



Evaluación de la presencia del antígeno Tn en cáncer de páncreas humano

Natalia Larisa Ansin Rando

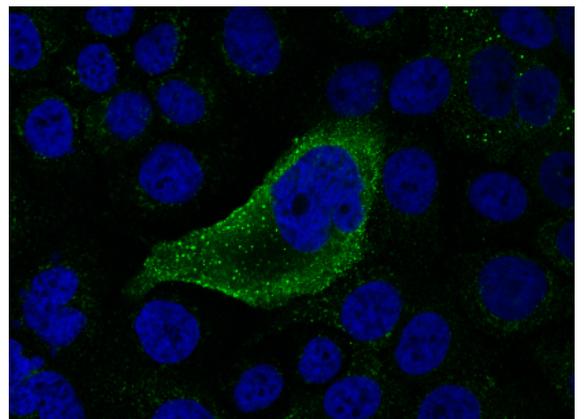
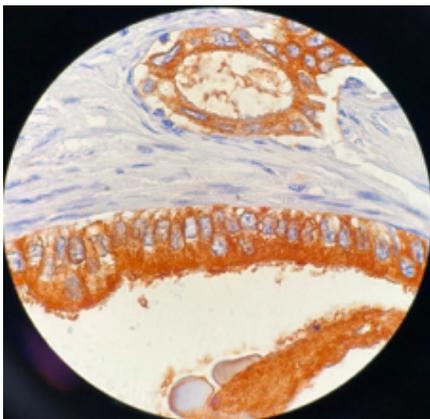
Tesina de grado- Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias Universidad
de la República (UDELAR)

Tutor: Dr. Álvaro Pittini

Co-tutor: Dr. Eduardo Osinaga

Instituto Pasteur de Montevideo, Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral

Diciembre 2021, Montevideo, Uruguay



AGRADECIMIENTOS

A mis tutores

Primero quiero agradecerle a mi tutor Álvaro Pittini, por su paciencia, esfuerzo y voluntad para enseñarme y corregirme. También quiero agradecerle a mi co-tutor, Eduardo Osinaga, por compartir su experiencia y conocimiento conmigo.

Eduardo, me abriste las puertas a tu laboratorio y me diste la oportunidad de crecer y hacerme más fuerte.

Álvaro, no solo me enseñaste las técnicas de experimentación y a escribir un documento científico, pero también contigo aprendí a superarme y fortalecerme. No son muchos los tutores que logran esto último.

A mi familia

Luego quiero agradecerles a mis padres, mi hermano, mis abuelos y mi pareja por el amor de todos los días. Los amo.

Mamá, Papá, me regalaron las herramientas, me enseñaron a usarlas y siempre me recordaron mi valor y de lo que soy capaz.

Andrés, sos el modelo de científico que trato de seguir y el modelo de hermano que trato de igualar.

Abuelos, mis soles. Me llenaron de amor y energía cada día.

Lea, me acompañaste durante el trayecto, felicitándome por los logros y ayudándome con mis debilidades. Un verdadero compañero de ruta.

A mis amigos

Al Instituto Pasteur de Montevideo y a la Universidad de la República, Facultad de Ciencias

Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Biología del Cáncer.....	5
1.2 Epidemiología del Cáncer.....	6
1.3 Antígenos asociados a tumores	8
1.3.1 Neoantígenos tumorales.....	8
1.3.2 Antígenos carbohidratos asociados a tumores (TACA)	8
1.3.3 Estructura Tn y antígeno Tn.....	9
1.3.4 Generación de la estructura Tn.....	9
1.3.5 Tn y desarrollo tumoral.....	10
1.3.6 Tn en cáncer de páncreas.....	14
1.4 Anticuerpos monoclonales.....	14
1.4.1 Anticuerpos anti-Tn.....	15
1.4.2 Anticuerpos recombinantes anti Tn.....	17
1.5 Un nuevo horizonte.....	18
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo general.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 Anticuerpos 83D4 y ChiTn.....	19
3.2 Evaluación de la presencia de antígeno Tn en líneas celulares tumorales de páncreas....	20
3.2.1 Cultivo celular y líneas comerciales.....	20
3.2.2 Ensayos de Western blot.....	21
3.2.3 Citometría de flujo.....	22
3.2.4 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	23
3.3 Evaluación de la presencia de antígeno Tn en tejidos tumorales de páncreas de pacientes.....	24

3.3.1 Ensayos de Inmunohistoquímica: Kit ABCAM.....	24
4. RESULTADOS	26
4.1 Estudio de la presencia del antígeno Tn en líneas celulares tumorales de páncreas.....	26
4.1.1 Evaluación de la expresión del antígeno Tn en lisados de líneas celulares tumorales de páncreas humano por Western blot a partir de su reconocimiento por 83D4.....	26
4.1.2 Evaluación de la presencia del antígeno Tn y su expresión sobre la membrana celular en líneas celulares tumorales de páncreas humano por Citometría de flujo a partir del anticuerpo 83D4.....	27
4.1.3 Estudio de la distribución celular del antígeno Tn en líneas celulares tumorales de páncreas humano por Inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo 83D4.....	31
4.1.4 Estudio del reconocimiento de líneas celulares de cáncer de páncreas humanas por Inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo ChiTn.....	35
4.2 Estudio del reconocimiento tumoral de páncreas por 83D4 en muestras de tejido de pacientes.....	38
4.2.1 Evaluación de la presencia del antígeno Tn en tejidos tumorales de páncreas de pacientes a partir de su reconocimiento por 83D4 por Inmunohistoquímica.....	38
4.2.2 Estudio de la distribución sub-tisular del antígeno Tn en tejido tumoral de páncreas a partir de su reconocimiento por 83D4	44
4.2.3 Estudio de la distribución sub-celular del antígeno Tn en tejido tumoral de páncreas humano por Inmunohistoquímica a partir de su reconocimiento por 83D4.....	46
5. DISCUSIÓN	48
5.1 Expresión del antígeno Tn en cáncer de páncreas reconocido por 83D4.....	48
5.2 Estudio comparativo del reconocimiento de líneas celulares tumorales de páncreas por los anticuerpos 83D4 y ChiTn.....	52
5.3 Distribución sub-celular y disposición del antígeno Tn.....	53
5.4 Estudio de la distribución sub-tisular del antígeno Tn reconocido por 83D4 en muestras de tejido tumoral de páncreas de pacientes oncológicos.....	54
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	55
7. ANEXO	56
8. BIBLIOGRAFÍA	63

RESUMEN

El cáncer de páncreas es uno de los tipos de cánceres con mayor incidencia, mortalidad y peor pronóstico tanto en hombres como en mujeres en el Uruguay y en el mundo, lo que refleja el bajo éxito en las estrategias de diagnóstico y terapia para estos tumores. No obstante, existe una variedad de nuevas opciones terapéuticas que se encuentran en diversas etapas de evaluación clínica. Varias de éstas son formas de inmunoterapia, ya sean vacunas o anticuerpos, que se dirigen a una variedad de marcadores de superficie expresados en células tumorales, y ausentes o expresados en menor medida en células sanas. Para el desarrollo de estas nuevas terapias dirigidas a tumores de páncreas, la identificación de nuevos biomarcadores asociados a cáncer de páncreas es crucial.

La molécula Tn (GalNAc-Ser/Thr) forma parte del grupo de antígenos carbohidratos asociados a tumores (TACA), los cuales se expresan en tejido tumoral maligno y se encuentran poco frecuentemente expresado en tejidos sanos. Por esta razón, el antígeno Tn tienen un gran potencial como blanco en diagnóstico y en terapias antitumorales dirigidas. En efecto, nuestro laboratorio, Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral del Instituto Pasteur de Montevideo, generó un anticuerpo murino IgM, denominado 83D4, que reconoce clústeres de 2 o 3 moléculas de Tn consecutivas, y otro anticuerpo quimérico recombinante humano denominado ChiTn IgG el cual deriva del anticuerpo 83D4.

En esta tesina se plantea estudiar la presencia y distribución del antígeno Tn reconocido por 83D4 y/o ChiTn en líneas celulares pancreáticas y en tejido tumoral de páncreas de pacientes, lo cual puede tener impacto en el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico temprano y nuevas inmunoterapias antitumorales dirigidas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biología del Cáncer.

El cáncer representa un conjunto de patologías malignas en las que un grupo de células del cuerpo prolifera anormalmente generando una masa celular que compromete al tejido sano (National Cancer Institute, 2021). Estas patologías son consecuencia de la adquisición de mutaciones por parte de las células malignas que perturban los programas de proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Hassanpour and Dehghani, 2017).

Las complejas características funcionales que permiten el crecimiento tumoral y la metástasis en células tumorales pueden ser resumidas, según Hanahan y Weinberg, en seis elementos fundamentales, o “*Hallmarks*” que incluyen: la resistencia a la muerte celular, el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de las señales supresoras del crecimiento, la inmortalidad replicativa, la inducción del proceso de angiogénesis y la capacidad de invadir otros tejidos para generar metástasis (D and RA, 2000) (Figura 1). Estas características distintivas son el blanco de terapias antitumorales, las cuales se detallan en la Figura 1.

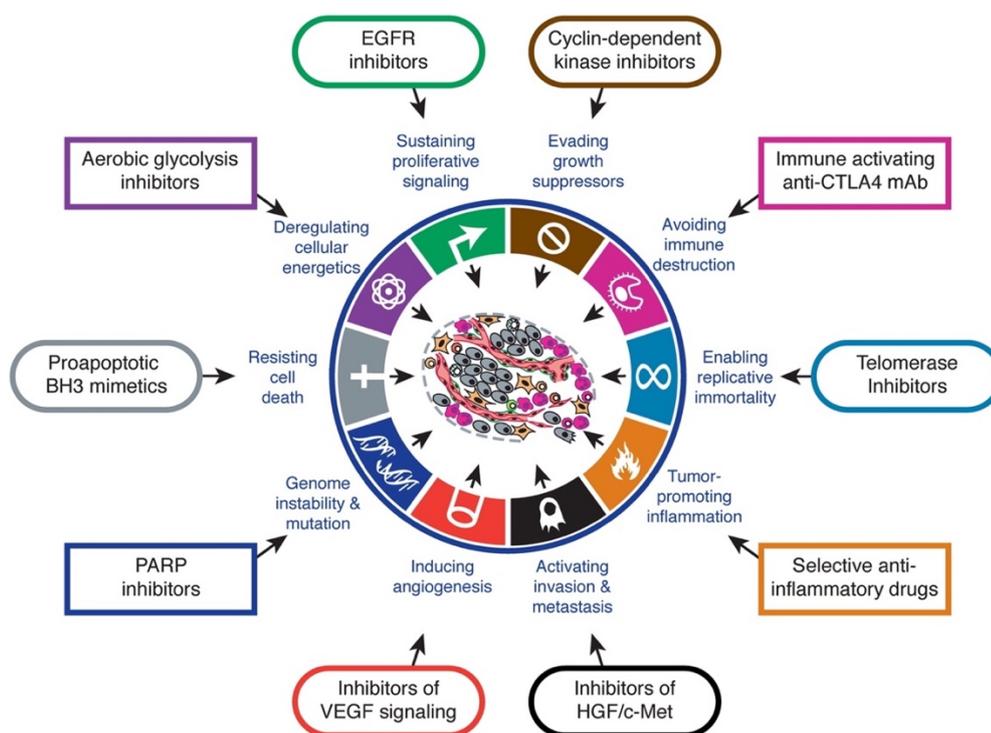


Figura 1. Los *Hallmarks* o sellos característicos del cáncer y las opciones terapéuticas basadas en estas distinciones. Se resumen las seis características fundamentales propuestas originalmente por Hanahan y Weinberg en el 2000 y las cuatro características sumadas posteriormente en el año 2011: la resistencia a la muerte celular, el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de las señales supresoras del

crecimiento, la inmortalidad replicativa, la inducción del proceso de angiogénesis, la capacidad de invadir otros tejidos para generar metástasis, promoción de un contexto inflamatorio favorable para el tumor, regulación del metabolismo energético e inestabilidad genómica. Estas características distintivas de las células tumorales permiten la progresión y el desarrollo, y estimulan la malignidad y la agresividad tumoral. Se han desarrollado terapias que interfieren con cada una de estas capacidades adquiridas necesarias para el crecimiento y la progresión del tumor. Algunas de estas terapias se ejemplifican en la figura. Muchas de ellas se encuentran aún en la etapa de ensayo clínico, aunque otras ya fueron aprobadas para su uso en el tratamiento de ciertas formas de cáncer humano (Hanahan and Weinberg, 2011).

Las características funcionales que permiten a las células tumorales sobrevivir, proliferar y diseminarse a través del organismo son adquiridas por diversos mecanismos a lo largo del desarrollo tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011). Según los autores, la adquisición de estas depende de dos características: la inestabilidad genómica y el contexto inflamatorio. La inestabilidad genómica promueve la adquisición y acumulación de mutaciones en los genes responsables de generar los *Hallmarks* antes mencionados. A su vez, el estado inflamatorio generado por las lesiones malignas promueve la infiltración de células inmunes contribuyendo a la formación de un microambiente que puede ser favorable para el desarrollo del tumor (Whiteside, 2008). El infiltrado de células inmunes puede ser determinado por el ambiente inducido por el tumor (Whiteside, 2008). De esta manera, se ha visto que en tumores malignos, el infiltrado de células inmunes se encuentra muchas veces enriquecido por células inmunosupresoras como los linfocitos T reguladores o las células inmunosupresoras de origen mieloide, las cuales promueven la tolerancia inmune hacia el tumor y previenen la destrucción de las células malignas (Noy and Pollard, 2014) (Whiteside, 2008). A su vez, la inflamación puede contribuir al desarrollo de algunos *Hallmarks* aportando moléculas bioactivas al microambiente tumoral tales como factores de crecimiento, señales de supervivencia y factores proangiogénicos entre otros (Hanahan and Weinberg, 2011).

1.2 Epidemiología del Cáncer

En la actualidad, el cáncer constituye uno de los desafíos sanitarios más problemáticos, representando la segunda causa de muerte a nivel mundial. La incidencia global del cáncer continúa en aumento, estimándose que el número de casos nuevos pasará de 14 millones en 2012, a más de 20 millones para el año 2030 (World Cancer Report, 2014). En Uruguay, aproximadamente un cuarto (24.2%) del total de las defunciones anuales se adjudican al cáncer (Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2021).

El cáncer de páncreas es uno de los tipos de cánceres de mayor mortalidad e incidencia tanto en mujeres como en hombres en el Uruguay (Figura 2). En efecto, en Uruguay, junto con la República de Moldova, se registraron las tasas de mortalidad por cáncer de páncreas más altas en el 2018 (Rawla, Sunkara and Gaduputi, 2019). En mujeres, el cáncer de páncreas es el séptimo tipo de cáncer más frecuente y ocupa el cuarto lugar en mortalidad por cáncer. En cambio, en hombres, el cáncer de páncreas es el octavo tipo de cáncer más frecuente y el quinto tipo de cáncer de mayor mortalidad (Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2021)(Figura 2). Estas estadísticas reflejan la falta de estrategias de diagnóstico de tumores en etapas tempranas y la baja eficiencia de las terapias antitumorales que se utilizan para tratar este tipo de cáncer.

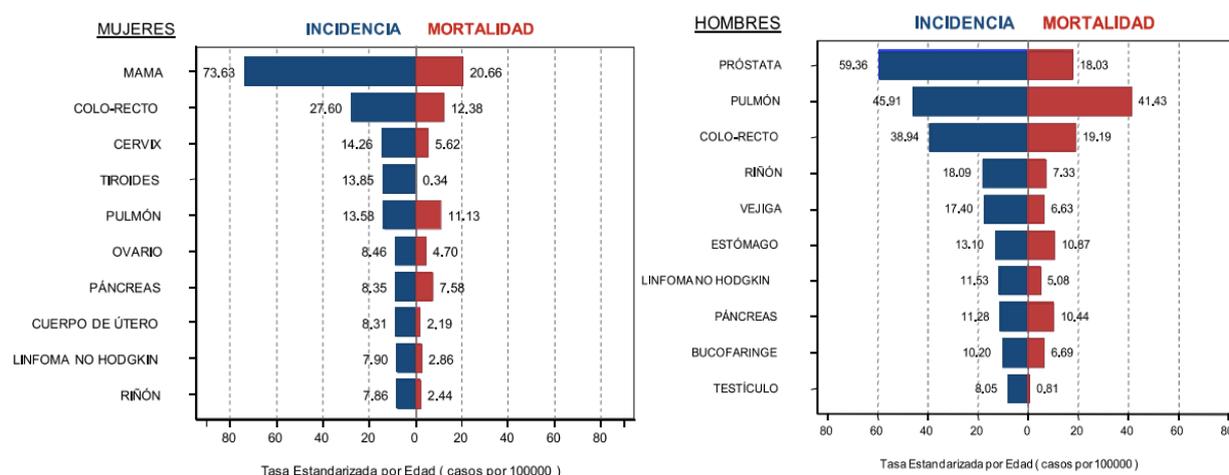


Figura 2. Incidencia y mortalidad de los principales tumores en Mujeres y Hombres en el período 2013-2017. En Uruguay, el cáncer de páncreas se encuentra dentro de los 10 tipos de cánceres de mayor incidencia y mortalidad tanto en mujeres como en hombres (Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2021).

Las tasas de incidencia de cáncer de páncreas han aumentado alrededor de un 1% cada año desde el año 2000 (American Society of Clinical Oncology, 2021). Según estadísticas recientes de la Sociedad Americana Contra El Cáncer, en los Estados Unidos, si el tumor es detectado en etapas tempranas (tumor menor a 2 cm de diámetro lo cual ocurre en el 11% de los casos) este se puede extirpar. Para estos pacientes a los que se les haya realizado la cirugía, la tasa de supervivencia a 5 años es de 39%. De lo contrario, para tumores avanzados en etapa metastásica, la tasa de supervivencia a 5 años es del 13% (American Society of Clinical Oncology, 2021). Por lo tanto, el escenario para pacientes con cáncer de páncreas es poco alentador, por lo que es de gran interés el estudio y desarrollo de técnicas de detección temprana de tumores pancreáticos y terapias antitumorales efectivas.

1.3 Antígenos asociados a tumores

En los últimos años se han investigado nuevas herramientas de diagnóstico o terapia que permitan seleccionar específicamente células tumorales, y direccionar hacia las mismas ya sea moléculas reporteras (radioisótopos o fluorocromos), para el diagnóstico temprano de tumores, como drogas para su tratamiento. Este tipo de estrategias direccionadas pueden ser de gran relevancia clínica, en especial para cánceres de detección tardía y/o baja tasa de respuesta a tratamientos, pero exigen la identificación de blancos moleculares específicos de tumores. Por esta razón, se han dedicado muchos esfuerzos a la búsqueda de moléculas expresadas en células tumorales y ausentes, o de expresión disminuida, en tejido sano.

1.3.1 Neoantígenos tumorales

Los neoantígenos tumorales son antígenos que se expresan únicamente en células tumorales y están completamente ausentes en tejido sano (Zhang *et al.*, 2021). Los neoantígenos se generan a partir de alteraciones en el código genético (mutaciones) que generan proteínas modificadas en las células tumorales durante el desarrollo y la progresión tumoral (Jiang *et al.*, 2019). La expresión de neoantígenos tumorales diferencia a las células sanas de las células malignas y por lo tanto, una gran variedad de terapias antitumorales tales como vacunas o la manipulación de células inmunes (como la terapia basada en células CAR-T), se basan en el reconocimiento de estos neoantígenos (Zhang *et al.*, 2021)(Jiang *et al.*, 2019).

1.3.2 Antígenos carbohidratos asociados a tumores (TACA)

Además de los neoantígenos tumorales, otras moléculas pueden expresarse diferencialmente en células tumorales y en células sanas. La glicosilación alterada es una característica común de las células tumorales y conduce a la formación de antígenos carbohidratos asociados a tumores (TACA) (Mantuano *et al.*, 2020). La generación de motivos carbohidratos alterados presentes en algunas células tumorales se asocian a tres eventos característicos: a) aumento de la expresión de glicanos truncados o incompletos, b) aumento de la ramificación de N-glicanos, y c) aumento o cambio de la presencia de glicanos que contienen ácido siálico. Estas modificaciones son el resultado de alteraciones en las vías de síntesis de glicanos, causadas por cambios en la expresión o actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis de glicoproteínas (Ajit Varki *et al.*, 2017).

1.3.3 Estructura Tn y antígeno Tn

La molécula carbohidrato conocida como Tn, perteneciente al grupo de los TACA, es una estructura glicosídica cuya expresión se asocia a la progresión de tumores y tasas de supervivencia bajas en pacientes (Y *et al.*, 2020). Se ha estimado que el 90% de todos los adenocarcinomas expresan Tn, mientras que su presencia en tejido sano es poco frecuente (Kudelka *et al.*, 2015).

La estructura Tn consiste en un residuo de acetilgalactosamina (GalNAc) unido a un residuo de Serina (Ser) o Treonina (Thr) del esqueleto peptídico (GalNAc-Ser/Thr) (Bennett *et al.*, 2012). Aunque Tn se expresa en algunos estadios del desarrollo fetal humano, no se encuentra generalmente expresado en células de adultos sanos (Sadraei, Reynolds and Trant, 2017). Por esta razón, utilizar a Tn resulta de gran atractivo para el desarrollo de terapias y diagnósticos dirigidos hacia tumores basados en anticuerpos.

1.3.4 Generación de la estructura Tn

En células tumorales, los productos de glicosilación generalmente se encuentran modificados debido a alteraciones en las vías de biosíntesis de carbohidratos. Normalmente, el proceso de O-glicosilación inicialmente es catalizado por la UDP-GalNAc transferasa (GalNAc-T) que transfiere el glúcido GalNAc co-activado por UDP al esqueleto peptídico (Bennett *et al.*, 2012). Luego, una serie de O-glicotransferasas agregan grupos adicionales completando el esqueleto carbohidrato de las glicoproteínas (Brockhausen, 2006) (Figura 3). En algunos tumores se ha identificado que tanto la ubicación, los niveles de expresión, así como la actividad de las glicotransferasas se encuentran modificadas (Andergassen *et al.*, 2015). En particular, la expresión o actividad alterada de algunas O-glicotransferasas pueden resultar en la generación de Tn (Cascio and Finn, 2016) (Figura 3). Por ejemplo, se ha reportado que la expresión alterada de la transferasa C1GalT1, que adiciona un residuo de Galactosa al residuo GalNAc, genera un aumento en la expresión de la molécula Tn en células tumorales pancreáticas (Cascio and Finn, 2016). A su vez, la actividad de la C1GalT1 requiere de la molécula chaperona *Cosmc* para su actividad (Ju *et al.*, 2014). En efecto, la disminución de la expresión de *Cosmc* se correlaciona con alta expresión de Tn (Ju *et al.*, 2002).

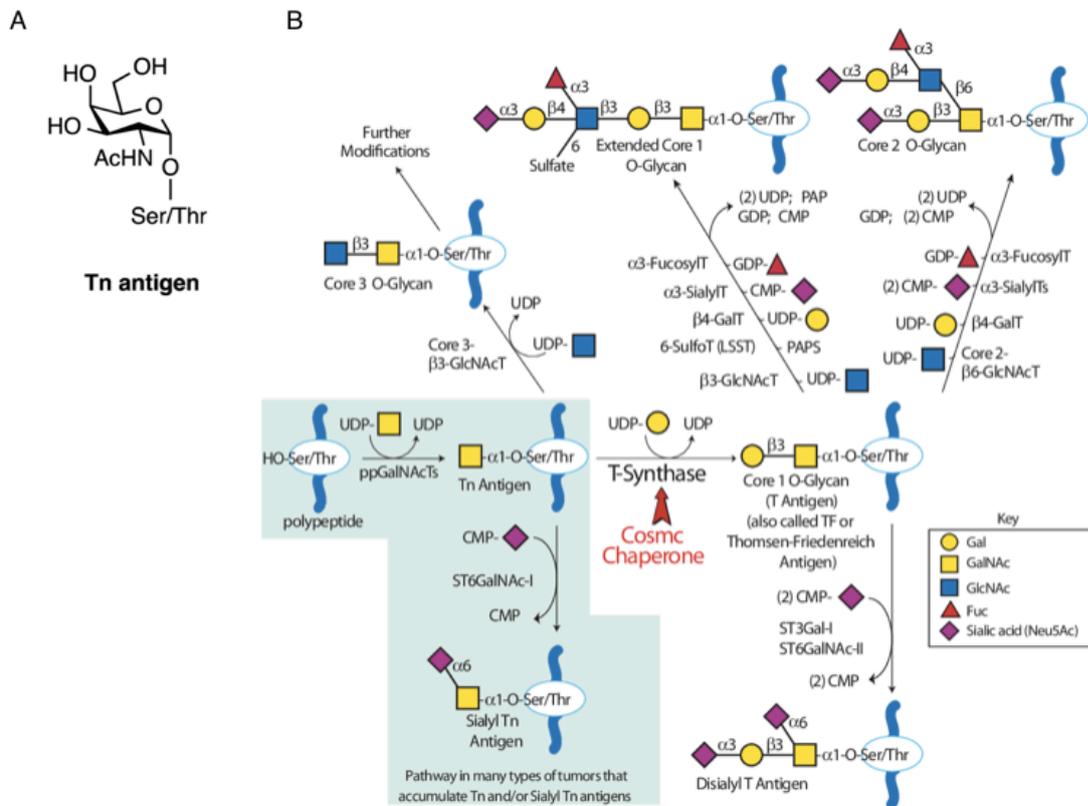


Figura 3. Vía de biosíntesis de O-glicanos, estructura y generación de Tn. A: Estructura Tn. B: Vía de generación de Tn. La biosíntesis de glicoproteínas comienza en el Retículo Endoplasmático (RE) donde se agregan N-glicanos co-traduccionalmente. La O-glicosilación se inicia normalmente en el aparato de Golgi, con el agregado de una molécula de N-acetilgalactosamida (GalNAc) a residuos Serina o Treonina del esqueleto peptídico. Posteriormente, la transferasa C1GalT1 (T-sintasa) transfiere un residuo de galactosa (Gal) co-activado con UDP al precursor común GalNAc-Ser/Thr (Tn) para generar el núcleo Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr. A partir de este núcleo, las ramificaciones glicosídicas se amplían mediante la adición de otros azúcares para generar los O-glicanos expresados en células sanas. En algunas células tumorales, la función alterada de la chaperona molecular *Cosmc*, que es necesaria para la actividad de C1GalT1, promueve la expresión del antígeno Tn. (Ju *et al.*, 2014)

1.3.5 Tn y desarrollo tumoral

La expresión de Tn en tumores se ha asociado a aumento en la malignidad y capacidad metastásica, baja supervivencia y mala prognosis en modelos murinos de cáncer (Ju *et al.*, 2002) (Chugh *et al.*, 2018). También se ha reportado que la inducción de la expresión de Tn mediante mutaciones en la chaperona *Cosmc* en líneas celulares de cáncer de páncreas se correlaciona con la disminución en la capacidad proliferativa, aumento en la migración y disminución en la apoptosis celular (Hofmann *et al.*, 2015).

Existen muchas formas en la que las alteraciones en la glicosilación inducen cambios a nivel celular. La alteración en los patrones glicosídicos de las proteínas de membrana celulares altera las funciones de estas últimas. Estos cambios pueden conducir a un plegamiento incorrecto de las glicoproteínas, oligomerización anormal, inestabilidad, proteólisis, pérdida de función y reconocimiento anormal por las proteínas de unión a glicanos (GBP) (Ju *et al.*, 2014). En particular, se ha demostrado que frecuentemente, la glicosilación aberrante de algunos receptores de la membrana celular promueve su oligomerización y perturba las cascadas de señalización celular (Figura 5) (Stowell, Ju and Cummings, 2015). A su vez, las vías de señalización alteradas pueden comprometer los mecanismos normales de apoptosis, control de proliferación y diferenciación, resultando en aumento de la metástasis, malignidad y agresividad de los tumores (Stowell, Ju and Cummings, 2015) (Figura 5). De hecho, se ha reportado que la función alterada de la C1GalT1, responsable del aumento en la expresión de Tn, se relaciona directamente con aumento en la motilidad, capacidad metastásica y agresividad de líneas tumorales de páncreas ductal (Cascio and Finn, 2016). Asimismo, se ha demostrado que la translocación de las GalNac-T desde el aparato de Golgi al Retículo Endoplasmático (ER) causa la acumulación del antígeno Tn en los lamelipodios de la superficie celular y promueve un aumento en la movilidad y adhesión celular (Matsumoto *et al.*, 2020), lo cual podría encontrarse relacionado con el aumento en la movilidad celular inducido por el aumento en la expresión de Tn en células malignas.

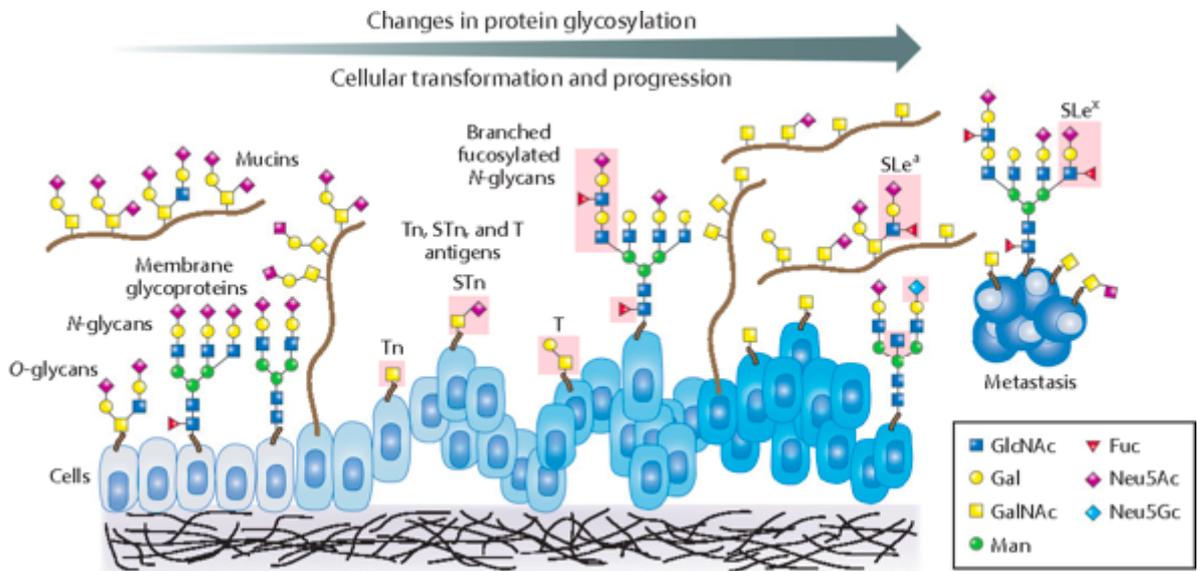


Figura 4. Representación de posibles aberraciones glicosídicas en la progresión tumoral. Durante la transformación celular, los cambios en la glicosilación de proteínas en la membrana y las glicoproteínas solubles, como las mucinas, son típicos y pueden ocurrir tanto al principio como al final de la carcinogénesis, aunque este fenómeno no está del todo elucidado. Los diferentes tipos de cambios se muestran en las áreas encuadradas en rosa, destacando los cambios en los O-glicanos (antígenos T, Tn y STn) y la expresión alterada de los N- y O-glicanos ramificados. Abreviaturas: Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; GlcNAc, N-acetilglucosamina; Man, manosa; Neu5Ac, ácido 5-N-acetilneuraminico ; Neu5Gc, ácido 5-N-glicolilneuramínico; SLe, sialil Lewis; STn, sialil Tn. (Stowell, Ju and Cummings, 2015)

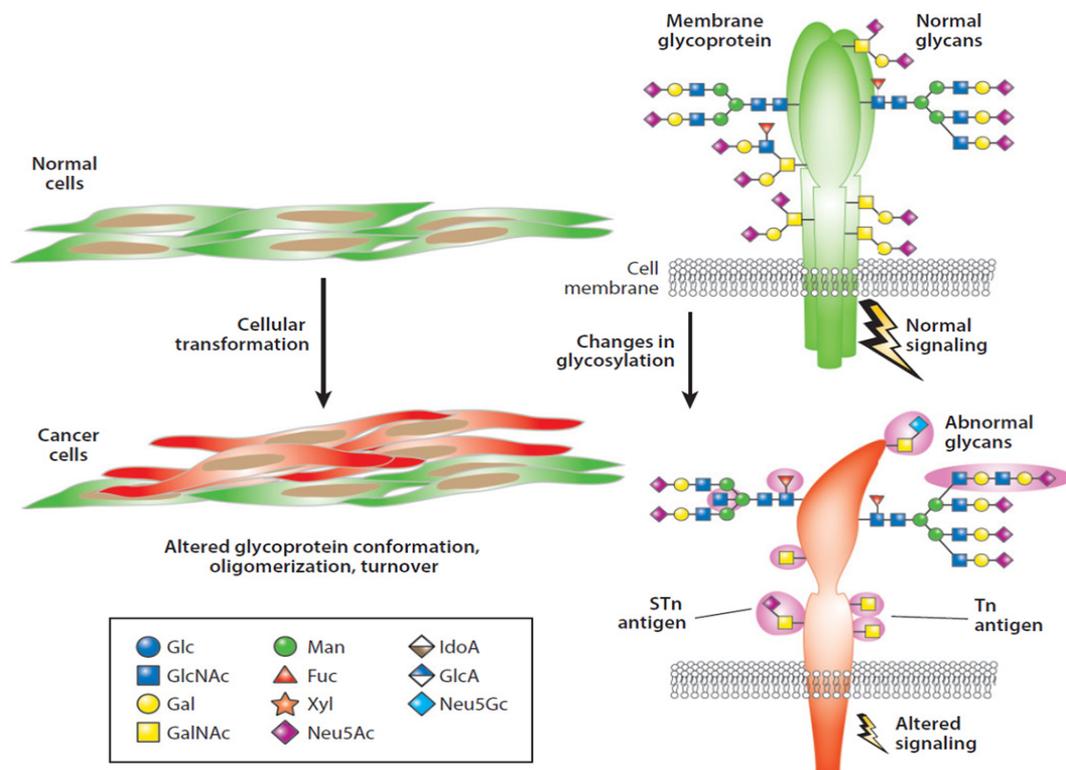


Figura 5. Mecanismo de señalización alterada por glicosilación truncada de receptores de membrana celular. La transformación celular a lo largo del desarrollo y progresión tumoral se asocia generalmente a cambios en los patrones glicosídicos de moléculas de membrana. Esto puede resultar en cambios conformacionales, oligomerizaciones y cambios en la disposición de los glicanos modificados, lo cual se asocia a alteraciones en algunas vías de señalización. Abreviaciones: Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; Glc, glucosa; GlcA, ácido glucurónico; IdoA, ácido idurónico; Man, manosa; Neu5Ac, ácido 5-N-acetilneuramínico; Neu5Gc, ácido 5-N-glicolilneuramínico; STn, sialil Tn; Xyl, xilosa. (Stowell, Ju and Cummings, 2015).

El contexto inflamatorio y/o el microambiente tumoral muchas veces se encuentra asociado a la adquisición de las características tumorales, *Hallmarks*, que promueven el desarrollo y la progresión tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011). Como se mencionó anteriormente, el perfil de células infiltradas y moléculas de señalización en el microambiente tumoral puede promover la malignidad y agresividad tumoral. Recientemente, se ha demostrado que la expresión de Tn podría inhibir la respuesta inmune antitumoral disminuyendo el infiltrado de células linfoides citotóxicas y células mieloides antitumorales y aumentando el número de células inmunorreguladoras en cáncer colorrectal (Cornelissen *et al.*,

2020). Además, se ha reportado que la presencia de Tn promueve el crecimiento de tumores pulmonares, al fomentar la inmunosupresión y la angiogénesis a través de la interacción con el receptor lectina 2 de macrófagos (MGL2) (da Costa *et al.*, 2021). Por lo tanto, el aumento en la expresión de Tn promueve un microambiente tumoral supresor y contribuye a la evasión inmune y la progresión tumoral, lo cual sugiere que Tn podría ser un posible biomarcador de agresividad en diagnóstico.

1.3.6 Tn en cáncer de páncreas

En la actualidad existen pocos estudios publicados de la presencia de Tn en cáncer de páncreas. Es importante aclarar que hasta el momento la literatura sobre la expresión de Tn en tejido de páncreas sanos es contradictoria. Un estudio realizado con la lectina VVL (Vicia Villosa Lectin) reporta la ausencia de Tn en tejido de páncreas sano (Munkley, 2019). Por otra parte, se ha reportado la presencia de esta molécula en tejido de páncreas sano, así como en tejido de pacientes con cáncer pancreático utilizando la lectina VVL (Itzkowitz *et al.*, 1991a). La lectina VVL reconoce al monómero de la molécula de Tn (GalNAc) con moderada afinidad (Cummings and Etzler, 2009). Algunos investigadores sugieren que si bien es posible encontrar monómeros de Tn en tejidos sanos, otros antígenos Tn, como los *clústeres* de Tn (glicosilaciones consecutivas de 2 o 3 moléculas de Tn sobre un esqueleto peptídico) se asocian en mayor medida a las células tumorales (Mazal *et al.*, 2013).

Dada la falta de terapias antitumorales efectivas para el tratamiento de cáncer de páncreas, es de gran interés evidenciar la expresión diferencial de *clústeres* de Tn en tejido pancreático tumoral y en tejido pancreático sano para el desarrollo de nuevas estrategias inmunes antitumorales. De esta manera, en esta tesina, se plantea el estudio de la presencia de *clústeres* de Tn en células y tejidos pancreáticos tumorales para su posible uso como dianas inmunológicas.

1.4 Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos producidos por clones de una única célula B hacia un antígeno específico. Para su generación, se inmuniza un modelo animal con el antígeno hacia el cual se quiere dirigir el anticuerpo y luego se aíslan clones de linfocito B productores de anticuerpo. Finalmente, se selecciona un clon con afinidad y/o especificidad deseada hacia dicho antígeno y se fusiona con células de mieloma para la generación de

hibridomas, células B inmortalizadas productoras de anticuerpos monoclonales (García Merino, 2011).

Existen diferentes estrategias terapéuticas y de diagnóstico dependientes de anticuerpos monoclonales cuyos blancos se asocia a antígenos tumorales. Entre ellas destaca el direccionamiento de drogas citotóxicas conjugadas a anticuerpos específicos contra células tumorales (Tivadar *et al.*, 2020) y la inducción de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (Brandsma *et al.*, 2019). A su vez, es importante destacar el rol de dichos anticuerpos en el diagnóstico clínico de cáncer (Zhang *et al.*, 2014).

En las últimas décadas, se han realizado muchos estudios utilizando anticuerpos monoclonales contra antígenos tumorales para el diagnóstico y tratamiento de tumores malignos. La identificación y análisis de antígenos tumorales es un campo de gran importancia, ya que estos pueden ser utilizadas como dianas inmunológicas para generar herramientas como la producción de anticuerpos y-o fragmentos de anticuerpos específicos contra células tumorales.

1.4.1 Anticuerpos anti-Tn

La estructura Tn tiene un gran potencial como blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer por su particular expresión en tejidos malignos y su ausencia de expresión en la mayoría de los tejidos sanos. Existe una amplia variedad de anticuerpos dirigidos hacia estructuras Tn (antígenos Tn) tales como: MLS128 (Sakai *et al.*, 2010), L2A5 (Loureiro *et al.*, 2018), 2A10, 9A7, 6E11, 15G9 (Mazal *et al.*, 2013).

Las estructuras Tn se caracterizaron utilizando tanto anticuerpos monoclonales específicos (MAb) como lectinas, pero estos enfoques diferentes conducen a un reconocimiento muy variable de las células tumorales. Como se explicó anteriormente, se ha demostrado mediante estudios realizados con la lectina VVL, que el antígeno Tn reconocido por esta molécula, se expresa en células acinares pancreáticas sanas (Itzkowitz *et al.*, 1991b), mientras que, por lo contrario, dos anticuerpos monoclonales anti-Tn (TEC-02 y 12A8-C7-F5) no reconocieron tejidos sano de páncreas (Cao *et al.*, 1996). Los epítopes reconocidos por anticuerpos anti-Tn pueden variar en gran medida. De hecho, además del papel desempeñado por la densidad de Tn, los residuos de aminoácidos O-glicosilados (Ser vs Thr) así como el esqueleto peptídico vecino podrían ser factores importantes que modulan la estructura del

epítope de Tn (Mazal *et al.*, 2013). Por lo tanto, es importante definir el epítope (la naturaleza del antígeno Tn) reconocido por cada anticuerpo anti-Tn.

Nuestro laboratorio (Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral del Instituto Pasteur de Montevideo), presenta una amplia trayectoria en el estudio y la generación de anticuerpos contra el antígeno Tn (Osinaga *et al.*, 1997) (Babino *et al.*, 2003). En particular, el anticuerpo monoclonal 83D4, IgM de origen murino, generado por nuestro laboratorio, demostró reconocer al epítope constituido por GalNAc-O-Ser/Thr (Medeiros *et al.*, 2000) (Osinaga *et al.*, 2000). Diferentes estudios reportaron que este anticuerpo murino reconoce un 90% de carcinomas de mama, colon, ovario y pulmón (Figura 6) (Mazal *et al.*, 2013). Nuestro equipo logró analizar los patrones moleculares involucrados en el reconocimiento de Tn por 83D4. El anticuerpo 83D4 reconoce *clústeres* compuestos por dímeros o trímeros de Tn (a lo cual nos referiremos de aquí en adelante como antígeno Tn), y no a monómeros de Tn aislados (Medeiros *et al.*, 2000) (Osinaga *et al.*, 2000). Por lo tanto, el anticuerpo 83D4 es una herramienta clave en el estudio de la expresión de *clústers* de Tn, a diferencia de otros anticuerpos o lectinas como la VVL.

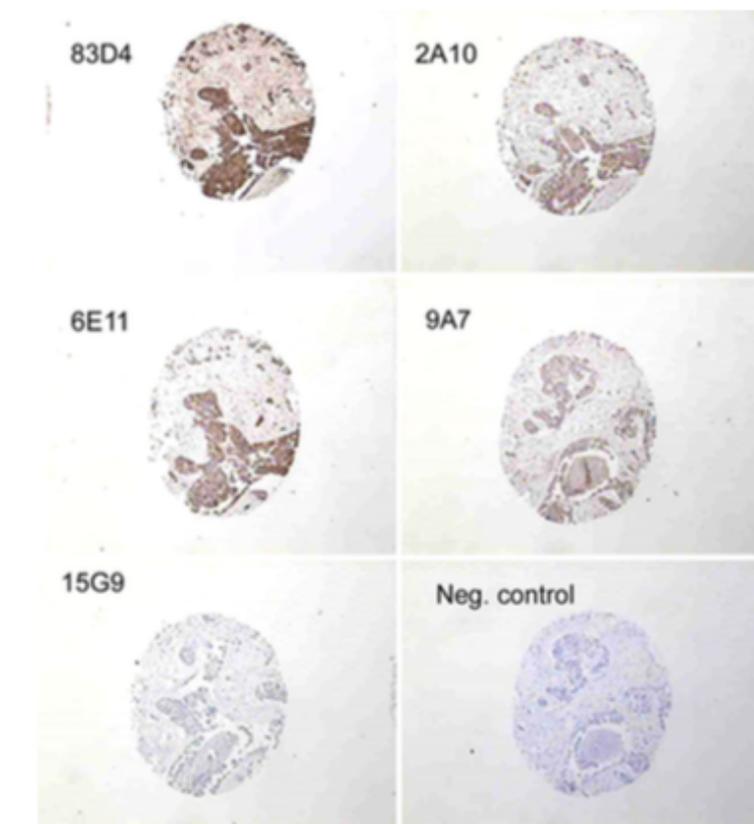


Figura 6. Reconocimiento de Tn por inmunohistoquímicas según diferentes anticuerpos monoclonales, incluyendo 83D4 (Mazal *et al.*, 2013). El anticuerpo monoclonal 83D4 ha reportado un fuerte reconocimiento de tejido tumoral de mama en relación a otros anticuerpos monoclonales contra estructuras Tn. Se observa un análisis de la expresión del antígeno Tn en tumores de mama humanos a partir de su reconocimiento por los anticuerpos monoclonales 83D4, 2A10, 6E11 y 9A7, y un anticuerpo monoclonal inespecífico como su control negativo. El anticuerpo 83D4 reconoció todas las muestras de tumores de mama, reconoció las muestras de cáncer de colon con mayor sensibilidad y fue el único anticuerpo que logró reconocer material secretado.

1.4.2 Anticuerpos recombinantes anti Tn

Los anticuerpos son proteínas que consisten en una región constante denominada Fc, la cual es compartida por todos los anticuerpos de un mismo isotipo y una región variable, Fab, la cual difiere entre todos los anticuerpos y contiene al parátipe, la región del anticuerpo que reconoce al antígeno (García Merino, 2011). Un anticuerpo monoclonal contendrá las regiones Fab y Fc derivadas del organismo inmunizado. Al administrar a un paciente un anticuerpo monoclonal producido en un modelo animal, este anticuerpo, debido a su origen, puede ser reconocido como exógeno y estimular una respuesta inmune en el paciente. A su vez, la mayoría de los mecanismos efectores de los anticuerpos radican en la región constante Fc y en

su reconocimiento por sus receptores inmunes. Esta región, con gran variabilidad entre especies, es capaz de interactuar con los receptores Fc celulares (RFc) y estimular los mecanismos celulares dependientes de anticuerpos tales como la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), opsonización y la activación celular. A su vez, las regiones Fc pueden interactuar con receptores Fc solubles, como el sistema de complemento, desencadenando la respuesta inmune. Por lo tanto, la administración de un anticuerpo monoclonal murino, como 83D4, en un paciente humano podría desencadenar una reacción inmune no deseada y fallaría en activar los mecanismos inmunes deseados. Una estrategia para resolver esto es la producción de anticuerpos recombinantes quiméricos.

Los anticuerpos quiméricos se generan a partir de las regiones variables de anticuerpos producidos en una especie determinada, y las regiones constantes Fc de otra especie. En efecto, en nuestro laboratorio, se diseñó por ingeniería genética un anticuerpo quimérico IgG humano (denominado, ChiTn) a partir del anticuerpo monoclonal murino 83D4 (Oppezzo *et al.*, 2000a). Este anticuerpo mostró un perfil de reconocimiento de Tn similar al del anticuerpo 83D4 murino (Oppezzo *et al.*, 2000a). Además, se ha demostrado en modelos animales de cáncer de mama, que la administración de ChiTn, junto con ciclofosfamida, promueve remisiones tumorales completas en el 90% de los animales (Hubert *et al.*, 2011).

1.5 Un nuevo horizonte

En el presente, existen pocos biomarcadores para las formas más comunes de tumores pancreáticos (Hasan *et al.*, 2019) (Giannis, Moris and Barbas, 2021) (Trabbic *et al.*, 2019). Además, las opciones terapéuticas para estos tumores, tanto tempranos como avanzados, se limitan a algunos quimioterapéuticos que no han cambiado durante varios años. No obstante, existe una variedad de nuevas opciones terapéuticas que se encuentran en diversas etapas de desarrollo. Varias de éstas son inmunoterapias, ya sean vacunas o anticuerpos, que se dirigen a una variedad de biomarcadores de superficie de membrana específicos del cáncer, como los TACA (Trabbic *et al.*, 2019). Por ejemplo, la molécula glicosídica Sialil Lewis CA 19-9 se expresa en gran medida en células de carcinoma pancreático (CP). Weitzenfeld y col. utilizaron anticuerpos dirigidos a CA 19-9 producidos a partir del suero de pacientes inmunizados con una vacuna de CA 19-9/hemocianina de lapa californiana (KLH) para proteger con éxito a los ratones de la progresión del CP (Weitzenfeld, Bournazos and Ravetch, 2019).

A pesar de los esfuerzos realizados para el desarrollo de inmunoterapias efectivas para el tratamiento de cáncer de páncreas, las opciones hasta ahora son muy limitadas (Weitzenfeld,

Bournazos and Ravetch, 2019). Por lo tanto, la identificación de nuevos biomarcadores asociados a cáncer de páncreas es crucial. En esta tesina se planea estudiar la presencia y distribución del antígeno Tn en líneas celulares pancreáticas y en tejido tumoral de páncreas de pacientes, a partir de los anticuerpos 83D4 y ChiTn los cuales reconocen *clústeres* de 2 o 3 moléculas de Tn. Evidenciar la presencia de estos biomarcadores en carcinoma pancreático podría permitir el desarrollo de estrategias de diagnóstico y nuevas inmunoterapias antitumorales dirigidas contra el antígeno Tn.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la presencia del antígeno Tn tanto en líneas celulares como en tejidos tumorales de páncreas humanos.

2.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la presencia del antígeno Tn en líneas celulares de cáncer de páncreas humanos mediante la técnica de Western blot utilizando el anticuerpo 83D4.
2. Evaluar la presencia en superficie celular del antígeno Tn en líneas celulares de cáncer de páncreas humanos mediante la técnica de Citometría de flujo utilizando el anticuerpo 83D4.
3. Evaluar la distribución celular del antígeno Tn en líneas celulares de cáncer de páncreas humanos mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo 83D4.
4. Evaluar la reactividad del anticuerpo ChiTn en líneas celulares de cáncer de páncreas humanos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.
5. Evaluar la presencia del antígeno Tn en muestras de tejidos tumorales de páncreas humanos mediante la técnica de Inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo 83D4.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Anticuerpos 83D4 y ChiTn

Los anticuerpos monoclonales 83D4 y ChiTn fueron producidos en nuestro laboratorio y cedidos por la Dr. Nora Berois, se trabajó en el formato de sobrenadante sin diluir.

3.2 Evaluación de la presencia del antígeno Tn en líneas celulares tumorales de páncreas

3.2.1 Cultivo celular y líneas comerciales

Se estudiaron las líneas comerciales de cáncer de páncreas BXPC3, L3.6 y T3M4 (Tabla S1) cedidas por el laboratorio del Dr. Francisco X. Real, del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, España. Para el medio de cultivo se utilizó medio comercial DMEM enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco 16000-044), 2mM L-glutamina (Gibco 56-85-9) y 1mM Piruvato de Sodio (Gibco 11360-070), en estufa a 37°

Celsius y 5% CO₂. Las células fueron almacenadas en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) 10% en SFB en congeladores a -80° Celsius. Para iniciar el cultivo de células congeladas, las células fueron descongeladas rápidamente a 37° Celsius y lavadas con buffer fosfato salino (PBS, pH 7.2). El lavado consiste en resuspender las células en un volumen 10 veces mayor de PBS estéril y centrifugar a 400 g por 5 minutos, descartando el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en medio de cultivo DMEM enriquecido como se mencionó anteriormente.

El desprendimiento de la monocapa para los pasajes celulares se realizó lavando la monocapa celular adherida a la placa de cultivo con PBS estéril y luego incubándolas con una solución de Tripsina EDTA 0.25% (Life Technologies) durante 1 a 5 min a 37° C hasta observar el desprendimiento de la monocapa adherida. Luego, se neutralizó el volumen de Tripsina añadido con un volumen equivalente de medio enriquecido. Esta suspensión de células fue lavada con PBS mediante centrifugación a 400 g por 5 minutos y el *pellet* de células se resuspendió en medio enriquecido. Para su almacenamiento, se desprendió la monocapa celular con Tripsina EDTA 0.25% (como se explicó anteriormente) y por último se resuspendieron las células en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) 10% en SFB e incubadas 1 hora a -20° Celsius. Finalmente, se almacenaron en congeladores a -80° Celsius.

El conteo de células se realizó utilizando la cámara de *Neubauer* a partir del marcado con TripanBlue. Para esto, se agregaron 20 uL de la suspensión de células en PBS , 20 uL de Azul de tripano 0.5% (Sigma 72-57-1) a 160 uL de PBS. Se sembraron aproximadamente 7-10 uL de la suspensión coloreada en la cámara de *Neubauer* y se contaron el número de células vivas (diferenciadas de las muertas por su falta de coloración azul) en 4 cuadrantes de la cámara.

La concentración celular se obtuvo según la ecuación:

$$\frac{\text{células}}{\text{ml}} = \frac{\# * (10.000) * \text{Factor de dilución}}{4}$$

Donde # es el número de células contadas en los 4 cuadrantes y el factor de dilución es el volumen total de la suspensión celular en TripanBlue dividido el volumen de suspensión inicial de las células (en este caso el factor de dilución es 10 ya que se tomaron 20 uL de la suspensión inicial celular y se resuspendieron en un volumen final de 200uL).

3.2.2 Ensayos de Western Blot

Los extractos celulares se generaron a partir de células BXPC3, T3M4 y L3.6 en fase de crecimiento (confluencia menor a 95%). Las células se resuspendieron con Tripsina y se lavaron 2 veces con PBS centrifugando a 400 g durante 5 minutos y se contaron (como se mencionó anteriormente). El *pellet* celular se resuspendió en 1 mL de buffer de lisis hipotónico (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, pH 7.0 complementado con inhibidores de proteasas [protease Inhibitor Mix- GE Healthcare Life Sciences]) cada 5×10^6 células vivas. La suspensión fue incubada 20 minutos en hielo, homogeneizando con *vortex* cada 5 minutos. Luego, los lisados fueron sonicados (Sonicador Branson Ultrasonic Sonifier S-450) en 6 pulsos de 10 segundos a 15% de amplitud espaciados por 10 segundos de descanso. El extracto se centrifugó a 14000 g por 10 minutos a 4° Celsius y el sobrenadante se almacenó a -80° Celsius.

La concentración proteica se midió por el método de Bradford. En una placa de 96 pocillos de fondo plano, se sembraron 150 uL de reactivo de Bradford (Sigma B6916) y 5 uL de la solución de lisado celular sin diluir y diluida 1:10 y 1:100. A su vez, en paralelo se realizó una curva estándar sembraron diluciones de la solución patrón de BSA (Sigma, 9048-46-8) de 0 a 2 mg/mL. Luego se midió la absorbancia a 650 nm en el espectrofotómetro de placas ThermoScientific Multiskan FC.

Una vez conocida la concentración de los extractos celulares generados, 40 ug de proteínas de los extractos celulares se incubaron en buffer de muestra desnaturizante 6X (b-mercaptoetanol 25%, SDS 2.5%, Glicerol 50% Buffer tris-HCl 0.125M, azul de bromofenol 0.1 mg/mL, pH 6.8) durante 5 minutos a 99° Celsius para lograr su completa desnaturalización. Luego, se sembraron en pocillos de un gel poliacrilamida 12% de 1.5mm de espesor. Se utilizó el marcador de peso molecular PageRuler Plus Protein Protein Ladder de ThermoScientific 26616 de 10-180 kDa. Las muestras se corrieron a una corriente constante de 35 mA. Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel, una membrana de nitrocelulosa Hybond (GS Healthcare) y esponjas para la transferencia se equilibraron en buffer de transferencia (Tris 25mM, Glicina 192 mM, 0.1% SDS, EtOH 20%) durante 15 minutos. Posteriormente, se transfirieron las proteínas del gel de acrilamida a la membrana de nitrocelulosa Hybond por electrotransferencia semi-seca durante 35 minutos a 380 mA utilizando el equipo de transferencia *Amersham Biosciences*. Luego, la membrana se tiñó con *Rojo Ponceau* (Rojo Ponceau 0.01%, ácido acético 0.1%) (el cual tiñe todas las proteínas de manera inespecífica) durante 5 minutos a temperatura ambiente, se identificaron y cortaron los carriles y finalmente las membranas fueron decoloradas en solución de lavado (PBS Tween 0.5%). Los carriles

cortados e identificados se incubaron con solución de bloqueo (PBS, BSA 2.5%, Tween 20 0.05%) a 4° Celsius durante toda la noche. Luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos con solución de lavado (PBS, Tween 20 0.05%) y se incubaron las membranas con el anticuerpo 83D4 sin diluir durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, realizaron 3 lavados de 5 minutos con solución de lavado y se incubaron los carriles por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario policlonal *rabbit anti-mouse* (HRP Código: P0260 DAKO). Las membranas se dejaron durante toda la noche en solución lavado para asegurarse de que la técnica presentara una menor interferencia en la señal. Para el revelado, las membranas fueron incubadas 5 minutos con los reactivos Stable Peroxide Solution y Luminol/Enhancer Solution (1:1) del kit SuperSignal™ West Pico PLUS (1863096, ThermoScientific). Finalmente se obtuvieron las imágenes utilizando el equipo ImageQuant 800.

3.2.3 Citometría de flujo

Las líneas celulares BXPC3, L3.6 y T3M4 provenientes de cultivo celular se contaron y se fijaron con 5 mL de PBS, paraformaldehído (PFA) 4% (a una concentración de 2×10^6 células/ml) por 20 minutos en hielo. Luego, se lavó el PFA, para lo cual se centrifugaron las células a 400g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el *pellet* celular en 5 ml de PSB a una concentración celular de 2×10^6 células/mL. La suspensión celular se fraccionó en dos partes iguales, una de las cuales correspondería a las células permeabilizadas (P) y otra a las células sin permeabilizar (SP). Para poder permeabilizar las células se centrifugaron a 400g durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS, 1% SFB, 0.1 % Tween-20 por 30 minutos a temperatura ambiente a una concentración de 1×10^6 células/mL. Las células sin permeabilizar se resuspendieron en paralelo con PBS, 1% SFB.

Luego, se sembraron 100 uL de la suspensión celular en diferentes pocillos (100.000 células por pocillo) de una placa de 96 pocillos de fondo cónico y se centrifugaron a 400g durante 5 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se incubó cada pocillo con 50 uL del anticuerpo primario 83D4 (sobrenadante sin diluir), durante toda la noche en cámara húmeda a 4° Celsius. Se sembraron pocillos por triplicado para cada condición. El triplicado de los controles con anticuerpo secundario (*anti-mouse*) y los triplicados de los controles sin marca (SM) fueron incubados con PBS, SFB 1 % para células no permeabilizadas y con PBS, SFB 1 %, Tween-20. 1 % para células permeabilizadas. Luego se realizaron 3 lavados con PBS, SFB 1% o PBS, 1 % SFB, 0.1% Tween-20, para los pocillos con células no permeabilizadas y permeabilizadas, respectivamente. El anticuerpo secundario (polyclonal *rabbit anti-mouse*

FITC Código: F0261 DAKO) fue incubado en dilución 1:50 en PBS, SFB 1% (o PBS, 1 % SFB, Tween-20 0.1% para células permeabilizadas) a temperatura ambiente por 45 minutos. Luego se realizaron nuevamente 3 lavados con las soluciones correspondientes y las células fueron resuspendidas en 150 uL de PBS para su posterior análisis.

Las células fueron analizadas por el citómetro *Accuri C6*. Para la estrategia de *gating* primero se seleccionaron las células y luego se seleccionaron los *singlets*, se trabajó siempre con esta población establecida. Para definir a la población Tn negativa se definió la zona positiva para la expresión de Tn (Tn+) a partir de los datos de las muestras tratadas solamente con el anticuerpo secundario (control anti-*mouse*). Esta zona se define como la zona de fluorescencia hacia la derecha de la población celular donde se observan menos del 0.5 % de los eventos de la población celular control (Figura S1, ANEXO). Finalmente, los datos se analizaron utilizando el Software FlowJo10 ®. Los análisis estadísticos se realizaron a través del software GraphPad Prism 8.0.2, utilizando el test *two-way Anova*. Se consideraron estadísticamente significativos los valores $P < 0.05$ (*).

3.2.4 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, se cultivaron las líneas celulares en cubreobjetos circulares. Para esto, se colocaron los cubreobjetos redondos de vidrio previamente remojados en etanol 70% en pocillos de una placa de 24 pocillos. Luego se expuso la placa a luz ultravioleta en la cámara de flujo laminar por 15 minutos. Una vez confirmado que el etanol se haya evaporado de los vidrios, se sembraron aproximadamente 10.000 células de las líneas L3.6, T3M4 y BXPC3 en los diferentes pocillos con los vidrios y se dejaron crecer en 1 mL de medio de cultivo DMEM enriquecido hasta llegar a un 60% de confluencia. Luego, las células en los cubreobjetos de vidrio se lavaron, para lo cual se les retiró el medio de cultivo, se les agregó 1 mL de PBS frío en cada pocillo, se incubó la placa 5 minutos y luego se retiró el PBS (esta secuencia se repitió tres veces). A continuación, las células se fijaron con 0.5 ml de PBS, PFA 4% por pocillo por 20 minutos en hielo. Posteriormente se permeabilizaron las células con 0.5 ml de PBS, BSA 2% ,Triton-X100 0.3% por pocillo por 30 minutos a temperatura ambiente y se realizó un lavados con la solución de lavado (PBS, BSA 1%, Triton-X100 0.15%). Posteriormente, los vidrios fueron transferidos a una plataforma recubierta con *parafilm*, sobre 50 uL del anticuerpo primario 83D4 o ChiTn sin diluir, corroborando que la cara del vidrio con células adheridas quedara hacia abajo en contacto con la solución de anticuerpo. Los vidrios se incubaron durante toda la noche en cámara húmeda a 4° Celsius. Los controles negativos fueron incubados con PBS, BSA 1%, Triton-X100 0.15%. Luego se

transfirieron los vidrios a la placa nuevamente y se realizaron 3 lavados con PBS, BSA 1%, Triton-X100 0.15%. A continuación, se incubaron los vidrios sobre *parafilm* con el anticuerpo secundario correspondiente (*polyclonal rabbit anti-mouse FITC* Código: F0261 DAKO para 83D4 y *polyclonal rabbit anti-human IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda FITC* Código: F0200 DAKO para ChiTn en una dilución 1:50 a temperatura ambiente por 45 minutos. Transcurridos los 45 minutos, se transfirieron los vidrios a la placa y se realizaron 3 lavados con la solución de lavado, 1 lavado con PBS frío y un último lavado con DAPI (Sigma D9542-1MG) diluido 1:1000 en PBS, el cual tiñe los núcleos. Finalmente se realizaron 3 últimos lavados con PBS frío. Los vidrios fueron montados en portaobjetos utilizando el reactivo Prolong Gold #P36930. Las láminas se observaron al menos 24 horas después en el microscopio confocal Zeiss L SM 880 con magnificación 630x.

3.3 Evaluación de presencia de antígeno Tn en tejidos tumorales de páncreas de pacientes

3.3.1 Ensayos de Inmunohistoquímica: Kit ABCAM

Los ensayos de inmunohistoquímica fueron realizados sobre muestras de tejido tumoral de páncreas de pacientes, cedidas por el Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay. Las muestras se desparafinaron mediante tres incubaciones en Xilol durante 5 minutos y tres incubaciones con isopropanol durante 5 minutos. Luego se realizó un lavado con agua destilada, para los cuales se incubaron las láminas por 5 minutos. A continuación, se realizaron 2 lavados por 5 minutos con solución de lavado TBST (Buffer Tris 50 mM, NaCl 9%, Tween 0.05% pH 7.5). Como lo indica el Kit, posteriormente se incubaron las muestras a temperatura ambiente, con *Hydrogen Peroxide block solution* (H₂O₂ 3%) por 10 minutos para bloquear la peroxidasa endógena y luego con la solución *protein block* por 10 minutos para bloquear los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo. El anticuerpo 83D4 se incubó sin diluir durante toda la noche a 4 ° Celsius. Al otro día, se realizaron 4 lavados con solución de lavado y posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario biotinilado proporcionado por el kit (*anti-mouse*) por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron las láminas 4 veces por 5 minutos con solución de lavado.

El marcador se reveló incubando las muestras con estreptavidina peroxidasa por 10 minutos a temperatura ambiente y luego de lavar 4 veces las láminas en solución de lavado, se incubaron con una solución de DAB cromógeno y *DAB substrate* (1 gota de cromógeno por cada 50 gotas de *substrate*) 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se

enjuagaron las láminas 4 veces en solución lavado y se dejaron 5 minutos en agua corriente, y finalmente se incubaron 5 minutos en agua destilada. La contratinción se realizó añadiendo solución Hematoxilina de Mayer durante 1 minuto y 15 segundos, en oscuridad, lavando posteriormente con agua corriente por 10 segundos y sumergiéndose 10 veces en una solución de hidróxido de amonio 37 mM. Finalmente se realizaron 4 lavados (uno con agua destilada, dos con isopropanol y uno con Xilol). Las láminas se montaron en los portaobjetos con bálsamo *Entellan® new* y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Olympus CX41RF con magnificaciones de 100x, 200x, 400x y 1000x.

4. RESULTADOS

4.1 Estudio de la presencia del antígeno Tn en líneas celulares tumorales de páncreas

Con el fin de evaluar la presencia de clústeres de Tn en líneas celulares comerciales de cáncer de páncreas, se realizaron ensayos de Western blot, Citometría de flujo e Inmunofluorescencia indirecta, utilizándose el anticuerpo 83D4, anticuerpo monoclonal murino, el cual reconoce clústeres de 2 y 3 moléculas de GalNAc-Ser/Thr consecutivas (Osinaga *et al.*, 2000) y el anticuerpo recombinante ChiTn. Se estudiaron tres líneas celulares de cáncer de páncreas humano: L3.6, T3M4 y BXPC3 (Tabla 1, ANEXO).

4.1.1 Evaluación de la expresión del antígeno Tn en lisados de líneas celulares tumorales de páncreas humano por Western blot a partir de su reconocimiento por 83D4

Con el fin de evaluar la presencia de clústeres del antígeno Tn en las líneas celulares de cáncer de páncreas L3.6, T3M4 y BXPC3, primero se realizaron ensayos de Western blot por triplicados a partir de lisados celulares utilizando como anticuerpo primario a 83D4, como se detalla en Materiales y Métodos. En la Figura 7 se presenta uno de los triplicados obtenidos mediante este ensayo. Como se puede observar en la Figura 7, 83D4 reconoció los lisados de las tres líneas celulares mencionadas. De esta manera, la presencia de clústeres del antígeno Tn fue evidenciada para todas las líneas celulares utilizadas. Se puede observar que el patrón de bandas obtenido para cada línea celular fue similar, aunque se pueden distinguir ciertas diferencias entre los patrones de bandas obtenidos y la intensidad de algunas bandas lo cual sugiere que el panel de glicoproteínas que expresan Tn en cada línea celular podría diferir. En este sentido, se observa una mayor intensidad de las bandas marcadas por 83D4 sobre el lisado de las células BXPC3 que para los demás lisados pertenecientes a las líneas celulares L3.6 y T3M4, lo cual nos podría indicar que la línea BXPC3 expresa el antígeno en mayor medida que las otras dos líneas. Estos resultados deberán ser corroborados realizando otros ensayos de Western blot, los cuales incluyan un control de carga (como la proteína actina) y cuantificar por densitometría de la intensidad de las bandas relativas al control de carga.

En resumen, los ensayos de Western blot indicaron la presencia de clústeres del antígeno Tn en las tres líneas celulares de cáncer de páncreas humano evaluadas, al mismo tiempo que nos indica la presencia del antígeno Tn sobre diferentes proteínas glicosiladas en cada lisado celular.

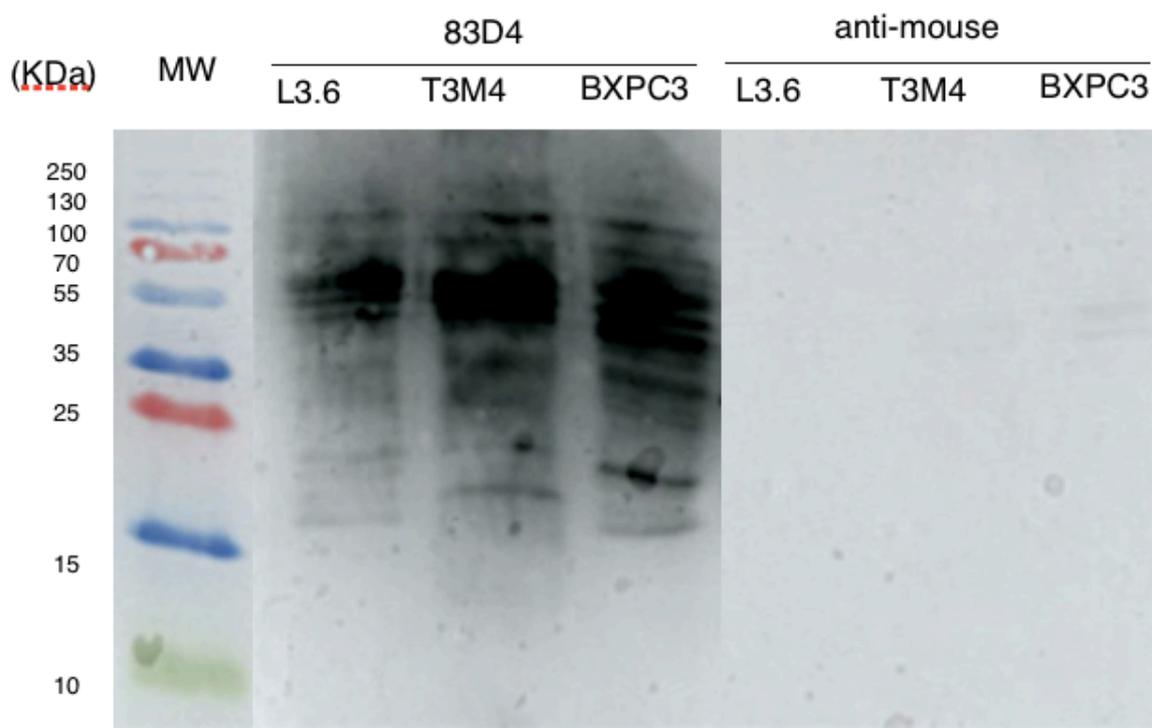


Figura 7. Evaluación de la presencia del antígeno Tn en lisados celulares por Western Blot. Se sembraron 40 mg de proteína de los lisados (cuantificado por el método colorimétrico de Bradford) en cada pocillo. Luego de transferir las proteínas a una membrana mediante transferencia semi-húmeda, la misma se incubó con el anticuerpo 83D4. Se utilizó como control secundario un anticuerpo secundario (*anti-mouse*) conjugado a streptavidina peroxidasa y se reveló con los reactivos Stable Peroxide Solution y Luminol/Enhancer Solution del *Kit SuperSignal™ West Pico PLUS*. Se observa el revelado obtenido por el equipo *ImageQuant800* para cada lisado (83D4) y su respectivo control secundario (*anti-mouse*) así como el marcador de peso molecular (MW).

4.1.2 Evaluación de la presencia del antígeno Tn y su expresión sobre la membrana celular en líneas celulares tumorales de páncreas humano por Citometría de flujo a partir del anticuerpo 83D4

Una vez evidenciada la presencia del antígeno Tn en líneas comerciales de cáncer de páncreas humano por Western blot utilizando el anticuerpo 83D4, decidimos estudiar el porcentaje de células de cada línea celular que expresa el antígeno Tn y, además, evaluar la expresión del antígeno Tn expuesto sobre la membrana celular. Para esto, se realizaron ensayos de Citometría de flujo utilizando el anticuerpo 83D4 sobre células permeabilizadas y sin permeabilizar (Figuras 8, 9 y 10; Tabla 2S ANEXO).

Para el estudio de las líneas celulares por citometría de flujo se siguió la estrategia de *Gating* propuesta en Metodología (Figura S1). En los resultados obtenidos por citometría de flujo (Figuras 8, 9 y 10), se observa que aproximadamente el 100% de las células de las líneas celulares T3M4, L3.6 y BXPC3 expresan clústeres del antígeno Tn (Figura 8). Para aquellos ensayos donde las células no se permeabilizaron, el porcentaje de células que resultaron positivas para 83D4 disminuyó aproximadamente a 50% en las líneas T3M4 y L3.6, y a 30% en la línea BXPC3 (Figura 8). Estos resultados muestran que, aunque cerca de la totalidad de las células de estas tres líneas de cáncer de páncreas humano expresan clústeres del antígeno Tn, solamente una fracción de ellas (aproximadamente la mitad para las líneas T3M4 y L3.6 y un tercio para la línea BXPC3) lo exponen en su membrana.

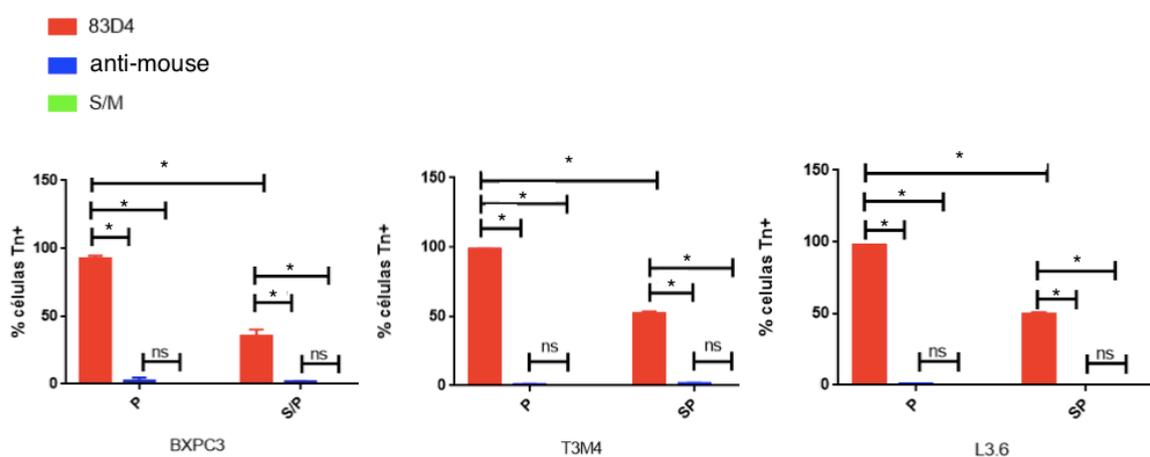


Figura 8. Estudio de la presencia y localización a nivel de membrana celular de clústeres del antígeno Tn en líneas celulares de cáncer de páncreas humano por citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células permeabilizadas (P) y sin permeabilizar (SP) positivas para el marcaje por 83D4. Las células fijadas con PFA y permeabilizadas, fueron incubadas con el anticuerpo 83D4. En paralelo, se realizaron dos controles, para los cuales se incubaron las células únicamente con el anticuerpo secundario (*anti-mouse*) o sin ninguno de los dos anticuerpos (Sin Marca, S/M). Para cada grupo (83D4, *anti-mouse* y S/M) se realizaron triplicados intraexperimento. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. La estadística corresponde al experimento mostrado y es representativa de los demás experimentos, (*, $P < 0.05$; ns, no significativo *two way ANOVA*). Los valores se detallan en la Tabla 2S ANEXO.

Además de estudiar el porcentaje de células que expresan clústeres del antígeno Tn, se compararon las medias geométricas de intensidad de fluorescencia de las poblaciones celulares tratadas con 83D4 para cada línea celular (Figuras 9 y 10). Para esto, se calculó la intensidad de fluorescencia de la población tratada con 83D4 normalizada por el valor de intensidad de

fluorescencia de la población control tratada con el anticuerpo secundario (*anti-mouse*) (media geométrica de intensidad de fluorescencia de la muestra dividido la media geométrica de intensidad de fluorescencia de las células tratadas con el control secundario *anti-mouse*). Como se observa en los gráficos de la Figura 9 y en la Figura 10, la línea celular BXPC3 presentó un valor de intensidad media de fluorescencia relativa al control secundario mayor que las líneas T3M4 y L3.6. Estos resultados podrían sugerir que la línea BXPC3 expresa un mayor número de clústeres de Tn que las otras líneas celulares estudiadas.

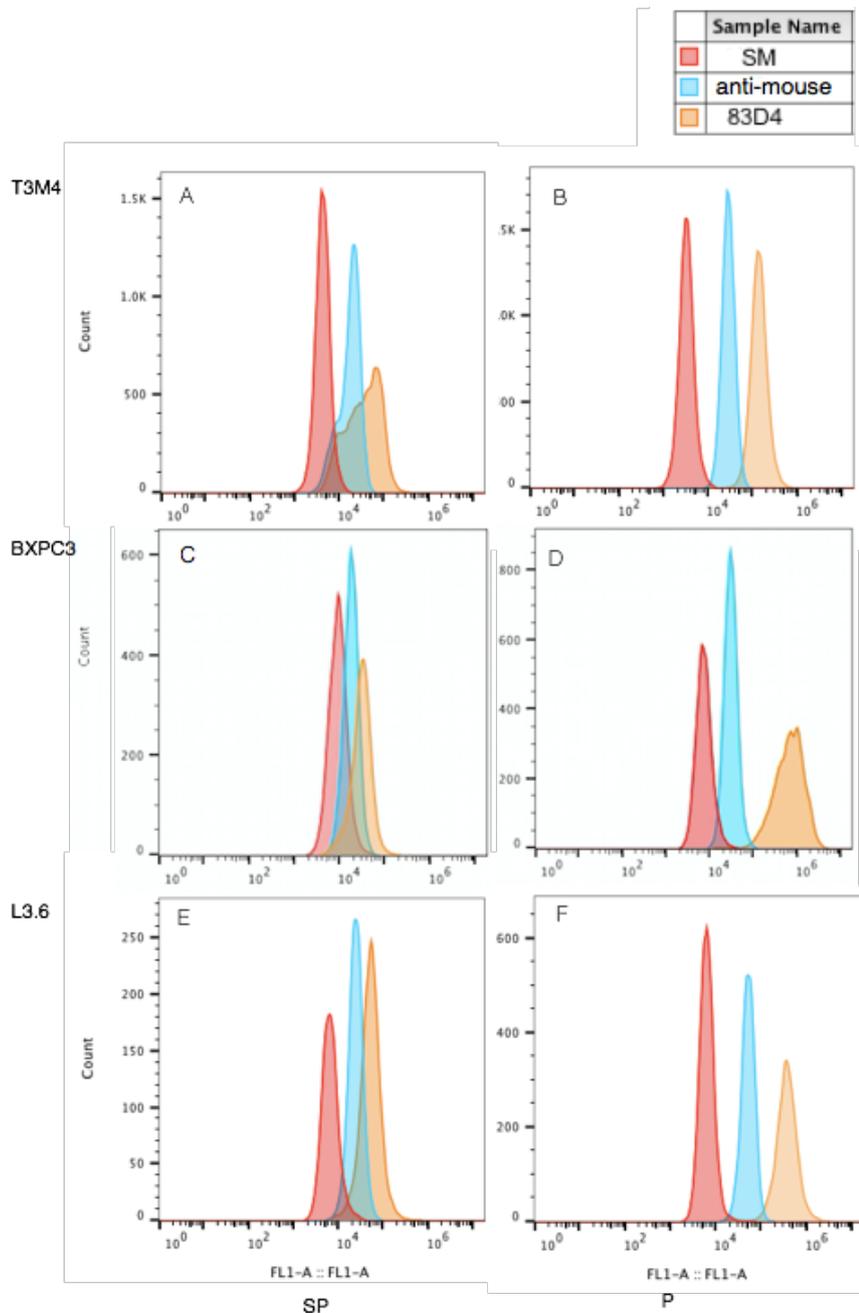


Figura 9. Estudio de la presencia de clústeres del antígeno Tn en líneas celulares de cáncer de páncreas humano por citometría de flujo. Las líneas celulares de T3M4, BXPC3 y L3.6 permeabilizadas (B, D y F) y sin permeabilizar (A, C y E), fueron incubadas con el anticuerpo 83D4. En paralelo, se realizaron dos controles, para los cuales se incubaron las células únicamente con el anticuerpo secundario (*anti-mouse*) o sin ninguno de los dos anticuerpos (S/M). Para cada grupo (83D4, *anti-mouse* y S/M) se realizaron triplicados intraexperimentos. A partir de los datos de citometría se realizaron histogramas de intensidad de fluorescencia para las células definidas como singuletes (Metodología- figura S1). Se muestran histogramas de intensidad de fluorescencia de un experimento representativo de 3 experimentos independientes para las células tratadas con el anticuerpo 83D4 y los 2 controles mencionados. A: T3M4 no permeabilizadas, B: T3M4 permeabilizadas; C: BXPC3 no permeabilizadas, D: BXPC3 permeabilizadas; E: L3.6 no permeabilizadas, F: L3.6 permeabilizadas.

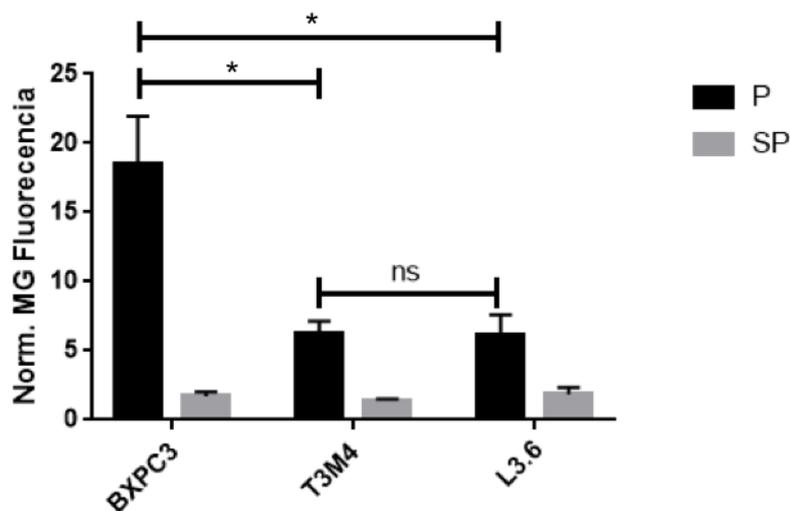


Figura 10. Media Geométrica de intensidad de fluorescencia obtenida por el marcaje de 83D4 normalizada respecto al control en líneas celulares de cáncer de páncreas humano por citometría de flujo. Las líneas celulares de T3M4, BXPC3 y L3.6 permeabilizadas (P) o sin permeabilizar (SP), fueron incubadas con el anticuerpo 83D4. En paralelo, se realizaron dos controles, para los cuales se incubaron las células únicamente con el anticuerpo secundario (*anti-mouse*) o sin ninguno de los dos anticuerpos (S/M). Para cada grupo (83D4, *anti-mouse* y S/M) se realizaron triplicados intraexperimentos. Para cada población celular, se calculó la media geométrica de fluorescencia a partir de los resultados de intensidad de fluorescencia obtenidos por los ensayos de citometría de flujo (Figura 10). El valor de intensidad calculado para las células tratadas con 83D4 se normalizó respecto a la fluorescencia del control secundario (*anti-mouse*). Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento (* $P < 0.05$; ns, no significativo, *two way ANOVA*). Los valores se detallan en la Tabla 2S ANEXO.

4.1.3 Estudio de la distribución celular del antígeno Tn en líneas celulares tumorales de páncreas humano por Inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo 83D4

Luego de confirmar la presencia de clústeres del antígeno Tn en las líneas celulares de cáncer de páncreas humano y de estudiar su expresión en la membrana celular, se decidió estudiar la distribución celular del antígeno mediante microscopia de fluorescencia utilizando la técnica de Inmunofluorescencia indirecta. Los resultados de microscopia obtenidos permiten visualizar la distribución y localización sub-celular del antígeno reconocido por 83D4 (Figuras 11, 12, 13).

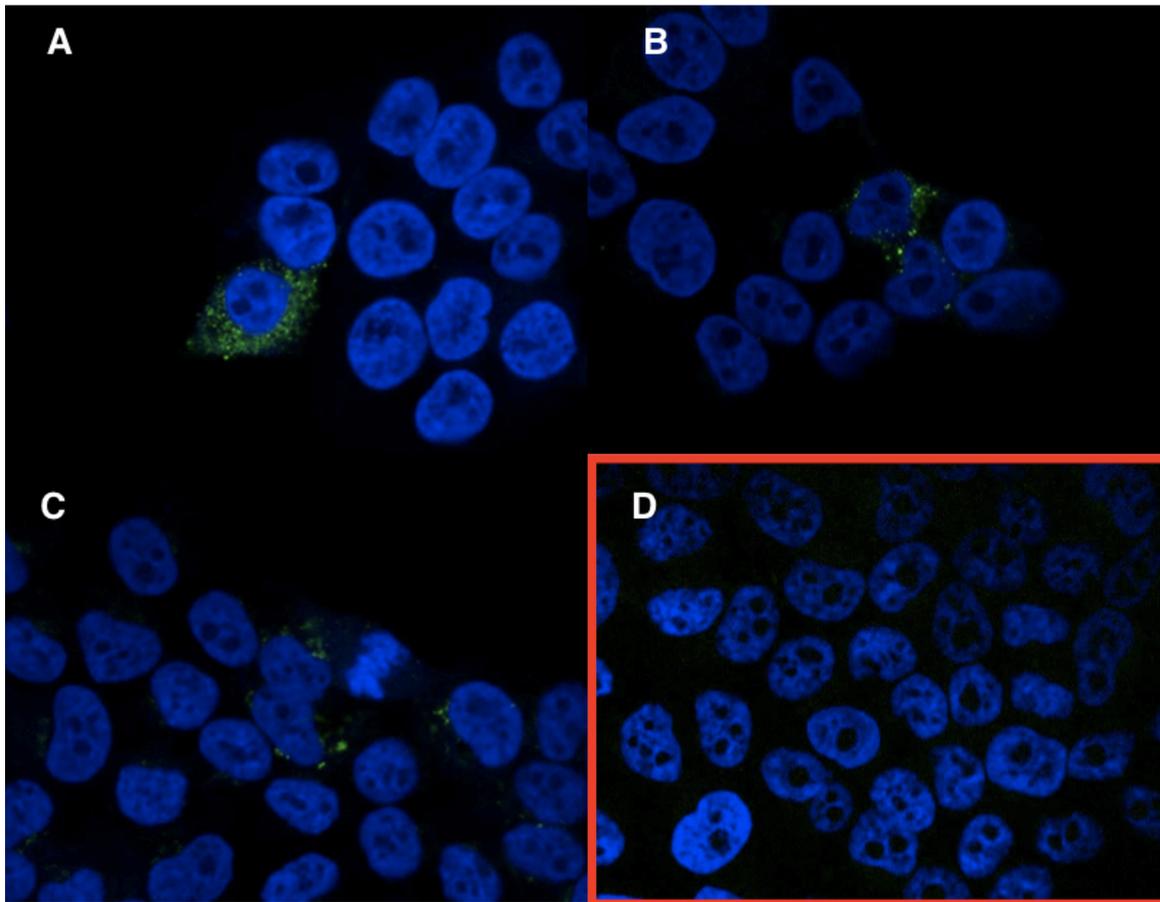


Figura 11. Evaluación del patrón de distribución del antígeno Tn en células T3M4 por Inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo 83D4. Las células fueron crecidas, fijadas y permeabilizadas en cubreobjetos circulares y tratadas con el anticuerpo 83D4 (A, B, C), como control negativo las células se incubaron únicamente con el anticuerpo secundario *anti-mouse* conjugado a FITC (D). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal Zeiss 880 en magnificación 630X.

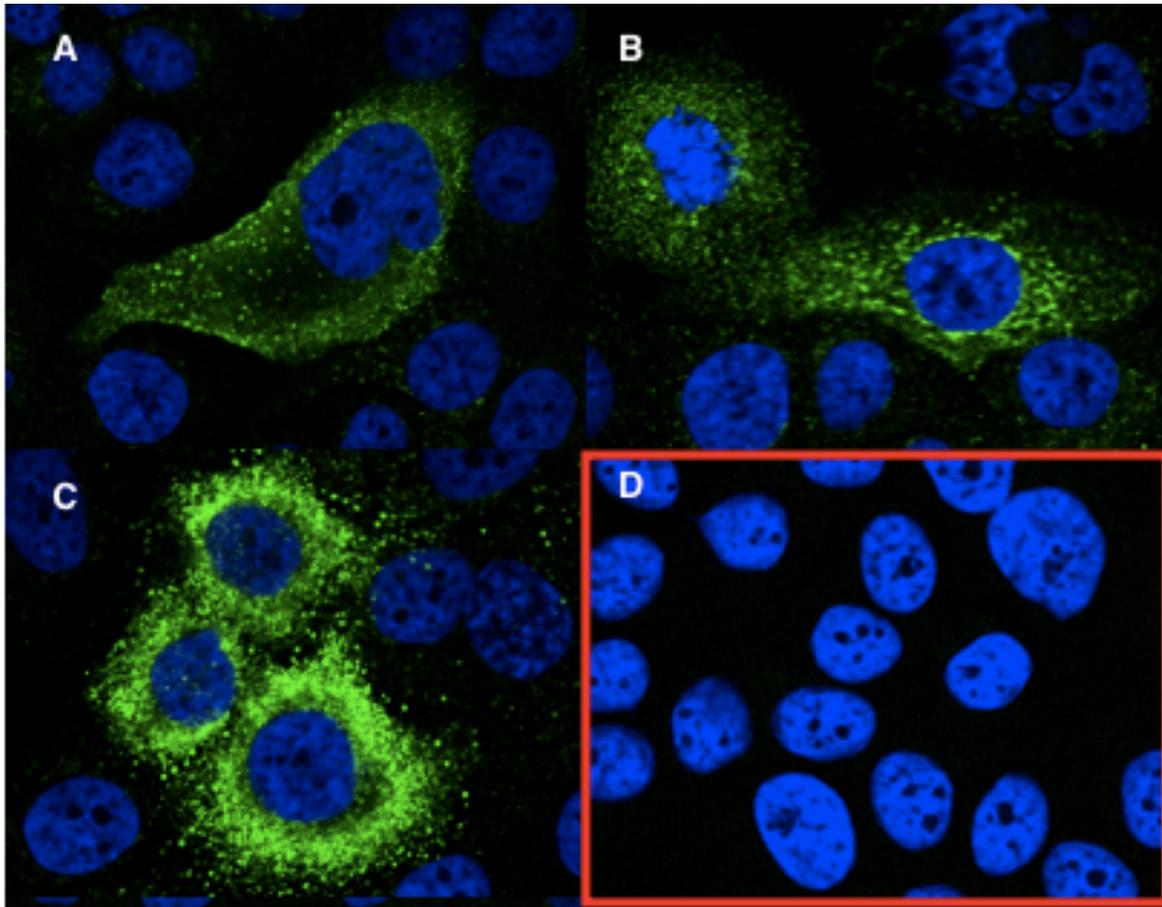


Figura 12. Evaluación del patrón de distribución del antígeno Tn en células BXPC3 por Inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo 83D4. Las células fueron crecidas, fijadas y permeabilizadas en cubreobjetos circulares y tratadas con el anticuerpo 83D4 (A, B, C), como control negativo las células se incubaron únicamente con el anticuerpo secundario *anti-mouse* conjugado a FITC (D). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal Zeiss 880 en magnificación 630X.

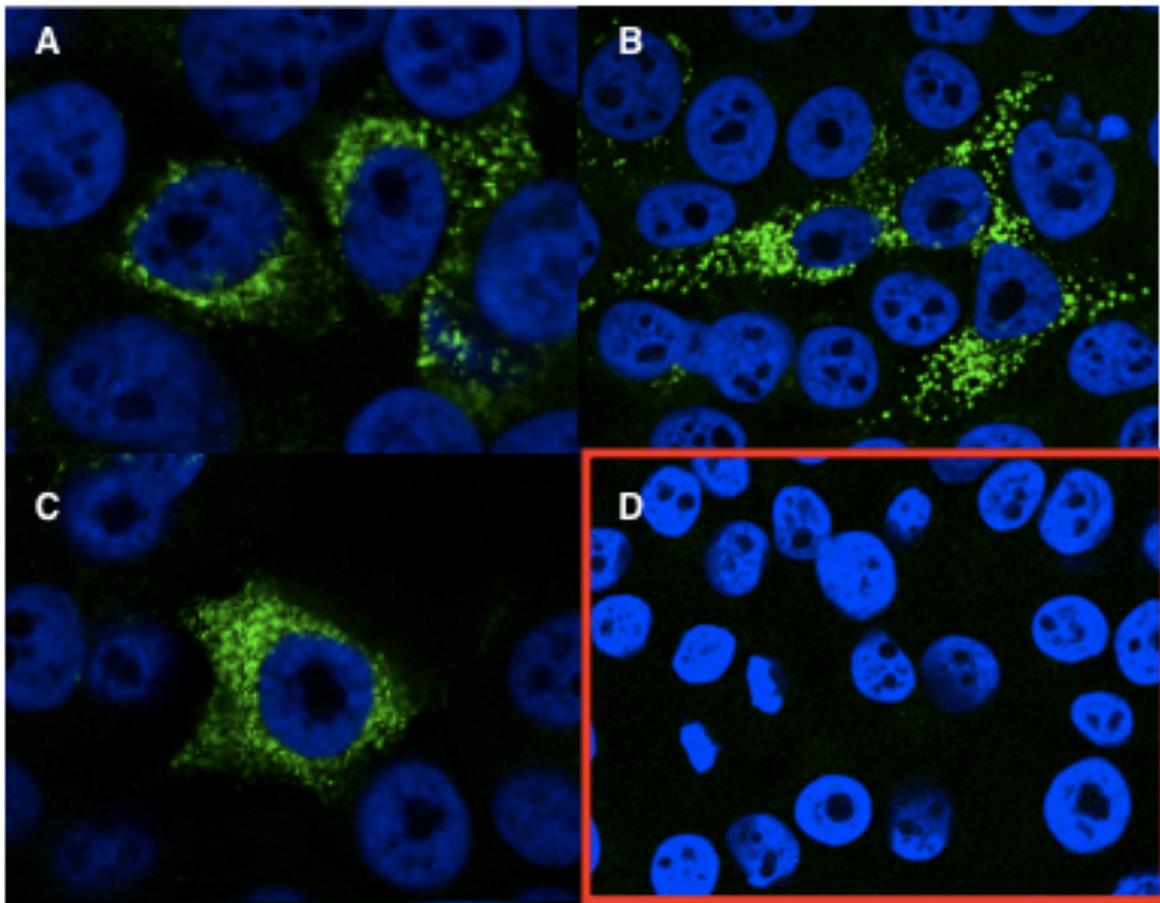


Figura 13. Evaluación del patrón de distribución del antígeno Tn en células L3.6 por Inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo 83D4. Las células fueron crecidas, fijadas y permeabilizadas en cubreobjetos circulares y tratadas con el anticuerpo 83D4 (A, B, C), como control negativo las células se incubaron únicamente con el anticuerpo secundario *anti-mouse* conjugado a FITC (D). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal Zeiss 880 en magnificación 630X.

Como se puede observar en las imágenes de microscopía de fluorescencia, las tres líneas celulares tumorales de cáncer de páncreas humano estudiadas expresan clústeres de Tn (Figuras 11-13). Como se esperaba, los controles negativos se mantuvieron libres de marca. Los resultados indican una posible diferencia en la intensidad del marcado por 83D4 en las células de la línea celular BXPC3, la cual parece ser mayor que en las otras dos líneas estudiadas. Esto sugiere una mayor expresión del antígeno Tn (Figura 11). La señal de fluorescencia se dispone en un patrón granular, para las tres líneas celulares. A su vez se observó que en la mayoría de las células de las líneas T3M4 y L3.6, los gránulos fluorescentes se distribuían de forma perinuclear o citoplasmática (Figura 11, Figura 13). Esto fue diferente para la línea BXPC3 cuya distribución se observa predominantemente citoplasmática (Figura 12). En ninguna de las

líneas celulares estudiadas se observó presencia de clústeres del antígeno Tn en el núcleo celular.

4.1.4 Estudio del reconocimiento de líneas celulares de cáncer de páncreas humanas por Inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo ChiTn

Los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia de células marcadas con el anticuerpo recombinante ChiTn se muestran en las Figuras 14, 15 y 16. La distribución y el patrón de reconocimiento del antígeno Tn por ChiTn fueron similares a los obtenidos por el anticuerpo 83D4. Este era un resultado esperable ya que la región variable, que contiene el parátipe, es idéntica entre ambos anticuerpos. Al igual que en los estudios de microscopía de fluorescencia realizados con el anticuerpo 83D4, el patrón de distribución granular de fluorescencia para la línea celular BXPC3 fue citoplasmático mientras que para las líneas L3.6 y T3M4 la distribución predominante fue perinuclear.

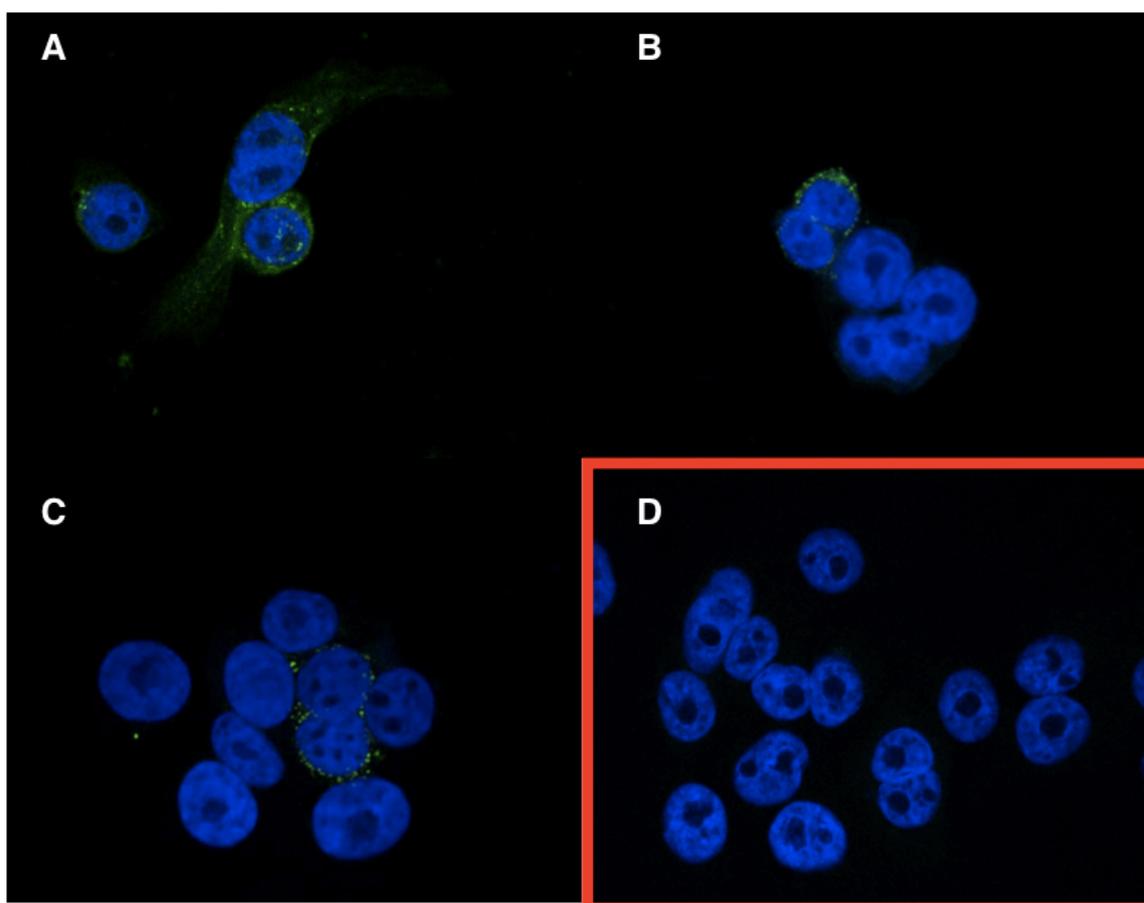


Figura 14. Estudio del reconocimiento de células T3M4 por el anticuerpo ChiTn por Inmunofluorescencia Indirecta. Las células fueron crecidas, fijadas y permeabilizadas en cubreobjetos circulares y tratadas con el anticuerpo ChiTn (A, B, C) o el anticuerpo secundario *anti-human* conjugado a FITC como control negativo (D). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Los resultados son representativos

de 3 experimentos independientes. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal Zeiss 880 en magnificación 630X.

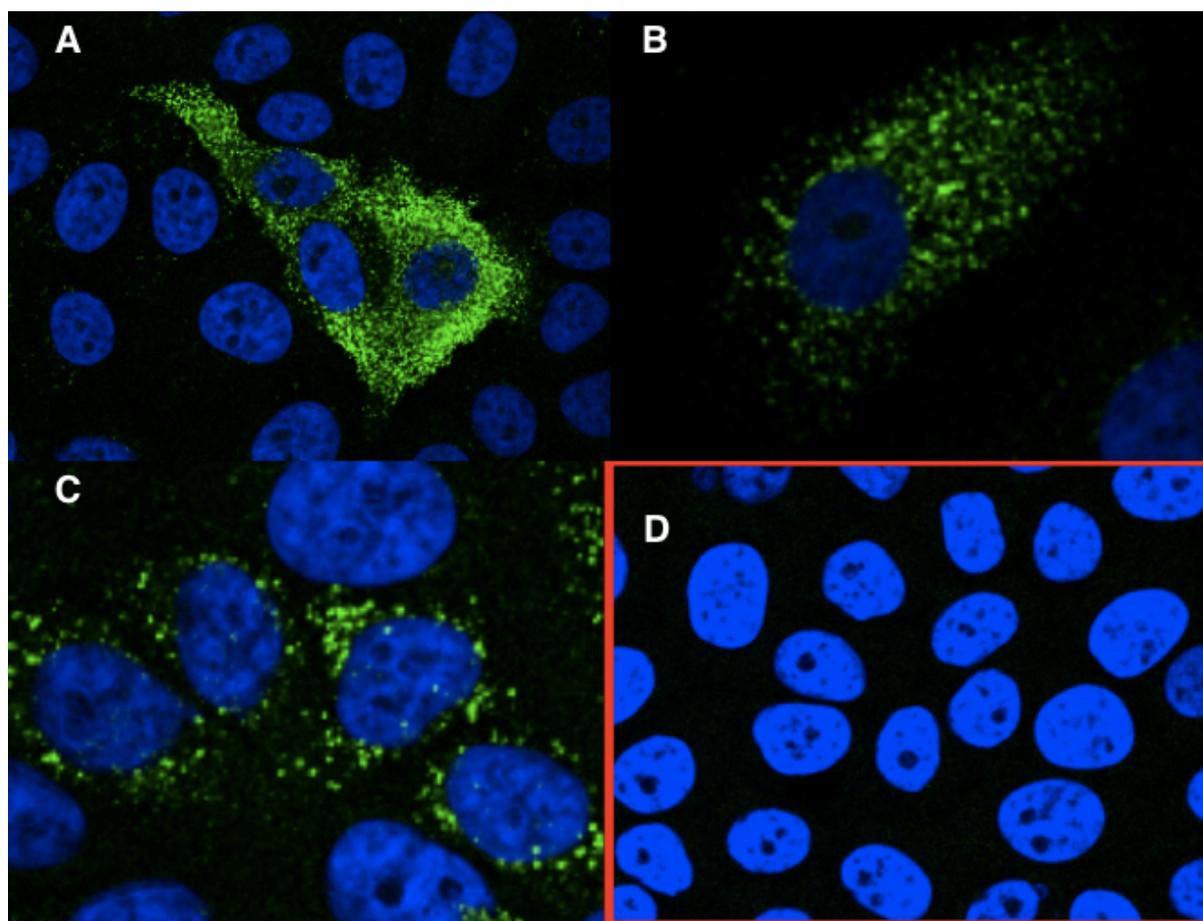


Figura 15. Estudio del reconocimiento de células BXPC3 por el anticuerpo ChiTn por Inmunofluorescencia indirecta. Las células fueron crecidas, fijadas y permeabilizadas en cubreobjetos circulares y tratadas con el anticuerpo ChiTn (A, B, C) o el anticuerpo secundario *anti-human* conjugado a FITC como control negativo (D). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal Zeiss 880 en magnificación 630X.

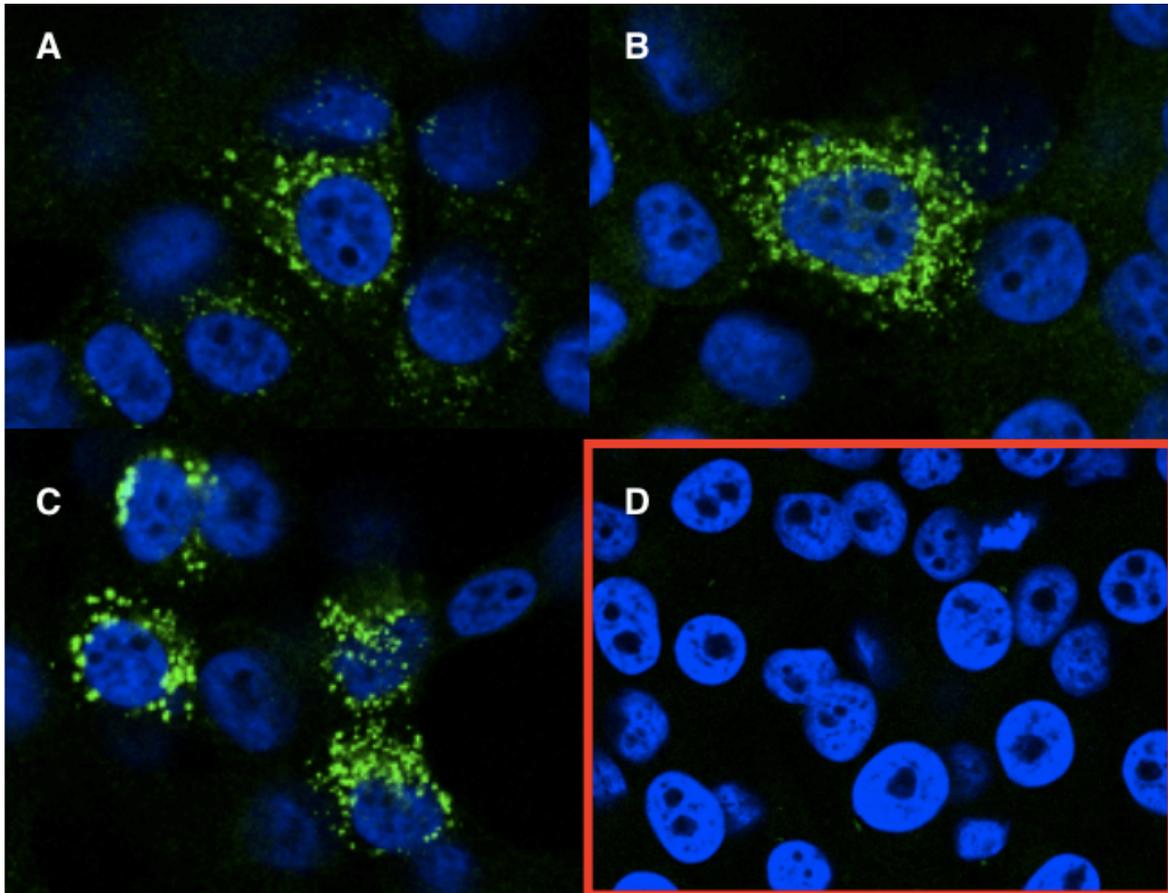


Figura 16. Estudio del reconocimiento de células L3.6 por el anticuerpo ChiTn por Inmunofluorescencia indirecta. Las células fueron crecidas, fijadas y permeabilizadas en cubreobjetos circulares y tratadas con el anticuerpo ChiTn (A, B, C) o el anticuerpo secundario *anti-human* conjugado a FITC como control negativo (D). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal Zeiss 880 en magnificación 630X.

En suma, los ensayos de microscopía de fluorescencia revelaron que un gran porcentaje de las células de las líneas BXPC3, T3M4 y L3.6 expresan el antígeno Tn y que la expresión es predominantemente intracelular. La intensidad de marca y los patrones de distribución celular del antígeno Tn reconocido por el anticuerpo ChiTn fueron similares y comparables con los obtenidos para el reconocimiento por el anticuerpo 83D4.

4.2 Estudio del reconocimiento tumoral de páncreas por 83D4 en muestras de tejido de pacientes

Una vez confirmada la presencia de clústeres del antígeno Tn en líneas celulares de cáncer de páncreas humano a través del reconocimiento por 83D4 mediante diferentes técnicas, se propuso estudiar la presencia de clústeres del antígeno Tn en tejidos tumorales de páncreas humanos. Para esto, se realizaron estudios de inmunohistoquímica en dos muestras de tejido tumoral de páncreas de pacientes del Hospital de Clínicas (Montevideo, Uruguay) y en un *array* comercial de 40 muestras tejidos tumorales de páncreas de pacientes (Biomax- C000119b) (Figura S1). Nuestra hipótesis basada en los resultados obtenidos con las líneas celulares tumorales humanas es que los tejidos tumorales de páncreas humanos, expresan un perfil de glicanos con un alto contenido en Tn, expresando por lo tanto clústeres de 2 a 3 moléculas consecutivas de Tn sobre el esqueleto peptídico de una variedad de proteínas. Por lo tanto, esperamos que el anticuerpo 83D4 reconozca tejidos tumorales de páncreas y que presente un reconocimiento menor en tejidos de páncreas sanos. Para evaluar esto último, se utilizó un estudio del reconocimiento de 83D4 en tejidos sanos de páncreas a partir de un *array* comercial de tejidos sanos (Biomax-MNO1021 bd10), realizado por la Q. F. Eugenia Fernández, integrante de nuestro laboratorio (Discusión).

4.2.1 Evaluación de la presencia del antígeno Tn en tejidos tumorales de páncreas de pacientes a partir de su reconocimiento por 83D4 por Inmunohistoquímica

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de inmunohistoquímica evidencian que los tejidos tumorales de páncreas de ambos pacientes del Hospital de clínicas fueron reconocidos por el anticuerpo 83D4 (Figuras 17 y 18). En el tejido del paciente 1 se observa un marcaje de intensidad moderada a fuerte (Figura 17), en dónde se pueden distinguir alguna de las estructuras marcadas, entre ellos acinos pancreáticos, secretores de enzimas digestivas, marcados sobre la monocapa de células acinares (Figura 17A). Por otro lado, también se observó marca por 83D4 en conductos neoplásicos (Figura 17B) y conductos colectores (Figura 17C). En cuanto a los conductos colectores, se observó una fuerte intensidad de marca para lo que podrían ser los productos de excreción. No se observó marca en el control negativo (*anti-mouse*) (Figura 17D).

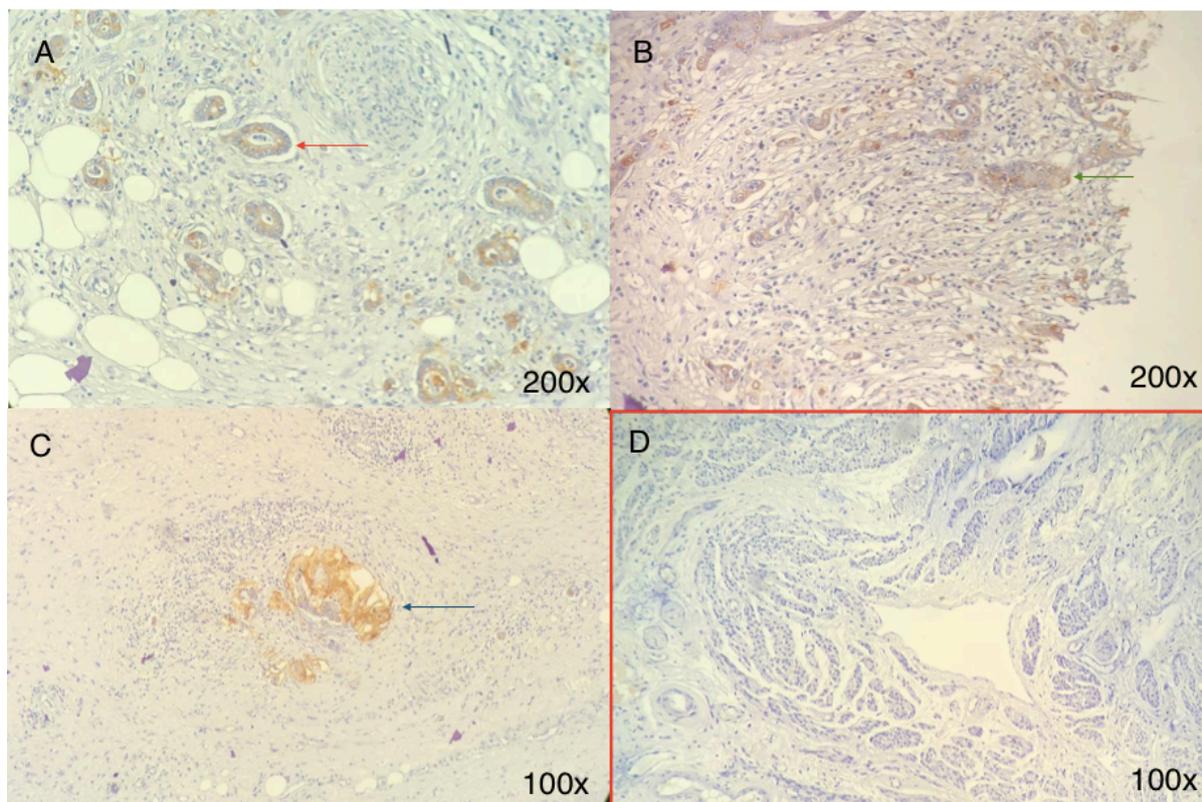


Figura 17. Estudio de la presencia de clústeres del antígeno Tn en una muestra de tejido tumoral de páncreas humano a través del reconocimiento de 83D4 por Inmunohistoquímica. Paciente 1. Los preparados de tejido tumoral de páncreas de pacientes, cedidos por el Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay fueron desparafinados con Xilol e isopropanol. Las tinciones por Inmunohistoquímica se realizaron según lo presentado en Materiales y Métodos utilizando reactivos del Kit ABCAM para inmunohistoquímica. Luego de bloquear la peroxidasa endógena y los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo, se incubaron las muestras con el anticuerpo 83D4 sin diluir durante toda la noche a 4° Celsius. Posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario biotinilado proporcionado por el kit (*anti-mouse*), el marcado se reveló incubando las muestras con estreptavidina peroxidasa y una solución de DAB, cromógeno y sustrato. Se utilizó Hematoxilina de Mayer para contrateñir los tejidos. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Olympus CX41RF. Se observan imágenes con magnificación 200x (A y B) y 100x (C y D) de las Inmunohistoquímicas de tejido tumoral pancreático del paciente 1 marcado con 83D4 (A, B, C) y su control negativo *anti-mouse* (E). Se marcan los acinos pancreáticos (flecha roja), conductos de excreción (flecha azul) y conductos neoplásicos (flecha verde).

Las imágenes de microscopía de la muestra de tejido del segundo paciente muestran una intensidad de marcación débil a media y un patrón de estructuras marcadas similar a las imágenes de tejido del primer paciente (Figura 18). Al igual que para el primer paciente, las estructuras marcadas distinguidas fueron los conductos excretores y conductos neoplásicos (Figura 18 A, B, C). En particular, en la Figura 18 B y C se observa que, la marcación se concentra sobre las células epiteliales de la pared de los conductos colectores y el conducto excretor. No se observó marca en el control negativo (*anti-mouse*) (Figura 18D).

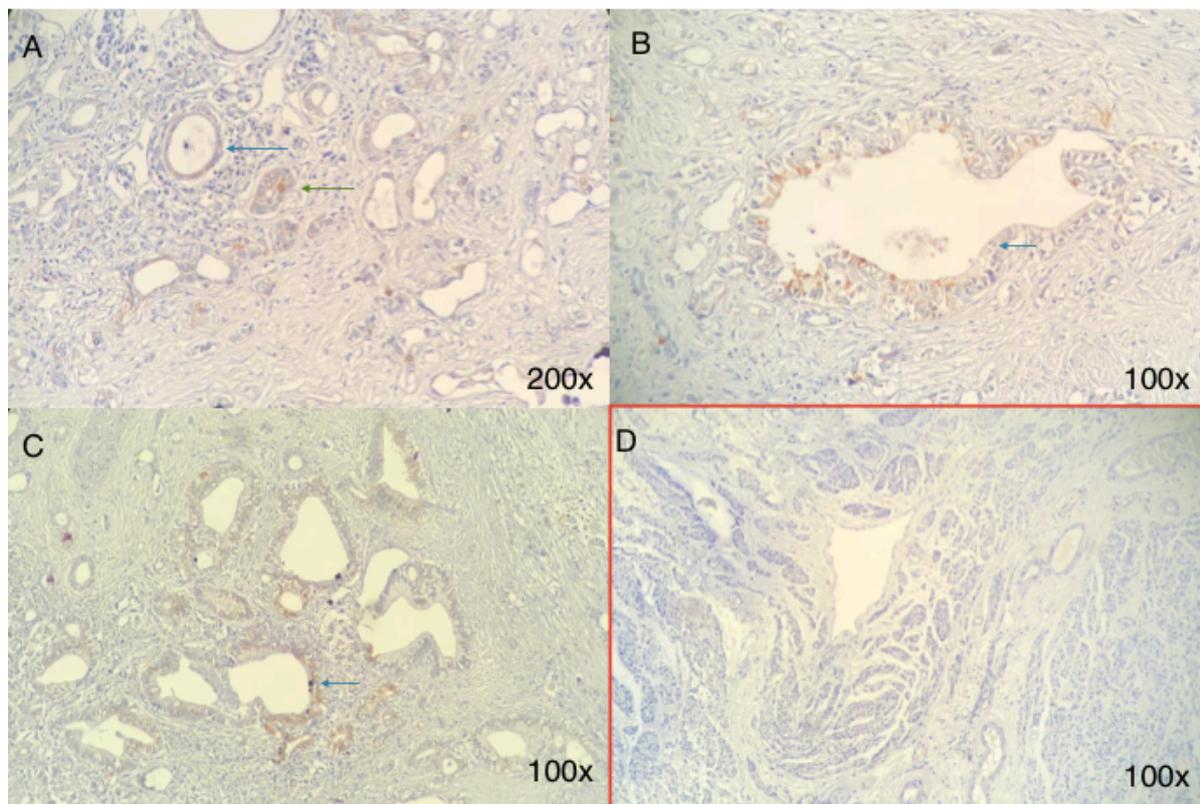


Figura 18. Estudio de la presencia de clústeres del antígeno Tn en una muestra de tejido tumoral de páncreas humano a través del reconocimiento de 83D4 por Inmunohistoquímica. Paciente 2. Los preparados de tejido tumoral de páncreas de pacientes, cedidos por el Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay fueron desparafinados con Xilol e isopropanol. Las tinciones por Inmunohistoquímica se realizaron según lo presentado en materiales y métodos, utilizando reactivos del Kit ABCAM para Inmunohistoquímica. Luego de bloquear la peroxidasa endógena y los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo, se incubaron las muestras con el anticuerpo 83D4 sin diluir durante toda la noche a 4° Celsius. Posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario biotinilado proporcionado por el kit (*anti-mouse*), el marcado se reveló incubando las muestras con estreptavidina peroxidasa y una solución de DAB, cromógeno y sustrato. Se utilizó Hematoxilina de Mayer para contrateñir los tejidos. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Olympus CX41RF. Se observan imágenes con magnificación 200x (A) y 100x (B, C y D) de las Inmunohistoquímicas de tejido tumoral pancreático del paciente 2 marcado con 83D4 (A, B, C) y su control negativo *anti-mouse* (E). Se marcan conductos de excreción (flecha azul) y conductos neoplásicos (flecha verde).

Tanto en la muestra del paciente 1 como en la del paciente 2, el tejido conectivo subepitelial se observó claro, libre de marca. Resulta importante destacar que, ya que el tejido conectivo no forma parte del conjunto de células tumorales, no se esperaba que expresaran clústeres de Tn, por lo que no se esperaba observar marca sobre este tejido.

Una vez confirmado el reconocimiento de tejido tumoral de páncreas humano por 83D4, se estudió el grado de reconocimiento de 83D4 sobre un *array* de muestras de tejidos de

pacientes con cáncer pancreático (Figura S3, ANEXO). A cada muestra, se le asignó un valor de puntaje. El puntaje, o grado de marca de cada muestra se definió según el método de puntaje semicuantitativo combinado (Fedchenko and Reifenrath, 2014) por su simplicidad y practicidad. A cada muestra se le asignaron dos valores, del 0 al 3, de acuerdo con su intensidad y porcentaje de células marcadas. Para la intensidad de marcado, un valor de 1, 2 o 3 representa un marcaje leve, mediano o fuerte, respectivamente. Para el número de células marcadas, un valor de 1, 2 o 3 representa porcentaje de células marcadas mayor a 0 y menor al 33%, del 33% al 66% y del 66% al 100%, respectivamente. El valor 0 es asignado a los tejidos que no presentaron ninguna marca. De esta manera, se indicaron puntajes de 1:1 si el tejido presentaba baja intensidad de marca y con porcentaje de células marcadas menor al 33 %,y un puntaje de 3:3 si el tejido presentaba alta intensidad de marcado con un porcentaje de células marcadas mayor al 66% (Tabla 1, Tabla S2). El puntaje calculado para cada muestra se generó sumando ambos valores (Figura 19).

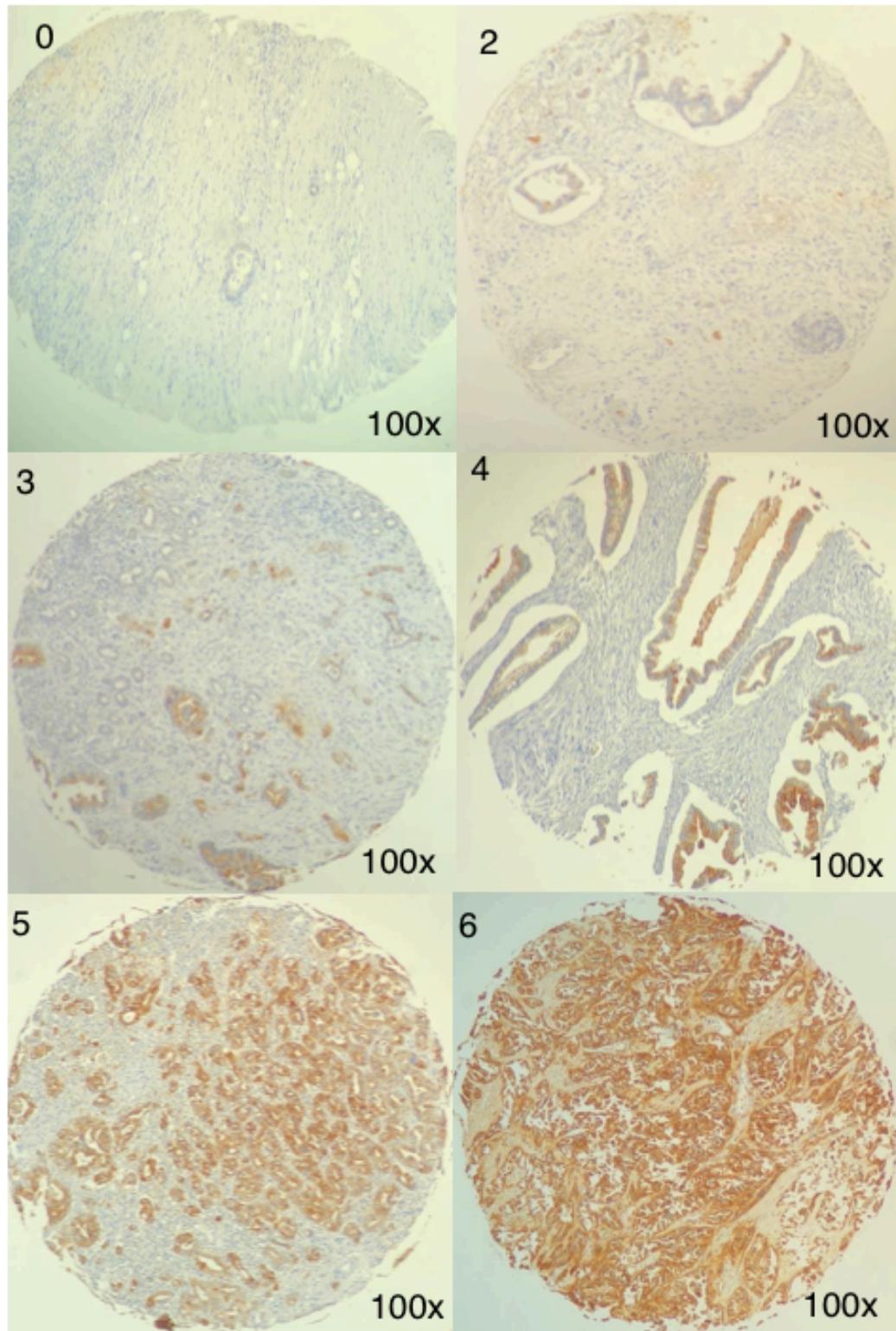


Figura 19. Estudio de la presencia de clústeres del antígeno Tn en un *array* de tejidos tumorales de páncreas humano a través del reconocimiento de 83D4 por Inmunohistoquímica. Las tinciones por Inmunohistoquímica se realizaron según lo presentado en materiales y métodos, utilizando reactivos del Kit ABCAM para Inmunohistoquímica. Luego de bloquear la peroxidasa endógena y los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo, se incubaron las muestras con el anticuerpo 83D4 sin diluir durante toda la noche a 4° Celsius. Posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario biotilado proporcionado por el kit (*anti-mouse*), el marcado se reveló incubando las muestras con estreptavidina peroxidasa y una

solución de DAB, cromógeno y sustrato. Se utilizó Hematoxilina de Mayer para contrateñir los tejidos. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Olympus CX41RF con una magnificación 100x. Se observan las imágenes obtenidas por la Inmunohistoquímica realizada sobre un *array* de tejidos tumorales de páncreas humanos con 83D4 y revelado con estreptavidina peroxidasa. Se muestran muestras representativas para cada *puntaje* (0, 2, 3, 4, 5, 6) calculado según la intensidad del marcado y el porcentaje de células positivas.

Puntaje	Número de muestras	% Representativo
0	1	2,5
2	10	25,0
3	5	12,5
4	5	12,5
5	15	37,5
6	2	5,0
Total	40	100

Tabla 1. Estudio de grado de presencia de clústeres del antígeno Tn en un *array* de tejidos tumorales de páncreas humano. Las Inmunohistoquímicas de los tejidos del *array* tratado con 83D4 fueron estudiadas en cuanto al grado de reconocimiento por el anticuerpo 83D4. A cada muestra, se le asignó un valor de puntaje sumando los valores (del 0 al 3) asignados representando la intensidad del marcaje y el porcentaje de células marcadas. Se muestra el puntaje calculado y el número de muestras para cada puntaje según el método de puntaje semicuantitativo combinado (Fedchenko and Reifenrath, 2014).

Las muestras de tejido tumoral de páncreas humano del *array* exhibieron un amplio grado de positividad para el reconocimiento con el anticuerpo 83D4 (Tabla 1). El 97,5% (39/40) de las muestras estudiadas del *array* fueron positivas para el marcaje con 83D4. A su vez, más del 50% de las muestras obtuvieron un puntaje de 4 o más, y por lo tanto cuentan con un marcaje intenso y en un alto porcentaje de células positivas.

Teniendo en cuenta lo mencionado en la introducción sobre que la presencia de Tn en células tumorales se asocia a la agresividad y malignidad tumoral, nos propusimos estudiar si el estadio tumoral podría estar relacionado al puntaje asignado a cada muestra de tejido. De esta manera, se agruparon los tejidos del *array* según su estadio de desarrollo tumoral y se graficaron los puntajes asignados a cada tejido (Tabla S2) (Figura 20). No se observó una

se vuelcan los productos de excreción transportados por los ductos) (Figura 21A, 21B, 21C), y conductos neoplásicos (Figura 21A, 21C). Estas estructuras se caracterizan por su rol en producción y excreción de una variedad de proteínas. El tejido conectivo, y el tejido sanguíneo (capilares y vasos) resultaron negativos.

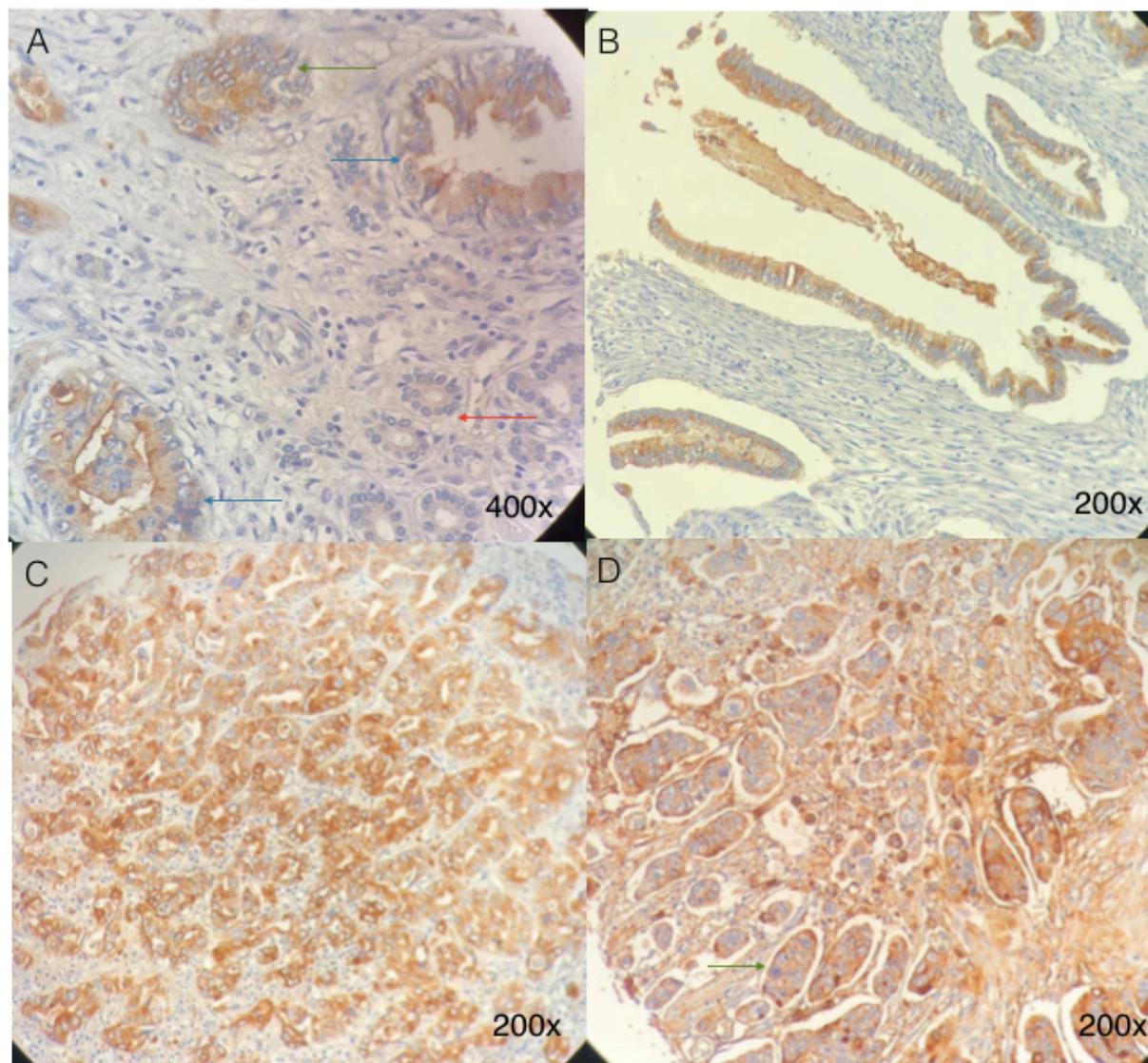


Figura 21. Evaluación de la localización subtisular de clústeres del antígeno Tn en los tejidos tumorales de páncreas de pacientes. Los preparados de tejido tumorales de páncreas pacientes, cedidos por el Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay fueron desparafinados con Xilol e isopropanol. Las tinciones por Inmunohistoquímica se realizaron según lo presentado en materiales y métodos, utilizando reactivos del Kit ABCAM para Inmunohistoquímica. Luego de bloquear la peroxidasa endógena y los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo, se incubaron las muestras con el anticuerpo 83D4 sin diluir durante toda la noche a 4° Celsius. Posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario biotinilado proporcionado por el kit (*anti-mouse*), el marcado se reveló incubando las muestras con estreptavidina peroxidasa y una solución de DAB, cromógeno y sustrato. Se utilizó Hematoxilina de Mayer para contrateñir los tejidos. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Olympus CX41RF. Se muestran las estructuras excretoras pancreáticas en muestras de tejido de pacientes con cáncer de páncreas (*array*: A, y

B; Paciente 1: C y D). Se observan imágenes con magnificación 400x (A) y 200x (B, C y D). Se marcan los acinos pancreáticos (flecha roja), conductos de excreción (flecha azul) y conductos neoplásicos (flecha verde).

4.2.3 Estudio de la distribución sub-celular del antígeno Tn en tejido tumoral de páncreas humano por Inmunohistoquímica a partir de su reconocimiento por 83D4

Las imágenes de microscopía obtenidas a partir de los estudios de tejidos de cáncer de páncreas por inmunohistoquímica utilizando al anticuerpo 83D4 revelan patrones distintivos de marcado intracelular (Figura 22). A lo largo de las muestras estudiadas, la marcación tiene un patrón granular, distribuída predominante en el citoplasma con incremento en el área perinuclear (Figura 22A, flecha 1). A su vez, en menor medida, se observa marcación de membrana (Figura 22, flecha 2), y se evidencia la ausencia de marcación nuclear. En las estructuras ductales de excreción, la coloración es consistente sólo con la monocapa de células epiteliales ductales (Figura 22C, 22D) y el tejido subyacente conectivo se mantiene limpio de marca. Mientras que en la mayoría de las células epiteliales ductales se observa una distribución homogénea de la marcación a lo largo del eje apical-basal epitelial (Figura 22C), en algunos casos la marca se localiza exclusivamente en la mitad apical celular (Figura 22 D, Flecha 3).

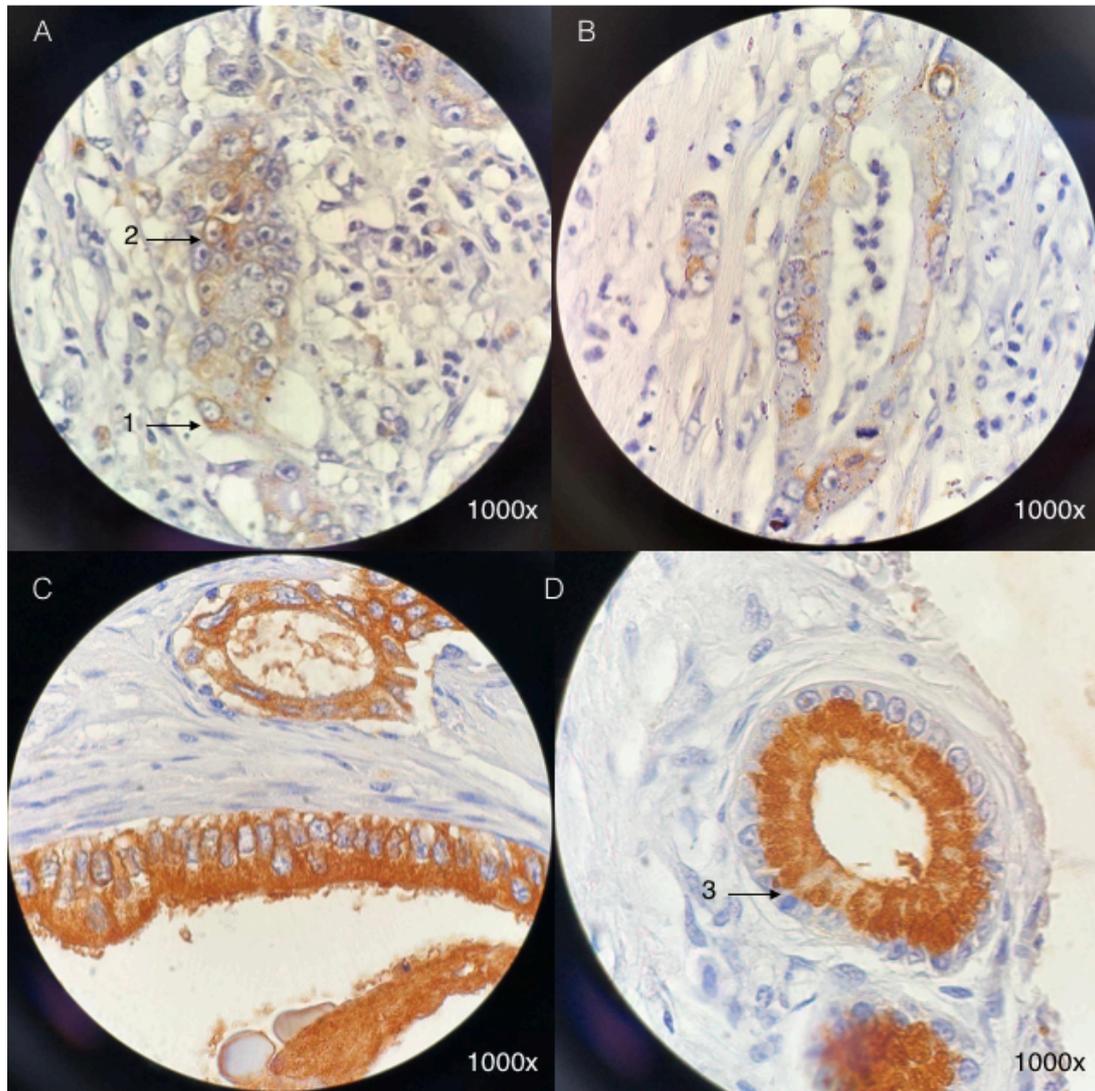


Figura 22. Evaluación de la localización subcelular de clústeres del antígeno Tn en los tejidos tumorales de páncreas de pacientes. Los preparados de tejido tumoral de páncreas de pacientes, cedidos por el Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay fueron desparafinados con Xilol e isopropanol. Las tinciones por inmunohistoquímica se realizaron según lo presentado en materiales y métodos, utilizando reactivos del Kit ABCAM para Inmunohistoquímica. Luego de bloquear la peroxidasa endógena y los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo, se incubaron las muestras con el anticuerpo 83D4 sin diluir durante toda la noche a 4° Celsius. Posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario biotinilado proporcionado por el kit (*anti-mouse*), el marcado se reveló incubando las muestras con estreptavidina peroxidasa y una solución de DAB, cromógeno y sustrato. Se utilizó Hematoxilina de Mayer para contrateñir los tejidos. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Olympus CX41RF. Se seleccionaron cortes ricos en elementos relacionados a funciones excretoras y se destacaron dos formas de distribución subcelular: citoplasmática (Flecha 1) y membrana (Flecha 2). Se observan imágenes con magnificación 1000x.

5. DISCUSIÓN

En el marco de esta tesina de grado, se estudió la presencia de clústeres de 2 y 3 moléculas de Tn (GalNAc- Ser/Thr) (antígeno Tn) en líneas celulares comerciales de cáncer de páncreas, a partir de su reconocimiento por el anticuerpo murino 83D4 y el anticuerpo recombinante ChiTn. Para esto, se realizaron ensayos de Western blot, Citometría de flujo e Inmunofluorescencia indirecta. A su vez, se estudió el reconocimiento de muestras de tejido tumorales de páncreas de pacientes oncológicos a partir del anticuerpo 83D4 mediante ensayos de Inmunohistoquímica.

5.1 Expresión del antígeno Tn en cáncer de páncreas reconocido por 83D4

En primer lugar, se estudió la presencia del antígeno Tn en lisados celulares generados a partir de las tres líneas celulares de cáncer de páncreas, BXPC3, T3M4 y L3.6 utilizando la técnica de Western blot. En los ensayos de Western blot, se pudo evidenciar la presencia de clústeres del antígeno Tn en una variedad de moléculas celulares de alto y mediano peso molecular para las tres líneas celulares estudiadas. Teniendo en cuenta estos resultados, resulta de interés realizar un Western blot bidimensional y un estudio de los *spots* por espectrometría de masas para estudiar la identidad de las proteínas portadoras de clúster de Tn.

Además, ensayos de Citometría de flujo también evidenciaron la presencia del antígeno Tn en las tres líneas celulares de cáncer de páncreas mencionadas. Estos estudios indicaron que aproximadamente todas las células estudiadas expresan el antígeno Tn reconocido por 83D4. Las terapias antitumorales dirigidas, o las estrategias de diagnóstico basadas en anticuerpos, actúan sobre blancos moleculares específicos expuestos en las células tumorales. Estas técnicas se basan generalmente en conjugar drogas o moléculas de detección (radioisótopos, fluorocromos) a un anticuerpo específico dirigido contra una molécula blanco expuesta en la membrana de las células tumorales. Por esta razón, resultó de nuestro interés estudiar la expresión de clústeres del antígeno Tn expuestos en la membrana celular de las células de cáncer de páncreas. Para esto, se realizaron ensayos de Citometría de flujo utilizando células permeabilizadas y sin permeabilizar. El estudio de las células sin permeabilizar indicó que solamente una fracción de ellas expresaban Tn en su membrana celular. En efecto, aproximadamente el 50% de las células de las líneas T3M4 y L3.6, y aproximadamente un 30% de las células de la línea BXPC3, exponían el antígeno Tn en su membrana celular. Además, el análisis de los estudios de Citometría de flujo sobre estas células indicaron que las células de la línea BXPC3 presentan una media geométrica de intensidad de fluorescencia superior a

las otras dos líneas celulares, lo cual podría sugerir que esta línea, a pesar de no exponer grandes cantidades del antígeno Tn sobre la superficie celular, expresa en mayor medida el antígeno Tn en comparación con T3M4 y L3.6. Estos datos son importantes para futuros estudios de terapia o diagnóstico *in vivo* y/o *in vitro* de cáncer de páncreas utilizando el anticuerpo 83D4 o ChiTn, para los cuales se sugiere utilizar las líneas T3M4 y L3.6, las cuales cuentan con un mayor porcentaje de células que expresan este glicoantígeno en su membrana.

En la bibliografía publicada hasta el momento se ha reportado por ensayos de Western blot, que estas líneas celulares estudiadas expresan débilmente la molécula Tn (Gill *et al.*, 2013) (Chugh *et al.*, 2018). Sin embargo, en esta tesis, los resultados obtenidos a partir de los ensayos de Western blot y de Citometría de flujo evidencian una fuerte positividad de las tres líneas para la presencia de clústeres del antígeno Tn. Los estudios reportados utilizan a la lectina Vicia Villosa (VVL) y anticuerpos monoclonales que reconocen a Tn como monómero de GalNAc-Ser/Thr. A diferencia de los estudios en esta tesina de grado se utilizó el anticuerpo 83D4 para evidenciar la presencia de clústeres de Tn. El anticuerpo 83D4 reconoce clústeres de 2 o 3 moléculas de GalNAc-Ser/Thr, estructura que podría estar asociada al cáncer de páncreas en mayor medida que los monómeros de Tn.

Adicionalmente, la presencia del antígeno Tn en las líneas celulares BXPC3, T3M4 y L3.6 también fue evidenciada en ensayos de Inmunofluorescencia indirecta utilizando los anticuerpos 83D4 y ChiTn. Los resultados de la intensidad del marcado por 83D4 observados indicaron una posible diferencia en la línea celular BXPC3 respecto a T3M4 y L3.6, la cual parece presentar una mayor intensidad de marca. Esto sugiere una mayor expresión del antígeno Tn en BXPC3, lo cual coincide con los resultados de intensidad de fluorescencia obtenidos para estas tres líneas celular en los ensayos de Citometría de flujo. Los ensayos de Western blot también sugirieron que esta línea podría expresar el antígeno Tn en mayor medida que las otras dos líneas, aunque estos resultados deben de ser confirmados a partir de ensayos de Western blot con control de carga.

Los ensayos de Inmunofluorescencia indirecta también permitieron evidenciar un patrón de marca granular, para las tres líneas celulares. A su vez se observó que en la mayoría de las células de las líneas T3M4 y L3.6, los gránulos marcados se distribuían de forma perinuclear o citoplasmática. Esto fue diferente para la línea BXPC3 cuya distribución se observa predominantemente citoplasmática. En ninguna de las líneas celulares estudiadas se observó presencia de clústeres del antígeno Tn en el núcleo celular. A su vez, estos estudios

permitieron evidenciar el reconocimiento del antígeno Tn por el anticuerpo ChiTn sobre las líneas celulares estudiadas, con un patrón similar al obtenido con el anticuerpo 83D4.

Finalmente, se realizaron estudios de Inmunohistoquímica sobre tejidos tumorales de páncreas humanos utilizando el anticuerpo 83D4. Los resultados de estos estudios también evidenciaron la presencia del antígeno Tn en tejidos de páncreas de pacientes oncológicos. Estos ensayos permiten tener resultados en un contexto que refleja mejor la realidad clínica del cáncer de páncreas. Los estudios de Inmunohistoquímica, utilizando un *array* de tejidos de cáncer de páncreas humanos (n=40), revelaron que un 97,5% de las muestras de páncreas analizadas contienen el antígeno Tn, evidenciado por su reconocimiento por 83D4. Estos resultados coinciden con un estudio previo publicado que ha demostrado la presencia de Tn en muestras de cáncer de páncreas de pacientes por unión a la lectina VVA (Itzkowitz *et al.*, 1991b) y por algunos anticuerpos anti-Tn (Ohshio *et al.*, 1995). Sin embargo, esta es la primera vez que se reporta específicamente la presencia de clústeres de Tn en tejido de páncreas. A su vez, la QF. Eugenia Fernández, integrante de nuestro laboratorio, realizó estudios de reconocimiento de tejido sano de páncreas por el anticuerpo 83D4 y reportó que, en 2 de 3 muestras de tejido, no se observó reconocimiento por este anticuerpo, aunque en un tejido se distinguió un marcado leve (Figura 21). De esta manera, estos resultados preliminares muestran una baja expresión de clústeres del antígeno Tn en tejido sano de páncreas, lo cual es importante ya que permite posicionar a los anticuerpos 83D4 y ChiTn como anticuerpos de relevancia para estudios de diagnóstico o terapia de cáncer de páncreas.

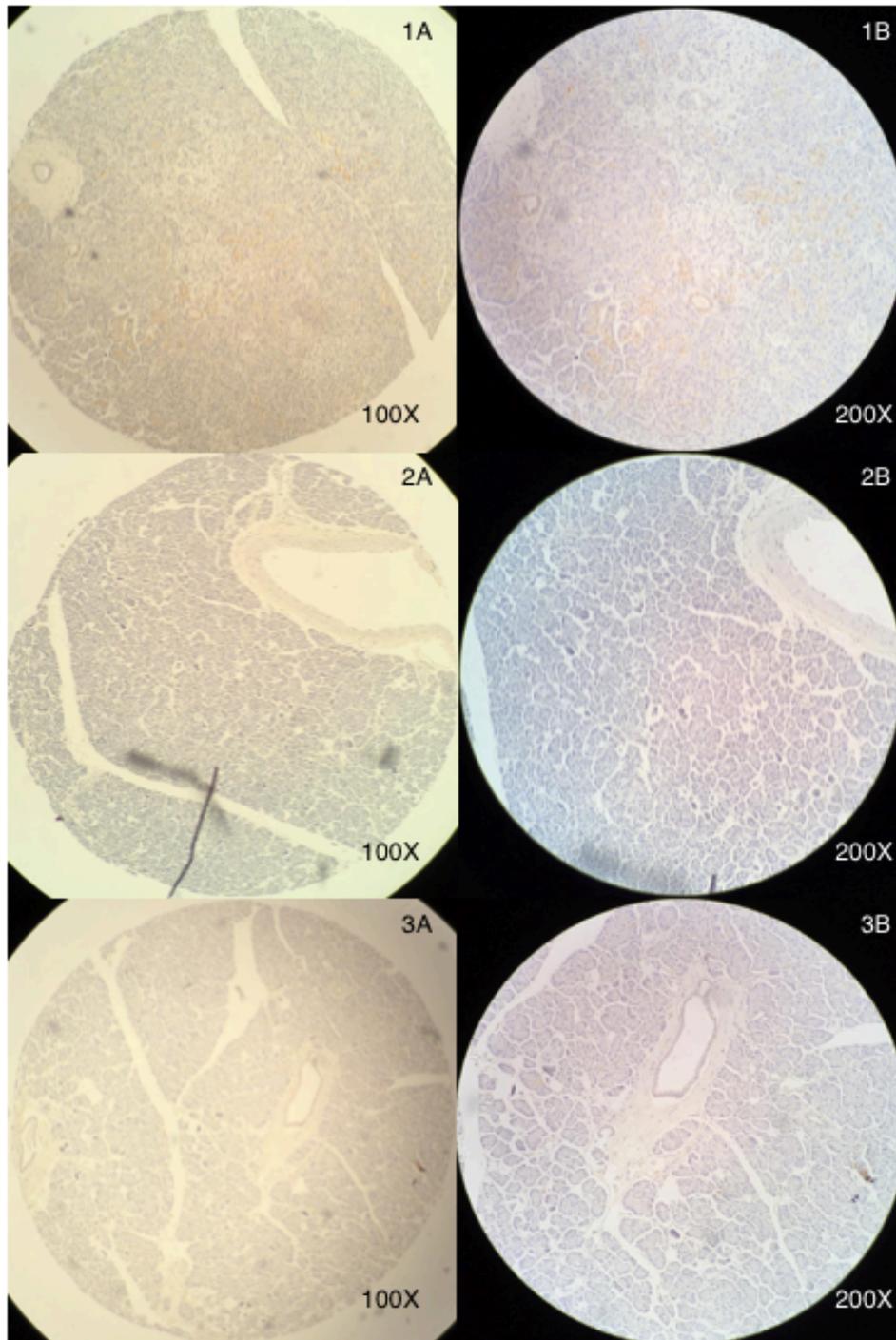


Figura 21. Estudio de reconocimiento de tejido sano de páncreas por el anticuerpo 83D4 realizado por la QF. Eugenia Fernández. Se presentan ensayos de Inmunohistoquímica de cortes de tejido sano de páncreas tratados con el anticuerpo 83D4 a partir del mismo protocolo utilizado en los ensayos de inmunohistoquímica realizados en esta tesina. Se observan los resultados obtenidos para tres tejidos (1A y 1B; 2A y 2B; 3A y 3B). La muestra 1 (1A, 1B) contiene una débil marca mientras que las otras dos muestras (2 y 3) resultaron negativas para el reconocimiento con 83D4.

Como se aclaró en la introducción, hasta el momento la literatura sobre la expresión de Tn en tejidos de páncreas sanos es contradictoria. Si bien se ha reportado la presencia de Tn en tejido sano de páncreas (Itzkowitz *et al.*, 1991a) a partir de estudios realizados con la lectina VVL, también en la literatura se reporta la ausencia de Tn en tejido de páncreas sano (Munkley, 2019). Los resultados de los ensayos de Inmunohistoquímica realizados por la Q. F. Eugenia Fernández, muestran que el tejido de páncreas puede expresar débilmente clústeres de Tn reconocidos por el anticuerpo 83D4, aunque la mayoría de los tejidos sanos de páncreas estudiados no resultaron expresar este antígeno. Este reconocimiento fue más débil que la gran mayoría de los tejidos de cáncer de páncreas estudiados en esta tesina. Es importante comentar que la lectina VVL reconoce monómeros del residuo GalNAc (Puri, Gopalakrishnan and Surolia, 1992). Debido a su naturaleza como lectina, la afinidad con la que reconoce al residuo carbohidrato es relativamente baja en comparación con la afinidad promedio de la mayoría de los anticuerpos (Hammond, 1993) (Cummings and Etzler, 2009). A su vez, la especificidad de los anticuerpos es generalmente superior a la especificidad de las lectinas (Cummings and Etzler, 2009). Esto podría explicar las diferencias observadas entre los perfiles de reconocimiento por 83D4 obtenidos y los perfiles de reconocimiento por VVL reportados en la literatura. A su vez, el anticuerpo 83D4 reconoce clústeres de 2 a 3 moléculas de Tn, las cuales podrían estar asociadas a una biosíntesis alterada de las glicoproteínas, en mayor medida que los monómeros del antígeno Tn. Los resultados de esta tesina evidencian que los clústeres de Tn se encuentran expresados en gran medida en tejidos tumorales de páncreas y en nula o muy baja medida en tejido de páncreas sano.

Finalmente, no se observó correlación entre el estadio de desarrollo tumoral y la expresión del antígeno Tn. La falta de correlación entre estas dos variables también fue reportada en estudios realizados sobre tejidos de carcinomas de mama (Imai *et al.*, 2001) y colon (Ohshio *et al.*, 1995).

5.2 Estudio comparativo del reconocimiento de líneas celulares tumorales de páncreas por los anticuerpos 83D4 y ChiTn

A partir de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia, pudimos evidenciar que el reconocimiento de las células de cáncer de páncreas mediante el anticuerpo 83D4 y el anticuerpo recombinante quimérico ChiTn fue similar. A su vez, los patrones de distribución granular de fluorescencia obtenidos mediante el reconocimiento por 83D4 fueron semejantes a los patrones evidenciados por el anticuerpo ChiTn. Si bien estos ensayos fueron necesarios para poder asegurar un patrón de reconocimiento similar, eran resultados esperables

ya que la región variable, que contiene el parátipe, de ambos anticuerpos es idéntica. Por lo tanto, el anticuerpo ChiTn, recombinante, tiene potencial para ser utilizados en terapias antitumorales dirigidas contra cáncer de páncreas.

5.3 Distribución sub-celular y disposición del antígeno Tn

Una vez evidenciada la presencia del antígeno Tn en células y tejido de páncreas tumoral, se propuso estudiar la distribución celular del antígeno reconocido por 83D4. En primera instancia, los resultados obtenidos de intensidad de fluorescencia por Citometría de flujo al comparar células permeabilizadas y no permeabilizadas muestran que posiblemente la mayoría del antígeno expresado por las células de las líneas T3M4, L3.6 y BXPC3 se encuentra en el interior celular y no en membrana celular. En este mismo sentido, las imágenes de microscopia de fluorescencia confirman la presencia mayoritaria de este antígeno en el interior celular. Además, tanto por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta como por Inmunohistoquímica, se muestra que el antígeno se dispone en gránulos mayoritariamente distribuidos de forma perinuclear y en algunos casos con distribución en el citoplasma. El patrón de distribución citoplasmático se evidenció, particularmente y en gran medida, en la línea celular BXPC3 mientras que en las líneas L3.6 y T3M4, la distribución fue predominantemente perinuclear. Por su parte, la distribución perinuclear podría asociarse al aparato de Golgi, donde se producen la mayoría de las O-glicosilaciones (Loureiro *et al.*, 2018). Estudios de microscopia de fluorescencia hechos en otras líneas celulares tumorales también reportan la localización del antígeno Tn en la superficie celular (periferia) y en el aparato de Golgi (región perinuclear) (Loureiro *et al.*, 2018) (Osinaga *et al.*, 1997) (Ohshio *et al.*, 1995). En la literatura se ha reportado que la localización celular de Tn en células epiteliales ductales de tejido de cáncer de páncreas se da principalmente en la región citoplasmática perinuclear, en lo que sugieren podría ser el aparato de Golgi, resultados que coinciden con lo observado en esta tesis (Itzkowitz *et al.*, 1991a) (Oppezzo *et al.*, 2000b). Asimismo, se ha propuesto que, además de su expresión alterada, la localización intracelular de las glicosiltransferasas puede llevar a glicosilaciones aberrantes y a la aparición del antígeno Tn (Gill *et al.*, 2013) (Andergassen *et al.*, 2015). En tumores malignos se ha reportado que existe una translocación de las transferasas, del aparato del Golgi al Retículo Endoplasmático (RE), alterando la expresión del antígeno Tn y este fenómeno se correlaciona con aumento de la agresividad y malignidad de las líneas celulares tumorales (Gill *et al.*, 2013). Este fenómeno de translocación podría explicar los diferentes patrones de expresión de clústeres de Tn observados. En este

contexto, sería interesante co-localizar el marcado del RE y del aparato de Golgi, con la expresión del antígeno Tn.

Adicionalmente, el ensayo de Western blot evidenció la presencia de varias proteínas reconocidas por el anticuerpo 83D4. Como se planteó anteriormente, nuestras perspectivas son identificar estas proteínas mediante Espectrometría de masas, lo cual nos daría mayor información acerca de la distribución del marcado de 83D4 en líneas celulares de cáncer de páncreas.

Por otra parte, los ensayos de Inmunohistoquímica realizados mostraron que las células epiteliales de los ductos de excreción pueden presentar dos patrones de distribución muy diferentes. Mientras que en la mayoría de las células epiteliales ductales se observa una distribución homogénea de la marcación a lo largo del eje apico-basal epitelial, en algunos casos la marca se localiza exclusivamente en la mitad apical celular. Un estudio publicado muestra por Inmunohistoquímica que Tn se encuentra concentrado en la región apical de la membrana celular de las células epiteliales ductales (Itzkowitz *et al.*, 1991a). Las células epiteliales pancreáticas, como muchas otras células de epitelio, presentan una polaridad baso-apical estructural y funcional, que es un reflejo de la distribución asimétrica de enzimas y actividades de transporte entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática (Ohshio *et al.*, 1995) (Simons and Fuller, 1985). Esta distribución asimétrica se logra por elementos del citoesqueleto y uniones estrechas que mantienen la organización intracelular. (Simons and Fuller, 1985). Esta polaridad molecular de las células epiteliales podría explicar la distribución asimétrica del antígeno Tn que encontramos en algunos ductos excretores en las muestras de pacientes. Una característica de las células tumorales pancreáticas ductales es la pérdida de polaridad celular en el proceso de transición epitelio mesénquima (Dangi-Garimella *et al.*, 2012). La ausencia de simetría encontrada en la distribución del antígeno Tn en algunas células epiteliales de los ductos de excreción podría ser consecuencia de la pérdida de polaridad debido a un avanzado estadio tumoral.

5.4 Estudio de la distribución sub-tisular del antígeno Tn reconocido por 83D4 en muestras de tejido tumoral de páncreas de pacientes oncológicos

Al evaluar los patrones de marcado en los tejidos de cáncer de páncreas estudiados por Inmunohistoquímica, se observó que la mayor parte de las estructuras reconocidas por el anticuerpo 83D4 eran estructuras excretoras como conductos de excreción y acinos pancreáticos. Las proteínas de excreción se encuentran sujetas a experimentar en gran medida

modificaciones postraduccionales, como la N-glicosilación, dentro del RE y la O-glicosilación dentro del aparato del Golgi (Cooley *et al.*, 2020). Por lo tanto, es esperable que las células de las estructuras secretoras contengan un alto metabolismo biosintético de glicoproteínas, lo que podría explicar por qué estas estructuras se marcaron con alta intensidad en las muestras de tejido de cáncer de páncreas.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que los anticuerpos 83D4 y ChiTn reconocen líneas celulares de cáncer de páncreas y que el anticuerpo 83D4 reconoce tejido tumoral de páncreas de pacientes. A su vez, la expresión de los clústeres del antígeno Tn no se limitó al interior celular, sino que también se evidenció la presencia del antígeno Tn a nivel de membrana plasmática en las tres líneas celulares de cáncer de páncreas estudiadas. También se evidenció en esta tesis que el reconocimiento de las líneas celulares BXPC3, T3M4 y L3.6 por el anticuerpo monoclonal murino 83D4 y por el anticuerpo recombinante ChiTn son similares. Además, resultados producidos por nuestro laboratorio muestran que la expresión del antígeno Tn en tejido de páncreas sano es nula o baja. Por lo tanto, los anticuerpos 83D4 y ChiTn poseen gran potencial para su utilización en diagnóstico de cáncer de páncreas basado en el reconocimiento de clústeres de la molécula Tn. Además, el anticuerpo ChiTn tiene gran potencial para su uso en inmunoterapias tumorales dirigidas hacia éste antígeno en cáncer de páncreas humano, lo cual abre nuevos horizontes hacia el desarrollo de terapias efectivas contra este tipo de tumores.

Como perspectivas de esta tesina de grado resulta interesante identificar las proteínas marcadas por 83D4 en las líneas celulares de cáncer de páncreas. Además, se plantea estudiar la presencia del antígeno Tn en un grupo mayor de muestras de tejidos sanos de páncreas, con el fin de confirmar la ausencia o baja presencia de este antígeno en tejido pancreático sano. Finalmente, dado a los resultados obtenidos, también resulta interesante estudiar la capacidad antitumoral del anticuerpo ChiTn conjugado a drogas con potencial quimioterapéutico en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de páncreas.

7. ANEXO

Línea Celular	BXPC3	L3.6	T3M4
Tumor	Carcinoma pancreático ductal	Carcinoma adenoescamoso de páncreas	Carcinoma pancreático ductal
Código NCI	C9120	C5721	C9120
Paciente de origen	Mujer, 61 Años.	Mujer, 77 Años.	Hombre, 64 Años.

Tabla S1. Líneas comerciales tumorales pancreáticas utilizadas. Datos extraídos de la base de datos *online* de acceso público ExPasy <https://web.expasy.org/cellosaurus/>

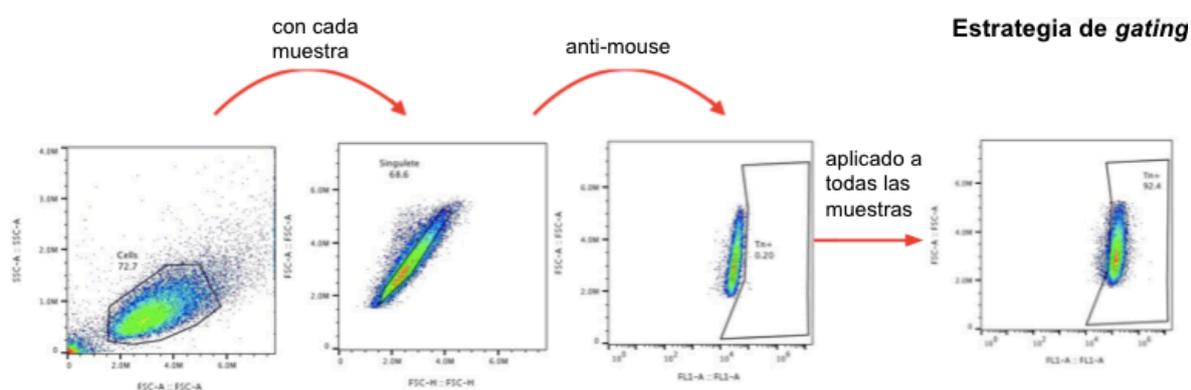


Figura S1. Estrategia de *gating* utilizada para los estudios de Citometría de flujo. Primero se seleccionó el *gate* de las células, luego el *gate* de los singletes y por último se seleccionó la región Tn positivas.

Línea Celular	Tratamiento	% Tn+		Media geométrica de fluorescencia normalizada de células marcadas con 83D4
		Promedio	Desviación estándar	
L3.6	Perm	97.0	0	6.0
	No Perm	49.3	1.53	5.6
BXPC3	Perm	97.9	0.35	18.5
	No Perm	25.6	1.59	1.7
T3M4	Perm	98.5	0.65	6.2

	No Perm	51.7	2.94	1.4
--	---------	------	------	-----

Tabla S2. Evaluación de los porcentajes de células Tn+ y la media geométrica de intensidad de fluorescencia para las células tratadas con 83D4 por citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células permeabilizadas (Perm) y sin permeabilizar (No Perm.) positivas para Tn para las líneas celulares comerciales trabajadas tratadas con 83D4, y la media geométrica de intensidad de fluorescencia normalizada por el control secundario.

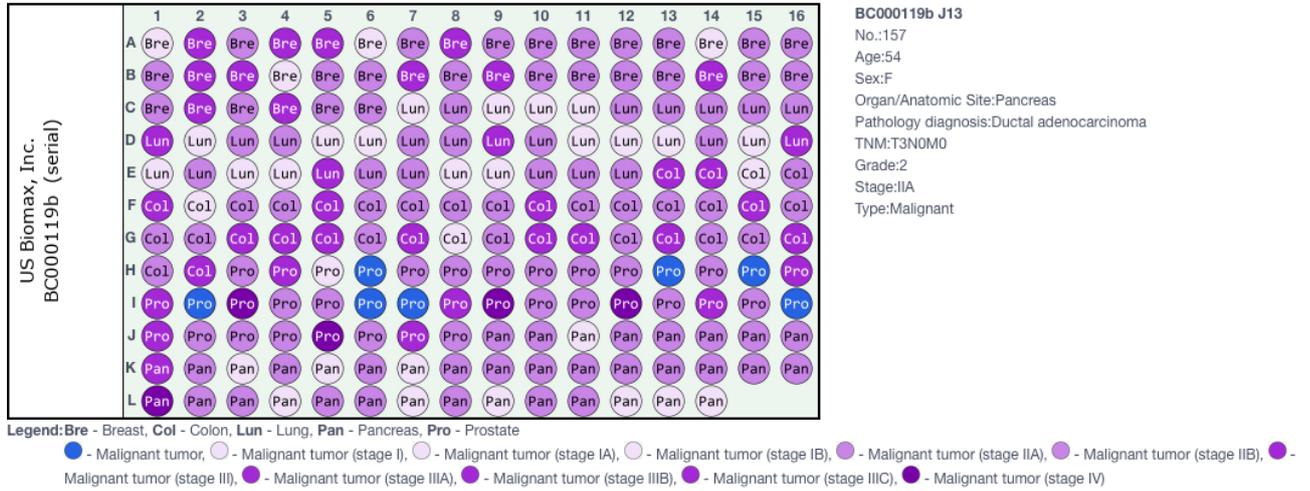
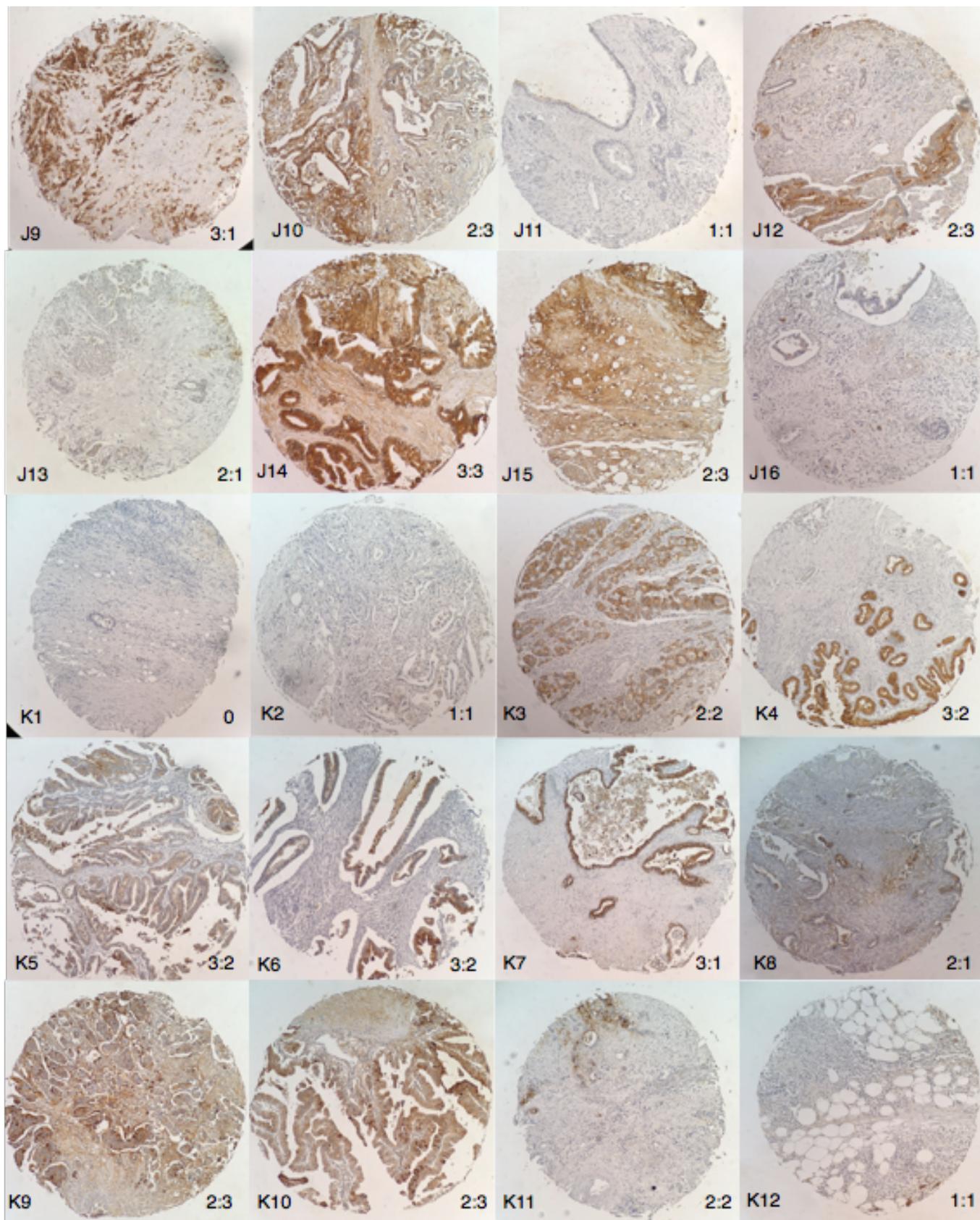


Figura S2. Array de tejidos de carcinoma de órganos múltiples. Se destacan los tejidos estudiados de adenocarcinoma de páncreas (Pan).

Muestra	Valor asignado a Intensidad de marca	Valor asignado a % de células positivas	Grado Total calculado	Estadío de desarrollo
J9	3	1	4	IIA
J10	2	3	5	IIA
J11	1	1	2	IIB
J12	2	3	5	IIA
J13	2	1	3	IIA
J14	3	3	6	IIA
J15	2	3	5	IIB
J16	1	1	2	IIA
K1	0	0	0	III
K2	1	1	2	IIB
K3	2	2	4	IB
K4	3	2	5	IIA
K5	3	2	5	IB
K6	3	2	5	IIB
K7	3	1	4	IB
K8	2	1	3	IIA
K9	2	3	5	IIA
K10	2	3	5	IIA
K11	2	2	4	IIA
K12	1	1	2	IIA

K13	2	2	4	IIB
K14	2	3	5	IIA
K15	2	3	5	IIB
K16	3	3	6	IIA
L1	1	2	3	IV
L2	1	1	2	IIA
L3	2	2	2	IIA
L4	2	3	4	IB
L5	1	1	2	IIA
L6	2	2	4	IIB
L7	2	1	3	IB
L8	2	3	5	IIB
L9	1	1	2	IB
L10	2	3	5	IIB
L11	1	1	2	IIA
L12	2	3	5	IB
L13	1	1	2	IB
L14	1	1	2	IB
L15	2	1	3	III
L16	2	3	5	IIB

Tabla S3. Valores de *score* asignado a cada muestra del *array* de tejidos de cáncer de páncreas y su estadio tumoral.



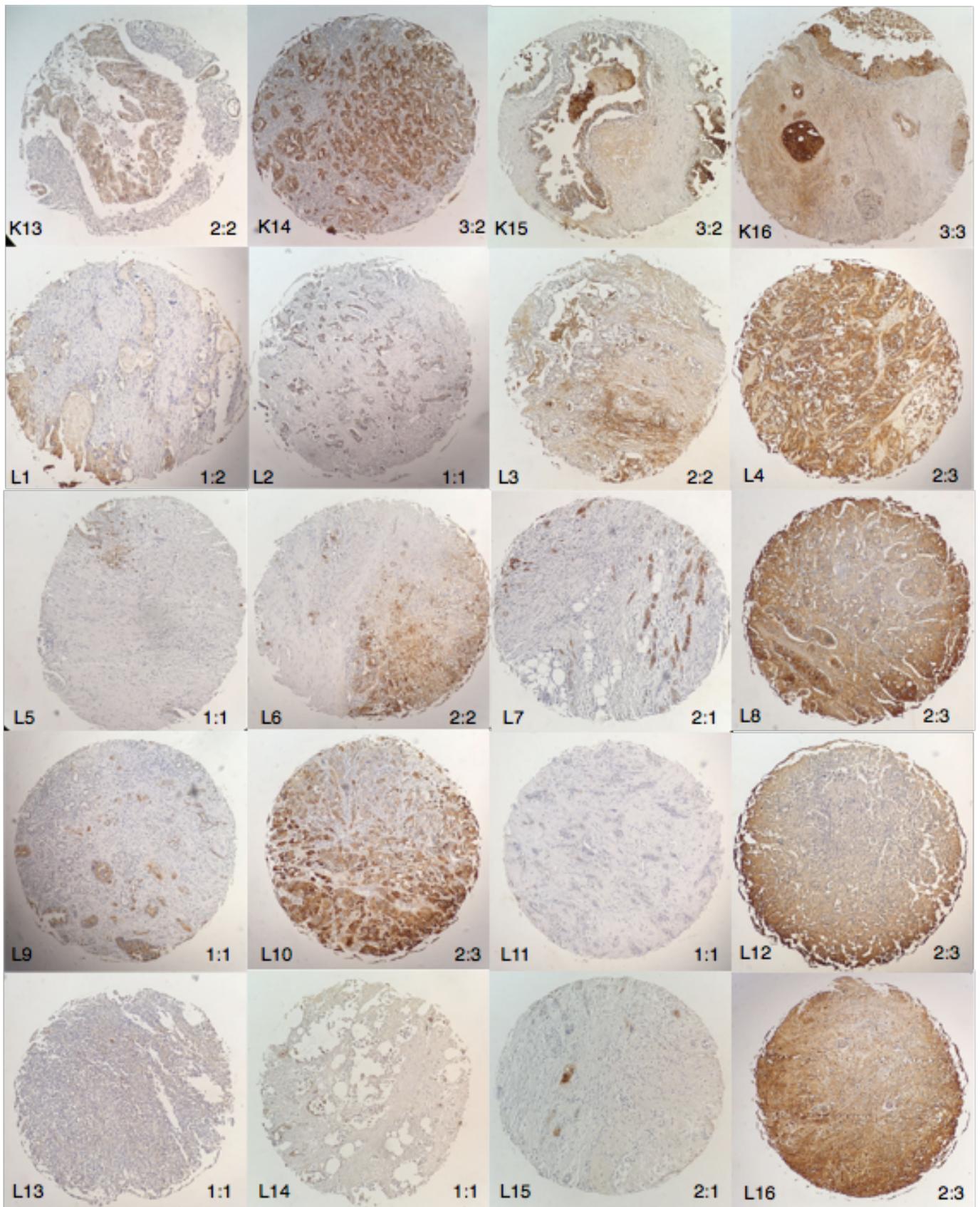


Figura S3. Estudio de presencia del antígeno Tn en muestras de tejido tumorales de páncreas humanos en un *array* por Inmunohistoquímica. Las tinciones por Inmunohistoquímica se realizaron según lo presentado en materiales y métodos, utilizando reactivos del Kit ABCAM para Inmunohistoquímica. Luego de bloquear la peroxidasa endógena y los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo, se incubaron las

muestras con el anticuerpo 83D4 sin diluir durante toda la noche a 4° Celsius. Posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario biotilado proporcionado por el kit (*anti-mouse*), el marcado se reveló incubando las muestras con estreptavidina peroxidasa y una solución de DAB, cromógeno y sustrato. Se utilizó Hematoxilina de Mayer para contrateñir los tejidos. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Olympus CX41RF con una magnificación 100x. Se observan las imágenes obtenidas por la Inmunohistoquímica realizada sobre un *array* de tejidos tumorales de páncreas con 83D4 y revelado con estreptavidina peroxidasa. Se muestran los 40 tejidos y los valores de intensidad “i” y porcentaje de células marcadas “%” como i:% sobre la esquina inferior derecha en cada imagen.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ajit Varki *et al.* (2017) *Essentials of Glycobiology*. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27010055/> (Accessed: November 21, 2021).
- American Society of Clinical Oncology (2021) *Cáncer de páncreas: Estadísticas | Cancer.Net*. Available at: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-pancreas/estadisticas> (Accessed: October 3, 2021).
- Andergassen, U. *et al.* (2015) “Glycosyltransferases as Markers for Early Tumorigenesis,” *BioMed Research International*, 2015. doi:10.1155/2015/792672.
- Babino, A. *et al.* (2003) “The crystal structure of a plant lectin in complex with the Tn antigen,” *FEBS Letters*, 536(1–3), pp. 106–110. doi:10.1016/S0014-5793(03)00037-1.
- Bennett, E.P. *et al.* (2012) “Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family,” *Glycobiology*, pp. 736–756. doi:10.1093/glycob/cwr182.
- Brandsma, A.M. *et al.* (2019) “Potent Fc receptor signaling by IgA leads to superior killing of cancer cells by neutrophils compared to IgG,” *Frontiers in Immunology*, 10(APR). doi:10.3389/fimmu.2019.00704.
- Brockhausen, I. (2006) “Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: Glycodynamics and functions,” *EMBO Reports*. European Molecular Biology Organization, pp. 599–604. doi:10.1038/sj.embor.7400705.
- Cao, Y. *et al.* (1996) “Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study,” *Histochemistry and cell biology*, 106(2), pp. 197–207. doi:10.1007/BF02484401.
- Cascio, S. and Finn, O.J. (2016) “Intra-and extra-cellular events related to altered glycosylation of MUC1 promote chronic inflammation, tumor progression, invasion, and metastasis,” *Biomolecules*. MDPI AG. doi:10.3390/biom6040039.
- Chugh, S. *et al.* (2018) “Disruption of C1galt1 Gene Promotes Development and Metastasis of Pancreatic Adenocarcinomas in Mice,” *Gastroenterology*, 155(5), pp. 1608–1624. doi:10.1053/j.gastro.2018.08.007.
- Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer (2021) *Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer - Mayo 2021*. Available at: <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/Situacion-Epidemiologica-del-Uruguay-en-relacion-al-Cancer--Mayo-2021-uc108> (Accessed: October 3, 2021).
- Cooley, M.M. *et al.* (2020) “Pancreatic Acinar Cell Protein Synthesis, Intracellular Transport, and Export,” *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base* [Preprint]. doi:10.3998/panc.2020.15.
- Cornelissen, L.A.M. *et al.* (2020) “Tn Antigen Expression Contributes to an Immune Suppressive Microenvironment and Drives Tumor Growth in Colorectal Cancer,” *Frontiers in Oncology*, 10. doi:10.3389/FONC.2020.01622.
- da Costa, V. *et al.* (2021) “The Tn antigen promotes lung tumor growth by fostering immunosuppression and angiogenesis via interaction with Macrophage Galactose-type lectin 2 (MGL2),” *Cancer letters*, 518, pp. 72–81. doi:10.1016/J.CANLET.2021.06.012.
- Cummings, R.D. and Etzler, M.E. (2009) “Antibodies and Lectins in Glycan Analysis,” *Essentials of Glycobiology* [Preprint]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1919/> (Accessed: November 14, 2021).
- D, H. and RA, W. (2000) “The hallmarks of cancer,” *Cell*, 100(1), pp. 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- Dangi-Garimella, S. *et al.* (2012) *Epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer progression, Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Transworld Research Network. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22876384> (Accessed: June 22, 2021).

Fedchenko, N. and Reifenrath, J. (2014) "Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review," *Diagnostic pathology*. Diagn Pathol, p. 221. doi:10.1186/s13000-014-0221-9.

García Merino, A. (2011) "Monoclonal antibodies. Basic features," *Neurología (English Edition)*, 26(5), pp. 301–306. doi:10.1016/S2173-5808(11)70063-3.

Giannis, D., Moris, D. and Barbas, A.S. (2021) "Diagnostic, Predictive and Prognostic Molecular Biomarkers in Pancreatic Cancer: An Overview for Clinicians," *Cancers*, 13(5), pp. 1–17. doi:10.3390/CANCERS13051071.

Gill, D.J. *et al.* (2013) "Initiation of GalNAc-type O-glycosylation in the endoplasmic reticulum promotes cancer cell invasiveness," *PNAS* [Preprint]. doi:10.1073/pnas.1305269110.

Hammond, J.R.M. (1993) "Brewer's Yeasts," *The Yeasts*, pp. 7–67. doi:10.1016/B978-0-08-092543-1.50012-6.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) "Hallmarks of Cancer: The Next Generation," *Cell*, 144(5), pp. 646–674. doi:10.1016/J.CELL.2011.02.013.

Hasan, S. *et al.* (2019) "Advances in pancreatic cancer biomarkers," *Oncology Reviews*, 13(1), pp. 69–76. doi:10.4081/ONCOL.2019.410.

Hassanpour, S.H. and Dehghani, M. (2017) "Review of cancer from perspective of molecular," *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), pp. 127–129. doi:10.1016/J.JCRPR.2017.07.001.

Hofmann, B.T. *et al.* (2015) "COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer," *Molecular Cancer*, 14(1). doi:10.1186/s12943-015-0386-1.

Hubert, P. *et al.* (2011) "Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy," *Cancer Research*, 71(15), pp. 5134–5143. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4222.

Imai, J. *et al.* (2001) "Immunohistochemical expression of T, Tn and sialyl-Tn antigens and clinical outcome in human breast carcinoma," *Anticancer Research* [Preprint].

Itzkowitz, S. *et al.* (1991a) "Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human pancreas," *Gastroenterology*, 100(6), pp. 1691–1700. doi:10.1016/0016-5085(91)90671-7.

Itzkowitz, S. *et al.* (1991b) "Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human pancreas," *Gastroenterology*, 100(6), pp. 1691–1700. doi:10.1016/0016-5085(91)90671-7.

Jiang, T. *et al.* (2019) "Tumor neoantigens: from basic research to clinical applications," *Journal of Hematology & Oncology 2019 12:1*, 12(1), pp. 1–13. doi:10.1186/S13045-019-0787-5.

Ju, T. *et al.* (2002) "Cloning and expression of human core 1 β 1,3-galactosyltransferase," *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), pp. 178–186. doi:10.1074/jbc.M109060200.

Ju, T. *et al.* (2014) "The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer," *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 14(1), p. 63. doi:10.3233/CBM-130375.

Kudelka, M.R. *et al.* (2015) "Simple sugars to complex disease-mucin-type O-glycans in cancer," *Advances in Cancer Research*, 126, pp. 53–135. doi:10.1016/BS.ACR.2014.11.002.

Loureiro, L.R. *et al.* (2018) "Novel monoclonal antibody L2A5 specifically targeting sialyl-Tn and short glycans terminated by alpha-2–6 sialic acids," *Scientific Reports 2018 8:1*, 8(1), pp. 1–16. doi:10.1038/s41598-018-30421-w.

Mantuano, N.R. *et al.* (2020) "Tumor-associated carbohydrates and immunomodulatory lectins as targets for cancer immunotherapy," *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(2), p. e001222. doi:10.1136/JITC-2020-001222.

Matsumoto, Y. *et al.* (2020) "Identification of Tn antigen O-GalNAc-expressing glycoproteins in human carcinomas using novel anti-Tn recombinant antibodies," *Glycobiology*, 30(5), pp. 282–300. doi:10.1093/glycob/cwz095.

Mazal, D. *et al.* (2013) "Monoclonal antibodies toward different Tn-amino acid backbones display distinct recognition patterns on human cancer cells. Implications for effective

immuno-targeting of cancer,” *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(6), pp. 1107–1122. doi:10.1007/s00262-013-1425-7.

Medeiros, A. *et al.* (2000) “Biochemical and functional characterization of the Tn-specific lectin from *Salvia sclarea* seeds,” *European Journal of Biochemistry*, 267(5), pp. 1434–1440. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01141.x.

Munkley, J. (2019) “The glycosylation landscape of pancreatic cancer (Review),” *Oncology Letters*. Spandidos Publications, pp. 2569–2575. doi:10.3892/ol.2019.9885.

National Cancer Institute (2021) *What Is Cancer? - National Cancer Institute*. Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (Accessed: October 3, 2021).

Noy, R. and Pollard, J.W. (2014) “Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy,” *Immunity*, 41(1), p. 49. doi:10.1016/J.IMMUNI.2014.06.010.

Ohshio, G. *et al.* (1995) “Distribution of Tn antigen recognized by an anti-Tn monoclonal antibody (MLS128) in normal and malignant tissues of the digestive tract,” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 121(4), pp. 247–252. doi:10.1007/BF01366970.

Oppezzo, P. *et al.* (2000a) “Production and functional characterization of two mouse/human chimeric antibodies with specificity for the tumor-associated Tn-antigen,” *Hybridoma*, 19(3), pp. 229–239. doi:10.1089/02724570050109620.

Oppezzo, P. *et al.* (2000b) “Production and functional characterization of two mouse/human chimeric antibodies with specificity for the tumor-associated Tn-antigen,” *Hybridoma*, 19(3), pp. 229–239. doi:10.1089/02724570050109620.

Osinaga, E. *et al.* (1997) *Amino acid sequence and three-dimensional structure of the Tn-specific isolectin B4 from Vicia villosa*, *FEBS Letters*. doi:10.1016/S0014-5793(97)00677-7.

Osinaga, E. *et al.* (2000) “Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy,” *FEBS Letters*, 469(1), pp. 24–28. doi:10.1016/S0014-5793(00)01248-5.

Puri, K.D., Gopalakrishnan, B. and Surolia, A. (1992) “Carbohydrate binding specificity of the Tn-antigen binding lectin from *Vicia villosa* seeds (VVLB4),” *FEBS Letters*, 312(2–3), pp. 208–212. doi:10.1016/0014-5793(92)80937-C.

Rawla, P., Sunkara, T. and Gaduputi, V. (2019) “Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors,” *World Journal of Oncology*, 10(1), p. 10. doi:10.14740/WJON1166.

Sadraei, S.I., Reynolds, M.R. and Trant, J.F. (2017) “The Synthesis and Biological Characterization of Acetal-Free Mimics of the Tumor-Associated Carbohydrate Antigens,” *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 74, pp. 137–237. doi:10.1016/BS.ACCB.2017.10.003.

Sakai, K. *et al.* (2010) “Isolation and characterization of antibodies against three consecutive Tn-antigen clusters from a phage library displaying human single-chain variable fragments,” *The Journal of Biochemistry*, 147(6), pp. 809–817. doi:10.1093/JB/MVQ014.

Simons, K. and Fuller, S.D. (1985) “Cell surface polarity in epithelia,” *Annual review of cell biology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , pp. 243–288. doi:10.1146/annurev.cb.01.110185.001331.

Stowell, S.R., Ju, T. and Cummings, R.D. (2015) “Protein glycosylation in cancer,” *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10, pp. 473–510. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040438.

Tivadar, S.T. *et al.* (2020) “Monoclonal antibody targeting sialyl-Di-LewisX-containing internalizing and noninternalizing glycoproteins with cancer immunotherapy development potential,” *Molecular Cancer Therapeutics*, 19(3), pp. 790–801. doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-0221.

Trabbic, K.R. *et al.* (2019) “A Tumor-Selective Monoclonal Antibody from Immunization with a Tumor-Associated Mucin Glycopeptide,” *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), pp. 1–12. doi:10.1038/s41598-019-42076-2.

Weitzenfeld, P., Bournazos, S. and Ravetch, J. v. (2019) “Antibodies targeting sialyl Lewis A mediate tumor clearance through distinct effector pathways,” *The Journal of clinical investigation*, 129(9), pp. 3952–3962. doi:10.1172/JCI128437.

Whiteside, T. (2008) “The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth,” *Oncogene*, 27(45), p. 5904. doi:10.1038/ONC.2008.271.

World Cancer Report (2014) *IARC Publications Website - World Cancer Report 2014*. Available at: <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014> (Accessed: June 21, 2021).

Y, M. *et al.* (2020) “Identification of Tn antigen O-GalNAc-expressing glycoproteins in human carcinomas using novel anti-Tn recombinant antibodies,” *Glycobiology*, 30(5), pp. 282–300. doi:10.1093/GLYCOB/CWZ095.

Zhang, X. *et al.* (2014) “The application of monoclonal antibodies in cancer diagnosis,” *Expert Review of Molecular Diagnostics*. *Expert Rev Mol Diagn*, pp. 97–106. doi:10.1586/14737159.2014.866039.

Zhang, Z. *et al.* (2021) “Neoantigen: A New Breakthrough in Tumor Immunotherapy,” *Frontiers in Immunology*, 0, p. 1297. doi:10.3389/FIMMU.2021.672356.