





Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Rol angiogénico e inmunomodulador del antígeno Tn durante el crecimiento tumoral

Lic. Valeria da Costa Escaron

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
- Opción Biología Celular y Molecular -

Tutor: Dra. Teresa Freire

Laboratorio de Inmunomodulación y Desarrollo de Vacunas Facultad de Medicina, UdelaR Montevideo, Uruguay

Co-Tutor: Dra. Karina Mariño

Laboratorio de Glicómica Funcional y Molecular Instituto de Biología y Medicina Experimental Buenos Aires, Argentina

"Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas".

Marie Curie



Contenido

Índice de figuras	8
Abreviaturas	11
Agradecimientos	13
Resumen	15
Introducción	17
Cáncer de pulmón	18
Características demográficas	18
Clasificación, diagnóstico y tratamiento	19
Mecanismos moleculares asociados al desarrollo neoplásico	20
Papel del infiltrado celular inmune en el desarrollo tumoral	23
Alteraciones en la glicosilación: el antígeno Tn	26
Glicosilación: funciones y procesos	26
Papel del antígeno Tn en el cáncer	31
Reconocimiento de Tn por parte del Sistema Inmune	35
Leucocitos presentes en el microambiente tumoral	35
Receptores de lectina tipo C	37
MGL 39	
Angiogénesis	42
Hipótesis y Objetivos	46
Hipótesis	47
Objetivo general	47
Objetivos específicos	47
Materiales y Métodos	48
Obtención de células tumorales Tn ⁺	49
Línea celular	49
Generación de células Tn ⁺	49
Selección de variantes celulares Tn ⁺	50
Ensayo de actividad de la enzima T-sintasa	51
Caracterización glicobiológica las líneas LL/2 Tn ⁺ <i>in vitro</i>	52
Determinación de la expresión de glicosiltransferasas involucradas en la glicosilación por qRT-PCR	
Caracterización del glicofenotipo por citometría de flujo	52
Ensayo de inhibición del reconocimiento de 83D4 por MGL2-Fc	54
Evaluación de la naturaleza carbohidrato-dependiente de la interacción o lectinas biotiniladas mediante de-N-glicosilación	
SDS-PAGE y Western Blot	54
Reconocimiento de las líneas Tn ⁺ por células CHO-MGL2 ⁺	55
Análisis estructural de O-glicanos por HILIC-UPLC-FLR	56

Análisis estructural del N-glicoma celular por HILIC-UPLC-FLR	. 57
Caracterización de las propiedades celulares in vitro	. 59
Ensayo de viabilidad celular con Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MT	
Ensayo de formación de colonias	. 59
Ensayo de migración celular in vitro por cierre de herida	. 59
Ensayo de invasión celular in vitro	. 59
Producción de medio condicionado celular	. 60
Caracterización del crecimiento tumoral in vivo	. 60
Ratones	. 60
Modelo de crecimiento tumoral	. 61
Análisis del microambiente tumoral por citometría de flujo	. 61
Expresión de CD31, CD11c, MGL2 en tumores por microscopía	. 62
Cuantificación de citoquinas por real time RT-PCR	. 62
Determinación de la concentración de VEGF y PDGF por ELISA	. 63
Evaluación de actividad metaloproteasa	. 63
Evaluación de la respuesta inmune celular	. 64
Determinación de citoquinas y anticuerpos en el suero de animales con tumor	. 64
Estimulación de BMDC con medios condicionados o medios de disgregación de los tumores	
Generación de BMDC	. 65
Estimulación de BMDC	. 65
Ensayo de estimulación de linfocitos alogénicos	. 66
Análisis Bioinformático	. 66
Análisis estadístico	. 66
esultados	. 67
Objetivo 1 - Generación de células tumorales murinas que expresen el antíger	าด
Objetivo 2 - Caracterización glicofenotípica de las líneas celulares generadas análisis estructural de sus N- y O-glicanos por metodologías	•
cromatográficas	
Caracterización glicofenotípica de las líneas celulares generadas	.72
Análisis estructural de N- y O-glicanos presentes en las líneas celulares generadas	. 81
Objetivo 3 - Análisis de la replicación e invasión celular <i>in vitro</i> de crecimiento celular de la línea tumoral Tn ⁺	
Objetivo 4 - Evaluación del crecimiento tumoral de las líneas Tn ⁺ y Tn ⁻ en un modelo tumoral pre-clínico	. 90
Objetivo 5 - Análisis inmunológico a nivel local y sistémico de ratones con tumores Tn ⁺	. 93
Análisis inmunológico en el microambiente tumoral	. 93
Análisis inmunológico en ganglios drenantes	100

Análisis inmunológico en bazo	101
Análisis inmunológico en suero	103
Objetivo 6 - Estudio de la capacidad de los factores solubles producido células Tn ⁺ en inmunomodular la función de DC	
Objetivo 7 - Estudio de la interacción del antígeno Tn con el receptor M vitro	
Objetivo 8 - Evaluación del papel de las células MGL2 ⁺ en el crecimien y la inducción de la respuesta inmune de animales con tumores T	
Objetivo 9 - Evaluación del papel de MGL2 y el antígeno Tn en la angio tumoral	•
Objetivo 10 - Análisis de la relevancia de los resultados encontrados er modelo murino en cohortes de pacientes con adenocarcinomas	
Discusión y Perspectivas	126
Caracterización glicobiológica de las variantes celulares generadas	128
Estudio de las características tumorales in vivo	133
Papel del antígeno Tn en la angiogénesis tumoral	139
Conclusión y perspectivas finales	140
Anexos	143
Anexo 1: Primers utilizados para las qRT-PCR	144
Anexo 2: Concentración de anticuerpos utilizados	145
Concentración de anticuerpos utilizados para citometría de flujo	145
Concentración de Anticuerpos utilizados para Microscopía	145
Bibliografía	146

Figura	1 -	- Principales características de las células tumorales	21
Figura	2 -	- Las tres fases en la inmunoedición de cáncer, eliminación, equilibrio y	
9		escape	24
Figura	З_	- Principales tipos de N-glicanos.	
-		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
		- Síntesis de O-glicanos tipo mucina (O-GalNAc)	
		- Papel de Cosmc en la actividad de la enzima T-sintasa	29
Figura	6 -	- Alteraciones en el proceso de O-glicosilación por cambios en la	
		expresión de glicosiltransferasas.	32
Figura	7 -	- Relocalización de las GALNT del RE al aparato de Golgi por GALA	
		- Estructuras de glicanos alteradas en cáncer reconocidos por el sistema	
i iguiu		inmune	
Ciaura	^		
rigura	9 -	- Funciones de las diferentes isoformas de VEGF en la interacción con s	
		receptores	
		- Rol de VEGF y PDGF en la formación de vasos sanguíneos	
Figura	11	– Vasos sanguíneos anormales en el ambiente tumoral	44
Figura	12	- Citometría de flujo de las células LL/2 post-transfección con el	
Ü		anticuerpo α -Tn 83D4	68
Figura	13	- Citometría de flujo con el anticuerpo α-Tn 83D4	
_		- Citometría de flujo con anticuerpos α –Tn	
		- Actividad de la enzima T-sintasa (C1GALT1)	71
Figura	16	- Expresión de glicosiltransferasas y chaperona Cosmc asociadas al	
		proceso de O-glicosilación.	72
Figura	17	- Esquema representativa de las principales estructuras glicosídicas de	
Ū		O- y N-glicanos reconocidas por las lectinas vegetales utilizadas en el	
		trabajo	73
Figura	18	- Glicofenotipo de célula LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 por citometría de	
i igura	10		
- :	40	flujo con lectinas vegetales.	14
Figura	19	- Glicofenotipo de células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 con lectinas	
		vegetales por citometría de flujo	
Figura	20	- Reactividad de lectinas con células LL/2-H12 y LL/2-WT luego de la de	э-
		N-glicosilación por PNGAsa-F	77
Figura	21	- Lectin blot de proteínas totales celulares con VVL	78
		- Lectin blot de proteínas totales celulares con HPA	
_		- Lectin blot de proteínas totales celulares con SBA.	
		- Lectin blot de proteínas totales celulares con WGA	
		- Lectin blot de proteínas totales celulares con ConA.	80
Figura	26	- Esquema de flujo de trabajo de estudio analítico de glicanos en las	
		variantes celulares generadas	82
Figura	27	- Análisis por HILIC-UPLC-FLR de glicanos liberados con O-glicosidasa	١
Ü			83
Figura	28	- Análisis por HILIC-UPLC de glicanos liberados por β-eliminación	84
		- Análisis por HILIC-UPLC de monosacáridos liberados por β-eliminació	
riguia	29	·	
			85
Figura	30	- Identificación por HILIC-UPLC de N-glicanos de proteínas	
		membranarias liberados con PNGasa F	85
Figura	31	- Porcentaje de residuos de N-glicanos de Alta manosa y de residuos	
-		sialilados	86
Figura	32	- Morfología de las variantes celulares generadas	
		- Ensayo de proliferación celular con MTT	
		- Ensayo de formación de colonias	
		- Ensayo de curación de herida (wound healing)	
Figura	-36	- Ensavo de Invasión celular.	89

Figura 37 - Crecimiento tumoral en ratones inoculados con las celulas LL/2-vv I,
LL/2-H12 y LL/2-F9
Figura 39 - Actividad de metaloproteasas (MMP) en tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H1291
Figura 40 - Análisis de las células CD45 ⁺ en microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9
Figura 41 - Análisis de las células presentadoras de antígeno mieloides en microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9
Figura 42 - Imágenes de cortes histológicos de tumores de LL/2-WT y LL/2-H12 marcados con α-CD11c y α-MGL2
Figura 43 - Análisis de las células NK en microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9
Figura 44 - Análisis de las células T CD3+ CD4+ en microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 96
Figura 45 - Análisis de las células T CD3 ⁺ CD8 ⁺ en microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F997
Figura 46 - Análisis de las células NKT en microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9
Figura 47 - Análisis de expresión génica de citoquinas y moléculas asociadas a la respuesta inmune en el microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H1299
Figura 48 - Análisis de las células presentadoras de antígeno en ganglios drenantes de tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 y ratones naive
Figura 49 - Análisis de las células T CD4 de antígeno en ganglios drenantes de tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 y ratones naive
Figura 50 - Análisis de las células T CD8 de antígeno en ganglios drenantes de tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12 102
Figura 51 - Análisis de las células mieloides presentadoras de antígeno en bazos de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 y ratones naive
Figura 52 - Análisis de las células T CD4 ⁺ en bazos de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12103
Figura 53 - Relación IL-10 /IFNγ en suero de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12 por ELISA104
Figura 54 - Títulos de anticuerpos totales IgM e IgG en suero de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12
Figura 55 - Ensayos de estimulación de BMDC con medios condicionados de las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9
Figura 56 - Ensayos de estimulación de BMDC con medios de disgregación de tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12 107
Figura 57 - Reconocimiento por la proteína quimérica MGL1-Fc y MGL2-Fc a las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9
Figura 58 - La unión del anticuerpo anti Tn 83D4 se inhibe por la proteína quimérica MGL2-Fc en células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9
Figura 59 - Lisados de células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 son reconocidos en lectin-blot por MGL2-Fc
Figura 60 - SDS-PAGE de proteínas purificadas por cromatografía de afinidad con MGL2-Fc
Figura 61 - VVL inhibe el reconocimiento de MGL2-Fc en lisados celulares de LL/2-WT, LL/2-H12 y LL-2/F9111

Figura 62	! - Células CHO que expresan el receptor MGL2-Fc reconocen células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9112
Figura 63	- Células CHO que expresan el receptor MGL2-Fc reconocen las células - LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9113
	- Crecimiento tumoral en ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12114
Figura 65	- Análisis de las células CD45 ⁺ en microambiente tumoral de ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12115
J	6 - Análisis de las células mieloides presentadoras de antígeno en microambiente tumoral de ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12116
Figura 67	´ - Análisis de las T CD4⁺ en microambiente tumoral de ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12117
Figura 68	s - Análisis de las T CD8 ⁺ en microambiente tumoral de ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12
Figura 69	- Análisis de las NKT en microambiente tumoral de ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos119
Figura 70	- Cuantificación de citoquinas en el sobrenadante de esplenocitos totales provenientes de animales con tumores
Figura 71	- Vascularización de tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12121
Figura 72	e - Cuantificación de VEGF en medio condicionado de cultivo de las células LL/2-WT y LL/2-H12 por ELISA122
Figura 73	- Cuantificación de VEGF y PDGF en medio de disgregación de tumores de ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12
-	- Análisis de expresión génica de VEGF y PDGF en el microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12 123
Figura 75	- Análisis bioinformático con el software GEPIA2 en cohortes de pacientes humanos124
Figura 76	- Hipótesis integradora de los resultados obtenidos142

Abreviaturas

2-IA - 2-lodoacetamida

ADCC - Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ALK - Inhibidor de linfoma quinasa anaplásico

ARN - Ácido Ribonucleico

Asn - Asparagina

B3GNT6 – β1-3 N-acetilglucosaminiltransferasa 6

BCA – Ácido Bicinconínico

BSA - Albúmina de Suero Bovino

cDNA - ADN copia

CHO - Células de cáncer de ovario de hámster chino

CLR - Receptor de lectina tipo C

ConA - Lectina de Canavalia ensiformis, ConcavalinaA

CRISPR/Cas9–Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/Caspasa 9

DAPI – 4'.6-diamidino-2-fenilindol

DBA – Aglutinina de Dolichos biflorus

DC - Célula Dendrítica

DC-SIGN – DC-specific ICAM-3-grabbing non-integrin

DectiN-1 – DC-associated C-type lectin-1

Dectin2 - DC-associated C-type lectin-1

DMSO - Dimetilsulfósido

Dol-P - Dolicol fosfato

DTT - Ditiotreitol

ECA – Aglutinina de Erythrina cristagali

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

EGFR - Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EGTA – Ácido egtazico

ER - Retículo endoplásmico

FBS - Suero fetal bovino

Gal - Galactosa

GalNAc - N-acetil galactosamina

GALNT – pp-GalNAc transferasas

GlcNAc - N-acetil glucosamina

HBSS - Solución balanceada de sales de Hank

HPA - Aglutinina de Helix pomatia

IFN - Interferon

JAC - Jacalina

LB - Medio Luria-Bertani

LL/2 – Células de carcinoma de Lewis pulmonar murina

Mal II - Lectina de Maackia amurensis II

MBL - Lectina de unión a manosa

MeOH - Metanol

MGL – Macrophage galactose-type lectin

MHC - Complejo mayor de histocompatibilidad

MMP - Metaloproteasa

MQ - Macrófago

MR - Receptor de manosa

NK - Natural Killer

NO – Óxido nítrico

NRP - Neuropilina

NSCLC - Cáncer de pulmón de célula no pequeña

ON – Overnight

Ost - Oligosacáridotransferasa

PBS - Buffer fosfato salino

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF β – Factor de crecimiento derivado de plaquetas β

PFA - Paraformaldehido

PNA - Aglutinina de Arachis hypogaea

PNGasa-F - Peptido-N-glicosidasa F

ppGalNAc-Ts - ppGalNAc transferasa

qPCR - PCR cuantitativa

RIPA – Buffer de Ensayo de Radioinmunoprecipitación

ROS - Especie reactiva de oxígeno

RPMI - Medio Roswell Park Memorial Institute

SBA – Aglutinina de Glycine max

SCLC - Cáncer de pulmón de célula pequeña

SDS - Sodio dodecil sulfato

Ser - Serina

SIGLECs - Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins

SNA - Aglutinina de Sambucus Nigra

SPA - Surfactante pulmonar A

SPD - Surfactante pulmonar D

ST6GalNAc-I - α2-6 sialiltransferasa I

sTn - sialil Tn

TACA - Antígenos carbohidratos asociados a tumor

TAM - Macrófagos asociados a tumor

TBS - Buffer Tris-salino

Thr - Treonina

TIL - Linfocitos infiltrados al tumor

Tr1 – T regulador de tipo 1

Treg – T regulador

VEGF - Factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGF-R – Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

VVL - Isolectina de Vicia villosa

WGA – Aglutinina de Ariticum vulgaris

Este trabajo fue posible gracias a la ayuda y apoyo de muchas personas, a las cuales les quiero expresar mi agradecimiento.

A mis tutoras, la Dra. Teresa Freire y la Dra. Karina Mariño, que me acompañaron y enseñaron durante todo este camino e impulsaron mi crecimiento tanto a nivel científico como personal. Quiero agradecerles por todo lo que me enseñaron, por su generosidad y dedicación, por contagiarme con su energía y su espíritu científico, y por todo su apoyo tanto a nivel científico como personal. Particularmente, estoy muy agradecida con Teresa por su confianza en mí desde el primer día y por abrirme las puertas de su laboratorio; y por su invaluable apoyo para el desarrollo de mi carrera como científica y docente durante estos años. Y quisiera agradecer también a Karina por su compromiso e interés en este proyecto, incluso desde antes de ser mi tutora, por contagiarme todo su amor por la glicobiología y por todas las charlas motivacionales y consejos.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Inmunomodulación y Desarrollo de Vacunas de Facultad de Medicina: Sofía, Florencia, Monique, Mercedes, Pablo, Santiago y Natalie, por siempre estar dispuestos a dar una mano, por su compañerismo y apoyo, y por las incontables horas de mesada y charlas compartidas, que hacen del lugar de trabajo mucho más agradable y entretenido. También quiero agradecer a Miguel, por siempre estar dispuesto a ayudarme y a Paula, por sus consejos, por enseñarme y acompañarme en mis primeros pasos en el laboratorio, y por toda su ayuda en los experimentos.

A mis compañeros del Laboratorio de Glicómica Funcional y Molecular, Alejandro, Anabela y Mora, por hacer más divertidas y productivas mis pasantías, por siempre recibirme con buena onda y hacerme sentir como en casa, y por todo su apoyo y ayuda en los experimentos y en el procesamiento de los datos.

A la Dra. Sandra van Vliet, por recibirme en su laboratorio y por su interés e invaluables aportes y consejos para enriquecer este trabajo. A la Dra. Yvette van Kooyk por permitirme hacer una pasantía en su laboratorio.

A Ernesto, Neha, Joost y Thanos del Departamento de Biología Molecular, Celular e Inmunología en Amsterdam, por su ayuda y apoyo durante la pasantía en Holanda.

Al Dr. Diego Croci por su interés en este trabajo, por sus consejos y ayuda en los experimentos de angiogénesis.

Al Dr. Eduardo Osinaga, por sus consejos y sugerencias, y por proporcionar herramientas muy valiosas para el desarrollo del proyecto.

A todos los miembros del Departamento de Inmunobiología, por todos los momentos compartidos y por las discusiones científicas sumamente enriquecedoras.

A la Unidad de Reactivos Biológicos de Facultad de Medicina, a la Unidad de Microscopia de Facultad de Medicina, y a la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur, por el uso de sus instalaciones y por su colaboración en los experimentos.

A los miembros del tribunal, al Dr. Otto Pritsch, la Dra. María Eugenia Giorgi y el Dr. Celso Reis, por aceptar evaluar este trabajo.

Por último, quiero destacar que este trabajo fue posible gracias al enorme apoyo de mi familia y amigos. Especialmente, quiero agradecer a mis padres y a mi hermana, por su apoyo incondicional, por su confianza en mi, por estimularme constantemente a ser una mejor persona y por todo su amor y cariño. A Ignacio, por estar siempre, por ser mi gran pilar cuando las cosas se complicaban, por ayudarme y apoyarme, y por todo su amor. A toda mi familia y amigos, por su apoyo, amor y por estar siempre presentes. Quiero dedicar este trabajo especialmente a mis abuelos, que siempre confiaron en mí y sé que estarían muy orgullosos.

A su vez, quiero agradecer a las **agencias financiadoras** por el apoyo económico para este trabajo:

A la ANII por la beca de Maestría.

A la CAP por la beca de Doctorado.

A CSIC, por el financiamiento del proyecto "Evaluación de las propiedades inmunomoduladoras del antígeno Tn durante el crecimiento tumoral" dentro del programa Iniciación a la Investigación.

Al programa MIA de CSIC por el financiamiento para las pasantías en Holanda y Argentina, así como la asistencia al 5to Congreso Latinoamericano de Glicobiología.

A PEDECIBA, por el financiamiento para la pasantía en Holanda.









El antígeno Tn se define como una unidad de *N*-acetil-galactosamina (GalNAc) unida a residuos de serina o treonina (GalNAc-O-Ser/Thr), que se expresa en más del 90% de los adenocarcinomas humanos. Este antígeno participa en fenómenos de adhesión, migración y proliferación de las células tumorales y su expresión se ha relacionado con la agresividad de algunos tipos de cáncer, constituyendo tanto una herramienta de diagnóstico como un potencial blanco de inmunoterapias. Estudios previos han demostrado que la presencia de Tn está asociada con la malignidad y el potencial metastásico de la célula tumoral. Este antígeno se origina por un bloqueo en la vía de *O*-glicosilación tipo mucina, que previene su elongación hacia *core* 1 y otros O-glicanos. En particular, la enzima responsable de la síntesis de *core* 1 es la *core*-1-sintasa, cuya actividad depende de una chaperona, Cosmc.

La información codificada por glicanos es interpretada a partir de proteínas evolutivamente conservadas específicas de carbohidratos, conocidas como lectinas. En particular, Tn es reconocido por un receptor lectina de tipo C (CLRs), denominado MGL (por sus siglas en inglés, *macrophage galactose-type lectin*), que reconoce glicoproteínas ricas en galactosa (Gal) o GalNAc. MGL se expresa en la superficie de células dendríticas y macrófagos, y participa en el reconocimiento e internalización de moléculas provenientes de patógenos y antígenos tumorales. Esta lectina modula la respuesta inmune controlando la funcionalidad de diferentes tipos celulares, influyendo, por ejemplo, en la polarización de células T. Se ha propuesto que MGL participa en la regulación inducida por células tumorales a través del reconocimiento del antígeno Tn. Mientras que en humanos hay una única isoforma de este receptor, en ratones hay dos variantes, MGL1 y MGL2, siendo MGL2 la isoforma que más se asemeja al MGL humano por su especificidad de reconocimiento.

En este trabajo, desarrollamos líneas celulares de cáncer de pulmón con glicosilación aberrante para caracterizar el rol de Tn durante el crecimiento tumoral. Para ello, generamos variantes de la línea celular LL/2 mediante la tecnología CRISPR/Cas9 dirigida a insertar mutaciones en el gen que codifica para la chaperona Cosmc. La expresión de Tn en las variantes celulares generadas se confirmó mediante glicofenotipo con lectinas vegetales, anticuerpos específicos anti-Tn, y evaluando la actividad T-sintasa. Tambien se demostró el reconocimiento de estas células Tn⁺ por el receptor MGL2.

Al inocular las células en ratones singénicos, se observó que las células Tn⁺ generan tumores más agresivos, con un crecimiento acelerado y mayor grado de vascularización. A su vez, los tumores Tn⁺ se caracterizaron por un mayor infiltrado de células CD11c⁺ F4/80⁺ que expresan mayores niveles de MGL2 que los tumores Tn⁻. También se observó un aumento en el infiltrado de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, caracterizado por una mayor expresión de IL-10.

Finalmente, se evaluó el crecimiento tumoral en un modelo de ratones MGL2-DTR, en los cuales la inyección de toxina diftérica permite eliminar de forma selectiva las células que expresan MGL2⁺. La depleción de células MGL2⁺ llevó a una reducción del tamaño de los tumores generados a partir de la variante celular Tn⁺, pero no afectó el crecimiento tumoral de los tumores derivados de la línea parental (Tn⁻). A su vez, la vascularización también se vio disminuida, así como la expresión de IL-10 en el infiltrado de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

En suma, estos resultados indican que tanto el antígeno Tn como el receptor que lo reconoce MGL2 tienen un papel relevante en el crecimiento y en la angiogénesis tumoral, y son responsables de procesos inmunomoduladores que disminuyen la respuesta y potencian el desarrollo tumoral.



Cáncer de pulmón

Características demográficas

En el ámbito de la salud mundial, las enfermedades no transmisibles son responsables de la mayor barrera para aumentar la expectativa de vida en el siglo XXI¹. Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades neoplásicas se encuentra en el primer o segundo lugar en las causas de muerte por debajo de los 70 años en 91 de 172 países, y en tercer o cuarto lugar en 22 países¹. Por otra parte, según GLOBOCAN, en 2018 se estimaban 18.1 millones de nuevos diagnósticos de cáncer, y 9,6 millones de muertes por estas enfermedades a nivel mundial¹.

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado, tanto para hombres como para mujeres, representando el 11,6% (2,1 millones) de casos a nivel mundial. Además, es la principal causa de muerte entre enfermedades neoplásicas, responsable de 18,4% o 1,8 millones de los casos mundiales de muerte por estas patologías¹. Esta enfermedad presenta variabilidad en número de casos según la región geográfica, principalmente causado por la madurez de la epidemia de tabaco y diferencias en los patrones de exposición histórica al tabaco, incluyendo la intensidad y duración del tabaquismo, el tipo de cigarro y tabaco disponible en la región¹.

En hombres, el cáncer de pulmón es el más frecuentemente diagnosticado, y la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial, seguido por cáncer de próstata y cáncer colorrectal¹. En cambio, el cáncer de pulmón es el tercer tipo de cáncer más diagnosticado en mujeres, antecedido por el cáncer de mama y el cáncer colorrectal¹. En cuanto a la mortalidad, ocupa el segundo lugar en mujeres, antecedido por el cáncer de mama, y seguido por el cáncer colorrectal¹.

En Uruguay, a nivel poblacional, el cáncer es la segunda causa de muerte, antecedida por las enfermedades cardiovasculares². Sin embargo, es la primera causa de muerte en personas menores a 70 años². Durante el período 2012-2016 se registraron 40288 muertes por cáncer, lo cual representa un promedio de 8058 muertes cada año². Aproximadamente un tercio de tales muertes se deben a cánceres vinculados al consumo de tabaco (tráquea y pulmón, laringe, cavidad oral y faringe, esófago, vejiga, riñón, páncreas, cuello de útero, entre otros)². En hombres, el cáncer de pulmón es el segundo en incidencia, pero el primero en mortalidad2. En mujeres el cáncer de pulmón ocupa el cuarto lugar en incidencia y el tercero en mortalidad². A

pesar del descenso sostenido de la mortalidad por cáncer de pulmón en hombres que se observa desde hace más de 25 años, aún se mueren anualmente más de 1300 uruguayos por esta causa (aproximadamente 1000 hombres y más de 300 mujeres en el período 2012-2016)². Por otro lado, en mujeres, la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón aumenta dramáticamente a un 3.5% por año².

Clasificación, diagnóstico y tratamiento

El cáncer de pulmón se puede clasificar en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés para non-small cell lung cancer) y cáncer de pulmón de célula pequeña (SCLC, por sus siglas en inglés para small cell lung cancer). Alrededor del 80 al 85% de los casos de cáncer de pulmón son clasificados como NSCLC, dentro de los cuales podemos distinguir los adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas y carcinomas de células grandes³. Los adenocarcinomas pulmonares se originan de células secretoras de mucus, y ocurre principalmente en personas fumadoras, aunque también es el tipo de cáncer con mayor incidencia en personas no fumadoras y en personas jóvenes³. En cuanto al carcinoma de células escamosas, se originan de las células que tapizan el interior de las vías respiratorias de los pulmones, y los casos están generalmente relacionados con antecedentes de tabaquismo³. Por último, el carcinoma de células grandes se origina en cualquier región del pulmón y tiende a crecer y propagarse rápidamente³. Con respecto al SCLC, corresponde al 10-15% de los casos, y tiene una alta tasa de propagación a otros tejidos³. Debido a su alta tasa proliferativa, estos pacientes responden bien a la quimioterapia y radioterapia, pero suelen tener una alta tasa de recurrencia³.

Uno de los grandes problemas del cáncer de pulmón, es que es diagnosticado, en general, en estadios avanzados, ya que en etapas tempranas generalmente es asintomático⁴. A su vez, las metodologías de **diagnóstico** actuales tienen diversas limitaciones y riesgos asociados⁵. Más allá que el despistaje o *screening* por tomografía computada de baja dosis reduce significativamente el riesgo de muerte por cáncer de pulmón, no es un método de diagnóstico 100% efectivo⁵. Por otro lado, presenta altas probabilidades de resultados falsos positivos, lo que genera la necesidad de exámenes adicionales de imagenología o biopsia, que incluso pueden desencadenar, aunque en casos muy raros, en la hospitalización y muerte del paciente⁵. Por estos motivos, no son técnicas incorporadas en los exámenes de chequeo médico rutinario en la población general y son indicadas frente a la consulta en pacientes con alto riesgo a desarrollar cáncer de pulmón o por la presencia de

síntomas⁵.

En cuanto al tratamiento, los pacientes con SCLC principalmente reciben radioterapia, posiblemente combinada con quimioterapia. En caso de pacientes con NSCLC en estadios tempranos, la mayoría reciben cirugía, a veces combinada con quimioterapia o radioterapia. En el caso del NSCLC de estadios avanzados, los pacientes son tratados con quimioterapia, radioterapia, o una combinación de ambas. En algunos casos, se incluye al tratamiento anticuerpos monoclonales, como bevacizumab (que reconoce al factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGF), o cetuximab (que reconoce al receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR) e inhibidores de enzimas específicas, como erlotinib (que inhibe al receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR) y crizotinib (inhibidor de linfoma quinasa anaplásico, ALK y c-ros oncogén 1, ROS1)⁴.

En las últimas décadas se ha puesto en evidencia los significativos progresos en las estrategias terapéuticas contra el cáncer, particularmente con la incorporación de tratamientos personalizados en función de las características moleculares y biológicas de cada tumor⁶. Sin embargo, los pacientes son muchas veces resistentes al tratamiento desde el comienzo, o se vuelven resistentes en el correr del mismo. Por este motivo, la búsqueda de nuevos biomarcadores para diagnóstico y terapia son imprescindibles para frenar este ascenso en mortalidad por cáncer.

Mecanismos moleculares asociados al desarrollo neoplásico

El cáncer consiste en un deterioro patológico del proceso que controla la proliferación, diferenciación y muerte celular. Antiquamente, se creía que los tumores eran masas de células cancerosas con alta tasa proliferativa. Sin embargo, hoy en día se entiende al tumor como un tejido complejo formado por múltiples tipos celulares que participan interaccionando entre sí7. Entre ellas, podemos encontrar a las células tumorales, pero también a las células estromales, que forman el tejido conectivo de sostén asociado a tumor y participan activamente de la tumorigénesis, y las células inmunes infiltrantes, que participan en la inducción de una respuesta inmunológica anti-tumoral⁷. Por este motivo, la biología de los tumores no debe ser entendida solo desde los atributos de la célula tumoral, sino que debe comprender e integrar la contribución de las células estromales y de las células inmunes a la tumorigénesis, que junto con las células neoplásicas constituyen el microambiente tumoral 7.

Hanahan y Weinberg describieron las principales características de las células tumorales^{7,8} (Figura 1). Una de estas características es la proliferación celular **crónica sostenida**⁷. Los tejidos normales controlan la producción y secreción de factores de crecimiento que instruyen a la célula en la entrada y progresión del ciclo celular, de esta forma asegurando la homeostasis del número celular y manteniendo la arquitectura de los tejidos⁷. Sin embargo, la célula tumoral puede desregular estas señales mediante diversos mecanismos. Por ejemplo, producen factores de crecimiento que actúan de forma autócrina, estimulando la proliferación, o pueden alterar la estructura de los receptores o las moléculas de la vía de activación, para que la señal de los factores de crecimiento ocurra de forma ligando-independiente^{7,9}



Figura 1 – Principales características de las células tumorales. Se indican las características distintivas de la transformación maligna. Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011 ⁷.

Otra característica de las células tumorales es la de **evadir los programas de regulación negativa del crecimiento celular**, y de esta forma mantener su proliferación exacerbada⁷. Los genes supresores del crecimiento celular actúan con dos circuitos reguladores complementarios, por un lado gobernando la decisión de la célula de proliferar, o alternativamente activando programas de senescencia o apoptosis⁷. En la célula tumoral, estos mecanismos se encuentran disminuidos o inactivos, muchas veces debido a mutaciones o pérdida de función de las proteínas supresoras⁹.

Por otro lado, las células tumorales son capaces de resistir a la apoptosis, que se induciría bajo las señales de estrés dadas por la alta expresión de oncogenes y el daño

en el ADN causado por la hiper-proliferación⁷, asegurando su persistencia en el tiempo.

A su vez, las células tumorales tienen la capacidad de alcanzar la **inmortalidad replicativa**. Las células normales logran replicarse un número limitado de veces, antes de alcanzar la senescencia, un estado no proliferativo pero viable, o morir por apoptosis⁷. Sin embargo, en algunas ocasiones, las células son capaces de evadir estos mecanismos exhibiendo potencial replicativo ilimitado, mecanismo que se conoce como inmortalización⁷.

Las células tumorales son capaces también de inducir **angiogénesis**⁷. Dada la alta tasa proliferativa, los tumores requieren grandes cantidades de nutrientes y oxígeno, así como vías para eliminar los desechos celulares y el dióxido de carbono⁷. La neovasculatura asociada al tumor, que se genera por el proceso de angiogénesis, cumple con estas funciones¹⁰. El proceso de formación de vasos sanguíneos, así como los mecanismos que regulan este fenómeno, serán abordados más adelante, ya que representan un tema importante en esta tesis.

Por otro lado, las células tumorales tienen **capacidad invasiva y metastásica**⁷. Esto se debe, principalmente, a que presentan alteraciones en su morfología y en su capacidad de adhesión a otras células y a la matriz extracelular¹¹. El proceso de invasión y metástasis consiste en múltiples pasos, comenzando por la invasión local, luego intravasación a vasos sanguíneos o linfáticos cercanos, el tránsito de las células por el torrente sanguíneo o linfático, y luego la extravasación de dichas células hacía el parénquima de tejidos distantes¹². Esto lleva a la formación de nódulos de células tumorales, denominadas micrometástasis, que pueden crecer a tumores macroscópicos, colonizando así otros tejidos⁷.

Otra característica de la célula tumoral es su **inestabilidad genómica y su alta tasa de mutagénesis**⁷. De hecho, la adquisición de las características mencionadas anteriormente se debe en gran parte a las alteraciones genómicas de las células neoplásicas¹³. Algunos genotipos mutantes le confieren ventajas selectivas a subclones de las células tumorales, permitiendo su expansión clonal y eventual dominancia en el tejido¹³. De esta forma, la progresión tumoral puede ser retratada como una sucesión de expansiones clonales, cada una disparada por la adquisición de un genotipo mutante ventajoso, o incluso por cambios epigenéticos no mutagénicos¹⁴.

Por otro lado, como se mencionaba anteriormente, el estudio de la biología del

tumor no se basa únicamente en las características de la célula tumoral, sino que son las propiedades emergentes del conjunto de las células tumorales, estromales, y las células del sistema inmune, que componen el tumor. Las células infiltrantes del sistema inmune innato y adaptativo promueven un determinado **estado inflamatorio asociado al tumor**⁷. Las características de la respuesta inmune anti-tumoral y los **mecanismos de evasión** de dicha respuesta serán abordados más adelante⁷.

Por último, una característica de la célula tumoral es el cambio en su **metabolismo energético** para poder mantener la alta tasa proliferativa⁷. Bajo condiciones biológicas aeróbicas normales, las células procesan glucosa a piruvato, y luego a dióxido de carbono en la mitocondria por respiración oxidativa. Sin embargo, en condiciones anaeróbicas, como las encontradas en el ambiente hipóxico del tumor, la célula transforma el piruvato en lactato por fermentación láctica¹⁵. Una característica distintiva de la célula tumoral es el denominado efecto Warburg, en el cual y aún en presencia de oxígeno, la célula tumoral reprograma su metabolismo aumentando la obtención de energía vía glicólisis, lo cual la vuelve fuertemente dependiente de carbohidratos y favorece el estado de alta tasa proliferativa^{7,16}.

Todas estas características le confieren ventajas a la célula tumoral al momento de proliferar de forma descontrolada, invadir y colonizar otros tejidos. A su vez, se ha visto que las propiedades biofísicas y bioquímicas de la matriz extracelular asociada al tumor influye en cada una de estas características distintivas descriptas por Hahanah y Weinberg, por lo que la prevención y terapia exitosa del cáncer requiere un entendimiento íntimo de la retroalimentación entre la matriz extracelular, las células tumorales, las células estromales y las células inmunológicas ¹⁷. Por ello, la comprensión de los mecanismos implicados en favorecer las características descritas es fundamental en la búsqueda de nuevos blancos de fármacos anti-tumorales, así como también en el desarrollo de herramientas de diagnóstico temprano.

Papel del infiltrado celular inmune en el desarrollo tumoral

El rol del sistema inmune en el desarrollo tumoral fue por primera vez planteado en 1909, cuando Paul Ehrlich propuso que las defensas naturales de un organismo podrían prevenir que células transformadas se desarrollen a tumores¹⁸. Sin embargo, se requirió un mayor entendimiento del sistema inmune para el surgimiento de las primeras hipótesis de **inmunovigilancia** en enfermedades neoplásicas. Las mismas aparecieron alrededor de 1950 y fueron postuladas por Lewis Thomas¹⁹ y Frank Burnet²⁰. En estas hipótesis, se sugería que el sistema inmune podría reconocer neoantígenos en las células tumorales y posteriormente eliminarlas, manteniendo de

esta forma la homeostasis tisular²¹. Sin embargo, la falta de evidencias experimentales en modelos animales que apoyaran esta teoría dio lugar al planteamiento de otras hipótesis sobre el papel del sistema inmune en el cáncer, como por ejemplo la teoría de **inmunoestimulación**, en la que el sistema immune promueve el crecimiento tumoral²². Hacia 1978, el concepto de inmunovigilancia había caducado, y el campo de la inmunología tumoral continuó su camino en el estudio de antígenos tumorales y el desarrollo de inmunoterapias para tratar a los pacientes con estas patologías²³. Recién entre 1994 y 1998 surgieron las primeras evidencias moleculares detallando el papel del interferón (IFN) $\gamma^{24,25}$ y de la perforina en limitar o contener el crecimiento tumoral²⁶.

En el 2002, Dunn y colaboradores fueron los primeros en proponer la teoría de la **inmunoedición** del cáncer²³. Esta teoría plantea que el sistema inmune no sólo protege del desarrollo del tumor, sino que cumple otras funciones al esculpir los tumores en desarrollo y modelar la enfermedad neoplásica (Figura 2)²³. El modelo se basa en el resultado de tres procesos, denominados "**Las tres E**": eliminación, equilibrio y evasión²³. En la fase de **eliminación**, ocurre la inmunovigilancia, en la cual las células inmunes reconocen las células neoplásicas y las eliminan²³. Esto se debe a que los tumores sólidos alcanzan un determinado tamaño en el cual comienzan a invadir otros tejidos y requieren un suministro sanguíneo mayor, para lo cual se forma neovasculatura por el proceso angiogénico²³. El crecimiento invasivo causa daño en el tejido circundante, desencadenando señales inflamatorias que reclutan células del sistema inmune innato al sitio de inflamación, como macrófagos (MQ), células dendríticas (DC) y células *natural killer* (NK)²³. A su vez, se activa la respuesta inmune

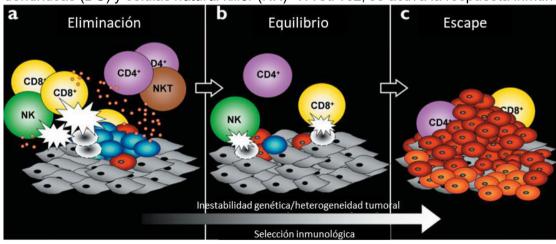


Figura 2 – Las tres fases en la inmunoedición de cáncer, eliminación, equilibrio y escape. En la fase de eliminación, se eliminan las células tumorales (azules) por la inmunovigilancia. Durante el equilibrio el sistema inmune promueve la selección o generación de células tumorales con capacidad de evadir el ataque del mismo (rojo). En la fase de escape el tumor modificado por el sistema inmune se expande de forma descontrolada. En gris re representa el estroma y las células no transformadas. Los círculos naranjas representan las citoquinas liberadas por las células inmunes, y los *flashes* blancos la actividad citotóxica dirigida sobre las células tumorales. Modificado de Dunn et al 2002 ²³.

adaptativa, y las células T infiltrantes son estimuladas a producir IFNy²³. Muchas veces, este proceso es exitoso y lleva a la completa remoción de las células tumorales del organismo. Sin embargo, en algunos casos, el sistema inmune no logra la remoción completa de las células neoplásicas, y se ingresa a una fase de **equilibrio** dinámico²³. En esta fase, los linfocitos generan una presión selectiva potente sobre las células tumorales que es suficiente para contener su crecimiento, pero no para eliminarlas completamente²³. En este período ocurre una selección Darwiniana, ya que la mayoría de las variantes de las células tumorales originales son destruidas, pero surgen nuevas variantes con mutaciones que le otorgan una ventaja selectiva de resistencia al ataque por parte del sistema inmune²³. Es probable que la fase de equilibrio sea la más larga de este proceso, ya que puede durar hasta varios años²³. Por último, en la fase de **escape**, las variantes celulares tumorales que han adquirido la capacidad de evadir la detección por parte del sistema inmune debido a cambios genéticos o epigenéticos comienzan a expandirse de forma descontrolada, lo que da lugar al desarrollo de la enfermedad maligna²³.

Alteraciones en la glicosilación: el antígeno Tn

Glicosilación: funciones y procesos

La superficie celular se encuentra compuesta por una variedad glicoconjugados, macromoléculas que contienen carbohidratos en sus estructuras. La porción glicosídica en las mismas puede variar ampliamente, tanto en su estructura como en cuanto a su contribución al tamaño del glicoconjugado²⁷. La natural asimetría de la membrana, exponiendo la porción glicosídica mayoritariamente hacia el exterior de la célula y generando de esa forma el **glicocálix**²⁷, remarca su importancia en procesos de comunicación célula-célula, en la interacción con la matriz extracelular y diversos factores solubles²⁸. En este sentido, los glicoconjugados, tanto de membrana celular como secretados, pueden modular o mediar una variedad de eventos críticos para el desarrollo y función de un organismo²⁷. A su vez, también pueden mediar interacciones entre diferentes organismos, como por ejemplo entre el huésped y un parásito, patógeno u organismo simbionte^{29,30}.

La glicosilación es una de las modificaciones post-traduccionales más frecuentes en proteínas. Una proteína puede presentar modificaciones en el esqueleto polipeptídico a través de enlaces N- u O-glicosídicos²⁷. Se define un **N-glicano** como aquel oligosacárido unido covalentemente a un residuo de asparagina (Asn); en eucariontes, se requiere una secuencia consenso para que este proceso se produzca, donde la Asn está seguida por cualquier aminoácido menos prolina, y a continuación por serina (Ser) o treonina (Thr) (Asn-X-Ser/Thr)²⁷. A su vez, los N-glicanos de eucariontes comparten una región core pentasacárídica (Man₃GlcNAc₂) y, de acuerdo a como este core está decorado o elongado pueden ser subdivididos en tres clases: N-glicanos de alta manosa, complejos o híbridos²⁷ (Figura 3). Por otro lado, los **O**glicanos pueden ser clasificados según su estructura, mucho más diversa que la de los N-glicanos, pero los más comunes (que se definen como O-glicanos tipo mucina, debido a que fueron inicialmente descriptos en estas glicoproteínas) se inician por la adición de una N-acetilgalactosamina (GalNAc) a un residuo de Ser o Thr, pudiendo extenderse y presentando, en base a esta extensión, ocho tipos de estructuras core³¹ (Figura 4). En este sentido, las mucinas son glicoproteínas altamente O-glicosiladas, ya que hasta un 80% de su peso puede corresponder a carbohidratos y presentan una gran cantidad de O-glicanos en clusters³².

A diferencia de las proteínas, las estructuras de los glicanos no se biosintetizan en base a un molde³³. En cambio, la estructura de los mismos se define por la acción

secuencial y muchas veces competitiva de glicosiltransferasas y glicosidasas, donde algunas de ellas requieren chaperonas para ser activas^{27,33}. Además, y considerando que este proceso postraduccional se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, también se requieren transportadores para llevar azúcares nucleótido (formas activadas de los monosacáridos destinados a la biosíntesis de glicoconjugados) que se sintetizan en el citoplasma²⁷. Este complejo sistema tiene como consecuencia una gran diversidad de estructuras glicosídicas producidas, que no son completamente predecibles simplemente en base a los niveles de expresión génica de las glicosiltransferasas relevantes en este proceso³⁴. Es importante tener en cuenta además que el repertorio de enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación de glicoconjugados es célula- y organismo-dependiente, y que además, el producto de la misma es influenciado, entre otros, por el ambiente y el estado nutricional de la célula³⁵. Esto se traduce en un perfil de glicanos (o glicoma) celular altamente variable y dinámico, que resulta en una herramienta poderosa para la generación de diversidad y complejidad biológica, aunque presenta un desafío notable en su caracterización estructural y funcional³⁵.

Comenzando con los **N-glicanos** y focalizando en células eucariotas, los mismos comparten un core común (Manα1-3(Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-), y como se mencionaba anteriormente, se pueden clasificar en tres tipos: 1- alta manosa, en los cuales el core es extendido únicamente con residuos de manosa, 2- Complejos, en los cuales el core se ramifica en antenas iniciadas por la adición de N-

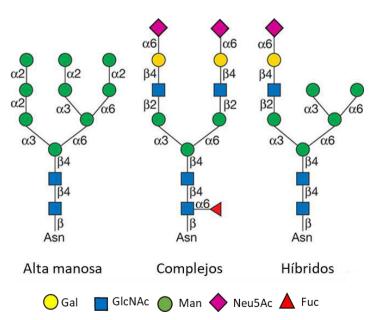


Figura 3 - Principales tipos de N-glicanos. Se presentan ejemplos representativos para cada tipo de N-glicano: alta manosa (izquierda) complejos (centro) e híbridos (derecha). Modificado de Varki 2015 ²⁷.

acetilglucosamina (GlcNAc), y las mismas pueden ser posteriormente galactosiladas (y sialiladas), y finalmente, 3- híbridos-, en los cuales el brazo α1-6 del core se decora con manosa, mientras el el brazo α1-3 puede hacerlo con una o dos GlcNAc (Figura 3)²⁷.

La biosíntesis de los Nglicanos ocurre en dos fases y en dos compartimientos retículo celulares, el

endoplásmico (ER) y el aparato de Golgi³⁶. En la primer fase, un oligosacárido ensamblado sobre el carrier lipídico dolicol fosfato (Dol-P) es transferido a una Asn, en una secuencia Asn-X-Ser/Thr sobre proteínas secretorias o membranarias por el complejo oligosacáridotransferasa (Ost)27. En la segunda fase, el oligosacárido es procesado por una serie de glicosidasas y posteriormente glicosiltransferasas en el lumen del ER y en el aparato de Golgi³⁶.

Por otro lado, los O-glicanos de tipo mucina (O-GalNAc), se sintetizan en el aparato de Golgi³¹. La disposición en el aparato de Golgi es similar a una línea de ensamblaje, ya que las reacciones tempranas ocurren en el cis-Golgi y las tardías en el trans-Golqi²⁷. La localización subcelular, la actividad y la especificidad de sustrato, así como de las glicosiltransferases, son críticas en la determinación del rango de Oglicanos sintetizados por la célula³¹.

El primer paso en la biosíntesis de los glicanos O-GalNAc es la adición de GalNAc en un enlace tipo α a una serina o treonina por la acción de las polipéptido-GalNAc transferasas (ppGalNAc-Ts o GALNTs), formando así el antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) (Figura 4)^{27,37}. Este residuo de GalNAc sin elongar es una estructura que no se encuentra normalmente en glicoproteínas secretadas o de membrana, siendo considerado una forma inmadura de O-glicosilación, y por ello, antigénica³⁷. En humanos existen 20 genes codificantes para GALNTs, lo que provee redundancia y complementación en especificidad de sustrato³¹. A su vez, la actividad o expresión diferencial de GALNTs han sido asociadas con la progresión tumoral³¹. Por ejemplo GALNT2 ha sido identificada como una importante reguladora en el carcinoma hepatocelular³⁸ y oral³⁹. Por otro lado, la expresión aberrante de GALNT3 contribuye a

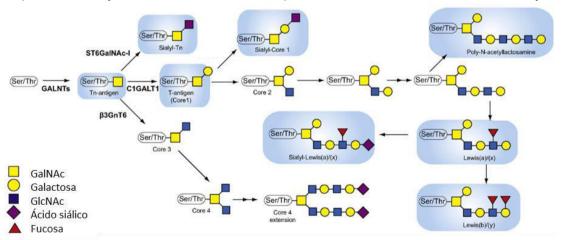


Figura 4 - Síntesis de O-glicanos tipo mucina (O-GalNAc). Se muestran los principales core y las enzimas vinculadas a los primeros pasos de la vía. GALNTs- polipéptido-GalNAc transferasas; ST6GalNAc-I α(2-6)N-acetil-galactosaminil-sialiltransferasa 1: C1GALT1β3Galactosiltransferasa; β3GnT6- β1-3 N-acetilglucosaminiltransferasa 6. En azul se marcan aquellas estructuras que han sido caracterizadas en células tumorales. Modificado de Chia et al 2016 40.

la progresión del cáncer de pulmón⁴⁰ y GALNT6 tiene un rol crítico en la progresión de cáncer de mama⁴¹, ovario⁴² y gástrico⁴³.

A partir del antígeno Tn, los O-glicanos se pueden elongar hacia diversos *core*, incluyendo el *core* 1 (Galβ1-3GalNAc-O-Ser/Thr), obtenido por la acción de la enzima T-sintasa o C1GALT1. Esta enzima requiere, para encontrarse en su forma activa, la acción de la **chaperona Cosmc**, o C1GALT1C1, durante su síntesis en el ER⁴⁴. Como se observa en la Figura 5, esta chaperona es esencial para la actividad de la enzima T-sintasa, ya que se une a la misma en el retículo endoplásmico durante su síntesis y participa en su correcto plegamiento ⁴⁴. En la ausencia de la chaperona funcional, la T-sintasa es plegada de forma incorrecta y traslocada al citoplasma, donde se ubiquitina y es degradada por el proteosoma 26S⁴⁴. Si el *core* 1 es apropiadamente sintetizado, puede sialilarse, elongarse o ramificarse hacia estructuras tipo *core* 2 (Figura 4).³⁷ La GalNAc también puede alternativamente extenderse hacia *core* 3 por

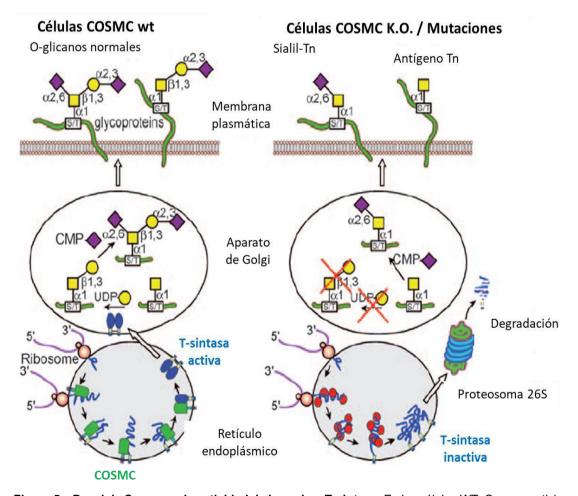


Figura 5 – Papel de Cosmc en la actividad de la enzima T-sintasa. En las células WT, Cosmc participa en el plegamiento de la enzima T-sintasa durante su síntesis, para obtener una enzima funcional y continuar con la síntesis de O-glicanos. Frente a mutaciones o deleciones de la chaperona Cosmc, la enzima T-sintasa no se pliega de manera adecuada y es degradada. Esto tiene como consecuencia la aparición del antígeno Tn o silail-Tn en la superficie celular. Modificado de Ju et al 2011⁴⁴.

la acción de la enzima β1-3 N-acetilglucosaminiltransferasa 6 (B3GNT6), y luego a core 4 por acción de las C2GnTs 27. Estas últimas estructuras se encuentran normalmente restringidas al epitelio mucoso del tracto gastrointestinal y respiratorio, y a las glándulas salivales²⁷, siendo los core 1 y 2 los más abundantes en proteínas séricas y en otros tejidos.

Si la síntesis de O-glicanos se trunca, el antígeno Tn también puede sialilarse, por la acción de enzimas denominadas α(2-6)N-acetil-galactosaminil-sialiltransferasas (ST6GalNAcs), las que en humanos conforman una familia de seis proteínas, cuya expresión varía según el tejido en estudio³⁷. El resultado de su acción es el **antígeno** sialil-Tn³⁷.

Las células tumorales presentan una gran variedad de alteraciones en su glicosilación comparadas con el tejido normal. Dos mecanismos principales que conllevan a la alteración en la estructura de los carbohidratos son la síntesis incompleta y la neosíntesis⁴⁵. La síntesis incompleta, que ocurre con mayor frecuencia en etapas tempranas del desarrollo neoplásico, es consecuencia de deficiencias en el proceso de glicosilación de la célula normal, y desencadena la formación de estructuras truncadas, como Tn o sTn, que se describieron anteriormente⁴⁵. En cambio, la neosíntesis, que ocurre predominantemente en estadios avanzados, está asociada a la inducción de ciertos genes involucrados en la síntesis de carbohidratos, generando la expresión de novo de antígenos como sialil Lewis-a o sialil-Lewis-x⁴⁵.

Los glicanos participan en varios procesos biológicos que pueden tener implicancias en el desarrollo neoplásico. Por ejemplo, pueden estabilizar la expresión de receptores en la superficie celular, y de esta forma modular la interacción receptor-ligando y señalización^{45,46}. También participan en la adhesión celular, tanto célula-célula, como célula-matriz extracelular⁴⁵⁻⁴⁷. A su vez, permiten la reorganización de la superficie celular para exponer proteínas esenciales para la adhesión celular^{45,46,48}. Más aún, pueden modular la transición epitelio-mesenquimal y pueden activar respuestas inmunológicas supresoras, tanto por activación de DC tolerogénicas o modular la muerte celular inducida por células efectoras^{45,46,48}.

Muchos de estos efectos de los glicanos están mediados por su reconocimiento por proteínas, denominadas lectinas. Las lectinas se identificaron por primera vez en plantas, cuando se observó que el extracto de una semilla podía aglutinar glóbulos rojos de animales, y por este motivo recibieron el nombre de aglutininas²⁷. Las lectinas se encuentran muy comúnmente en las semillas de plantas leguminosas y se utilizan

con frecuencia como herramientas de reconocimiento de estructuras de glicanos²⁷. Posteriormente, se identificaron lectinas en microorganismos así como en organismos vertebrados²⁷. En esto últimos, se han identificado tanto lectinas intracelulares, como lectinas extracelulares o secretadas. Focalizando en aquellas con relevancia en el sistema inmune, podemos encontrar las lectinas tipo C (CLR, del inglés C-type lectin receptors), v siglecs (sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins)⁴⁹, ambas de superficie celular, y las galectinas (solubles), las que participan en la adhesión celular, en la interacción huésped-patógeno, en la movilidad y en la activación de respuestas inmunes^{49,50}.

Papel del antígeno Tn en el cáncer

Debido a la complejidad del proceso de glicosilación, y a la gran variedad de enzimas, transportadores y chaperonas que participan en el mismo, alteraciones en alguno de estos componentes resultarán en modificaciones en el glicoma de la célula que pueden asociarse con diversos eventos patológicos^{51,52}.

Numerosos biomarcadores utilizados en el diagnóstico de enfermedades neoplásicas corresponden a mucinas aberrantemente O-glicosiladas. En ese sentido, el antígeno Tn, es definido como de los antígenos carbohidratos asociados a tumor (o TACA, del inglés tumor-associated carbohydrate antigen) más frecuente, expresándose en más del 90% de los adenocarcinomas humanos⁴⁴. Asimismo, Tn participa en fenómenos de adhesión, migración y proliferación de las células tumorales y su expresión se ha relacionado con la malignidad de algunos tipos de adenocarcinomas⁵³, constituyendo un elemento de utilidad para establecer el pronóstico de la enfermedad ^{44,53}. Como ya mencionamos, el antígeno Tn también puede ser sialilado, formando otro TACA vinculado al proceso neoplásico y asociado a la malignidad, el antígeno sialil-Tn (o sTn)⁴⁶.

La expresión del antígeno Tn, o de su variante sialilada, sTn, en células tumorales es consecuencia de diversas alteraciones en el proceso de O-glicosilación que truncan su elongación. Algunos de estos procesos se describirán a continuación.

- 1. Uno de los principales mecanismos asociados a la expresión de Tn son mutaciones en la enzima T-sintasa o en la chaperona Cosmc, truncando el proceso de biosíntesis de *core* 1 y *core* 2 O-glicanos (Figura 6 A)^{53–57}.
- 2. La sobreexpresión de ST6GalNAc-I lleva a la producción de sTn, como resultado de la competencia con la T-sintasa, lo cual se observa frecuentemente en cáncer de colon y de mama (Figura 6 C)⁵⁸.

- **3.** Por otro lado, en el tracto gastrointestinal, se ha descripto que una disminución en la expresión de B3GNT6, que sintetiza estructuras tipo *core* 3 puede llevar a un aumento en la expresión del antígeno Tn o sTn, lo cual se ha asociado al desarrollo de cáncer de colon (Figura 6 B)⁵⁹.
- 4. Finalmente, el desarrollo y estudio de variantes de células de ovario de hámster

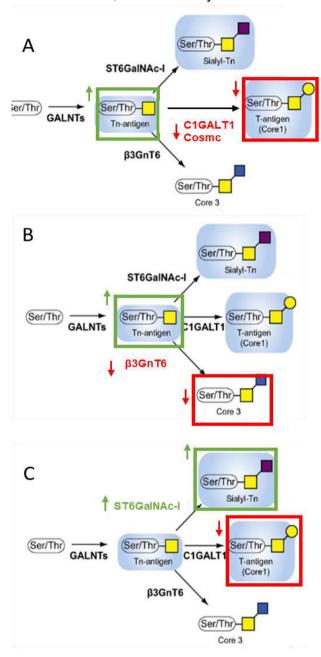


Figura 6 – Alteraciones en el proceso de *O*-glicosilación por cambios en la expresión de glicosiltransferasas. A-La disminución de la expresión de C1GalT1 o su chaperona asociada cosmc llevan a la disminución de core 1 y aumento de Tn. B- En tejidos del epitelio mucoso, disminución de la expresión de B3GNT6 disminuye la expresión de core 3 y aumenta Tn, C- El aumento en la expresiónST6GalNAc-I desencadena el aumento de sialil-Tn como resultado de la competencia con la C1GALT1 por el sustrato Tn. Modificado de Chia et al. 2016 ⁴⁰.

chino (CHO) deficientes en el transportador UDP-Gal (Lec8), permitió demostrar que las mismas también son incapaces de elongar Tn hacia *core* 1⁶⁰.

La relocalización de las 5. GALNT del aparato del Golgi al RE, proceso conocido como GALA (Figura 7)61. En este proceso, se sintetiza el antígeno Tn en el RE, pero no se elonga debido a que las enzimas responsables de este se encuentran en el proceso aparato de Golgi⁶¹. Esto promueve la formación de clusters de Tn, ya que las GALNT presentan afinidad por Tn, y su unión promueve la glicosilación O-GalNAc en el mismo polipéptido⁶¹.

Debido а que Tn estructura más simple de la Oglicosilación y es el precursor de los O-glicanos complejos, su aparición indica ausencia de estos glicanos extendidos en una gran diversidad glicoproteínas de membranarias o secretadas. Esto podría llevar a cambios en la señalización celular, el en metabolismo o en la función de diversos receptores⁴⁴. Por ejemplo.

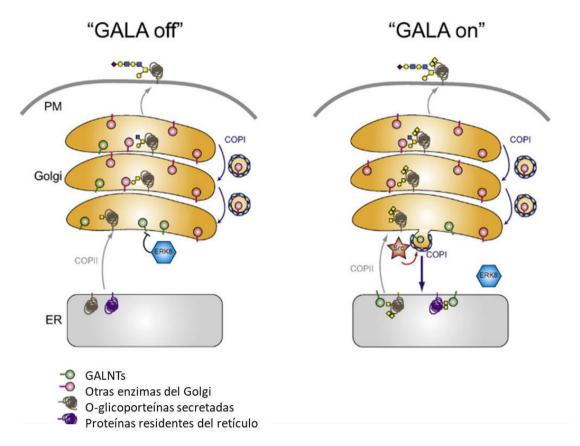


Figura 7 – Relocalización de las GALNT del aparato de Golgi al RE por GALA (Activación de GALNT). Bajo condiciones normales (GALA off) la iniciación de la glicosilación del tipo *O*-GalNAc de las proteínas membranarias o secretadas comienza en el aparato de Golgi. Los residuos de GalNAc son rápidamente modificados por la adición de galactosa por la C1GALT1, previniendo la unión por el dominio lectina y adición secundaria de otro GalNAc por la misma u otra GALNT. Tras la activación de GALA (GALA on), las GALNT son transportadas al RE y pueden glicosilar proteínas en este sitio. Esto facilita la adición de GalNAc en sitios secundarios por el mecanismo dependiente de la interacción del dominio lectina de GALNT, incluso en regiones no expuestas que se encuentran normalmente plegadas cuando llegan al Golgi. Algunos GalNAc agregados en este proceso no se elongan a *core* 1 cuando llegan al Golgi y permanecen como Tn en la superficie celular. Modificado de Chia et al 2016 ⁴⁰.

se ha visto que la expresión de Tn conduce a alteraciones en la expresión de CD44 en cáncer de colon, ya que la *O*-glicosilación incompleta de dicho receptor lleva a que el mismo se libere en exosomas en lugar de permanecer en la superficie de la célula y participar en sus funciones biológicas⁶². Aunque en este trabajo no se elucidaron las implicancias de la expresión de CD44 en los exosomas, en trabajos anteriores se había observado que los exosomas cargados con CD44 podrían promover la invasión y motilidad de células tumorales^{63,64}. Otro ejemplo que demuestra la relevancia de la traslocación de las GALNT al RE, y por lo tanto la importancia del aumento en la expresión de Tn en cáncer, son los efectos observados en la actividad de la metaloproteasa 14 (MMP14)⁶⁵. En un modelo de cáncer hepático murino, se observó que la traslocación de GALNT1 al ER genera un crecimiento tumoral acelerado, con un fenotipo más agresivo, caracterizado por una capacidad invasiva y metastásica aumentada⁶⁵. Se concluyó en este trabajo que esto se debe a que la relocalización de

GALNT1 lleva a un aumento de la expresión de Tn sobre la MMP14⁶⁵. Esto tiene como consecuencia una actividad aumentada de esta enzima que degrada la matriz extracelular, lo que explica el incremento en la capacidad metastásica e invasiva⁶⁵.

Por otro lado, es importante resaltar que en células tumorales el antígeno Tn se presenta preferencialmente bajo forma de clústeres. De hecho, diferentes anticuerpos monoclonales desarrollados contra células tumorales, y que no reaccionan con células normales, reconocen estructuras de al menos dos Tn consecutivos⁶⁶. Además, la alta expresión de Tn trimérico inducida por la sobreexpresión de la ppGalNAcT13 en células de carcinoma de pulmón de Lewis lleva a un aumento en la capacidad invasiva y metastásica de dichas células, a través de la acción de Syndecan 1, la integrina α 5 β 1 y la metaloproteasa MMP9⁶⁷.

Otros mecanismos que explican las características pro-tumorales del antígeno Tn, incluyen su participación en la transición epitelio-mesenquimal, a través de la sobreregulación de la expresión de H-Ras⁶⁸. La transición epitelio-mesenquimal en el cáncer es un proceso complejo, en el cual ocurre una reprogramación celular que involucra cambios metabólicos, epigenéticos y de diferenciación celular⁶⁹. Para poder invadir otros tejidos y generar metástasis, las células neoplásicas epiteliales diferenciadas retornan a un estado no diferenciado, expresando marcadores y adquiriendo funciones de tipo célula madre⁶⁹. En este proceso, pierden sus capacidades de adhesión célula-célula, así como su polaridad, y adquieren características que favorecen su movilidad e invasividad⁶⁹.

Finalmente, también hay evidencia experimental que el antígeno Tn es capaz de interaccionar con otra molécula de Tn, y esto podría tener un rol en el contexto neoplásico, en el cual dos células Tn⁺ podrían dar lugar a la iniciación de vías de señalización oncogénicas, o incluso en una misma célula, por la agregación y subsecuente activación de receptores altamente *O*-glicosilados⁷⁰.

Reconocimiento de Tn por parte del Sistema Inmune

Leucocitos presentes en el microambiente tumoral

Las **DC** son las células presentadoras de antígenos profesionales más eficientes⁷¹ y están especializadas en la identificación de moléculas patógenas o derivadas de células tumorales o alteradas, así como en la captura de antígenos⁷². Son las responsables de dirigir la respuesta inmune y de determinar el tipo de respuesta adaptativa inducida contra un antígeno⁷¹. A su vez, son las únicas células capaces de activar y diferenciar linfocitos T naive o vírgenes, por lo que se les ha atribuido el papel de "puente" entre la inmunidad innata y la adaptativa⁷¹. Luego del contacto con el antígeno, las DC se activan durante el curso de una reacción inflamatoria local y migran por el sistema linfático o sanguíneo a los órganos linfoides secundarios en donde completan su maduración. Este proceso es acompañado por la pérdida de la capacidad de capturar antígenos, la producción de citoquinas pro-inflamatorias, el aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) así como del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y la adquisición de la capacidad de activación de los linfocitos T⁷³. Allí, las DC inducen el desarrollo de diferentes fenotipos de células T dependiendo de la naturaleza de la DC, que incluye el tipo de citoquinas que secreta, así como las moléculas de membrana y/o coreceptores que presente, conduciendo a la diferenciación principalmente de linfocitos T cooperadores a tipo -Th1, -Th2, -Th17 o reguladores (Treg). De esta forma, cada tipo de respuesta inmune adaptativa inducida se asocia a un perfil de citoquinas determinado, que inducirá la producción y activación de una serie de componentes celulares y/o moleculares⁷⁴. Además, en ciertos contextos, como en el microambiente tumoral, las DC pueden inducir anergia de linfocitos T⁷¹.Por lo tanto, las DC constituyen un linaje celular plástico, capaz de procesar e integrar señales del microambiente celular.

Los **MQ**, al igual que las DC, también participan en el reconocimiento de patógenos o de células alteradas. Sin embargo, estas células están especializadas en la eliminación de patógenos a través de la fagocitosis y la producción de moléculas citotóxicas⁷⁵, aunque también son capaces de expandir linfocitos previamente activados por las DC⁷⁵. Dependiendo del tipo de estímulo que reciban, los MQ se pueden diferenciar en dos grandes tipos: activados clásicamente o alternativamente. Los primeros, también conocidos como MQ M1, se ven favorecidos por las respuestas de tipo Th1, con alta producción de IFNγ. Producen óxido nítrico (NO) y especies reactivas del oxígeno (ROS) y presentan alta capacidad presentadora de antígenos, el

incremento en el estallido respiratorio y la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1β y TNFα⁷⁵. Por otro lado, los MQ de activación alternativa se producen en un entorno Th2 o regulador y se los conoce como M2. Estos MQ no producen NO a partir de arginina sino que cambian el metabolismo de la L-arginina hacia la producción de poliaminas, lo que disminuye la producción de moléculas proinflamatorias. Por otra parte, secretan citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGFB y participan activamente en el remodelamiento tisular, y reparación tisular⁷⁵.

Además, los MQ que infiltran al tumor (TAM, tumor associated macrophages) favorecen la angiogénesis, la cual será discutida en profundidad más adelante⁷⁶. De hecho, éstos constituyen una de las células no neoplásicas más abundantes en el microambiente tumoral⁷⁷. Sin embargo, dichos MQ poseen actividad pro-tumoral en lugar de ser tumoricidas, tanto en los sitios primarios como metastásicos⁷⁷, ya que favorecen la supresión de las respuestas celulares T^{78,79}, la angiogénesis, la invasión v motilidad tumoral, así como la extravasación de las células tumorales, v la sobrevida y el crecimiento tumoral^{79,80}.

Las células **NK** pertenecen al sistema inmune innato y son particularmente relevantes en la inmunovigilancia del cáncer. Al contrario de los linfocitos T CD4+ y CD8⁺, las células NK poseen de manera intrínseca una serie de receptores activadores e inhibidores codificados en la línea germinal, y no requieren activación antígeno específica⁸¹. Como consecuencia del proceso de presión selectiva que ocurre durante la fase de equilibrio en el desarrollo tumoral, hay una tendencia a la aparición de variantes de células tumorales con baja expresión de MHC de clase I, para evadir el reconocimiento por las células T81. Las células NK poseen la habilidad de reconocer células malignas que han perdido la expresión del MHC I y son capaces de matar a dichas células mediante degranulación y liberación de perforina y granzima^{82,83}. A su vez, secretan grandes cantidades de IFNy, que promueve el desarrollo de la respuesta Th1, aumenta la expresión de MHC I y tiene un efecto anti-proliferativo en las células malignas^{82,83}. Además, las células NK pueden eliminar las células tumorales por un mecanismo denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Este mecanismo requiere la presencia de anticuerpos que se unan a la superficie de la célula tumoral, que son reconocidos por las células NK, y mediante su entrecruzamiento se activa el proceso de desgranulación de la célula NK que puede conducir a la destrucción de la célula neoplásica82. Este mecanismo se considera el principal mecanismo efector en el tratamiento de linfoma con el anticuerpo monoclonal rituximab y el cáncer de mama con el anticuerpo monoclonal trastuzumab⁸⁴. En estudios poblacionales, se ha visto una correlación positiva entre una reducción de riesgo de cáncer con la actividad citotóxica de las células NK en circulación⁸⁵. A su vez, en cáncer colorrectal se ha visto que actividad reducida de las células NK está relacionada con un peor pronóstico para el paciente⁸⁶.

Por último, el microambiente tumoral también se caracteriza por poseer linfocitos T infiltrantes, también denominados **TIL** por sus siglas en inglés (*tumor-infiltrating lymphocytes*). Debido a la formación de neo-antígenos durante la transformación maligna, los linfocitos T que reconocen dichos antígenos se activan, se expanden de forma clonal y se transportan al tumor⁸⁷. Sin embargo, el microambiente tumoral es hostil para la funcionalidad de la respuesta T, debido a la expresión de enzimas que depletan el triptófano y la arginina, la alta concentración de lactato secretado por las células tumorales, así como la presencia de células inmunes supresoras, tanto de la inmunidad innata, como DC reguladoras o MQ de tipo M2, o de la adaptativa, como linfocitos Treg⁸⁷.

En este contexto, resulta interesante destacar que en estadios tempranos de cáncer colorrectal, la presencia de linfocitos **T CD8**⁺, tanto en el microambiente tumoral como en el estroma peri-tumoral, tiene una correlación positiva con el pronóstico para el paciente⁸⁸. A su vez, un alto índice de células T CD8⁺ sobre células T reguladoras Foxp3⁺ en cáncer de ovario, ha sido asociado a un pronóstico clínico favorable⁸⁸. Sin embargo, se ha visto que la sobre-expresión de moléculas inmunoreguladoras, así como la acumulación de células Treg es dependiente de las células T CD8^{+ 89}, lo que estaría indicando que gran parte de los mecanismos inmunosupresores que se observan en el microambiente tumoral son dirigidos por el propio sistema inmune, e implican que inmunoterapias que tienen como blanco puntos de control (*checkpoints*) inmunológicos podrían ser más beneficiosas en pacientes con un microambiente tumoral inflamatorio con TIL⁸⁹.

Receptores de lectina tipo C

Los **CLR** son una gran familia de receptores caracterizada por la presencia de uno o más dominios de lectina tipo C, el cual le permite interactuar con motivos de carbohidratos específicos de forma Ca²⁺-dependiente⁹⁰. A pesar de la presencia de un dominio altamente conservado, los CLR son funcionalmente diversos y participan en diferentes procesos biológicos, como por ejemplo en la adhesión celular, regulación de la función o activación celular, activación del complemento, remodelación tisular,

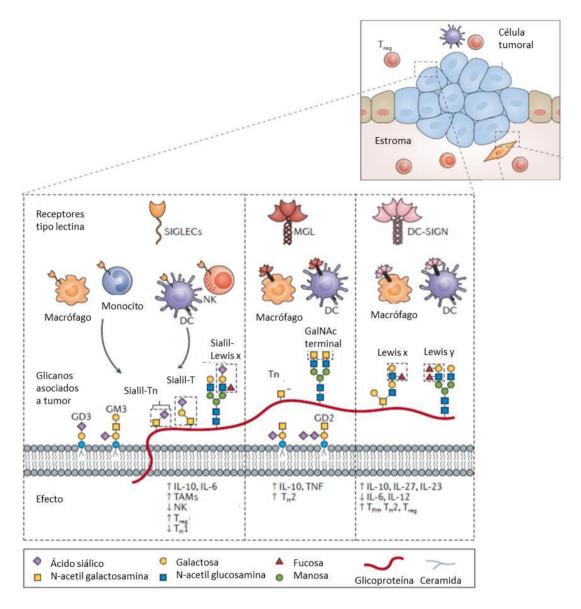


Figura 8 – Estructuras de glicanos alteradas en cáncer reconocidos por el sistema inmune. Durante la transformación maligna, la célula tumoral puede presentar estructuras de glicanos ausentes en tejidos normales. Estos glicanos pueden ser reconocidos por receptores de tipo lectinas presentes en las células del sistema inmune, como MQ, DC, monocitos y NK. Esto puede desencadenar el aumento en la producción de citoquinas anti-inflamatorias, disminución en la actividad de NK, o la inducción de respuestas Th2 o T_{reg}. Modificado de Rodríguez et al 2018 ⁹⁵.

activación plaquetaria, endocitosis o fagocitosis^{91–93}. Las DC y los MQ expresan una variedad de CLR, capaces de reconocer glicanos derivados de patógenos o de células tumorales⁹⁴. Entre los CLR existen lectinas solubles, como la lectina de unión a manosa (MBL) o las proteínas del surfactante pulmonar A y D (SP-A y SP-D), y lectinas ancladas a membrana que se subdividen en dos grupos en función de la localización del extremo N-terminal. Las lectinas de tipo I presentan el extremo N-terminal en el exterior celular y pueden tener varios dominios de lectina, como el receptor de manosa (MR o CD206). Las lectinas de tipo II presentan el extremo N-terminal en el interior

celular⁹⁴. Muchos de estos receptores como el MR, Dectin-1 (*DC-associated C-type lectiN-1*), Dectin-2, DC-SIGN (*DC-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*) y las colectinas están implicados en la inmunidad anti-bacteriana y anti-fúngica: median la unión, captación y eliminación del patógeno, además de contribuir al inicio y/o modulación de la respuesta inmune adaptativa⁹⁴. La gran diversidad estructural de los CLR se relaciona también con su capacidad variada de señalización, la cual puede desencadenar señales activadoras o inhibidoras, dependiendo de sus motivos de señalización citoplasmáticos⁹⁰.

Durante la transformación maligna, la célula tumoral puede presentar diversas estructuras glicosídicas que están ausentes en el tejido normal. En la Figura 8, se observan diversas estructuras de glicanos que se pueden encontrar unidas a glicoproteínas o glicolípidos en la célula tumoral, como el antígeno sTn, *core* 1 sialilado, o el antígeno de Lewis sialilado, el antígeno Tn y los antígenos fucosilados Lewis-x y Lewis-y. Estas estructuras pueden ser reconocidas por CLR como SIGLECs (específico de antígenos sialilados), MGL (reconoce el antígeno Tn), o DC-SIGN (reconoce estructuras Lewis-x y Lewis-y) presentes en MQ o DC. En algunos casos, su interacción, puede dar lugar a la producción de citoquinas anti-inflamatorias, disminución de citoquinas pro-inflamatorias, y la inducción de células T reguladoras o Th2⁹⁵.

MGL

MGL reconoce motivos con Gal o GalNAc terminal, como el antígeno Tn y su variante silailada, sTn. Aunque en humanos existe una única variante de MGL (hMGL), en ratones existen dos isoformas: mMGL1 y mMGL2, las cuales poseen diferencias en su especificidad de ligando. La isoforma mMGL1 reconoce estructuras complejas como Lewis-x y Lewis-a, mientras que mMGL2 reconoce GalNAc en estructuras más simples, como por ejemplo el antígeno Tn⁹⁶. Es esta última la que posee una especificidad similar a la MGL humana⁹⁶, y que se plantea, podría tener una función en el reconocimiento de células tumorales.

Hasta el momento se ha visto que MGL se expresa exclusivamente en DC y MQ, cumpliendo un papel inmunomodulador, a través de la expresión de moléculas específicas y citoquinas, e influyendo en la polarización de células T^{94,97}. Ello se relaciona también con el hecho de que la expresión de MGL aumenta en DC tolerogénicas inducidas tanto en condiciones experimentales *in vitro* como patológicas en pacientes⁹⁸. Se ha propuesto que MGL puede participar en la regulación inducida por células tumorales a través del reconocimiento del antígeno-Tn⁹⁶, aunque

únicamente se han realizado ensayos in vitro. Por otro lado, MGL puede reconocer sialil-Tn sobre mucinas producidas por células tumorales 96,99-101. De forma interesante, la expresión de los ligandos de hMGL se asocia con la expresión de Her2/Neu en tumores de cáncer de mama¹⁰², o con mutaciones BRAF en cáncer colorectal¹⁰³, lo que podría indicar que hMGL podría estar reconociendo tumores más agresivos.

Los reportes sobre la inmunomodulación desencadenada por MGL son variados, y abarcan efectos estimuladores, que involucran la potenciación de la activación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, así como también modulación de la maduración de DC favoreciendo la producción de citoquinas inmunoreguladoras⁹⁷. A su vez, la señalización a través de MGL altera el metabolismo de las DC, ya que reduce su capacidad glicolítica lo que podría estar involucrado con su actividad tolerogénica¹⁰⁴. Por otro lado, la interacción MGL-Tn en CD45 en células T efectoras conduce a una disminución de su actividad fosfatasa, reduciendo la proliferación de linfocitos T y la producción de citoquinas inflamatorias, lo que eventualmente conduce a la apoptosis de las células T^{98,105}. Además, se ha reportado que MGL podría estar involucrado en la retención de DC inmaduras, ya que la migración de DC es sustancialmente favorecida al bloquear MGL con un anticuerpo específico⁹⁶. Por otro lado, también se ha comprobado que la estimulación de MGL mediante anticuerpos agonistas, o de ligandos conteniendo el antígeno-Tn, induce un aumento en la expresión de IL-10 por parte de DC que expresan MGL106, adoptando un perfil tolerogénico que dirige la diferenciación de células T a linfocitos T reguladores de tipo 1 (Tr1) supresores de forma MGL-dependiente¹⁰⁷. Esto también se correlaciona con el hecho de que MGL reconoce patrones de patógenos, quienes utilizan este mecanismo como estrategia de evasión inmunitaria, ya que la interacción de Campilobacter jejuni con MGL inhibe la maduración de DC y limita la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-6108. Por último, mMGL2 se ha visto implicada en la inducción de respuestas celulares Th2, ya sea en un contexto de infección helmíntica, como en patologías alérgicas 109,110.

En un contexto tumoral, una inmunomodulación como la descripta anteriormente resulta altamente relevante ya que, como ya se mencionó, las respuestas de tipo Th1 favorecen la activación y diferenciación de linfocitos T citotóxicos capaces de reconocer y eliminar células transformadas, mientras que el IFNy promueve la activación clásica de MQ y la diferenciación de linfocitos T CD8+ citotóxicos111. Este tipo de respuesta también se asocia a una alta actividad por parte de las células NK, que como se mencionó anteriormente, son capaces de, al igual que los linfocitos T citotóxicos, eliminar células tumorales. Por ello, las respuestas T reguladoras o Th2

Introducción

podrían entonces favorecer el crecimiento tumoral a través de la supresión de la respuesta inmunológica anti-tumoral.

Angiogénesis

Como se mencionó anteriormente, los tumores requieren del suministro de nutrientes y oxígeno, así como una vía de evacuación de los desechos celulares y dióxido de carbono. Mediante el proceso de angiogénesis se logran atender estas necesidades, debido a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente⁷. El proceso angiogénico está gobernado por la acción de factores que pueden inducir o inhibir la formación de vasos sanguíneos. Algunos de estos factores son proteínas señalizadoras que se unen a receptores sobre las células endoteliales, como por ejemplo VEGF-A o PDGF.

La familia génica de **VEGF** contiene al menos 7 miembros, mientras que la familia de receptores para VEGF (VEGFR) tiene 3 a 4 miembros, dependiendo de la especie¹¹². VEGF-A y sus receptores, VEGFR-1 y VEGFR-2, y su co-receptor, Neuropilina-1 (NRP-1), cumplen roles fundamentales en la angiogénesis fisiológica y patológica, incluyendo la angiogénesis tumoral, mientras que VEGF-C/D y su receptor, VEGFR-3 puede regular la angiogénesis en la embriogénesis temprana, pero actúa principalmente como regulador de la linfoangiogénesis (formación de vasos linfáticos) (Figura 10)^{112,113}. VEGF-A promueve la sobrevida y proliferación de la célula endotelial,

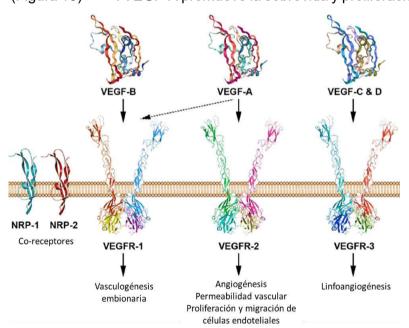


Figura 9 – Funciones de las diferentes isoformas de VEGF en la interacción con sus receptores. VEGF-A y VEGF-B activan VEGFR-1 para inducir la vasculogénesis embironaria. VEGF-A interactúa con VEGFR-2 para inducir la angiogénesis en situaciones fisiológicas y patológicas. VEGF-C y D interactúan con VEGFR-3 para promover la linfoangiogénesis. Los receptores neuropilin (NRP) actúan como coreceptores para intensificar la señal de VEGF-R. Modificado de Alsohaimi 2019 113.

aumenta la expresión de moléculas de adhesión У la permeabilidad vascular (Figura 10)114. El eje **VEGF-VEGFR** es blanco de drogas de inmunoterapia, como por ejemplo anticuerpo monoclonal neutralizante anti-VEGF (bevacizumab) que está aprobado para el tratamiento de colorrectal, cáncer cáncer de mama, cáncer de pulmón

NSCLC, cáncer renal y glioblastoma, aunque con una baja eficacia y diversos efectos secundarios¹¹².

El **PDGF**β, o factor de crecimiento derivado de plaquetas β, es una glicoproteína dimérica que participa en la regulación del crecimiento y la división celular, jugando un rol significativo en la angiogénesis. Participa en el reclutamiento y expansión de los pericitos en los vasos sanguíneos en formación, y su ausencia lleva a la generación de vasos sanguíneos sin pericitos asociados (Figura 10)¹¹⁵. Los pericitos contribuyen al desarrollo y mantenimiento de la vasculatura, ya que participan en la regulación del flujo sanguíneo, permeabilidad vascular, y estabilización de la pared de los vasos sanguíneos, por lo que en un contexto tumoral, pueden modificar la progresión tumoral, afectando la capacidad metastásica y la resistencia a terapias¹¹⁶. En la mayoría de los tumores, los pericitos se encuentran débilmente asociados a la célula endotelial, presentan morfología anormal y expresan marcadores de células más inmaduras y poco contráctiles¹¹⁷, como se muestra en la Figura 11.

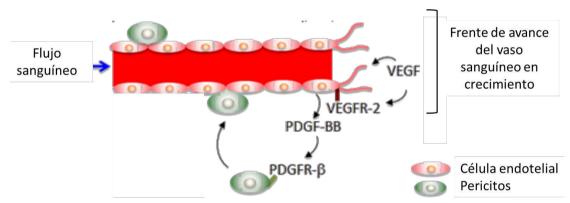


Figura 10 - Rol de VEGF y PDGF en la formación de vasos sanguíneos. VEGF participa induciendo la proliferación de las células endoteliales en el frente de avance, a través de la señalización de VEGFR-2. El PDGF recluta los pericitos a los vasos sanguíneos en formación para estabilizarlos. Modificado de Cao 2013 118.

La co-existencia de diversos factores angiogénicos, citoquinas y receptores de señalización frecuentemente resulta en el crosstalk (o diálogo cruzado) entre varias vías de señalización¹¹⁸. Durante el proceso de angiogénesis, varios factores y citoquinas no solo señalizan de forma vertical, sino que interactúan de forma horizontal entre ellas¹¹⁸. Esto puede tener un rol sinérgico, en el cual la interacción de los factores aumenta la señal, o antagónico, en el cual uno de los factores inhiba la señalización del otro¹¹⁸. Uno de estos mecanismos involucra a VEGF, que tiene un rol inhibitorio en la vascularización inducida por PDGF, ya que evita la cobertura de pericitos en los vasos sanguíneos en formación, llevando a la desestabilización de éstos y generando vasos sanguíneos inmaduros 119.

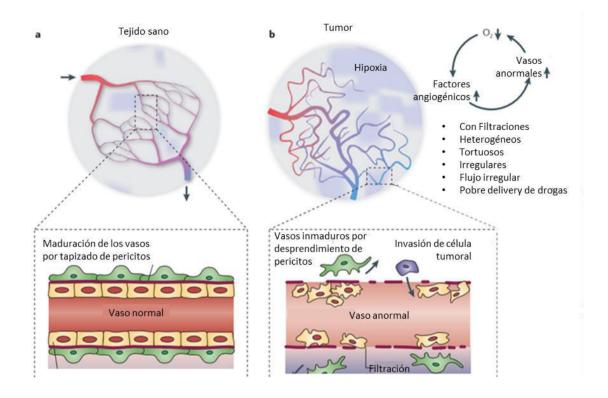


Figura 11 – Vasos sanguíneos anormales en el ambiente tumoral. A- En el tejido sano, se forman vasos sanguíneos regulares y funcionales, con una pared normal tapizada por pericitos. B- En los tumores, el endotelio y las paredes de los vasos sanguíneos exhiben anormalidades estructurales y funcionales. Presentan flujo sanguíneo irregular, filtraciones y baja cobertura de pericitos. Modificado de Carmeliet et al 2011 ¹¹⁷.

En el **microambiente tumoral, los vasos sanguíneos** que se forman son en general **aberrantes** debido a la mezcla de señales pro-angiogénicas desbalanceadas, generando vasculatura caracterizada por capilares con brotación precoz, ramificaciones de los vasos retorcidos y excesivos, vasos distorsionados y agrandados, flujo sanguíneo errático, microhermorragia, filtraciones y niveles anormales de proliferación endotelial y apoptosis^{117,120}. Estas características a su vez, posibilitan la entrada (intravasación) y salida (extravasación) de las células tumorales al flujo sanguíneo mediante la migración trans-endotelial, lo que facilita el proceso de colonización y metástasis (Figura 11)¹²¹.

Por otro lado, algunas **células infiltrantes del sistema inmune**, como TAM y otras células inmunosupresoras **promueven la angiogénesis**¹²². Los TAM se encuentran frecuentemente en la periferia de los vasos sanguíneos de los tumores sólidos, y su número se asocia positivamente a la densidad de vasos sanguineos ¹²³. A su vez, se ha visto que su depleción resulta en una disminución de la angiogénesis en el tumor, mientras que su enriquecimiento tiene el efecto contrario ¹²³. Esto se debe al ambiente hipóxico en el microambiente tumoral, que estimula la adaptación metabólica

de los TAM y la expresión de factores inducibles por hipoxia, entre los que se encuentra VEGF-A¹²³. Los neutrófilos infiltrantes de los tumores también pueden inducir la angiogénesis, por un lado por la expresión de MMP-9, que degrada la matriz extracelular y libera factores angiogénicos de la misma, o a través de la expresión de VEGF estimulada por TNFα¹²³.

La glicosilación aberrante tiene implicancias en la activación de las vías proangiogénicas¹²⁴ y está implicada en la resistencia adquirida a las terapias antiangiogénicas 125,126. Por ejemplo, la lectina galectina-1 es capaz de reconocer los Nglicanos de VEGFR-2, y activar la señalización de dicho receptor, incluso en ausencia o frente al bloqueo de VEGF¹²⁷. Esto tiene implicancias en la capacidad respondedora de los pacientes al tratamiento con anti-VEGF, ya que los tumores sensibles al tratamiento exhiben altas concentraciones de ácido siálico α2-6 en VEGFR2, que previene la unión por Galectina-1. Sin embargo, los tumores resistentes al tratamiento secretan cantidades aumentadas de galectina-1 y como el receptor VEGFR2 presenta patrones de glicosilación que facilitan su interacción con galectina-1, ésta media la señalización de dicho receptor, incluso frente a la terapia anti-VEGF¹²⁷. A su vez, datos recientes demuestran que los cambios en la glicosilación también promueven la actividad angiogénica, incluso de forma independiente de galectinas 125,128.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Teniendo en cuenta los mecanismos inmunoreguladores descritos para MGL, en particular consecuencia de su interacción con el antígeno Tn^{104,106,129}, y que la expresión del antígeno-Tn así como de ligandos de MGL se ha asociado con mal pronóstico de pacientes con cáncer^{46,57,130}, la HIPÓTESIS de este trabajo es que la expresión de Tn en las células tumorales potencia las propiedades malignas del tumor, acelerando el crecimiento tumoral y el desarrollo de angiogénesis, así como activando una respuesta inmune reguladora mediada por células que expresan el receptor MGL2.

Objetivo general

Considerando la hipótesis previamente expuesta, el objetivo general de esta tesis doctoral fue evaluar las propiedades inmunomoduladoras y angiogénicas del antígeno Tn durante el crecimiento tumoral en un modelo murino in vivo y el papel de las células MGL2 en dichos procesos.

Objetivos específicos

El objetivo general mencionado, se divide en los siguientes objetivos específicos:

- 1. Generación de células tumorales murinas que expresen el antígeno Tn.
- 2. Caracterización glicofenotípica de las líneas celulares generadas y análisis estructural de sus N- y O-glicanos por metodologías cromatográficas.
- 3. Análisis de la replicación e invasión celular in vitro de crecimiento celular de la línea tumoral Tn⁺.
- 4. Evaluación del crecimiento tumoral de las líneas Tn⁺ y Tn⁻ en un modelo tumoral pre-clínico.
- 5. Análisis inmunológico a nivel local y sistémico de ratones con tumores Tn⁺.
- 6. Estudio de la capacidad de los factores solubles producidos por las células Tn⁺. en inmunomodular la función de DC.
- 7. Estudio de la interacción del antígeno Tn con el receptor MGL2 in vitro.
- 8. Evaluación del papel de las células MGL2+ en el crecimiento tumoral y la inducción de la respuesta inmune de animales con tumores Tn⁺.
- 9. Evaluación del papel de MGL2 y el antígeno Tn en la angiogénesis tumoral.
- 10. Análisis de la relevancia de los resultados encontrados en el modelo murino en cohortes de pacientes con adenocarcinomas.

Materiales y Métodos

A continuación, se describen los materiales y metodología utilizada durante el transcurso de esta tesis doctoral. Para facilitar su comprensión, los mismos han sido agrupados según los diferentes objetivos específicos planteados.

Obtención de células tumorales Tn⁺

Línea celular

La línea celular de carcinoma de Lewis pulmonar (LL/2) murina, con fondo C57BL/6, se obtuvo de ATCC (LL/2 ATCC CRL-1642™). Estas células están reportadas por ser altamente tumorigénicas, pero con débil capacidad metastásica en ratones¹³¹. Presentan características mixtas en cultivo, ya que crecen tanto adherentes como y en suspensión, y generalmente se encuentran débilmente adheridas 131. Las razones por las cuales se seleccionó esta línea celular para el presente trabajo se basan en que: i) el cáncer de pulmón es la primer causa de muerte por cáncer 132, ii) la línea celular LL/2 es ampliamente estudiada para inducir tumores subcutáneos en ratones¹³³ y iii) el grupo de trabajo posee vasta experiencia en su manejo experimental, lo que ha permitido desarrollar y caracterizar el crecimiento de tumores subcutáneos en ratones y la evaluación de la respuesta inmunológica. Las células LL/2 se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 Thermo Fisher o Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado (FBS, Capricorn) y antibióticoantimicótico (Thermo Fisher) a una concentración final de 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 0.25 µg/mL anfotericina B. A este medio le denominados "medio completo". Durante el cultivo, las células se mantuvieron a 37°C en una cámara humidificada con 5% CO₂. Para cosechar las células se utilizó buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM. Para el proceso de congelamiento, aproximadamente 3 x 10⁶ células se guardaron en FBS conteniendo 10 % dimetilsulfóxido (DMSO) a -80°C.

Generación de células Tn+

Las variantes celulares fueron generadas utilizando la tecnología de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/Caspase 9 (CRISPR/Cas9). Se utilizó el plásmido pBS-U6sq proveniente de Tacqene con la secuencia guía para el exón 2 de la chaperona molecular específica de la enzima core 1 β3-galactosiltransferasa, o T-sintasa, (Cosmc), (exón 2 690s GCGGTCTGCCTGAAATACGC) y el vector hCas 9 (#41815) de Addgene. Para amplificar los vectores se transformaron bacterias Esecherichia coli DH5α mediante electroporación (200 Ω, 25 μF 2,6 ms). Las bacterias se crecieron a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) frente a la presión selectiva de 50

 μ g/ml de ampicilina, para seleccionar las bacterias que incorporaron los plásmidos. Los plásmidos se purificaron utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), se cuantificaron por nanodrop midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm y se utilizaron para transfectar las células LL/2 por electroporación. 500.000 células LL/2 fueron incubadas con 2 μ g de cada uno de los plásmidos. Se electroporaron a 220 V, 50 μ F en 100 μ l de PBS frio, y fueron dejadas en hielo durante 10 minutos antes de regresarlas a cultivo.

Selección de variantes celulares Tn⁺

La selección de las variantes expresando el antígeno Tn se realizó mediante clasificación celular utilizando el citómetro BD FACSAria Fusion (BD Biosciences). Para evaluar la expresión del antígeno Tn se utilizó el anticuerpo monoclonal IgM, específico de Tn, 83D4, desarrollado y gentilmente cedido por el Prof. Dr. Eduardo Osinaga⁶⁶. Este anticuerpo es específico contra el antígeno Tn expresado en células tumorales, debido a su especificidad contra clústeres consecutivo diméricos (Tn²) y triméricos de Tn (Tn³), aunque no reconoce residuos de Tn individuales (Tn¹), o residuos diméricos o triméricos de Tn no consecutivos, intersectados por un aminoácidos no glicosilados, como prolina (Tn²p) o treonina (Tn²t) (**Tabla 1**) ⁶⁶.

Tabla 1. Especificidad del anticuerpo monoclonal 83D4 y la lectina vegetal *Vicia villosa* (VVL-B4) contra Tn monomérico (Tn¹), dimérico consecutivo (Tn²), y trimérico consecutivo (Tn³), o clústeres de Tn no consecutivos separados por un aminoácido no glicosilado como prolina (Tn²p) o treonina (Tn²t). Modificado de (Osinaga et al, 2000).

	Tn¹	Tn²	Tn³	Tn²p	Tn²t
83D4	-	+	+	-	-
VVL-B4	+	+	+	+	+

También se utilizaron los anticuerpos murinos monoclonales IgG3 6E11, IgG1 15G9 e IgG2a 9A7¹³⁴. Mientras que los anticuerpos 6E11 y 9A7 reconocen *clusters* de Tn en secuencias de Ser^{Tn}-Thr^{Tn}-Thr^{Tn}, el 15G9 reconoce *clusters* de Tn en secuencias de Ser^{Tn}-Ser^{Tn} situados en el péptido de poliovirus KLFAVWKITYKDT¹³⁴.

Para analizar la expresión de Tn con los anticuerpos 83D4 (IgM), 6E11 (IgG3), 15G9 (IgG1) y 9A7 (IgG2a) se dispensaron 200.000 células por pocillo de placa de 96 pocillos (p96) de fondo cónico. Las células fueron incubadas con el sobrenadante de cultivo del hibridoma 83D4, o las ascitis de 6E11, 15G9 o 9A7 conteniendo los respectivos anticuerpos, y posteriormente lavadas y marcadas con un anticuerpo

secundario α -IgM o α -IgG murino conjugado a FITC. Todas las incubaciones se realizaron en buffer FACS (PBS conteniendo 2% FBS y 0,02% azida de sodio) y se analizaron por citometría de flujo. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, en un citómetro BD Accuri C6 (BD Biosciences) o CyAn ADP (Beckman Coulter), adquiriendo 10.000 células singuletes, y los análisis se realizaron utilizando el software BD CSampler Plus Software (BD Biosciences, versión 1.0.23.1) o FlowJo (Versión X.0.7).

Para sortear las células, se preparó una suspensión de 8x10⁶ células/ml y se marcaron con el anticuerpo 83D4 como se describió anteriormente. Las células Tn⁺ se obtuvieron al seleccionar 1 célula/pocillo (*single cell deposition*) o enriqueciendo a través de la obtención de 100 células Tn⁺/pocillo con alta pureza. En ambos casos, se seleccionaron las células Tn⁺ altamente reconocidas por el anticuerpo 83D4 en citometría de flujo y se denominaron LL/2 H12. A partir de estas células se realizó una nuevo *sorting*, a partir del cual se obtuvo la línea celular clonal LL/2 F9. Las clasificaciones celulares se realizaron en el equipo BD FACSAria Fusion (BD Biosciences).

Ensayo de actividad de la enzima T-sintasa

Para este ensayo se utilizaron lisados celulares, que se obtuvieron a partir de 2 millones de células, lisadas por sonicación (5 x 3 segundos) en Buffer Tris salino (TBS) (50 mM Tris-Cl pH 7,6 150 mM NaCl) con inhibitores de proteasas (Protease Inhibitor EDTA-free cocktail de Roche). Finalmente se agregó Tritón-X100 a una concentración final de 0,5%, se agitó mecánicamente (con un vortex) y centrifugó a 1000 g por 5 minutos. Las proteínas fueron cuantificadas mediante el método de ácido bicinconinico (BCA) utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay de Thermo Scientific, siguiendo las instrucciones del proveedor. El ensayo de actividad de T-sintasa se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente 135. Brevemente, 5 µl de extracto celular se incubaron con 1000 μM GalNAc-α-4-(MU), 500 μM UDP-Gal, 20 mM MnCl₂, 0.2 % Triton X-100, 800 unidades de O-glicosidasa en Buffer de ácido 2-etanosulfónico-NaOH 50 mM pH 6.8, a 37°C por 60 minutos en placas de 96 pocillos negras apropiadas para ensayos de medición de fluorescencia. El control negativo se realizó remplazando el UDP-Gal con H₂O. La reacción control (blanco) se realizó con la misma mezcla de reacción, pero sin la enzima O-glicosidasa. Al finalizar el tiempo de incubación, se agregaron 100 μL de Glicina-NaOH 1,0 M pH 10 para parar la reacción. La intensidad de fluorescencia se midió en un fluorímetro FLUOstar Galaxy (BMG, excitación 360-12, emisión 460). Para calcular la actividad de la enzima se utilizó una curva de calibración con 4-MU, y la actividad se expresó como nM de 4-MU por µg de proteína total.

Caracterización glicobiológica las líneas LL/2 Tn⁺ in vitro

Determinación de la expresión de glicosiltransferasas involucradas en la Oglicosilación por gRT-PCR

Para evaluar la expresión génica de diferentes glicosiltransferasas, primeramente, se extrajo el ARN de las células LL/2 WT, F9 y H12 con Tri-Reagent (Sigma), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La extracción se realizó con cloroformo, y el ARN fue precipitado con isopropanol. El ARN total fue cuantificado utilizando un Nanodrop y posteriormente se sintetizó cDNA utilizando el kit sensiFAST cDNA synthesis (Bioline). Las reacciones de qPCR para los diferentes genes se realizaron utilizando el SensiFAST SYBR No-ROX kit (Bioline) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Los *primers* utilizados se extrajeron de Nairn et al 2008³⁵ y se detallan en el **Anexo 1.** El programa para realizar las amplificaciones fue 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 58°C, 1 minuto a 60°C, y la curva de *melting* se realizó mediante un incremento de 0,5°C desde 65°C a 95°C en el termociclador CFX96 de Biorad, y analizado en el software Bio-Rad CFX Manager.

Caracterización del glicofenotipo por citometría de flujo

Para la determinación del glicoma de superficie celular, realizamos un ensayo de reconocimiento de las variantes celulares generadas y de la línea parental (WT) por parte de lectinas vegetales mediante citometría de flujo. En primer lugar, se incubaron las lectinas biotiniladas con estreptavidina conjugada a un fluróforo por 30 min a 4°C. Posteriormente, las células en cultivo se despegaron con EDTA 2 mM y se incubaron 200.000 células con la solución de lectinas-estreptavidina en placas de 96 pocillos de fondo cónico por 30 min a 4°C en PBS conteniendo 2% albúmina de suero bovino (BSA) y 0,02% azida de sodio.

Las lectinas (Vector Labs) utilizadas fueron: Aglutinina de *Helix pomatia* (HPA, 0.1 μg/ml), Isolectina de *Vicia villosa* (VVL 40 μg/ml), Aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA, 1 μg/ml), Aglutinina de *Erythrina cristagali* (ECA, 1 μg/ml), Aglutinina de *Sambucus Nigra* (SNA, 5 μg/ml), Lectina de *Maackia amurensis* II (Mal II, 10 μg/ml), Aglutinina de *Ariticum vulgaris* (WGA, 1 μg/ml), Lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA, 1 μg/ml), Aglutinina de *Glycine max* (SBA, 10 μg/ml), Aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA, 40 μg/ml), Jacalina (Jac, *Artocarpus integrifolia*, 20 μg/ml). La especificidad de

Tabla 2 – Especificidad primaria y secundaria de las lectinas utilizadas.

Lectina	Abreviatura	Especificidad primaria	Especificidad secundaria	Referencia
Aglutinina de Helix pomatia	НРА	α- y β-GalNAc		136
Isolectina B4 de <i>Vicia</i> <i>villosa</i>	VVL	Tn,α-GalNAc	β-GalNAc	137
Aglutinina de Glycine max	SBA	α- y β-GalNAc, Tn	Gal	138
Aglutinina de Dolichos biflorus	DBA	α-GalNAc, grupo sanguíneo A		139
Aglutinina de Arachis hypogaea	PNA	Galβ(1-3)GalNAc	Galβ(1–3)GlcNAc Galβ(1–4)GlcNAc	140
Aglutinina de Erythrina cristagali	ECA	Galβ(1–4)GlcNAc	Lac >GalNAc > Gal	141
Aglutinina de Sambucus Nigra	SNA	NeuAcα(2-6)Gal	NeuAcα(2- 6)GalNAc, Lac	142
Lectina de <i>Maackia</i> <i>amurensis</i> II	Mal II	NeuAcα(2-3)Gal		143
Aglutinina de Ariticum vulgaris	WGA	GlcNacβ(1,4) GlcNacβ(1,4) GlcNAc > GlcNacβ(1,4) GlcNAc > GlcNac	internal GlcNAc in polylactosamine repeats > (Sialic acid (Neu5Ac)	144,145
Lectina de Canavalia ensiformis	ConA	αMan>αGlc		146
Jacalina	Jac	Galβ(1-3)GalNAc, α-GalNAc	Core 3, sialilT	147

estas lectinas se muestra en la **Tabla 2.** También se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-Tn 83D4 (sobrenadante de cultivo del hibridoma) y una proteína quimérica formada por el dominio de reconocimiento de MGL2 o MGL1 con la porción Fc de un anticuerpo humano, mMGL2-Fc o mMGL1-Fc (10 µg/ml). Estas proteínas quiméricas fueron producidas y gentilmente cedidas por la Dra. Sandra van Vliet⁹⁶. Tanto el anticuerpo como MGL1-Fc y MGL2-Fc se incubaron por 30 min a 4°C con 200.000 células en placas de 96 pocillos de fondo cónico por 30 min a 4°C en solución balanceada de sales de Hanks (HBSS) conteniendo 0,05 % BSA. Para la inhibición de la unión de MGL2-Fc por su dominio de reconocimiento, se utilizó ácido egtázico (EGTA) 10 mM como quelante de calcio. Las células se lavaron dos veces con los *buffers* correspondientes, y en el caso de la marcación con 83D4, se las incubó con un

anticuerpo anti-IgM de ratón conjugado a FITC, y para MGL1-Fc o MGL2-Fc, o un anticuerpo anti-Fc humano conjugado a APC por 30 minutos a 4°C. Se volvieron a lavar dos veces y se fijaron con paraformaldehido (PFA) 1% en PBS. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, en un citómetro BD Accuri C6 (BD Biosciences) o CyAn ADP (Beckman Coulter), adquiriendo 10.000 células singuletes, y los análisis se realizaron utilizando el software BD CSampler Plus Software (BD Biosciences, versión 1.0.23.1) o FlowJo (Versión X.0.7).

Ensayo de inhibición del reconocimiento de 83D4 por MGL2-Fc

Para determinar si la lectina MGL2 interacciona con células LL/2 Tn⁺ por reconocimiento de ligandos glicosilados similares a los epitopes blanco del anticuerpo 83D4 (Tn² y Tn³), se evaluó si la pre-incubación de MGL2 lograba inhibir el reconocimiento por el anticuerpo. 200.000 células fueron pre-incubadas con mMGL2-Fc (25 μg/ml) por 30 minutos a 4°C previo a la marcación con 83D4, tomando la precaución de no lavar las células al final de la incubación. Posteriormente, las células se marcaron con el anticuerpo 83D4 como se describió anteriormente. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, en un citómetro CyAn ADP (Beckman Coulter), adquiriendo 10.000 células singuletes, y los análisis se realizaron utilizando el software FlowJo (Versión X.0.7).

Evaluación de la naturaleza carbohidrato-dependiente de la interacción con lectinas biotiniladas mediante de-N-glicosilación

Para evaluar el reconocimiento de lectinas en células de-N-glicosiladas, las células LL/2 fueron pre-incubadas con Peptido-N-glicosidasa F (PNGasa-F, NEB) a 100 U/ml, ON en agitación leve a 37°C en medio sin FBS. Posteriormente, las células se lavaron, y se incubaron con las lectinas VVL, ConA, ECA y PNA como se describió previamente.

SDS-PAGE y Western Blot

Se recolectaron células de cultivo y los *pellets* celulares se resuspendieron en Buffer de Ensayo de Radioinmunoprecipitación (Buffer RIPA, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP-40, 0,5% deoxicolato de sodio, 0,1 % de sodio dodecil sulfato (SDS)) con Cocktail Inhibidor de Proteasa libre de EDTA (Roche). La concentración proteica se midió con el kit Pierce BCA Protein Assay de Thermo Scientific, siguiendo las instrucciones del proveedor. Se prepararon geles de acrilacrilamida/bis-acrilamida 8% y se corrieron 10 µg de proteína total por carril en buffer de muestra (buffer Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, 2.5 % SDS, 0.002 % azul de

bromofenol, 0.7135 M (5%) β -mercaptoetanol, 10 % glicerol). Las muestras se corrieron a 100 V en buffer tris 25 mM, 200 mM glicina 0.1% SDS. Posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham) a 300 mA por 2 horas en el sistema húmedo de BioRad en buffer Tris 25 mM, 200 mM glicina, 20 % metanol (MeOH). Las membranas se bloquearon ON a 4°C utilizado Roti-Block 1/10 (Carl Roth). Posteriormente, se lavaron y se incubaron con 10 μ g/ml de mMGL2-Fc o 1 μ g/ml HPA, 1 μ g/ml de VVL, 1 μ g/ml de WGA, 1 μ g/ml de ConA en buffer TSM (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH 7.4). por 1 hora a temperatura ambiente. En el caso del experimento del bloqueo de la membrana con VVL, se incubó previamente la membrana con 2 μ g/ml de VVL y posteriormente con 10 μ g/ml de mMGL2-Fc sin lavados intermedios. Después de la incubación, se lavó con TSM 0.1 % Tween-20, se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado a peroxidasa (en el caso de mMGL2-Fc) o con streptavidina conjugada a peroxidasa (en el caso de las lectinas vegetales). Las membranas se revelaron utilizando el kit ECL Western Blot Substrate (Pierce).

Reconocimiento de las líneas Tn⁺ por células CHO-MGL2⁺

Para evaluar si la lectina MGL2 expresada en la superficie de células es capaz de reconocer las líneas tumorales Tn+, se utilizaron células de cáncer de ovario de hámster chino (CHO) genéticamente modificadas para expresar MGL2 murino, generadas y gentilmente cedidas por la Dra. Sandra van Vliet⁹⁶. Esta interacción se evaluó tanto por citometría de flujo en células en suspensión como por un ensayo en fase sólida. Para ambos experimentos, las células CHO-MGL2 se resuspendieron a 4 x 10⁶ células/ml y se las marcó con Calcein-AM a una concentración final de 1 μg/ml. Se las incubó por 30 minutos a 37°C en la oscuridad y posteriormente se lavaron con PBS.

Para la evaluación por citometría de flujo, las células LL/2 se resuspendieron a 1x10⁶ células /ml y se marcaron con 2,5 μM Vybrant DiD cell-labeling solution (DiD, ThermoFisher) por 20 minutos a 37°C en oscuridad. Luego se lavaron en PBS 2 % albumina de suero bovino (BSA). En placas de 96 pocillos, se agregaron 100.000 células LL/2 (marcadas con DiD) y 100.000 células CHO-MGL2 (marcadas con la sonda fluorescente Calcein-AM) en solución balanceada de HBSS 0.05% BSA, en presencia o ausencia de 10 mM de EGTA y se realizó una rápida centrifugación de las placas para asegurar la interacción celular. A tiempo 0 minutos y 3 minutos posterior a la centrifugación, se fijaron las células con PFA a una concentración final de 1% y se analizaron 10.000 células por citometría de flujo en el citómetro CyAn ADP (Beckman

Coulter), evaluando el porcentaje de eventos doble positivos, con la precaución de no excluir dupletes del análisis. El análisis se realizó con el software FlowJo (X.0.7)

Para el ensayo de interacción en placa, se plaquearon 20000 células de las diferentes variantes de LL/2 sin marcar en placas de 96 pocillos y se dejaron en cultivo por 2 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se agregaron a cada pocillo 20000 células CHO-MGL2 (marcadas con Calcein-AM) en ausencia o presencia de 10 mM EGTA y se centrifugó por 1 minuto a 250 rpm. A tiempo 1 minuto y 5 minutos, se retiró el medio y se lavaron las células no adheridas con PBS y se lisaron las células adheridas con 100 µl de buffer de lisis 50 mM Tris 0,1% SDS. Finalmente se midió la fluorescencia es un fluorímetro FLUOstar Galaxy (BMG, excitación 480 nm, emisión 530 nm). Se calculó el porcentaje de unión como la relación entre la condición sin EGTA y la condición con EGTA, en la cual se impide la interacción MGL2-ligando.

Análisis estructural de O-glicanos por HILIC-UPLC-FLR

A partir de 5x10⁶ células se realizaron lisados celulares por sonicación en buffer Tris-Acetato 0,1 M pH 7,4 con 20% SDS. Las muestras fueron incubadas con DNAsa durante 30 min a 37°C, reducidas con 10% ditiotreitol (DTT) por 10 min a 70°C y alquiladas con 100 mM de 2-iodoacetamida (2-IA) por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las proteínas fueron precipitadas con acetona ON y digeridas con tripsina 0,25% en buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8,1 a 37°C ON. Al día siguiente, las proteínas se desnaturalizaron por 3 minutos a 100°C con 0.5% SDS en Buffer NaHCO₃ 20 mM pH 8.1. Cuando se enfriaron hasta temperatura ambiente, los O-glicanos se liberaron tanto mediante la incubación con O-glicosidasa o mediante β-eliminación. Para la digestión con O-glicosidasa, las muestras se incubaron con 80.000 unidades de O-glicosidasa (NEB) junto con 4 µl NP-40 10%, 4 µL Glycobuffer 2 (50 mM Sodium Phosphate pH 7.5, NEB) y 100 unidades de α2-3,6,8 Neuramidasa en 20 μl de H₂O ON a 37°C según instrucciones del proveedor. Para la β-eliminación, las muestras se incubaron con 1 mL de solución saturada de carbonato de amonio en amoníaco 29,2% ON a 60°C, y posteriormente se neutralizaron, según lo descripto por Naughton et al 2013¹⁴⁸.

Los O-glicanos liberados por cualquiera de las dos estrategias fueron separados por filtración con filtros Nanosep 10K (Omega, Pall Life Sciences) y marcados con 2aminobenzamida (2-AB) mediante una reacción de adición nucleofílica y posterior reducción, consiguiéndose una marcación estable. La reacción se llevó a cabo durante 150 min a 65°C y el excedente del 2-AB se eliminó mediante cromatografía en papel con acetonitrilo como solvente.

Las muestras se analizaron por HILIC-UPLC-FLR (λex=330 nm, λem=420 nm) usando una columna para glicanos BEH (150 x 2.1 mm, con partículas híbridas de etilsioxano/silica de 1,7 µm, Waters) en un equipo Acquity H-Class (Waters). Se utilizó como estándar externo una solución de dextran parcialmente hidrolizado para estandarizar los tiempos de retención en unidades de glucosa (GU). El solvente A fue ácido fórmico 50 mM a ajustado a pH 4.4 con solución de amonio y el solvente B acetonitrilo. La temperatura de la columna fue de 40°C. El método de 45 minutos se realizó en un gradiente 88-53 % de solvente A, a un flujo de 0,56 ml/min por 37.5 minutos, seguido por un 53-30 % de solvente A, para finalmente revertir a 88% de solvente A para completar la corrida. Las muestras se prepararon en 88% (v/v) de acetonitrilo y se mantuvieron a 5°C hasta el momento de la inyección (10 µl). Los resultados se procesaron usando el software Waters Empower 3 chromatography workstation.

Para evaluar específicamente monosacáridos (niveles de GalNAc), se utilizó el kit LudgerTagTM 2-AA (2-aminobenzoic acid) Monosaccharide Release and Labeling Kit y las condiciones cromatográficas sugeridas por el proveedor. Los glicanos liberados mediante β-eliminación se incubaron con 50 μL de LT-NaOAc-01 y se homogeneizaron con un vortex por 15 segundos. Posteriormente, se incubaron con 50 µL de la solución de 2-AA (LT-2AA-02) y 50 µl de la solución de cianoborohidrido de sodio (LT-CYANOB-03) a 80°C por 45 minutos. Subsiguientemente, las muestras fueron diluidas en BPT (0,2% butilamina, 0,5% ácido fosfórico, 1% tetrahidrofluorano). Las muestras se analizaron por HPLC-FLR con separación por matriz de fase reversa (λ^{ex} =360 nm, λ^{em}=425 nm) usando una columna LudgerSep™ uR2 en un equipo Acquity H-Class (Waters). El solvente A fue BPT y el solvente B 50 % BPT: 50% acetonitrilo. La temperatura de la columna fue de 30°C y el flujo durante la corrida de 0.8 ml/min. El método de 45 minutos se realizó a flujo 7% de solvente B por 7 minutos, seguido por un gradiente 7-17% de solvente B por 18 minutos, continuando por un gradiente 17-100% de solvente B por un minuto, flujo de solvente B 100% por 10 minutos, para finalmente revertir a 7% de solvente B en 1 minuto y continuar con flujo 7% de solvente B hasta completar la corrida. Las muestras se prepararon en BPT y se mantuvieron a 5 °C hasta el momento de la inyección (10 µl). Los resultados se procesaron usando el software Waters Empower 3 chromatography workstation.

Análisis estructural del N-glicoma celular por HILIC-UPLC-FLR

A partir de las líneas celulares recolectadas del cultivo, se purificaron las proteínas membranarias usando el kit de extracción de proteínas de membrana Mem-PER Plus

(ThermoFisher) y se cuantificaron con BCA. Las muestras fueron reducidas con 100 mM DTT por 10 minutos a 70°C y posteriormente se alguilaron con 100 mM de 2iodoacetamida (2-IA), por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, las proteínas se incubaron ON con Tripsina 0,25% en buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8,1 a 37°C. Al día siguiente, las muestras se desnaturalizaron por 3 minutos a 100°C con 0.5% SDS en Buffer NaHCO₃ 20 mM pH 8.1. Cuando se enfriaron hasta temperatura ambiente, se les agregó 100 U/ml de PNGasa-F, junto con 25mM EDTA, 2.5% NP-40, 1 % DTT y se hidrolizó ON a 37°C. Los N-glicanos liberados fueron separados por filtración con filtros Nanosep 10K (Omega, Pall Life Sciences) y marcados con 2-AB durante 180 min a 65°C y el excedente del 2-AB se eliminó mediante cromatografía en papel con acetonitrilo como solvente 149,150. Las muestras se analizaron por HILIC-UPLC-FLR (λex=330 nm, λem=420 nm) usando una columna para glicanos BEH (150 x 2.1 mm, con partículas híbridas de etilsioxano/sílica de 1,7 µm, Waters) en un equipo Acquity H-Class (Waters). Se utilizó como estándar externo una solución de dextran parcialmente hidrolizado para estandarizar los tiempos de retención en unidades de glucosa (GU). El solvente A fue ácido fórmico 50 mM a ajustado a pH 4.4 con solución de amonio y el solvente B acetonitrilo. La temperatura de la columna fue de 40°C. El método de 30 minutos se realizó en un gradiente 30-47% de solvente A, a un flujo de 0,56 ml/min por 23 minutos, seguido por un 47-70% de solvente A, para finalmente revertir a 30% de solvente A para completar la corrida^{150,151}. Las muestras se prepararon en 70% (v/v) de acetonitrilo y se mantuvieron a 5 °C hasta el momento de la inyección (10 µl). Los resultados se procesaron usando el software Waters Empower 3 chromatography workstation. La identificación de los Nglicanos fue asistida por la digestion con exoglicosidasas¹⁵², incluyendo: α(2-3,6,8,9) neuraminidasa A (clonada de Arthrobacter ureafaciens y expresada en E. coli); α(2-3) neuraminidasa (clonada de from Streptococcus pneumoniae y expresada en E. coli) y β(1-3,4)-galactosidasa (clonada de testículo bovino). Las digestiones enzimáticas se realizaron sobre los N-glicanos marcados con 2-AB en los buffers recomendados por el fabricante por 16 horas a 37°C. Posterior a la digestión, los N-glicanos se separaron de las exoglicosidasas previo al análisis cromatográfico por centrifugación con en filtros de microcentrífuga Nanosep 10K Omega (Pall Life Sciences). Todas exoglicosidasas se adquirieron en New England Biolabs.

Caracterización de las propiedades celulares in vitro

Ensayo de viabilidad celular con Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)

Se recolectaron las células LL/2 WT, H12 y F9, se contaron y se plaquearon en placas de 96 pocillos partiendo de una concentración de 125000 células por pocillo en 200 µl de medio de cultivo en la primera fila, y realizando diluciones seriadas al medio en la columna correspondiente. Después de 24 horas en cultivo, se retiraron 100 µl de medio y se agregó a las células MTT (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 2,5 mg/ml y se incubaron por 4 horas a 37°C. Finalmente, se agregaron 100 µl de 0.1 M HCl en alcohol isopropílico para disolver los cristales de MTT y se midió la absorbancia a 570 nm.

Ensayo de formación de colonias

Se plaquearon 500 células LL/2 en placas de 100 mm y se incubaron a 37°C durante 10 días en medio completo. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y las células se tiñeron con una solución de cristal violeta 0.05%, conteniendo formaldehido 1%, Metanol 1% en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Las unidades formadoras de colonias se contaron manualmente.

Ensayo de migración celular in vitro por cierre de herida

Se despegaron las células LL/2 y se plaquearon 1x10⁶ células por pocillo en placas de 6 pocillos, y se las incubó hasta que alcanzaran confluencia. Posteriormente, se realizó una herida en la monocapa con un *tip* de micropipeta de 200 µl. Las células se lavaron 2 veces con PBS para eliminar los restos celulares (*debris*) y se cultivaron en medio de cultivo con 2% de FBS. Se sacaron fotos a 0, 24, 48 y 72 horas en un microscopio de epifluorescencia Leica TCS SP5 II y el área de la herida se midió con el software Image J.

Ensavo de invasión celular in vitro

Para evaluar la invasión celular, se utilizaron insertos de cultivo celular Nunc de Polycarbonato con poros de 8 micras en placas de 24 pocillos (Thermo Fisher). A los insertos se les agregó 100 µl de una solución de 1 mg/ml de colágeno en buffer Hepes 20 mM, 26 mM NaHCO₃, 5 mM NaOH y se lo dejó gelificar a 37°C por 4 h. Posteriormente, se agregaron 500 µl de medio de cultivo completo a la parte inferior del pocillo. Las células LL/2 se plaquearon en la parte superior del inserto a una concentración de 1x10⁵ células por pocillo, en medio libre se FBS, y se incubaron a

37°C por 48 h. A continuación, los insertos se lavaron con PBS y se utilizó un cotonete para eliminar las células pegadas a la parte superior del inserto. Las células en el lado inferior del inserto se tiñeron con una solución de cristal violeta 0.05%, 1% formaldehido, 1% Metanol en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los insertos se lavaron con agua, y las fotografías se tomaron con un microscopio de epifluorescencia Leica TCS SP5 II y se analizaron con el software Image J. Se analizó el número de células capaces de atravesar la capa de colágeno.

Producción de medio condicionado celular

Las células se despegaron y se lavaron con PBS 2 veces. Se plaquearon en *flasks* o placas de 100 mm según las siguientes concentraciones: (2.5 x 10⁶ en *flask* T75, o 5.0 x 10⁶ en placas de 100 mm). Se dejaron por 18 horas en medio libre de FBS a 37°C. Posteriormente, se retiró el medio y se lo centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm para eliminar el *debris* celular, y se agregó inhibidor de preoteasas (Protease Inhibitor EDTA-free cocktail de Roche), según la recomendación del fabricante.

Caracterización del crecimiento tumoral in vivo

Ratones

Se utilizaron ratones C57BL/6 adquiridos del DILAVE (Uruguay) y ratones MGL2-DTR con un fondo genético C57BL/6 adquiridos del Laboratorio Jackson, mantenidos en la unidad de animales transgénicos y de experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo. Los ratones MGL2DTR contienen un cDNA codificante para la proteína quimérica del receptor de toxina diftérica humano (DTR)-EGFP en el exón 2 de MGL2¹⁰⁹. La inyección de toxina diftérica (DT) depleta específicamente las células MGL2⁺¹⁰⁹. Los ratones que reciben múltiples inyecciones de DT son viables y la depleción dura hasta 6 días posterior a una única inyección¹⁰⁹.

Para los experimentos se utilizaron hembras de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones fueron alojados en el bioterio de Facultad de Medicina, UdelaR durante los experimentos, siguiendo las normas de la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA, Uruguay). Todos los procedimientos involucrando animales fueron aprobados por el Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Protocolos Nº 070153-000543-16 y 070153-000811-19).

Modelo de crecimiento tumoral

Realizamos un modelo de crecimiento tumorales a través de la inoculación subcutánea de las células LL/2 Tn⁺ y parental WT en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6 o MGL2-DTR.

Para la inoculación de las células LL/2, las mismas se recolectaron en una confluencia aproximada del 60-70%, se contaron y se prepararon a una concentración de $2x10^6$ células/ml. Los animales C57BL/6 fueron anestesiados con una solución de ketamina 10 mg/ml y xilacina 0.1% en PBS, y se inocularon 200.000 células en 100 μ l de PBS utilizando agujas 21 *gauge* subcutáneamente en el flanco izquierdo del ratón. Se monitoreó la aparición de tumores y a partir de la presencia de los mismos se midió el tamaño tumoral cada 2-3 días, y el volumen se calculó como V=3/4. π .($r_1.r_2^2$), siendo r_1 el radio mayor y r_2 el radio menor. Los animales fueron sacrificados cuando el ratón con mayor tamaño tumoral alcanzó los 12.5 mm de radio. Se extrajeron los tumores, se pesaron y se procesaron para microscopía, PCR o citometría de flujo. En caso de disgregación, también se colectó el medio de disgregación mecánica para su posterior análisis por ELISA. También se extrajeron los bazos y los ganglios drenantes al tumor.

Para evaluar el papel de MGL2 en el crecimiento tumoral se utilizaron animales MGL2-DTR, a los cuales se les depleta las células MGL2+ al inocularlos con la tóxima diftérica. Los animales fueron inyectados intraperitonealmente cada 3-4 días desde el día -1 de inoculación de las células, con 0.5 µg de toxina diftérica (Tha Native Antigen company) en PBS o solo PBS en el caso de los controles. El procedimiento de inoculación y seguimiento fue el mismo al descrito para los animales C57BL/6.

Análisis del microambiente tumoral por citometría de flujo

En el caso de los análisis de las células provenientes de tumores, los mismos se disgregaron mecánicamente y luego se incubaron con 100 U/ml de Colagenasa tipo IV por 1 hora a 37°C. Posteriormente, se filtraron los tumores con filtros de 40 μm y se lisaron los glóbulos rojos con buffer de amonio-cloruro-potasio (ACK, 150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA). Luego, se dispensaron entre 50.000 y 200.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo cónico. Para la marcación con 83D4, se pre-incubaron las células con buffer de *stripping* (100 mM Glicina 4 g/l NaCl) por 30 minutos a 37°C, para eliminar anticuerpos murinos que podrían estar adheridos a las mismas y evitar reacciones inespecíficas con el anticuerpo secundario anti-lgM murino. Para la identificación de glóbulos blancos (identificados por ser CD45+), se incubaron las células con los anticuerpos diluidos en PBS conteniendo 2% FBS, 0.02%

NaN₃ por 30 min a 4°C. Pasado este tiempo, las células se lavaron dos veces por centrifugación con buffer FACS a 2000 rpm por 2 minutos. Los anticuerpos utilizados fueron anti-CD45 (104), -F4/80 (BM8), -CD11c (N418), -MGL2 (URA-1), -CD4 (GK1.5), -CD8á (53.6-7), -CD3 (17A2), α-CD49b (DX5), α-NK1.1 (PK136). Las concentraciones de uso se detallan en el Anexo 2.

Para la marcación intracelular, se utilizaron los buffers de fijación y permeabilización de BioLegend, según su recomendación. Posterior a la marcación extracelular, se fijaron las células con el buffer de fijación por 20 min a temperatura ambiente. Luego se lavaron con el buffer de permeabilización diluido en agua destilada y se incubaron las células con los anticuerpos intracelulares diluidos en buffer de permeabilización por 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos utilizados fueron α-IL-10 (JES5-16E3), α-TGFβ (21C11), α-IFNγ (XMG1.2), α-IL-4 (11B11), α-Foxp3 (FJK-16s). La concentración de uso se detalla en el Anexo 2. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, en un citómetro BD Accuri C6 (BD Biosciences) adquiriendo 20.000 células y los análisis se realizaron utilizando el software FlowJo (Versión X.0.7).

Expresión de CD31, CD11c, MGL2 en tumores por microscopía

Los tumores extraídos fueron congelados en PolyFreeze Tissue Freezing Medium (Sigma) y cortados en crióstato y montados sobre láminas silanizadas. Las secciones se fijaron con acetona a -20°C o con 100 % Metanol 0,1% Tritón X-100 (para el caso de la marcación con el anticuerpo α-CD31). Se bloquearon con 5% FBS y se incubaron con los anticuerpos α-CD11c PECy7, α-MGL2-PE, o α-CD31 ON a 4°C en oscuridad. Las concentraciones de uso se detallan en el **Anexo 2**. Para la marcación con α-CD31 se utilizó α-rlgG-FITC como anticuerpo secundario, el cual fue incubado por 3 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se realizó una contra-tinción de los núcleos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 40 ng/ml por 5 minutos a temperatura ambiente. Entre cada paso se realizaron 3 lavados en PBS 0,1% Tween-20 por 10 minutos cada uno a temperatura ambiente. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal espectral Leica modelo TCS SP5 II, disponible en la Unidad de Microscopía de Facultad de Medicina, UdelaR y analizadas con el software ImageJ. Para el análisis fractario se utilizó el plugin FracLac¹⁵³.

Cuantificación de citoquinas por real time RT-PCR

El ARN total de los tumores se aisló utilizando TRI-reagent (Sigma-Aldrich), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La extracción se realizó con cloroformo, y el ARN fue precipitado con isopropanol. El ARN total fue cuantificado utilizando un Nanodrop y posteriormente se sintetizó cDNA utilizando el kit sensiFAST cDNA synthesis (Bioline). El cDNA se sintetizó utilizando el kit SensiFast cDNA synthesis kit (Bioline) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para las real time PCR, las muestras se analizaron en un Eco real-time PCR (Illumina) utilizando el Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). Los primers utilizados se detallan en el **Anexo 1**. El programa para realizar las amplificaciones fue 20 segundos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, y la curva de *melting* se realizó mediante un incremento de 1,3% desde 60°C a 95°C en el termociclador StepOne Plus System Applied Biosystems.

En el caso de la cuantificación de VEGF y PDGF, las reacciones de PCR se realizaron utilizando el QuantiTect Primer Assay (Qiagen) de VEGF o PDGF murino (Mm_Vegfa_1_SG Qiagen QT00160769, Mm_Pdgfb_1_SG Qiagen QT00266910) según las recomendaciones del proveedor.

Determinación de la concentración de VEGF y PDGF por ELISA

Para dosificar el VEGF y PDGF secretados del tumor, se colectó el medio de disgregación física previo al tratamiento con colagenasa y se cuantificó con BCA. Para determinar VEGF y PDGF secretado por las células en cultivo, se plaquearon 1x10⁶ células en placas de 6 pocillos. A las 24 horas, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron 3 veces con PBS y se les agregó medio de cultivo libre de FBS (medio condicionado). A las 18 horas se colectaron los medios y se midió la concentración proteica mediante BCA. El ELISA de VEGF y PDGF se realizó utilizando el kit SimpleStep ELISA de VEGF o PDGF (Abcam) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 50 μl de la muestra con 50 μl del cocktail de anticuerpos por 1 hora a temperatura ambiente en agitación en los pocillos de la placa suministrada. Pasado el tiempo de incubación se lavaron 3 veces con buffer de lavado y se le agregó 100 μl de la solución de revelado de TMB por 10 minutos. Luego se frenó la reacción con la solución de *stop* y se midió la absorbancia a 450 nm

Evaluación de actividad metaloproteasa

Para evaluar la actividad de metaloproteasas, se utilizó el kit MMP Activity Assay Kit (Fluorometric - Red) (abcam) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En primer instancia, se activaron las metaloproteasas de 25 µl de medio de disgregación de tumores con 25 µl de 2 mM de 4-aminophenilmercurico acetato (APMA, concentración final 1 mM) por 2 horas a 37°C. Posteriormente se le agregó 50 µl del

sustrato de la reacción (MMP red solution) diluido 1/100 en el buffer de ensayo suministrado, y se midió la fluorescencia (exitación 540 / emisión 590nm) por 60 minutos en intervalos de 5 minutos en un Varioskan Flash de Thermo. La actividad de metaloproteasas se representó como unidades de fluorescencia relativa por mg de proteína total.

Evaluación de la respuesta inmune celular

Para el estudio de la polarización de linfocitos T de animales con tumor, se obtuvieron suspensiones celulares de bazo (esplenocitos). 1x10⁶ células fueron cultivadas en RPMI completo en presencia de estímulos policionales (Concanavalina A, ConA; 5 μg/mL o CD3/CD28 (1μg/ml/ 1μg/ml)) por 72 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego de ese tiempo, se determinó la concentración de las citoquinas IFNγ e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo por ELISA.

Los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo fueron cuantificados mediante ensayos de ELISA sándwich específicos (BD Biosience, para citoquinas murinas. Para ello, placas Nunc de 96 pocillos fueron sensibilizadas con anticuerpos primarios específicos de cada citoquina (BD Bioscience) en buffer fosfato 100 mM pH 9 (o buffer fosfato 200 mM pH 6 en el caso de IL-10) toda la noche a 4° C. Se bloqueó con gelatina 1% en PBS por 1 hora a 37° C. Las muestras y los estándares de cada citoquina para las curvas de calibración se incubaron por 1 hora a 37° C, u ON en el caso de la detección de IL-10. Los anticuerpos secundarios conjugados a biotina utilizados se incubaron durante 1 hora a 37° C. La estreptavidina-peroxidasa fue incubada por 30 minutos a 37° C. El sistema de revelado consistió en OPD 0,5 mg/mL y 0,12% H₂O₂ en Buffer citrato-fosfato 0,1 M pH 5 y la reacción se detuvo con HCl 3 M. Luego se midió la absorbancia a 492 nm.

Determinación de citoquinas y anticuerpos en el suero de animales con tumor

Previo al sacrificio de los animales, se recolectó sangre y se centrifugó 15 min a 5000 rpm para obtener el suero. A partir del mismo, se detectaron citoquinas por ELISA, siguiendo el protocolo detallado anteriormente.

A su vez, se evaluó el título de anticuerpos en suero de los animales con tumor. Para ello, placas Nunc de 96 pocillos fueron sensibilizadas con los sueros de los animales en diluciones seriadas, en buffer carbonato 50 mM pH 9 ON a 4° C. Se bloqueó con gelatina 1% en PBS por 1 hora a 37° C. Los anticuerpos secundarios α -lgM murina e α -lgG murina conjugados a biotina se incubaron durante 1 hora a 37° C.

La estreptavidina-peroxidasa fue incubada por 30 minutos a 37°C. El sistema de revelado consistió en OPD 0,5 mg/mL y 0,12% H2O2 en Buffer citrato-fosfato 0,1 M pH 5 y la reacción se paró con HCl 3 M. Luego se midió la absorbancia a 492 nm y se calcularon los títulos de los anticuerpos.

Estimulación de BMDC con medios condicionados o medios de disgregación de los tumores

Generación de BMDC

Para la generación de BMDC, se extrajeron los precursores de médula ósea de tibia y fémur de ratones C57/BL6. Los mismos fueron cultivados en placas a una concentración final de 8 x 10⁶ células por placa, en 8 ml de medio RPMI completo con GM-CSF a 20 ng/ml (Peprotech) por 7 días. Al día 4, se realizó un refuerzo del medio con GM-CSF (20 ng/ml) agregando 4 ml por placa. Al séptimo día, se colectaron las células para su uso, incubando las placas con EDTA 1 mM por 10 min a 37°C, para obtener las células sueltas y las débilmente adherentes. El medio de cultivo junto con la solución de EDTA se centrifugaron durante 10 min a 1500 rpm, y se contaron las células para su posterior uso en experimentos de estimulación.

Estimulación de BMDC

Se incubaron $4.7x10^5$ BMDC en tres placas de cultivo de 96 pocillos con los medios condicionados de las células tumorales o el sobrenadante de disgregación de los tumores ON a 37° C con 5% CO₂ en volúmenes iguales. Posteriormente, se recogió el sobrenadante del cultivo y se midió IL-10, TNF α e IL-12 por ELISA, siguiendo el protocolo detallado anteriormente.

En dos de las tres placas de cultivo, las células se recogieron, se lavaron y se marcaron con anticuerpos específicos para analizar por citometría de flujo. Se incubaron las células con los anticuerpos diluidos en PBS conteniendo 2% FBS, 0.02% NaN₃ por 30 min a 4° C. Pasado este tiempo, las células se lavaron dos veces por centrifugación con buffer FACS a 2000 rpm por 2 minutos. Los anticuerpos utilizados fueron α -CD11c (N418), -MGL2 (URA-1), -MHC-II (M5/11415.2), -CD80 (16-10A1) y -CD86 (GL1). Las concentraciones de uso se detallan en el **Anexo 2**. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, en un citómetro BD Accuri C6 (BD Biosciences) adquiriendo 20.000 células y los análisis se realizaron utilizando el software FlowJo (Versión X.0.7).

Ensayo de estimulación de linfocitos alogénicos

A partir de un ratón BALB/c, se extrajo el bazo, se disgregó y los glóbulos rojos fueron lisados con buffer ACK, según lo descripto anteriormente. Los esplenocitos se contaron, y se dispensaron en la tercera placa del ensayo de estimulación, 5.87×10^5 por pocillo junto con las BMDC estimuladas. Se incubó en cultivo por 5 días a 37° C con 5% CO₂. Posteriormente, se recogió el sobrenadante del cultivo y se midieron IFN γ e IL-10 por ELISA, siguiendo el protocolo detallado anteriormente.

Análisis Bioinformático

Los análisis de correlación se realizaron utilizando el programa GEPIA2 (gepia2.cancer-pku.cn) con una base de datos humana de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, LUAD) con 483 muestras de tumor de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). También se realizaron análisis incluyendo muestras de 1896 pacientes con adenocarcinoma de colon (COAD), recto (READ), páncreas (PAAD), próstata (PRAD) y estómago (STAD). Los genes analizados fueron *clec10a* (codificando para MGL), *cd4*, *cd8a*, *il10*, subunidad alfa del receptor de IL-10 (*il10ra*), subunidad alfa de la integrina X (*itgax*, codificante para CD11c) y la molécula de adhesion plaquetaria y endothelial 1) (*pecam1*, codificante para CD31).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism (Graph-Pad Prism 6.01). Se utilizó el t-test de Student no apareado o el ANOVA de una vía, para determinar la significancia de las diferencias entre grupos. Se consideró estadísticamente significativo un p valor de p<0.05. Los datos son representativos de al menos dos experimentos individuales. Los asteriscos se correlacionan con la significancia del resultado, siendo *P < 0.05; ** P < 0.01 y *** P < 0.001.

Resultados

Objetivo 1 - Generación de células tumorales murinas que expresen el antígeno

Tn

Para inducir la expresión del antígeno Tn se seleccionó la línea tumoral murina LL/2 o LLC1, derivada de carcinoma de pulmón de tipo Lewis con fondo genético C57BL/6. La generación de las variantes Tn⁺ y Tn⁻ a partir de la línea tumoral parental LL/2 se realizó la tecnología Crispr/Cas9. Las células fueron transformadas por electroporación con dos plásmidos: uno conteniendo la secuencia codificante para Cas9 y otro codificando para un ARN guía (small guide RNA) específico para la dirigir la actividad nucleasa de Cas9 contra el gen Cosmc. Utilizando el anticuerpo monoclonal (mAb) específico 83D4, se analizó por citometría de flujo el nivel de expresión de Tn. La eficiencia de transfección, definida como el porcentaje de células positivas para la marcación con el anticuerpo 83D4, fue del 5,1% (Figura 12). Las células positivas fueron clasificadas utilizando un Sorter Celular y posteriormente enriquecidas mediante la tecnología de Single Cell Deposition utilizando el mismo equipo, depositando entre 1 y 100 células por pocillo. Las variantes fueron analizadas por citometría de flujo y se seleccionaron en base a su unión al anticuerpo 83D4 (LL/2-

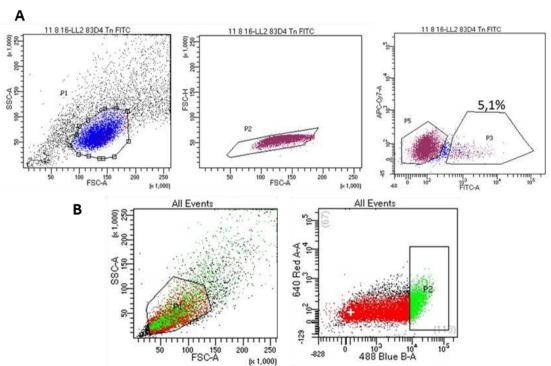


Figura 12 - Citometría de flujo de las células LL/2 post-transfección con el anticuerpo α -Tn 83D4. Las células se transfectaron con los plásmidos codificantes para la secuencia guía de CRISPR/Cas9 para la chaperona Cosmo, generando células Tn+. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo α-Tn, 83D4, y su reactividad fue analizada por citometría de flujo. A- Sorting de las células LL/2-H12, las células seleccionadas para sortear se encuentran en el gate P3. B- Sorting de las células LL/2-F9, las células seleccionadas para sortear se encuentran en el gate P2.

H12) que provenía de un pocillo con 100 células depositadas. A partir de estas células, denominadas LL/2-H12, se realizó una segunda ronda selección celular, de la cual seleccionamos la variante LL/2-F9, proveniente de un pocillo con una única célula depositada (Figura 12). De esta forma, resulta destacar importante

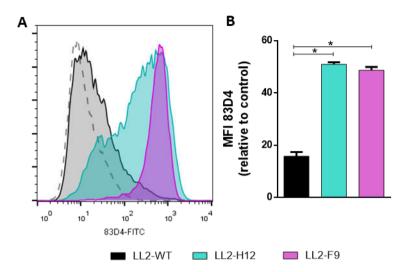


Figura 13 Citometría de flujo con el anticuerpo α-Tn 83D4. A – Histograma de intensidad de fluorescencia de las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. En punteado se observa el control sin anticuerpo. B - Mediana de la intensidad de fluorescencia de la marcación de 83D4 relativizada al control negativo (línea punteadas gris en A). Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa, siendo *p<0.05, según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la mediana (SEM).

que las células denominadas LL/2-F9 derivan de una única célula sorteada, mientras que las células LL/2-H12 derivan de un enriquecimiento de células Tn⁺ que provienen de un pocillo donde se depositaron 100 células. De hecho, esto se pone en evidencia al evaluar la expresión del antígeno Tn en ambas líneas celulares obtenidas. Como se puede observar en la gráfica de citometría de la marcación con el anticuerpo 83D4 (Figura 13 A), la expresión de Tn en las células LL/2-F9 fue uniforme, viéndose la población como un pico único con alta intensidad de fluorescencia, mientras que el perfil de distribución poblacional de las células LL/2-H12 fue más heterogéneo (Figura 13 A). Sin embargo, cabe destacar que la totalidad de la población de células LL/2-H12 fue positiva para la presencia de Tn, aunque con diferentes niveles de expresión, lo cual resulta en una reactividad del anticuerpo 83D4 similar entre ambas (Figura 13B).

Para profundizar en el análisis de la presencia de Tn, se marcaron las células LL/2-WT y LL/2-H12 con anticuerpos monoclonales específicos contra el antígeno Tn, pero cuya especificidad difiere en función a los aminoácidos O-glicosilados, como se muestra en la Figura 14 A (extraída de ¹³⁴): mientras los anticuerpos 6E11 y 9A7 reconocen preferencialmente un clúster de 3 Tn consecutivos en estructuras STT, SSS o TTT, el anticuerpo 15G9 reconoce Tn en estructuras SSS, pero no en STT o TTT¹³⁴ (Figura 14 A). El análisis del reconocimiento de las moléculas Tn⁺ de superficie se realizó por citometría de flujo, mostrando que los tres anticuerpos presentaron un

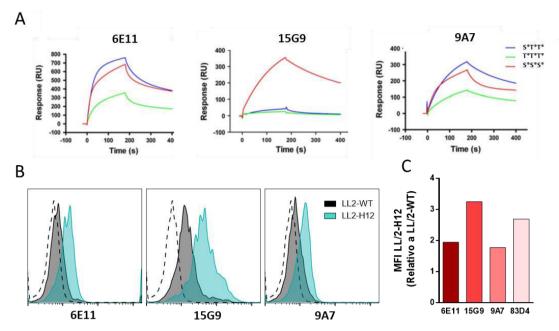


Figura 14 - Citometría de flujo con anticuerpos α -Tn. A- Figura modificada de Mazal et al 2012, donde se muestra la especificidad de unión de diferentes anticuerpos monoclonales específicos contra Tn a péptidos sintéticos formados por secuencias diferentes de treonina o serina, pero conteniendo Tn triméricos. B- Histograma de intensidad de fluorescencia de las células LL/2-WT y LL/2-H12 marcadas con los anticuerpos 6E11 (reconocimiento predominante, antígeno Tn en péptidos STT); 15G9 (antígeno Tn en péptidos SSS) y 9A7 (antígeno Tn en péptidos STT). En punteado se observa el control sin anticuerpo. C- Media de intensidad de fluorescencia de las células LL/2-H12 relativo a las células LL/2-WT del reconocimiento de los anticuerpos 6E11, 159G, 9A7 y 83D4.

mayor reconocimiento por las células LL/2-H12 que las células LL/2-WT, pero este reconocimiento fue mayor con el anticuerpo 15G9 (Figura 14 B). Al comparar la intensidad de la marcación de cada uno de estos anticuerpos en las células LL/2-H12, relativo a la intensidad en la línea parental (LL/-WT), se observó que el anticuerpo 15G9 y el 83D4 son los que presentan una unión mayor a las células LL/2-H12 en comparación con la LL/2-WT (Figura 14 C).

Con el objeto de validar que la expresión del antígeno Tn observada en las líneas LL/2 H12 y F9 correlaciona con la disminución de la actividad enzimática de la Tsintasa (C1GalT1) (Figura 15 A), se realizó un ensayo para evaluar su actividad. Este ensayo utiliza GalNAc-α-(4-metilumbeliferona) (GalNAc-α-(4-MU)) como sustrato, y UDP-Gal como donador para formar Galβ1-3GalNAc-α-(4-MU)¹³⁵, con lisados celulares como fuente de la enzima T-sintasa (Figura 15 B). Posteriormente, la enzima O-glicosidasa (NEB) corta la unión glicosídica con la aglicona fluorescente 4-MU, por lo que se puede medir la actividad de la enzima T-sintasa en función a la concentración de 4-MU en el medio 135 (Figura 15 B). Este ensayo fue realizado utilizando las células LL/2-WT, LL/2-H12 v LL/2-F9. Se observó que, efectivamente, la actividad de la

enzima T-sintasa se encuentra significativamente disminuida en un 83% en las células LL/2-H12, y en un 91% en las células LL/2-F9 (Figura 15 B).

En conclusión, se obtuvieron dos variantes celulares de las células LL/2 que expresan el antígeno Tn, una de ellas de naturaleza clonal (LL/2-F9), y otra no clonal (LL/2-H12). A su vez, presentaron un 17% y 9% de la actividad de la enzima T-sintasa con respecto a las células LL/2-WT, lo que sugiere que la síntesis de core 1 O-glicanos se encuentra bloqueada, y que la estrategia utilizada fue exitosa. En este punto es importante destacar que tanto las células LL/2-H12 como el clon LL/2-F9 fueron obtenidos en momentos diferentes. Esto, junto con las características de los tumores que estas células inducen (resultados que se detallarán más adelante), nos condujo a realizar algunos experimentos de forma exclusiva con las LL/2-H12. En consecuencia, algunos de los resultados que mostraremos en las próximas secciones no se obtuvieron para el clon LL/2-F9.

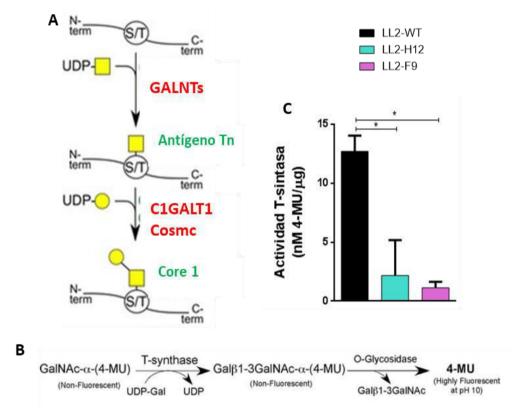


Figura 15 - Actividad de la enzima T-sintasa (C1GALT1). A - Esquema representativo de los primeros pasos en el proceso de O-glicosilación, comenzando por la síntesis del antígeno Tn por las GALNTs, y la elongación hacia core 1, mediado por la enzima C1GALT1 cuya actividad es dependiente de la chaperona Cosmc. B- Esquema representativo del ensayo de actividad de la enzima T-sintasa. El extracto celular (conteniendo la enzima T-sintasa) se incuba con el sustrato GalNAc-α-4-(MU) junto con el donador UDP-Gal, para catabolizar la formación de Galβ1-3GalNAc α-4-(MU). La O-glicosidasa agregada al ensayo libera el fluoróforo 4-MU, cuya fluorescencia es directamente proporcional a la actividad de la enzima Tsintasa de la muestra. C- Actividad de la enzima T-sintasa en las diferentes variantes celulares. Para calcularla, se utilizó una curva de calibración con 4-MU, y la actividad se expresó como nM de 4-MU por μg de proteína total. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa, siendo *p<0.05 según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la mediana (SEM).

Objetivo 2 - Caracterización glicofenotípica de las líneas celulares generadas y análisis estructural de sus N- y O-glicanos por metodologías cromatográficas

Caracterización glicofenotípica de las líneas celulares generadas

Debido a la natural complejidad del proceso biosintético de glicoconjugados, y a la relevancia que poseen para la funcionalidad y desarrollo celular, se ha descripto el fenómeno de complementación, en el que la desregulación de una enzima particular de estas rutas puede provocar alteraciones en vías laterales, las que modulan el glicoma de la célula según las necesidades de la misma¹⁵⁴. En este sentido, y como primera aproximación, evaluamos por PCR cuantitativa la expresión génica de

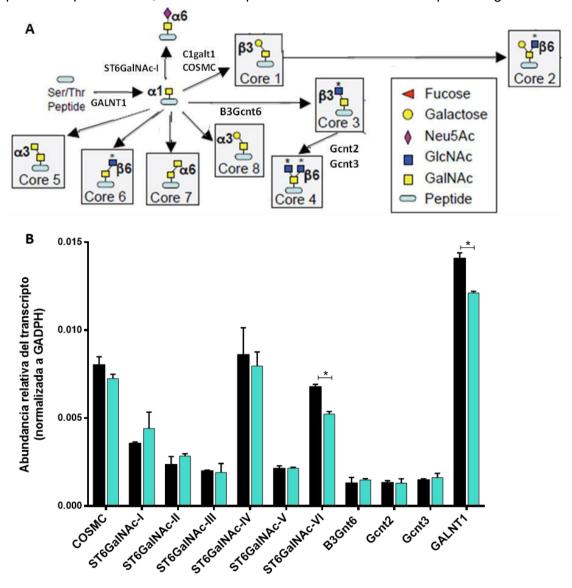


Figura 16 - Expresión de glicosiltransferasas y chaperona Cosmc asociadas al proceso de O-glicosilación. A – Esquema representativo de los primeros pasos en el proceso de O-glicosilación, con las principales enzimas que participan en dicho proceso. B – Expresión relativa de dichas enzimas en las células LL/2-WT y LL/2-H12. Los niveles de ARNm se relativizaron al gen de expresión constitutiva GAPDH. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa, siendo *p<0.05 según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la mediana (SEM).

diferentes glicosiltranferasas y chaperona vinculadas con el proceso de O-glicosilación (Figura 16 A) en las células LL/2-WT y LL/2-H12, las que podrían alterarse en su expresión por la mutación de *Cosmc*. En este ensayo no se abordó el análisis de la línea LL/2-F9 ya que en dicho momento no estaba disponible. En particular, se observó una disminución en las células LL/2-H12 de la expresión génica de la enzima sialiltransferasa ST6GalNAc-VI y de la polipeptidil-N-Acetilgalactosaminiltransferasa 1 (Galnt1), un miembro de la familia de las ppGalNAc transferasas responsables de la formación de Tn (Figura 16 B). Con respecto a las restantes enzimas estudiadas, como ST6GalNAc-I, II, III, IV, V, *core* 3 sintasa (B3Gnt6), *core* 4 sintasa (Gcnt2 y Gcnt3) y la chaperona Cosmc, no se encontraron diferencias significativas en su expresión génica entre las células estudiadas (Figura 16 B).

En segundo lugar, evaluamos la presencia de estructuras de glicanos en la superficie celular. Se realizaron marcaciones con lectinas vegetales biotiniladas, que reconocen glicoepitopes específicos (Tabla 2) presentes en O- y N-glicanos, ejemplificados en la Figura 17. Al comparar las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9,

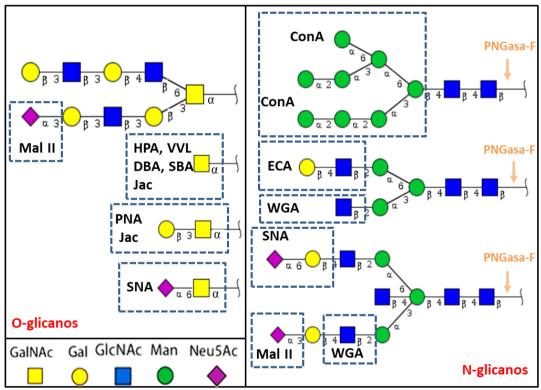


Figura 17 - Esquema representativa de las principales estructuras glicosídicas de O- y N-glicanos reconocidas por las lectinas vegetales utilizadas en el trabajo. Se utilizó la nomenclatura propuesta por Varki et al. (2015) para la representación de los glicanos (leyenda en el extremo inferior). Las abreviaciones son las siguientes: HPA: Aglutinina de *Helix pomatia*, VVL: Isolectina B4 de *Vicia villosa*, PNA: Aglutinina de *Arachis hypogaea*, ECA: Aglutinina de *Erythrina cristagali*, SNA: Aglutinina de *Sacumbus Nigra*, Mal II: Lectina de *Maackia amurensis* II, WGA: Aglutinina de *Ariticum vulgaris*, ConA: Lectina de *Canavalia ensiformis*, SBA: Aglutinina de *Glycine max*, DBA: Aglutinina de *Dolichos biflorus*, Jac: Jacalina. En el caso de la unión por PNA y Jac a core 1, la unión de Jac se da independiente de la sialilación del mismo, mientras que PNA se une solo a la variante desialilada. En naranja se muestra el sitio de corte de la enzima PNGasa-F.

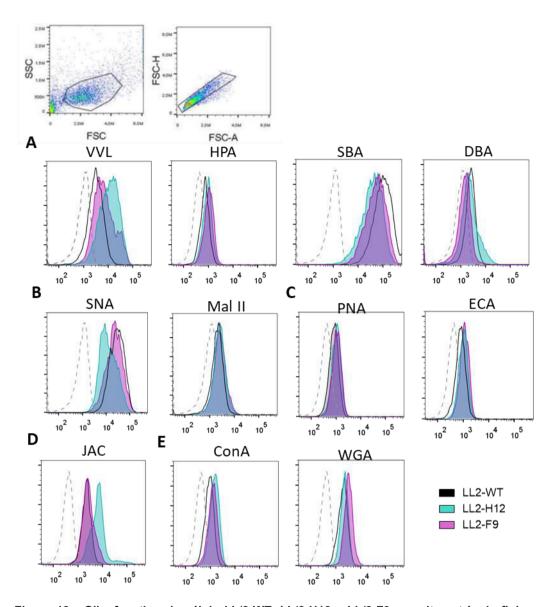


Figura 18 - Glicofenotipo de célula LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 por citometría de flujo con lectinas vegetales. Se incubaron las células con diferentes lectinas biotiniladas, previamente incubadas con estreptavidina conjugada a un fluoróforo, y se analizaron por citometria de flujo. En la figura se observa la estrategia de gating, así como los histogramas de la intensidad de fluorescencia para cada una de las lectinas estudiadas. Se utilizaron lectinas de reconocimiento de A- GalNAc, B-Residuos sialilados, **C**- Galactosa terminal, **D**- O-glicanos, **E**- N-glicanos.

se observó una reactividad diferencial de las variantes celulares LL/2-H12 y LL/2-F9 en comparación con la de las LL/2-WT, lo que sugiere que su glicoma se encuentra alterado (Figura 18 y 19). Focalizando en la expresión de Tn y complementando los estudios con anticuerpos específicos, para la detección de residuos GalNAc terminales se usaron cuatro lectinas biotiniladas de diferente especificidad (Tabla 2). Tanto HPA como VVL reconocen estructuras con α- y β-GalNAc terminal, aunque en el caso de VVL, tiene una afinidad mayor por α-GalNAc que por β-GalNAc. En cuanto a SBA, puede reconocer GalNAc en enlaces tanto α como β, y también puede unir Gal terminales. Por último, DBA únicamente reconoce α-GalNAc.

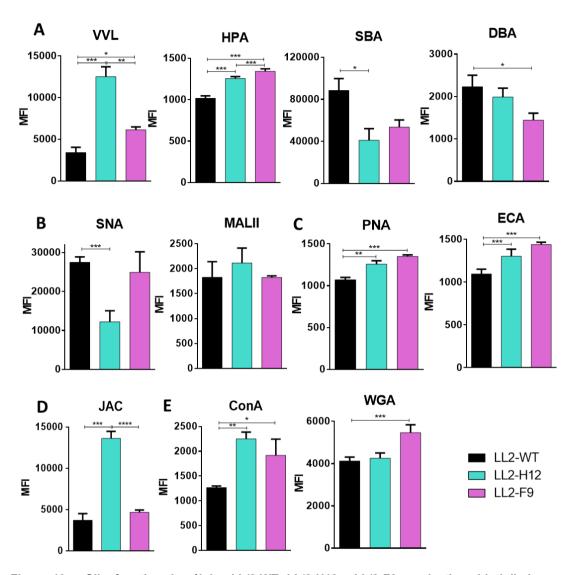


Figura 19 - Glicofenotipo de células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 con lectinas biotiniladas por citometría de flujo. Se incubaron las células con diferentes lectinas biotiniladas, previamente incubadas con estreptavidina conjugada a un fluoróforo, Y se analizaron por citometría de flujo. Se graficó la mediana de la intensidad de fluorescencia para cada una de las lectinas estudiadas. Se utilizaron lectinas de reconocimiento de A- GalNAc, B- Residuos sialilados, C- Galactosa terminal, D- O-glicanos, E- N-glicanos. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, **** p<0.001 según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la mediana (SEM).

Particularmente, se observó un aumento en residuos GalNAc terminales (incluyendo al antígeno Tn), basado en la reactividad de las lectinas VVL y HPA (Figura 18 y 19). Sin embargo, la diferencia en el reconocimiento por la lectina VVL con las células LL/2-WT fue considerablemente mayor para las células LL/2-H12 que para las células LL/2-F9 (Figura 18 y 19). En este punto es importante destacar que para la lectina SBA, se observó una disminución en el reconocimiento de las células LL/2-H12 en comparación con las LL/2-WT y las LL/2-F9 (Figura 18 y 19). Finalmente, con la lectina DBA no se observaron diferencias significativas en su reconocimiento a las

células LL/2-H12, pero sí una disminución en las células LL/2-F9 en comparación con las LL/2-WT (Figura 18 y 19).

A su vez, se observó un aumento en la reactividad con Jacalina (JAC) en las células LL/2-H12, pero no en las LL/2-F9 (Figura 18 y 19). Esta lectina tiene afinidad por Oglicanos en general, incluyendo *core* 1, Tn y *core* 3, pero no es capaz de unir sTn, *core* 2 o *core* 6 (Figura 17 y Tabla 2).

Más allá de los residuos GalNAc terminales, y focalizando en la sialilación de glicanos, no se vieron diferencias significativas en sialilación 2,3 mediante la lectina MAL II (Figura 18 y 19) entre ninguna de las líneas celulares. Sin embargo, se observó una disminución en siálico α 2-6 en las células LL/2-H12 (SNA, Figura 17) con respecto a la línea parental, sin diferencias significativas entre las células LL/2-F9 y LL/2-WT (Figura 18 y 19).

Por otro lado, tanto en las células LL/2-H12 como LL/2-F9, se observó un aumento en la abundancia de β -D-galactosil-(1,3)-*N*-acetil-D-galactosamina (Gal- β -(1-3)GalNAc), también conocido como *core* 1 y β - (1,3)/ β -(1,4)N-acetil lactosamina (LacNAc) mediante la lectina PNA (Figura 18 y 19 y Tabla 2). Este resultado fue comparable con el obtenido específicamente para el disacárido β -(1,4)LacNAc, reconocido de manera específica por la lectina ECA (Figura 17 y Tabla 2), donde ambas LL/2-H12 y LL/2-F9 presentan un aumento en su reconocimiento en comparación con las LL/2-WT (Figura 18 y 19).

Finalmente, se evaluó la presencia de N-glicanos de alta manosa mediante la lectina ConA (Figura 17 y Tabla 2), detectándose un mayor reconocimiento por las células Tn⁺ LL/2-H12 y LL/2-F9 (Figura 18 y 19). Por otro lado, no se observaron diferencias para el reconocimiento por la lectina WGA, que reconoce residuos de GlcNAc en N-glicanos complejos (Figura 17 y Tabla 2), en las células LL/2-H12 comparadas con las LL/2-WT, pero si un aumento en la unión a las células LL/2-F9 (Figura 18 y 19).

A modo de resumen, las células LL/2-H12, en la primera selección no clonal, presentaron un aumento en los residuos de GalNAc presentes en *core* O-glicanos (HPA y VVL), confirmando el aumento de antígeno Tn por eliminación de Cosmc. Sin embargo, este cambio en la O-glicosilación también afectaría el proceso de $\alpha(2,6)$ sialilación (disminuyéndolo), y la biosíntesis de N-glicanos, con un aumento de aquellos de alta manosa (ConA) acompañado de un aumento de Lactosaminas

terminales en N-glicanos complejos, evidenciado por el aumento de ECA y de manera inespecífica, por PNA. Por otro lado, la selección clonal de las LL/2-F9 mantiene todos los cambios descriptos en el glicofenotipo de las células H12, pero evidencia adicionalmente un aumento de N-glicanos por WGA sin modificar la sialilación en ninguna de sus formas.

El aumento en el reconocimiento por PNA, y considerando que su especificidad primera es por estructuras tipo core 1, nos llevó a realizar estudios adicionales para verificar que lo que incrementaba el reconocimiento de esta lectina era la interacción inespecífica con a β(1,4)LacNAc, como evidenciaba ECA, y descartar una posible presencia de core 1 O-glicanos. Para ello, y considerando que los N-glicanos podrían ser responsables de este cambio, se utilizó una estrategia de de-N-glicosilación para las células H12 mediante tratamiento con PNGasa F (Figura 17), procediendo luego a glicofenotipificar las células. Para verificar que la de N-glicosilación fue exitosa, y

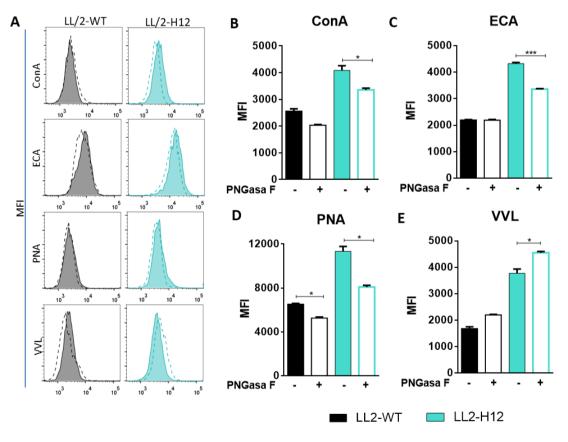


Figura 20 - Reactividad de lectinas con células LL/2-H12 y LL/2-WT luego de la de-N-glicosilación por PNGAsa-F. Las células fueron previamente tratadas con PNGasa-F ON a 37°C en agitación. Posteriormente las células se lavaron y se incubaron con diferentes lectinas biotiniladas, previamente incubadas con estreptavidina conjugada a un fluoróforo, y se analizaron por citometria de flujo. Se graficó la mediana de la intensidad de fluorescencia para cada una de las lectinas estudiadas. A- Histogramas para cada una de las lectinas estudiadas. En línea punteada se observa el control sin PNGasa para cada una de las líneas, mientras que el histograma relleno corresponde a las células de-N-glicosiladas. B-ConA, C- ECA, D- PNA, E- VVL. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la mediana (SEM).

teniendo en cuenta que esta enzima corta tanto N-glicanos de alta manosa como complejos, utilizamos la lectina ConA (alta manosa) y ECA (LacNAc terminales en N-glicanos complejos), con las que se observó una disminución significativa en las células LL/2-H12, (Figura 20). En efecto, la unión de la lectina PNA disminuyó significativamente al de N-glicosilar las células LL/2-H12 (Figura 20), pero no se modificó al eliminar los N-glicanos en las células LL/2-WT, indicando que el incremento en PNA en las células LL/2-H12 está relacionado al reconocimiento inespecífico de los residuos LacNac de los N-glicanos.

Notablemente, y como fue observado en otros tipos celulares¹⁵⁵, la eliminación de N-glicanos con PNGAsa en las células LL/2-H12 aumenta la exposición de los residuos GalNAc presentes en estas células, reflejado por un aumento de intensidad de señal con la lectina VVL (Figura 20).

Para complementar el glicofenotipo celular por citometría de flujo, se realizaron *lectin blots* con extractos proteicos totales como una primera aproximación para identificar aquellas glicoproteínas portadoras de antígeno Tn, utilizando lectinas VVL, HPA, y SBA). Como se observa en la Figura 21, algunas bandas de los lisados proteicos de LL/2-H12 y LL/2-F9 fueron predominantemente reconocidas por VVL en

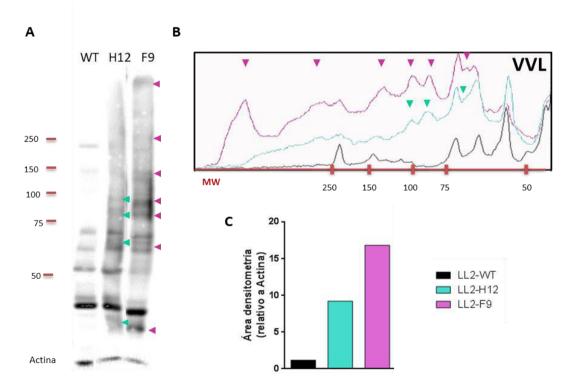


Figura 21 - Lectin blot de proteínas totales celulares con VVL. Se corrieron 10 μg de proteína en geles de acrilamida/bis-acrilamida 8 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con la lectina VVL biotinilada. **A**- Fotografía del blot de VVL. En rojo se observa el marcador de peso molecular, y en la parte inferior el western blot de control de carga de actina. **B**- Gráficos de densitometría de los carriles. **C**- Área debajo del gráfico de densitometría normalizado a la densitometría de actina.

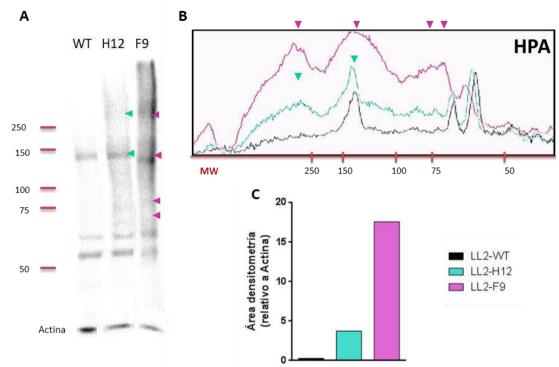


Figura 22 - Lectin blot de proteínas totales celulares con HPA. Se corrieron 10 µg de proteína en geles de acrilamida/bis-acrilamida 8 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con la lectina HPA biotinilada. A- Fotografía del blot de HPA. En rojo se observa el marcador de peso molecular, y en la parte inferior el western blot de control de carga de actina. B- Gráficos de densitometría de los carriles. C- Área debajo del gráfico de densitometría normalizado a la densitometría de actina.

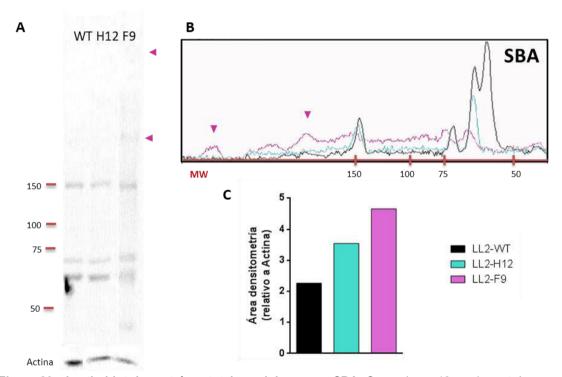


Figura 23 - Lectin blot de proteínas totales celulares con SBA. Se corrieron 10 µg de proteína en geles de acrilamida/bis-acrilamida 8 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con la lectina SBA biotinilada. A- Fotografía del blot de SPA. En rojo se observa el marcador de peso molecular, y en la parte inferior el western blot de control de carga de actina. B- Gráficos de densitometría de los carriles. C- Área debajo del gráfico de densitometría normalizado a la densitometría de actina.

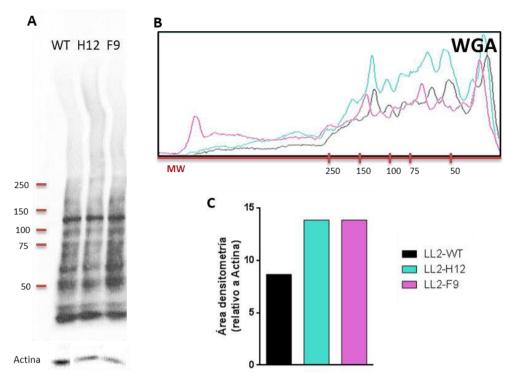


Figura 24 - Lectin blot de proteínas totales celulares con WGA. Se corrieron 10 µg de proteína en geles de acrilamida/bis-acrilamida 8 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con la lectina WGA biotinilada. A- Fotografía del blot de WGA. En rojo se observa el marcador de peso molecular, y en la parte inferior el western blot de control de carga de actina. B- Gráficos de densitometría de los carriles. C- Área debajo del gráfico de densitometría normalizado a la densitometría de actina.

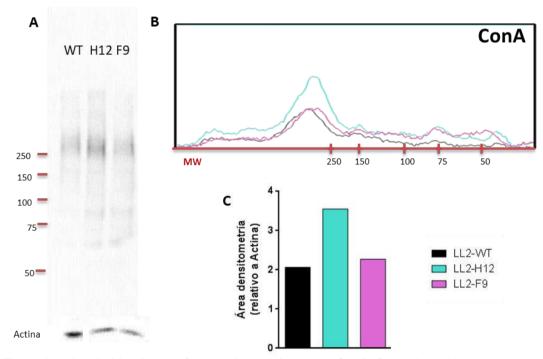


Figura 25 -. Lectin blot de proteínas totales celulares con ConA. Se corrieron 10 µg de proteína en geles de acrilamida/bis-acrilamida 8 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con la lectina ConA biotinilada. A- Fotografía del blot de ConA. En rojo se observa el marcador de peso molecular, y en la parte inferior el western blot de control de carga de actina. B- Gráficos de densitometría de los carriles. C- Área debajo del gráfico de densitometría normalizado a la densitometría de actina.

comparación con las proteínas LL/2-WT particularmente entre 75 y 100 kDa, alrededor de 150 kDa y mayores a 250 kDa, este último en las células LL/2-F9 (Figura 21 A y B). Para tener una aproximación cuantitativa de la reactividad de las lectinas, analizamos las membranas por densitometría, confirmando la mayor reactividad de la lectina VVL por las células LL/2-H12 y LL/2-F9 (Figura 21 C). Utilizando la lectina HPA, algunas bandas de los lisados proteicos de LL/2-H12 y LL/2-F9 fueron reconocidas por la misma en comparación con las proteínas LL/2-WT, como los de peso molecular relativo de alrededor 75 y, 150 kDa para la línea LL/2-F9 (Figura 22) verificando la presencia de Tn en las mismas. A su vez, se pudo observar, tanto en el carril de LL/2-H12 como de LL/2-F9 (aunque con mayor intensidad en este último) bandas superiores a 250 kDa reconocidas por HPA, que no se observaron en las células LL/2-WT (Figura 22). En cuanto a la reactividad de las lectinas SBA y WGA sobre los componentes glicoproteicos de las células estudiadas, no se observaron grandes diferencias (Figura 23 y 24), a exceptuar por el reconocimiento de SBA por LL/2-F9 donde se detectó levemente una reactividad por componentes mayores a 150 kDa (Figura 23 A y B). Sin embargo, al realizar la curva de densitometría, se detectó un leve aumento de la reactividad en las líneas Tn+ (Figura 23 y 24) Por último, y apuntando al aumento de N-glicanos de alta manosa observado, se verificó un leve aumento en el reconocimiento de las proteínas de las células LL/2-H12 con ConA, particularmente en la zona superior a 250 kDa, aunque no hubo componentes glicosilados reconocidos de forma diferencial entre las líneas Tn⁺ y la LL/2-WT Tn⁻ (Figura 25).

Análisis estructural de N- v O-alicanos presentes en las líneas celulares generadas

Dadas las diferencias encontradas en el glicofenotipo, que indicaban que la eliminación de *Cosmc* podría estar alterando el N-glicoma además del O-glicoma, se realizaron estudios analíticos para comparar las dos variantes celulares generadas con las parentales. La estrategia experimental para dichos análisis se detalla en la Figura 26. Se partió de lisados proteicos totales, o preparados enriquecidos en (glico)proteínas membranarias (Figura 26 A). Para analizar los O-glicanos, se realizaron dos estrategias de liberación: a) enzimática, con la enzima comercial O-glicanasa (que libera residuos de *core* 1 y *core* 3 no sialilados, (Figura 26 C) y b) química, mediante β-eliminación (Figura 26 D). En el caso de los N-glicanos, los mismos fueron liberados con la enzima PNGasa F (Figura 26 E). Los N- y O-glicanos liberados se marcaron con el fluoróforo 2-aminobenzamida (2-AB) (Figura 26 F) y las muestras se analizaron en un sistema cromatográfico líquido de ultra eficacia (UPLC).

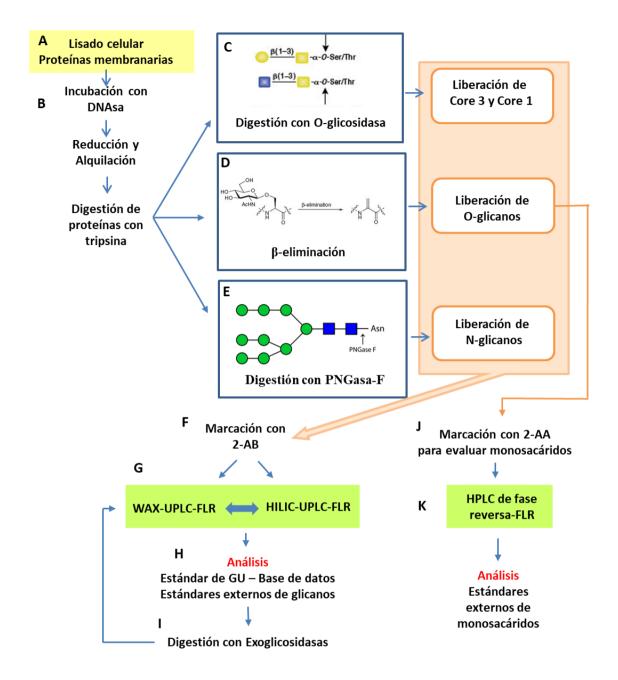


Figura 26 - Esquema de flujo de trabajo para el estudio analítico de glicanos en las variantes celulares generadas. Se partió de lisados totales o proteínas membranarias purificadas (A). Las mismas fueron tratadas con DNAsa, reducidas y alquiladas, para posteriormente digerir las proteínas con tripsina (B). Los glicanos fueron digeridos con sialidasa y O-glicosidasa, para liberar glicanos Core 3 y Core 1 (C), expuestos un medio alcalino fuerte para su β-eliminación, para liberar O-glicanos totales (**D**), o digeridos con PNGasa-F, para liberar N-glicanos totales (E). En cualquiera de los casos, los glicanos fueron marcados con 2-AB (F) y analizados por HILIC-UPLC-FLR y/o WAX-UPLC-FLR (G). Para la identificación y análisis de los glicanos eluidos (H), se recurrió al uso de un estándar de unidades de glucosa (GU), para identificar los glicanos en bases de datos (www.glycostore.org) y al uso de estándares externos de glicanos conocidos, como Nglicanos liberados de RNAsa B como estándar externo de alta manosa, Lactosa o GalNAc para O-glicanos y monosacáridos respectivamente. Finalmente, para confirmar los picos se utilizaron exoglicosidasas específicas y se volvió a analizar los cromatogramas de las muestras digeridas (I). Para analizar los monosacáridos, los O-glicanos liberados por β-eliminación se marcaron con 2-AA (J) y se evaluaron por HPLC de fase reversa-FLR (K), utilizando estándares externos de monosacáridos para su identificación.

utilizando columnas que separan los glicanos según su carga (WAX) o columna que los separa según interacciones hidrofílicas, incluyendo no sólo su carga sino también su forma y tamaño (HILIC)¹⁵² (Figura 26 G). La identificación de los glicanos se realizó por relativización a un estándar externo (dextran parcialmente hidrolizado), generando unidades de glucosa (GU), lo que permite independizarse de las variabilidades propias de la cromatografía y posteriormente, comparar estos valores de GU con aquellas estructuras depositadas en bases de datos (Glycostore, www.glycostore.org)^{156,157} (Figura 26 H). Cuando fue posible, las estructuras fueron confirmadas por digestión con exoglicosidasas específicas, y los perfiles de digestión también verificados según base de datos (Figura 26 H). Finalmente, y para analizar en particular GalNAc, se utilizó un sistema de identificación cromatográfico de monosacáridos por marcación con 2-ácido aminobenzoico (Figura 26 J) y se analizó comparando con un estándar externo de GalNAc (Figura 26 K).

En una primera instancia, se abordó este estudio centrándonos en los O-glicanos de las células LL/2-WT y LL/2-H12. Si bien la metodologías estructural ideal para la determinación de este tipo de modificación es la espectrometría de masa¹⁵², la imposibilidad de enviar las muestras a la Universidad de Davis (California) por las medidas de aislamiento social, preventivo y obligatorio nos llevó a utilizar dos aproximaciones metodológicas alternativas y diferentes. La primera, centrada en cuantificar *core* 1, y considerando que la regulación del gradiente de elución en HILIC permite ver O-glicanos^{148,151}, se aplicó esta técnica con un gradiente más suave que el utilizado para N-glicanos y se utilizaron estándares externos, como *core* 1 O-glicanos

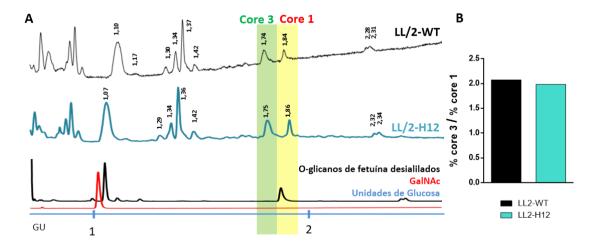


Figura 27 - Análisis por HILIC-UPLC-FLR de glicanos liberados con O-glicosidasa. A-Perfil cromatográfico de LL/2-WT y LL/2-H12. Se utilizaron O-glicanos de Fetuina desialilada como estándar de Core 1 y Dextrano como estándar de la corrida para delimitar los GU (Unidades de Glucosa). En amarillo se señaló el pico correspondiente a Core 1 y en verde Core 3. **B-** Proporción de abundancia de core 3 sobre la abundancia de core 1, calculadas como el área debajo del cromatograma.

obtenidos de Fetuina Bovina por tratamiento con O-glicanasa y neuraminidasas. La segunda, centrada en cuantificar Tn, es necesaria considerando que en HILIC el bajo tiempo de retención del monosacárido GalNAc lo hace difícil de identificar por su coelución con el excedente de 2-AB. La identificación de Tn se abordó mediante una cromatografía específica para monosacáridos, por marcación con 2-aminobenzoico (2AA).

Los perfiles de O-glicanos obtenidos por liberación con O-glicanasa no mostraron diferencias entre las células LL/2-WT y LL/2-H12 (Figura 27). Sin embargo, se pudo observar que los niveles de core 1 en la línea parental son bajos, encontrándose una predominancia de core 3 en dicha línea (Figura 27). En tanto, las LL/2-H12 no presentan un aumento significativo de estas estructuras (Figura 27). Las células LL/2-F9 no fueron incluidas en este ensayo. Lamentablemente, los O-glicanos liberados por reacción de β-eliminación fueron muy pocos, probablemente por efecto de la reacción de descomposición de los mismos en medio básico¹⁵² (Figura 28).

En cuanto a la determinación de la presencia de GalNAc en la metodología de análisis para monosacáridos, la misma no fue concluyente, dado que en las muestras se encontró una alta concentración de Glc y las áreas correspondientes al pico de GalNAc eran minoritarias (Figura 30).

Por último, se caracterizó el N-glicoma de las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 por tratamiento de los lisados celulares con PNGasa F. Mediante este análisis, se

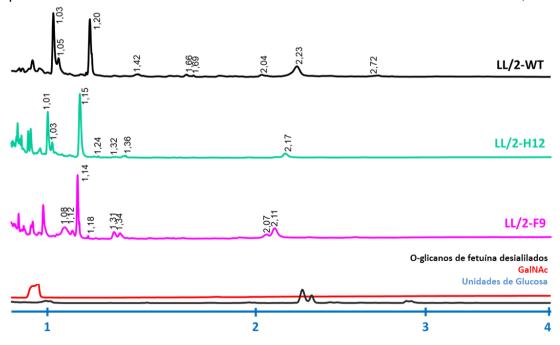


Figura 28 - Análisis por HILIC-UPLC de glicanos liberados por β-eliminación. Perfil cromatográfico de LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/-F9. Se utilizó Fetuina y GalNAc como estándares externos y Dextran como estándar de la corrida para delimitar los GU (Unidades de Glucosa).

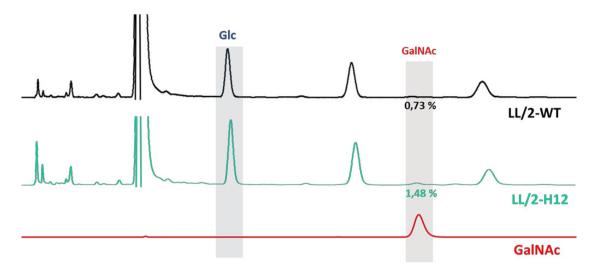


Figura 30 - Análisis por HPLC de fase reversa de monosacáridos liberados por β-eliminación. Perfil cromatográfico de LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/-F9. Se utilizó GalNAc como estándar externo. Se muestra el porcentaje de abundancia relativa de GalNAc debajo del cromatograma correspondiente.

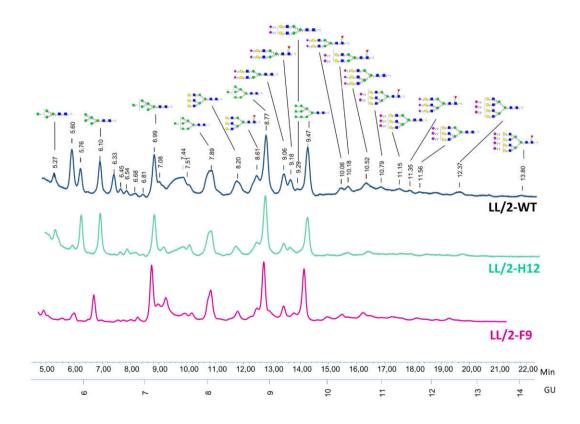


Figura 29 - Identificación por HILIC-UPLC de N-glicanos de proteínas membranarias liberados con PNGasa F. Perfil cromatográfico de LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/-F9 por HILIC-UPLC-FLR. Se utilizó Dextran como estándar de la corrida para delimitar los GU (Unidades de Glucosa). Las estructuras fueron identificadas mediante comparación de GU con bases de datos y digestión con exoglicosidas específicas.

confirmó que, efectivamente, las células LL/2-H12 presentan un N-glicoma diferente al de las células LL/2-WT, encontrando un aumento en glicanos de alta manosa que correlaciona con los cambios observados en el glicofenotipo (reactividad con ConA), así como una disminución en la proporción de N-glicanos sialilados, lo que podría relacionarse tanto con la disminución en SNA como con los aumentos en el pegado de ECA y PNA (Figura 29Figura 31 y 31). En cuanto a las células LL/2-F9, no se observaron diferencias significativas en la proporción de alta manosa o residuos sialilados en comparación con la línea parental LL/2-WT (Figura 29 y 31), validando nuevamente los resultados del glicofenotipo.

En conclusión, el análisis estructural permitió confirmar las diferencias en Nglicanos evidenciadas por el glicofenotipo, poniendo de manifiesto la relevancia de los posibles mecanismos compensatorios.

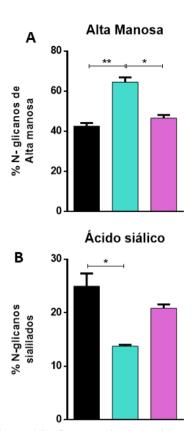


Figura 31 - Porcentaje de residuos de Nglicanos de Alta manosa (A) y de residuos sialilados (B). Los porcentajes fueron calculados por el porcentaje del área debajo de los cromatogramas analizados por HILIC-UPC-FLR de los N-glicanos de membrana liberados con PNGasa-F y tratados con neuraminidasa. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01 según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la mediana (SEM).

Objetivo 3 - Análisis de la replicación e invasión celular *in vitro* de crecimiento celular de la línea tumoral Tn⁺

Para determinar si las alteraciones generadas en las células LL/2 obtenidas resultan en cambios en el crecimiento celular o en las capacidades migratorias de las células, se realizaron ensayos para medir la replicación y la invasión celular *in vitro*.

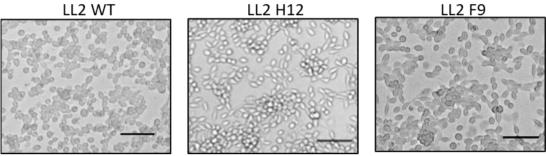


Figura 32 - Morfología de las variantes celulares generadas. Imágenes tomadas de microscopia a campo claro para visualizar la morfología celular de las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. La barra negra representa 50 nm.

En primera instancia, se analizó la morfología de las células, no encontrando grandes diferencias entre las mismas, aunque parecería que las células LL/2-H12 presentaron una forma un poco más alargada que la parental y la LL/2-F9 (Figura 32).

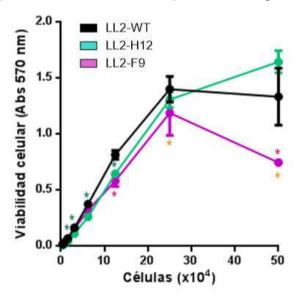
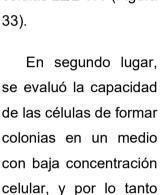


Figura 33 - Ensayo de proliferación celular con MTT. Se plaquearon concentraciones seriadas de células LL/2 y se las dejó incubando ON en la estufa de cultivo. Se agregó MTT y se las incubó por 4 horas a 37°C. En la gráfica se observa la absorbancia del producto reducido del MTT a 570 nm en función al número de células plaqueadas inicialmente. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05. Los asteriscos verdes representan diferencia entre LL/2-WT y LL/2-H12, violetas entre LL/2-WT y LL/2-F9 y naranjas entre LL/2-H12 y LL/2-F9 según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la mediana (SEM).

Posteriormente, se realizaron ensayos de proliferación a través de la medición de la viabilidad celular utilizando el ensayo por metabolismo de MTT. Se cultivaron diferentes dosis de células por 48 horas y posteriormente se evaluó la viabilidad celular. Como se ve en la Figura 33, tanto las células LL/2-F9 como las células LL/2-H12 presentaron una leve disminución en su tasa de crecimiento celular en comparación con las células LL/2-WT. Sin embargo, comportamiento de las células LL/2-H12 fue diferente al de las LL/2-F9, ya que las células LL/2-H12 presentaron diferencias significativas con las LL/2-WT a

bajas concentraciones celulares, mientras que las LL/2-F9 presentaron menor proliferación o tasa de crecimiento celular a altas concentraciones celulares en comparación con las células LL/2-WT (Figura 33).



baia concentración de

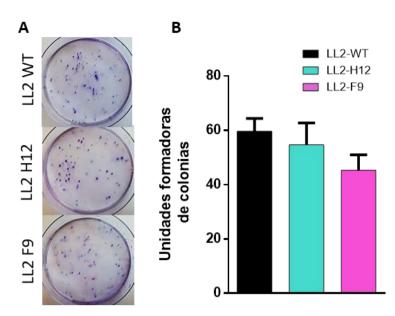


Figura 34 - Ensayo de formación de colonias. Se plaquearon 500 células LL/2 en placas de 100 mm y se incubaron a 37°C en la estufa de cultivo durante 10 días en medio completo. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y las células se tiñeron con una solución de cristal violeta por 20 minutos a temperatura ambiente. Las unidades formadoras de colonias se contaron manualmente. A- Imágenes representativas de las placas teñidas con cristal violeta. B- Número de unidades formadoras de colonias en las diferentes variantes celulares. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la mediana (SEM).

factores secretados. Este tipo de experimentos se puede asociar a la capacidad metastásica de las células tumorales¹⁵⁸. 500 células fueron incubadas durante 10 días y posteriormente se detectaron los islotes celulares por tinción con Violeta de cristal.

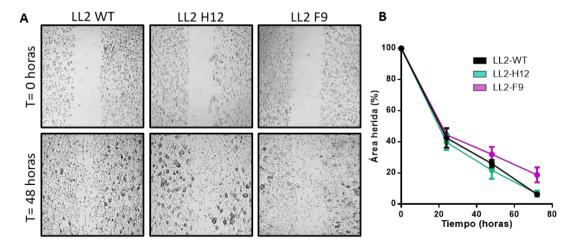


Figura 35 - Ensayo de curación de herida (wound healing). Se plaquearon 1x10⁶ células por pocillo en placas de 6 pocillos, y se las incubó hasta que alcanzaron confluencia. Posteriormente, se realizó una herida en la monocapa con una punta de micropipeta de 200 μl y se cultivaron en medio de cultivo con 2% de FBS. Se sacaron fotos a 0, 24, 48 y 72 horas en un microscopio de epifluorescencia y se determinó la superficie libre de células utilizando el software Image J. **A**- Imágenes representativas d tomadas a las 0 y 48 horas. **B**- Porcentaje del área de la herida de la monocapa a 0, 24, 48 y 72. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la mediana (SEM).

Como se observa en la Figura 34, no se encontraron diferencias significativas entre las líneas celulares obtenidas y la parental (WT).

Por otro lado, se pasó a evaluar las capacidades migratorias de las células tumorales. Para esto, en primera instancia, se realizó un ensayo de curación de herida (wound healing), en el cual se le realiza una herida a la monocapa celular con una punta de pipeta, y se analiza cada 24 horas el porcentaje del área cerrada en comparación con la hora 0. Como se aprecia en la Figura 35, no se encontraron diferencias significativas en la capacidad migratoria de las células Tn⁺ obtenidas en relación con la parental al realizar este ensayo.

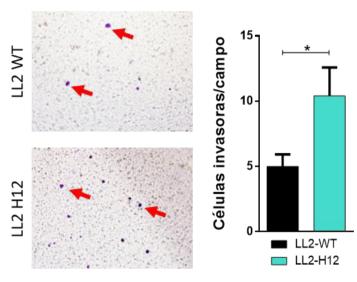


Figura 36 - Ensayo de Invasión celular. Se utilizaron insertos (transwells) de cultivo celular con poros de 8 micras en placas de 24 pocillos cubiertos con 100 µl de 1 mg/ml de colágeno. Se agregaron 500 µl de medio de cultivo completo a la parte inferior del pocillo. Las células LL/2 se plaquearon en la parte superior del inserto a una concentración de 1x105 células por pocillo, en medio libre se FBS, generando de esta forma un gradiente de la concentración del mismo, y se incubaron a 37°C por 48 h. Posteriormente, las células en el lado inferior del inserto se tiñeron con cristal violeta por 20 minutos a temperatura ambiente. A - Imágenes representativas tomadas por microscopia de campo claro a las células invasoras. Las flechas rojas indican ejemplos de las células que se contabilizaron. B - Número de células invasoras por campo analizado en las células LL/2-WT y LL/2-H12. Los asteriscos representan diferencia significativa, siendo *p<0,05 según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la mediana (SEM).

Por último, se evaluó la capacidad invasiva de las células in vitro, utilizando transwells (o insertos) con una membrana con poros de 8 µm, recubiertos con una capa de colágeno. Las células se sembraron sobre esta capa de colágeno y se enfrentaron a un gradiente en la concentración de FBS. Posteriormente, se contaron el número de células que atravesaron la capa de colágeno, marcadas en la 36 **Figura** de forma representativa con flechas rojas. Debido a la baja disponibilidad de transwells, este ensayo en se evaluaron únicamente las

células LL/2-WT y LL/2-H12. Se encontró una mayor capacidad invasiva para las células LL/2-H12 en relación con las células parentales LL/2-WT (Figura 36).

En conclusión, las variantes celulares Tn⁺ generadas presentaron únicamente diferencias con las células parentales en la tasa de proliferación celular (menor a la LL/2-WT) y en la invasión celular (mayor a la LL/2-WT).

Objetivo 4 - Evaluación del crecimiento tumoral de las líneas Tn⁺ y Tn⁻ en un modelo tumoral pre-clínico

Posteriormente, pasamos a realizar una caracterización de las líneas celulares Tn+ obtenidas in vivo, con énfasis en el estudio de su capacidad de generar tumores de implantación subcutánea y la caracterización inmunológica del microambiente tumoral. Para evaluar el crecimiento tumoral y la respuesta inmunológica, se inocularon 200.000 células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 en el flanco izquierdo de ratones singénicos. El crecimiento tumoral se evaluó midiendo los tumores cada 2 o 3 días durante el ensayo y calculando el volumen de los mismos con la fórmula $v = \frac{3}{4} * \pi *$ $(r_a * r_b^2)$, siendo r_a el radio mayor y r_b el radio menor. Como se observa en la Figura 37. las células LL/2-H12 generaron tumores de mayor tamaño que los generados por la línea parental, durante el período de tiempo analizado, observándose diferencias significativas a partir del día 21 post-inoculación de las células tumorales. Las células LL/2-F9 también presentaron un mayor crecimiento tumoral que las LL/2-WT,

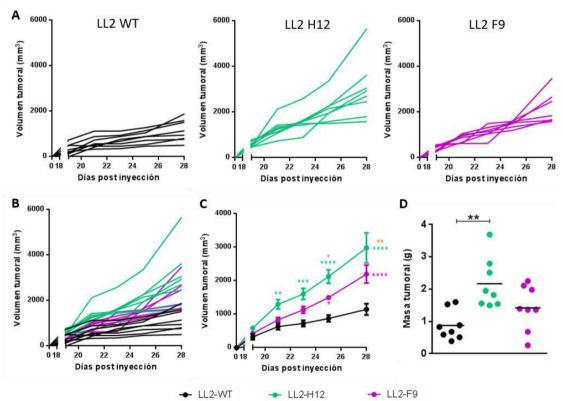


Figura 37 - Crecimiento tumoral en ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. El tamaño tumoral se registró midiendo el diámetro mayor y menor de los tumores cada 2-3 días. El volumen tumoral se calculó como V=(4/3)π(R.r²). A y B- Volumen tumoral en función a los días post inyección de los diferentes ratones de cada uno de los grupos. C- Promedio del volumen tumoral en función a los días post inyección. D- Masa de los tumores post disección. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. En C, los asteriscos verdes representan diferencia entre LL/2-WT y LL/2-H12, violetas entre LL/2-WT y LL/2-F9 y naranjas entre LL/2-H12 y LL/2-F9 según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la mediana (SEM).

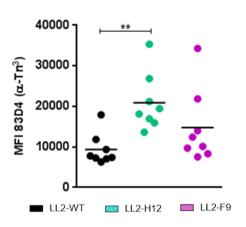


Figura 38 - Expresión del antígeno Tn en tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Post sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados para formar una suspensión celular. La misma se incubó con buffer de stripping para eliminar los anticuerpos murinos adheridos a las células tumorales. Las células se marcaron con anticuerpo anti-Tn (83D4) y anti-CD45. Se analizó la media de la intensidad de fluorescencia del 83D4 en las células CD45-. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01 según el test estadístico one-way ANOVA.

obteniendo diferencias significativas a partir del día 25, aunque el tamaño tumoral fue intermedio al de la línea parental (WT) y las células LL/2-H12 (Figura 37 A, B y C).

También evaluamos la masa de los tumores al momento de su extirpación, encontrando un aumento significativo de la masa de los tumores provenientes de las células LL/2-H12 en comparación con aquellos generados por las células LL/2-WT. Sin embargo, no se vieron diferencias significativas en la masa de los tumores generados por las células LL/2-F9 a pesar de visualizarse una clara tendencia a un mayor tamaño (Figura 37 D).

Por otro lado, para confirmar si la expresión del antígeno Tn se mantenía in vivo,

se evaluó su expresión en las células provenientes de los tumores disgregados. Para ésto, las mismas fueron marcadas con el anticuerpo α-CD45 y α-Tn (83D4), y se analizó la media de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo 83D4 en las células CD45. Se encontró que en los tumores LL/2-H12, las células CD45 tienen una mayor expresión de Tn que las células de los tumores LL/2-WT, pero no se diferencias encontraron significativas con las células provenientes de los tumores LL/2-F9

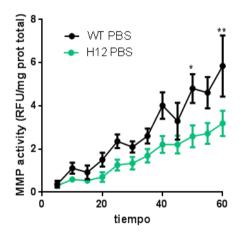


Figura 39 - Actividad de metaloproteasas (MMP) en tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Post sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados y el medio de disgregación se utilizó para medir la actividad de metaloproteasas en un ensayo de FRET, y se calculó su actividad como las unidades de fluorescencia relativa por mg de proteína total. En ensayo se realizó a un tiempo final de 1 hora, realizando mediciones cada 5 minutos. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01 según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la mediana (SEM).

(aunque hay una tendencia a una mayor expresión de Tn) (Figura 38).

Por otro lado, debido a las diferencias encontradas en los ensayos de invasión *in vitro*, se evaluó la actividad de metaloproteasas (MMP) provenientes del medio de disgregación del tumor. Sin embargo, no se observó una correlación positiva entre la capacidad invasiva de las células LL/2-H12 y la actividad de MMP del microambiente tumoral, e incluso se observó una disminución significativa de dicha actividad en LL/2-H12 a tiempo final del ensayo en comparación con las células LL/2-WT (Figura 39).

En conclusión, las células LL/2-H12 generaron tumores de mayor tamaño que las células LL/2-WT, con una mayor expresión de Tn post-disección de los mismos. Por otro lado, las células LL/2-F9 generaron tumores de tamaño intermedio entre la línea parental (WT) y la LL/2-H12 con una tendencia no significativa de mayor expresión de Tn.

Objetivo 5 - Análisis inmunológico a nivel local y sistémico de ratones con tumores Tn⁺

Para evaluar la respuesta inmunológica en el microambiente tumoral y en los órganos linfoides drenantes asociados al tumor, se realizaron análisis por citometría de flujo de las células provenientes de los tumores, bazo y los ganglios drenantes al tumor en los animales inoculados con las células tumorales con el fin de identificar diferentes poblaciones de leucocitos.

Análisis inmunológico en el microambiente tumoral

Comenzando con el análisis de las células inmunes infiltradas en el microambiente tumoral, se observó una disminución del porcentaje de células CD45⁺ infiltrantes en los tumores provenientes de la inoculación de las células LL/2-H12 y en el número de dichas células relativo al número de células tumorales, en comparación con los

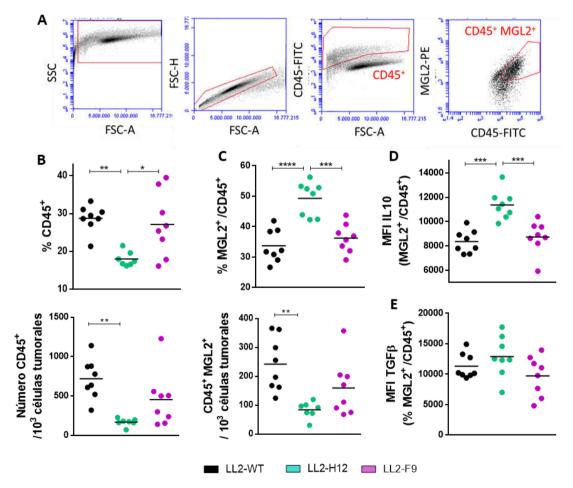


Figura 40 - Análisis de las células CD45⁺ en microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados y las células marcadas con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos, A- Estrategia de gating B- Porcentaje de células CD45⁺ y número de células CD45⁺ en función al número de células tumorales. C- Porcentaje de células MGL2⁺/CD45⁺ y número de células MGL2⁺/CD45⁺ en función al número de células tumorales D- Expresión de IL-10 en células MGL2⁺/CD45⁺ E- Expresión de TGFβ en células MGL2⁺/CD45⁺ . Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ****p<0,001 y *****p<0,0001. según el test estadístico oneway ANOVA.

tumores LL/2-WT y LL/2-F9 (Figura 40 B). A su vez, se observó un aumento en el porcentaje de células CD45⁺ que expresan el receptor MGL2 en los tumores LL/2-H12 en comparación con los LL/2-WT y LL/2-F9 (Figura 40 C). Por otro lado, se analizó la expresión de IL-10 y TGFβ en las células CD45⁺ MGL2⁺, encontrando un aumento en la expresión de IL-10 de dichas células en los tumores de LL/2-H12, en comparación con los LL/2-WT y LL/2-F9 (Figura 40 D). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de TGFβ en ninguno de los grupos (Figura 40 E).

A continuación, se evaluó el infiltrado de células mieloides presentadoras de antígeno profesionales, macrófagos y células dendríticas. Para ello utilizamos anticuerpos específicos de CD11c y F4/80. En esta instancia, resulta pertinente aclarar que en el microambiente tumoral no se observaron poblaciones simple positivas CD11c⁺ F4/80⁻ o CD11c⁻ F4/80⁺; en su lugar se observó una única población positiva para ambas moléculas (Figura 41 A). Se encontró un aumento en el porcentaje de células CD45⁺/CD11c⁺ F4/80⁺ en el microambiente tumoral de los tumores de LL/2-H12 en comparación con los LL/2-WT y LL/2-F9 (Figura 41 B), aunque una disminución en su número relativo al número de células tumorales en comparación con las LL/2-WT. Por otro lado, estas células presentaron una mayor expresión del receptor MGL2 que las células de los tumores LL/2-WT (Figura 41 C). Sin embargo, la expresión de MGL2 en las células CD11c+ F4/80+ de los tumores LL/2-F9 fue heterogénea, no observándose diferencias significativas con ninguno de los demás grupos (Figura 41 C).

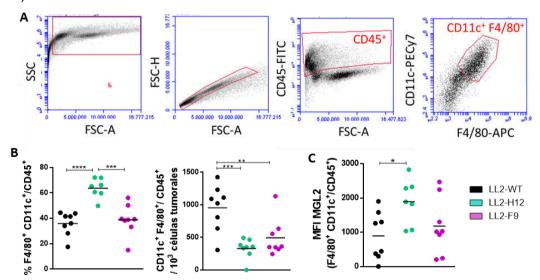


Figura 41 - Análisis de las células presentadoras de antígeno mieloides en microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados y las células marcadas con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos, A- Estrategia de gating. B- Porcentaje de células CD11c+ F4/80+/CD45+.y número de células CD11c+ F4/80+/CD45+ relativo al número de células tumorales. C- Expresión de MGL2 en células CD11c+ F4/80+/CD45+ Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 y ****p<0,0001 según el test estadístico one-way ANOVA.

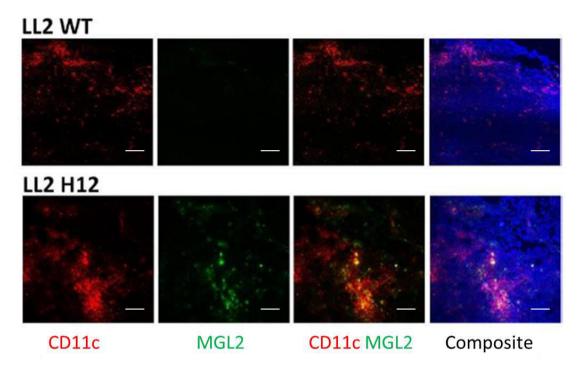


Figura 42 - Imágenes de cortes histológicos de tumores de LL/2-WT y LL/2-H12 marcados con α-CD11c y α-MGL2. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron extirpados y congelados. A partir de cortes histológicos de los mismos, se marcaron con anticuerpos específicos para CD11c (rojo) y MGL2 (verde) y se realizó la contra tinción de los núcleos con DAPI. Las imágenes fueron tomadas a 20x por microscopía confocal. Las barras corresponden a 50 nm.

Para confirmar la presencia de estas células, analizamos por microscopía confocal las células CD11c⁺ y MGL2⁺ en cortes histológicos tomados de tumores provenientes de animales inoculados con las células LL/2-H112 y LL/2-WT. Como se muestra en imágenes representativas en la Figura 42, se encontró un mayor infiltrado CD11c⁺ y MGL2⁺ en los tumores provenientes de LL2-H12. Además, se observó una colocalización de las células CD11c⁺ y MGL2⁺ (Figura 42), indicando un mayor reclutamiento de células CD11c⁺ que expresan MGL2 en los tumores Tn⁺ provenientes de la inoculación de LL/2-H12 en relación con los de LL2-WT.

Por otro lado, se evaluó el porcentaje de células NK infiltrantes en los tumores, definidas como células CD49⁺/CD45⁺. Como se observa en la Figura 43, en los tumores provenientes de células LL/2-H12 se determinó una disminución significativa del porcentaje de células CD49⁺/CD45⁺ infiltrantes en relación con los tumores provenientes de las células parentales LL/2-WT (Figura 43 B), aunque no se observaron diferencias significativas en su número relativo al número de células tumorales (Figura 43 B). En el caso de los tumores LL/2-F9, no se observaron diferencias significativas ni con los tumores LL/2-WT ni LL/2-H12 (Figura 43 B), A su vez, se evaluó la expresión de IFNγ en las células CD49⁺/CD45⁺, no encontrando diferencias entre los grupos (Figura 43 C).

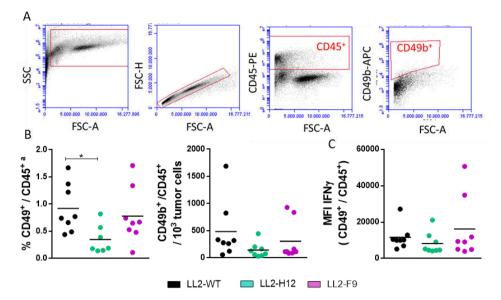


Figura 43 - Análisis de las células NK en microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados y las células marcadas con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos. **A-** Estrategia de gating. **B-** Porcentaje de células CD49b+/CD45+ y número de células CD49b+/CD45+ relativas a las células tumorales **C-** Expresión de IFNγ en células CD49b+/CD45+. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05 según el test estadístico one-way ANOVA.

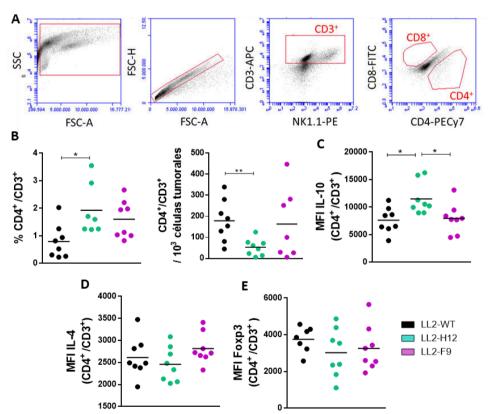


Figura 44 - Análisis de las células T CD3⁺ CD4⁺ en microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados y las células marcadas con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos. A- Estrategia de gating B-Porcentaje de células CD4⁺ /CD3⁺ y número de células CD4⁺/CD3⁺ relativas a las células tumorales. C- Expresión de IL-10 en células CD4⁺ /CD3⁺. D- Expresión de IL-4 en células CD4⁺ /CD3⁺. E- Expresión de FoxP3 en células CD4⁺ /CD3⁺. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01 según el test estadístico one-way ANOVA.

Posteriormente, se analizó el infiltrado linfocitario en el microambiente tumoral. Comenzando con los linfocitos T CD4+ (CD4+/CD3+) se observó un aumento en el porcentaje de dichas células en el microambiente tumoral de los tumores LL/2-H12 y en comparación con los tumores LL/2-WT (Figura 44 B) aunque una disminución en su número relativo al número de células tumorales (Figura 44 B). También se observó un aumento en la expresión de IL-10 en las células T CD4+ de los tumores LL/2-H12 en comparación con los tumores LL/2-WT y LL/2-F9 (Figura 44 C). En cuanto a los tumores LL/2-F9, no se observaron cambios significativos en el porcentaje de células T CD4+ infiltrantes al compararlo con los tumores LL/2-WT, ni en la expresión de IL-10 de dichas células (Figura 44 B y C). Por otro lado, se evaluó la expresión de IL-4 (Figura 44 D) y FoxP3 (Figura 44 E) en las células T CD4+, no observándose diferencias significativas entre los grupos.

A su vez, se analizó el infiltrado T CD8+ (definido como CD8+/CD3+) en el microambiente tumoral. En los tumores LL/2-H12 se observó un aumento en el

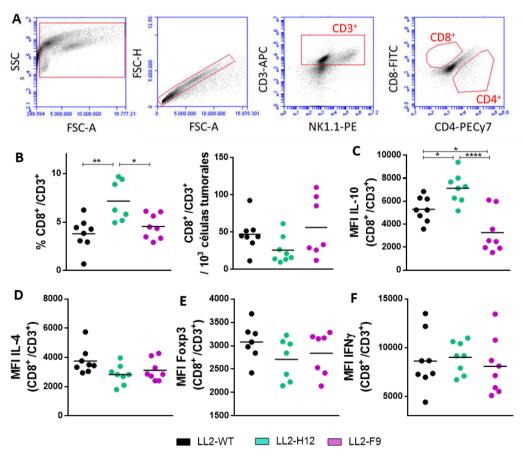


Figura 45 - Análisis de las células T CD3⁺ CD8⁺ en microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados y las células marcadas con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos. A- Estrategia de gating B-Porcentaje de células CD8⁺ /CD3⁺ y número de células CD8⁺/CD3⁺ relativas a las células tumorales. C- Expresión de IL-10 en células CD8⁺ /CD3⁺. E- Expresión de FoxP3 en células CD8⁺ /CD3⁺. F-Expresión de IFNγ en células CD8⁺ /CD3⁺. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.01 según el test estadístico one-way ANOVA.

porcentaje de células T CD8⁺ infiltradas en comparación con los tumores LL/2-WT y LL/2-F9 (Figura 45 B) aunque no se observaron cambios en su número en relación al número de células tumorales (Figura 45 B). En cuanto a la expresión de IL-10 de dichas células, se encontró un aumento en las células provenientes de los tumores LL/2-H12 en comparación con las LL/2-WT y LL/2-F9, y una disminución en la expresión de IL-10 de las células T CD8 de los tumores LL/2-F9 al comparar tanto con las LL/2-H12 como las LL/2-WT (Figura 45 C). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de IL-4 (Figura 45 D), FoxP3 (Figura 45 E) e IFNγ (Figura 45 F).

Por último, se evaluaron las células NKT, definidas como la población CD3⁺ NK1.1⁺. En este caso, se encontró un aumento en el porcentaje de dichas células infiltradas e los tumores LL/2-H12 al comparar con los tumores LL/2-WT (Figura 46 B) aunque no se observaron diferencias en su número relativizado al número de células tumorales. Más allá de la tendencia al aumento en el número de células infiltrantes CD3⁺ NK1.1⁺ en los tumores LL/2-F9 comparadas con los tumores LL/2-WT, esta diferencia no fue significativa (Figura 46 B).

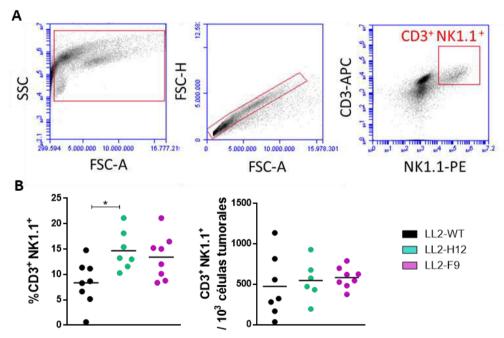


Figura 46 - Análisis de las células NKT en microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados y las células marcadas con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos, A- Estrategia de gating B-Porcentaje de células CD3⁺ NK1.1⁺ y número de células CD3⁺ NK1.1⁺ relativas a las células tumorales. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05. según el test estadístico one-way ANOVA.

Para complementar los estudios de poblaciones inmunológicas por citometría de flujo, se analizó la expresión de diversas citoquinas o moléculas asociadas a la respuesta inmune por qRT-PCR a partir de ARNm total aislado de tumores de LL/2-WT y LL/2-H12. Aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de las moléculas analizadas, es importante destacar que se detectó una

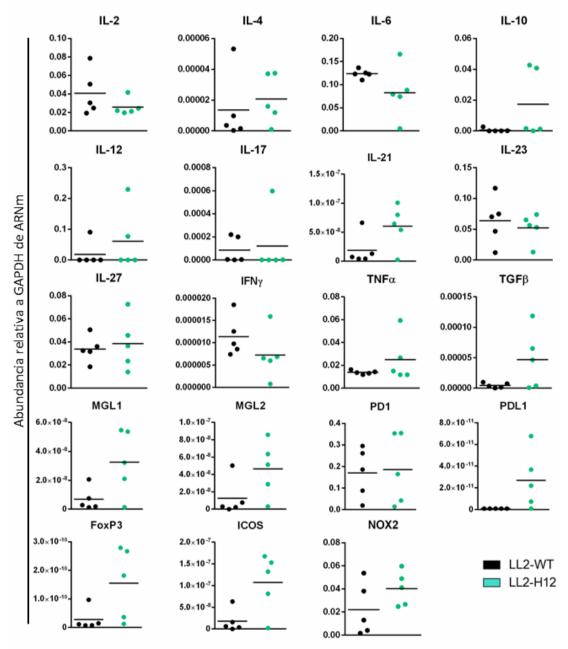


Figura 47 - Análisis de expresión génica de citoquinas y moléculas asociadas a la respuesta inmune en el microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, se extrajo el ARN total de los tumores. El ARN se retro-transcribió a ADNc y este fue utilizado como molde para realizar las qRT-PCR. Se evaluaron diversos genes de citoquinas, receptores y moléculas asociadas a la respuesta inmunológica, En las gráficas se muestra la abundancia de el gen correspondiente, relativizada al gen housekeeping GAPDH. Se realizaron análisis estadístico utilizando el test one-way ANOVA. Con asteriscos se indican los genes que dan una tendencia a aumentar en las muestras correspondientes a LL/2-H12.

tendencia al aumento de la expresión génica de TGFβ, PD-L1, MGL1, MGL2, FoxP3 e ICOS (señalados con asteriscos en la Figura 47), así como una disminución de IFNγ en las muestras provenientes de tumores LL/2-H12 con respecto a los LL/2-WT (Figura 47).

Análisis inmunológico en ganglios drenantes

Para el estudio de los ganglios drenantes al tumor, se realizaron pools de los

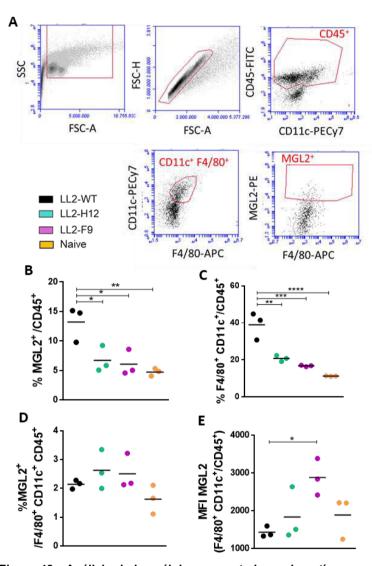


Figura 48 - Análisis de las células presentadoras de antígeno en ganglios drenantes de tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 y ratones naive. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, los ganglios fueron disgregados y se realizó un pool de los mismos para marcar las células con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos, A- Estrategia de gating B- Porcentaje de células MGL2+/CD45+. C- Porcentaje de células F4/80+CD11c+CD45+. D- Porcentaje de células MGL2+/F4/80+CD11c+CD45+. E- Expresión de MGL2 en células F4/80+CD11c+CD45+. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 y *****p<0,0001 según el test estadístico one-way ANOVA.

ganglios debido al bajo número celular obtenido en cada uno de ellos por separado. A su vez, se incorporó al estudio ratones naive (sin tumor) controles. como En primera instancia evaluó el porcentaje de células MGL2+/CD45+. Sorpresivamente, se observó que los ratones tumores LL/2-WT con presentaron un aumento en el porcentaje de las células CD45⁺ MGL2⁺ en comparación con restantes grupos (Figura 48 B). Por otro lado, se evaluaron células las presentadoras de antígeno F4/80+ CD11c+, encontrándose un aumento en esta población celular en los ratones inoculados con LL/2-WT (Figura 48 C). A su vez, se evaluó el porcentaje células MGL2⁺ de dentro las

células presentadoras de antígeno (Figura 48 D) y la expresión de este receptor en dichas células (Figura 48 E), encontrándose diferencias significativas en la media de fluorescencia de MGL2 en las células F4/80⁺ CD11c⁺ en los ratones inoculados con las células LL/2-F9 comparado con los ganglios de los ratones inoculados por las células LL/2-WT (Figura 48 E).

También se evaluaron las poblaciones linfocitarias CD4⁺ y CD8⁺ en los ganglios drenantes del tumor, no observándose diferencias en el porcentaje de células CD3⁺ CD4⁺ o CD8⁺ en los ganglios, ni en la expresión de IL-10, IL-4 o FoxP3 en los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ de los diferentes grupos (Figura 49 y 50).

Análisis inmunológico en bazo

Por último, se analizaron las poblaciones de células inmunes en los bazos de animales con tumores. Este análisis se realizó en animales inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12, dado a que corresponden a un experimento previo al mostrado en las figuras anteriores, donde no se inocularon las células LL/2-F9. En primer lugar,

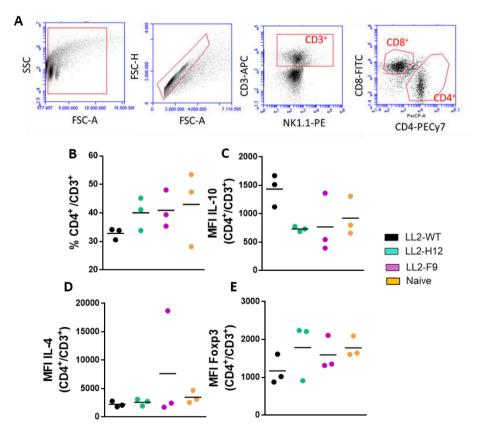


Figura 49 - Análisis de las células T CD4 de antígeno en ganglios drenantes de tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 y ratones naive. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, los ganglios fueron disgregados y se realizó un pool de los mismos para marcar las células con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos. A- Estrategia de gating B- Porcentaje de células CD4+/CD3+. C- Expresión de IL-10 en células CD4+/CD3+. D- Expresión de IL-4 en células CD4+/CD3+. E- Expresión de Foxp3 en células CD4+/CD3+. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA.

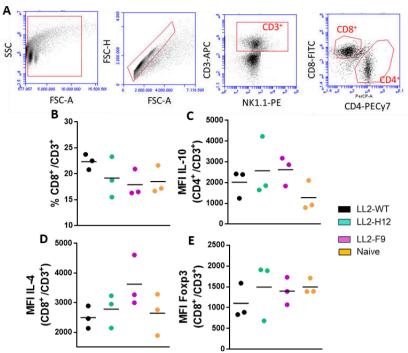


Figura 50 - Análisis de las células T CD8 de antígeno en ganglios drenantes de tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 y ratones naive. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, los ganglios fueron disgregados y se realizó un pool de los mismos para marcar las células con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos. A- Estrategia de gating. B- Porcentaje de células CD8+/CD3+. C- Expresión de IL-10 en células CD8+/CD3+. D- Expresión de IL-4 en células CD8+/CD3+. E- Expresión de Foxp3 en células CD8+/CD3+. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA.

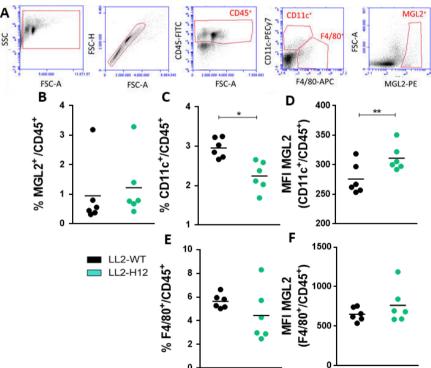


Figura 51 - Análisis de las células mieloïdes presentadoras de antígeno en bazos de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, los bazos fueron disgregados para marcar las células con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos, A- Estrategia de gating. B- Porcentaje de células MGL2+/CD45+ C- Porcentaje de células CD11c+/CD45+ D- Expresión de MGL2 en células CD11c+/CD45+ E- Porcentaje de células F4/80+/CD45+ F- Expresión de MGL2 en células F4/80+/CD45+. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01 según el test estadístico one-way ANOVA.

se analizaron las células presentadoras de antígeno de tipo mieloide (CD11c⁺ F4/80⁻ o CD11c⁻ F4/80⁺). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células CD45⁺ MGL2⁺ entre los ratones inoculados con células LL/2-WT y LL/2-H12 (Figura 51 B). En cuanto a las células CD11c⁺, se observó una disminución en el porcentaje de células CD45⁺ CD11c⁺ en los bazos de ratones inoculados con células LL/2-H12 comparadas con las LL/2-WT (Figura 51 C), así como un aumento en la expresión de MGL2 en estas células (Figura 51 D). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células CD45⁺ F4/80⁺ (Figura 51 E), ni en la expresión de MGL2 (Figura 51 F).

En segundo lugar, se analizó el porcentaje de células T CD4⁺ en bazo (Figura 52 B), así como la expresión de IL-10 (Figura 52 C), IL-4 (Figura 52 D), TGFβ (Figura 52 E) y FoxP3 (Figura 52 F), no observándose diferencias significativas en ninguno de estos parámetros analizados.

Análisis inmunológico en suero

Al analizar los niveles de citoquinas en suero por ELISA, observamos que los ratones con tumores LL/2-H12 presentan un aumento en la relación de los niveles de IL-10 en función a IFNy en comparación con los WT (Figura 53).

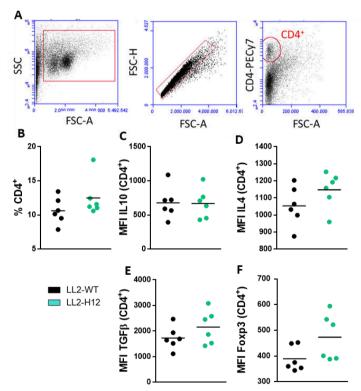


Figura 52 - Análisis de las células T CD4⁺ en bazos de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior sacrificio del animal, los bazos fueron disgregados para marcar las células con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos. A- Estrategia de gating. B- Porcentaje de células CD4⁺. C- Expresión de IL-10 en células CD4⁺ D-Expresión de IL-4 en células CD4⁺. E- Expresión de TGFβ en células CD4⁺. F- Expresión de FoxP3 en células CD4⁺. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA.

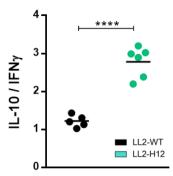


Figura 53 - Relación IL-10/IFNγ en suero de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12 por ELISA. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Justo previo al sacrificio del animal, realizó una la extracción de sangre, y se centrifugó para obtener el suerpo. Mediante kits ELISA de detección de IL-10 e IFNγ se calculó la relación IL-10/ IFNγ. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: ****p<0.0001 según el test estadístico one-way ANOVA.

Por último, se analizó el título de anticuerpos totales IgM e IgG en los sueros de los animales inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos (Figura 54).

En conclusión, las células LL/2-H12 generaron tumores con un menor infiltrado CD45⁺. No obstante, este infiltrado CD45⁺ en los tumores LL/2-H12 se encuentra caracterizado por un aumento de células MGL2⁺, CD11c⁺ F4/80⁺ con mayor expresión de MGL2 e IL-10, así como también una mayor predominancia de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productores de IL-10, indicando un mayor estado inmunoregulador en los tumores

donde la expresión del antígeno Tn se mantiene in vivo.

Con respecto a las células LL/2-F9, estas generaron tumores con infiltrados leucocitario similar al encontrado en los tumores provenientes de las células parentales LL/2-WT (Tn⁻).

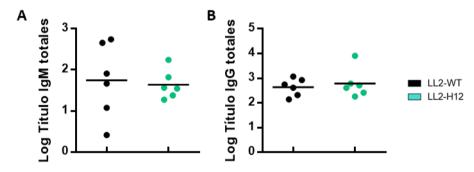


Figura 54 - Títulos de anticuerpos totales IgM e IgG en suero de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Justo previo al sacrificio del animal, realizó una la extracción de sangre, y se centrifugó para obtener el suerpo. Se realizaron ELISA de detección de IgG e IgM murinos. A- Logaritmo del título de IgM en suero. B- Logaritmo del título de IgG en suero. Se realizaron análisis estadístico utilizando el test one-way ANOVA.

Objetivo 6 - Estudio de la capacidad de los factores solubles producidos por las células Tn⁺ en inmunomodular la función de DC

Considerando el reclutamiento de células CD11c⁺ F4/80⁺ que expresan mayores niveles de MGL2 en los tumores Tn⁺, así como la presencia de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-10, y para evaluar si las moléculas secretadas por las células o tumores Tn⁺, eran capaces de condicionar la función de DC en inducir una respuesta T reguladora, se realizó un ensayo de condicionamiento de BMDC. Las mismas se produjeron a partir de precursores de médula ósea de ratones singénicos estimulados con GM-CSF, y se incubaron con el medio condicionado de cultivo de las células tumorales (Figura 55), o el sobrenadante de la disgregación de los tumores (Figura 56) por 24 horas. El sobrenadante de cultivo se guardó para la detección de citoquinas por ELISA, y primeramente la expresión de MGL2, MHC-II y moléculas de co-estimulación (CD80 y CD86) fue por BMDC fue analizada por citometría de flujo. En segundo lugar, las BMDC condicionadas con los factores solubles de las células (Figura 55) o tumores (Figura 56) se incubaron con esplenocitos alogénicos por 5 días. Pasados estos 5 días, se recogió el sobrenadante del cultivo para medir citoquinas por ELISA.

En la Figura 55 se observan los resultados de este ensayo con medio condicionado de las células tumorales en cultivo. Las BMDC no presentaron cambios significativos en los marcadores de activación MHC-II y CD80 en las condiciones evaluadas. Sin embargo, se observó una disminución en la expresión de MGL2 al incubar las BMDC con los medios condicionados de las células Tn+ (Figura 55 A) y un aumento en la expresión de CD86 en las BMDC incubadas con el medio condicionado de las LL/2-F9 (Figura 55 A). Por otro lado, las BMDC condicionadas con los factores solubles derivados de las células Tn+ LL/2-H12 produjeron mayores niveles de IL-10 ((Figura 55 B), resultando en una menor producción del cociente IL-12/IL-10 en comparación con el condicionamiento con los factores derivados de LL/2-WT (Figura 55 C). Por el contrario, esta diferencia no fue obtenida al incubar las BMDC con los factores solubles derivados de las células Tn+ LL/2-F9 (Figura 55 B y C). Con relación a TNF-α, se observó una diminución de su producción por parte de BMDC incubadas con el medio condicionado de LL/2-H12 en comparación con las de LL/2-WT, LL/2-F9 y la condición medio control (Figura 55 B).

En una segunda instancia, analizamos las citoquinas producidas en el ensayo de estimulación alogénica de esplenocitos, en el cual no se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-10, pero si un aumento significativo en la producción de IFNγ por BMDC incubadas con medio condicionado de LL/2-WT en comparación al resto de las condiciones ((Figura 55 D y E). Estos resultados, aunque variados, indican

una cierta inmunomodulación en las citoquinas secretadas por las BMDC por parte de los factores solubles producidos por las células Tn⁺ LL/2-H12.

Para complementar estos resultados, analizamos el efecto del condicionamiento de BMDC con el sobrenadante de la disgregación de los tumores, el cual, al contrario del medio condicionado celular, contiene todos los factores solubles secretados por el tumor, incluyendo el de células no tumorales. Las BMDC incubadas con los factores solubles producidos por los tumores derivados de LL/2-H12 presentaron un aumento en la expresión de MGL2 y una disminución significativa de MHC-II y CD86 en relación con los provenientes de LL/2-WT (Figura 56 A). Por otra parte, las BMDC incubadas con los factores solubles producidos por los tumores Tn⁺ LL/2-H12 produjeron menores niveles de IL-12, pero no de IL-10 o TNFα, en relación con aquellos derivados de los tumores LL/2-WT (Figura 56 B y C). Para finalizar, analizamos las citoquinas

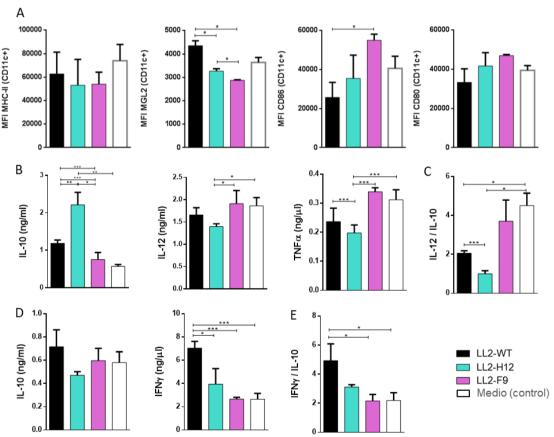


Figura 55 - Ensayos de estimulación de BMDC con medios condicionados de las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Se cultivaron las células a igual concentración por 18 horas en medio libre de FBS. Posteriormente, se recogió el sobrenadante de cultivo (medio condicionado) y se incubó con BMDC de ratones singénicos por 24 horas. A- Expresión de moléculas de activación MHC-II, MGL2, CD80 y CD86 en las células CD11c+ . B- Concentración de IL-10, IL-12 y TNFα por ELISA en los sobrenadantes de cultivo C- Expresión de IL-12 en función a la expresión de IL-10 en el sobrenadante de cultivo por ELISA. D- Pasadas las 24 horas, se lavaron las BMDC y se incubaron con esplenocitos de ratones alogénicos. A los 5 días, se midieron IL-10 e IFNy en el sobrenadante de cultivo por ELISA. E- Expresión de IFNy en función a la expresión de IL-10 en el sobrenadante de cultivo por ELISA. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la media (SEM).

producidas en el ensayo de estimulación alogénica de esplenocitos, en el cual observamos una disminución del cociente IFN γ /IL-10 por parte de las BMDC incubadas con los factores solubles producidos por los tumores LL/2-H12 con respecto al control, el cual no fue observado con aquellos provenientes de LL/2-WT (Figura 56 D y E).

En conclusión, los factores solubles provenientes de células o tumores Tn+ condicionan la expresión de moléculas de superficie o de citoquinas en la DC, lo que podría eventualmente impactar en su función estimuladora.

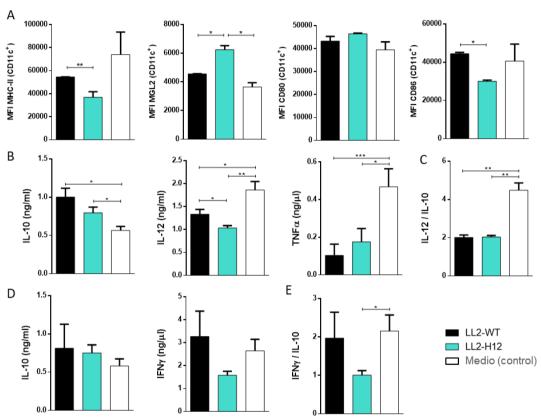


Figura 56 - Ensayos de estimulación de BMDC con medios de disgregación de tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Los tumores fueron disgregados hasta obtener una suspensión celular y el sobrenadante del medio de disgregación se incubó con BMDC de ratones singénicos por 24 horas. A-Expresión de moléculas de activación MHC-II, MGL2, CD80 y CD86 en las células CD11c⁺. B-Concentración de IL-10, IL-12 y TNFα por ELISA en los sobrenadantes de cultivo. C- Expresión de IL-12 en función a la expresión de IL-10 en el sobrenadante de cultivo por ELISA. D- Pasadas las 24 horas, se lavaron las BMDC y se incubaron con esplenocitos de ratones alogénicos. A los 5 días, se midieron IL-10 e IFNγ en el sobrenadante de cultivo por ELISA. E- Expresión de IFNγ en función a la expresión de IL-10 en el sobrenadante de cultivo por ELISA. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras representan el error estándar de la media (SEM).

Objetivo 7 - Estudio de la interacción del antígeno Tn con el receptor MGL2 in vitro

Debido al aumento observado de células MGL2⁺ en el infiltrado inmune en los tumores Tn⁺ provenientes de la inoculación de las células LL/2-H12, y los antecedentes en la bibliografía del reconocimiento de dicho receptor por residuos GalNAc terminales (incluido el antígeno Tn)⁹⁶, estudiamos si las variantes celulares Tn⁺ generadas eran reconocidas por MGL2 o por células MGL2⁺ *in vitro*. Para ésto, se utilizaron proteínas quiméricas formadas por la porción de reconocimiento del receptor MGL1 y MGL2 con la porción Fc de in anticuerpo lgG humano⁹⁶. Como control de estos ensayos, se utilizó EGTA, que es un agente quelante con una alta capacidad de secuestrar el calcio del medio. Debido a que el receptor MGL2 es una lectina de tipo C, necesita calcio para unirse a sus ligandos por su dominio de reconocimiento a carbohidratos¹⁰¹. Por ello,

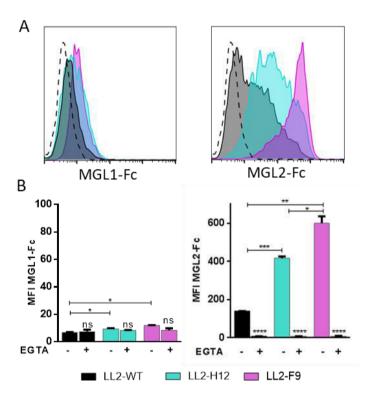


Figura 57 - Reconocimiento por la proteína quimérica MGL1-Fc y MGL2-Fc a las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Se utilizaron proteínas quiméricas formadas por el dominio de reconocimiento del receptor tipo lectina MGL1 o MGL2, fusionadas al dominio Fc de un anticuerpo IgG humano. Las células fueron marcadas para analizar por citometría de fluio. Como control. se agregó EGTA al medio de incubación, que quela el Calcio del medio, el cual es fundamental para la unión del receptor a través de su dominio de reconocimiento. A- Histograma de la intensidad de fluorescencia de MGL1-Fc y MGL2-Fc. B- Gráfica de la media de la intensidad de fluorescencia de MGL1-Fc y MGL2-Fc en las diferentes condiciones. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 y ****p<0,0001 o ns indica no significativo según el test estadístico one-way ANOVA. Los asteriscos sobre las barras de la condición de EGTA indica diferencia significativa con su respectiva variante celular sin EGTA. Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

en presencia de EGTA la interacción MGL2-ligando se previene.

primer lugar, evaluó por citometría flujo si las variantes celulares LL/2-H12 y LL/2-F9 generadas eran capaces ser reconocidas por MGL1-Fc o MGL2-Fc. Se observó todas que variantes analizadas (LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9) eran reconocidas por la proteína quimérica MGL2-Fc al comparar con el control con EGTA, pero este reconocimiento fue significativo considerablemente mavor en las células LL/2-H12 y LL/2-F9 al compararlas a las células LL/2-WT (Figura 57). Además, las células LL/2-F9

presentaron un aumento en el reconocimiento por dicho receptor en comparación con las LL/2-H12 (Figura 57). Es importante destacar que la reactividad de MGL2 por parte de las tres líneas o variantes celulares estudiadas se abolió en presencia de EGTA, un quelante de calcio (Figura 57 B), indicando una interacción dependiente de este catión y una lectina tipo C como mediador. Con respecto al reconocimiento por MGL1, más allá que se observaron diferencias en su reconocimiento por las líneas/variantes celulares, ninguna de ellas fue significativa en presencia de EGTA (Figura 57), por lo cual esta unión no estaría mediada por el dominio de reconocimiento de la lectina y su ligando carbohidrato.

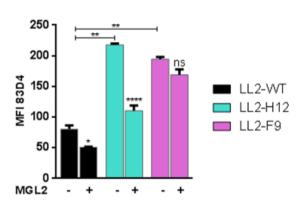


Figura 58 - La unión del anticuerpo anti Tn 83D4 se inhibe por la proteína quimérica MGL2-Fc en células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Se utilizó la proteína quimérica formadas por el dominio de reconocimiento del receptor tipo lectina MGL2, fusionada al dominio Fc de un anticuerpo lgG humano. Las células fueron preincubadas con MGL2-Fc y posteriormente marcadas para analizar por citometría de flujo con 83D4. Las gráficas muestran de la media de la intensidad de fluorescencia de 83D4. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, y ****p<0,0001 o ns indica no significativo según el test estadístico one-way ANOVA. Los asteriscos sobre las barras de la condición de inhibición indica diferencia significativa con su respectiva variante celular sin inhibidor. Las barras de error indican error estándar de la media (SEM).

Posteriormente. para confirmar MGL2 que interacciona con las células Tn+ a través del antígeno Tn, se estudió si el reconocimiento por el anticuerpo se veía disminuido al pre-incubar las células con MGL2-Fc. Por lo tanto, se preincubaron las células con MGL2-Fc y se analizó la reactividad del anticuerpo α-Tn 83D4. Se observó que tanto en las células LL/2-WT como LL/2-H12. reconocimiento por el anticuerpo 83D4 fue inhibido por MGL2, aunque únicamente en las células LL/2-H12 la inhibición

fue de un 50% (Figura 58). Por otro lado, la pre-incubación con MGL2 no fue suficiente para inhibir la reactividad del anticuerpo 83D4 por la línea LL/2-F9 (Figura 58), indicando que podrían existir diferencias entre los epitopes reconocidos por anticuerpo monoclonal y la lectina.

Por otro lado, se evaluó por *lectin blot*, el reconocimiento de MGL2-Fc a proteínas totales provenientes de las variantes celulares. Como se observa en el *blot*, las células LL/2-H12 y LL/2-F9 fueron reconocidas con mayor intensidad por MGL2, aunque este reconocimiento fue mayor en las células LL/2-F9 (Figura 59). A su vez, se observaron bandas correspondientes a componentes glicosilados de aproximadamente 75, 100 y

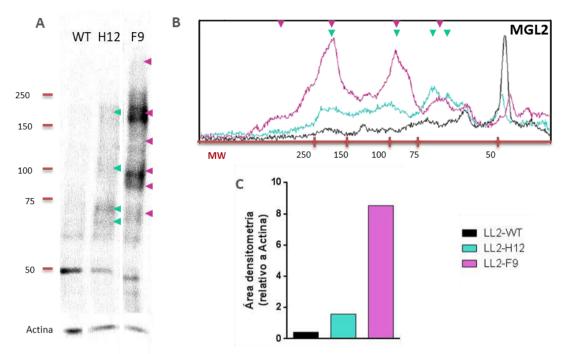


Figura 59 - Lisados de células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9 son reconocidos en lectin-blot por MGL2-Fc. Se corrieron 10 μg de proteína en geles de acrilamida/bis-acrilamida 8 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con la proteína quimérica MGL2-Fc. A-Fotografía del blot de MGL2-Fc. En rojo se observa el marcador de peso molecular, y en la parte inferior el western blot de control de carga de actina. B- Gráficos de densitometría de los carriles. C- Área debajo del gráfico de densitometría normalizado a la densitometría de actina.

150 kDa reconocidas de forma diferencial en las células Tn⁺, que no aparecen en el carril de las proteínas de las células LL/2-WT (Figura 59 A y B). Por último, por densitometría se confirmó el aumento en el reconocimiento de MGL2 a las células Tn⁺, especialmente en LL/2-F9 (Figura 59 C).

Debido a que en los *lectin blots* analizados se pudo observar la predominancia de algunas proteínas diferencialmente reconocidas por las lectinas que reconocen GalNAc terminal (Figura 21 y 22) por MGL2-Fc (Figura 59), se procedió a purificarlas en columnas de afinidad conjugadas a MGL2-Fc. A partir de *pellets* celulares de LL/2-H12, se realizó un enriquecimiento en proteínas membranarias por ultracentrifugación, y la fracción fue incubada en la columna conjugada a MGL2. Posteriormente, las proteínas eluidas se analizaron por SDS-PAGE. Como se observa en la Figura 60, se purificaron tres componentes principales, el primero de alto peso molecular (mayor a 170 kDa), un segundo componente de entre 70 y 55 kDa y un tercero de aproximadamente 35 kDa. Los pesos moleculares de estas bandas se correlacionaron con el peso de algunos componentes observados en el lectin blot de VVL y HPA (Figura 21 y 22). Particularmente, en el caso de HPA se observó una banda mayor a 250 kDa en las células LL/2-H12 (Figura 21 y 22) y en el caso de VVL se observaron bandas entre 75 y 50 kDa y menor a 50 kDa en estas mismas células (Figura 21), que

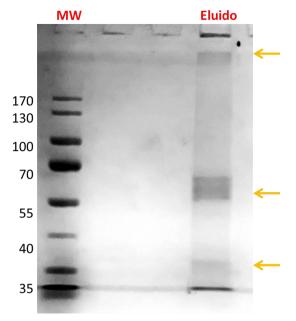


Figura 60 - SDS-PAGE de proteínas purificadas por cromatografía de afinidad con MGL2-Fc. Las proteínas de fracción membranaria fueron purificadas por ultracentrifugación y se les realizó una cromatografía de afinidad por MGL2-Fc. La fracción del eluído se analizó por SDS-PAGE. Con las flechas se indican las glicoproteínas ligandos predominantes en el eluído.

no fueron identificadas por la lectina en las células LL/2-WT, y que podrían corresponder los а mismos componentes purificados con MGL-2 (Figura 60).

Las proteínas purificadas fueron tratadas siguiendo el protocolo para identificarlas por espectrometría de masas, así como identificar los glicanos presentes en las mismas, pero debido a problemas logísticos vinculados al envío de las muestras y la pandemia de COVID-19, no se pudo continuar con este objetivo.

Para evaluar si los ligandos identificados con MGL2 por lectin blot se correspondían los ligandos con

identificados en esta misma técnica con la lectina VVL, se evaluó si el reconocimiento de las proteínas totales por MGL2 podía ser inhibido por VVL, que presenta alto

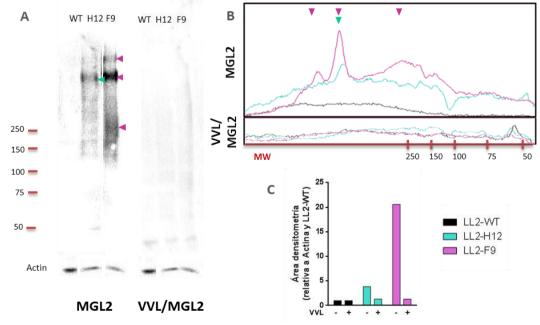


Figura 61 - VVL inhibe el reconocimiento de MGL2-Fc en lisados celulares de LL/2-WT, LL/2-H12 y LL-2/F9. Se corrieron 10 µg de proteína en geles de acrilamida/bis-acrilamida 8% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se pre-incubaron con VVL y posteriormente se incubaron con la proteína quimérica MGL2-Fc. A- Fotografía del blot de MGL2-Fc y MGL2-Fc inhibido con VVL. En rojo se observa el marcador de peso molecular, y en la parte inferior el western blot de control de carga de actina. B- Gráficos de densitometría de los carriles. C- Área debajo del gráfico de densitometría normalizado a la densitometría de actina.

reconocimiento por estructuras tipo GalNAc terminales, entre las que se incluye el antígeno Tn (Tabla 2). Como se ve en la Figura 61, el reconocimiento observado con MGL2 por las proteínas de LL/2-H12 y de LL/2-F9 (de componentes mayores a 250 kDa) se abolió completamente al pre-incubar la membrana con la lectina VVL (Figura 61 A). Esto también se pudo observar en las figuras de la densitometría de los diferentes carriles, excepto para las células LL/2-WT (Figura 61 B y C).

Por último, se evaluó si las células MGL2+ eran capaces de interaccionar con las células tumorales Tn⁺. Para ello se estudió si células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con el receptor membranario MGL2 murino eran capaces de interaccionar de forma diferencial con las células Tn⁺. Para ésto se realizaron dos estrategias diferentes. En primer lugar, se marcaron tanto las células CHO como las diferentes variantes de LL/2 con dos sondas fluorescentes diferentes, y se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de dobletes doble positivos, comparándolo con un control en presencia de EGTA. Como se visualiza en la Figura 62, se observó que tanto las células LL/2-H12 como LL/2-F9 interaccionaron con las células CHO-MGL2 debido a un porcentaje de dobletes doble positivos mayor que las células LL/2-WT, e incluso es las células LL/2-F9 este porcentaje fue significativamente mayor que las células LL/2-H12 (Figura 62 B). Sin embargo, al comparar con sus controles respectivos con EGTA donde esperamos abolir la interacción, solo se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de las células LL/2-F9 en relación con la misma condición en presencia de EGTA (Figura 62 B).

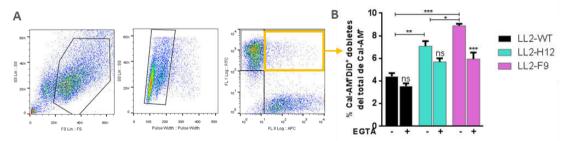


Figura 62 - Células CHO que expresan el receptor MGL2-Fc reconocen células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Las células CHO MGL2+ fueron marcadas con la sonda fluorescente Calcein-AM y las células LL/2 se marcaron con la sonda DiD. Las mismas se incubaron y se analizaron por citometría de flujo. A-Estrategia de gating. B- El porcentaje de interacción se consideró como el porcentaje de eventos dobletes doble positivos sobre el total de eventos positivos para Calcein-AM (células CHO) (cuadrante naranja en el gráfico dotblot de citometría en A). Como control, se agregó EGTA al medio de incubación, que quela el calcio del medio, el cual es fundamental para la unión del receptor a través de su dominio de reconocimiento. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 y ****p<0,0001 o ns indica no significativo según el test estadístico one-way ANOVA. Los asteriscos sobre las barras de la condición de EGTA indica diferencia significativa con su respectiva variante celular sin EGTA. Las barras de error indican error estándar de la media (SEM).

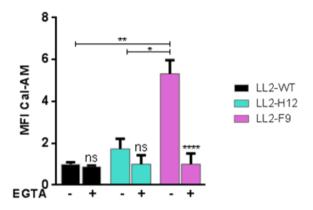


Figura 63 - Células CHO que expresan el receptor MGL2-Fc reconocen las células LL/2-WT, LL/2-H12 y LL/2-F9. Las células LL/2 se plaquearon en placas de 96 pocillos hasta que se adherieran a la placa. Las células CHO MGL2+ fueron marcadas con la sonda fluorescente Calcein-AM y se agregaron a los pocillos. Como control, se agregó EGTA al medio de incubación, que quela el Calcio del medio, el cual es fundamental para la unión del receptor a través de su dominio de reconocimiento. A diferentes tiempos, se lavó la placa y las células que permanecieron adheridas se lisaron y se midió la fluorescencia de Calcein-AM en el medio y se relativizó a su condición con EGTA. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 y ****p<0,0001 o ns indica no significativo según el test estadístico one-way ANOVA. Los asteriscos sobre las barras de la condición de EGTA indica diferencia significativa con su respectiva variante celular sin EGTA.Las barras indican error estándar sobre la media (SEM).

En una segunda instancia, se confirmaron estos resultados mediante una segunda técnica basada en la marcación de las células CHO MGL2+ con la sonda fluorescente Calcein-AM. observó un aumento significativo en la fluorescencia de los pocillos las células LL/2-F9 de comparación con las células LL/2-WT y LL/2-H12, que disminuyó de forma significativa al agregar EGTA a la reacción (Figura 63). En conclusión, las células CHO-MGL2⁺ fueron capaces de reconocer por su dominio de unión de carbohidrato a las células LL/2-F9.

En conclusión, el receptor tipo lectina MGL2 reconoce las variantes celulares LL/2-H12 y LL/2-F9 a través del antígeno Tn.

Objetivo 8 - Evaluación del papel de las células MGL2⁺ en el crecimiento tumoral y la inducción de la respuesta inmune de animales con tumores Tn⁺

Para evaluar el rol de las células MGL2+ en el crecimiento tumoral de ratones inoculados con células LL/2-H12, se utilizó un modelo murino de ratones C57BL/6 MGL2-DTR. Estos ratones, como se explicó anteriormente, tienen acoplada la expresión de MGL2 a la expresión del receptor de la toxina diftérica (DTR). Por lo tanto, al inyectarles DT se depletan selectivamente las células MGL2⁺. Es importante destacar que estos estudios los realizamos únicamente con la variante Tn⁺ LL/2-H12 (comparándola con la línea parental) ya que sólo los tumores que provenían de estas células presentaron un mayor reclutamiento de células CD11c+ F4/80+ expresando MGL2. Además, en dichos tumores se encontró mayor producción de IL-10 por parte de las células CD11c+ F4/80+ y linfocitos T (objetivo 5).

En primera instancia, se evaluó el crecimiento tumoral en cuatro grupo de ratones: animales inoculados con las células LL/2-WT inyectados con PBS (WT-PBS) e inyectados con DT (WT-DT), y ratones inoculados con las células LL/2-H12 inyectados con PBS (H12-PBS) e inyectados con DT (H12-DT), Como se observa en la Figura 64, la inoculación de DT no generó cambios en el crecimiento tumoral de las células LL/2-WT, pero al inocular los ratones LL/2-H12 con DT, el volumen tumoral fue significativamente menor comparado con la condición control de PBS desde el día 16 del crecimiento tumoral (Figura 64 A). De manera análoga, el crecimiento tumoral de los ratones inoculados con LL/2-H12 y DT no presentó diferencias significativas con los ratones inoculados con LL2-WT y PBS, en contraposición con los ratones

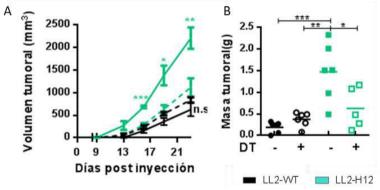


Figura 64 - Crecimiento tumoral en ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Al día -1 y cada 2-3 días los ratones fueron inoculados i.p. con tóxina diftérica (DT) o PBS. El tamaño tumoral se registró midiendo el diámetro mayor y menor de los tumores cada 2-3 días. El volumen tumoral se calculó como V=(4/3)π(R.r2). A - Volumen tumoral en función a los días post-inoculación de los diferentes ratones de cada uno de los grupos. B- Masa de los tumores post disección. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 según el test estadístico one-way ANOVA. En A, los asteriscos verdes representan diferencia entre LL/2-H12 PBS y LL/2- H12 DT.

inoculados con LL/2-H12 y PBS (Figura 64 A). Por otro lado, la masa de los tumores extirpados de los ratones fue significativamente superior en los ratones H12-PBS que los WT-PBS, como se observó en los experimentos anteriores, al inocular los ratones

LL/2-H12 con DT, la masa tumoral disminuyó de forma significativa, no presentando diferencias con los ratones inoculados con LL/2-WT (Figura 64 B).

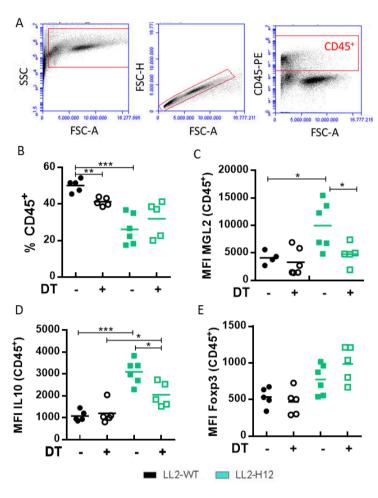


Figura 65 - Análisis de las células CD45⁺ en microambiente tumoral de ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Al día -1 y cada 2-3 días los ratones fueron inoculados i.p. con tóxina diftérica (DT) o PBS. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados para marcar las células con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos, A- Estrategia de gating B-Porcentaje de células CD45+. C- Expresión de MGL2 en células CD45+ D- Expresión de IL-10 en células CD45⁺. E- Expresión de Foxp3 en células CD45+. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 y ****p<0,0001 según el test estadístico one-way ANOVA.

Al iqual que en los experimentos anteriores, se evaluó la respuesta nivel inmune del infiltrado tumoral, y las células provenientes de la disgregación del tumor fueron analizadas citometría de flujo. analizó el porcentaje de células CD45⁺ infiltradas, observándose que diferencia encontrada anteriormente entre los ratones LL/2-WT y LL/2-H12 se mantuvo en los ratones transgénicos MGL2-DTR (Figura 65 B). Sin embargo, al inocular los ratones LL/2-H12 con DT, porcentaje el de células CD45⁺ el microambiente tumoral no se modificó (Figura 65 B). Sorprendentemente, ratones inoculados LL/2-WT y DT presentaron

una leve pero significativa disminución en el porcentaje de células CD45⁺ infiltradas en el tumor, al comparar con los ratones inoculados con LL/2-WT-PBS (Figura 65 B). Por otro lado, se evaluó la expresión de MGL2 en las células CD45⁺. Al igual que lo observado anteriormente, las células CD45+ de los tumores derivados de los ratones inoculados con LL/2-H12 y PBS expresaron mayores niveles de MGL2 que las células CD45⁺ presentes en los tumores derivados de las LL/2-WT y PBS (Figura 65 C). Además, dicho porcentaje disminuyó de forma significativa al inyectar DT en los

animales inoculados con LL/2-H12 (Figura 65 C), siendo coherente con la depleción de células MGL2+. A su vez, se evaluó la expresión de IL-10 y FoxP3 en las células CD45⁺. En cuanto a la expresión de IL-10, se observó que las células CD45⁺ provenientes de los ratones inoculados con LL/2-H12 y PBS expresaron mayores niveles de esta citoquina que los provenientes de ratones inyectados con LL/2-WT y PBS, y que la misma disminuyó significativamente al depletar las células MGL2⁺ en los ratones con tumores LL/2-H12 (DT) (Figura 65 D). Por otra parte, no se encontraron diferencias en la expresión de Foxp3 entre ninguno de los grupos (Figura 65 E).

En cuanto a las células mieloides presentadoras de antígeno en este modelo (CD11c⁺ F4/80⁺), se observó un aumento en el porcentaje de dichas células en los ratones con tumores derivados de LL/2-H12 e inoculados con PBS comparado con los derivados de LL/2-WT (PBS), como ya se había observado en el experimento anterior (Figura 66 B). Sin embargo, la inoculación de DT no llevó a cambios significativos en los niveles de estas células para ninguna de las líneas estudiadas (Figura 66 B). Por otro lado, la expresión de MGL2 en estas células no arrojó resultados significativos entre los grupos, aunque se observó una tendencia al aumento en la expresión de MGL2 en estas células presentes en tumores derivados de células LL/2-H12 e inoculados con PBS (Figura 66 C).

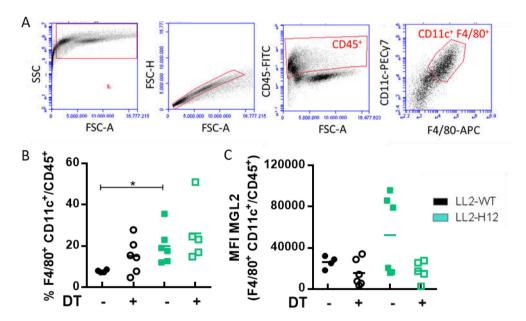


Figura 66 - Análisis de las células mieloides presentadoras de antígeno en microambiente tumoral de ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Al día -1 y cada 2-3 días los ratones fueron inoculados i.p. con tóxina diftérica (DT) o PBS. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados para marcar las células con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos, A- Estrategia de gating. B- Porcentaje de células F4/80+CD11c+/CD45+. C- Expresión de MGL2 en células F4/80+CD11c+/CD45+. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, según el test estadístico one-way ANOVA.

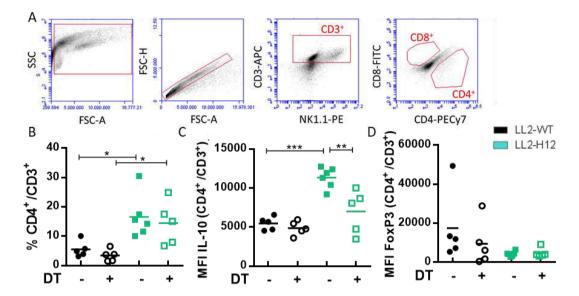


Figura 67 - Análisis de las T CD4* en microambiente tumoral de ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Al día -1 y cada 2-3 días los ratones fueron inoculados i.p. con tóxina diftérica (DT) o PBS. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados para marcar las células con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos, **A-** Estrategia de gating. **B-** Porcentaje de células CD4*/CD3*. **C-** Expresión de IL-10 en células CD4*/CD3*. **D-** Expresión de FoxP3 en células CD4*/CD3*. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 según el test estadístico one-way ANOVA.

Por otro lado, se evaluó el infiltrado linfocitario en los tumores. Se observó un mayor porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en los tumores de ratones inoculados con las células LL/2-H12 y este aumento no se vio afectado por la inoculación de DT (Figura 67 B). Sin embargo, la expresión de IL-10 solo aumentó en los linfocitos T CD4⁺ presentes en tumores de ratones inoculados con LL/2-H12 y PBS y no en aquellos de ratones inyectados con LL/2H12 y DT, donde se abroga al depletar las células MGL2⁺ (Figura 67 C). Por otro lado, no se observaron diferencias en la expresión de FoxP3 en las células CD4⁺ entre los grupos (Figura 67 D).

De la misma forma, se analizaron las células T CD8⁺ infiltrantes. En cuanto al porcentaje de las mismas, se observó el mismo patrón que para las células CD4⁺, detectándose un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ presentes en tumores provenientes de ratones inoculados con LL/2-H12 y PBS comparado con los inyectados con LL/2-WT y PBS (Figura 68 B). Este aumento no se perdió al depletar las células MGL2⁺ de los ratones inyectados con LL/2-H12 (Figura 68 B). Inesperadamente, se observó una disminución en el porcentaje de células T CD8⁺ en el microambiente tumoral de ratones inyectados con LL/2-WT y DT comparado con los inoculados con LL/2-WTy PBS (Figura 68 B). Por otro lado, también se analizó la expresión de IL-10 (Figura 68 C) y FoxP3 (Figura 68 D) en estas células. Al igual que lo observado para las células CD4⁺, los tumores provenientes de ratones inoculados

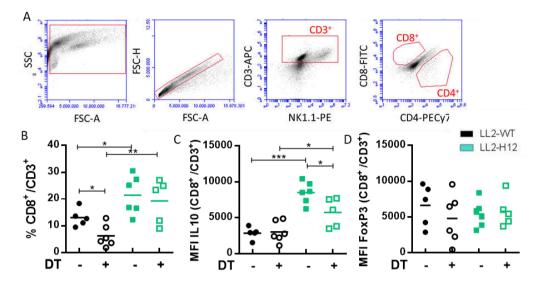


Figura 68 - Análisis de las T CD8+ en microambiente tumoral de ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Al día -1 y cada 2-3 días los ratones fueron inoculados i.p. con tóxina diftérica (DT) o PBS. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados para marcar las células con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos, A- Estrategia de gating. B- Porcentaje de células CD8+/CD3+. C- Expresión de IL-10 en células CD8+/CD3+. D- Expresión de FoxP3 en células CD8+/CD3+. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 según el test estadístico one-way ANOVA.

con LL/2-H12 y PBS presentaron un aumento en la expresión de IL-10 en las células CD8⁺ al comparar con los tumores derivados de LL/2-WT y PBS, y este aumento se abolió al depletar las células MGL2+ en los ratones inoculados con LL/2-H12 y DT (Figura 68 C). Por otra parte, no se encontraron diferencias en la expresión de Foxp3 entre los grupos (Figura 68 D).

Con respecto a las células NKT, se volvió a observar el aumento de dichas células en el microambiente tumoral de los ratones inoculados con las células LL/2-H12 y PBS comparados con los inyectados con LL/2-WT y PBS, pero no se observaron cambios en dichos porcentajes al depletar las células MGL2+ (Figura 69 B). En cuanto a la expresión de citoquinas de las células NKT, no se observaron diferencias significativas en la expresión de IL-10 e IL-4 entre los tumores derivados de LL/2-WT y LL/2-H12 ambos inoculados con PBS, ni entre aquellas provenientes de los tumores derivados de LL/2-H12 en presencia de PBS o DT (Figura 69 C y D). Sin embargo, se observó que los niveles de ambas citoquinas disminuyen al inocular los ratones con LL/2-WT en presencia de DT (Figura 69 C y D).

Por último, los bazos de los animales con tumores fueron disgregados, y los esplenocitos se cultivaron a 37°C por 3 días en ausencia (medio) o presencia de estímulos policionales (ConA o CD3/CD28). Posteriormente, se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se midió la concentración de IL-10 e IFNy por ELISA. Los

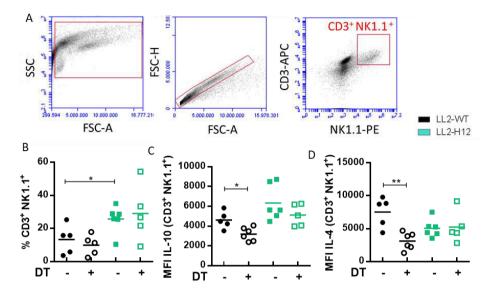


Figura 69 - Análisis de las NKT en microambiente tumoral de ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Al día -1 y cada 2-3 días los ratones fueron inoculados i.p. con tóxina diftérica (DT) o PBS. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados para marcar las células con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos, **A-** Estrategia de gating. **B-** Porcentaje de células CD3+ NK1.1+. **C-** Expresión de IL-10 en células CD3+ NK1.1+. **D-** Expresión de IL-4 en células CD3+ NK1.1+. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01 según el test estadístico one-way ANOVA.

resultados se muestran en la Figura 70 según el estímulo, y relativizados a la condición de medio de cada uno de los grupos. En cuanto a los esplenocitos estimulados con

ConA. se observó que esplenocitos de los animales inyectados con las células LL/2-H12 y PBS expresaron menores niveles de **IFNv** aue los provenientes de los inyectados con LL/2-WT y PBS (Figura 70 A). Sin embargo, está disminución no fue restaurada al depletar las células MGL2+ (Figura 70 A). De hecho, los esplenocitos provenientes de animales tratados DT con presentaron una disminución de IFNy en relación con los controles (Figura 70 A). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la concentración de IL-10 (Figura 70 A) para ninguno de los grupos estudiados.

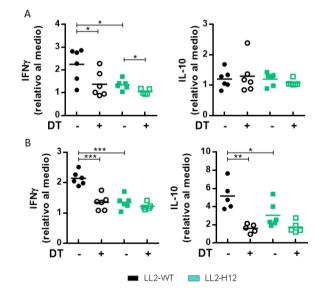


Figura 70 - Cuantificación de citoquinas en el sobrenadante de esplenocitos totales provenientes de animales con tumores. Se inocularon 200.000 células LL/2-WT o LL/2-H12 s.c. en ratones singénicos. Al día -1 y cada 2-3 días los ratones fueron inoculados i.p. con tóxina diftérica (DT) o PBS. Posterior al sacrificio del animal, los bazos fueron disgregados y se estimularon en cultivo con ConA (A) o con CD3/CD28 (B) por 3 días. Posteriormente, se midió la concentración de IFNγ o IL-10 en el sobrenadante de cultivo. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 según el test estadístico one-way ANOVA.

Resultados

Con respecto a los esplenocitos estimulados con CD3/CD28, se observó un resultado similar que para ConA en la expresión de IFNy de los animales inyectados con LL/2-WT y LL/2-H12 en presencia de PBS (Figura 70 B). No obstante, la disminución observada previamente en la producción de dicha citoquina en los animales inoculados con DT sólo fue significativa para los ratones inyectados con las células LL/2-WT (Figura 70 B). A su vez, con este estímulo se encontraron diferencias en la producción de IL-10 de los esplenocitos, siendo significativamente mayor en los ratones inoculados con LL/2-WT y PBS que en los LL/2-H12 y PBS (Figura 70 B). También se observó que la inoculación de DT llevó a menor producción de IL-10 en los ratones con tumores LL/2-WT, pero no se detectó una diferencia significativa (aunque si una tendencia) en los ratones LL/2-H12 (Figura 70 B).

En conclusión, las células MGL2⁺ parecen ser esenciales en la generación de tumores Tn⁺ de mayor tamaño con un microambiente tumoral mayormente inmunoregulador, caracterizado por la presencia de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productores de IL-10.

Objetivo 9 - Evaluación del papel de MGL2 y el antígeno Tn en la angiogénesis tumoral

Uno de los aspectos macroscópicos de los tumores formados por las células LL/2-H12 que nos resultó más llamativo fue su alto grado de vascularización en comparación a los formados por las células LL/2-WT (Figura 71 A). Por este motivo, se procedieron a hacer diversos estudios para evaluar la capacidad angiogénica de las células tumorales LL/2-H12 Tn⁺.

En primera instancia, los tumores extirpados fueron congelados para realizar cortes histológicos y analizar el grado de vascularización de los mismos. Para esto se utilizó un anticuerpo que reconoce la proteína de superficie del endotelio vascular, CD31. Las imágenes fueron tomadas por microscopia de epifluorescencia, realizando una contra tinción de los núcleos con DAPI. Como se observa en la Figura 71, los tumores provenientes de las células LL/2-H12 presentaron una mayor concentración de estructuras tubulares positivas para CD31, que corresponderían a los vasos sanguíneos (Figura 71 B). Para poder cuantificar este fenómeno, se realizó el análisis fractario de las imágenes obtenidas de la marcación de CD31. Este análisis evalúa la complejidad de la red de la marcación de CD31, y su resultado es un valor numérico denominado dimensión fractaria, que puede tomar valores entre 0 y 2. Cuanto más se acerca este valor a 2, mayor es la complejidad de la red evaluada, y en este caso en particular, mayor es el grado de vascularización de los tumores. Como se observa en

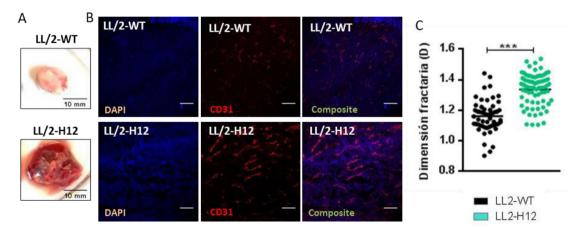


Figura 71- Vascularización de tumores de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio de los ratones, los tumores fueron congelados y se realizaron cortes histológicos de los mismos. Los cortes fueron utilizados para inmunofluorescencias con el anticuerpo anti-CD31, que se expresa en superficie endotelial. A- Imagen representativa del grado de vascularización macroscópica de los tumores post-disección. B- Imágenes tomadas del microscopio de epifluorescencia de tumores marcados con DAPI (azul) y anti-CD31 (rojo). Las barras corresponden a 200 nm. C- Análisis fractario de las imágenes tomadas de la marcación de CD31. Este análisis brinda información de la complejidad de la red, arrojando como resultado la dimensión fractaria (D). Cuanto mayor es este valor D, mayor es la complejidad de la red analizada, en este caso la red del endotelio vascular evidenciada por la marcación de CD31. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa**** p<0.001 según el test estadístico one-way ANOVA.

la gráfica, los tumores provenientes de LL/2-H12 presentaron valores de D significativamente mayores que los tumores LL/2-WT (Figura 71 C).

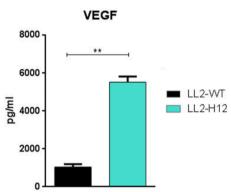


Figura 72 - Cuantificación de VEGF en medio condicionado de cultivo de las células LL/2-WT y LL/2-H12 por ELISA. Se plaquearon las células en medio sin FBS por 18 horas y se midió por ELISA la concentración de VEGF secretado por las células. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa **p<0.01 según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras indican el error estándar de la media (SEM).

Posteriormente, se evaluó si la diferencia en el grado de vascularización de los tumores podría relacionarse con la presencia de determinadas moléculas pro- angiogénicas, como el VEGF y PDGF. En primer lugar, se evaluó la capacidad de las células tumorales en secretar VEGF, midiendo la concentración del mismo en medios condicionados de cultivo de las células *in vitro*. Como se observa en la Figura 72, se detectó un aumento de hasta 5 veces en el nivel de VEGF presente en el medio condicionado de las células LL/2-H12 en relación con de LL/2-WT (Figura 72). En segundo lugar, se evaluó la presencia de VEGF y PDGF en medios de disgregación de

los tumores del modelo de crecimiento tumoral en ratones MGL2-DTR por ELISA. Como se observa en la Figura 73, los tumores provenientes de ratones inoculados con las células Tn⁺ LL/2-H12 presentaron un aumento significativo en los niveles de VEGF en el medio tumoral al comparar con aquellos derivados de ratones inoculados con las células LL/2-WT, y esta diferencia significativa se abolió al depletar las células MGL2⁺

(Figura 73 A). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de PDGF entre los grupos (Figura 73 B).

Para determinar si la diferencia observada en los niveles de VEGF presentes en tumores de los ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12 se debía a un

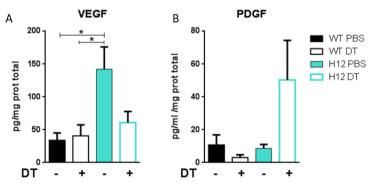


Figura 73 - Cuantificación de VEGF y PDGF en medio de disgregación de tumores de ratones MGL2-DTR inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos Al día -1 y cada 2-3 días los ratones fueron inoculados i.p. con tóxina diftérica (DT) o PBS. Posterior al sacrificio del animal, los tumores fueron disgregados y el medio de disgregación se colectó para medir la concentración de VEGF (A) y PDGF (B) por ELISA. Los asteriscos indican cuando hay diferencia significativa: *p<0.05, según el test estadístico one-way ANOVA. Las barras indican el error estándar de la media (SEM).

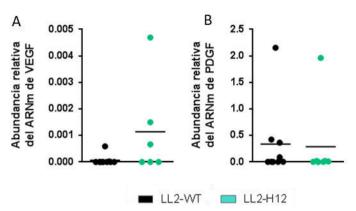


Figura 74 - Análisis de expresión génica de VEGF y PDGF en el microambiente tumoral de ratones inoculados con las células LL/2-WT y LL/2-H12. Se inocularon 200.000 células s.c. en ratones singénicos. Posterior al sacrificio del animal, se extrajo el ARN total de los tumores. El ARN se retro-transcribió a ADNc y este fue utilizado como molde para realizar las qRT-PCR. En las gráficas se muestra la abundancia de VEGF (A) y PDGF (B) relativizada al gen housekeeping GAPDH según el test estadístico one-way ANOVA.

aumento en la expresión génica de dichas moléculas, se evaluaron los niveles de ARNm del ARN total de los tumores. No se encontraron diferencias significativas en niveles del ARNm de VEGF o PDGF entre los tumores generados con las células LL/2-WT y LL/2-H12 (Figura 74), indicando que la

diferencia podría radicar en la capacidad de las células en secretar mayores niveles de VEGF y no en su expresión génica.

En conclusión, los tumores Tn+ generados con las células LL/2-H12 presentaron un mayor grado de vascularización, acompañado por un aumento en la secreción de VEGF, en un proceso que depende de la presencia de células MGL2⁺.

Objetivo 10 - Análisis de la relevancia de los resultados encontrados en el modelo murino en cohortes de pacientes con adenocarcinomas

Para evaluar la relevancia médica de los resultados obtenidos en este trabajo en el modelo murino, utilizamos bases de datos de pacientes humanos con adenocarcinomas (Figura 75).

En primera instancia, evaluamos la correlación entre la expresión génica de diversas moléculas que se encontraron aumentadas en el modelo murino y la expresión del receptor MGL humano en tumores de adenocarcinoma de pulmón. En la Figura X se muestran los principales resultados obtenidos. Se encontró una correlación positiva entre la expresión de MGL con PECAM1 (CD31), IL-10 y su receptor IL10RA, CD8a, ITGAX (CD11c) y CD4. En cuanto a VEGFA, no se encontró correlación con la expresión de MGL (Figura 75 A). Por otro lado, se analizó la sobrevida de los pacientes (Figura 75 B) y el tiempo libre de enfermedad (Figura 75 C) según la expresión de MGL y los 6 genes con los cuales se encontró una correlación positiva con MGL. Sin embargo, en adenocarcinoma de pulmón, la alta expresión de estos genes no estuvo

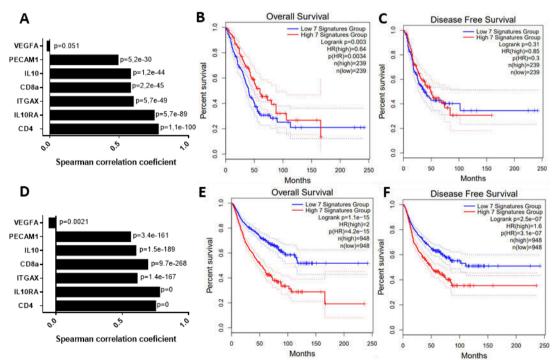


Figura 75 - Análisis bioinformático con el software GEPIA2 en cohortes de pacientes humanos. A-Análisis de correlación en la expresión génica de MGL con VEGFa, CD4, CD8a, IL-10, IL-10R, ITGAX (CD11c) y PECAM-1 (CD31) en adenocarcinomas de pulmón en humanos. B y C- Sobrevida (B) y tiempo libre de enfermedad (C) de pacientes con adenocarcinoma de pulmón, clasificados según la alta o baja expresión de los genes analizados. D- Análisis de correlación en la expresión génica de MGL con VEGFA, CD4, CD8a, IL-10, IL-10R, ITGAX (CD11c) y PECAM-1 (CD31) en adenocarcinomas de pulmón, colon, páncreas, próstata y estómago en humanos. E y F- Sobrevida (E) y tiempo libre de enfermedad (F) de pacientes con adenocarcinoma de pulmón colon, páncreas, próstata y estómago en humanos, clasificados según la alta o baja expresión de los genes analizados.

relacionada con cambios en la sobrevida o en el tiempo libre de enfermedad en la cohorte de estudio (Figura 75 B y C).

Para ampliar el análisis a pacientes con otros tipos de adenocarcinomas, incluyendo al de pulmón, se agregaron al estudio bases de datos de pacientes con adenocarcinoma de estómago, páncreas, colon y próstata. En esta cohorte, los resultados de correlación entre las moléculas estudiadas y MGL fueron similares a los encontrados en pulmón, observándose una correlación positiva en la expresión de las moléculas mencionadas y MGL (Figura 75 D). Con respecto a la sobrevida y el tiempo libre de enfermedad, se pudo observar que la alta expresión de los genes estudiados lleva a una disminución significativa de la sobrevida (Figura 75 E) y en el tiempo libre de enfermedad (Figura 75 F) en pacientes con adenocarcinoma.

En conclusión, se observó que los genes que expresan proteínas que se vieron aumentadas en el modelo murino LL/2 Tn+ están correlacionadas con la expresión de MGL, y su expresión en conjunto se relaciona con una menor sobrevida y menor tiempo libre de enfermedad en pacientes con diferentes tipos de adenocarcinomas.

Discusión y Perspectivas

La glicosilación aberrante es una característica distintiva de la transformación maligna, que desencadena la aparición de TACAs en la superficie de la célula tumoral¹⁵⁹. De hecho, la expresión del antígeno Tn en pacientes con cáncer está asociado con una menor sobrevida, menor tiempo libre de enfermedad y una mayor capacidad metastásica¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Sin embargo, la función del antígeno Tn en evadir la respuesta inmune o participar en el proceso de angiogénesis no está aún estudiado. En este trabajo, se planteó como objetivo evaluar las propiedades inmunomoduladoras y angiogénicas del antígeno Tn durante el crecimiento tumoral en un modelo murino in vivo. Se encontró que los tumores Tn⁺ presentan un crecimiento acelerado, con un infiltrado inmunológico caracterizado por la presencia de células MGL2+ y linfocitos T que expresan IL-10. A su vez, se determinó que el receptor MGL2 participa en el reconocimiento de las células tumorales Tn⁺ y que las células que expresan este receptor secretan IL-10 y son necesarias para la presencia de linfocitos T productores de IL-10 en el microambiente tumoral. Es importante destacar que cuando se inició este proyecto, no había trabajos publicados en los cuales se demostrara el papel de Tn en el desarrollo tumoral y la respuesta inmunológica asociada al tumor. Sin embargo, en el corriente año se publicaron dos trabajos que estudian las implicancias de Tn en el desarrollo de cáncer colorrectal y en glioblastoma en modelos murino 162,163. En el modelo de cáncer colorrectal, se encontró que las células Tn⁺ presentan un crecimiento tumoral acelerado al inocularlas en ratones singénicos, y una respuesta inmune caracterizada por un menor infiltrado CD8163. Sin embargo, tanto las diferencias en el crecimiento tumoral como en la caracterización inmunológica de las poblaciones presentes en el microambiente tumoral con respecto a la célula parental fueron muy tenues¹⁶³. Por otro lado, en el modelo de glioblastoma se encontró que la sobreexpresión de Tn se asocia con un aumento de la frecuencia de macrófagos inmunosupresores PD-L1⁺ en el microambiente tumoral¹⁶². No obstante, en estos trabajos no se realizó un análisis exhaustivo de la glicosilación de las células generadas, ni se estudió la participación de las células MGL2⁺ en los procesos inmunológicos o de angiogénesis. A su vez, en el primer trabajo tampoco se verificó la expresión del antígeno Tn in vivo. En relación con este punto, cabe destacar que no es menor, ya que, en nuestro caso, no pudimos detectar una expresión significativa del antígeno Tn en tumores generados a partir de células Tn⁺ LL/2F9. Este punto se desarrollará más adelante.

Para abordar los objetivos planteados en este trabajo, generamos dos variantes de células de cáncer de pulmón de ratón (LL/2) que sobre-expresan el antígeno Tn (LL/2-H12 y LL/2-F9). Un análisis de la literatura muestra que, al contrario de lo que sucede

en humanos, no existen líneas celulares murinas de cáncer que generen tumores sólidos y que expresen el antígeno Tn. De hecho, estudios realizados muy recientemente para evaluar el papel de Tn en el crecimiento tumoral fueron realizados con células humanas implantadas en ratones inmunodeprimidos, lo cual inhabilita el estudio de la respuesta inmune¹³⁰. Sin embargo, la estrategia que abordamos nos permitió evaluar el rol de Tn comparando el crecimiento y el microambiente tumoral con la de la contraparte LL/2-WT, entre otras propiedades. Por otro lado, caracterizamos las células generadas, tanto en el aspecto glicobiológico, como en sus propiedades de crecimiento e invasión in vitro. A su vez, evaluamos el crecimiento tumoral al inyectarlas en ratones singénicos, comparándola con la línea parental WT y analizamos la respuesta inmunológica en los animales en el microambiente tumoral y en los órganos linfoides asociados. Finalmente, estudiamos las propiedades angiogénicas de las células generadas. A continuación, realizamos un análisis crítico de los resultados obtenidos, presentado en diferentes secciones para facilitar su comprensión.

Caracterización glicobiológica de las variantes celulares generadas

A diferencia de la generación de células con cambios en la expresión de una proteína, en las cuales generalmente la estrategia de desarrollo se basa en la alteración de la expresión génica directa del blanco molecular a estudiar, la generación de células con estructuras glicosídicas aberrantes involucra alterar glicosiltransferasas, glicohidrolasas, chaperonas transportadores. todos involucrados en su vía de síntesis. Esto se traduce en un nivel de complejidad mayor, ya que es necesario encontrar blancos moleculares que al sobre-expresar, mutar o silenciar, desencadenen en la formación de la estructura de estudio con el menor número de efectos secundarios posibles. A su vez, las vías de glicosilación afectan una gran variedad de moléculas, por lo cual las consecuencias de la alteración en la glicosilación pueden traducirse en una variedad de efectos mediados por las mismas, ya sea intrínsecamente o a partir de lectinas.

La estrategia seleccionada para la generación de las células que expresan el antígeno Tn fue el truncamiento de la formación de *core* 1 a partir de Tn, generando células *knock out* para la chaperona Cosmc. Como se mencionó anteriormente, esta chaperona es esencial para el correcto plegado y generación de la forma activa de la enzima T-sintasa, y mutaciones en la misma se han vinculado con el desarrollo neoplásico⁵³. Esto otorga la ventaja de que la estrategia utilizada para la obtención de

células Tn⁺ mimetiza el mecanismo principal por el cual se observa la sobre-expresión de este antígeno en células tumorales de pacientes. Sin embargo, la elongación de Tn hacia *core* 1 no es la única vía en el proceso de O-glicosilación como se muestra en la Figura 4. También puede ocurrir la elongación hacia *core* 3 o hacia sTn, por lo cual la mutación en Cosmo no necesariamente genera la sobreexpresión de Tn. Por este motivo, se decidió hacer un análisis exhaustivo de los glicanos presentes en las células generadas.

En este trabajo, se obtuvieron dos variantes celulares Tn⁺, LL/2-H12 y LL/2-F9. Mientras que las LL/2-H12 provienen de un enriquecimiento de células Tn⁺ policionales, las células LL/2-F9 corresponden a un clon celular obtenido a partir de la clasificación de una única célula. Esto es un aspecto a tener en cuenta a la hora del análisis de los resultados obtenidos, ya que por un lado se obtuvieron células homogéneas (LL/2-F9) y, por otro lado, células heterogéneas (LL/2-H12).

Para confirmar la expresión de Tn se utilizaron varias estrategias experimentales. Por un lado, se estudió el reconocimiento de las células Tn⁺ y WT por parte de diversos anticuerpos monoclonales y lectinas específicas de GalNAc y con mayor afinidad por el antígeno Tn (VVL), confirmando un aumento en la expresión de este antígeno. Por otro lado, ninguna de estas líneas presentó actividad T-sintasa, lo que confirma que la expresión de Tn se debe, como era de esperarse, a alteraciones en la funcionalidad de esta enzima. Sin embargo, al utilizar las lectinas SBA y DBA, que reconocen GalNAc terminal, no se observó un aumento en el reconocimiento de las células Tn⁺, poniendo de manifiesto la relevancia de la composición y densidad de glicoepitopes presentes en el contexto de la superficie celular ante la interpretación de los datos. SBA se ha demostrado altamente dependiente de la longitud de las mucinas y dominios tipo mucina que presentan el antígeno Tn, modulando su afinidad 138. Además, la misma también reconoce galactosa, y por lo tanto la unión que estamos observando puede deberse al reconocimiento de GalNAc y galactosa, no permitiendo al evaluar toda la superficie celular detectar diferencias entre líneas. Por otro lado, por más que la lectina DBA está reportada por reconocer únicamente GalNAc, estudios anteriores demuestran que los sitios de unión de esta lectina no son los mismos que los que reconoce la lectina HPA^{164,165}, lo que podría indicar que la especificidad de unión esta mediada por estructuras diferentes a las que se une HPA, que aún no han sido elucidadas detalladamente. A su vez, DBA reconoce el grupo sanguíneo A, por lo que reconoce GalNAc terminal más específicamente en esta forma 165. El análisis específico de las glicoproteínas que presentan Tn como consecuencia de la mutación de Cosmo permitirá evaluar estos resultados de manera más precisa.

En este sentido, durante la realización de esta Tesis se estableció la colaboración con el grupo de la Dra. Mariana Barboza-Gardner (Departamento de Química/ Departamento de Anatomía, Fisiología y Biología Celular, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de California Davis, EE. UU.) quien es especialista en caracterización sitio específica de N- y O-glicanos por espectrometría de masa. La estrategia planteada proponía identificar glicoproteínas expresando Tn en las líneas celulares y más específicamente, analizar los ligandos de MGL2 obtenidos por cromatografía de afinidad. Debido a la situación de pandemia por Covid-19, no se pudo realizar el análisis, y en ese sentido, el análisis por espectrometría de masa de los Oglicanos presentes en las muestras, así como la identificación de las glicoproteínas con ligandos para MGL es una de las perspectivas a futuro de este trabajo. Los métodos analíticos utilizados como alternativa por cromatografía HILIC-FLR o análisis de monosacáridos lamentablemente no fueron suficientes para el nivel de análisis requerido. Esto puede deberse a la reacción de beta-eliminación que se utiliza para liberar los glicanos tiene una reacción de naturaleza química similar que los degrada (peeling). La imposibilidad de contar con espectrometría de masas para la identificación (lo que permitiría realizar la liberación y reducción de los glicanos, protegiéndolos del peeling) hizo que la caracterización cromatográfica, por HILIC o fase reversa para monosacáridos se viera comprometida en su sensibilidad. Finalmente, los estudios realizados indican la presencia de O-glicanos tipo core 3 en LL/2 WT, y un leve aumento en las células donde Cosmc fue mutada. La presencia de core 3 y su funcionalidad en estas células de adenocarcinoma de pulmón queda pendiente.

En trabajos anteriores, se ha visto que la generación de células de cáncer gástrico $knock\ out$ para Cosmc lleva al expresión de tanto el antígeno Tn como sTn 166 . Sin embargo, en este trabajo, no encontramos resultados que nos lleven a pensar que este mecanismo de sialilacíon se produce. Los resultados de qRT-PCR demuestran que las ST6GalNAcs responsables de la biosíntesis de sTn no están alteradas, salvo ST6GalNAc6, la que en realidad disminuye, no aumenta. Se intentó hacer este estudio con el anticuerpo B72-3, que reconoce sTn, obteniendo un resultado negativo, pero la ausencia de un control positivo adecuado no permitió validar este resultado. Finalmente, y al evaluar sialilación $\alpha(2,6)$ de manera indirecta y por glicofenotipo, se sabe que SNA reconoce, entre otros, al antígeno sTn, y no encontramos un aumento

de la reactividad de la misma, disminuyendo en las células LL/2-H12 y manteniéndose igual en las células LL/2-F9, lo que estaría indicando que no hay un aumento en estructuras sialiladas en $\alpha(2-6)$.

Considerando la alta complejidad del proceso de glicosilación, la gran cantidad de moléculas que participan del mismo así como la diversidad de posibles mecanismos compensatorios, la alteración de una de las vías de este proceso puede desencadenar cambios inespecíficos. A nivel general, uno de los aspectos más evidentes de los resultados del análisis de la glicosilación de las variantes celulares generadas fue que, además de encontrar expresión de Tn, se observaron variaciones en el glicofenotipo asociados a los N-glicanos. Particularmente, en las células LL/2-H12 se observó un aumento de los N-glicanos de alta manosa (evidenciado tanto por la reactividad de ConA como por métodos analíticos) así como una disminución en la presencia de Nglicanos sialilados, que se evidenció con la unión de SNA y por métodos analíticos. Por otro lado, determinamos un aumento en residuos galactosilados en las células LL/2-H12, evidenciado por la unión de ECA y PNA, y que se confirmó que provenían de N-glicanos por la reducción en su afinidad al tratar las células con PNGasa-F. Por último, las células LL/2-F9, mantienen el aumento en la presencia de N-glicanos de alta manosa, observado por la reactividad de ConA, quedando pendiente la confirmación por técnicas analíticas.

En nuestra hipótesis inicial al comenzar este trabajo, no estaba previsto que las células generaran cambios en sus N-glicanos, sino que esperábamos observar únicamente modificaciones a nivel de los O-glicanos. Este resultado puede ser producto de varios mecanismos o procesos biológicos alternativos. En el caso de las diferencias basadas en glicofenotipo, no debe descartarse el efecto estérico de los O-glicanos y su influencia en el acceso de las lectinas a su sitio de reconocimiento. Al truncar el proceso de O-glicosilación, se podrían exponer N-glicanos que no se encontraban accesibles para que se uniera la lectina en la superficie celular. Este efecto ya fue observado previamente, en un estudio de la contribución de los diferentes glicoconjugados a la adhesión endotelial, en el cual la marcación con un anticuerpo específico para el antígeno Le^x, que se encuentra principalmente en N-glicanos y glicoesfingolípidos, aumenta significativamente al depletar los O-glicanos, lo que indica que los mismos estarían enmascarando este epitope⁵⁴.

Por otro lado, dada la naturaleza altamente compleja y dinámica del proceso de glicosilación, no resulta insólito pensar que exista algún tipo de mecanismo compensatorio frente a la alteración de alguna de sus vías. Resulta importante tomar

a consideración, que tanto el proceso de N- como de O-glicosilación, utilizan azúcares nucleótido en común para su síntesis, y que el truncamiento de O-glicanos podría cambiar el nivel de los mismos disponibles para la N-glicosilación, alterando la misma como consecuencia de la diferencia en sustratos para su biosíntesis.

Por último, también podría deberse a que el truncamiento en la elongación de Tn influya de manera inespecífica sobre la actividad de las enzimas involucradas en la Nglicosilación. Al alterarse la O-glicosilación, podrían modificarse vías de señalización que alteren la actividad de estas enzimas de manera indirecta. Por ejemplo, se observó recientemente en células de cáncer gástrico, que al afectar la O-glicosilación, se altera el transcriptoma de la célula, y esto influenció en diversas vías en procesos de homeostasis y oncogénicos, incluyendo moléculas de señalización y de adhesión celular¹⁶⁷. Sin embargo, en otros trabajos en células ES de observó que la deleción de Cosmo no afecta los N-glicanos presentes en la superficie celular, tanto por unión de lectinas vegetales como por espectrometría de masas¹⁶⁸. lo que podría indicar que los efectos en las mutaciones de Cosmc son dependientes del tipo celular.

Finalmente, no se descarta que estas modificaciones sean producto de mutaciones no específicas en el proceso de edición génica por CRISPR/Cas9. De hecho, se ha descrito que esta estrategia puede dar lugar a alteraciones no deseadas por mutaciones en sitios off-target 169,170.

En cuanto a las diferencias observadas entre las células LL/2-H12 y LL/2-F9, resulta interesante considerar como la misma estrategia para la expresión de Tn sobre la misma línea celular lleva a la generación de variantes celulares, que, aunque ambas Tn⁺, presenten alteraciones diferentes en otras estructuras. Esto podría deberse a los efectos off target mencionados anteriormente, que afecten de forma diferente a las células H12 que a las F9. Por otro lado, mientras que dentro de las F9 se tiene un pool de células genéticamente iguales, dentro de la población H12 existen células diversas, y el glicoma estudiado es el resultado de la sumatoria de los cambios de los subclones que componen a esta población, por lo cual el perfil de glicosilación o el glicofenotipo observado corresponde a un pool celular, y, en consecuencia, a un perfil dependiente de la composición del mismo.

En este sentido, y mirando los efectos globales de los cambios observados, es importante destacar que las diferencias encontradas entre las células Tn⁺ y las WT, podrían generar cambios en ciertos aspectos biológicos de relevancia como las propiedades adhesivas 167 y de señalización por parte de receptores lectina en células inmunes^{104,106,171}. Por otro lado, otro aspecto a considerar es el cambio en la expresión génica de variedad de proteínas que podría presentarse en las células Tn⁺ seleccionadas. De hecho, estudios previos han demostrado que la alteración de los procesos de glicosilación resulta en cambios significativos en el transcriptoma de las células^{163,167}. Este aspecto no ha sido abordado en nuestro trabajo. Por lo tanto, el estudio del papel del antígeno Tn o de las células que lo pueden reconocer es fundamental para determinar si están o no mediando dichos procesos.

Estudio de las características tumorales in vivo

Otro de los grandes objetivos de este trabajo fue evaluar el papel de Tn durante la progresión tumoral. Para comenzar el análisis, se centrará en los resultados observados con las células LL/2-H12, para luego focalizarse en lo hallazgos para las células LL/2-F9.

Comenzando por el crecimiento tumoral observado en los ratones inoculados con las células LL/2-H12, este se encuentra significativamente aumentado en comparación con su contraparte LL/2-WT, y las células tumorales provenientes de la disgregación de estos tumores expresan niveles altos de Tn. Este dato es sumamente relevante, ya que indica que la expresión de Tn en las células LL/2-H12 se mantiene en niveles elevados, incluso durante el crecimiento *in vivo*.

En este punto es importante destacar que la capacidad de las células LL/2-H12 en generar *in vivo* tumores más grandes a los de las células LL/2-WT no se debería en principio a características relacionadas con la proliferación o migración celular, ya que estos aspectos, evaluados *in vitro*, resultaron ser similares en ambos tipos de células. Sin embargo, observamos un aumento en la capacidad invasiva de las células LL/2-H12 en relación a las LL/2-WT, la cual no se debió a un aumento en la actividad de metaloproteasas, en contraposición a estudios anteriores⁶⁵. Sin embargo, no pudimos evaluar la capacidad metastásica (como indicador de invasividad *in vivo*) ya que el modelo celular elegido posee poca capacidad metastásica¹³¹. En este sentido, intentamos utilizar un modelo metastásico a través de la inoculación de las células por vía intravenosa, sin obtener metástasis pulmonares. Queda entonces planteada la posibilidad de seguir trabajando en este modelo como perspectiva para determinar si el antígeno Tn aumenta la capacidad metastásica de las células tumorales.

Por otro lado, es importante destacar que el aumento del crecimiento tumoral observado para las células Tn+ podría deberse a cambios en las células, moléculas o estímulos presentes en el microambiente tumoral, y no únicamente a la célula tumoral propiamente dicha. De aquí surge la importancia del estudio del sistema inmune en el microambiente tumoral y de la angiogénesis.

Uno de los objetivos de este trabajo fue el estudio de la respuesta inmunológica. tanto local como sistémica, en ratones con tumores generados por la inoculación de células Tn⁺, al comparar con ratones inoculados con las células LL/2-WT. Como se mencionó anteriormente, el posible rol inmunoregulador del antígeno Tn ha sido estudiado únicamente in vitro. En este sentido, se ha visto que el antígeno Tn modifica la activación de células dendríticas induciendo un aumento en la expresión de IL-10 y TNFα¹⁰⁶ y una polarización de linfocitos T CD4⁺ a un fenotipo regulador productor de IL-10¹⁰⁷, en un proceso mediado por la interacción con el receptor MGL. A su vez, las células presentadoras de antígeno que expresan el receptor MGL quedan retenidas en el sitio de interacción y no migran a los órganos linfoides 172, y alteran su metabolismo¹⁰⁴.

En aspectos generales, los tumores LL/2-H12 se caracterizaron por presentar diversas diferencias en su infiltrado tumoral leucocitario, aunque no se encontraron grandes cambios en la respuesta inmune en bazo o en los órganos drenantes. Los tumores generados por las células LL/2-H12 presentaron un menor infiltrado leucocitario. Esto podría estar relacionado con que, como se vio anteriormente, la unión del receptor MGL de células dendríticas a su ligando, GalNAc, lleva a la retención de dichas células en el sitio de interacción 172. Esto podría impedir la migración de estas células a los órganos linfoides para una correcta activación del sistema inmunológico. De esta forma, aunque hay un aumento en el porcentaje de células MGL2⁺ retenidas en el tumor, se observa una diminución en el número de células CD45+ infiltrantes al mismo. Para elucidar esta interrogante, se podría generar ratones cuyas células presentadoras de antígeno al activarse, expresen algún marcador de seguimiento, como GFP, y evaluar la presencia de células GFP+ en órganos linfoides drenantes a diferentes tiempos post-inoculación de la célula tumoral. Este diseño sería análogo a los ratones Foxp3^{GFP+}, que expresan GFP en los linfocitos T Foxp3^{+ 173}.

Analizando el infiltrado CD45⁺, y evaluando las diversas poblaciones inmunológicas que comprenden al mismo, se puede concluir que los tumores de LL/2-H12 presentan un mayor porcentaje de células presentadoras de antígeno que expresan el receptor MGL2 infiltrantes en el tumor, y que a su vez estas células expresan altos niveles de IL-10, lo que sugiere un rol inmunoregulador de las mismas.

In vitro, se observó que los factores secretados por las células LL/2-H12 en cultivo son capaces de inducir un fenotipo regulador en BMDC, aumentando fundamentalmente la expresión de IL-10 y disminuyendo el índice IL-12/IL-10 secretada. Por otro lado, los componentes secretados en el contexto tumoral generan esencialmente diferencias a nivel del perfil de activación de las DC, ya que las mismas disminuyen la expresión de moléculas de co-estimulación y aumentan la expresión de MGL2, lo que podría explicar el mayor aumento de células MGL2⁺ en el microambiente tumoral. Estas diferencias podrían deberse a que los componentes secretados por la célula en cultivo sean diferentes a los que secreta en un contexto tumoral. A su vez, dentro del sobrenadante de disgregación del tumor, no solo vamos a tener los componentes secretados por la célula tumoral, sino también moléculas secretadas por las células inmunes infiltrantes.

Por otro lado, *in vivo* también se observó un fenotipo regulador a nivel del sistema inmune adaptativo: presencia de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en el microambiente tumoral, con una mayor expresión de IL-10.

Las BMDC condicionadas *in vitro* con factores solubles de células LL/2-H12 presentaron diferente capacidad estimuladora en un MLR y diferente expresión de moléculas co-estimuladoras, lo que podría explicar el aumento de linfocitos T reguladores en los tumores Tn⁺ productores de IL-10. Estas células a su vez indujeron una menor secreción de IFNγ de los linfocitos T activados *in vitro*, lo que confirma que las células LL/2-H12 secretan componentes que alteran el perfil de activación de la respuesta inmunológica de forma diferente a los secretados por las células LL/2-WT. Para poder determinar si estos hallazgos se deben al rol de glicoproteínas secretadas por las células tumorales que expresan el antígeno Tn, se podrían realizar estos experimentos incorporando un anticuerpo bloqueante para Tn o un inhibidor de MGL2, como GalNAc y evaluar si el fenotipo de las BMDC o su capacidad de polarizar los linfocitos T a fenotipos reguladores se ve alterada.

Otro aspecto que podría estar vinculado con la presencia de linfocitos T productores de IL-10 es la expresión aumentada (aunque no significada) de moléculas como PD-L1, ICOS, $TGF\beta$ y Foxp3, lo que sugiere un ambiente inmunoregulador y propicio para la diferenciación de linfocitos T reguladores.

Considerando el aumento en el porcentaje de células MGL2⁺ en el microambiente tumoral y el aumento en la expresión de este receptor en las BMDC, evaluamos si las células Tn⁺ podían ser reconocidas de forma diferencial por este receptor *in vitro*. Tanto las células LL/2-H12 como lisados proteicos provenientes de las mismas, son mayormente reconocidas por MGL2 que sus contrapartes de LL/2-WT, y esta unión es inhibida tanto por el anticuerpo 83D4 (observado por citometría de flujo) y por la lectina VVL (observado por western blot). Esto indica que la unión de MGL2 esta mediada principalmente por Tn, ya que tanto el 83D4 como VVL tienen una alta especificidad por el mismo. A su vez, células que expresan el receptor en su superficie interactúan con las células LL/2-H12, lo que fortalece la hipótesis de que MGL2 está reconociendo a Tn *in vivo* durante el crecimiento tumoral.

En un modelo de depleción de las células MGL2⁺ *in vivo*, la expresión de IL-10 en las células T resultó ser dependiente de las células MGL2⁺, ya que al depletarlas, dicha diferencia se pierde. Estos resultados sugieren que lo observado en experimentos *in vitro* en trabajos anteriores se reproduce parcialmente *in vivo* durante el crecimiento tumoral, por un mecanismo mediado por las células MGL2⁺. Sin embargo, en los experimentos *in vitro*, la expresión de IL-10 estaba acompañada por un aumento en TNFα¹⁰⁶, lo cual no se observó en este trabajo. Esto podría deberse a que, en el contexto tumoral, la célula que está recibiendo la señal a través de MGL2 también está recibiendo una gran variedad de señales por diversos receptores que reconocen otras moléculas en el tumor y activan diversas vías de señalización, y la integración de estas señales podría conducir a que la expresión de TNFα no se vea alterada.

En este trabajo también se observaron índices elevados de IL-10/IFNγ en suero de los animales inoculados con las células LL/2-H12, lo que sugiere una respuesta reguladora a nivel sistémico. La IL-10 es una potente citoquina inmunoreguladora que juega un rol central en el supresión de la respuesta inmune contra el cáncer, suprimiendo la inflamación asociada al tumor¹⁷⁴. En NSCLC su expresión está asociada a un mayor tamaño tumoral, así como una menor sobrevida y peor pronóstico para el paciente¹⁷⁴. La expresión de IL-10 en las células T podría indicar que se trata de células Treg, que suprimen la inmunovigilancia, y favorecen el crecimiento tumoral. Sin embargo, es importante destacar que en este trabajo no estudiamos la capacidad supresora de los linfocitos T productores de IL-10 presentes en el microambiente tumoral. Esto es fundamental para poder asociar una función reguladora a los mismos. En este caso, habíamos planificado realizar una purificación de los linfocitos T CD4⁺ a partir de tumores Tn⁺ y Tn⁻ y co-cultivarlos con un ensayo de activación alogénica.

Aunque se demostró que la expresión de Tn se mantiene in vivo, que las células Tn⁺ son reconocidas de forma diferencial por el receptor MGL2 por diversas aproximaciones experimentales in vitro, o que las células MGL2+ son esenciales para mediar el efecto inmunoregulador de las células LL/2-H12, no se puede asegurar que la interacción Tn-MGL2 esté ocurriendo en el tumor. Por un lado, no se descarta que los resultados observados puedan deberse a otras modificaciones en las células tumorales que afecten su crecimiento tumoral, como, por ejemplo, por la gran variedad de estructuras glicosídicas alteradas en las mismas o por la pérdida de O-glicanos elongados por el truncamiento en Tn. Por otro lado, al depletar las células MGL2⁺, no solo estamos aboliendo la interacción de dicho receptor con Tn, sino también estamos inhibiendo el efecto de estas células presentadoras de antígeno, que, además de expresar MGL2 e IL-10, pueden secretar una gran variedad de moléculas, e interaccionar con otros ligandos por otros receptores celulares. Una estrategia para dilucidar si los efectos observados son mediados por el antígeno Tn sería bloquearlo in vivo con un anticuerpo anti-Tn, y observar si los resultados obtenidos se pierden o mantienen. Esta estrategia se consideró abordar durante el trabajo, pero la principal dificultad que se encontró fue que el anticuerpo monoclonal que se utilizó para identificar las células Tn⁺, el anticuerpo 83D4, es un anticuerpo IgM murino, por lo que la unión de este anticuerpo sobre la superficie de la célula tumoral podría activar el complemento como efecto secundario y mediar la lisis celular.

Un aspecto interesante, y a la vez inesperado, encontrado en este trabajo, fue que las variantes celulares Tn⁺ no presentaron las mismas características biológicas. De hecho, los ratones inoculados con las células LL/2-F9 presentaron tumores de tamaño intermedio con características inmunológicas similares a los tumores provenientes de la inoculación de las células LL/2-WT. Esto podría deberse a varios motivos. Por un lado, las células LL/2-H12, al ser policionales, podrían presentar una ventaja en el crecimiento tumoral. De hecho, esto mimetizaría lo que ocurre durante el desarrollo de cáncer. Como se describió anteriormente, en la teoría de la inmunoedición el sistema inmune juega un rol fundamental generando una presión selectiva sobre las diferentes celulares generadas, siendo aquellas con mayores capacidades inmunoevasivas las que posteriormente escapan a la inmunovigilancia y conforman el tumor. En el caso de las LL/2-F9, al ser todas provenientes de un único clon, todas van a tener las mismas características y esto podría ser desventajoso para estas células en comparación con las policionales LL/2-H12. Otro factor que podría explicar este resultado (y varios de los resultados correspondientes a las células LL/2-F9 in vivo) es que mientras las células tumorales provenientes de los ratones inoculados con las

células LL/2-H12 presentan una alta expresión de Tn, esta no fue mantenida en los tumores provenientes de los ratones inoculados con las células LL/2-F9. Esto es sumamente interesante, debido a que in vitro, las células LL/2-F9 tienen una expresión alta y homogénea de Tn que no se observa tras el crecimiento in vivo. Una de las hipótesis que se plantea para explicar este resultado es que, como ya se ha visto que la glicosilación celular es altamente sensible al contexto en el que se encuentra la célula, durante el crecimiento tumoral las células podrían modificar su glicosilación, y esto llevaría a la disminución en la expresión del antígeno Tn. Debido a que la formación de core 1 se encuentra truncado, podría ocurrir que las células generen sTn por la sialilación de Tn, o la elongación hacia core 3. Para confirmar esto, se debería hacer un análisis del glicofenotipo de las células tumorales CD45⁻ provenientes de los tumores. Por otro lado, los tumores F9 no reclutaron un mayor porcentaje de células MGL2⁺ al microambiente tumoral, indicando que este receptor no estaría jugando un rol fundamental en la respuesta inmunológica desarrollada. Concordantemente con estos resultados, cuando se evaluó si la proteína quimérica MGL2 era capaz de inhibir la unión de 83D4 a las células tumorales, no se observó inhibición en el caso de F9. Este resultado indicaría que por más que estas células son reconocidas por ambas moléculas, los sitios de reconocimiento son diferentes para 83D4 y MGL2, lo que podría indicar que el reconocimiento de MGL2 no se da a través del antígeno Tn en estas células, y quizá no tenga una relevancia durante la respuesta inmune in vivo.

Para evaluar si los resultados obtenidos tienen relevancia en un contexto clínico, se seleccionaron los genes para los que se encontró una mayor diferencia de expresión en el crecimiento tumoral de los ratones de LL/2-H12 y se evaluó su expresión en pacientes con cáncer usando bases de datos. La correlación positiva de los genes seleccionados con MGL indica que en el contexto tumoral en humanos se observan resultados similares a los que se encontraron en el modelo murino. Por otra parte, en adenocarcinoma, la expresión alta de estos genes está asociada a una menor sobrevida y un menor tiempo libre de enfermedad, indicando que podría tratarse de un fingerprint con alto valor pronóstico. Sería ideal poder correlacionar estos datos con la expresión de Tn, pero como ya se expuso anteriormente, la expresión de este antígeno se da por diversas vías, algunas de las cuales no están directamente relacionadas con los niveles de expresión génica de proteínas particulares, y por lo tanto, no es posible distinguir los pacientes con tumores Tn⁺ de los Tn⁻ utilizando esta base de datos. Para poder identificar la expresión de este antígeno, y correlacionarlo con la expresión de los genes seleccionados, podrían utilizarse arrays comerciales con muestras de tejido de pacientes y evaluar por microscopía la presencia de Tn y las proteínas

seleccionadas. Estos *arrays* a su vez, contienen los datos de sobrevida y desarrollo clínico del paciente, por lo cual también podrían evaluarse estos parámetros en los mismos.

Papel del antígeno Tn en la angiogénesis tumoral

Uno de los resultados que encontramos durante el transcurso de este estudio, y que no postulamos inicialmente, fue la observación que los tumores generados por LL/2-H12 presentan un mayor grado de vascularización que los tumores de LL/2-WT, acompañado por una mayor expresión de VEGF en estos tumores. Hasta la fecha, no hay reportes que indiquen que la expresión de Tn se asocie con un mayor grado de angiogénesis en los tumores.

Como se describió anteriormente, a medida que el tumor crece, necesita un suministro alto de nutrientes y oxígeno para mantener las altas tasas proliferativas de sus células. Sin embargo, muchas veces esto da lugar a la formación de vasos sanguíneos irregulares con baja estabilidad, que favorecen la extravasación de las células tumorales. Uno de los mecanismos descriptos que lleva a la formación de esta vasculatura aberrante es que frente a altos niveles de VEGF, este podría inhibir la función de PDGF en la estabilización de los vasos sanguíneos mediante el reclutamiento de pericitos a la pared de la vasculatura 119. En este trabajo, se determinó que VEGF se encuentra secretado en mayores niveles en las células y en los tumores Tn+, pero no se observaron diferencias en la secreción de PDGF. Esto de todas formas, no descarta que se esté dando un mecanismo de inhibición de la función de PDGF que no afecte la secreción del mismo.

Por otro lado, se encontró que los niveles aumentados de VEGF no se deben a un aumento en su expresión génica, sino que hay una mayor secreción de esta molécula al medio. Una de las hipótesis que planteamos es que VEGF presente cambios en su O-glicanos y que éstos alteren su secreción o función. Ya se ha reportado que modificaciones en el patrón de N-glicosilación en VEGFR pueden afectar la señalización por VEGF y promover su potencial angiogénico 128. A su vez, se observó que mutantes de VEGF en una asparagina que es sitio de N-glicosilación tienen una secreción reducida 175. A su vez, se ha visto que los glicanos juegan un rol fundamental en la señalización del receptor VEGFR, ya que el mismo puede ser activado por un mecanismo independiente de VEGF, que involucra glicanos presentes en galectinas 176.

En este trabajo, no fue posible elucidar si los cambios observados se deben directamente a un efecto de la expresión de Tn, ya que también podrían deberse a las alteraciones encontradas en el proceso de N-glicosilación. Para entender en profundidad los mecanismos involucrados, resultaría sumamente interesante generar de forma recombinante VEGF en las variantes celulares generadas, y evaluar la glicosilación de esta proteína. A su vez, se podría generar un modelo murino de inoculación de células LL/2-WT knock out para VEGF y suministrar intra-tumoralmente el VEGF producido por las células Tn⁺, para evaluar cual es el rol de esta molécula en el desarrollo neoplásico y en la angiogénesis.

Por otra parte, no debemos olvidar el rol del sistema inmune en la angiogénesis. Por ejemplo, los macrófagos TAM son inductores de angiogénesis, ya que secretan altas concentraciones de moléculas pro-angiogénicas, entre las cuales podemos encontrar a VEGF y también podrían estar contribuyendo a los efectos observados. Los TAM también secretan MMP que participan en la angiogénesis, aunque en este trabajo no se encontró un aumento en la actividad de MMP en los tumores Tn⁺. Algo sumamente interesante es que al depletar las células MGL2+, los niveles de VEGF en el tumor disminuyen considerablemente. Esto podría indicar que las células MGL2+ están contribuyendo a la secreción de VEGF en el microambiente tumoral, y por lo tanto el reclutamiento de dichas células por la alta expresión de Tn en el tumor participaría en desarrollo angiogénico. Por otro lado, hay evidencia que algunos CLR son capaces de inducir la expresión de VEGF¹⁷⁷, por lo cual no se descarta que la interacción de MGL2 con el antígeno Tn también contribuya a los niveles observados de VEGF.

Conclusión y perspectivas finales

Este trabajo evidencia el rol inmunomodulador del antígeno Tn durante el crecimiento tumoral, y que su presencia favorece un ambiente inmune regulador, así como la angiogénesis, a través de un proceso mediado por células MGL2⁺. Por otro lado, hay indicios clínicos de la asociación de la presencia de principales moléculas identificadas en los tumores Tn⁺ con una menor sobrevida de pacientes con adenocarcinomas. A su vez, este trabajo abre varios caminos de investigación para continuar elucidando el rol de Tn en el desarrollo neoplásico. Por un lado, resulta sumamente interesante elucidar el mecanismo subyacente en los cambios observados en el N-glicoma al generar células knock out de cosmc. En este sentido nos planteamos las siguientes preguntas: ¿existen vías de regulación entre los procesos

de N- y O-glicosilación, y que al afectar uno de ellos, se observen cambios en el otro? ¿O se trata de efectos off-target de la estrategia seleccionada? ¿Estas características son responsables de los efectos biológicos observados en los tumores Tn⁺? La glicosilación es un proceso altamente dinámico, y más allá de que no se hayan observado estos cambios en otras líneas celulares en las cuales se utilizaron las mismas estrategias, podría tratarse de un proceso dependiente del tipo celular seleccionado. Además, la glicosilación es un proceso sumamente sensible a alteraciones en el medio, y tipo celular dependiente. Esto a su vez deriva en la discusión de los modelos experimentales que se utilizan en investigación, y si los resultados que derivan de su uso son trasladables o no a la situación clínica.

Por otro lado, en este trabajo se pudieron purificar algunos ligandos de MGL2 producidos por la célula tumoral, pero no se pudo identificar los mismos. La identificación de estos ligandos es una de las principales perspectivas de este trabajo, ya que permitiría entender con una mayor profundidad los mecanismos involucrados en el papel de MGL2 y Tn en el desarrollo neoplásico. Recientemente, se publicó un trabajo en el cual se identificaron los ligandos de MGL2 en células de cáncer de colon¹⁷⁸. En este sentido, sería sumamente interesante saber si las proteínas purificadas en nuestro modelo de cáncer de pulmón de corresponden con algunas de las halladas en el trabajo publicado, o si se trata de otras glicoproteínas diferentes.

Por otro lado, otra perspectiva de este trabajo es investigar si la interacción directa entre Tn y MGL2 in vivo es responsable del fenotipo observado en los tumores. En esta vía de trabajo, en el grupo del Dr. Eduardo Osinaga, se han desarrollado de forma recombinante variantes del anticuerpo 83D4 que carecen de la porción Fc, y por lo tanto podrían ser utilizadas como agentes bloqueantes sin activar la respuesta inmune. Inoculando los ratones con tumores Tn⁺ con este anticuerpo, se podría evaluar si Tn está mediando estos efectos de forma directa, o si los cambios observados son un efecto indirecto de la expresión de Tn en las células, que altera la expresión de otras moléculas que median los efectos observados.

Por último, la evaluación del rol de la interacción entre Tn y MGL2 en la angiogénesis resulta sumamente relevante, ya que no se había observado previamente. Esto tiene una alta relevancia a nivel clínico, ya que la capacidad respondedora a la terapia anti-VEGF en pacientes es algo que continúa siendo objeto de estudio, y si Tn o MGL2 son biomarcadores de este proceso es algo que se desconoce.

En conclusión, en este trabajo se demuestra que la deleción de Cosmo en células de cáncer de pulmón lleva a una alta expresión de Tn, y contribuye en la angiogénesis y en la inmunoevasión por el reclutamiento de células productoras de IL-10 al microambiente tumoral. Tanto las propiedades inmunoevasivas como las propiedades angiogénicas promueven el desarrollo de tumores más agresivos en un mecanismo mediado por la participación de células MGL2⁺.

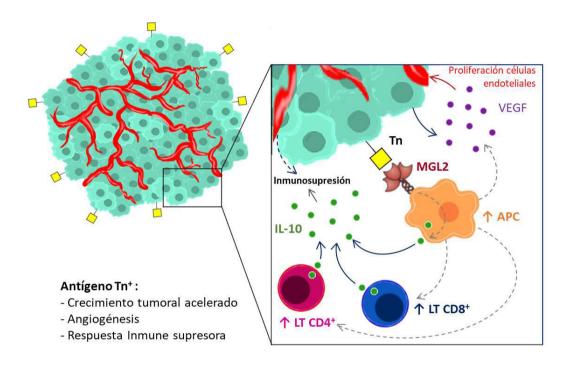


Figura 76 - Hipótesis integradora de los resultados obtenidos - Los resultados de este trabajo sugieren que la presencia del antígeno Tn promueve el desarrollo de tumores más agresivos, con un crecimiento acelerado y una respuesta inmune supresora. El microambiente tumoral Tn+ se caracteriza por un mayor reclutamiento de APC MGL2+ productoras de IL-10, y LT CD4+ y CD8+ productores de IL-10. A su vez, los tumores Tn+ presentan un mayor grado de angiogénesis mediado por un aumento en la secreción de VEGF por las células tumorales, que también favorece la inmunosupresión. Asimismo, las células MGL2+ median (directa o indirectamente) las propiedades inmunoevasivas y angiogénicas.

Anexos

Anexo 1: Primers utilizados para las qRT-PCR

Gen	Foward	Reverse
mST6GalNAc-l	GAGAGGCAGTCCAAGGAAGAGC	TGAGGATTCTCTGGTGCTGGC
mST6GalNAc-II	GAGCCGACTTTGCCAACACTC	GGGTGGAGAGGTCAAACAGGC
mST6GalNAc-III	TGCAGGATGCATGGTCTATC	TGTAACCACTGTGCCATCGT
mST6GalNAc-IV	CACCGTGGGCTTTGAGGAGG	GCGCAGAAGCAATGGCACAC
mST6GalNAc-V	GCTCATCGAACTGCATCAT	AGCTCCTTAGCCAAGTGCTG
mST6GalNAc-VI	ACATGGAATGGGCCACTAC	GAACGATGCTCCCACCTCT
mGALNT1	CAGCATGTGAACAGCAATCA	GTCTCTAATGCTGGGCACCT
mB3Gnt6	AGTCCCACGACACTGGCTTTC	CCTGCCTGTGTTCCTGGAGG
mGcnt2	CGGTTGATTTGCTCCATTG	TATTGAGCGTCACCCAGAAAT
mGcnt3	ACCCAGGCTCTGCTGAATAA	AGGTAGTCGGCCTCTGTGAA
mCOSMC	TGCACCACCATGAGCATCACC	AGCTCCATGCGTTCAGCCTC
mIL-2	GCGGCATGTTCTGGATTTGACTC	CCACCACAGTTGCTGACTCATC
mIL-4	AGGTCACAGGAGAAGGGACGCC	TGCGAAGCACCTTGGAAGCCC
mIL-6	GTATGAACAACGATGATGCACTTG	ATGGTACTCCAGAAGACCAGAGGA
mIL-10	TTCCCAGTCGGCCAGAGCCA	GGGGAGAAATCGATGACAGCG
mIL-12	ACCTGCTGAAGACCACAGAT	GATTCTGAAGTGCTGCGTTG
mIL-17	TCACCCTGGACTCTCACCGCA	CTGGCGGACAATCGAGGCCA
mIL-21	GCCTCCTGATTAGACTTCGTCAC	CAGGCAAAAGCTGCATGCTCAC
mIL-23	CATGCTAGCCTGGAACGCACAT	ACTGGCTGTTGTCCTTGAGTCC
mIL-27	TCTCGATTGCCAGGAGTGAACC	AGTGTGGTAGCGAGGAAGCAGA
mIFNγ	GGAGGAACTGGCAAAAGGATGGTG	GCGCTGGACCTGTGGGTTGT
mTNFα	TCGGCTGACGGTGTGGGTGA	GCCCACGTCGTAGCAAACCACC
mTGFβ	AACAATTCCTGGCGTTACCTT	CTGCCGTACAACTCCAGTGA
mMGL1	AACCTCCAGAACTCAAGGATCG	AGCTTTACCAGGCTCTTGGGT
mMGL2	CAGAACTTGGAGCGGGAAGAG	TTCTTGTCACCATTTCTCATCTCC
mPD1	GCACTTGAGCTGGCAATCAG	GGTGAAGGTGGCATTTGCTC
mPD-L1	CTCGCCTGCAGATAGTTCCC	AGCCGTGATAGTAAACGCCC
mFoxp3	TCCAAGTCTCGTAAGGC	GCGAAAGTGGCAGAGAGGTA
mICOS	GCAGCTTTCGTTGTGGTACTCC	TGTGTTGACTGCCGCCATGAAC
mNOX2	TGGCGATCTCAGCAAAAGGTGG	GTACTGTCCCACCTCCATCTTG

Anexo 2: Concentración de anticuerpos utilizados

Concentración de anticuerpos utilizados para citometría de flujo

Membranarios			Intracelulares		
Anticuerpo	Clon	[] (µg/ml)	Anticuerpo	Clon	[] (µg/ml)
α-CD45	104	0.5	α-IL-10	JES5-16E3	10
α-F4/80	BM8	1,0	α-TGFβ	21C11	10
α-CD11c	N418	0,66	α-IFNγ	XMG1.2	10
α-MGL2	URA-1	0,66	α-IL-4	11B11	10
α-CD4	GK1.5	0,33	α-Foxp3	FJK-16s	5
α-CD8a	53.6-7	1,0			
α-MHC-II	M5/11415.2	0,25			
α-CD80	16-10A1	1,0			
α-CD86	GL1	1,0			
α-CD49b	DX5	0,80			
a-CD3	17A2	1,66			
α-NK1.1	PK136	2,5			

Concentración de Anticuerpos utilizados para Microscopía

Anticuerpo	Clon	[] (µg/ml)	
α-CD11c	N418	1,32	
α-MGL2	URA-1	1,32	
α-CD31	390	2,5	



- 1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
- 2. Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. Situacion Epidemiologica del Uruguay en relacion al Cancer. *Regist. Nac. del Cáncer, Com. Honor. Lucha Contra el Cáncer* 1–61 (2019).
- 3. American Cancer Society. Acerca del cáncer de pulmón. 1–14 (2019).
- 4. Siegel, R. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **62**, 220–241 (2012).
- 5. Wender, R. *et al.* American Cancer Society lung cancer screening guidelines. *CA. Cancer J. Clin.* **63**, 106–117 (2013).
- 6. Stricker, T., Catenacci, D. V. T. & Seiwert, T. Y. Molecular profiling of cancer The future of personalized cancer medicine: A primer on cancer biology and the tools necessary to bring molecular testing to the clinic. *Semin. Oncol.* **38**, 173–185 (2011).
- 7. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
- 8. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
- 9. Feitelson, M. A. *et al.* Sustained proliferation in cancer: therapeutic targets. *Semin. Cancer Biol.* **35**, 25–54 (2016).
- 10. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257 (2000).
- 11. Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–37 (2013).
- 12. Pastushenko, I. & Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* **29**, 212–226 (2019).
- 13. Macheret, M. & Halazonetis, T. D. DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **10**, 425–448 (2015).
- 14. Andor, N., Maley, C. C. & Ji, H. P. Genomic instability in cancer: Teetering on the limit of tolerance. *Cancer Res.* **77**, 2179–2185 (2017).
- 15. Vaupel, P., Schmidberger, H. & Mayer, A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *Int. J. Radiat. Biol.* **95**, 912–919 (2019).
- 16. Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* **23**, 27–47 (2016).
- 17. Pickup, M. W., Mouw, J. K. & Weaver, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* **15**, 1243–1253 (2014).
- 18. Ehrlich, P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd* 273–290 (1909).
- 19. Thomas, L. Delayed hypersensitivity in health and disease. *Cell. Humoral Asp. Hypersensitive States Hoeber-Harper; New York* 529–532 (1959).
- 20. BURNET, M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br. Med. J.* **1**, 841–7 (1957).
- 21. Ribatti, D. The concept of immune surveillance against tumors. The first

- theories. Oncotarget 8, 7175-7180 (2017).
- 22. Prehn, R. T. Perspectives on oncogenesis: does immunity stimulate or inhibit neoplasia? *J. Reticuloenothel. Soc.* **10**, 1–16 (1970).
- 23. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–998 (2002).
- 24. Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFNγ receptors. *Immunity* **1**, 447–456 (1994).
- 25. Kaplan, D. H. *et al.* Demonstration of an interferon γ-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7556–7561 (1998).
- 26. Van Den Broek, M. F. *et al.* Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* **184**, 1781–1790 (1996).
- 27. Varki, A. et al. Essentials of Glycobiology, 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY) (2015).
- 28. Rodrigues, J. G. *et al.* Glycosylation in cancer: Selected roles in tumour progression, immune modulation and metastasis. *Cell. Immunol.* **333**, 46–57 (2018).
- 29. Poole, J., Day, C. J., Von Itzstein, M., Paton, J. C. & Jennings, M. P. Glycointeractions in bacterial pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 440–452 (2018).
- 30. Watanabe, Y., Bowden, T. A., Wilson, I. A. & Crispin, M. Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subi.* **1863**, 1480–1497 (2019).
- 31. Bennett, E. P. *et al.* Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* **22**, 736–756 (2012).
- 32. Hanisch, F. G. O-glycosylation of the mucin type. *Biol. Chem.* **382**, 143–149 (2001).
- 33. Krasnova, L. & Wong, C. H. Exploring human glycosylation for better therapies. *Mol. Aspects Med.* **51**, 125–143 (2016).
- 34. Costa, A. F., Campos, D., Reis, C. A. & Gomes, C. Targeting Glycosylation: A New Road for Cancer Drug Discovery. *Trends in Cancer* **6**, 757–766 (2020).
- 35. Nairn, A. V *et al.* Regulation of Glycan Structures in Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* **283**, 17298–17313 (2008).
- 36. Schwarz, F. & Aebi, M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 576–582 (2011).
- 37. Reis, C. A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C. & David, L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J. Clin. Pathol.* **63**, 322–329 (2010).
- 38. Liu, S., Shun, C., Hung, K. & Juan, H. Mucin glycosylating enzyme GALNT2 suppresses malignancy in gastric adenocarcinoma by reducing MET phosphorylation. *Oncotarget* **7**, (2016).
- 39. Lin, M. C., Huang, M. J., Liu, C. H., Yang, T. L. & Huang, M. C. GALNT2 enhances migration and invasion of oral squamous cell carcinoma by

- regulating EGFR glycosylation and activity. Oral Oncol. 50, 478–484 (2014).
- 40. Dosaka-Akita, H. *et al.* N-acetylgalactosaminyl transferase-3 is a potential new marker for non-small cell lung cancers. *Br. J. Cancer* **87**, 751–755 (2002).
- 41. Park, J. H. *et al.* Critical roles of mucin 1 glycosylation by transactivated polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 in mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* **70**, 2759–2769 (2010).
- 42. Lin, T. C. *et al.* GALNT6 expression enhances aggressive phenotypes of ovarian cancer cells by regulating EGFR activity. *Oncotarget* **8**, 42588–42601 (2017).
- 43. Gomes, J. *et al.* Expression of UDP-N-acetyl-D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-6 in gastric mucosa, intestinal metaplasia, and gastric carcinoma. *J. Histochem. Cytochem.* **57**, 79–86 (2009).
- 44. Ju, T., Otto, V. I. & Cummings, R. D. The Tn Antigen-Structural Simplicity and Biological Complexity. *Angew. Chemie Int. Ed.* **50**, 1770–1791 (2011).
- 45. Pinho, S. S. & Reis, C. A. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 540–555 (2015).
- 46. Chia, J., Goh, G. & Bard, F. Short O-GalNAc glycans: Regulation and role in tumor development and clinical perspectives. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1860**, 1623–1639 (2016).
- 47. Paredes, J. *et al.* Epithelial E- and P-cadherins: Role and clinical significance in cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **1826**, 297–311 (2012).
- 48. Pinho, S. S. *et al.* Gastric cancer: Adding glycosylation to the equation. *Trends Mol. Med.* **19**, 664–676 (2013).
- 49. Cadena, A. P., Cushman, T. R. & Welsh, J. W. Glycosylation and Antitumor Immunity. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **343**, 111–127 (2019).
- 50. Cagnoni, A. J., Pérez Sáez, J. M., Rabinovich, G. A. & Mariño, K. V. Turning-Off Signaling by Siglecs, Selectins, and Galectins: Chemical Inhibition of Glycan-Dependent Interactions in Cancer. *Front. Oncol.* **6**, 1–21 (2016).
- 51. Ohtsubo, K. & Marth, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* **126**, 855–867 (2006).
- 52. Varki, A. Nothing in Glycobiology Makes Sense, except in the Light of Evolution. *Cell* **126**, 841–845 (2006).
- 53. Ju, T., Aryal, R. P., Kudelka, M. R., Wang, Y. & Cummings, R. D. The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer. *Cancer Biomarkers* **14**, 63–81 (2014).
- 54. Stolfa, G. *et al.* Using CRISPR-Cas9 to quantify the contributions of O-glycans, N-glycans and Glycosphingolipids to human leukocyte-endothelium adhesion. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
- 55. Yu, X. *et al.* Aberrant Cosmc genes result in Tn antigen expression in human colorectal carcinoma cell line HT-29. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 2590–602 (2015).
- 56. Huang, J. *et al.* The molecular chaperone cosmc enhances malignant behaviors of colon cancer cells via activation of Akt and ERK. *Mol. Carcinog.* **53**, E62–E71 (2014).
- 57. Hofmann, B. T. *et al.* COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer. *Mol. Cancer* **14**, 109 (2015).

- 58. Burchell, J. M., Mungul, A. & Taylor-Papadimitriou, J. O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **6**, 355–64 (2001).
- 59. An, G. *et al.* Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3–derived O-glycans. *J. Exp. Med.* **204**, 1417–1429 (2007).
- 60. Do, S.-I. & Cummings, R. D. The hamster transferrin receptor contains Ser/Thr-linked oligosaccharides: use of a lectin-resistant CHO cell line to identify glycoproteins containing these linkages. *J. Biochem. Biophys. Methods* **24**, 153–165 (1992).
- 61. Bard, F. & Chia, J. Cracking the Glycome Encoder: Signaling, Trafficking, and Glycosylation. *Trends Cell Biol.* **26**, 379–388 (2016).
- 62. Gao, T. *et al.* Disruption of Core 1-mediated O-glycosylation oppositely regulates CD44 expression in human colon cancer cells and tumor-derived exosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **521**, 514–520 (2020).
- 63. Wang, Z., Au, A. von, Schnölzer, M., Hackert, T. & Zöller, M. CD44v6-competent tumor exosomes promote motility, invasion and cancer-initiating cell marker expression in pancreatic and colorectal cancer cells. *Oncotarget* **7**, 55409–55436 (2016).
- 64. Nakamura, K. *et al.* Exosomes promote ovarian cancer cell invasion through transfer of CD44 to peritoneal mesothelial cells. *Mol. Cancer Res.* **15**, 78–92 (2017).
- 65. Growth, T. *et al.* Organelle Specific O-Glycosylation Drives MMP14 Activation, Tumor Growth, and Metastasis. *Cancer Cell* **32**, 639-653.e6 (2017).
- 66. Osinaga, E. *et al.* Analysis of the fine specificity of Tn binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy. *FEBS Lett.* **469**, 24–28 (2000).
- 67. Matsumoto, Y. *et al.* Trimeric Tn Antigen on Syndecan 1 Produced by ppGalNAc-T13 Enhances Cancer Metastasis via a Complex Formation with Integrin α5β1 and Matrix Metalloproteinase 9. *J. Biol. Chem.* **288**, 24264–24276 (2013).
- 68. Liu, Z. *et al.* Tn antigen promotes human colorectal cancer metastasis via H-Ras mediated epithelial-mesenchymal transition activation. *J. Cell. Mol. Med.* **23**, 2083–2092 (2019).
- 69. Li, L. & Li, W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: Comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacol. Ther.* **150**, 33–46 (2015).
- 70. Sletmoen, M., Gerken, T. A., Stokke, B. T., Burchell, J. & Brewer, C. F. Tn and STn are members of a family of carbohydrate tumor antigens that possess carbohydrate-carbohydrate interactions. *Glycobiology* **28**, 437–442 (2018).
- 71. Puhr, S., Lee, J., Zvezdova, E., Zhou, Y. J. & Liu, K. Seminars in Immunology Dendritic cell development History, advances, and open questions. *Semin. Immunol.* **27**, 388–396 (2016).
- 72. Fricke, I. & Gabrilovich, D. I. Dendritic cells and tumor microenvironment: A dangerous liaison. *Immunol. Invest.* **35**, 459–483 (2006).
- 73. Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B. & Lawrence, T. Dendritic cell maturation: Functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* **33**, 1104–1116 (2014).

- 74. Yoo, S. & Ha, S.-J. Generation of Tolerogenic Dendritic Cells and Their Therapeutic Applications. *Immune Netw.* **16**, 52–60 (2016).
- 75. Franken, L., Schiwon, M. & Kurts, C. Macrophages: Sentinels and regulators of the immune system. *Cell. Microbiol.* **18**, 475–487 (2016).
- 76. Chen, Y. *et al.* Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression. *J. Biomed. Sci.* **26**, 1–13 (2019).
- 77. Biswas, S. K., Allavena, P. & Mantovani, A. Tumor-associated macrophages: Functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin. Immunopathol.* **35**, 585–600 (2013).
- 78. Coussens, L. M., Zitvogel, L. & Palucka, A. K. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* **339**, 286–91 (2013).
- 79. Qian, B. & Pollard, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
- 80. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* **41**, 49–61 (2014).
- 81. Ben-Shmuel, A., Biber, G. & Barda-Saad, M. Unleashing Natural Killer Cells in the Tumor Microenvironment–The Next Generation of Immunotherapy? *Front. Immunol.* **11**, 1–23 (2020).
- 82. Reid, F. S. W., Egoroff, N., Pockney, P. G. & Smith, S. R. A systematic scoping review on natural killer cell function in colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* (2020). doi:10.1007/s00262-020-02721-6
- 83. Caligiuri, M. A. Human natural killer cells. *Blood* 112, 461–469 (2008).
- 84. Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* **6**, 443–446 (2000).
- 85. Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. & Nakachi, K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: An 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* **356**, 1795–1799 (2000).
- 86. Santos, M. F. *et al.* Comparative analysis of innate immune system function in metastatic breast, colorectal, and prostate cancer patients with circulating tumor cells. *Exp. Mol. Pathol.* **96**, 367–374 (2014).
- 87. Hadrup, S., Donia, M. & Thor Straten, P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* **6**, 123–133 (2013).
- 88. Gajewski, T. F., Schreiber, H. & Fu, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* **14**, 1014–1022 (2013).
- 89. Spranger, S. *et al.* Up-regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells. *Sci. Transl. Med.* **5**, 1–21 (2013).
- 90. Iborra, S. & Sancho, D. Signalling versatility following self and non-self sensing by myeloid C-type lectin receptors. *Immunobiology* **220**, 175–184 (2015).
- 91. Osorio, F. & Reis e Sousa, C. Myeloid C-type Lectin Receptors in Pathogen Recognition and Host Defense. *Immunity* **34**, 651–664 (2011).
- 92. Sancho, D. & Reis e Sousa, C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 491–529 (2012).
- 93. Zelensky, A. N. & Gready, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily.

- FEBS J. 272, 6179-6217 (2005).
- 94. Geijtenbeek, T. B. H. & Gringhuis, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 465–79 (2009).
- 95. RodrÍguez, E., Schetters, S. T. T. & van Kooyk, Y. The tumour glyco-code as a novel immune checkpoint for immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 204–211 (2018).
- 96. Singh, S. K. *et al.* Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: Distinct glycan specificities and tumor binding properties. *Mol. Immunol.* **46**, 1240–1249 (2009).
- 97. Zizzari, I. G. *et al.* MGL Receptor and Immunity: When the Ligand Can Make the Difference. *J. Immunol. Res.* **2015**, 1–8 (2015).
- 98. van Vliet, S. J., van Liempt, E., Geijtenbeek, T. B. H. & van Kooyk, Y. Differential regulation of C-type lectin expression on tolerogenic dendritic cell subsets. *Immunobiology* **211**, 577–585 (2006).
- 99. Nollau, P. *et al.* Protein Domain Histochemistry (PDH): Binding of the Carbohydrate Recognition Domain (CRD) of Recombinant Human Glycoreceptor CLEC10A (CD301) to Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Breast Cancer Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **61**, 199–205 (2013).
- Saeland, E. et al. Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumour tissue of colon cancer patients. Int. J. Cancer 131, 117–128 (2012).
- Saeland, E. et al. The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. Cancer Immunol. Immunother. 56, 1225–1236 (2007).
- 102. Andergassen, U. et al. Detection of tumor cell-specific mRNA in the peripheral blood of patients with breast cancer-evaluation of several markers with realtime reverse transcription-PCR. Int. J. Mol. Sci. 14, 1093–1104 (2013).
- 103. Lenos, K. *et al.* MGL ligand expression is correlated to BRAF mutation and associated with poor survival of stage III colon cancer patients. *Oncotarget* **6**, 26278–26290 (2015).
- 104. Zaal, A. et al. Activation of the C-Type Lectin MGL by Terminal GalNAc Ligands Reduces the Glycolytic Activity of Human Dendritic Cells. Front. Immunol. 11, 1–13 (2020).
- 105. Van Vliet, S. J. *et al.* Human T cell activation results in extracellular signal-regulated kinase (ERK)-calcineurin-dependent exposure of Tn antigen on the cell surface and binding of the macrophage galactose-type lectin (MGL). *J. Biol. Chem.* **288**, 27519–27532 (2013).
- 106. Vliet, S. J. Van, Bay, S., Vuist, I. M., Kalay, H. & García-vallejo, J. J. MGL signaling augments TLR2-mediated responses for enhanced IL-10 and TNF- secretion. 94, 315–323 (2013).
- 107. Li, D. *et al.* Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **209**, 109–121 (2012).
- 108. van Sorge, N. M. et al. N-glycosylated proteins and distinct lipooligosaccharide glycoforms of Campylobacter jejuni target the human C-type lectin receptor MGL. Cell. Microbiol. 11, 1768–1781 (2009).
- 109. Kumamoto, Y. et al. CD301b+ dermal dendritic cells drive T helper-2 cell

- mediated immunity. Immunity 39, 733-743 (2014).
- 110. Murakami, R. *et al.* A Unique Dermal Dendritic Cell Subset That Skews the Immune Response toward Th2. *PLoS One* **8**, (2013).
- 111. Disis, M. L. Mechanism of action of immunotherapy. *Semin. Oncol.* **41**, S3–S13 (2014).
- 112. Shibuya, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. Genes and Cancer 2, 1097–1105 (2011).
- 113. Alsohaimi, A. The Pathogenic Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Skin Diseases. *Adv. Med. Med. Res.* **2**, 27–37 (2019).
- 114. Popat, S. *et al.* Lung Cancer Anti-angiogenic agents in the age of resistance to immune checkpoint inhibitors: Do they have a role in non-oncogene-addicted non-small cell lung cancer? *Lung Cancer* **144**, 76–84 (2020).
- 115. Hellström, M. *et al.* Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* **152**, 543–553 (2001).
- Ribeiro, A. L. & Okamoto, O. K. Combined Effects of Pericytes in the Tumor Microenvironment. Stem Cells Int. 2015, 1–8 (2015).
- Carmeliet, P. & Jain, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 417–427 (2011).
- 118. Yihai Cao. Angiogenic factors and cancer therapy. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* (2013).
- 119. Greenberg, J. I. *et al.* A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature* **456**, 809–814 (2008).
- Janice A. Nagy, Sung-Hee Chang, Shou-Ching Shih, Ann M. Dvorak, and H. F. D. Heterogeneity of the Tumor Vasculature. Semin Thromb Hemost 36, 321–331 (2010).
- 121. Brown Chandler, K., E. Costello, C. & Rahimi, N. Glycosylation in the Tumor Microenvironment: Implications for Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Cells* **8**, 544 (2019).
- 122. Riabov, V. *et al.* Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front. Physiol.* **5**, 1–13 (2014).
- 123. Stockmann, C., Schadendorf, D., Klose, R. & Helfrich, I. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling. *Front. Oncol.* **4**, 1–13 (2014).
- 124. Cheng, W. K. & Oon, C. E. How glycosylation aids tumor angiogenesis: An updated review. *Biomed. Pharmacother.* **103**, 1246–1252 (2018).
- 125. Croci, D. O., Cerliani, J. P., Pinto, N. A., Morosi, L. G. & Rabinovich, G. A. Regulatory role of glycans in the control of hypoxia-driven angiogenesis and sensitivity to anti-angiogenic treatment. *Glycobiology* **24**, 1283–90 (2014).
- 126. Croci, D. O., Mendez-Huergo, S. P., Cerliani, J. P. & Rabinovich, G. A. Immune-Mediated and Hypoxia-Regulated Programs: Accomplices in Resistance to Anti-angiogenic Therapies. *Handb. Exp. Pharmacol.* **249**, 31–61 (2017).
- 127. Croci, D. O. *et al.* Glycosylation-Dependent Lectin-Receptor Interactions Preserve Angiogenesis in Anti-VEGF Refractory Tumors. *Cell* **156**, 744–758

- (2014).
- 128. Chandler, K. B. et al. N-Glycosylation regulates ligand-dependent activation and signaling of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2). J. Biol. Chem. 294, 13117-13130 (2019).
- van Koovk, Y. C-type lectins on dendritic cells; key modulators for the induction of immune responses. Biochem. Soc. Trans. 36, 1478-1481 (2008).
- Du. T. et al. Cosmc disruption-mediated aberrant o-glycosylation suppresses breast cancer cell growth via impairment of CD44. Cancer Manag. Res. 12, 511-522 (2020).
- Bertram, J. S. & Janik, P. Establishment of a cloned line of Lewis lung carcinoma cells adapted to cell culture. Cancer Lett. 11, 63-73 (1980).
- American Lung Association Epidemiology and Statistics Unit Research and Program Services Division. Trends in Lung Cancer Morbidity and Mortality. Muscle Nerve 45, fmiii-fmiv (2012).
- Arnold, J. N., Magiera, L., Kraman, M. & Fearon, D. T. Tumoral Immune Suppression by Macrophages Expressing Fibroblast Activation Protein- and Heme Oxygenase-1. Cancer Immunol. Res. 2, 121–126 (2014).
- Mazal, D. et al. Monoclonal antibodies toward different Tn-amino acid backbones display distinct recognition patterns on human cancer cells. Implications for effective immuno-targeting of cancer. Cancer Immunol. Immunother. 62, 1107–1122 (2013).
- Ju, T. et al. A novel fluorescent assay for T-synthase activity. Glycobiology 21, 135. 352-362 (2011).
- 136. Sanchez, J. F. et al. Biochemical and structural analysis of Helix pomatia agglutinin: A hexameric lectin with a novel fold. J. Biol. Chem. 281, 20171-20180 (2006).
- Puri, K. D., Gopalakrishnan, B. & Surolia, A. Carbohydrate binding specificity of the Tn-antigen binding lectin from Vicia villosa seeds (VVLB4). FEBS Lett. 312, 208-212 (1992).
- Dam, T. K. et al. Binding studies of α -GalNAc-specific lectins to the α -GalNAc (Tn-antigen) form of porcine submaxillary mucin and its smaller fragments. J. Biol. Chem. 282, 28256-28263 (2007).
- Piller, V., Piller, F. & Cartron, J. P. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-D-galactosamine-recognizing lectins. Eur. J. Biochem. 191, 461-6 (1990).
- Sharma, V., Srinivas, V. R., Adhikari, P., Vijayan, M. & Surolia, A. Molecular basis of recognition by Gal/GalNAc specific legume lectins: Influence of Glu 129 on the specificity of peanut agglutinin (PNA) towards C2-substituents of galactose. Glycobiology 8, 1007–1012 (1998).
- Debray, H., Montreuil, J., Lis, H. & Sharon, N. Affinity of four immobilized Erythrina lectins toward various n-linked glycopeptides and related oligosaccharides. Carbohydr. Res. 151, 359-370 (1986).
- Shibuya, N. et al. The elderberry (Sambucus nigra L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. J. Biol. Chem. 262, 1596–1601 (1987).
- Geisler, C. & Jarvis, D. L. Effective glycoanalysis with Maackia amurensis lectins requires a clear understanding of their binding specificities.

- Glycobiology 21, 988-993 (2011).
- Gallagher, J. T., Morris, A. & Dexter, T. M. Identification of two binding sites for wheat-germ agglutinin on polylactosamine-type oligosaccharides. *Biochem. J.* 231, 115–122 (1985).
- 145. Immel, F. *et al.* The shell of the invasive bivalve species Dreissena polymorpha: Biochemical, elemental and textural investigations. *PLoS One* **11**, 1–28 (2016).
- 146. Mandal, D. K. *et al.* Studies of the Binding Specificity of Concanavalin A. Nature of the Extended Binding Site for Asparagine-Linked Carbohydrates. *Biochemistry* **33**, 1157–1162 (1994).
- 147. Hagiwara, K., Collet-Cassart, D., Kunihiko, K. & Vaerman, J. P. Jacalin: isolation, characterization, and influence of various factors on its interaction with human IgA1, as assessed by precipitation and latex agglutination. *Mol. Immunol.* **25**, 69–83 (1988).
- 148. Naughton, J. A. *et al.* Divergent Mechanisms of Interaction of Helicobacter pylori and Campylobacter jejuni with Mucus and Mucins. *Infect. Immun.* **81**, 2838–2850 (2013).
- 149. Royle, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. A. & Rudd, P. M. Detailed structural analysis of N-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions. *Methods Mol. Biol.* **347**, 125–43 (2006).
- 150. Ferragut, F. et al. Dual knockdown of Galectin-8 and its glycosylated ligand, the activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM / CD166), synergistically delays in vivo breast cancer growth. BBA Mol. Cell Res. 1866, 1338–1352 (2019).
- 151. Saldova, R. *et al.* Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J. Proteome Res.* **13**, 2314–27 (2014).
- 152. Mariño, K., Bones, J., Kattla, J. J. & Rudd, P. M. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 713–723 (2010).
- 153. Di leva, A. *et al.* Fractal dimension as a quantitator of the microvasculature of normal and adenomatous pituitary tissue. *J. Anat.* **211**, 673–680 (2007).
- 154. Steentoft, C. *et al.* Precision genome editing: a small revolution for glycobiology. *Glycobiology* **24**, 663–80 (2014).
- 155. Madrid, J. F., Aparicio, R., Sáez, F. J. & Hernández, F. Lectin cytochemical characterization of the N- and O-linked oligosaccharides in the human rectum. *Histochem. J.* **32**, 281–289 (2000).
- 156. Campbell, M. P., Royle, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. A. & Rudd, P. M. GlycoBase and autoGU: Tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics* **24**, 1214–1216 (2008).
- 157. Abrahams, J. L., Campbell, M. P. & Packer, N. H. Building a PGC-LC-MS N-glycan retention library and elution mapping resource. *Glycoconj. J.* **35**, 15–29 (2018).
- 158. Price, J. E. Clonogenicity and experimental metastatic potential of spontaneous mouse mammary neoplasms. *J. Natl. Cancer Inst.* **77**, 529–535 (1986).
- 159. Fu, C. et al. Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T

- antigen. Hla 88, 275-286 (2016).
- 160. Springer, G. F. Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J. Mol. Med.* **75**, 594–602 (1997).
- 161. Freire, T. & Osinaga, E. Immunological and biomedical relevance of the Tn antigen. **22**, 27–38 (2003).
- 162. Dusoswa, S. A. *et al.* Glioblastomas exploit truncated O-linked glycans for local and distant immune modulation via the macrophage galactose-type lectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 3693–3703 (2020).
- 163. Cornelissen, L. A. M. *et al.* Tn Antigen Expression Contributes to an Immune Suppressive Microenvironment and Drives Tumor Growth in Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* **10**, 1–15 (2020).
- 164. Brooks, S. A. & Leathem, A. J. C. Expression of N-acetyl galactosaminylated and sialylated glycans by metastases arising from primary breast cancer. *Invasion and Metastasis* 18, 115–121 (1999).
- 165. Laferté, S., Prokopishyn, N. L., Moyana, T. & Bird, R. P. Monoclonal antibody recognizing a determinant on type 2 chain blood group A and B oligosaccharides detects oncodevelopmental changes in azoxymethane-induced rat colon tumors and human colon cancer cell lines. *J. Cell. Biochem.* **57**, 101–119 (1995).
- Campos, D. et al. Probing the O-glycoproteome of gastric cancer cell lines for biomarker discovery. Mol. Cell. Proteomics 14, 1616–1629 (2015).
- 167. Freitas, D. et al. O-glycans truncation modulates gastric cancer cell signaling and transcription leading to a more aggressive phenotype. EBioMedicine 40, 349–362 (2019).
- Wang, Y. et al. Cosmc is an essential chaperone for correct protein Oglycosylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 9228–9233 (2010).
- 169. Fu, Y. *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* **31**, 822–826 (2013).
- 170. Aryal, N. K., Wasylishen, A. R. & Lozano, G. CRISPR/Cas9 can mediate high-efficiency off-target mutations in mice in vivo. *Cell Death Dis.* **9**, 9–11 (2018).
- 171. Napoletano, C. *et al.* Targeting of macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) induces DC signaling and activation. *Eur. J. Immunol.* **42**, 936–945 (2012).
- van Vliet, S. J., Paessens, L. C., Broks-van den Berg, V. C. M., Geijtenbeek, T. B. H. & van Kooyk, Y. The C-Type Lectin Macrophage Galactose-Type Lectin Impedes Migration of Immature APCs. *J. Immunol.* 181, 3148–3155 (2008).
- 173. Kuczma, M. *et al.* Foxp3-deficient regulatory T cells do not revert into conventional effector CD4+ T cells but constitute a unique cell subset. *J. Immunol.* **183**, 3731–41 (2009).
- 174. Vahl, J. M. *et al.* Interleukin-10-regulated tumour tolerance in non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* **117**, 1644–1655 (2017).
- 175. Claffey, K. P., Senger, D. R. & Spiegelman, B. M. Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* **1246**, 1–9 (1995).
- Croci, D. O. et al. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. Cell 156, 744–58 (2014).

- 177. Borah, S., Vasudevan, D. & Swain, R. K. C-type lectin family XIV members and angiogenesis (Review). *Oncol. Lett.* **18**, 3954–3962 (2019).
- 178. Pirro, M. *et al.* Characterization of Macrophage Galactose-type Lectin (MGL) ligands in colorectal cancer cell lines. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1864**, (2020).

