

Maestría en Ciencias Biológicas PEDECIBA

***“Evaluación de las
propiedades anti-tumorales de un péptido tipo
mucina de origen parasitario”***

Lic. Verónica Noya

Maestría en Ciencias Biológicas PEDECIBA

Opción Biología Celular y Molecular

Orientador: Dra. Teresa Freire

Co-orientador: Dr. Eduardo Osinaga

Departamento de Inmunobiología

Facultad de Medicina

Universidad de la República

Tribunal

Dr. Alfonso Cayota, presidente

Dr. Marcelo Hill, vocal

Dra. Maria Moreno vocal

Fecha de Defensa: 15 de Setiembre, 2011.

Resumen

En esta tesis de Maestría se evaluaron las propiedades inmunológicas de péptidos derivados de la proteína tipo mucina C317 de *E. granulosus*, en particular C317, EM5, y EM5-2Tn. Los mismos resultaron poseer una alta inmunogenicidad en murinos, siendo capaces de generar una respuesta celular T, de tipo Th1 caracterizada por una alta producción de INF γ . Los péptidos también indujeron una respuesta humoral en la cual se evidenció la presencia de anticuerpos específicos contra los mismos.

La alta inmunogenicidad de los péptidos, la capacidad de las células dendríticas en internalizarlos y activarse en presencia de los mismos, produciendo IL6, IL12 y el hecho de que los péptidos son de origen parasitario, evitando posibles efectos de tolerancia, representaron hechos alentadores para evaluar dichos péptidos en modelos murinos de cáncer utilizando las líneas PancO2 y TA3/Ha. En este sentido se llevaron a cabo experimentos en los que se demostró el rol activador o potenciador de la respuesta celular *in vivo* de los péptidos C317, EM5, y EM5-2Tn ya que esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con dichos péptidos, fueron capaces de mediar la eliminación de células tumorales. Nuestros resultados sugieren que los péptidos evaluados inducen un aumento de células NK activadas, las cuales podrían ser responsables del efecto citotóxico demostrado *in vitro*. Asimismo, a partir de los estudios de células dendríticas podemos sugerir que los péptidos, en conjunto con LPS, sinergizan la producción de IL6 e IL12. Esta última citoquina, podría ser la responsable de activar las células NK, las cuales median la muerte celular. En el momento, nos encontramos realizando estudios *in vivo*, para demostrar los efectos anti-tumorales de estos péptidos en ratones con cáncer.

Indice

Resumen.....	2
Agradecimientos.....	6
Introducción.....	7
1. Cáncer y Antígenos Asociados a Tumor (TAA).....	7
1.1 Epidemiología del Cáncer.....	7
1.2 Biología del Cáncer.....	8
1.3 Tipos de Cáncer.....	10
1.4 Antígenos Asociados a Tumor.....	10
1.4.1 Antígenos Sobre-expresados.....	11
1.4.2 Auto-antígenos Mutados ó Alterados.....	12
1.4.3 Antígenos específicos de Linaje y/ó Diferenciación.....	12
1.4.4 Antígenos Virales.....	13
1.4.5 Antígenos cancerígenos/Testiculares (CT).....	13
1.4.6 Clasificación de TAA.....	13
2. Inmunidad y cáncer.....	14
2.1 Mecanismos efectores de la inmunidad anti-tumoral.....	17
2.2 Mecanismos de Escape Tumoral.....	19
2.3 Inmunoterapia anti-tumoral.....	20
3. Antígeno Tn y Cáncer.....	23
3.1 Antígeno Tn.....	23
3.1.1 O-Glicosilación.....	23
3.1.2 Antígenos de O-glicosilación incompleta.....	24
3.2 Mucinas.....	26
3.3 Mucinas en el Cáncer.....	27
3.4 Mucinas Parasitarias.....	29
Objetivos	31
1 Objetivos Generales.....	31
2 Objetivos Específicos.....	32
Metodología.....	33
1 Líneas celulares tumorales.....	33

2	Ratones.....	33
3	Obtención de péptidos C317 presentando el antígeno Tn.....	34
	3.1 Producción de C317 recombinante en <i>E. Coli</i>	34
	3.2 Péptidos y Proteínas Sintéticos.....	34
	3.3 Detección de Endotoxinas.....	34
	3.4 Glicosilación <i>in vitro</i>	35
4	Mapeo Peptídico.....	35
5	Evaluación de la Respuesta Inmunitaria.....	36
	5.1 Evaluación de la respuesta celular.....	36
	5.2 Evaluación de la respuesta humoral.....	37
6	Determinación de Citoquinas ELISA.....	37
7	Evaluación del reconocimiento de células tumorales por sueros obtenidos de ratones inmunizados por citometría de flujo.....	37
8	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad citotóxica de esplenocitos de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn ó C317.....	38
9	Identificación de Poblaciones Celulares en esplenocitos de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn ó C317.....	39
10	Ensayos con Células Dendríticas.....	39
	10.1 Generación de células Dendríticas.....	39
	10.2 Internalización de antígenos por BMDC.....	40
	10.3 Maduración de Células Dendríticas.....	40
11	Análisis estadísticos.....	41
	Resultados.....	42
1.	Expresión de la proteína C317 recombinante en <i>E. Coli</i>	42
	1.1 Glicosilación <i>in vitro</i>	44
	1.2.1 Optimización sobre péptido MUC6.....	44
	1.2.1 Glicosilación <i>in vitro</i> de la proteína C317.....	46
2.	Identificación de Regiones Inmunodominantes de C317.....	46
	2.1 Inmunogenicidad de la proteína C317.....	47
	2.2 Determinación de Regiones Inmunodominantes de C317.....	49
	2.3 Glicosilación del péptido EM5.....	50
3.	Evaluación de la Respuesta Inmunitaria inducida por C317 y EM5.....	52

3.1	Selección de Adyuvante.....	52
3.2	Análisis de la Respuesta Inmunitaria inducida por los péptidos EM5, EM5-2Tn y C317.....	53
3.3	Evaluación de la Respuesta Humoral Inducida por EM5, EM5-2Tn y C317.....	55
4.	Evaluación de la capacidad anti-tumoral de la respuesta inducida por EM5, EM5-2Tn y C317.....	57
4.1	Optimización de Modelos Tumoraes TA3Ha y PancO2.....	57
4.2	Análisis de la Respuesta Celular presente en ratones C57BL/6 con cáncer PancO2 y TA3/Ha: Estudio del reconocimiento de EM5 y EM5-2Tn.....	58
4.3	Análisis de la Respuesta Inmune humoral anti-tumoral inducida por EM5, EM5-2Tn y C317.....	60
4.4	Análisis del reconocimiento de antígenos derivados de PancO2 y TA3/Ha por esplenocitos de ratones inmunizados con C317, EM5 y EM5-2Tn.....	61
4.5	Estudio de la capacidad citotóxica <i>in vitro</i> de esplenocitos de ratones inmunizados con C317, EM5 y EM5-2Tn.....	62
5.	Evaluación de los mecanismos responsables en la respuesta anti-tumoral inducida por EM5, EM5-2Tn y C317.....	64
5.1	Células dendríticas.....	64
5.1.1	Internalización de C317, EM5 y EM5-2Tn por las células dendríticas.....	65
5.1.2	Estudio del efecto de EM5, EM5-2Tn y C317 en la maduración de células dendríticas.....	67
6.	Estudio de Poblaciones Celulares en ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn y C317.....	69
	Discusión.....	72
1	Obtención de péptidos C317 presentando el antígeno Tn.....	72
2	Evaluación de la Respuesta Inmunitaria inducida por C317, EM5 y EM5-2Tn.....	75
3	Evaluación de los mecanismos responsables de la respuesta anti-tumoral inducida por EM5,EM5-2Tn C317	78
	Referencias Bibliográficas.....	84

Agradecimientos

Muchas gracias a todos aquellos que de alguna manera u otra, han participado de este proyecto. A mi familia, mis padres y hermanas, muchas gracias, por su compañía y apoyo incondicional. A la “familia elegida” Gonza, Lore, Rosa, Ceci, Lucía y todos los que me acompañan y animan el camino todos los días, a todos ellos muchas gracias.

Gracias a todos los compañeros y amigos del laboratorio, por hacer tan llevadera la tarea y en especial tan divertida, entre ellos, gracias a Enrique por los cafetakis compartidos y por su amistad, también a Carolina y a Ernesto con quienes es un placer trabajar.

A Teresa, por la dedicación y en especial por ser tan generosa con el conocimiento y con la experiencia, y por hacer de todas las instancias una oportunidad de aprendizaje enriqueciendo mi formación.

A Eduardo por su gran aporte en mi formación, por el apoyo y haberme abierto las puertas a este departamento.

Gracias también a Mónica y a Vicky siempre dispuestas a colaborar y buscar soluciones.

Por último gracias a la ANII y AMSUD-Pasteur por su apoyo económico.

Introducción

1. Cáncer y Antígenos Asociados a Tumor (TAA)

1.1 Epidemiología del Cáncer

El cáncer constituye uno de los principales problemas de salud en todo el mundo y es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad [1] siendo la segunda causa de muerte luego de la patología cardiovascular en nuestro país al igual que ocurre en el mundo occidental. El mismo se origina a partir de la proliferación descontrolada y la extensión de clones de células transformadas. El crecimiento de los tumores de tipo maligno está determinado en gran medida por la capacidad proliferativa de las células que lo componen y por su capacidad de invadir nuevos tejidos [2-3].

En cuanto a la epidemiología de esta enfermedad cabe destacar a modo de ejemplo, que solo en el año 2008 se detectó en el mundo una incidencia de más de 6 millones de casos y una mortalidad superior a 4 millones. En Uruguay también se observan altos niveles de incidencia y mortalidad, 8065 y 4871 casos, respectivamente en el mismo año (<http://globocan.iarc.fr/>). La incidencia y la mortalidad según las distribuciones de los casos en función del tipo de cáncer se muestran en la Figura 1.

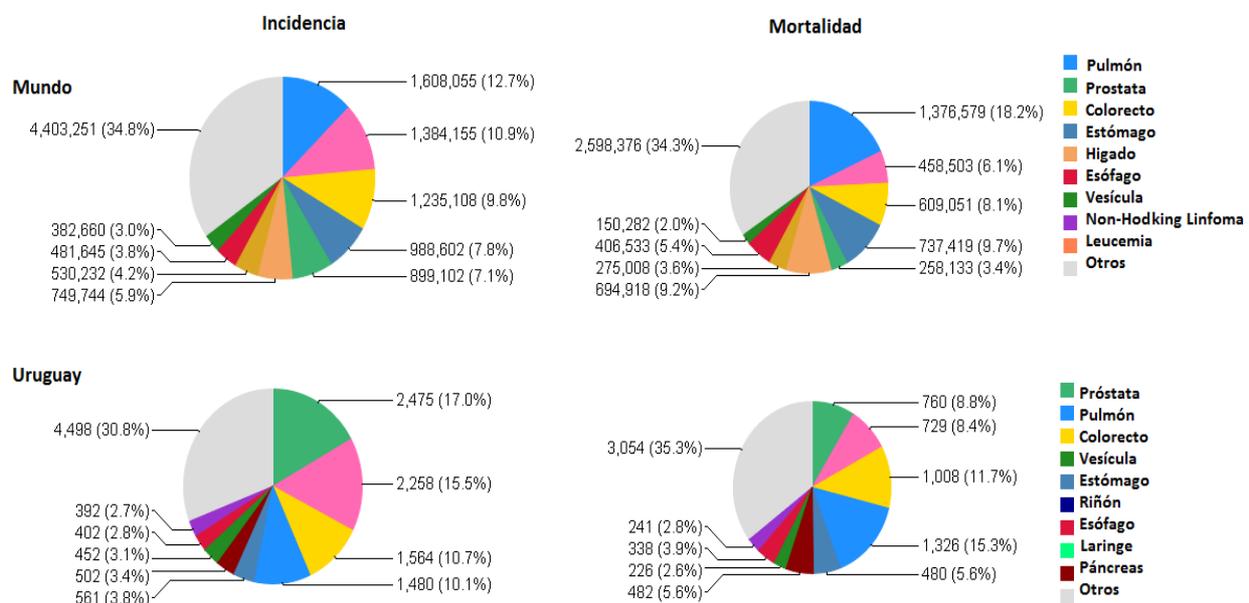


Figura 1. Epidemiología del Cáncer. Datos estadísticos obtenidos de GLOBOCAN para el año 2008 para el Mundo y para el Uruguay en cuanto a la Incidencia (izquierda) y mortalidad (derecha). Los datos reflejan los casos sumados de hombres y mujeres sin tener en cuenta la edad de los pacientes.

Tomando como referencia el mismo año (2008) en cuanto a la franja etaria hombre/mujer, se observa que para las mujeres el cáncer de mama es el de mayor prevalencia (34,6% de incidencia y 19,3 % de mortalidad), mientras que en los hombres los más frecuentes son los cánceres de pulmón (15,1% de incidencia y 22,4% de mortalidad) y de próstata (30,7% de incidencia y 15,6% de mortalidad).

Los datos epidemiológicos, sumados a un aumento en el control de las enfermedades cardiovasculares con un leve descenso de éstas como primer causa de muerte a nivel de los países desarrollados, hacen que exista una posible tendencia a que el cáncer constituya, en las próximas décadas, la primer causa de muerte.

1.2 Biología del Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por un trastorno de la proliferación y el comportamiento celular que lleva al tumor a una conducta “asocial” con el huésped donde las células crecen sin seguir patrones morfológicos ni funcionales, invadiendo tejidos circundantes y distantes. El origen de la carcinogénesis se encuentra en la acumulación de lesiones genéticas no letales, las que pueden adquirirse por la acción de agentes ambientales, como sustancias químicas, radiación o virus, o puede heredarse con la línea germinal. Esta hipótesis genética del cáncer implica que un tumor se debe a la expansión clonal de una célula transformada, es así entonces que los tumores suelen ser monoclonales en su origen [3].

Los principales genes involucrados en la carcinogénesis son de cuatro clases: los protooncogenes, los genes supresores de tumor, los genes que regulan la apoptosis y los genes reparadores del ADN. No basta con una sola mutación para desarrollar un cáncer sino que es la acumulación de mutaciones no letales la que determina su desarrollo. Los genes que regulan la entrada a la carcinogénesis son los llamados genes “porteros” (gatekeeper): basta con la mutación de un alelo de estos genes para comenzar el proceso. Por otro lado los genes “conserje” (caretaker), son aquellos que mantienen la integridad del ADN y que necesitan de la mutación de ambos alelos más la mutación de un gen portero para comenzar la cascada carcinogénica.

Durante las sucesivas divisiones de las células transformadas se van acumulando mutaciones en distintos genes que van dándole a la células descendientes características diferentes, ésto genera subpoblaciones con diferentes atributos fenotípicos entre sí (como por ejemplo, capacidad de invasión, capacidad de generar metástasis a distancia, respuesta a hormonas, resistencia a fármacos anti-neoplásicos, etc.). Este fenómeno es conocido como progresión tumoral y determina

que si bien un tumor comenzó siendo monoclonal, la masa tumoral al diagnóstico es muy heterogénea .

La historia natural de la mayoría de los tumores malignos puede dividirse entonces en cuatro fases: 1) Transformación: en la cual una célula normal adquiere una mutación en alguno de los genes descritos; 2) Crecimiento: en la que las células transformadas se dividen acumulando mutaciones gracias a su propia inestabilidad formando un grupo de células heterogéneo; 3) Invasión local: en la cual algunas de las células transformadas adquieren la capacidad de atravesar la membrana basal y progresar a través del estroma y 4) Metástasis a distancia: un pequeño grupo de células adquiere la capacidad de progresar hacia la circulación, sobrevivir al sistema inmune en el torrente sanguíneo y depositarse en órganos distantes desarrollando colonias del tumor original.

En el proceso de carcinogénesis antes mencionado las células adquieren al menos seis características típicas que generan el fenotipo maligno destructor del cáncer, como se esquematiza en la Figura 2.

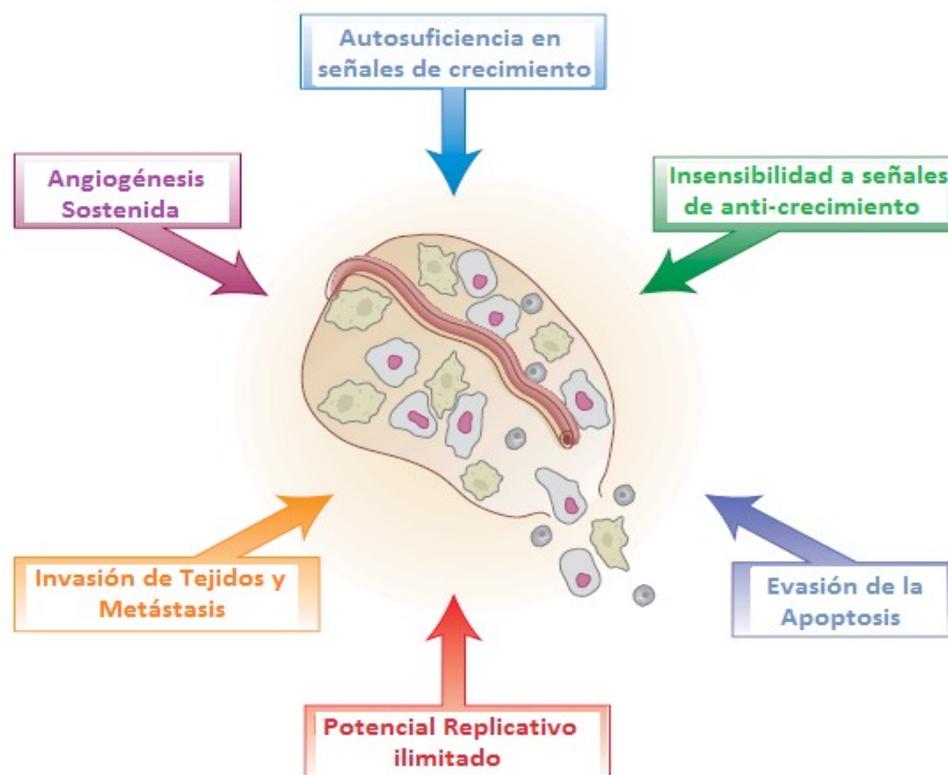


Figura 2. Características típicas adquiridas por las células cancerosas. Las células cancerosas adquieren determinadas capacidades funcionales durante la carcinogénesis. En particular, las células adquieren seis características: angiogénesis sostenida, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales de anti-crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado e invasión de tejidos y metástasis. Las mismas otorgan a las células cancerosas el fenotipo destructor. Figura adaptada de Hanahan & Weinberg R A, 2000 [6].

1.3 Tipos de Cáncer

Existen distintos tipos de cáncer. Los cuales pueden clasificarse dependiendo del tipo de tejido en donde se originan. Por ejemplo, los carcinomas se desarrollan en el tejido epitelial como piel, glándulas (mamarias, próstata), pulmones, estómago, esófago. Por otro lado, los sarcomas son originados a partir de tejido mesenquimatoso, como ser huesos, tendones cartílagos y músculo; las leucemias, cáncer originado a partir de células provenientes del sistema hematopoyético; los linfomas desarrollados en células de las glándulas del sistema inmune; por último los mielomas desarrollados a partir de células plasmáticas de médula ósea [6].

En el contexto de esta maestría se estudiarán en particular aspectos relacionados a los tumores de tipo epitelial que comprenden a su vez distintos tipos de cáncer. En la Tabla I se detallan los distintos tumores epiteliales así como la manifestación benigna y maligna (extraída de [4]).

Tabla I. Clasificación de Tumores de tipo Epitelial

Tejido de Origen	Benigno	Maligno
Tumores Epiteliales		
Epitelio escamoso estratificado	Papiloma Escamoso	Carcinoma de células o epidermoide Carcinoma o epitelioma basocelular
Células basales de la piel o anejos		
Revestimientos Epiteliales		
Glándulas o Conductos	Adenoma Papiloma Escamoso Cistadenoma	Adenocarcinoma Carcinoma papilar Cistadenocarcinoma
Vías Respiratorias		Carcinoma bronquial Adenoma bronquial (carcinoide)
Neuroectodermo	Nevo	Melanoma Maligno
Epitelio renal	Adenoma tubular renal	Carcinoma de células renales
Hepatocitos	Adenoma hepático	Hepatocarcinoma, carcinoma hepatocelular
Vía urinario (epitelio de transición)	Papiloma transicional	Carcinoma transicional
Placentario (trofoblasto)	Moda hidatiforme	Coriocarcinoma
Testicular (células germinales)		Carcinoma embrionario

1.4 Antígenos Asociados a Tumor

Ciertas proteínas utilizadas por los tumores para promover la transformación y la tumorigénesis para establecer así un fenotipo maligno, son en ocasiones referidas como Antígenos Asociados a Tumor ó TAA (por su sigla en inglés Tumor Associated Antigens). El reconocimiento de este tipo de

antígenos puede rastrearse hasta el descubrimiento de H- y K-Ras [5]. Los avances en técnicas de biología molecular y de “screening” inmunológico han aumentado enormemente la cantidad de TAA identificados, como ser el antígeno BRCA en cáncer de mama y ovario [8] ó el antígeno MAGE en melanoma [9]. De esta manera, se ha profundizado en el estudio de los TAA de forma tal que hoy se pueden clasificar en distintos subgrupos: **antígenos sobre-expresados, específicos de linaje o diferenciación, antígenos virales, autoantígenos mutados ó alterados, antígenos cancerosos y testiculares (Antígenos CT)**. Estos antígenos se detallan en la Tabla II [11].

Tabla II. Clasificación de Antígenos Asociados a Tumor

Tipo de Antígeno	Nombre	Malignidad
Sobre-expresados	HER-2	Mama
	MUC-1	Mama, Ovario, Linfoma
	WT-1	Leucemias, MDS
Específicos de Linaje/Diferenciación	gp100	Melanoma
	Melan-A/MART-1	Melanoma
	Tirosinasa	Melanoma
	PSA	Prostata
Viral	E6/E7	Cervical, Cabeza y Cuello
	EBNA	Linfomas
	Tax	Leucemia de Células T/ Linfoma
	HCV core	Hepatocelular
Autoantígenos Mutados/Alterados	BCR-ABL	CML.Ph+ ALL
	PML-RAR α	APL/FAB AML M3
Antígenos Testiculares Cancerosos	MAGE	Melanoma
	HAGE	Leucemias, Mieloma, MGUS, Linfoma
	PRAME	Leucemias, Mieloma

1.4.1 Antígenos Sobre-expresados

En cuanto al subgrupo de TAA de **antígenos sobre-expresados** se ha observado que determinados tumores son capaces de estimular la sobre-expresión de ciertos constituyentes celulares que a su vez promueven el crecimiento maligno. Ejemplos de estos antígenos incluyen el antígeno HER-2 y MUC-1 en carcinoma de mama [10] y el antígeno Wilm’s Tumour-1 (WT-1) en varios tipos de transformaciones malignas como ser cáncer de pulmón, de ovario, gástrico y hematológicos incluyendo leucemias y linfomas [11].

El gen MUC1 perteneciente a la familia de genes que codifican para glicoproteínas de tipo mucina [12], es expresado normalmente en la superficie apical de células epiteliales de la glándula mamaria. Sin embargo, en adenocarcinoma de mama, o en cierto tipos de cánceres epiteliales, su

expresión es más elevada y la mucina se expresa en toda la superficie celular [13]. Esta característica hace que MUC-1 sea un marcador valioso de cáncer de mama, ya que su sobre-expresión se utiliza para el diagnóstico y se correlaciona con una peor prognosis [13].

Por otro lado, si bien estos antígenos están sobre-expresados en células cancerosas, las células normales también los expresan, lo que podría aparejar problemas de autoinmunidad al utilizarlos en inmunoterapia. De todas formas se han desarrollado vacunas de uso clínico para los antígenos MUC-1 [14] que se encuentran en estudio.

1.4.2 Auto-antígenos Mutados ó Alterados

Los TAA del subgrupo **autoantígenos mutados ó alterados** se pueden observar en cáncer generados por la acción de carcinógenos que generan cambios genéticos que pueden resultar en el desarrollo de tumor. En este sentido, se han estudiado diversos protooncogenes cuya alteración pueden conducir al proceso de tumorigénesis. Ejemplos de estos TAA incluyen al gen que codifica para la proteína Ras. Mutaciones puntuales en su secuencia pueden originar una proteína incapaz de ser inactivada ó resistente a la inactivación. Esta alteración se encuentra en 30% de los cánceres humanos [15]. Otros ejemplos de este tipo de antígenos incluye a las proteínas de fusión BCR-ABL y PML-RAR α causadas por translocación cromosómica encontrada en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (CML) junto con Leucemia Linfoblástica Aguda Filadelfia positiva (Ph-ALL), y en Leucemia Aguda Promielocítica (APL/FAB/AML_{M3}) [16-18] .

Al igual que para los TAA sobreexpresados, la inmunoterapia resulta dificultosa utilizando estos antígenos como blancos terapéuticos, debido a que, a pesar de contener mutaciones, estos TAA contienen secuencias y dominios iguales a las proteínas nativas normales, por lo que se pueden establecer reacciones de autoinmunidad [19].

1.4.3 Antígenos específicos de Linaje y/ó Diferenciación

Los Antígenos específicos de Linaje y/ó Diferenciación son aquellos que están restringidos a determinados tipos tisulares y luego de una transformación oncogénica son sobre-expresados de manera significativa. Este grupo de antígenos asociados a tumor ha sido largamente estudiado en melanoma ya que se han descrito numerosos ejemplos como ser las tirosina-quinazas gp75, gp100 y melan-A/MART-1 [11]. Otros ejemplos no específicos de melanoma incluyen el Antígeno específico Prostático (PSA) en cáncer de próstata [20] y el antígeno mamaglobulina-A en cáncer de mama [21].

1.4.4 Antígenos Virales

Determinados virus son capaces de integrarse en el ADN de huésped como parte de su ciclo infeccioso. Ciertos virus poseen en su genoma genes que son capaces de inducir la transformación en la células una vez que se han integrado al genoma del huésped. Algunas proteínas virales que contribuyen al fenotipo maligno son: las proteínas E6 y E7 producidas por el Virus del Papiloma Humano (HPV) [22], la proteína LPM y EBNA del virus Epstein Bar (EBV) [23], la proteína Tax del virus humano T linfotrófico (HTLV-1) [24] y la proteína HCV virus de la hepatitis C (HCV) [25], entre otras.

Estos antígenos virales son necesarios para mantener el comportamiento maligno de las células, y por lo tanto son blancos relevantes para el desarrollo de estrategias inmunológicas. A modo de ejemplo, los antígenos LMP, EBNA y EBV parecen estar involucrados en la inmortalización y en la interacción con c-myc afectando las vías de señalización llevando así al desarrollo de linfomas tales como el linfoma de Burkitt's [23, 26]. Otro ejemplo lo constituyen las proteínas E6 y E7 del HPV cuyo blanco son las proteínas represoras de tumor p53 y retinoblastoma (Rb), de esta manera reprimen la inhibición del ciclo celular y la reparación del ADN, lo que permite una aparición descontrolada de las mutaciones [27, 28]. De manera interesante, recientemente se ha aprobado en Uruguay el uso de la vacuna profiláctica contra el HPV que podría reducir el riesgo de cáncer cervical [29].

1.4.5 Antígenos cancerígenos/Testiculares (CT)

Los antígenos CT tienen la particularidad de que son expresados por prácticamente todas las células tumorales y no expresadas en células normales con la excepción de células presentes en tejidos testiculares, embrionicos y de la placenta, tejidos denominados "inmunoprivilegiados" por que carecen de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad [30]. Hoy en día se conocen más de 100 antígenos CT, que incluyen MAGE, BAGE, GAGE, SSX, NY-ESO-1, HAGE y PRAME entre otros. Algunos de ellos han sido evaluados para ser utilizados en la inmunoterapia como ser los antígenos T21 y HAGE [11].

1.4.6 Clasificación de TAA

Por último, cabe destacar que los antígenos tumorales pueden además clasificarse utilizando otros criterios, como ser la naturaleza química de las moléculas (lípidos, proteínas, glúcidos). Los antígenos asociados a tumor de tipo glicolipídico consisten en cadenas de oligosacáridos unidos a

ceramida, formando gangliósidos. Un tipo muy estudiado de TAA son los de naturaleza carbohidrata, y se denominan **Antígenos Carbohidratos Asociados a Tumores (TACA**, por su sigla en inglés *Tumor Associated Carbohydrate Antigens*)[31]. Los mismos se han identificado como productos de la glicosiación incompleta en distintos tipos de cáncer, lo que lleva a una acumulación de glicanos nuevos, como ser sialil-Le^a (sLe^a), sLe^x, Le^y, globo H, Tn, TF, sTn, GM2, GD2, GD3 y antígenos fucosil-GM1 [31].

2. Inmunidad y cáncer

Paul Ehrlich, premio Nobel en Fisiología y Medicina (1908), fue quien propuso por primera vez la idea de que el sistema inmunitario podía protegernos frente al cáncer. Mediante la teoría de la “inmunidad de la cadena lateral”, Ehrlich proponía que los receptores de las células se combinan con determinados grupos químicos de algunas toxinas para producir “cuerpos inmunes” capaces de combatir determinadas enfermedades [32].

En 1900 Ehrlich reemplazó el término “cadenas laterales” por “receptor”. En el transcurso del tiempo también cambió las sustancias con las cual experimentaba: de toxinas a sustancias nutritivas y eventualmente a drogas terapéuticas. De esta manera, Ehrlich desarrolló el concepto que denominaría “bala mágica”, drogas que se dirigen específicamente a sus blancos celulares de manera que atacaran células infectadas pero no células sanas, lo que reducía posibles efectos adversos en los pacientes [32].

Si bien la teoría de Ehrlich de las cadenas laterales fue de gran importancia en el desarrollo de la Inmunología Tumoral, la falta de herramientas inmunológicas hizo que la misma no pudiera comprobarse. Sin embargo, en 1950, Mac Farlane Brunet y Lewis Thomas retomaron el concepto e introdujeron la hipótesis de la “Inmunovigilancia”. De acuerdo con esta hipótesis, el sistema inmune es capaz de detectar y eliminar células transformadas antes de que puedan crecer e invadir nuevos tejidos. Si bien las primeras evidencias fueron muy alentadoras, los resultados fueron desalentadores cuando se evidenció que en ratones inmunodeprimidos atímicos (*nude*) la exposición al carcinógeno metilcolantreno dió crecimiento a tumores con frecuencias similares que en ratones normales [33]. Esto dió lugar al abandono transitorio de dicha hipótesis ya que en ese momento se desconocía que los ratones *nude* no padecen una inmunodeficiencia completa ya que poseen células natural killer (NK) y algunas poblaciones funcionales de células T de desarrollo extra-tímico [33].

En 1998 la hipótesis de la Inmunovigilancia vuelve a cobrar interés al publicarse una serie de

estudios que demostraron la participación clave de IFN γ y las células T en la supresión del crecimiento tumoral. El bloqueo de IFN γ utilizando anticuerpos monoclonales específicos favoreció en gran medida la aparición de tumores [34, 35]. Asimismo, ratones deficientes en el receptor de IFN γ mostraron mayor susceptibilidad a la aparición de tumores con respecto a ratones normales [34-36]. Ratones deficientes en perforinas, moléculas claves de la acción pro-apoptótica de células NK y de linfocitos T citotóxicos presentaron mayor incidencia de cáncer [37, 38].

Si bien numerosas evidencias experimentales, desde los hallazgos de Ehrlich, han demostrado que el sistema inmunitario es fundamental para prevenir, limitar y suprimir el crecimiento neoplásico, los datos epidemiológicos demuestran que el mismo no es capaz de mediar la eliminación de las células tumorales de manera definitiva, lo que ocasiona gran morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Actualmente se sabe que el sistema inmunológico establece lo que se denomina como un diálogo dinámico con el tumor, que le permite modificar sus propiedades fenotípicas y funcionales [39]. Esta nueva concepción permitió que en el año 2002 Dunn GP y colaboradores re-definieran la teoría de la “Inmuno-vigilancia” en lo que hoy conocemos como “Teoría de la inmuno-edición de los tumores” [39]. El proceso de inmuno-edición de tumores transcurre en tres fases conocidas como: Eliminación, Equilibrio y Escape tumoral (denominadas las “tres E”) [39, 40]. En la Figura 3 [39] se detallan aspectos relevantes en cuanto a la **Eliminación** de células tumorales por el sistema inmune, el **Equilibrio** que se establece entre ambas células y **Escape** tumoral se profundizan a continuación.

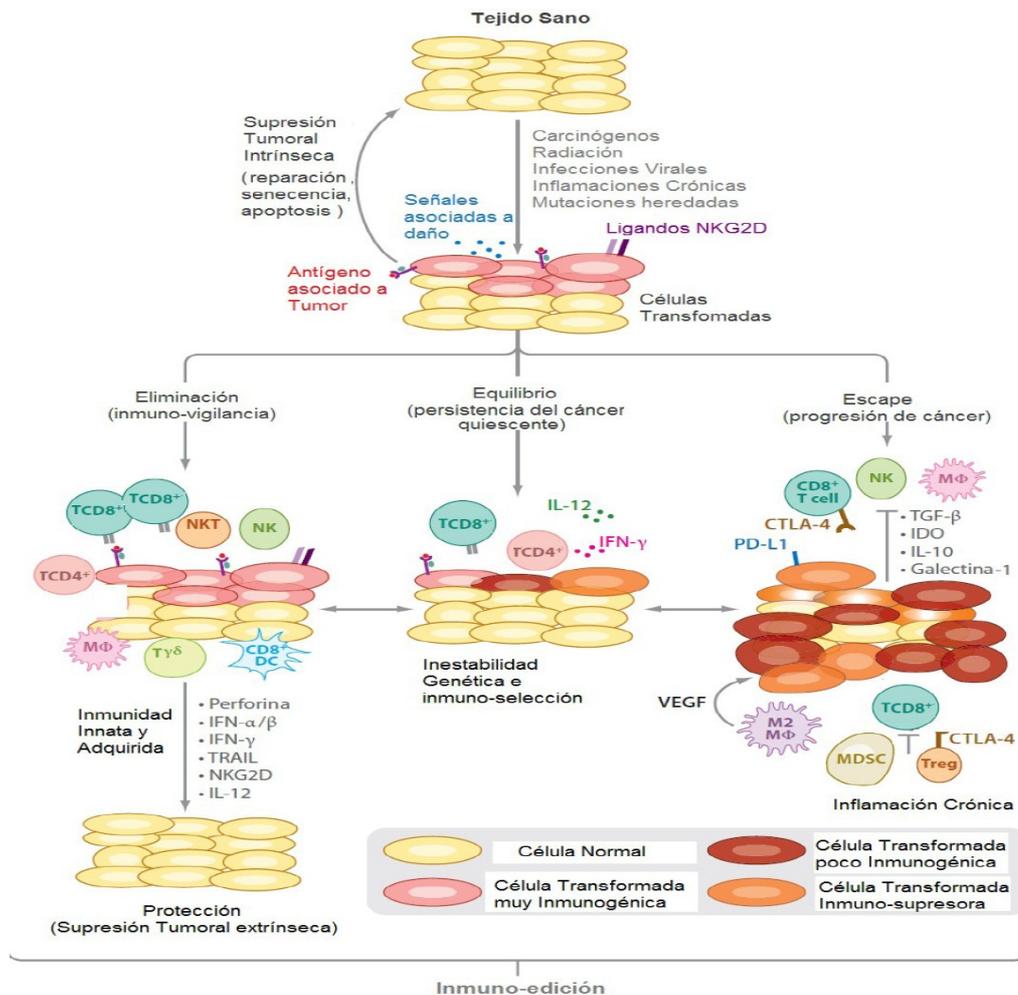


Figura 3. Las tres fases de la inmuno-edición en cáncer. La inmuno-edición en cáncer es el resultado de tres procesos que funcionan de manera independiente o en secuencia de manera de controlar y moldear el crecimiento tumoral. Una vez las células normales son transformadas en tumor, por una combinación de oncogenes adquiridos y fallas intrínsecas de los mecanismos supresores de tumor, el sistema inmune puede actuar como un factor extrínseco de supresión, eliminando células tumorales y previniendo su crecimiento. En la primer fase de la inmuno-edición, la eliminación o inmuno-vigilancia, las células del sistema inmune innato y adaptativo reconocen moléculas en células transformadas y destruyen las mismas lo que genera un retorno a las condiciones normales fisiológicas del tejido. Sin embargo, si la inmunidad anti-tumoral no puede resolver completamente dicha eliminación, las variantes que sobreviven pueden entrar en la fase de equilibrio, en la cual las células de la inmunidad adaptativa previenen el crecimiento masivo. Estas variantes pueden, eventualmente adquirir un fenotipo más invasivo por la acumulación de mutaciones. (Abreviaciones: CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte associated protein-4; IDO, indoleamine 2,3-deoxigenasa; IFN, interferón; IL, interleuquina; M, macrófago; MDSC, myeloid-derived suppressor cells; NK, natural killer; NKG2D, NK group 2, miembro D; PD-L1, ligando programmed cell death ligand 1; TGF-β, transforming growth factor-β; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Treg, regulatory T cell; VEGF, vascular endothelial growth factor.) Figura adaptada de Matthew D. Vesely et al 2011 [40].

2.1 Mecanismos efectores de la inmunidad anti-tumoral

En la fase de eliminación las células tumorales son efectivamente reconocidas y eliminadas por el sistema inmunitario. Si bien no se conoce con exactitud de qué manera las células de sistema inmune reconocen a las células tumorales, ciertas evidencias indican que dicho reconocimiento podría estar mediado por “señales asociadas a daño o señales de peligro” (DAMPs), secretadas por las células tumorales. Un ejemplo de dichas señales está constituido por los interferones tipo I [33]. Dichas citoquinas activan a las células dendríticas y promueven la inducción de una respuesta adaptativa anti-tumoral [33]. Otros patrones moleculares asociados a daño celular (DAMPs) como ser HMGB1 (por su sigla en inglés, high mobility group box 1) también se han considerado en el reconocimiento de las células tumorales por parte del sistema inmune, ya que dicha molécula es liberada por células tumorales que mueren, o por tejido dañado [41]. Por último, dicho reconocimiento podría involucrar un tercer mecanismo que involucra ligandos asociados a estrés como ser RAE-1 y H60 ó MICA/B que se unen a receptores presentes en células de sistema inmune innato generando la liberación de citoquinas pro-inflamatorias lo que favorece el reconocimiento de las células tumorales por células del sistema inmune adaptativo [33].

Una vez el sistema inmune detecta las células malignas, su eliminación puede estar mediada por diferentes células y componentes de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa [33]. En particular, estudios realizados en ratones deficientes en RAG-1 o RAG-2 los cuales carecen de células $T\alpha\beta$, células B, NKT ó $T\gamma\delta$, demostraron que dichos linfocitos poseen un papel crítico en el proceso de inmunovigilancia, ya que desarrollan más tumores que los ratones salvajes al ser inyectados con el carcinógeno 3-metil clorantreno (MCA) [33, 42]. En humanos, la evidencia más clara del fenómeno de inmuno-vigilancia viene justamente del estudio de la función de las poblaciones linfocitarias. En particular, aquellas que infiltran los tumores (TIL, del inglés Tumor Infiltrating Lymphocytes) pueden eliminar las células tumorales o mediar mecanismos que favorezcan dicho proceso. Se ha relacionado la cantidad, calidad y disposición espacial de los TILs con la supervivencia de los pacientes [44]. La infiltración tumoral con células Th1 y de T CD8+ productoras de $INF\gamma$ en presencia de citoquinas tales como $INF\gamma$, $TNF\alpha$ que promueven el crecimiento tumoral, se ha asociado a un mejor pronóstico para el paciente en varios tipos de cáncer [44].

Diversos mecanismos efectores del Sistema Inmunológico se han asociado a la eliminación de células tumorales. Muchos de ellos involucran la inducción de muerte celular en las células

transformadas, como aquellos mediados por células NK y linfocitos T CD8+. Las células NK, pertenecientes a la rama innata de la inmunidad, son capaces de desencadenar la muerte en sus células blanco. Su actividad está regulada por un balance entre señales provenientes de receptores activadores e inhibitorios.

Los receptores activadores reconocen motivos alterados en la superficie celular, como las moléculas de MICA/MICB, ligandos del receptor NKG2D. Muchos receptores inhibitorios reconocen moléculas de expresión normal en las células, como motivos conservados en las moléculas MHC de clase I. La unión a sus ligandos lleva al desencadenamiento de vías de señalización que bloquean las señales enviadas por receptores activadores [45]. Dado que, muchas veces las células tumorales reducen su expresión de moléculas MHC de clase I para evadir el reconocimiento por linfocitos T citotóxicos, la ausencia de señales inhibitorias, acompañada por la estimulación de receptores activadores, lleva a la activación de las células NK. Éstas, al ser activadas, conducen a la apoptosis de las células blanco mediante la liberación de gránulos conteniendo moléculas de perforina y de granzima, o mediante interacciones entre receptores de membrana como Fas/Fas-L [46]. Por otra parte, las células NK pueden desencadenar sus mecanismos efectores ante el reconocimiento de anticuerpos IgG unidos a la superficie de las células tumorales, fenómeno conocido como citotoxicidad celular inducida por anticuerpos (ADCC) [45].

Los linfocitos T citotóxicos son igualmente capaces de desencadenar la apoptosis de células transformadas, pero en respuesta al reconocimiento mediante su TCR de complejos específicos péptido-molécula de MHC de clase I. Los mecanismos empleados por éstos son esencialmente los mismos que los desencadenados por las células NK. Sin embargo, a diferencia de las células NK, los linfocitos T CD8+ requieren de una activación previa por células presentadoras de antígeno y colaboración por linfocitos T CD4+ [46, 47].

Poblaciones celulares como las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T CD4+ son esenciales para estimular la generación de tales respuestas. De hecho, una correcta presentación de antígeno permite la activación de linfocitos T colaboradores, que juegan un papel importante en guiar el tipo de respuesta generado y para conferir a la respuesta inmunitaria la capacidad de memoria [35]. Asimismo, la liberación local de citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ , tanto por células de la inmunidad innata como de la adaptativa, contribuirían a la activación de células efectoras de la inmunidad y al reclutamiento de poblaciones celulares adicionales en la vecindad del tumor [11, 48].

2.2 Mecanismos de Escape Tumoral

Si bien se han descrito numerosos mecanismos por los que las células tumorales pueden ser eliminadas por las células del sistema inmune, es importante destacar que algunas células tumorales logran escapar de estos procesos y proceden a una fase de **equilibrio** en donde son controladas pero no pueden ser eliminadas. La interacción permanente del sistema inmune con los tumores por períodos extensos determina, por un proceso de selección natural que estos tumores sean “editados” derivando en variantes menos inmunogénicas que logren escapar al sistema inmune [11].

Existen diversos mecanismos por los cuales las células tumorales evaden el sistema inmune, algunos de ellos se detallan en la Figura 4 y se describen a continuación.

Cabe destacar que la naturaleza de los antígenos y la manera en que éstos son procesados determinan en gran medida si el sistema inmune podrá o no reconocer determinado antígeno [49-50]. Las células tumorales que presentan bajos niveles de MHC evitan ser reconocidas por las células T. Esto puede deberse a mutaciones que afecten los genes que codifican MHC o mediante cambios en otras moléculas también asociadas a la presentación antigénica como por ejemplo la proteína TAP (por su sigla en inglés Transporter-associated protein) ó en la β -2-microglobulina (β 2M) [11]. Las deficiencias en MHC de clase I tienen especial relevancia ya que es a través de esta molécula que la célula presenta antígenos propios, de manera tal que las células tumorales utilizan frecuentemente esta estrategia [51].

La pérdida de co-estimulación por B7.1 y B7.2 o la regulación de la expresión de CTLA-4 pueden prevenir la generación de la “segunda señal” necesaria para una correcta activación de linfocitos [52-55]. Por otro lado, las células tumorales expresan altos niveles de citoquinas como ser TGF β , IL4, IL10 e IL17 entre otras, que si bien parecen promover respuestas anti-tumorales en una primer etapa, tras largos períodos de tiempo parecen colaborar en la progresión tumoral [52-55].

Otro mecanismo de evasión tumoral es la resistencia aumentada de las células tumorales al ataque por CTLs mediante un incremento de la molécula FAS-L que se une a FAS en los CTLs. Los CTLs expresan dicha moléculas para evitar reacciones de autoinmunidad, por lo que las células tumorales “explotan” esta característica para evitar ser eliminadas [56].

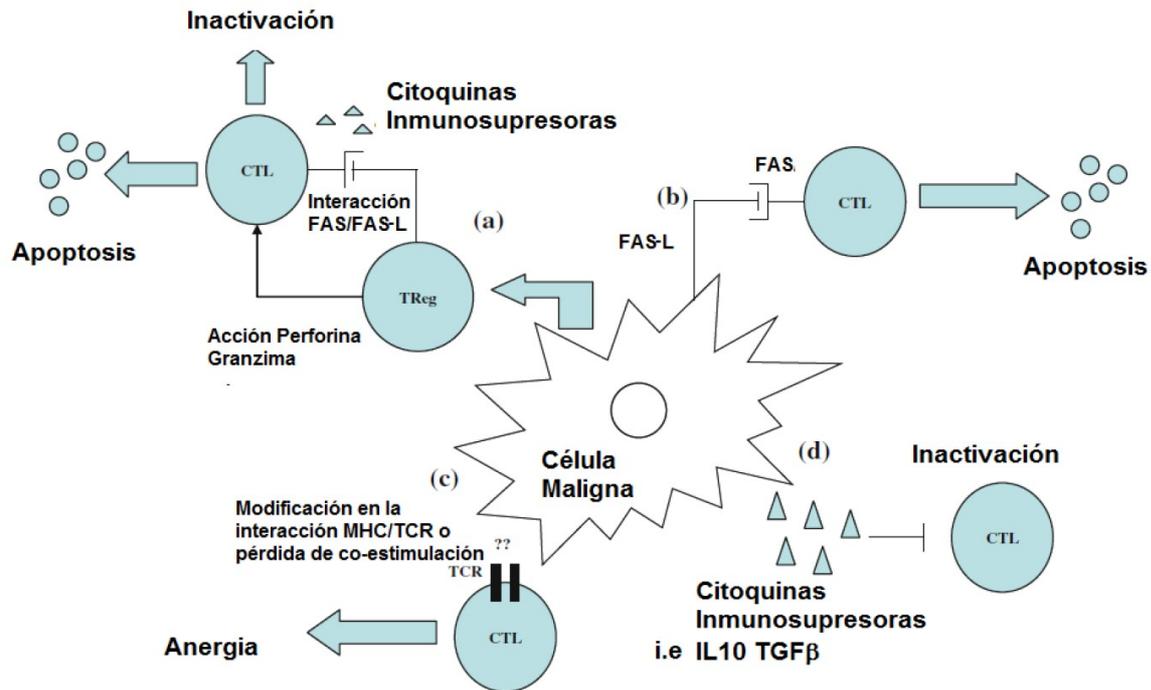


Figura 4. Mecanismos básicos de escape tumoral utilizados por ciertos tumores. a) Acción de Treg naturales o inducidos, en inhibir los linfocitos T mediante la secreción de citoquinas inmuno-supresoras o mediante la activación de la apoptosis de células citotóxicas T CD8 + (CTLs) vía perforina/granzima ó FAS/ FAS-L. **b)** La expresión de Fas-L en células tumorales que al unirse a Fas en CTLs inician la apoptosis de la célula efectora. **c)** Pérdida de interacción de las células tumorales con las CTL ya sea por alteración de la unión MHC/TCR, por disminución en la expresión de MHC o moléculas de coestimulación, ó por un procesamiento antigénico reducido. **d)** Secreción por parte del tumor de citoquinas inmuno-supresoras como ser IL10 y TGF-β que inhiben las funciones efectoras de las células T. Figura extraída y adaptada de Linley et al 2011 [11]

Por último, otro mecanismo que posibilita la evasión de tumoral es el mediado por las células T reguladoras (Treg) las cuales actúan inhibiendo las funciones efectoras de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de manera tal que permiten el crecimiento tumoral [57]. A su vez, las células tumorales pueden secretar ellas mismas citoquinas como ser TGFβ que promueven la activación de Treg revirtiendo la inmuno-vigilancia [57].

2.3 Inmunoterapia anti-tumoral

Desde la época de Ehrlich se ha avanzado enormemente en el desarrollo de terapias contra cáncer

[32]. Algunas terapias inmunológicas se basan en el hecho de que las células del sistema inmune son capaces de reconocer a las células tumorales mediante el reconocimiento de antígenos asociados a tumor. Por lo tanto, una posible estrategia experimental sería potenciar dicha respuesta de manera tal de evitar llegar a condiciones de equilibrio, y posterior escape tumoral.

El advenimiento de los anticuerpos monoclonales en las inmunoterapias pasivas sugirió una posibilidad de dirigir la respuesta y destruir tumores utilizando anticuerpos específicos contra antígenos asociados a tumor. Este enfoque depende de encontrar antígenos asociados a tumor que se encuentren en la superficie de la célula tumoral. En la tabla III se detallan algunos antígenos blancos que han sido utilizados en ensayos clínicos, algunos de los cuales han sido aprobados para tratamientos terapéuticos con anticuerpos monoclonales.

Tabla III. Ejemplos de TAA utilizados como blanco en terapias con anticuerpos monoclonales

Tejido de origen del Tumor	Tipo de Antígeno	Antígeno	Tipo de Tumor
Linfoma/Leucemia	Antígenos de Diferenciación	CD25	Linfoma de células T
		CD52 (CAMPATH1)	Linfoma de células B Linfoma de células B/T Leucemias
	Receptor de señalización en Linfocito B	CD20	Non-Hodking B Linfoma
Tumores Sólidos	Antígenos de Superficie		
	Glicoproteína	CEA	Tumores Epiteliales (mama, colon, pulmón)
	Carbohidratos	Lewis Y CA-125	Carcinoma de Ovario
	Receptores de Factores de Crecimiento	HER-2/neu Receptor de IL2 VEGF	Cabeza y Cuello, Pulmón, mama Tumores en células B y T Colon, Pulmón, mama
	Antígenos Estromales Extracelulares	FAP-a Tenascina Metalloproteinasas	Tumores Epiteliales Glioblastoma multiforme Tumores Epiteliales

En particular, han sido muy sorprendentes los resultados obtenidos en el tratamiento de cáncer de mama, utilizando un anticuerpo monoclonal humanizado llamado trastuzumab (Herceptin) cuyo blanco molecular es la molécula HER-2/neu, sobre-expresada en un cuarto de pacientes de cáncer de mama [58].

Los anticuerpos monoclonales como estrategia terapéutica han permitido otras variantes como ser la unión de los mismos a radioisótopos de manera que la fuente radioactiva permanezca en el sitio del tumor. En efecto, esta estrategia fue utilizada para tratar linfomas de células B refractarios, con anticuerpos anti-CD20 unidos a yttitium-90 (ibritumomad tiuxetan).

Otro tipo de estrategias terapéuticas utilizadas en cáncer involucran el uso de vacunas. Diferentes estrategias se han evaluado para desarrollar vacunas para tratar pacientes que han desarrollado cáncer. En este sentido, las vacunas ideales son aquellas basadas en antígenos tumorales para establecer una inmunidad anti-tumoral mediada por células T. Estas vacunas son difíciles de desarrollar ya que algunos péptidos son presentados por determinados alelos de MHC, por ejemplo, los péptidos MAGE-1 son reconocidos por las células T en pacientes de melanoma de pacientes que expresan el haplotipo HLA-A1 [11].

Otros tipos de vacunas con diferente estrategia experimental han sido desarrolladas. Se pueden destacar las vacunas que [11] utilizan células tumorales alogénicas o autólogas. Éstas consisten en extractos de células tumorales ó células tumorales irradiadas mezcladas con adyuvantes como Bacilo Calmette-Guérin (BCG) ó *Corynebacterium parvum* los cuales pueden participar en la estimulación del TLR4 por BCG tal como se ha reportado para melanoma y algunos tumores sólidos [11, 60].

Otra aproximación experimental en cuanto a la vacunación en cáncer consiste en la generación de vacunas que utilizan las proteínas de shock térmico que actúan como chaperonas intracelulares para los péptidos antigénicos. De esta forma, se facilita el acceso de los péptidos a las moléculas de MHC de manera que la célula tumoral se torna más “visible” frente al sistema inmune [61].

Otro ejemplo de vacunas son las denominados “vacunas ADN”. Las mismas contienen genes que aumentan la respuesta contra las células tumorales. En este sentido, los genes pueden codificar para moléculas de co-estimulación como B7 ó codificar para citoquinas de manera que la expresión de las mismas medien el reclutamiento o la activación de más células inmunes que pueden eventualmente reconocer el tumor [11].

Por último, cabe destacar otro tipo de vacunas, basadas en la utilización de células dendríticas como “carriers”, las cuales han tomado creciente interés en las últimas décadas [62]. La gran capacidad de las células dendríticas en activar los linfocitos T hace de las mismas candidatos especiales para dirigir la respuesta inmune [63]. El uso de las células dendríticas cargadas con antígenos que presentan motivos comunes a antígenos asociados a tumor en la inmunoterapia contra cáncer, ha sido puesto a punto en modelos animales y actualmente se utiliza en estudios a nivel clínico en humanos [64, 65]. En este tipo de estrategia experimental las células dendríticas autólogas son cargadas *ex vivo* con antígenos tumorales y son administradas al paciente. Las mismas migran al ganglio donde presentan y activan a las células T. Cabe destacar que esta estrategia excluye a las células dendríticas de posibles señales inmuno-supresoras que puedan

existir en el microambiente tumoral [65].

Una alternativa a esta estrategia es el cargado *in vivo* de la célula dendrítica, estrategia denominada "*in vivo DC targeting*" [65]. De esta manera, se inmuniza a los animales con antígenos fusionados a moléculas con conocida capacidad de unirse y ser internalizadas por las células dendríticas por medio de sus receptores de superficie como ser los anticuerpos anti-FC γ R ó anti DEC205 [66, 67].

Las células dendríticas poseen en su superficie receptores lectina de tipo C que reconocen de manera específica determinados antígenos carbohidratos. Dado que muchos antígenos asociados a tumor son de naturaleza carbohidrata muchos esfuerzos se han realizado en determinar los ligandos de dichas lectinas. A modo de ejemplo la lectina DC-SIGN (por su sigla en inglés DC-specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin) reconoce estructuras ricas en manosa, y antígenos de Lewis, como Le^x, Le^y, Le^b y Le^a. Otra lectina presente en células dendríticas MGL (por su sigla en inglés macrophage galactose/N-acetylgalactosamine-specific C-type lectin) reconoce GalNAc [68]. Tal como se detalló en secciones anteriores Le(x), Le(y) y estructuras tipo glicanos con GalNAc (antígeno Tn) se encuentran frecuentemente en la superficie de células tumorales, por lo que la estrategia de DC *in vivo* targeting representa una estrategia atractiva para el tratamiento de cáncer [68].

3. Antígeno Tn y Cáncer

3.1 Antígeno Tn

3.1.1 O-Glicosilación

La glicosilación proteica es una modificación post-transcripcional de gran relevancia para varios procesos celulares como ser la secreción, el transporte de las moléculas a regiones subcelulares específicas, la regulación de la actividad enzimática y conferir estabilidad y solubilidad a las proteínas secretadas [69]. Asimismo, la glicosilación es de vital importancia en el establecimiento de las interacciones célula-célula y célula-matriz así como en el desarrollo [69].

Existen dos tipos principales de unión que se pueden establecer entre un oligosacárido y una proteína: tipo-N y tipo-O (*N*-glicoproteínas y *O*-glicoproteínas, respectivamente). En las *N*-glicoproteínas los carbohidratos (como ser *N*-acetilglucosamina, GlcNAc) se unen al grupos amino de la cadena lateral de una asparagina a la secuencia consenso: Asn-X-Ser/Thr (Siendo X cualquier aminoácido excepto prolina). En las *O*-glicoproteínas, como las mucinas humanas, el carbohidrato

GalNAc es el más frecuentemente encontrado [70]. Los carbohidratos pueden unirse al grupo hidroxilo (OH) de los aminoácidos Ser ó Thr (GalNAc-*O*-Ser/Thr).

En cuanto al proceso de *O*-glicosilación, el primer paso es llevado a cabo por una familia de enzimas conocidas como UDP-GalNAc: polipéptido-*N*-acetil- α -D-galactosaminiltransferasas (ppGalNAc-Ts) [71, 72]. Estas enzimas tienen funciones y estructuras conservadas a través de las especies [73]. Existen al menos 20 isoformas de ppGalNAc-Ts diferentes. Las mismas poseen patrones de expresión tisular y especificidades de sustratos diferentes. Dichas características determinan, por ejemplo, la densidad de sitios glicosilados en las mucinas de tipo *O*-glicosiladas así como el tipo de proteína a glicosilar [74].

La unión inicial del grupo GalNAc a las *O*-glicoproteínas ocurre en el aparato de Golgi. Esto a su vez, inicia la acción de numerosas glicosiltransferasas de alta especificidad, las cuales generan la extensión del grupo GalNAc para generar diversos tipos de *O*-glicanos [70].

3.1.2 Antígenos de *O*-glicosilación incompleta

Los *O*-glicanos tienen muchas funciones biológicas. Defectos en la síntesis de los mismos trae importantes alteraciones fisiológicas [75]. A modo de ejemplo, la alteración de las vías de *O*-glicosilación en modelos animales trae aparejado diversos defectos, como ser la muerte embrionaria, defectos en el desarrollo y defectos en la respuesta inmunológica ocasionados principalmente en las propiedades adhesivas por una disminución en el rolling sobre las P- E- y L-selectinas [76]. Diversas patologías también son ocasionadas por defectos en la *O*-glicosilación, algunos ejemplos son: la calcinosis tumoral (hiperfosfatemia) que lleva a la calcificación de tejido blando [77], la nefropatía IgA [78] y formación de tumores y metástasis [79].

En el cáncer, los defectos en la *O*-glicosilación conducen a la aparición de diversos antígenos tumorales. Se han identificado diversos antígenos tipo TACA de *O*-glicosilación incompleta como ser: **Tn** (α -GalNAc- Thr/Ser), **sTn** (NeuAc_{2,6}- α GalNAc-Thr/Ser) y **TF** (Gal_{1,3}- α GalNAc-Thr/Ser) [31, 81]. Estos últimos han sido detectados en diversos tipos de cáncer epiteliales como por ejemplo cáncer gastrointestinal, colorrectal, de próstata, de páncreas, de mama y de pulmón [80-81]. Los mismos consisten en *O*-glicanos truncados que resultan ya sea de una desregulación de las glicosiltransferasas que participan en el proceso de *O*-glicosilación o de un cambio del polipéptido aceptor del azúcar por expresión aberrante de genes de apomucinas [31]. Dado que la aparición de dichos antígenos se observa en células cancerosas y no en células normales, los mismos resultan de gran interés en el tratamiento inmunológico contra el cáncer.

En particular nos centraremos en el antígeno Tn, que se encuentra constituyendo la estructura central de diversas mucinas expresadas en células tumorales y es uno de los antígenos asociados a cáncer más comunes detectado en aproximadamente el 90 % de los carcinomas humanos [83].

Los niveles de expresión y/o exposición del antígeno Tn adquieren en ocasiones un valor diagnóstico. A modo de ejemplo se ha reportado una sobreexpresión del antígeno Tn en las hiperplasias adenomatosas y en los carcinomas endometriales [84], así como un aumento en la exposición del antígeno Tn en la mucina MUC6 en células tumorales de mama con *O*-glicosilación aberrante [85].

Dado que la expresión del antígeno Tn está relacionada con la agresividad de los carcinomas humanos y por lo tanto con un peor pronóstico [86], el mismo tiene gran interés a nivel terapéutico y muchos esfuerzos se han realizado en el desarrollo de terapias que lo involucren. Un ejemplo de desarrollo de una herramienta con posible uso en la inmunoterapia es el anticuerpo monoclonal MLS128, que inhibe el crecimiento tumoral en las líneas de cáncer de colon y de mama LS180 y MCF-7 respectivamente [87]. El anticuerpo MLS128 es una inmunoglobulina G3 (IgG3) que se une a 3 antígenos Tn consecutivos (Tn3), presentes en glicoproteínas de superficies de las células tumorales [87, 88].

Otro tipo de estrategia inmunoterapéutica involucra la generación de vacunas conteniendo el antígeno Tn. Diferentes formulaciones de este antígeno han sido evaluadas como vacunas en modelos oncológicos. En la mayor parte de este tipo de estudios, el antígeno Tn es utilizado en asociación con proteínas “carrier” inmunogénicas [31]. A pesar de la eficacia de estas vacunas en modelos pre-clínicos, su aplicación en el hombre es todavía limitada. De forma general, estos conjugados inducen anticuerpos específicos del antígeno carbohidrato en los pacientes vacunados. Sin embargo, la especificidad de los anticuerpos producidos por las estructuras nativas (presentes en células tumorales), así como la correlación nivel de anticuerpos-respuesta clínica no es constante. Además, el uso de proteínas “carriers” en el desarrollo de una respuesta inmune acarrea diferentes inconvenientes, como por ejemplo una producción considerable de anticuerpos contra la proteína “carrier” así como heterogeneidad química en la composición del conjugado final [31].

Una alternativa muy eficaz a este tipo de estrategia comprende el uso de glicopéptidos Tn asociados a un epítipo CD4⁺ encargado de activar los linfocitos T, capaces de generar una respuesta inmune larga y duradera, así como también memoria inmunológica [89, 90]. Sin embargo, la síntesis química y purificación de dichas moléculas es muy tediosa y además, su costo, extremadamente elevado, lo cual hace difícil su explotación a gran escala.

3.2 Mucinas

Las superficies epiteliales se encuentran recubiertas de un gel mucoso que lubrica y protege la mucosa del daño externo ambiental incluyendo fuerzas físicas y mecánicas, organismos invasivos intestinales, y de toxinas bacterianas [91]. Las mucinas son los componentes mayoritarios presentes en el mucus. Las mismas, son proteínas *O*-glicosiladas de alto peso molecular, presentes en secreciones y membranas mucosas. Tienen secuencias características con dominios ricos en Ser, Thr y Pro que contienen *O*-glicosilaciones ubicadas muy próximos entre sí [92].

Otras glicoproteínas no mucínicas también pueden contener oligosacáridos con uniones *O*-glucídicas, por lo que su diferenciación con las mucinas se refiere a aspectos cuantitativos en relación al número de oligosacáridos así unidos. El contenido carbohidrato para las mucinas ronda entre 50-90% del peso total de la glicoproteína y ocurre generalmente en “clusters” determinados por los repetidos de Ser ó Thr presentes en la secuencia aminoacídica de la mucina y por la especificidad de las ppGalNAc transferasas responsables de su síntesis [93]. Los “clusters” de oligosacáridos con uniones tipo *O*-glucídicas confieren a la molécula regiones de gran hidratación, resistencia a proteasas y sitios de unión para anticuerpos de unión específica a carbohidratos, así como de lectinas [93].

Aunque la porción carbohidrata de las mucinas es la más característica, se ha realizado gran esfuerzo por conocer la porción proteica de las mismas (apomucinas) lo que ha permitido estudiar la síntesis y biología de las mismas. Se han descrito muchos otros genes que codifican para mucinas desde la caracterización inicial de las secuencia de MUC1 [94] y MUC2 [95], los mismos se han nombrado de manera cronológica según han sido descritos (MUC1-MUC20) [93].

Según la estructura y la función, las mucinas pueden clasificarse en: mucinas secretadas formadoras de gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6) y mucinas transmembrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC17). Sin embargo, algunos productos génicos resultantes de la expresión de los genes MUC, no entran en ninguna de estas dos categorías (MUC7, MUC8, MUC9, MUC13, MUC15, MUC16) [93]. Las cadenas carbohidratas en las mucinas están constituidas por estructuras denominadas núcleos o “cores” de residuos de monosacáridos con distintos tipos de uniones [96]. En la Figura 5 se detallan las estructuras de los cores más estudiados contenidas en las mucinas de tipo *O*-glicanos.

En este sentido, cabe destacar que, los cores constituyentes de glicanos más frecuentemente encontrados en humanos son los cores 1 y 2. Los glicanos de core 1 son glicanos pequeños frecuentemente terminados por ácido siálico, mientras que los glicanos de tipo core 2 constituyen

glicanos más largos. Muchos de los diversos cores que existen tienen masas moleculares similares, y es necesario recurrir a un análisis en los tipos de unión para diferenciarlos entre sí [70].

3.3 Mucinas en el Cáncer

Cambios en la *O*-glicosilación de las mucinas tienen repercusiones en diversos procesos como ser inflamación, angiogénesis, autoinmunidad y cáncer. De hecho, las mucinas y su glicosilación están

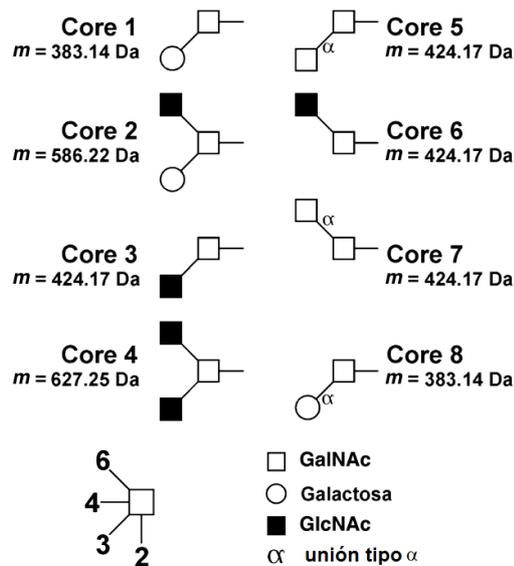


Figura 5. Las 8 estructuras reportadas para los core contenidos en las mucinas tipo *O*-glicanos. Se indican las posiciones de unión a monosacáridos mediante una línea negra. En caso de no indicarse unión tipo α , corresponden a anómeros β . Figura extraída de Pia H. Jensen, et al 2010 [70].

implicadas en muchos tipos de cáncer. A modo de ejemplo, la glicosilación aberrante de la mucina MUC1 ha sido detectada en cáncer de mama, y son blancos moleculares de anticuerpos generados contra antígenos tumorales [92]. En cáncer de colon también se ha observado una glicosilación aberrante de las mucinas. De hecho, la expresión de MUC1 se encuentra aumentada en cáncer de colon con respecto a colon normal [93]. La mayoría de los estudios que utilizan anticuerpos monoclonales para detectar la proteína MUC1 muestran clara detección de MUC1 en cáncer de colon, mientras que no hay reacción en colon normal, aunque si se detectan niveles de ARNm [93]. Interesantemente, la remoción parcial del contenido carbohidrato de colon utilizando oxidación con periodato desenmascara la proteína MUC1 en distintos tipos de células del colon lo que

sugiere un papel de la expresión de los antígenos carbohidratos asociados a MUC1 en cáncer de colon [97].

Interesantemente, la sobre-expresión de MUC1 en células de cáncer de colon parece estar implicada en la progresión en el cáncer colorectal, ya que se ha observado que el desarrollo de metástasis en colon de cáncer, se acompaña de un aumento en la expresión de MUC1 [98].

Alteraciones a nivel de la expresión de la mucina MUC2 también se han estudiado a nivel de cáncer de colon [99]. Los niveles de expresión de MUC2 en cáncer de colon son menores que en colon normal, tanto a nivel de ARNm [100] como a nivel de su detección inmunohistoquímica [101]. Experimentos utilizando ratones deficientes en el gen MUC2 (ratón deficiente en Muc2) sugieren que el detrimento en MUC2 puede contribuir en la carcinogénesis [102].

A nivel de su estructura molecular, las mucinas expresadas en cáncer presentan *O*-glicosilación aberrante, lo que conduce a la expresión de antígenos carbohidratos. Como se mencionó anteriormente, algunos de estos antígenos, como Tn, sTn y TF están siendo investigados como marcadores de pronóstico y como blancos terapéuticos para ser utilizados en vacunas [93].

En particular, los ensayos clínicos llevados a cabo para evaluar la capacidad terapéutica de las mucinas en pacientes con cáncer, se basan en la utilización de péptidos de MUC1, principalmente para cáncer de mama y colon [103, 93]. Es muy importante subrayar el hecho que todos estos estudios son llevados a cabo con péptidos de mucina no glicosilados, y que existen muy pocos ejemplos de ensayos clínicos con mucinas glicosiladas [93, 104, 105]. Sin embargo, cada vez más trabajos demuestran la importancia de los carbohidratos en la estructura de los marcadores tumorales en las mucinas, y que su presencia puede ser esencial para obtener un inmunógeno eficaz. Por ejemplo, recientemente se ha reportado que pacientes con cáncer de mama son capaces de producir anticuerpos anti-MUC1 que reconocen mejor péptidos MUC1 glicosilados que péptidos sin glicosilar [106]. Por otra parte, determinados estudios estructurales han mostrado que el antígeno Tn participa al reconocimiento inmune del tumor ya que es reconocido por anticuerpos anti-MUC1 obtenidos luego de inmunización con células de un tumor de ovario [93]. Por último, cuando el antígeno Tn es presentado sobre un péptido MUC1 conjugado a la KLH (MUC1:Tn-KLH), induce la producción de niveles mas elevados de anticuerpos anti-Tn que cuando se encuentra directamente conjugado a la KLH (Tn-KLH) [108]. Además, el glicoconjugado MUC1:Tn-KLH es capaz de producir niveles mas elevados de anticuerpos específicos del péptido MUC1 que el compuesto no glicosilado MUC1-KLH [81]. Por estas razones, las mucinas glicosiladas

constituyen un interés particular en el desarrollo de vacunas contra el cáncer. Sin embargo, la tolerancia por parte de las células T a los antígenos propios, como las mucinas humanas, limita su eficiencia en este tipo de estrategia.

3.4 Mucinas Parasitarias

Resulta interesante destacar que, además de estar presentes en las mucinas superficiales de células tumorales, los antígenos Tn, sTn y TF han sido identificados en diversos parásitos helmintos [81, 109]. Dichos parásitos producen diversas moléculas tipo mucina capaces de participar en procesos tales como, infección y evasión del sistema inmune del hospedero [109]. En la Tabla IV se detallan algunos ejemplos de las interacciones entre parásitos helmintos con sus huéspedes.

Tabla IV. Moléculas tipo Mucina producidas por parásitos helmintos y sus posibles funciones en la interacción huésped-parásito. Adaptada de Theodoropoulos, G. 2001 [110]

Parásito	Estadio	Molécula Tipo Mucina	Posible rol en la Interacción Huésped-parásito	Referencia
Tremátodos				
<i>Schistosoma mansoni</i>	Cercaria	O-glicanos en glicocalix Superficial	Posible implicancia en reconocimiento y Penetración en el huésped secundario	Nanduri, J. <i>et al.</i> 1991
	Hembra Adulto	Proteína A11 (core rico en Ser/Thr)	Puede contribuir en formación de recubrimiento protector del tracto reproductor así como Prevenir la formación prematura de la cubierta De huevos.	Menrath, M. <i>et al.</i> 1995
Nemátodos				
<i>Toxocara canis</i>	Larva infectiva	Proteína TES-120 (core rico en Ser/Thr en tandem, altamente O-glicosilado)	Constituyente principal de la cubierta del parásito que contribuye mecanismos evasivos de la Respuesta inmune del huésped	Gems, D & Maizels, R M 1996 Tetteh, K K A <i>et al.</i> 1999
<i>Onchocerca gipsoni</i>	Macho Adulto	Productos de Excreción Secresión (PES) contienen Fosfocolina	Posible evasión de la respuesta inmune del Huésped	MacDonald, M <i>et al.</i> 1996
<i>Brugia spp.</i>	Adulto	O-glicoproteína		

El antígeno Tn se ha detectado mediante anticuerpos monoclonales en el parásito *Schistosoma mansoni* tanto en su estado adulto como quístico [110]. Por otro lado, los antígenos Tn y sTn se han identificado en la larva y el adulto *Echinococcus granulosus* [111], así como también la presencia de Tn circulante en pacientes con hidatidosis [111]. Estos antígenos también han sido

identificados, en *Fasciola hepática* [112], *S. mansoni* [113] y en otros parásitos helmintos [114]. Por último, cabe destacar que también se ha proporcionado evidencia acerca de la existencia del antígeno sTn en un parásito protozoario como lo es *Trypanosoma cruzi* [115].

La presencia de estos “antígenos tumorales” en helmintos, ha tomado gran importancia en la investigación en cáncer, ya que en los últimos años se ha identificado la presencia de una correlación negativa entre algunas infecciones por parásitos helmintos y la prevalencia de cáncer [116]. Esto plantea la posibilidad de una posible reacción cruzada para los antígenos TACA en individuos que han sido infectados por estos parásitos indicando el potencial uso de estos antígenos en terapias inmunológicas contra el cáncer [31].

En este sentido, resulta de gran interés el estudio de una proteína tipo mucina identificada y clonada por nuestro equipo de investigación, a partir de *E. granulosus* denominada C317. La misma se expresa en la capa germinativa de la pared del quiste hidático. En cuanto a su estructura, la C317 tiene 58 residuos aminoacídicos organizados en tres regiones diferentes: i) el extremo N-terminal rico en residuos ácidos con un péptido señal, ii) una región tipo mucina con 14 sitios posibles de O-glicosilación y iii) el extremo C-terminal que contiene varios aminoácidos hidrofóbicos.

Resulta interesante destacar que la secuencia del péptido C317 es muy diferentes a la de las mucinas humanas, no observándose secuencias primarias conservadas entre ambas proteínas. En la Tabla V se detalla la secuencia primaria del péptido C317.

Tabla V. Secuencia Primaria del péptido C317

MGTLQIFILLLLTAHTFAYSHEYGEEDDLTTSTTTTSTTQTTVAKATS
QMSLLSPSTPLHLFTSLLLFITSYALL

Símbolo de colores:

Péptido señal

Extremo N-terminal ácido

Región central rica en serina y treoninas

Extremo C-terminal hidrofóbico

Objetivos

1 Objetivos Generales

En esta tesis nos planteamos como objetivo estudiar el papel de la proteína C317 conteniendo el antígeno Tn en la inducción y potenciación de una respuesta inmunológica anti-tumoral en ratones. Nos formulamos como hipótesis la posibilidad de que la glicoproteína C317-Tn podría potenciar una respuesta inmune contra el antígeno Tn presente en tumores epiteliales, sin que se presenten problemas de tolerancia inmunológica ya que el péptido portador del antígeno Tn no es propio del huésped.

Teniendo en cuenta que, diferentes glicoproteínas patógenas pueden ser reconocidas por los receptores tipo lectinas presentes en la superficie de las células dendríticas (CD), nos planteamos también como objetivo de este proyecto, evaluar el papel de las CD, en potenciar una respuesta inmunológica anti-tumoral a través del reconocimiento y la internalización de los glico-péptidos por dichos receptores tipo lectinas.

Estos estudios podrían constituir un aporte en el futuro desarrollo de una vacuna contra cáncer que consista en el proteína C317 con el antígeno Tn incorporado por *O*-glicosilación *in vitro*.

2 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos de este proyecto de maestría fueron los siguientes:

1. Obtención de péptidos C317 presentando el antígeno Tn
2. Evaluación de la Respuesta Inmunitaria tanto a nivel celular como humoral inducida por C317 y péptidos relacionados (EM5 y EM5-2Tn)
3. Evaluación de la respuesta Anti-tumoral inducida por 317 y péptidos relacionados (EM5 y EM5-2Tn)
4. Evaluación de los mecanismos responsables de la respuesta anti-tumoral inducida por EM5, EM5-2Tn y C317

Metodología

1 Líneas celulares tumorales

Las líneas celulares de origen murino PancO2 (cáncer de pulmón, cepa C57BL/6) y TA3/Ha (cáncer de mama, cepa BALB/c) fueron cultivadas en RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 2 mM de L-glutamina y 1 mM de piruvato de sodio, en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO₂.

Para la puesta a punto de los modelos tumorales células PancO2 y TA3/Ha fueron cultivadas por 72 hrs aproximadamente previo a la inoculación. La misma, se realizó mediante inyección intra-peritoneal para los ratones TA3/Ha y sub-cutánea para PancO2. Los ratones control fueron inyectados con PBS. Las células TA3/Ha desarrollaron ascitis en los ratones por lo que la sobrevivencia de los ratones fue evaluada manteniendo los ratones hasta que los mismos comienzan a tener dificultades para desplazarse en busca del alimento, momento en el cual fueron sacrificados. Las células PancO2 desarrollaron tumores subcutáneos, a los cuales se midieron los diámetros mayor y menor, para expresar sus crecimiento en área definida como el producto del diámetro mayor y diámetro menor (mm²).

Para la preparación de extractos proteicos a partir de células tumorales se utilizaron células PancO2 y TA3/Ha procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento. Se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en buffer de lisis (25% glicerol, NaCl, 1,5 mM NaCl₂, 20 mM HEPES, 1% Tritón X-100, DTT 2 mM, PMST 1 mM) y se almacenó a -80° C. La cantidad de proteína en el sobrenadante, fue cuantificada por el métodos de Ácido Bicinconínico.

2 Ratones

Se utilizaron ratones hembras BALB/c o C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones fueron adquiridos en el DILAVE ó en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo. Éstos fueron mantenidos en un ambiente controlado, con temperatura entre 19 y 21°C y ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los animales fueron alojados en jaulas con filtro y recibieron agua y ración estéril, administradas en condiciones *ad libitum*. Los diferentes protocolos de experimentación con animales utilizados en este trabajo

fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República y por la Comisión de Ética del Institut Pasteur de Montevideo.

3 Obtención de péptidos C317 presentando el antígeno Tn

3.1 Producción de C317 recombinante en *E. Coli*

La proteína C317 la misma fue clonada en distintos vectores de expresión de *E. Coli*: pET28, pET29, pET32 y pTrc. Los mismos fueron transfectados por shock térmico en diferentes cepas de bacterias competentes BL21 y Bli5. Para la sobre-expresión *in vitro* se realizaron pre-cultivos de 12 hrs en medio LB de las bacterias transfectadas. Una vez realizado el pre-cultivo las bacterias fueron crecidas en 100 ml de LB hasta alcanzar una DO a 600nm de 0,5-0,6 momento en el cual se adicionó IPTG (0,1 M) y se creció por cuatro horas a 37°C. Transcurrido el tiempo de inducción las bacterias fueron centrifugadas y resuspendidas en buffer de Urea 8,0 M pH 8,0. Se homogeneizó y luego centrifugó a 12000 rpm por 5 min tomando posteriormente el sobrenadante conteniendo las proteínas.

La evaluación de la expresión de C317 en los clones transfectantes se realizó por SDS-PAGE al 15% en buffer Tris-Glicina (0,25 M) pH 8,3 a 150mV. Como marcador de peso molecular se utilizó un marcador Low Range (Sigma Aldrich). Una vez transcurrida la electroforesis, se tiñeron los geles con azul de Coomassie por una hora. Alternativamente, la proteína recombinante fue identificada por Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-His.

3.2 Péptidos y Proteínas Sintéticos

Los péptidos EM5 (MSLLSPSTPLHAITS) y C317 (ver Esquema 1) fueron sintetizados por SBS Bio Beiiing SBS Genetech Co. Ltd (China) ó Peptide 2.0 Inc (USA). El glicopéptido EM5-2Tn fue sintetizado en el laboratorio de Chimie de Biomolecules en el Institut Pasteur París.

3.3 Detección de Endotoxinas

Todos los péptidos utilizados fueron evaluados en cuanto a su contaminación potencial con endotoxina de los péptidos se empleó el kit Pyrochrome (Associates of Cape Cod). Brevemente, se preparó una curva estándar de endotoxina en un rango de 0,005 a 50 EU/mL (unidades de endotoxina/mL) y diluciones apropiadas de la muestra a ensayar. Las muestras fueron incubadas con un lisado de amebocitos de *Limulus* durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se midió la

absorbancia a 405 nm. La concentración de endotoxinas en la muestra se obtuvo interpolando con ayuda de la curva estándar y relativizando con la cantidad de proteína. Los valores obtenidos son de 1,55 EU/ml para C317, 1,28 EU/ml para EM5 y 1,31 EU/ml para EM5-2Tn.

3.4 Glicosilación *in vitro*

Las glicosilaciones *in vitro* fueron realizadas mediante la incubación a 37° C de los péptidos (C317, EM5 ó MUC6) con diferentes ppGalNAc-Ts (-T2, -T3, -T6) recombinantes [117], en presencia de UDPGalNAc (uridine 5-diphospho-*N*-acetylgalactosamine) a razón de 2 equivalentes por Thr/Ser. El buffer de reacción consistió en buffer imidazol (50 mM) pH 7.2, conteniendo MnCl₂ (15 mM) y Triton X-100 (0.1%). Diferentes tiempos de incubación fueron evaluados, resultando ser 24 hrs de incubación la condición óptima.

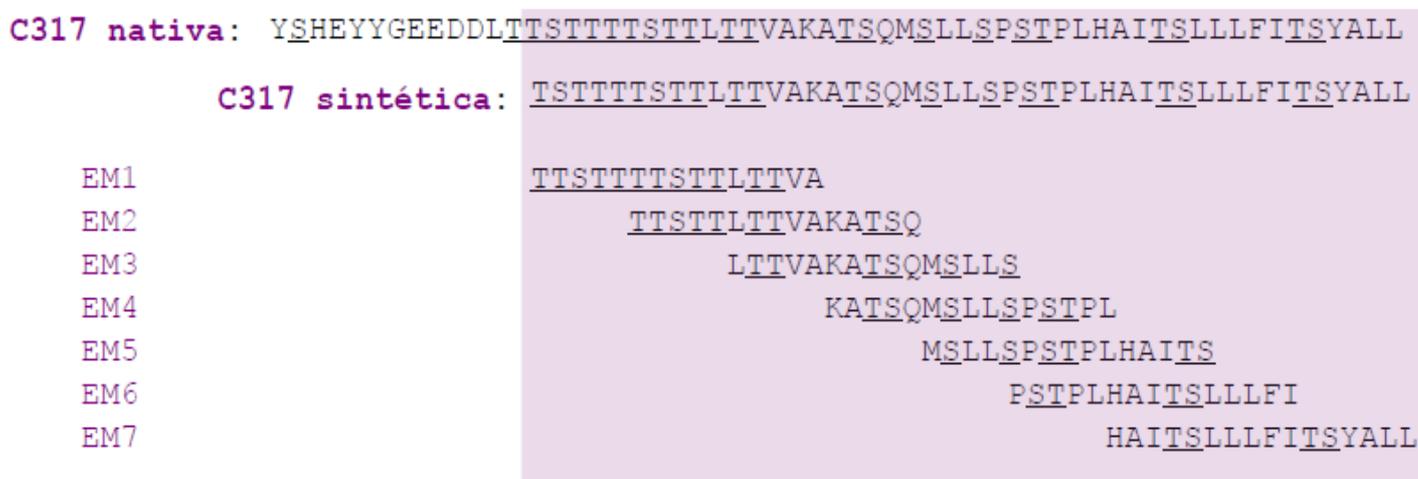
Se utilizó un cocktail de inhibidores de proteasas para evitar la degradación del sustrato peptídico (Roche). El seguimiento de la glicosilación *in vitro* fue realizado por HPLC de fase reversa utilizando una columna C18 (Kromasil 5m 100Å 4,6 x 250 mm) utilizando una mezcla de agua y acetonitrilo como solventes. Los programas utilizados fueron: 5%-50% de acetonitrilo en 30 minutos para la glicosilación de la C317, 25% a 50% de acetonitrilo en 25 minutos para la glicosilación de EM5 y de 15% a 25% de acetonitrilo en 20 minutos para los péptidos MUC6. Todos los programas incluyeron una fase de equilibrio en la mezcla de gradiente inicial por 5 minutos. Como control de la corrida se realizaron inyecciones con 10 µl de agua. Los picos identificados de péptidos y glico-péptidos fueron colectados y evaluados por MALDI-TOF en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Institut Pasteur Montevideo.

Alternativamente, para evaluar la glicosilación *in vitro* por el método de ELISA se sensibilizaron placas NUNC con 1 µg de proteína C317 ON a 4°C. La detección del antígeno Tn se realizó incubando con el anticuerpo monoclonal 83D4 seguido de un anticuerpo anti-ratón conjugado a la peroxidasa (Sigma Aldrich). El anticuerpo 83D4 es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer el antígeno Tn siempre y cuando existan al menos dos residuos GalNAc [88].

El sistema de revelado fue mediante adición de OPD (O-Phenylenediamine Dihydrochloride) en buffer citrato-fosfato pH5. Se realizaron dos controles para evaluar la glicosilación: uno consistió en la mezcla de reacción en ausencia de UDP-GalNAc (referido como control -1); el otro control consistió en la mezcla de reacción sin péptido aceptor (referido como control -2). Como control positivo de detección de la glicosilación *in vitro* por el método de ELISA se evaluó la glicosilación de la mucina submaxilar ovina deglicosilada (aOSM).

4 Mapeo Peptídico

Para determinar las regiones inmunodominantes de la proteína C317s, se inmunizaron s.c ratones C57BL/c o BALB/c en adyuvante completo de Freund (CFA) ó Hidróxido de Aluminio. Transcurridos 10 días se extrajeron los ganglios drenantes, los cuales, fueron disgregados. Las células obtenidas fueron re-estimuladas con un panel de péptidos (10 µg/ml) de 15 aminoácidos, solapados en 10 de los mismos y denominados EM1-EM7 (Esquema 1). Luego de 3 días de incubación, se retiraron los sobrenadantes y fueron evaluados para la determinación de citoquinas (INFγ) presentes en el mismo. La proliferación celular fue evaluada por incorporación de timidina tritiada en un contador de centelleo (TOMTEC).



Esquema 1. Secuencias aminoacídicas de la proteína C317 y de péptidos EM1-EM7. Los péptidos EM1-EM7 contenidos dentro de la secuencia de la C317s, tienen 15 aminoácidos y se solapan entre sí en 10 aminoácidos.

5 Evaluación de la Respuesta Inmunitaria

5.1 Evaluación de la respuesta celular

Grupos de 5 ratones C57BL/c fueron inmunizados s.c. en la base de la cola con EM5, EM5-2Tn y C317 (20 µg) en Hidróxido de Aluminio ó Adyuvante Completo de Freund (CFA). Transcurridos 10 días se extrajeron los ganglios drenantes, los cuales fueron disgregados. Las células obtenidas fueron re-estimuladas con distintas concentraciones de antígenos (0.1, 1, 10 y 30 µM) por 3 días a

37° C. La proliferación celular fue evaluada por la incorporación de timidina tritiada en un contador de centelleo (TOMTEC). Los sobrenadantes fueron colectados para la determinación de citoquinas (IL5, IL17 e INF γ) presentes en el mismo.

5.2 Evaluación de la respuesta humoral

Se evaluó la presencia de anticuerpos IgG e IgM específicos de los antígenos EM5, EM5-2Tn y C317 en ratones inmunizados 4 veces con 20 μ g de cada uno de los antígenos. El grupo control consistió en ratones inmunizados únicamente con el adyuvante.

Se sensibilizaron placas de ELISA de fondo plano con 10 μ g/pocillo antígeno (EM5, EM5-2Tn ó C317) en buffer NaHCO₃-Na₂CO₃ 0,05 M pH 9,6 durante toda la noche a temperatura ambiente. Alternativamente, las placas fueron sensibilizadas con extractos proteicos (10 μ g/pocillo) obtenidos a partir de las células tumorales PancO2 y TA3/Ha.

Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con gelatina 1% en PBS por 2 horas a 37°C. A continuación, se adicionaron diluciones seriadas al medio de los sueros (1/100 a 1/12800). Las placas fueron incubadas por 1 hora a 37°C. Posteriormente, las placas se incubaron con una dilución apropiada de anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa por una hora. Para la detección de IgG e IgM se emplearon anticuerpos policlonales anti-IgG y anti-IgM, respectivamente, de ratón generado en cabra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La actividad de la peroxidasa se evidenció incubando los pocillos con OPD en buffer citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0. La reacción se dejó proseguir por 30 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 492 nm.

6 Determinación de Citoquinas ELISA

Placas Nunc de 96 pocillos fueron sensibilizadas con anticuerpos primarios específicos de cada citoquina (BD Bioscience) toda la noche a 4°C. Se bloqueó con BSA 1% en PBS Tween-20 0,001 % por 1 hora a 37°C. Diferentes diluciones de los sobrenadantes, así como los estándares de cada citoquina utilizados para las curvas de calibración, se incubaron por 1 hora a 37°C. Los anticuerpos secundarios conjugados a biotina utilizados se incubaron durante 45 minutos a 37°C. La estreptavidina fue incubada por 30 minutos a 37°C. El sistema de revelado consistió en OPD en buffer citrato-fosfato pH 5, como indicado anteriormente.

7 Evaluación del reconocimiento de células tumorales por sueros obtenidos de ratones inmunizados por citometría de flujo

Las células PancO2 y TA3/Ha, fueron depositadas en una placa de 96 pocillos de fondo cónico, 2 x 10⁵ células/pocillo. Posteriormente, las células fueron incubadas con diluciones de los sueros de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn ó C317 por 15 min a 4^o C. Las células fueron lavadas en buffer en PBS conteniendo 2% SBF y 0,1% Azida de Sodio. Posteriormente, las células fueron fijadas en formaldehído al 0,37%. La intensidad de fluorescencia fue posteriormente analizada utilizando el equipo CyAn High-Performance Flow Cytometer (DakoCytomation).

8 Evaluación *in vitro* de la actividad citotóxica de esplenocitos de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn ó C317

A los efectos de analizar la capacidad citotóxica de esplenocitos provenientes de animales inmunizados con EM5, EM5-2Tn y C317, se inmunizaron 5 ratones C57BL/6 y BALB/c por vía intraperitoneal en CFA. Luego de 10 días se sacrificaron los ratones y se les extrajo el bazo. Los esplenocitos obtenidos fueron incubados toda la noche con células TA3/Ha(para esplenocitos de ratones de BALBc) ó PancO2(para esplenocitos de ratones de C57BL/c), en distintas relaciones células efectoras: células blanco (100:1, 50:1, 10:1). Cada condición se analizó por triplicado. Como controles, se utilizaron células tumorales solas, esplenocitos solos y células tumorales incubadas con Tritón X-100 1%, éste último como control de un 100% de citotoxicidad. Al día siguiente, se agregaron 10 uL del reactivo WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2Htetrazolio monosódico, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a cada pocillo y se incubó a 37^oC durante 3 horas. Subsiguientemente, se leyó la absorbancia a 450 nm y se calculó el porcentaje de citotoxicidad empleando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ citotoxicidad} = \frac{E_{\text{solos}} + T_{\text{solas}} - (E + T)}{T_{\text{solas}} - T_{\text{Tritón}}}$$

con:

E_{solos}: Absorbancia de pocillos con esplenocitos solos.

T_{solas}: Absorbancia de pocillos con células tumorales solas.

E+T: Absorbancia de pocillos con mezcla de células tumorales y esplenocitos.

T_{Tritón}: Absorbancia de pocillos con células tumorales incubadas con Tritón X-100 1%.

9 Identificación de Poblaciones Celulares en esplenocitos de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn ó C317

Ratones inmunizados i.p. 4 veces con EM5, EM5-2Tn ó C317 (20 µg) fueron sacrificados y sus bazo fueron extraídos y disgregados para obtener una suspensión de esplenocitos. Posteriormente los esplenocitos fueron lavados con PBS conteniendo SBF 2%, azida de sodio 0,1% e incubadas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas características de determinadas poblaciones celulares del sistema inmunológico (eBioscience).

Las concentraciones óptimas de cada anticuerpo fueron determinadas previamente. Posteriormente, las células fueron lavadas y analizadas en el citómetro CyAN High-Performance Flow Cytometer (DakoCytomation).

Los linfocitos B y T, se evaluaron mediante la mezcla siguiente de anticuerpos: anti-CD8 α conjugado a FITC, anti-CD19 conjugado a PE, anti-CD4 conjugado a PECy7, anti-CD3 conjugado a A647 y anti-CD62L conjugado a PECy5.

Los macrófagos se analizaron utilizando la mezcla siguiente de anticuerpos: anti-F4/80 conjugado a FITC, anti-MHCII conjugado a PE y anti-CD11b conjugado a APC. Las MDSC fueron analizadas mediante el empleo de la mezcla: anti-Ly6G conjugado a FITC, anti-Ly6C conjugado a PerCP.Cy5.5 y anti-CD11b conjugado a APC.

Las células dendríticas se evaluaron utilizando los siguientes anticuerpos: anti-CD40 conjugado a FITC, anti-MHCII conjugado a PE, anti-CD80 conjugado a PECy5, anti-CD11c conjugado a PECy7 y anti CD86 conjugado a APC.

Las células NK y su estado de activación fueron analizadas tras la incubación con los anticuerpos siguientes: anti-NK1.1 conjugado a PE, anti-CD69L conjugado a FITC y anti-CD49b conjugado a APC.

10 Ensayos con Células Dendríticas

10.1 Generación de células Dendríticas

Las células dendríticas fueron generadas a partir de los precursores de la médula ósea (BMDC) de fémur y tibias de ratones C57BL/c. Se cortaron las extremidades de los huesos y haciendo uso de una jeringa de 1 ml se extrajeron las células progenitoras en medio RPMI suplementado con

Glutamina, Penicilina y Ampicilina, SBF 10% y β -mercaptoetanol (0,05 mM). Las células precursoras se contaron y se llevaron a una dilución de $2,0 \times 10^5$ cels/ml en medio RPMI completo suplementado con 0,5% GM-CSF. La concentración de cada stock de GM-CSF a utilizar se puso a punto cultivando a los precursores de células dendríticas con diferentes concentraciones de GM-CSF obtenido a partir del sobrenadante de células inmortalizadas secretoras de GM-CSF.

Una vez llevadas a la concentración deseada, las células precursoras de células dendríticas se depositaron en placas de petri a razón de 10 ml por placa. Al tercer día se observaron las células y en caso de presentar islotes se adicionaron 5 ml de medio RPMI completo con 0,5% GMSCF. Del día 7 a 9 (D7-D9) las células en suspensión se colectaron y se contaron para llevarlas a la concentración requerida para cada experimento.

10.2 Internalización de antígenos por BMDC

La internalización de antígenos por BMDC se evaluó por citometría de flujo y por microscopía confocal. Para ello, primeramente se marcaron los antígenos con una sonda fluorescente ATTO647 (Fluka). Los péptidos EM5, EM5-2Tn o C317 fueron incubados con ATTO647 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en buffer bicarbonato (Na_2CO_3 0,1M, NaHCO_3 0,2M pH 9,5) por 12 hrs a 4^o C. Posteriormente, los péptidos fueron dializados utilizando una membrana de diálisis (3500 Da) (Pierce) por 24 hrs a 4^o C. Para la evaluación de la internalización por citometría de flujo, se incubaron BMDC ($0,5 \times 10^6$ cels/pocillo) con los péptidos-ATTO647 (5 μM) por 1 hr a 37^o C ó a 4^o C (control). Transcurrida la incubación se efectuaron dos lavados en PBS conteniendo azida de sodio (0,1%) y SBF (2%). A continuación las BMDC fueron incubadas con un anticuerpo anti-CD11c conjugado a FITC lo que permitió evaluar la intensidad de fluorescencia correspondiente a la internalización de los péptidos-ATTO647 en células CD11c⁺ por citometría de flujo. Alternativamente, las BMDCs marcadas fueron depositadas en láminas de vidrio previamente lavadas y tratadas con alcohol 95%. Una vez secas, las células fueron incubadas por 30 minutos a 4 °C con anticuerpos específicos anti-LAMP1 (conjugado a Rhodamina), anti-CD11c (conjugado a FITC) ó anti-IAb (conjugado a FITC) (eBioscience) y posteriormente fijadas con formaldehído al 0,37% en buffer FACS. Los preparados fueron montados con glicerol 80% estéril y analizados en un microscopio confocal (Nikon).

10.3 Maduración de Células Dendríticas

BMDC ($0,5 \times 10^5$ cel/pocillo) se incubaron con diferentes concentraciones de EM5, EM5-2Tn ó C317 (0,01 a 10 μM) por 1 hr a 37^o C. Posteriormente, se adicionó LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ó Zymosan (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y

se incubaron toda la noche a 37^o C tras lo cual se colectó el sobrenadante para evaluar citoquinas (IL12, IL6 e IL10) por ELISA. Por otro lado, las células fueron incubadas con anticuerpos específicos de CD11c, IAb, CD40, CD80 y CD86 (eBioscience) y analizados por citometría de flujo.

11 Análisis estadísticos

Las variables cuantitativas se analizaron mediante el test de la t de Student. Valores de p menores a 0,05 ó 0,01 (señalizados en las gráficas con un *) se consideraron estadísticamente significativos.

6. Resultados

1 Producción de péptidos conteniendo el antígeno Tn

1.1 Expresión de la proteína C317 recombinante en *E. Coli*

La proteína C317 fue clonada en vectores de expresión en *E. Coli* (pET28, pET29, pET32, pTrc) los cuales fueron utilizados para transfectar las cepas de expresión BL21 y Bli5. Diferentes clones transfectados fueron cultivados en presencia de IPTG para inducir la expresión de la proteína heteróloga. Posteriormente, los lisados bacterianos obtenidos en condiciones desnaturizantes fueron evaluados en un SDS-PAGE al 15 % (Figura 6). A modo de ejemplo, cuando se estudió la expresión la expresión de la proteína contenida en el plásmido pET32 se observó una banda diferencial de aproximadamente 26 kDa (Figura 6A). Dicha banda fue observada tanto cuando la transfeccion del plásmido se realizó en la cepa bacteriana BL21 como en la cepa Bli15. Como control de expresión se realizaron transfecciones con plásmidos conteniendo la secuencia de la proteína MUC6 humana cuya expresión también es inducida por IPTG (Figura 6B). Para optimizar las condiciones de expresión de la proteína C317 y obtener mayores niveles de expresión, se evaluó la expresión a diferentes tiempos (1, 2, 4 ó 6 hrs) luego de la inducción de IPTG. También se evaluaron diferentes temperaturas (4, 20 y 37°C) y diferentes concentraciones de IPTG (resultados no mostrados).

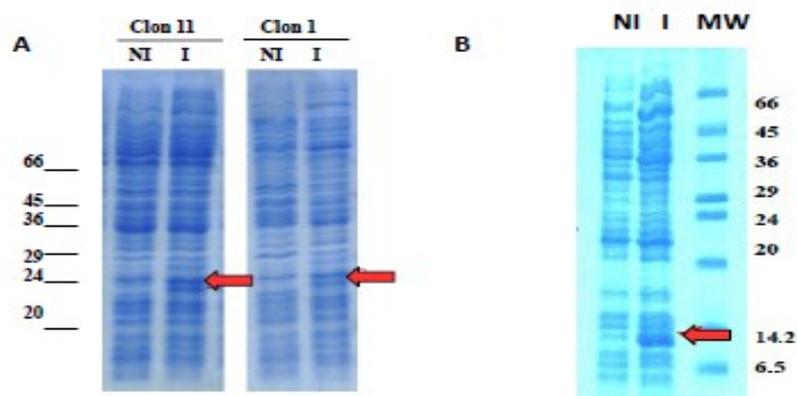


Figura 6. Expresión de la proteína recombinante C317 en *E. Coli*. A) SDS-PAGE al 15 % de bacterias transfectantes obtenidas con el vector pET32 conteniendo la C317. Transfectantes obtenidas en la cepa Bli5 (clon 11) y en la cepa

BL21 (clon 1) fueron inducidas con IPTG (0.1 mM) durante 4 hrs a 37°C. Posteriormente, se obtuvieron los lisados bacterianos en condiciones desnaturalizantes. B) Como control de expresión utilizamos un vector conteniendo la proteína MUC6 humana (pET28-MUC6). Las flechas rojas indican la expresión de la banda de interés. (NI: no inducido e I: inducido). Las flechas rojan indican la banda correspondiente a la C317.

El plásmido utilizado para la producción de la proteína recombinante C317 contiene una secuencia que codifica para una cola de aminoácidos histidina que es incorporada a la proteína una vez que la expresión del plásmido es inducida por IPTG. Ésto nos permitió realizar la purificación de la proteína C317 por cromatografía de afinidad. Con este fin, se realizaron cromatografías de afinidad en columnas de agarosa-Ni²⁺ con los lisados celulares de uno de los clones para los que se observó expresión de C317, en particular el clon 1 pET32-C317 en la cepa BL21 (Figura 7). En los carriles se observó una banda representando a la proteína purificada con un peso molecular de aproximadamente

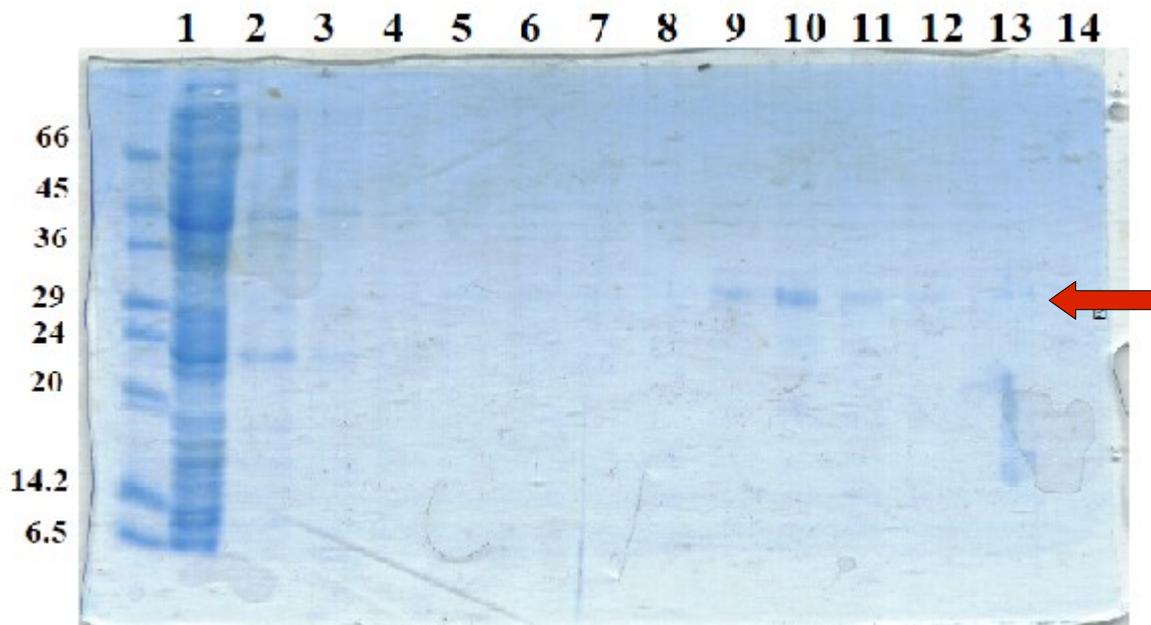


Figura 7. Expresión de la proteína recombinante pET32-C317 en *E. Coli* BL21. SDS-PAGE al 15 % de transfectantes obtenidas con el vector pET32 conteniendo la C317 en la cepa BL21. El clon (denominado clon 1) fue inducido con IPTG (0.1 mM) durante 4 hrs a 37°C. Posteriormente, se obtuvieron los lisados bacterianos en condiciones desnaturalizantes y se purificó la proteína utilizando una columna de afinidad de agarosa conjugada a Ni²⁺. En carril 1: lisado inducido, carriles 2-6 : lavados, carriles 7-14: eluidos con 100 mM imidazol. La flecha negra indica la banda correspondiente a pET32-C317 con un peso aproximado de 25 kDa.

Si bien mediante el protocolo puesto a punto se logró purificar la proteína pET32-C317 (Figura 7) no se obtuvieron cantidades significativas de la misma. A modo de ejemplo: se testaron 130 clones

de bacterias transfectadas con pET28-C317, 80 clones de bacterias transfectadas con pET29-C317, 70 clones de bacterias transfectadas con pTrc-C317 entre otros, sin detectar un clon productor de grandes cantidades de proteína recombinante que permitiera su utilización como sustrato para eventuales reacciones de glicosilación *in vitro*. Como alternativa decidimos adquirir un péptido sintético conteniendo el sitio glicosilable de la C317 que denominamos C317s (Tabla VI).

Tabla VI. Secuencia Aminoacídica de los diferentes Constructos C317

Nombre	Secuencia Aminoacídica	Amino Ácidos	PM (Da)
C317n	MGTLQIFILLLLTAHTFAYSHEYEGEDDLTSTTTTSTTQTTVAKATSQMSLLSPSTPLHLFTSLLLFIITSYALL	76	8274.4
C317r	M...TRX-tag...LAGSGSGHMHMHHSSGLVPRGSMKETAAAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIGSGT LQIFILLLLTAHTFAYSHEYEGEDDLTSTTTTSTTQTTVAKATSQMSLLSPSTPLHLF TSLLLFIITSYALL *	242	25937
C317s	YSHEYEGEDDLTSTTTTSTTLLTTVAKATSQMSLLSPSTPLHAITSLLLFIITSYALL	58	6289.0

* Simboliza que el peptido recombinante contiene la secuencia M...TRX-tag:

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKE
FLDANLA

1.2 Glicosilación *in vitro*

1.2.1 Optimización sobre péptido MUC6

El sistema de glicosilación *in vitro* se puso a punto utilizando los péptidos MUC6-1 (SSTSLVTPSTHIVIP) y MUC6-11 (PLIVTTSRTSTSQUHS). Dichos péptidos son secuencias de 15 aminoácidos contenidos dentro de la secuencia de la mucina humana MUC6 que al igual que la proteína C317, contiene varios sitios probables de O-glicosilación (subrayados). El ensayo de glicosilación *in vitro* consistió en una mezcla de reacción conteniendo el sustrato aceptor (C317s), el sustrato dador (UDP-GalNAc), junto con ppGalNAc-Transferasas (ppGalNAc-Ts) en presencia de Mn²⁺. El proceso de puesta a punto consistió en la optimización del tiempo de incubación, así como la concentración de ppGalNAc-T y UDP-GalNAc en la mezcla de reacción.

Se obtuvieron glicopéptidos con todas las ppGalNAc-T evaluadas (ppGalNAc-T2, -T3 y -T6). En la Figura 3 se observa un ejemplo obtenido para la glicosilación *in vitro* de MUC6-11 utilizando la ppGalNAc-T2 (Figura 8A) y ppGalNAc-T6 (Figura 8C). Las glicosilaciones fueron seguidas por HPLC en fase reversa con el objetivo de visualizar los glicopéptidos obtenidos, los cuales fueron eluidos previo a los péptidos dado su carácter más hidrofílico. De esta forma, a modo de ejemplo en la

Figura 8A podemos observar que el glicopéptido generado al glicosilar MUC6-11 con ppGalNAc-T2 sale con un tiempo de retención de aproximadamente 10,5 minutos, mientras el péptido sale en el minuto 12. La confirmación por MALDI-TOF sugiere que el glicopéptido identificado por HPLC es un monoglicopéptido ya que la masa experimental obtenida fue 1830,02 Da (1626,83 Da correspondiente al péptido MUC6-11 + 203,19 Da correspondientes a GalNAc) (Figura 8B). Con respecto a la glicosilación de MUC6-11 con la enzima ppGalNAc-T6, en la Figura 3C, se observa un pico con un tiempo de retención de aproximadamente 10,5 minutos cuya confirmación por masa demostró ser un di-glicopéptido de masa experimental correspondiente a 2033,03 Da [1626,83 Da + (203,19x2)Da] (Figura 8D).

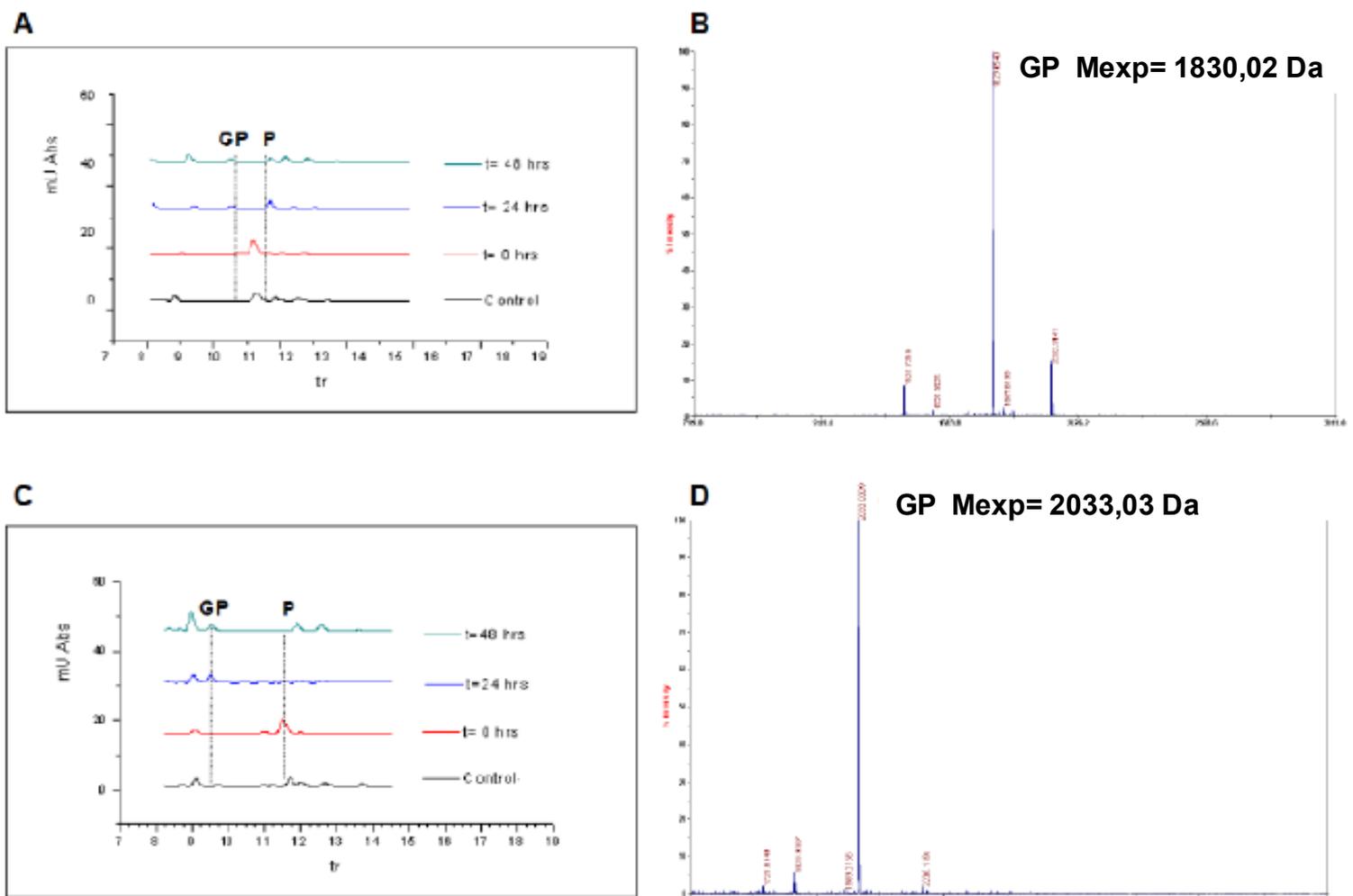


Figura 8. Glicosilación *in vitro* del péptido MUC6-11. A) Análisis por HPLC de la glicosilación correspondiente al péptido MUC6-11 con la enzima ppGalNAc-T2 a diferentes tiempos (0, 24 y 48 hrs). Las mezclas de reacción fueron separadas en una columna C18 c100Å, 4,6 x 250 mm de fase reversa en un gradiente (15-20)% en 20 minutos. El control corresponde a la mezcla de reacción sin UDP-GalNAc (P: péptido GP: glicopéptido). B) Confirmación por

MALDI-TOF de la presencia de glico-péptido en el eluido colectado correspondiente a pico GP en 8A. C) Análisis por HPLC de la glicosilación correspondiente al péptido MUC6-11 con la enzima ppGalNA-T6 a diferentes tiempos (0, 24 y 48 hrs). D) Confirmación por MALDI-TOF de la presencia de glicopéptido en el eluido colectado correspondiente a pico GP en 8C.

1.2.2 Glicosilación *in vitro* de la proteína C317

Una vez puesto a punto el protocolo de glicosilación *in vitro* utilizando los péptidos MUC6, se procedió a realizar el mismo ensayo pero esta vez utilizando la C317s como sustrato. Al igual que para MUC6-1 y MUC6-11 la glicosilación fue evaluada por HPLC en fase reversa. Si bien fue posible identificar el pico de elución correspondiente a la proteína C317 sintética nos resultó extremadamente difícil determinar picos correspondientes a la proteína glicosilada, ya que la misma fue eluida de forma solapada con sustancias de mayor hidrofiliidad (Resultados no mostrados).

Dadas las dificultades técnicas a la hora de detectar variantes glicosiladas de la proteína C317 por HPLC, decidimos evaluar la glicosilación por un método alternativo, en particular el método de ELISA. Con dicho fin, utilizamos como herramienta un anticuerpo monoclonal (83D4) generado en nuestro laboratorio, que permite reconocer de manera específica el antígeno Tn, en particular, los residuos GalNAc-Thr/Ser presentados en forma de "cluster" [88]. En la Figura 9 se observa el resultado del ELISA para diferentes reacciones de glicosilación utilizando diferentes ppGalNAc-Ts (-T2, -T3 ó -T6). En la misma se evidencia que no hubo niveles de glicosilación significativos de la proteína C317s con ninguna de las enzimas evaluadas.

Si bien el método de ELISA resultó ser una herramienta exitosa para la evaluación de las glicosilaciones *in vitro*, este experimento junto con los análisis por HPLC previamente descritos, sugieren que los niveles de glicosilación obtenidos para la proteína C317 en las condiciones analizadas no son considerables. La alta presencia de aminoácidos hidrofóbicos en la C317 podría explicar los bajos niveles de glicosilación obtenidos.

2 Identificación de Regiones Inmunodominantes de C317

Dadas las dificultades encontradas para glicosilar la proteína C317 nos propusimos estudiar las secuencias inmunodominantes de la misma, para eventualmente glicosilarlas. Para ello, se estudió en primer lugar la inmunogenicidad de la proteína C317 en diferentes cepas de ratones. En una segunda instancia se realizó un ensayo de mapeo peptídico para identificar las regiones

inmunodominantes.

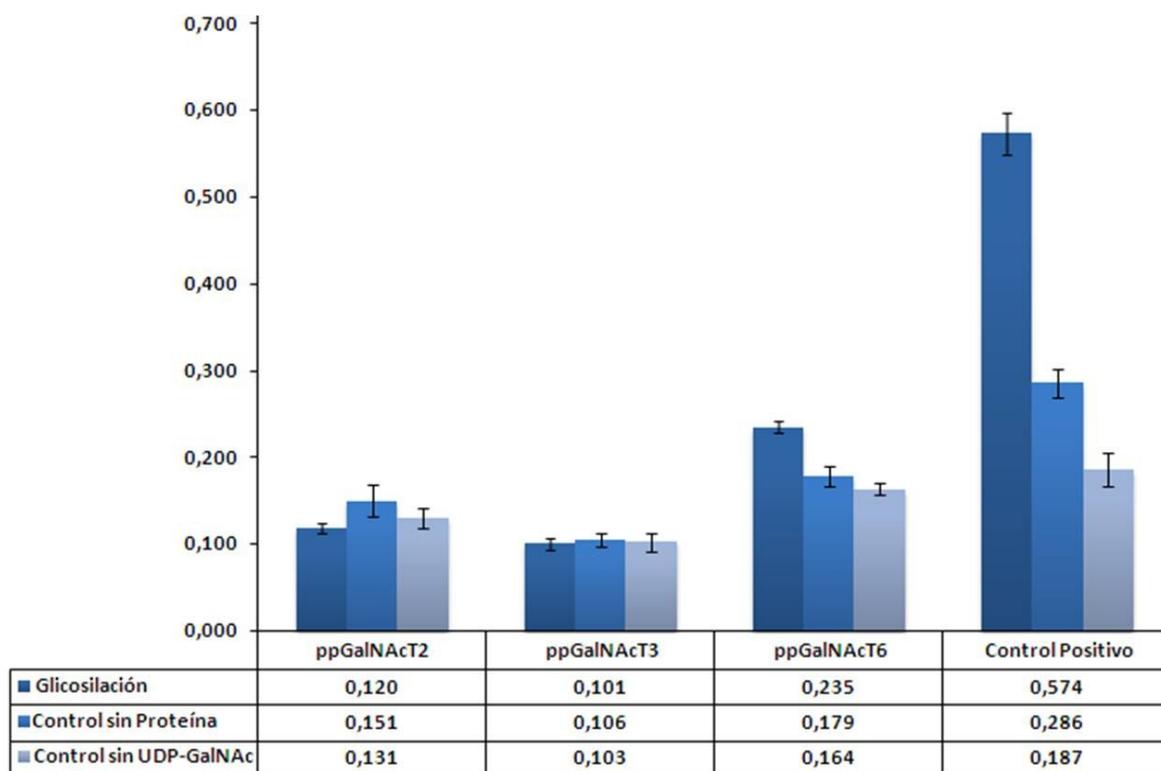


Figura 9. Evaluación de la glicosilación *in vitro* de la proteína C317 por ELISA. Se realizaron mezclas de glicosilación en presencia de ppGalNAc-Ts (-T2, -T3, -T6) durante 24 hrs. Posteriormente se sensibilizó una placa de ELISA con 1 µg de proteína C317. La detección del antígeno Tn (GalNAc-Thr/Ser) se realizó incubando con el anticuerpo monoclonal 83D4 seguido de un anti-ratón conjugado a la peroxidasa. Los controles consistieron en la mezcla de reacción sin UDP-GalNAc ó sin péptido aceptor. Como control positivo de glicosilación se utilizó la mucina submaxilar ovina deglicosilada.

2.1 Inmunogenicidad de la proteína C317

Con el objetivo de determinar la inmunogenicidad de la proteína C317 se inmunizaron ratones C57BL/6 y BALB/c con 20 µg de proteína C317. Una vez transcurridos diez días se extrajeron los

ganglios drenantes y se re-estimularon *in vitro* con la proteína C317. Posteriormente, evaluamos la presencia de IFN γ en el medio de cultivo (Figura 10).

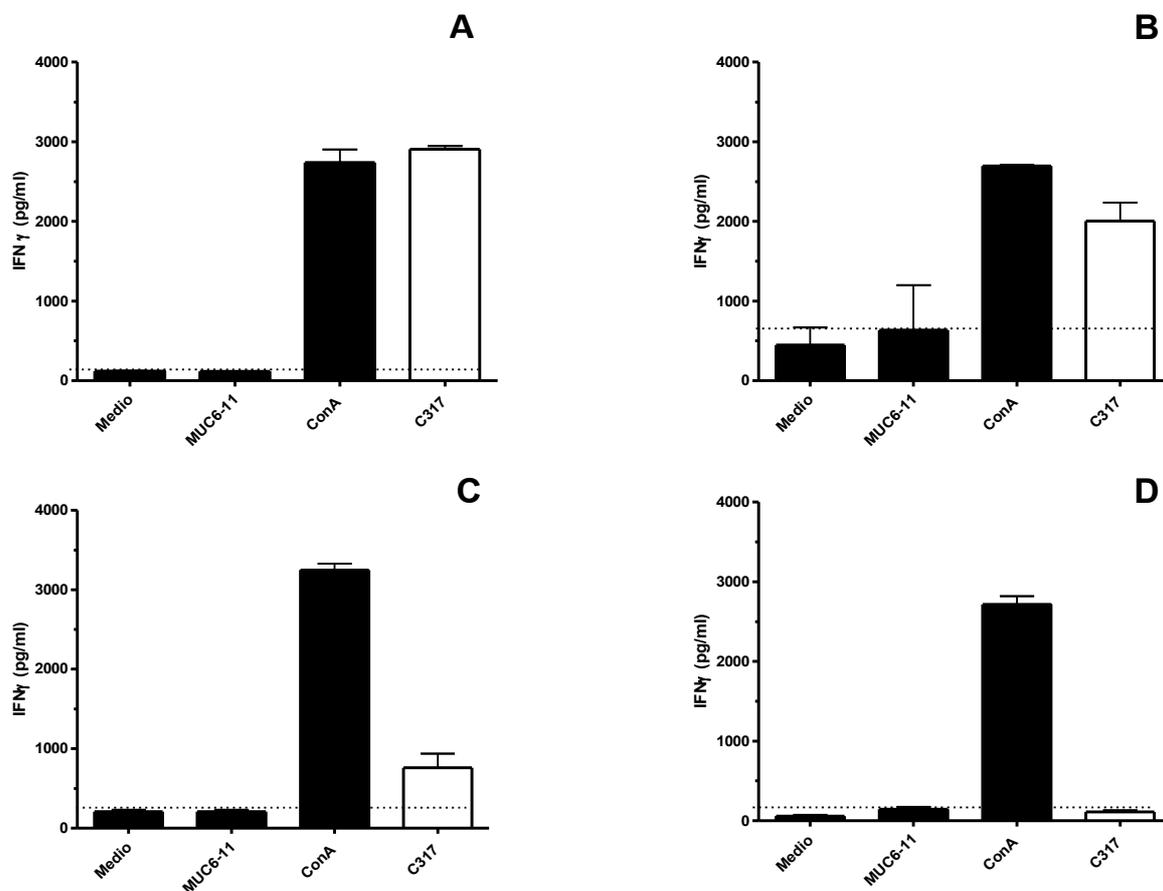


Figura 10. Inmunogenicidad de C317 en C57BL/6 y BALB/c. Las células de ganglios drenantes de ratones C57BL/6 (A y C) o BALB/c (B y D) inmunizados con C317 (A y B) ó con PBS (C y D) en Adyuvante de Freund (CFA por su sigla en inglés) fueron re-estimulados *in vitro* con C317 (10 μ g/ml) durante 72 hrs luego de transcurridos diez días de la inmunización. (Grupos de ratones n= 4). Posteriormente, se analizó la presencia de IFN γ en el medio de cultivo a través de la realización de un ELISA utilizando anticuerpos específico de esta citoquina. No se muestran las proliferaciones (CPM) dado el mal funcionamiento del contador de centelleo al momento en que se realizó el experimento. Como control positivo de estimulación policlonal *in vitro* utilizamos Concavalina A (Con A) 12,5 μ g/ml. El control negativo utilizado fue MUC6-11 (10 μ g/ml).

Las células provenientes de los ganglios drenantes de ratones tanto C57BL/6 (Figura 10A) como BALB/c (Figura 10B) produjeron altos niveles de IFN- γ al ser re-estimuladas *in vitro* con dicha proteína, mientras que las células provenientes de ganglios drenantes de ratones control (a los que se les inyectó PBS) no tuvieron tal producción (Figuras 10C y 10D). En otras palabras, dicha

proteína es inmunogénica en las dos cepas de ratones estudiadas.

2.2 Determinación de Regiones Inmunodominantes de C317

Una vez determinada la inmunogenicidad de C317 se procedió a identificar las regiones inmunodominantes de la misma, con el objetivo de poder glicosilar *in vitro* dichas secuencias. Esto representaría un camino alternativo a la glicosilación de la proteína C317, que como se detalló anteriormente, no fue buen sustrato para las ppGalNAc-Ts en las condiciones evaluadas.

Para ello realizamos un mapeo peptídico de la proteína C317 utilizando un grupo de péptidos de 15 aminoácidos solapados en su extremo por 10 aminoácidos EM1-EM7 (ver Materiales y Métodos).

La proliferación de linfocitos fue evaluada por la producción de IFN- γ ya que el contador de centelleo para evaluar proliferación por incorporación de timidina tritiada estaba fuera de servicio. En las Figura 11A y 11C se representa la re-estimulación de células de ganglios drenantes de ratones C57BL/6 con los diferentes péptidos de C317 (EM1-EM7) en el grupo de ratones inmunizados con C317 (11A) ó con PBS (Figura 11C). La re-estimulación *in vitro* de los las células de ganglios drenantes con el péptido EM5 generó una producción elevada de IFN γ con respecto a los otros péptidos y con respecto al control, siendo éste por tanto la región inmunodominante para esta cepa de ratones (Figura 11A). En las Figura 11B y 11D se representa la re-estimulación de células de ganglios drenantes de ratones BALB/c con los péptidos EM1-EM7 para el grupo de ratones inmunizados con C317 (Figura 11B) ó con PBS (Figura 11D). A diferencia de lo observado para los ratones C57BL/6, no se observó una única región inmunodominante, ya que encontramos niveles elevados de producción de IFN- γ tanto para EM3 como para EM5 y EM6 (Figura 11B). En base a los resultados obtenidos optamos por realizar la glicosilación *in vitro* del péptido EM5 cuya secuencia es MSLLSPSTPLHAITS (conteniendo 6 sitios posibles de O-glicosilación), y trabajar en la cepa de ratones C57BL/6 ya que en dichos ratones la proteína C317 contiene una región inmunodominante fácilmente identificable y única.

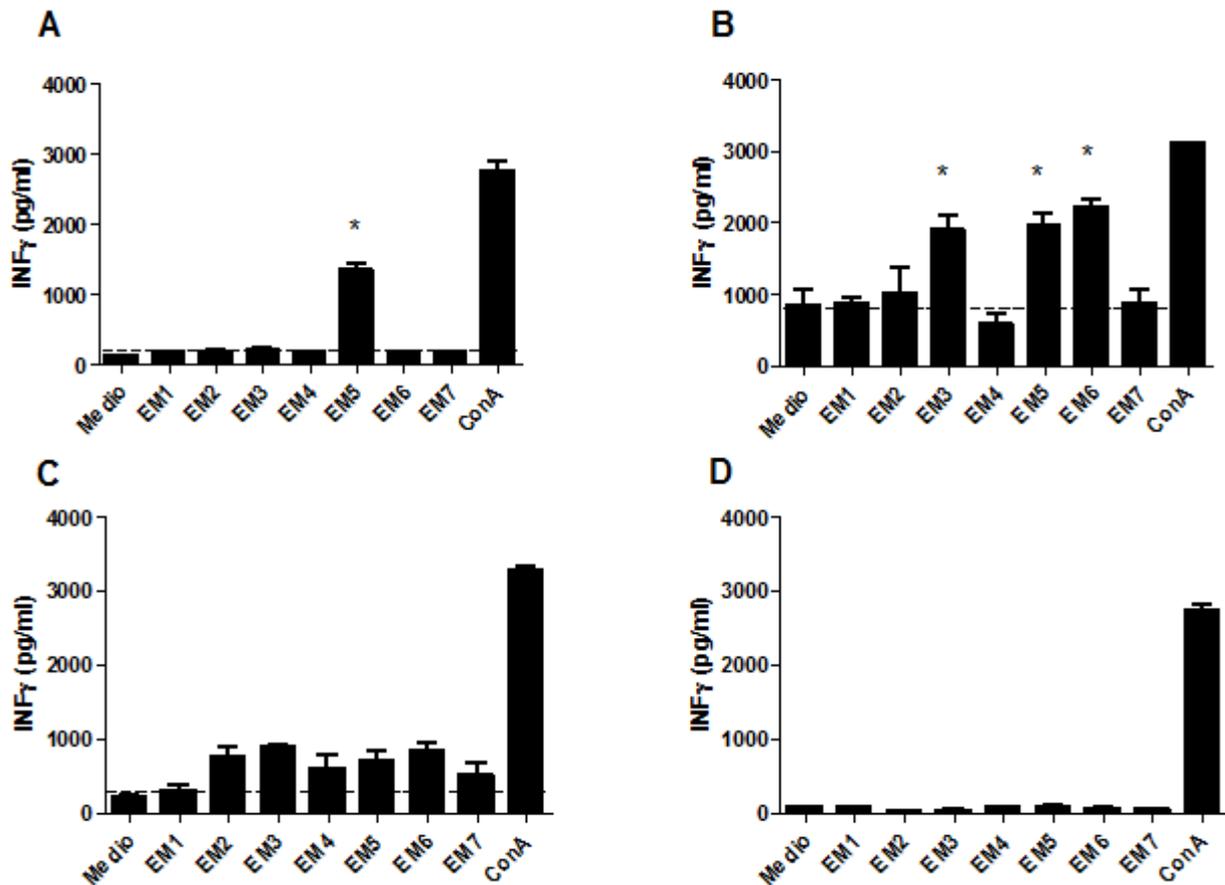


Figura 11. Determinación de las regiones Inmunodominates en ratones C57BL/6 y BALB/c por mapeo peptídico. A) Las células de ganglios drenantes de ratones C57BL/6 (A y C) o BALB/c (B y D) inmunizados con C317 (A y B) ó con PBS (C y D) en Adyuvante de Freund (CFA) fueron re-estimulados *in vitro* con los péptidos de C317 (EM1-EM7) luego de transcurridos diez días de la inmunización. (Grupos de ratones n= 4). No se muestran las proliferaciones (CPM) dado el mal funcionamiento del contador de centelleo para el momento en que se realizó el experimento. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control (medio).

2.3 Glicosilación del péptido EM5

La glicosilación *in vitro* del péptido EM5 fue llevada a cabo en las mismas condiciones descritas para los péptidos de MUC6. Posteriormente, los resultados fueron evaluados por HPLC de fase reversa. En la Figura 12 se observa el cromatograma correspondiente a la inyección de la reacción de glicosilación de EM5. El pico correspondiente al péptido EM5 tuvo un tiempo de retención de 20 minutos. Sin embargo, aunque se evaluaron numerosas condiciones de glicosilación *in vitro*, no se observaron picos de mayor hidrofiliidad correspondientes a posibles glicopéptidos generados, probablemente, debido a una degradación importante de los mismos en la mezcla de reacción.

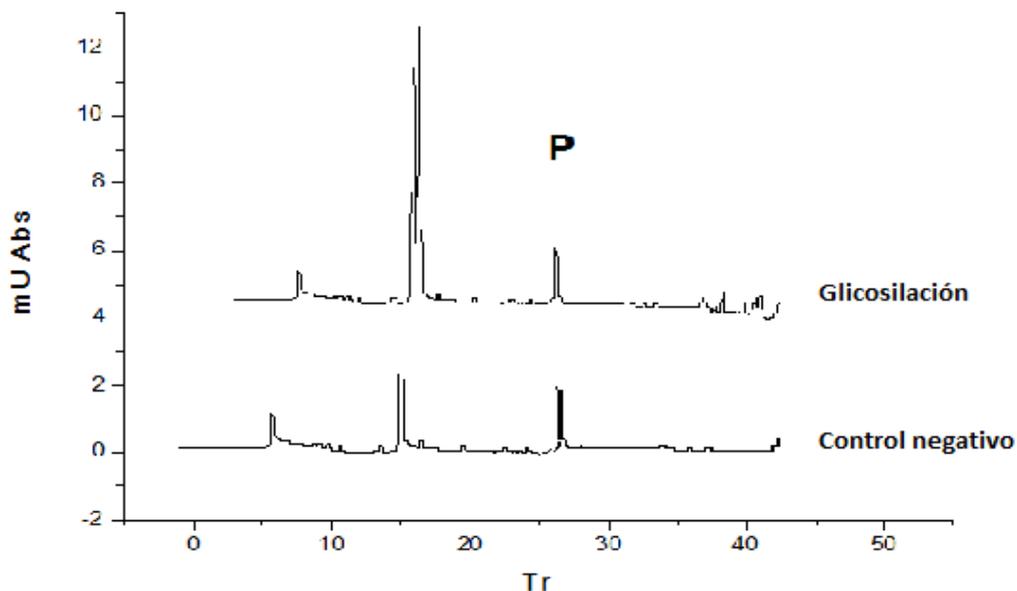
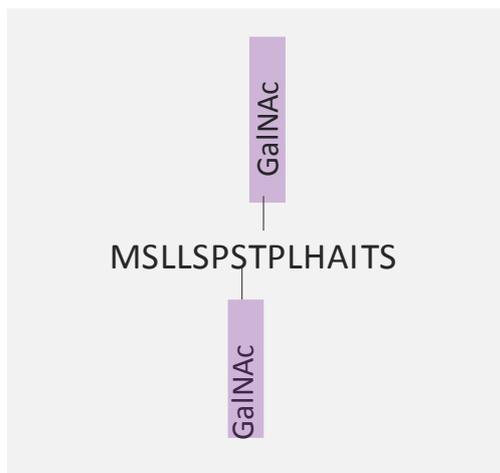


Figura 12. Evaluación de glicosilación *in vitro* de EM5. Análisis por HPLC en fase reversa de la glicosilación correspondiente al péptido EM5 con la enzima ppGalNAC-T3 a 48 hrs. Se inyectaron 10µg de reacción de glicosilación de EM5. El pico correspondiente al péptido EM5 tiene un tiempo de retención de 25 minutos aproximadamente. El control negativo representa la mezcla de reacción sin UDP-GalNac. (P: péptido).

Dadas las dificultades encontradas al glicosilar el péptido mediante la utilización de ppGalNAC-Ts recombinantes, sintetizamos de manera alternativa, un glicopéptido sintético conteniendo 2 residuos GalNac (colaboración con el laboratorio de Sylvie Bay de Química Orgánica del Institut Pasteur de París). El péptido di-glicosilado se denomina de aquí en adelante EM5-2Tn. El mismo se encuentra glicosilado en una serina y una treonina ubicadas en la región central, formando un cluster de 2Tn, como se detalla en el Esquema 2.



Esquema 2: di-Glicopéptido EM5-2Tn

3 Evaluación de la Respuesta Inmunitaria inducida por C317 y EM5

3.1 Selección de Adyuvante

Con el objetivo de estudiar el tipo de respuesta inmunitaria inducida por la proteína C317, por el péptido EM5 ó el glicopéptido EM5-2Tn, pusimos a punto un ensayo de proliferación para células de los ganglios drenantes de ratones C57BL/6. Para ello se evaluó la efectividad en inducir la respuesta inmune de dos adyuvantes diferentes: Hidróxido de Aluminio (Alúmina) y Adyuvante de Freund (CFA, por su sigla en inglés). Los dos grupos de ratones fueron inmunizados con C317-CFA (línea negra, Figura 13A) ó con C317-Alúmina (línea negra, figura 13 B). La activación y proliferación celular fueron evaluadas por producción de citoquinas y por incorporación de timidina tritiada (expresada en Cuentas por Minuto, CPM). La proliferación celular de las células de ganglios drenantes en presencia de la proteína C317 se vió estimulada en comparación al control (ratones inmunizados con el péptido MUC6-11) cuando los ratones fueron inmunizados con C317 en CFA de manera dosis dependiente (Figura 13A, CPM). En cuanto a los niveles de citoquinas producidas por las células de ganglios drenantes de estos ratones, observamos altos niveles de producción de IFN- γ tras la re-estimulación, mientras que las citoquinas IL5 e IL17 no fueron detectadas (Figura 13A) . Sin embargo, no se observó proliferación significativa de las células de ganglios drenantes de ratones inmunizados con C317 utilizando alúmina como adyuvante tanto en relación a la proliferación como a la producción de IFN- γ , IL5, e IL17 (Figura 13B). En otras palabras, la inmunización con la proteína C317 junto al adyuvante completo de Freund (CFA) induce una respuesta potente y específica, por tanto decidimos realizar las inmunizaciones utilizando este adyuvante.

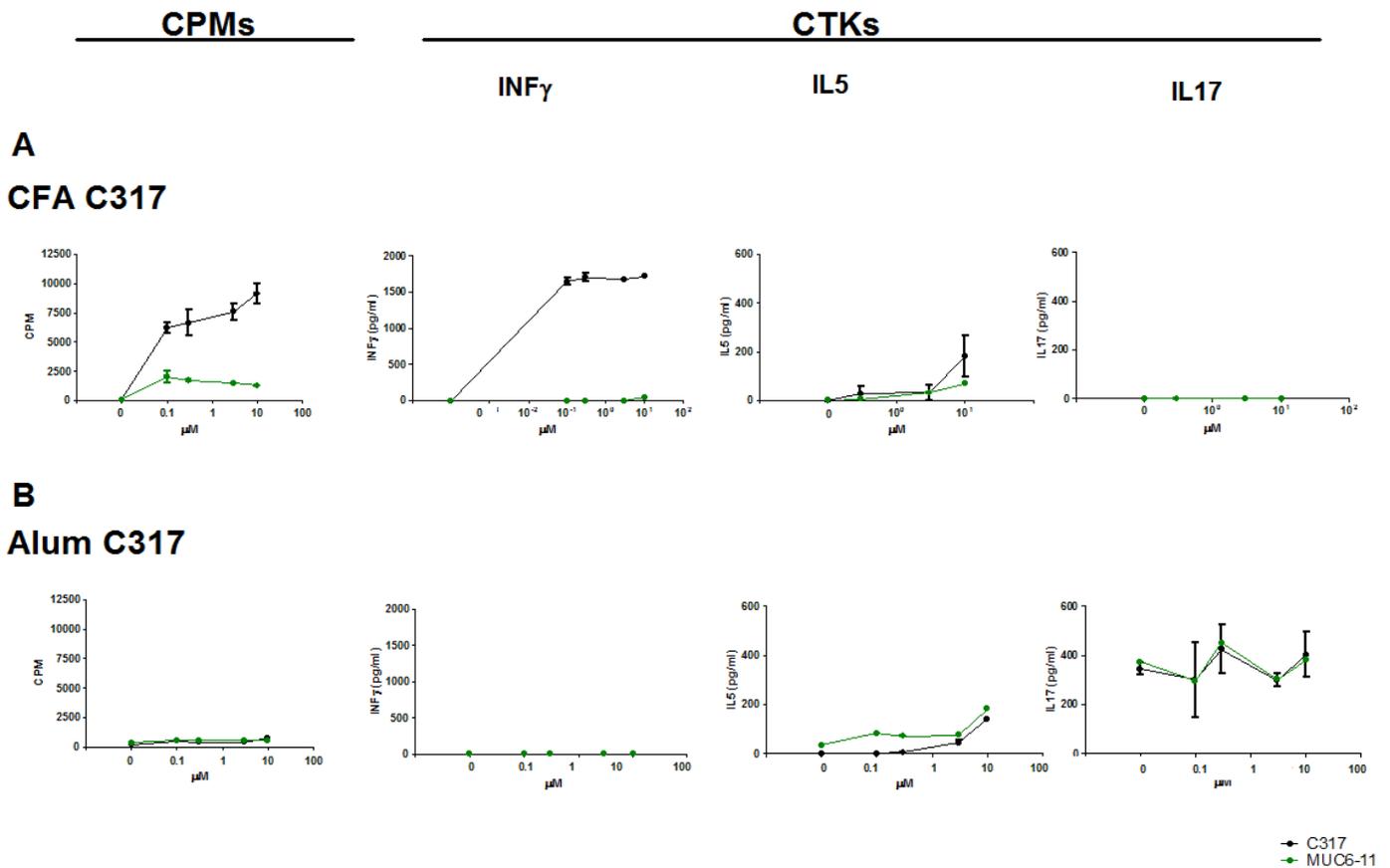


Figura 13. Evaluación de Adyuvantes para ensayos de Proliferación. Ensayo de proliferación celular evaluado por incorporación de timidina tritiada (izquierda) y por producción de IFN- γ , IL5, IL17 (derecha). Se inmunizaron ratones C57BL/6 con 20 μ g de proteína C317-CFA (A) ó C317-Alumina (B). Transcurridos 10 días, se extrajeron las células derivadas de los ganglios drenantes y se re-estimularon con concentraciones crecientes de la proteína C317 (línea negra) o con un péptido control (MUC6-11) (línea verde) . Grupos de ratones n= 4.

3.2 Análisis de la Respuesta Inmunitaria inducida por los péptidos EM5, EM5-2Tn y C317

Posteriormente, procedimos a estudiar el tipo de respuesta inmune celular inducida por los antígenos de interés: péptidos EM5, EM5-2Tn y C317. En la Figura 14 se observan los resultados obtenidos para la proliferación de linfocitos T en cuanto a la incorporación de timidina tritiada (CPM) y en cuanto a la producción de citoquinas (IFN- γ , IL5, IL17) al re-estimular *in vitro* células de ganglios drenantes provenientes de ratones C57BL/6 inmunizados con C317 (Figura 14A), EM5 (Figura 14B), EM5-2Tn (Figura 14C) ó con PBS (Figura 14D). La re-estimulación para todos los grupos se llevó a cabo con C317, EM5, EM5-2Tn y con un péptido control MUC6-11. Tanto la

incorporación de timidina como la producción de citoquinas mostró un patrón dosis-dependiente para todos los grupos de ratones excepto para el grupo de ratones control a los que se les administró PBS y no presentan proliferación ni producción de citoquinas (Figura 14D). Las células de ganglios drenantes de cada grupo de ratones inmunizados con los péptidos secretaron cantidades importantes de IFN- γ cuando se las re-estimuló con el mismo antígeno con el que fueron inmunizados, evidenciando la generación *in vivo* de una respuesta T contra los antígenos administrados (Figura 14). El grupo de ratones inmunizados con C317 (Figura 14A) no solo generó altos niveles de IFN- γ (aproximadamente 2000 pg/ml) al ser re-estimulados con C317 (línea negra) sino que también generó una reacción cruzada al ser re-estimuladas con el antígeno EM5 (línea roja) lo que era de esperar dado que la secuencia de EM5 esta contenida dentro de la secuencia de la C317. Dicha reactividad cruzada también fue observada para las células de ganglios drenantes del grupo de ratones inmunizados con EM5 (Figura 14B). Las células de ganglios drenantes de dicho grupo de ratones respondieron fuertemente en cuanto a la producción de IFN- γ al ser re-estimuladas con el antígeno con el cual fueron inmunizados (EM5, línea roja) y con la proteína C317 (línea negra).

La reactividad cruzada entre C317 y el péptido EM5, se pierde cuando el péptido EM5 se encuentra glicosilado (EM5-2Tn). Células de ganglios drenantes provenientes de ratones inmunizados con EM5-2Tn (Figura 14C) no fueron capaces de producir IFN- γ al ser re-estimulados con la proteína C317 (Figura 14C línea negra). El mismo resultado fue obtenido al re-estimular con EM5-2Tn, las células de ganglios drenantes provenientes de ratones inmunizados con la proteína C317 (Figura 14A).

Por último, cabe destacar que para ninguno de los grupos evaluados, se observó producción de IL5 y que sólo se detectó producción leve de IL17 en las células de ganglio drenantes de ratones inmunizados con EM5-2Tn y re-estimuladas con el mismo EM5-2Tn (Figura 14C).

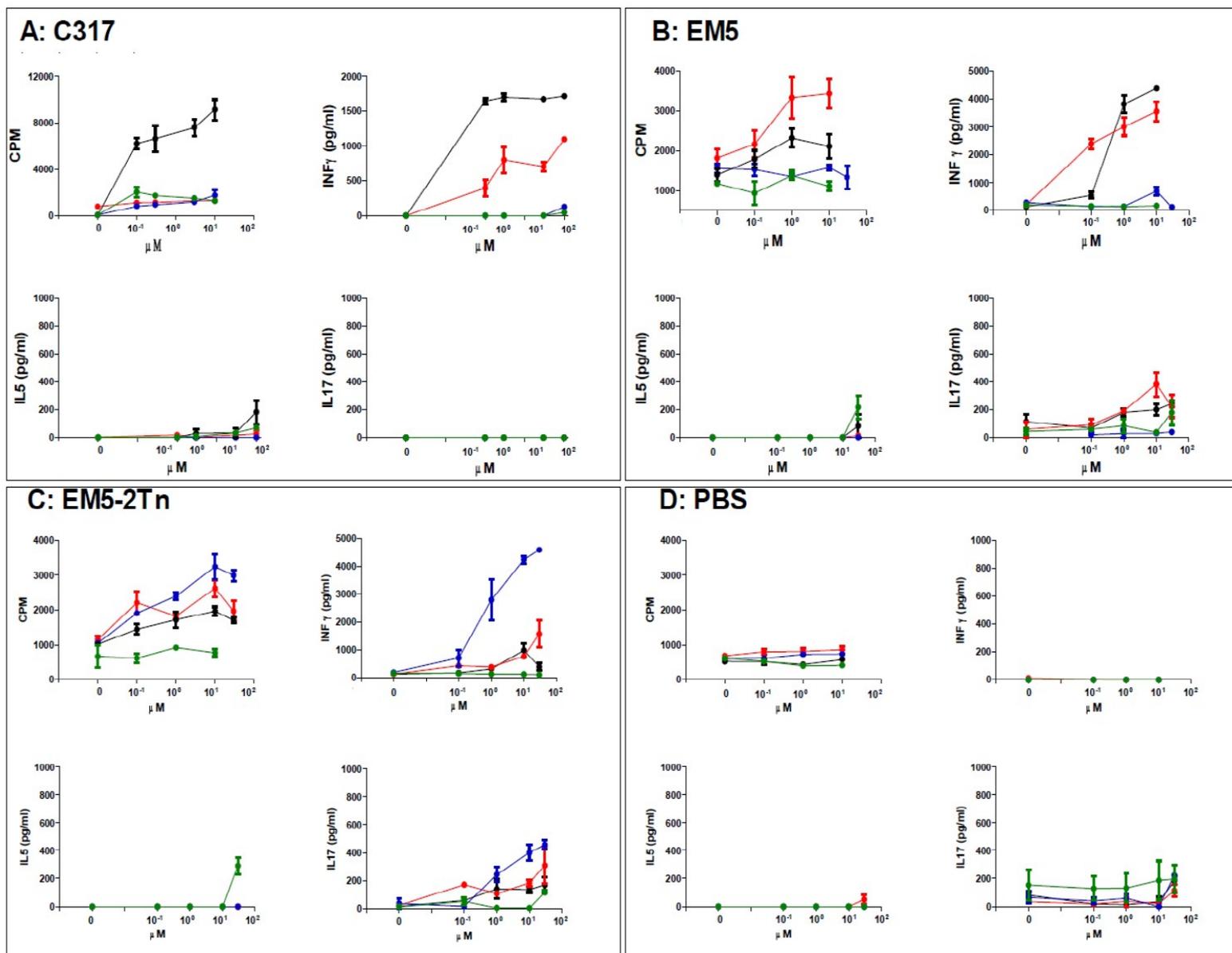


Figura 14. Evaluación de la Respuesta Celular T inducida por EM5, EM5-2Tn y C317s. Ensayo de Proliferación evaluado por incorporación de Timidina Triitada (CPM) y por producción de citoquinas (INF γ , IL5, IL17). Se inmunizaron ratones C57BL/6 con 20 μ g de proteína C317 (A), con EM5 (B), EM5-2Tn (C) y PBS (D) en CFA. Transcurridos 10 días, se extrajeron las células derivadas de los ganglios drenantes y se re-estimularon con concentraciones micromolares crecientes (0-30 μ M) de C317 (línea negra), EM5 (línea roja), EM5-2Tn (línea azul) y un péptido control MUC6-11 (línea verde). (Grupo de ratones n= 4).

3.3 Evaluación de la Respuesta Humoral Inducida por EM5, EM5-2Tn y C317

Con el objetivo de evaluar la respuesta humoral inducida por C317 y EM5 se evaluó la presencia de anticuerpos específicos en sueros de ratones C57BL/6 inmunizados i.p 4 veces con C317, EM5, EM5-2Tn o con PBS (grupo control). En la Figura 15 se observan los resultados obtenidos para

sueros recuperados dos semanas luego de la última inmunización.

En cuanto al reconocimiento de la proteína C317, tanto el grupo de ratones inmunizado con C317 como el grupo de ratones inmunizados con EM5 presentaron, altos títulos de anticuerpos policlonales de tipo IgG capaces de reconocer dicha proteína (Figura 15A). La producción de anticuerpos IgM que reconozcan la proteína C317 no parece ser significativa para ninguno de los grupos a juzgar por los bajos títulos obtenidos (Figura 15D).

El grupo de ratones inmunizados con EM5 desarrolló niveles significativos de anticuerpos IgG e IgM que reconocen dicho antígeno (Figura 15B y 15E respectivamente). El grupo de ratones inmunizados con la proteína C317 también desarrolló anticuerpos IgM que reconocen EM5 (Figura 15E).

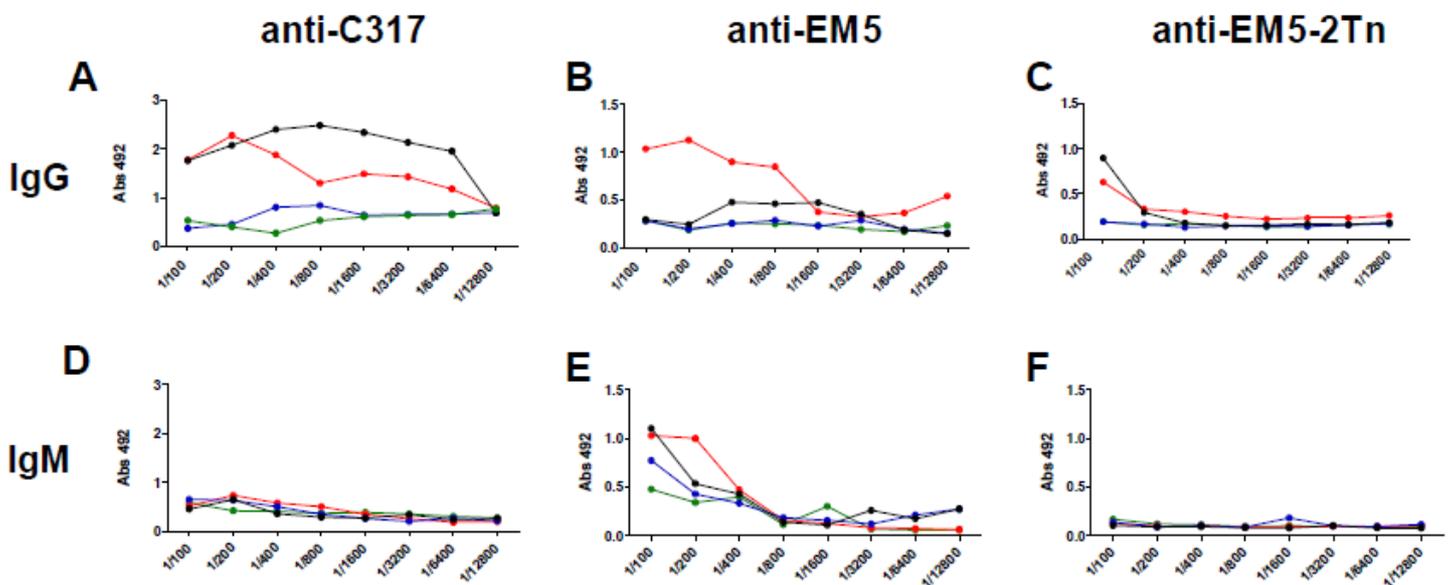


Figura 15. Respuesta Humoral de ratones C57BL/6 inmunizados con C317, EM5 y EM5-2Tn. Detección de anticuerpos por el método de ELISA. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados 5 veces con 20 μ g de de antígenos C317 (línea negra), EM5 (línea roja), EM5-2Tn (línea azul) ó con PBS (línea verde). Se sensibilizaron las placas con 10 μ g/ml de C317 (A y D), 10 μ g/ml de EM5 (B y E), 10 μ g/ml de EM5-2Tn (C y F). Los sueros se incubaron realizando diluciones seriadas desde 1/100 hasta 1/12800. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG ó anti-IgM conjugado a HRP, y se reveló color con OPD.

En cuanto al reconocimiento del antígeno EM5-2Tn por los sueros provenientes de los diferentes grupos, se observa que los grupos que efectivamente generaron anticuerpos IgG capaces de reconocerlo son los grupos de ratones inmunizados con EM5 y con C317, lo que sugiere que los

anticuerpos policlonales generados, contra la porción peptídica, también pueden reconocer, aunque en menor medida al péptido glicosilado (Figura 15C). Por otro lado, no se detectaron anticuerpos capaces de reconocer EM5, EM5-2Tn ó C317 en los sueros de ratones inmunizados con EM5-2Tn.

4 Evaluación de la capacidad anti-tumoral de la respuesta inducida por EM5, EM5-2Tn y C317

4.1 Optimización de Modelos Tumorales TA3Ha y Panc02

Como modelos tumorales murinos seleccionamos las líneas celulares TA3/Ha, de cáncer de mama (fondo genético BALB/c), y Panc02, de cáncer de páncreas (fondo genético C57BL/6). En primer lugar, estudiamos por citometría de flujo la expresión del antígeno Tn utilizando las lectinas provenientes de *Helix pomatia* (HPA, reconoce residuos GalNAc terminales, incluyendo el antígeno Tn) y *Vicia villosa* (VV, reconoce el antígeno Tn), así como el anticuerpo monoclonal anti-Tn 83D4, el cual reconoce el antígeno Tn únicamente cuando se encuentra formando clusters de 2 o más Tn [118]. Como se muestra en la Figura 16, las tres moléculas reconocen la línea tumoral TA3/Ha, mientras que únicamente las lectinas son capaces de unirse a las células Panc02. Estos resultados sugieren que ambas líneas tumorales expresarían el antígeno Tn, pero que éste se encuentra expresado en forma de clústers únicamente en TA3/Ha.

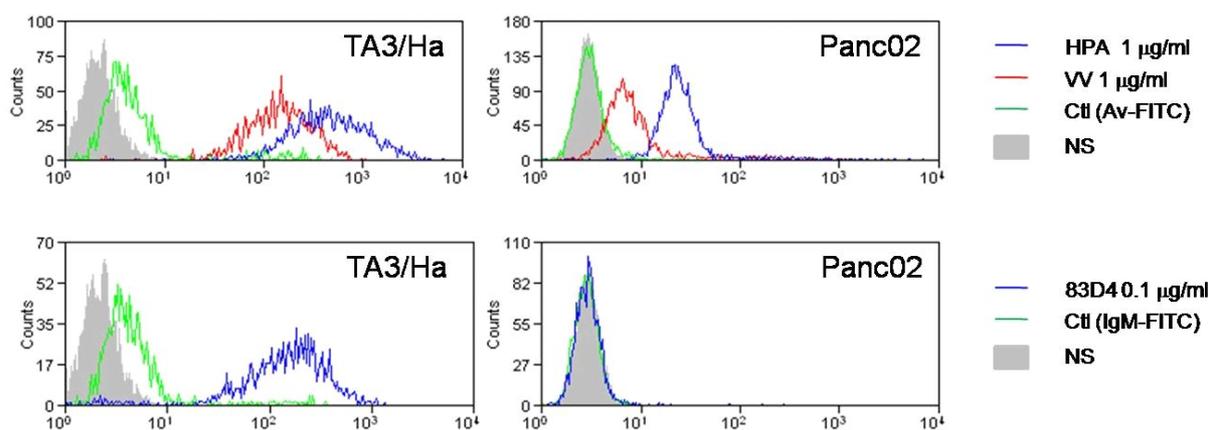


Figura 16. Reconocimiento de las líneas tumorales TA3/Ha y Panc02 por parte de lectinas y anticuerpo monoclonal anti-Tn. Las células tumorales fueron incubadas con las lectinas HPA y VV conjugadas a la biotina, y su unión visualizada tras la incubación con Avidina-FITC. En el caso del anticuerpo monoclonal 83D4, se incubó un anticuerpo anti-IgM de ratón conjugado a FITC. Los resultados fueron analizados por Citometría de Flujo. NS: células sin marcar.

En segundo lugar, y con el objetivo de evaluar el papel de los antígenos C317, EM5 y EM5-2Tn en potenciar la respuesta inmune frente a estos tipos de células tumorales, optimizamos los modelos de desarrollo tumoral para PancO2 y TA3/Ha (Figura 17 A y 17B respectivamente).

En cuanto a la inoculación de células PancO2 cabe destacar que el seguimiento de desarrollo de cáncer se realiza mediante la medición del tamaño del tumor. La evolución del mismo se puede observar en la Figura 17A. En la misma, se puede observar que el crecimiento tumoral es más acelerado en aquellos ratones que fueron inoculados con un millón de células tumorales, mientras que ratones inoculados con 500,000 o 200,000 células tienen crecimiento tumoral similar. El desarrollo tumoral inducido por TA3/Ha se realizó de manera distinta, dado que resulta inviable medir el desarrollo de ascitis en términos de tamaño. Las curvas de supervivencia para este modelo se observan en la Figura 17B.

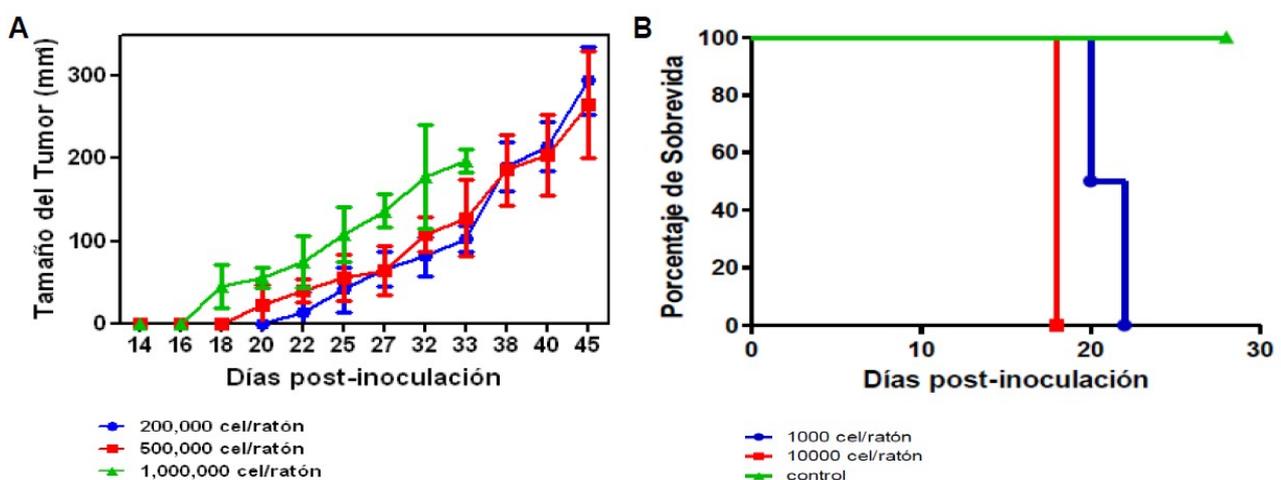
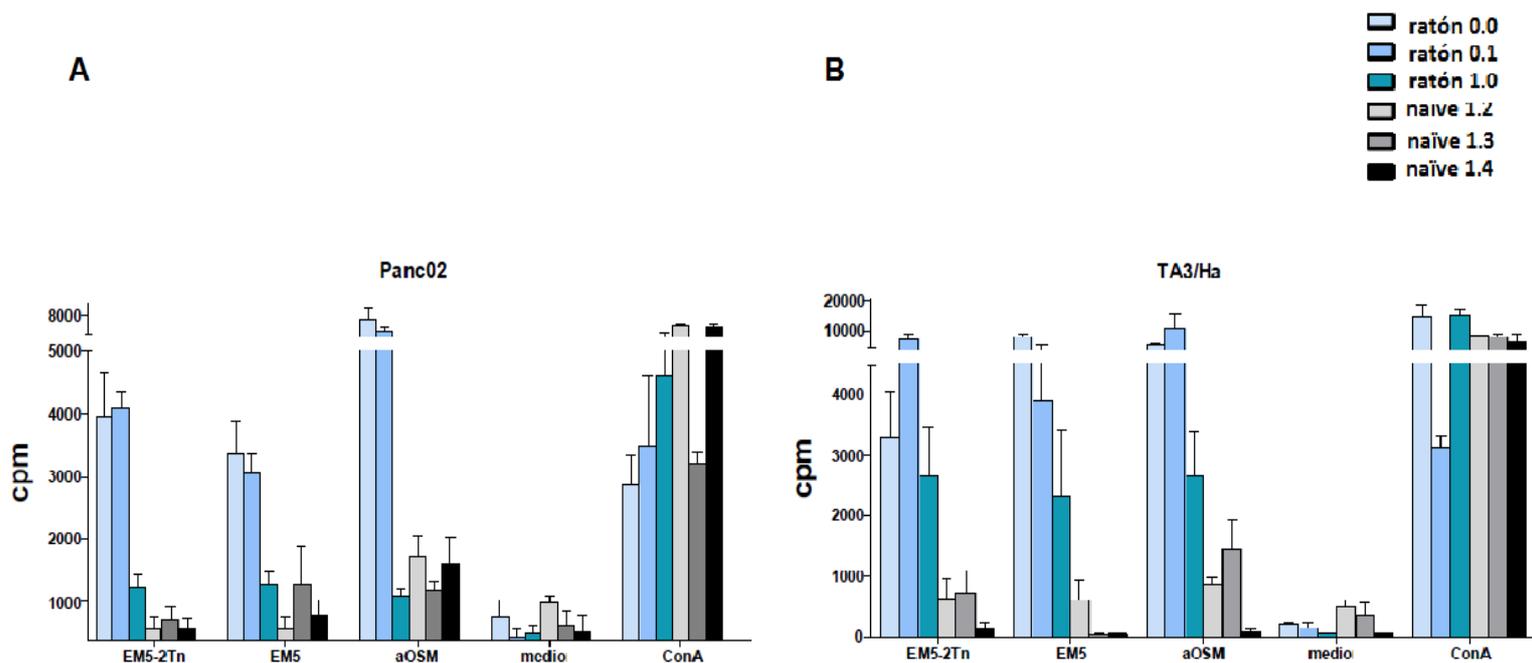


Figura 17. Puesta a punto de modelos tumorales PancO2 y TA3/Ha. A) Crecimiento Tumoral en ratones C57BL/6 inoculados s.c con distintas cantidades de células PancO2. Se midió el tamaño del tumor desarrollado en el sitio del inoculo inicial en el transcurso de los días a partir de la aparición. B) Ratones BALBc inoculados i.p con distintas cantidades de células TA3Ha. Se registró supervivencia en el transcurso del tiempo.

4.2 Análisis del reconocimiento de C317, EM5 y EM5-2Tn por esplenocitos provenientes de ratones con cáncer PancO2 y TA3/Ha: Estudio del reconocimiento de EM5 y EM5-2Tn

La puesta a punto de dichos protocolos permitió estudiar si esplenocitos de ratones en los que se ha inducido cáncer son capaces de reconocer y proliferar en presencia de los antígenos EM5 ó EM5-2Tn . Este experimento permitió estudiar posibles reacciones cruzadas entre los antígenos estudiados y antígenos presentes en las células tumorales. Para ello, ratones que habían desarrollado cáncer mediante inoculación de PancO2 (Figura 18A) ó TA3/Ha (Figura 18B) fueron

sacrificados, y sus esplenocitos fueron re-estimulados en presencia de EM5, EM5-2Tn ó de asialo-OSM (mucina expresando el antígeno Tn). En dos de los tres ratones con cáncer PancO2 la re-estimulación *in vitro* con EM5-2Tn ó EM5 generó la activación y proliferación de esplenocitos (Figura 18A). En relación a los ratones con cáncer inducido por TA3/Ha, la re-estimulación *in vitro* con EM5-2Tn y EM5 generó la proliferación de esplenocitos de los tres ratones evaluados (Figura 18B). En ambos casos (ratones con cáncer PancO2 y TA3Ha), los mismos ratones que respondieron contra los antígenos EM5 y EM5-2Tn, también lo hicieron para el antígeno aOSM y para el control policlonal de proliferación: Concaivalina-A (ConA). Este resultado sugiere la existencia de una respuesta inmune cruzada mediante la cual, esplenocitos provenientes de ratones con cáncer son capaces de reconocer y ser estimulados *in vitro* en presencia de los antígenos EM5 y EM5-2Tn. No se observó proliferación significativa de esplenocitos provenientes de ganglios de ratones vírgenes. Los niveles de citoquinas en el sobrenadante de cultivo también fueron evaluados, observándose una importante producción de INF γ e IL5 tanto para los esplenocitos provenientes de los ratones con cáncer de PancO2 como para TA3/Ha (resultados no mostrados).



4.3 Análisis de la Respuesta Inmune humoral anti-tumoral inducida por EM5, EM5-2Tn y C317

Para evaluar si los anticuerpos desarrollados en ratones C57BL/6 inmunizados con EM5, EM5-2Tn, C317 ó PBS son capaces de reconocer antígenos presentes en las células tumorales PancO2 y TA3/Ha se sensibilizaron placas de ELISA con extractos PancO2 y TA3/Ha, y se utilizaron para evaluar la presencia de anticuerpos IgG e IgM presentes en dichos ratones (Figura 19).

Tanto EM5 como C317 indujeron anticuerpos de tipo IgG que reconocen proteínas presentes en los extractos de células tumorales de PancO2 y TA3/Ha (Figura 19). Sin embargo, este reconocimiento no fue detectado para EM5-2Tn. En ninguno de los casos se detectaron anticuerpos de tipo IgM capaces de reconocer proteínas presentes en los extractos de células tumorales.

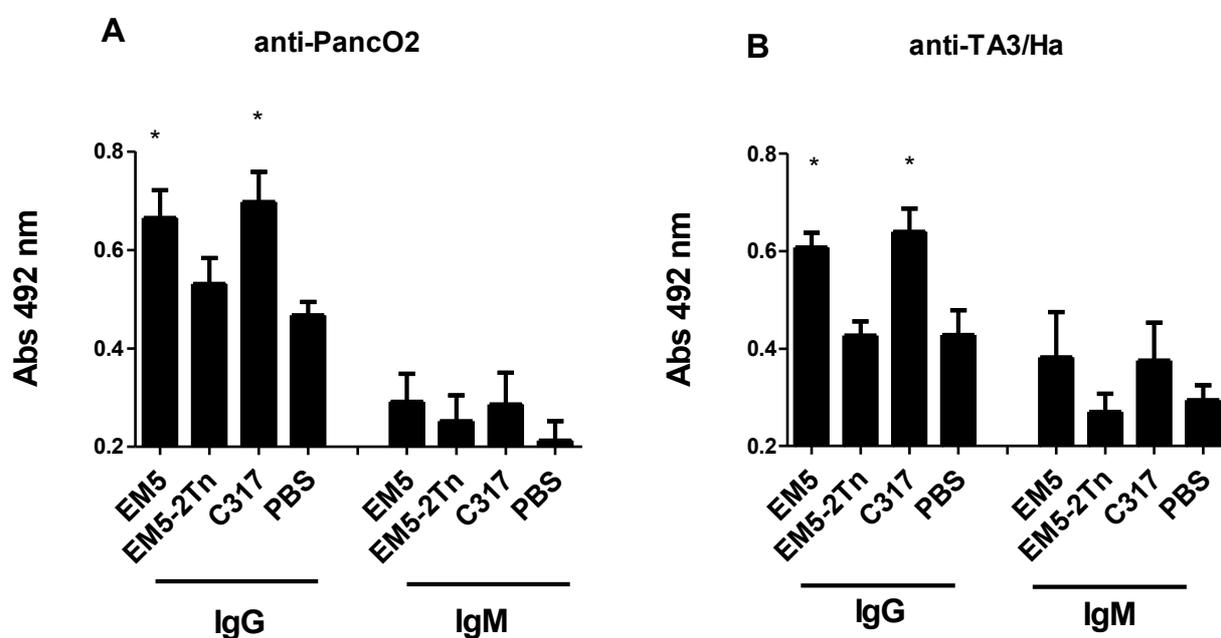


Figura 19. Evaluación del reconocimiento de proteínas de PancO2 o TA3/Ha por parte de anticuerpos presentes en sueros de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn y C317. Sueros de ratones inmunizados 5 veces con 20 μ g de C317, EM5, EM5-2Tn y PBS fueron incubados realizando diluciones seriadas desde 1/100 hasta 1/12800 en placas previamente sensibilizadas con 100 μ g/ml de PancO2 (A) ó TA3Ha (B) . Los asteriscos (*) simbolizan diferencias significativas ($p < 0,01$).

El reconocimiento de antígenos presentes en células tumorales por parte de anticuerpos inducidos tras la inmunización con C317, EM5 y EM5-2Tn también fue evaluado por citometría de flujo (Figura 20). Estos datos demuestran que los sueros de los ratones inmunizados con EM5-2Tn y C317 contienen anticuerpos capaces de reconocer antígenos presentes en la superficie de células

TA3/Ha (Figura 20B). Sin embargo, ninguno de los grupos de sueros reconoció de forma significativa células PancO2 (Figura 20A).

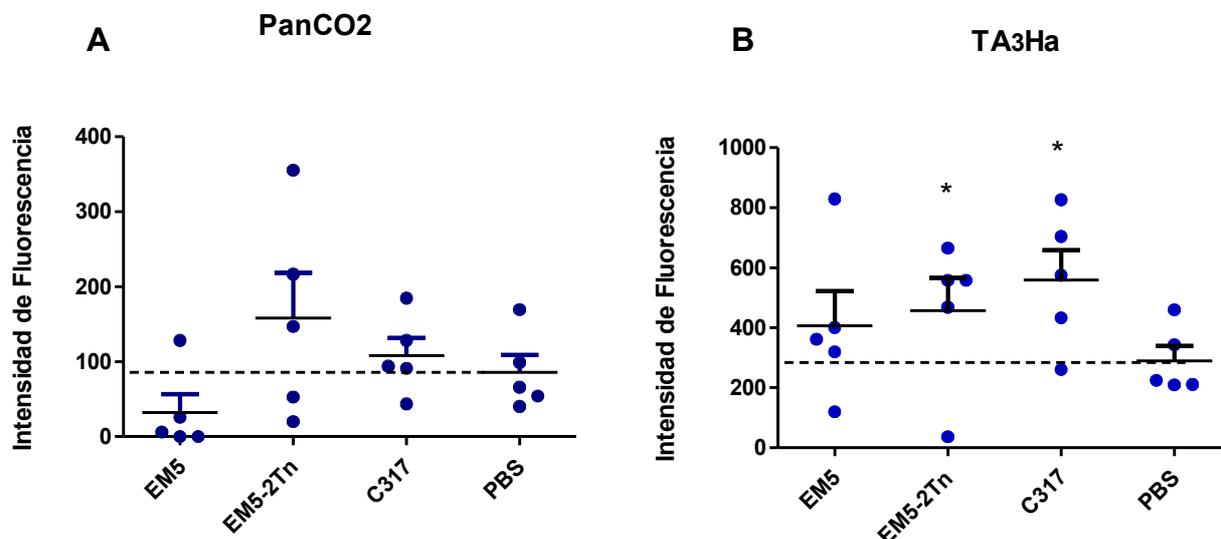


Figura 20. Reconocimiento de Células Tumorales por Anticuerpos presentes en sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con EM5, EM5-2Tn, C317 y PBS. Se inmunizaron ratones C57BL/6 5 veces con 20 μ g de EM5, EM5-2Tn, C317 ó PBS. Las células tumorales PancO2 (A) ó TA3/Ha (B), cultivadas *in vitro*, se incubaron en presencia de sueros individuales de distintos grupos y posteriormente con un anticuerpo anti-ratón conjugado a FITC. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control (PBS).

4.4 Análisis del reconocimiento de antígenos derivados de PancO2 y TA3/Ha por esplenocitos de ratones inmunizados con C317, EM5 y EM5-2Tn

A continuación evaluamos si esplenocitos de ratones inmunizados con los antígenos C317, EM5 ó EM5-2Tn son capaces de reconocer y proliferar al ser re-estimulados *in vitro* con antígenos tumorales. Para ello, esplenocitos extraídos de ratones inmunizados con dichos antígenos fueron re-estimulados en presencia de extractos proteicos de PancO2, TA3/Ha y de una mucina conteniendo el antígeno Tn (aOSM). En la Figura 21 se observan los resultados de dicha proliferación. De manera interesante, dichos esplenocitos proliferaron significativamente al ser re-estimulados con aOSM y TA3/Ha, pero no con PancO2. Se obtuvieron niveles menores de proliferación para esplenocitos de ratones inmunizados con EM5.

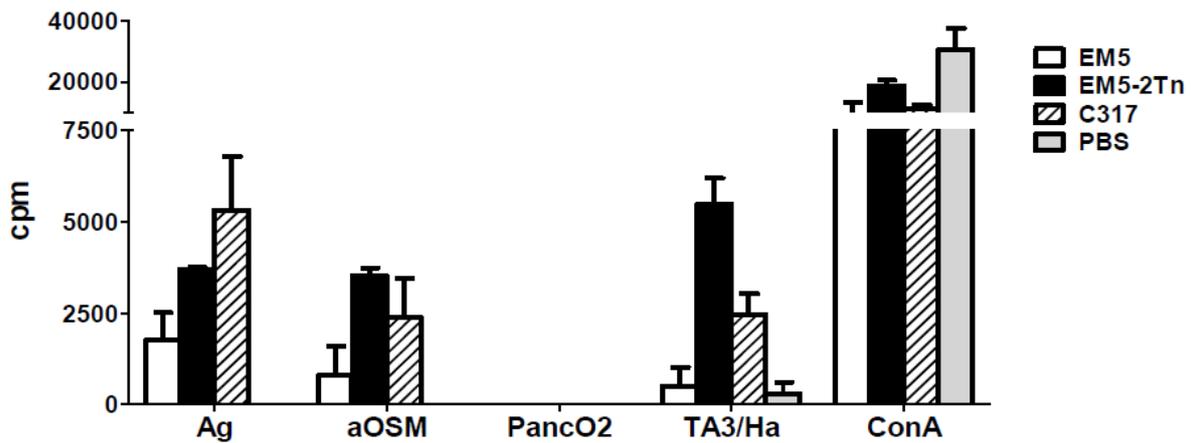


Figura 21. Evaluación del reconocimiento de extractos proteicos de PancO2 y TA3/Ha por esplenocitos obtenidos de ratones C57Bl/c inmunizados con C317, EM5 ó EM5-2Tn. Esplenocitos provenientes de ratones inmunizados i.p con 20 µg de EM5, EM5-2Tn y C317 fueron re-estimulados *in vitro* con extractos proteicos de PancO2 y TA3/Ha, y con aOSM, ó Concaivalina A. Se midió proliferación celular por incorporación de timidina tritiada. “Ag” se refiere a la re-estimulación de los grupos de esplenocitos con el mismo antígeno que se utilizó para la inmunización.

4.5 Estudio de la capacidad citotóxica *in vitro* de esplenocitos de ratones inmunizados con C317, EM5 y EM5-2Tn

Posteriormente, llevamos a cabo ensayos de citotoxicidad celular *in vitro*, para evaluar si esplenocitos de ratones inmunizados con C317, EM5 ó EM5-2Tn eran capaces de eliminar las células tumorales PancO2 y TA3/Ha. En la Figura 22 se observan los resultados obtenidos al incubar los esplenocitos obtenidos de los distintos grupos de ratones (células efectoras) con las células tumorales (células blanco) ya sea PancO2 (Figura 22A) o TA3/Ha (Figura 22B). Las células efectoras y tumorales fueron incubadas en diferentes proporciones y posteriormente se adicionó WST8, reactivo que se une en el espacio extracelular al NADPH generado por las mitocondrias de células vivas lo que genera un cambio colorimétrico. Interesantemente, los esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados con C317, EM5 ó EM5-2Tn fueron capaces de eliminar las células tumorales, PancO2 (Figura 22A) y TA3/Ha (Figura 22B). Cabe destacar que el efecto de citotoxicidad fue observado con esplenocitos de ratones inmunizados con EM5 y con EM5-2Tn, por lo que la capacidad citotóxica inducida tras la inmunización no parece depender de la presencia del antígeno Tn.

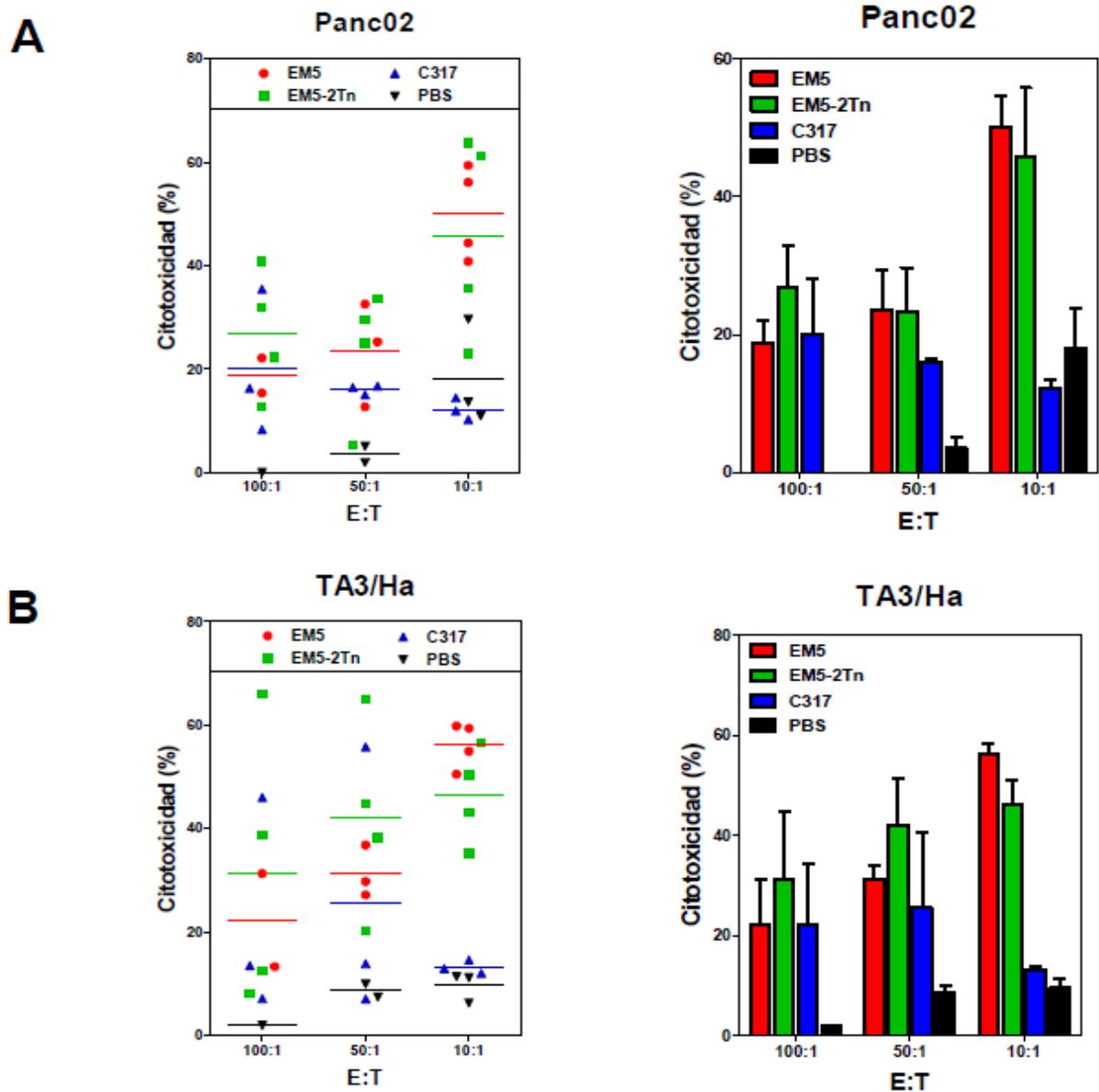


Figura 22. Ensayo de Citotoxicidad Celular *in vitro*. Ratones C57BL/6 (A) ó BALB/c (B) fueron inmunizados con 20 μ g de C317 (azul), EM5 (rojo), EM5-2Tn (verde), ó PBS (negro). Luego de 10 días se extrajeron los bazo y se incubaron los esplenocitos (E) con las células tumorales (T) PancO2 (A) ó TA3/Ha (B) en distintas proporciones por 18 hrs. Al día siguiente se adicionó WST8 y se realizaron mediciones de absorbancia a 650 y a 400 nm. Los valores de citotoxicidad se calcularon empleando la fórmula descrita en Materiales y Métodos.

5 Evaluación de los mecanismos responsables en la respuesta anti-tumoral inducida por EM5, EM5-2Tn y C317

5.1 Células dendríticas

En la sección anterior mostramos resultados que sugieren que EM5, EM5-2Tn o C317 son capaces de inducir, tanto a nivel celular como humoral, respuestas específicas de células tumorales. Una respuesta efectiva contra células tumorales, requiere de la inducción de una respuesta inmune rápida y eficaz que involucra diversos tipos celulares. Las células dendríticas, por ejemplo, son cruciales para proveer los componentes necesarios para iniciar y desarrollar una respuesta inmune efectiva mediada por células [118]. Dichas células se encuentran en diversos tejidos en el cuerpo y capturan y procesan antígenos que son luego presentados en el contexto de moléculas de MHC en la superficie de las mismas [4, 119]. Las moléculas de co-estimulación son sobre-expresadas en las células dendríticas a medida que migran hacia los ganglios linfoides secundarios, donde interactúan con linfocitos T induciendo la activación y proliferación de linfocitos T citotóxicos específicos para el antígeno presentado [4]. Por tanto la relevancia de las células dendríticas en el cáncer, implica diversos procesos inter-relacionados que ocurren en secuencia: a) Presentación y reconocimiento de los antígenos asociados a tumor (TAA) en los tejidos, lo que involucra el clivaje proteolítico intracelular y la presentación de péptidos derivados en la superficie; b) la activación de las células dendríticas y el tráfico hacia ganglio linfáticos drenantes próximos a la región tumoral así como la interacción en los mismos con células TCD4+ vía el TCR y moléculas de co-estimulación asociadas (CD40, CD80 y CD86) lo que resulta eventualmente en la activación y proliferación de linfocitos citotóxicos específicos del antígeno; c) migración de los linfocitos T citotóxicos al sitio del tumor e inducción de la muerte de células tumorales.

Alteraciones en las funciones de las células dendríticas pueden favorecer la prevalencia de las células tumorales y el escape a la inmuno-vigilancia [121]. A modo de ejemplo, se ha demostrado que células dendríticas de pacientes con carcinoma hepato-celular tienen una capacidad disminuida de estimular la proliferación celular de linfocitos T. En dichos pacientes las células dendríticas expresan niveles disminuidos de molécula HLA-DR y de citoquina IL12 [118]. De hecho un mal funcionamiento de las células dendríticas se han observado procesos malignos [118].

Teniendo en cuenta lo antes mencionado y con el objetivo de profundizar en los mecanismos y en la identificación de los actores celulares que están involucrados en mediar dicho efecto, hemos realizado distintos estudios a nivel de células dendríticas y de identificar poblaciones celulares.

5.1.1 Internalización de C317, EM5 y EM5-2Tn por las células dendríticas

Experiencia previa de nuestro grupo de trabajo en ensayos de internalización de mucinas por parte de células dendríticas sugieren un rol importante de receptores dependientes de Ca^{2+} presentes en células dendríticas, en la internalización de algunas mucinas expresando el antígeno Tn. Un ejemplo de dichos receptores, es el receptor MGL [68]. Más específicamente, hemos realizado estudios con un péptido MUC6-Tn, demostrando que su internalización es potenciada en presencia del antígeno Tn. Dicha internalización es inhibida al adicionar EDTA al medio, concluyendo que la internalización de dicho péptido está mediada por un receptor dependiente de Ca^{2+} (Figura 23A). Un candidato receptor dependiente de Ca^{2+} es la lectina tipo galactosa de macrófagos (MGL por su sigla en inglés *macrophage galactose-type lectin*), que reconoce residuos GalNAc terminales [68], y en particular el antígeno Tn y es expresada por las células dendríticas (Figura 23B).

En este sentido, quisimos evaluar si nuestros antígenos de interés son internalizados por las células dendríticas y en particular en nuestro caso si la internalización de EM5-2Tn está mediada por receptores dependientes de Ca^{2+} .

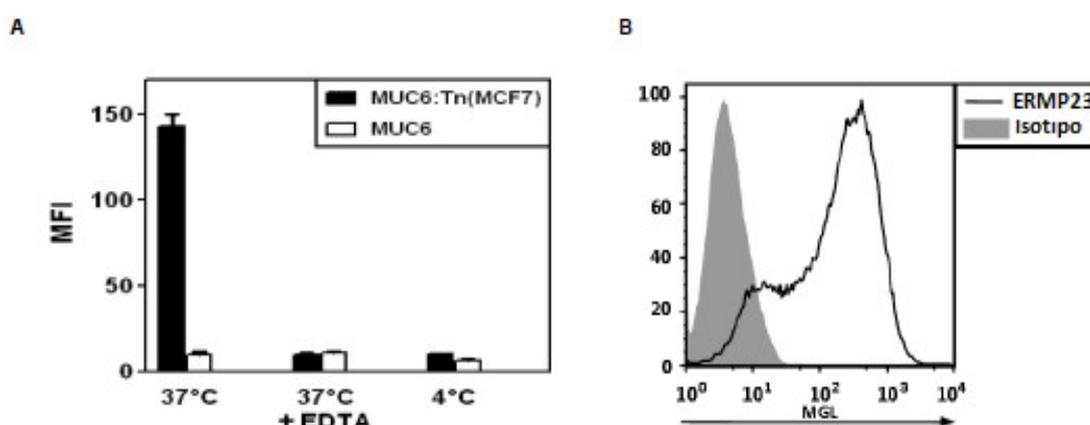


Figura 23. Internalización del glicopéptido MUC6-Tn mediada por MGL. A) Antígenos MUC6 (barras blancas) y MUC6-Tn (barras negras) fueron conjugados a Alexa647. Se dispensaron 50 μl de $0,5 \times 10^6$ BMDCs por pocillos y se adicionaron 50 μl de antígenos de manera que la concentración final fue 10 μM . Se incubaron por 1 hr a 37°C ó 4°C (control) en presencia de 10 mM EDTA. Las células dendríticas se incubaron con anticuerpos anti-CD11c conjugado a FITC. B) Se evaluó presencia de MGL en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal de unión a MGL (ERMP23) (línea negra) ó un isotipo (relleno gris).

Para ello se generaron células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC, por su sigla en inglés *Bone Marrow Derived Dendritic Cells*) sobre las cuales se evaluó la internalización de los antígenos EM5, EM5-2Tn y C317. En la Figura 24 se observan los resultados obtenidos para los antígenos

C317-ATTO₆₄₇, EM5- ATTO₆₄₇ y EM5-2Tn-ATTO₆₄₇. Todos los antígenos fueron internalizados por las células dendríticas (barras negras). La adición de EDTA en el medio no generó cambios significativos en la internalización de los antígenos (barras cuadriculadas) por lo que la misma no parece estar mediada por receptores dependientes de Ca²⁺. Cabe destacar que tampoco se encontraron diferencias significativas entre el péptido EM5 y EM5-2Tn probablemente debido a que los antígenos no son internalizados a través de receptores específicos para la porción carbohidrata. La internalización de los distintos antígenos también fue evaluada por microscopía confocal con el objetivo de confirmar si efectivamente el péptido se encontraba en el interior celular. En la Figura 25 se observan los resultados obtenidos para la internalización antigénica evaluada por microscopía confocal. En la misma se observa que las marcaciones correspondientes a EM5, EM5-2Tn y C317 colocan (Merge puntos de coloración violeta) con la marcación correspondiente a la marcación de LAMP-1, así como con la de IAb (MHC II) probablemente debido a una localización en compartimentos endosomales de dichos antígenos. De estos resultados concluimos que los tres péptidos son internalizados de forma similar por las células dendríticas.

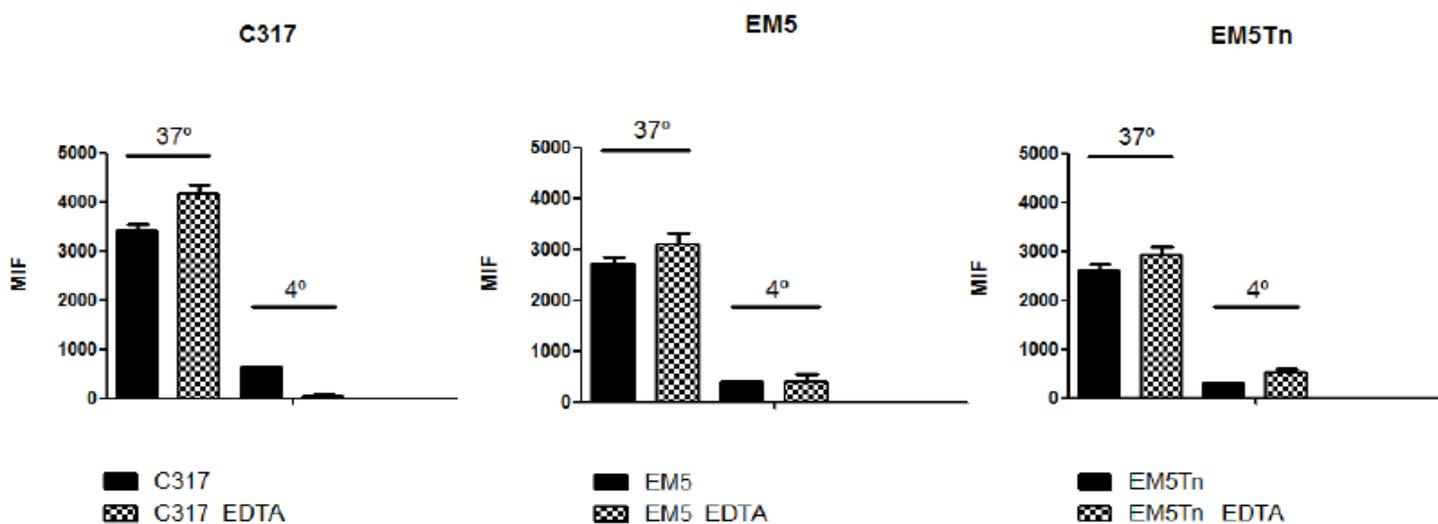


Figura 24. Ensayo de Internalización de EM5, EM5-2Tn y C317 por células dendríticas evaluado por Citometría de Flujo. Los antígenos C317, EM5 y EM5-2Tn fueron conjugados con el fluorocromo ATTO₆₄₇. Se dispensaron 50 µl de 0,5x10⁶ BMDCs por pocillo y se adicionaron 50 µl de antígenos de manera que la concentración final se 10 µM. Se incubaron por 1 hora a 37°C o 4°C (control) en ausencia (barras negras) ó presencia de 50 µM EDTA (barras cuadriculadas). Las células dendríticas se incubaron con anticuerpos anti-CD11c conjugado a FITC y fueron, posteriormente evaluadas por Citometría de Flujo.

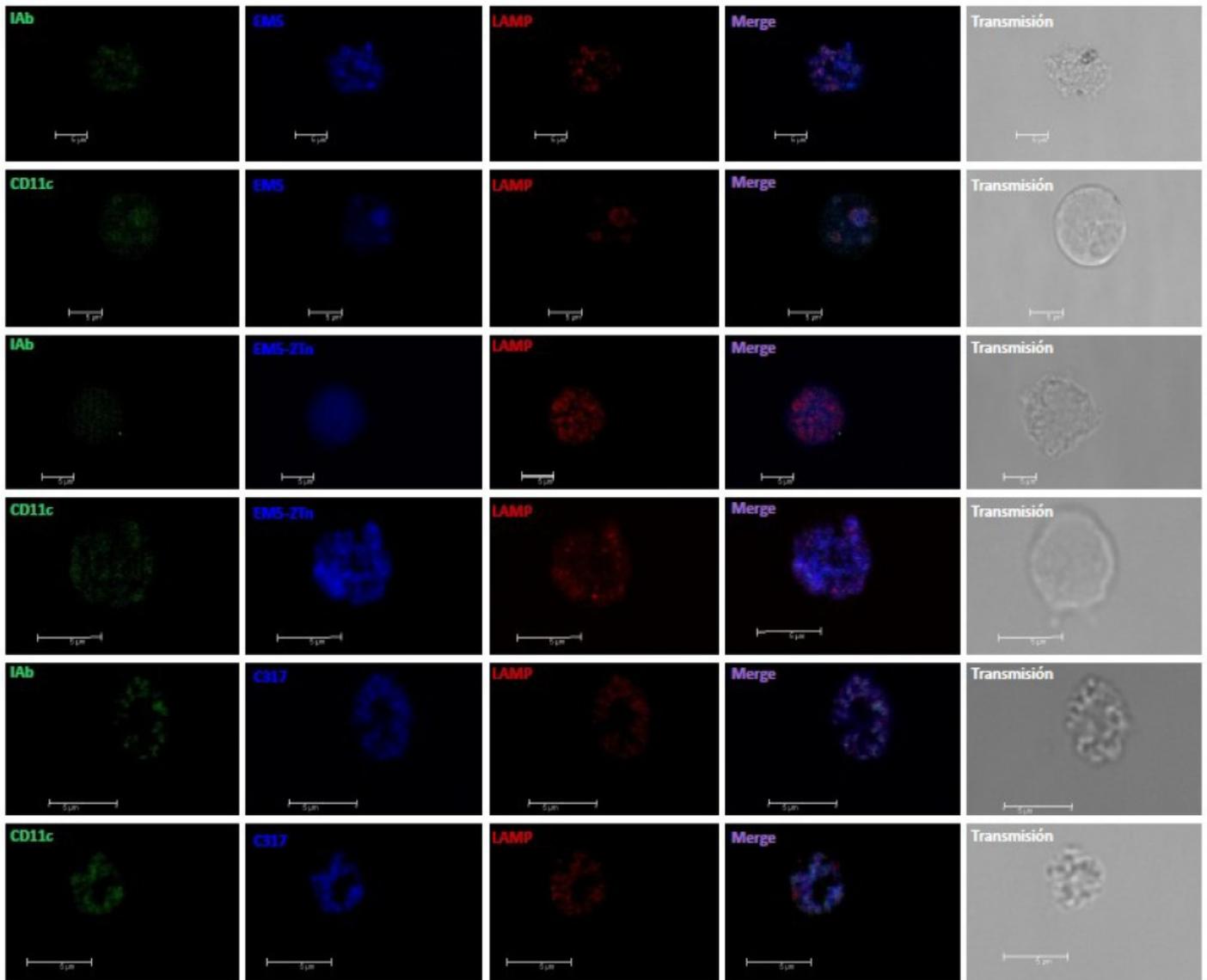


Figura 25. Ensayo de Internalización de EM5, EM5-2Tn y C317 por células dendríticas evaluado por Microscopía Confocal. Los antígenos fueron conjugados con el fluorocromo ATTO647 (azul). Se dispensaron 50 μl de $0,5 \times 10^6$ células por pocillo y se adicionaron 50 μl de antígenos de manera que la concentración final de 10 μM . Se incubaron por 1 hora a 37°C o 4°C (control). Las células dendríticas fueron teñidas con anticuerpos anti-CD11c conjugado a FITC (verde), anti-lamp (primario y secundario conjugado a Rhodamina, en rojo) y anti-IAb conjugado a FITC (verde) y posteriormente evaluadas por Microscopia Confocal.

5.1.2 Estudio del efecto de EM5, EM5-2Tn y C317 en la maduración de células dendríticas

Una vez evaluada la internalización de los antígenos por las células dendríticas procedimos a evaluar si una vez internalizados, dichos antígenos inducían o modulaban de alguna manera el proceso de maduración de las células dendríticas. Células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC) fueron cultivadas con los distintos antígenos en presencia o ausencia de agonistas de receptores TLRs capaces de inducir la activación y maduración de células dendríticas.

Una vez transcurridas 24 horas se cosecharon las células y se incubaron con anticuerpos

específicos contra moléculas de co-estimulación, marcadoras de activación y maduración de células dendríticas: CD40, CD80, CD86 e IAb.

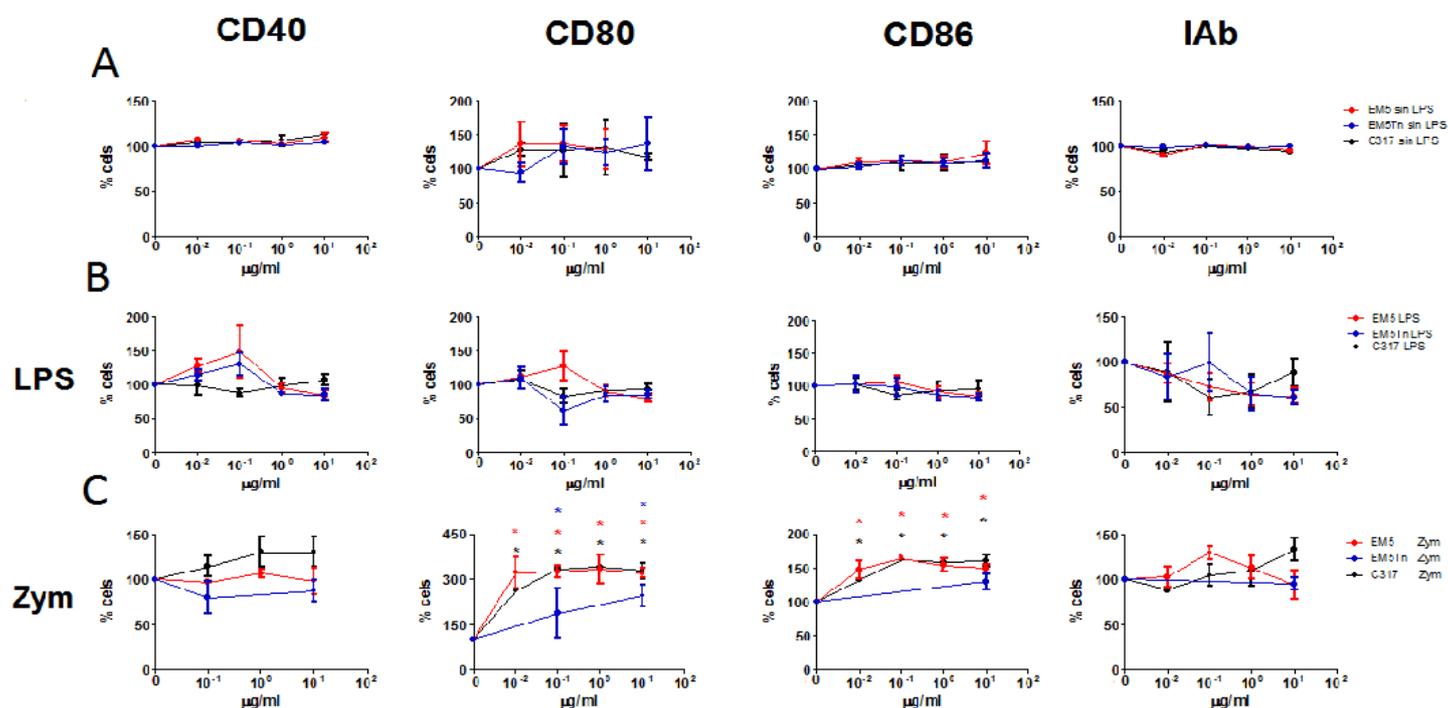


Figura 26. Expresión de moléculas de co-estimulación en BMDC cultivadas con C317, EM5 y EM5-2Tn en presencia ó ausencia de agonistas de TLR. Ensayo de maduración de células dendríticas evaluado por Citometría de Flujo. Moléculas de co-estimulación expresadas en porcentajes, siendo 100% las células incubadas con agonista de TLR sin antígenos. Células derivadas de la médula ósea con 0,5% GM-CSF fueron incubadas por 24 horas con distintas concentraciones de antígenos EM5, EM5-2Tn y C317 en ausencia de agonistas de TLR (A) y en presencia de 1 µg/ml LPS (B) ó 25 µg/ml zymozan (C). Finalizada la incubación se tiñeron las células utilizando anticuerpos que reconocen CD40, CD80, CD86 y IAb y CD11c. Los niveles de expresión de dichas moléculas se evaluaron por Citometría de Flujo en células CD11c⁺ positivas. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al valor % cells obtenido en ausencia de antígeno.

En la Figura 26 se observan los porcentajes de células dendríticas que expresan las moléculas de co-estimulación en función de las diferentes concentraciones de los antígenos de interés (EM5, EM5-2Tn, C317). Cuando se utilizó un agonista de TLR como ser zymosan, se observó un aumento significativo en la expresión de las moléculas CD80 y CD86 dependiente de la concentración de antígenos EM5, EM5-2Tn y C317 (Figura 26C). Sin embargo, en ausencia de ligandos de TLR ó en presencia del agonista de TLR LPS, no observamos variación en la expresión de las moléculas de co-estimulación evaluadas cuando las BMDCs fueron incubadas con las diferentes concentraciones de

EM5, EM5-2Tn y C317 (Figura 26B).

Los sobrenadantes de los cultivos de células dendríticas con los antígenos EM5, EM5-2Tn y C317 en presencia ó ausencia de agonistas de TLRs fueron colectados con el objetivo de estudiar el perfil de citoquinas producidas por las células dendríticas. En la Figura 27 se observan la expresión de citoquinas IL6, IL10 e IL12 en presencia de lo concentraciones crecientes de antígenos EM5, EM5-2Tn y C317, a su vez en ausencia (Figura 27A) o presencia de ligandos de TLR (27B y 27C). El perfil de citoquinas evaluado para la maduración en presencia de LPS muestra un aumento significativo de IL6 e IL12 de forma dosis dependiente. El perfil de citoquinas evaluado para la maduración en presencia de zymozan no muestra cambios significativos al adicionar diferentes concentraciones de antígenos evaluados.

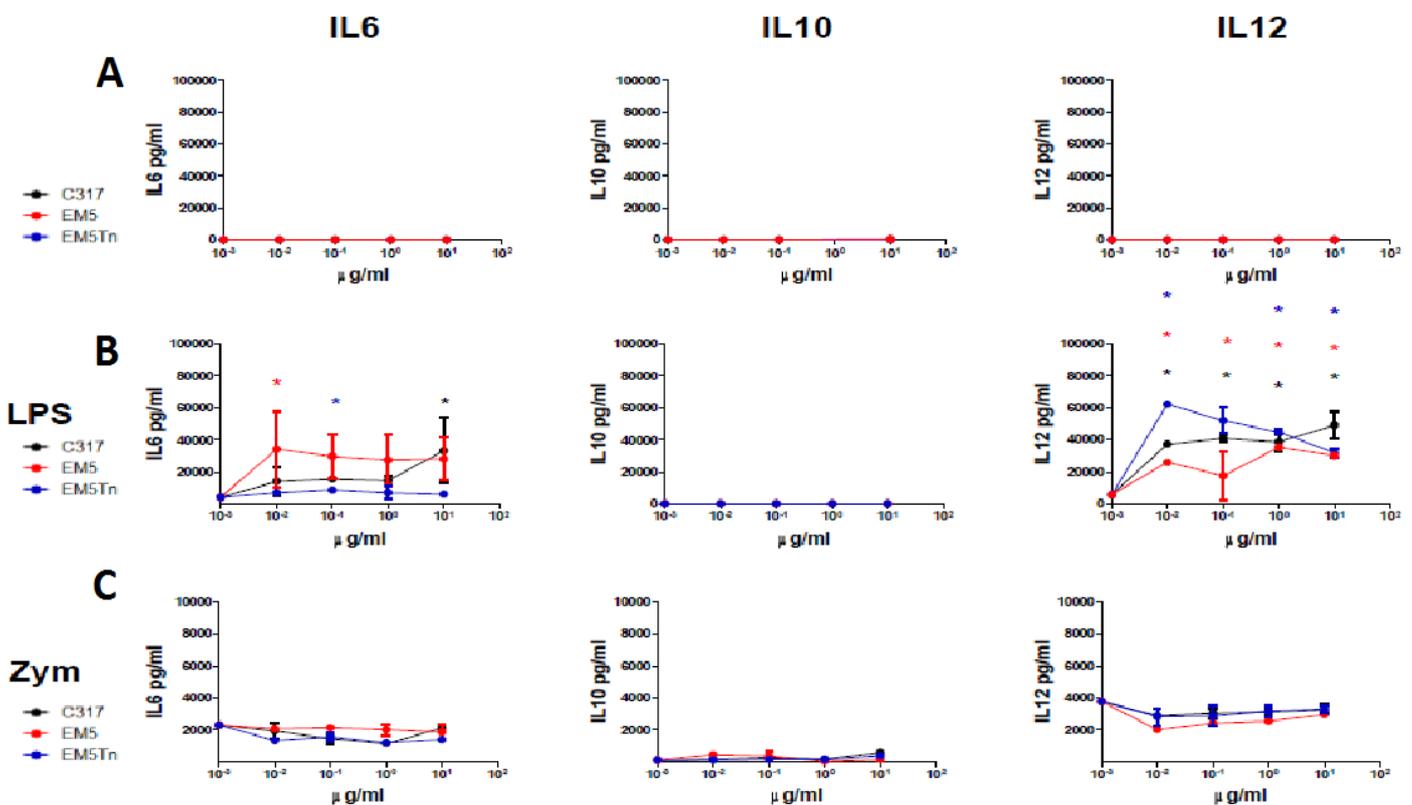


Figura 27. Expresión de citoquinas producidas por células dendríticas incubadas con EM5, EM5-2Tn y C317 presencia ó ausencia de ligandos de TLR. Niveles de citoquinas expresadas en función de concentraciones crecientes de antígenos EM5, EM5-2Tn y C317. Células derivadas de la médula ósea diferenciadas en presencia de 0,5% GM-CSF fueron incubadas por 24 hrs a 37° C con e distintas concentraciones de antígenos EM5, EM5-2Tn y C317 en ausencia (A) o presencia de LPS (1 μg/ml) (B) ó zymozan (25 μg/ml) (C). Posteriormente, se colectaron los sobrenadantes para evaluar IL6, IL10, IL12 por ELISA. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al valor obtenido en ausencia de antígeno.

Sin embargo, la producción de citoquinas no se vió afectada al agregar diferentes concentraciones de antígenos en ausencia de agonistas de TLR o en presencia de zimosan (Figura 27).

6. Estudio de Poblaciones Celulares en ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn y C317

El efecto citotóxico sobre células tumorales de esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn y C317 (Figura 22), así como la obtención de una respuesta inmunitaria que reconoce células tumorales (Figura 18) sugiere que dichos antígenos poseen un rol importante en potenciar la respuesta inmune y en estimular el reconocimiento y la eliminación de células tumorales. Con el objetivo de identificar los posibles actores celulares que median dicho efecto llevamos a cabo un estudio de las poblaciones celulares en esplenocitos de ratones inmunizados con los antígenos de interés. En la Figura 28 y 29 se observan las poblaciones celulares identificadas por marcadores de superficie tal como se detalla en materiales y métodos.

En cuanto a las poblaciones celulares de tipo mieloide se observó que las poblaciones celulares correspondiente a las $Ly6G^+ Ly6C^+/CD11b^+$ se encuentra enriquecida en el grupo de ratones inmunizados con EM5-2Tn (barras rayadas) con respecto al control (Figura 28).

El resto de las poblaciones de tipo mieloide estudiadas ($CD11c^+$; $Ly6G^+ Ly6C^+/CD11b^+$; $Ly6G^- Ly6C^+/CD11b^+$; $CD11b^{int}F480^+$) no mostró cambios significativos respecto al control (Figura 28).

Por otro lado, no encontramos diferencias en los niveles de poblaciones linfocitarias evaluadas (linfocitos B, TCD4, TCD8 y NK) (Figura 29A). Sin embargo, las diferencias fueron encontradas al utilizar marcadores de linfocitos efectores ó activados (Figura 29B). Se observó un incremento significativo de las poblaciones $CD62L^+ CD19^+$, $CD62L^+/ CD4^+/CD3^+$, $CD62L^+/ CD8^+/CD3^+$, $CD62L^+/ CD4^+/CD8^+/CD3^+$ y $CD69^+/ NK1.1^+/ CD49b^+$ en esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con EM5 (barras gris claro) con respecto al control (Figura 29B). De manera interesante, la población $CD69^+/ NK1.1^+/ CD49b^+$ correspondiente a células Natural Killer (NK) activadas se vió aumentada en esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con los (Figura 29B).

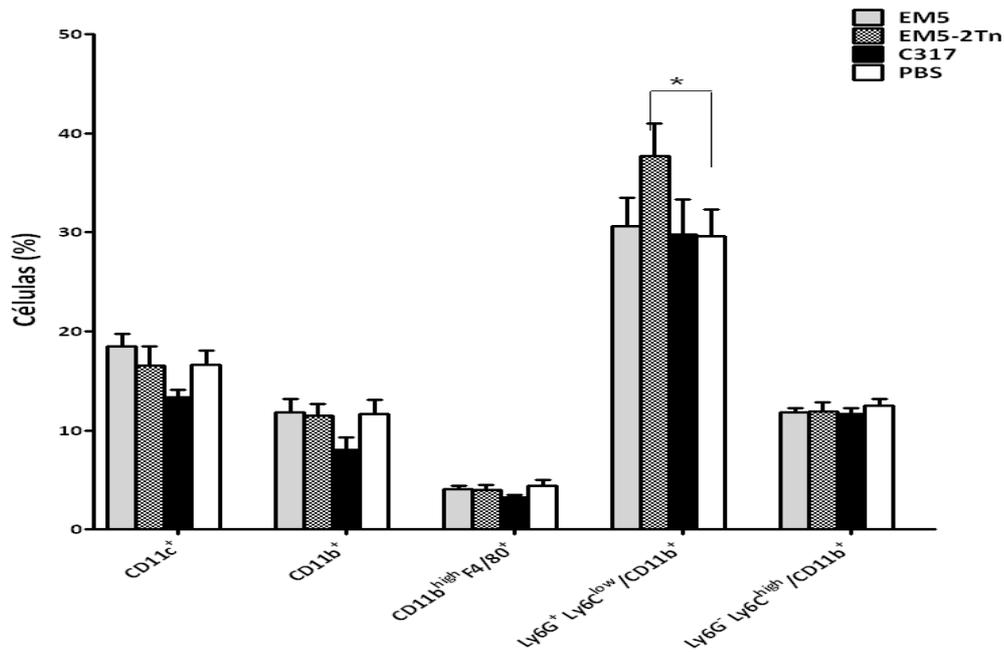


Figura 28. Poblaciones de tipo Mieloide Celulares de ratones C57BL/6 inmunizados con C317, EM5, EM5-2Tn y PBS. Ratones Inmunizados 5 veces con 20 µg de C317 (negro), EM5 (gris), EM5-2Tn (punteado) y PBS (blanco). Los ratones fueron sacrificados y los esplenocitos extraídos e incubados con anticuerpos específicos de moléculas características de diversas poblaciones celulares como se detalló en materiales y métodos. Posteriormente fueron analizados por citometría de flujo.

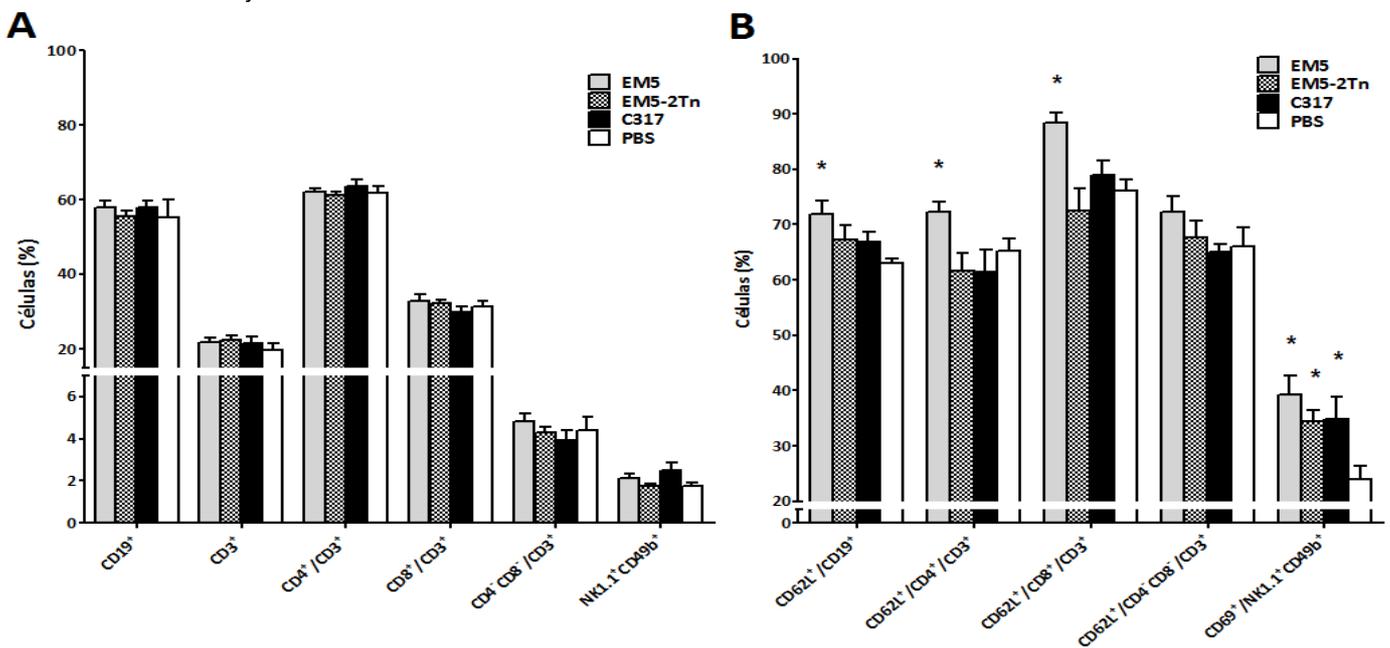


Figura 29. Poblaciones Celulares linfocitarias de ratones C57BL/6 inmunizados con C317, EM5, EM5-2Tn y PBS. Ratones Inmunizados i.p, 4 veces con 20 µg de C317(negro), EM5 (gris), EM5-2Tn (punteado) y PBS (blanco). Los ratones fueron sacrificados y los esplenocitos extraídos y teñidos con anticuerpos específicos de moléculas características de diversas poblaciones celulares como se detalló materiales y métodos. Posteriormente fueron analizados por citometría de flujo. (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control (PBS).

Discusión

1 Obtención de péptidos C317 presentando el antígeno Tn

El primer objetivo planteado en el contexto de este trabajo de Maestría fue la obtención de péptidos C317 presentando el antígeno Tn. Para ellos nos propusimos expresar la proteína de forma recombinante en *E. Coli*. El proceso de optimización de las condiciones de expresión de C317 consistió en evaluar diferentes temperaturas, tiempos de incubación, diferentes cepas bacterianas y concentraciones de IPTG. Si bien el exhaustivo análisis de un gran número de clones, así como el uso de condiciones óptimas de expresión, nos permitió expresar la proteína C317, no se logró obtener cantidades significativas de la misma. Las dificultades en la sobre-expresión de C317 podrían deberse a la secuencia misma. Tal como describimos en la introducción, dicha proteína presenta una región C-terminal que contiene varios residuos hidrofóbicos. En particular, la proteína C317 tiene una región central hidrofóbica importante a partir del aminoácido 57 al 76 según dos algoritmos predictores de hidrofobicidad (Figura 29).

Las proteínas con parches hidrofóbicos pueden sufrir un “colapso hidrofóbico” durante su síntesis, haciendo difícil la expresión de las mismas en sistemas heterólogos. Cuando estas proteínas son expresadas en *E. Coli* tienden a formar cuerpos de inclusión y se requieren de varios pasos adicionales para poder obtener la proteína. Usualmente se utilizan marcadores de fusión (“fusion tags”) para ayudar a solubilizar este tipo de proteínas, que son escindidos en etapas posteriores de la purificación [122].

Una estrategia alternativa que vale la pena evaluar, comprende la expresión de la proteína careciendo de la secuencia correspondiente al péptido señal, el cual podría estar involucrado en dirigir la proteína a regiones de alta hidrofobicidad.

Paralelamente a la producción recombinante de la proteína C317r trabajamos sobre la identificación de las porciones inmunodominantes de la proteína, utilizando un constructo peptídico sintetizado químicamente en un sintetizador de péptidos automático (C317s) (Chimie de Biomolécules, Institut Pasteur Paris). El objetivo principal de esta estrategia comprendió la determinación de secuencias pequeñas, inmunogénicas, posibles de O-glicosilar con residuos GalNAc y de adquirir comercialmente más fácilmente.

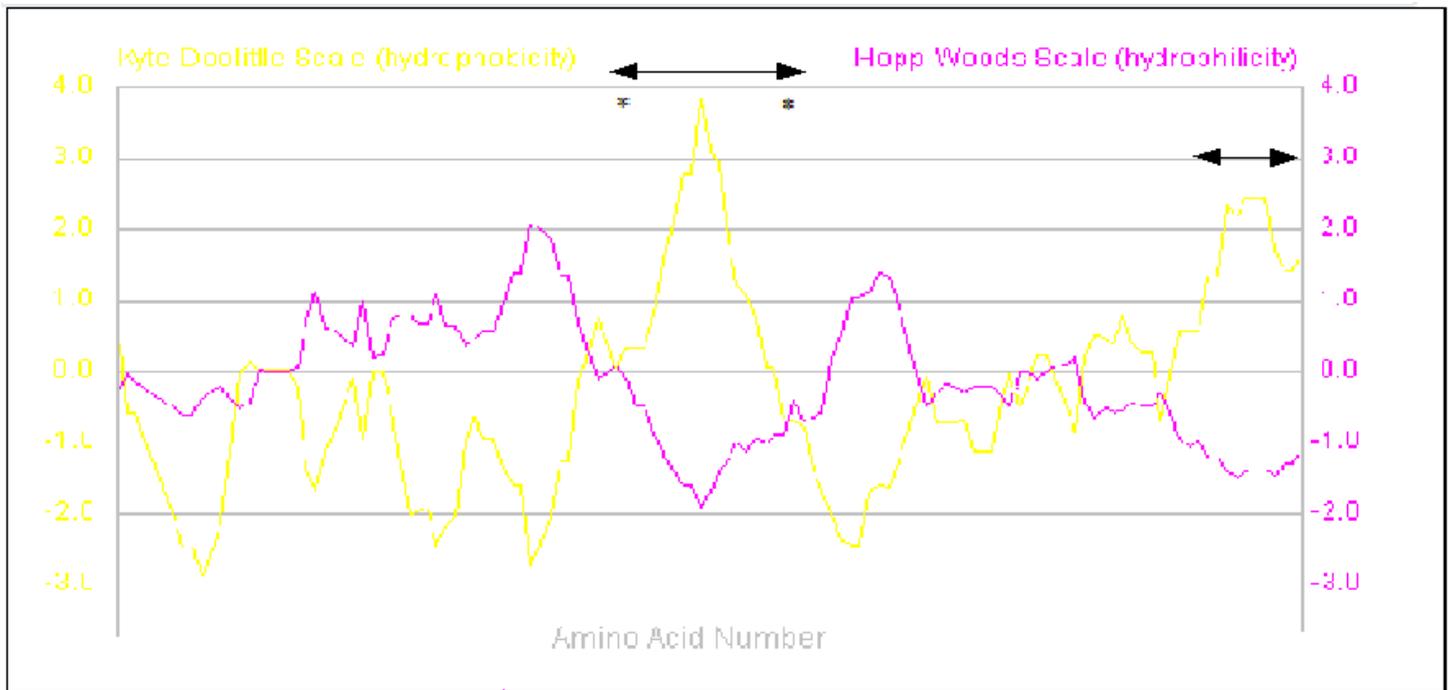


Figura 29. Predicciones de la hidrofobicidad de C317r según los algoritmos de Kyte-Doolittle (amarillo) y de Hopp-Woods (rosado). Para el primero los valores por encima de cero corresponden a aminoácidos de carácter hidrofóbico, mientras que para el algoritmo de Hopp-Woods los valores por encima de cero indican regiones hidrofílicas. Los aminoácidos de mayor hidrofobicidad se encuentran entre los aminoácidos 57 a 76 y 118 a 130. Las simulaciones de hidrofobicidad utilizando ambos algoritmos fueron realizadas on line (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/index.html>).

Primeramente, procedimos a glicosilar *in vitro* la C317, utilizando ppGalNAc-Ts recombinantes. Dicho método, ha sido exitoso en la generación de proteínas tipo mucina presentando el antígeno Tn [117]. Sin embargo, y a pesar de que el sistema de glicosilación fue efectivo en varios sustratos peptídicos (péptidos, mucinas de-glicosiladas), no logramos evidenciar glicosilación de C317s por ninguno de los dos métodos de detección diferentes que hemos realizado (HPLC y ELISA).

Los altos niveles de hidrofobicidad en proteínas pueden generar que las mismas se aglutinen. Dadas las características hidrofóbicas de la C317, es posible que los bajos niveles de glicosilación pueden deberse en gran medida a la dificultad en el acceso de las ppGalNAc-Ts a los sitios de *O*-glicosilación que estarían ocultos en el caso de que la proteína este aglutinada.

Posteriormente, y dada la imposibilidad de obtener C317-Tn, procedimos a la evaluación de las regiones inmuno-dominantes de C317 por mapeo peptídico.

El mapeo peptídico de una proteína es una estrategia experimental que permite evaluar para determinada cepa de ratones, qué regiones de la misma son responsables de la inducción de la respuesta inmune. Esto se basa en el hecho de que una vez realizado el procesamiento antigénico dentro de la célula presentadora, ésta presentará péptidos asociados a moléculas de MHC que activarán una determinada población de linfocitos T cuyo TCR tenga alta especificidad por el péptido .

Luego de comprobar la inmunogenicidad de la proteína, identificamos una región inmuno-dominante en ratones C57BL/6 contenida probablemente en la región central del péptido EM5. Por otro lado, identificamos dos porciones dominantes en ratones BALB/c. El hecho de que tanto el péptido EM5 como el EM6 fueron capaces de re-estimular *in vitro* células de ganglios drenantes previamente activadas *in vivo* con la proteína C317, sugiere que la porción inmunodominante corresponde al menos a la secuencia común entre ellos (PSTPLHAITS).

La segunda región inmuno-dominante estaría situada en los 10 aminoácidos del extremo N-terminal del péptido EM3, como sugiere la identificación aislada de dicho péptido (LTTVAKATSQ). Las variaciones en las secuencias inmuno-dominantes entre diferentes cepas de ratones, son esperables ya que los haplotipos MHC presentes en cada una de ellas varían. Mientras que los ratones C57BL/c presentan el haplotipo H_2IA^{-b} , los BALB/c presentan la variante H_2IA^{-d} y H_2IE^{-d} [124].

Teniendo en cuenta estos resultados, seleccionamos el péptido EM5 para posteriores análisis. Dicho péptido posee 6 sitios potenciales de glicosilación (MSLLSPSTPLHAITS) y no es de carácter hidrofóbico tal como se observa en la Figura 30. Llevamos a cabo la glicosilación *in vitro* del péptido EM5 utilizando diferentes ppGalNAc-Ts recombinantes. Sin embargo, se observó degradación de los péptidos por los componentes de la mezcla de reacción, la cual no fue evitada ni siquiera en presencia de inhibidores de proteasas. Por lo tanto, y dado que el laboratorio tiene una colaboración establecida con el laboratorio de Chimie de Biomolécules en el Institut Pasteur de Paris, resolvimos generar un glico-péptido conteniendo dos residuos de GalNAcs. De todas maneras queda dentro de las perspectivas de este trabajo, profundizar en la glicosilación *in vitro* del péptido EM5 mediante unión a matrices de modo de facilitar la exposición de los sitios potenciales de O-glicosilación, así como la utilización de ppGalNAc-Ts puras.

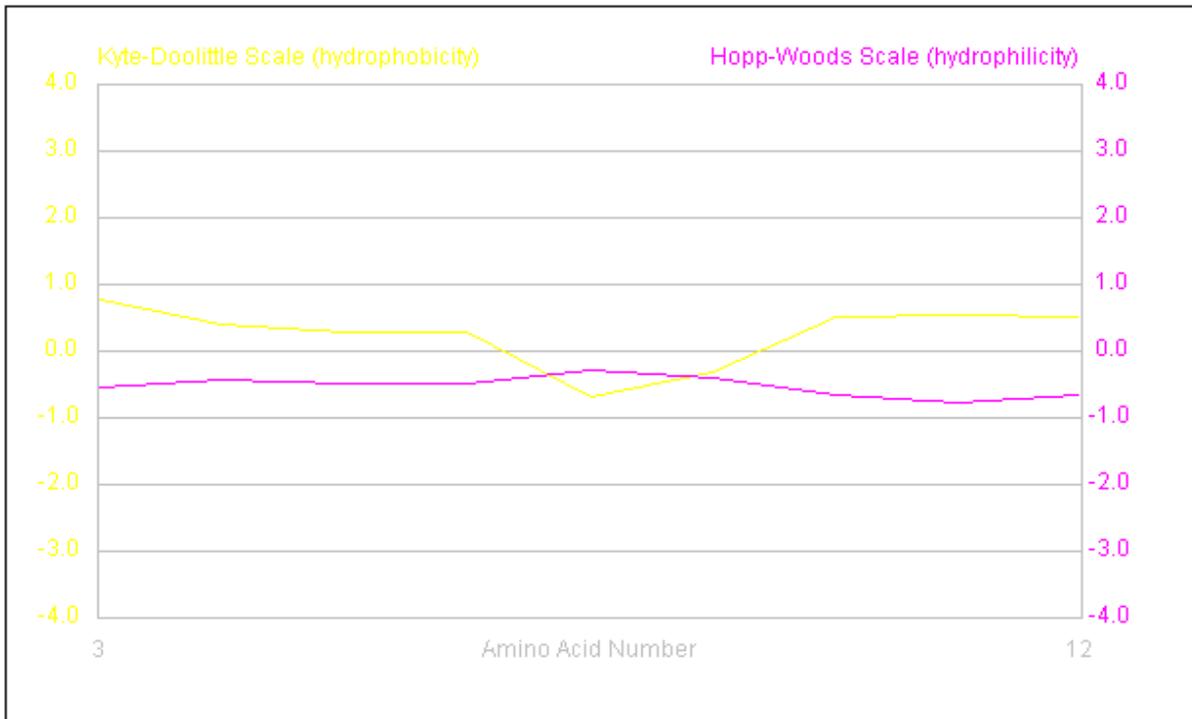


Figura 30. Predicción de la hidrofobicidad del péptido EM5, según los algoritmos de Kyte-Doolittle (amarillo) y el de Hopp-Woods (rosado). Para el primero los valores por encima de cero corresponden a aminoácidos de carácter hidrofóbico, mientras que para el algoritmo de Hopp-Woods los valores por encima de cero indican regiones hidrofílicas. Ambos algoritmos indican que no existen en el péptido regiones de gran hidrofobicidad.

2 Evaluación de la Respuesta Inmunitaria inducida por C317, EM5 y EM5-2Tn

El siguiente objetivo del presente trabajo consistió en estudiar el tipo de respuesta inmunitaria inducida por los péptidos y glicopéptido obtenidos. En este sentido, hemos estudiado la respuesta celular y humoral inducida por los péptidos C317, EM5, y EM5-2Tn. Todas las inmunizaciones fueron llevadas a cabo utilizando adyuvante de Freund como complemento ya que el otro adyuvante evaluado, hidróxido de Aluminio, no genera respuestas considerables. Si bien el adyuvante CFA puede utilizarse en ensayos experimentales con animales utiliza como adyuvante en la inmunización humana, por lo que está entre las perspectivas de este trabajo, evaluar otros adyuvantes combinados con agonistas de TLR que permitan una eventual extrapolación a la inmunización en humanos (Hidróxido de Aluminio con CpG) [125]. Sin embargo, el adyuvante de Freund es uno de los más utilizados a nivel experimental [4].

En cuanto al tipo de respuesta celular inducida por los péptidos C317, EM5 y EM5-2Tn hemos observado que todos ellos indujeron la proliferación de esplenocitos previamente activados *in vivo*

de forma dosis-dependiente. Además, esta proliferación celular estuvo acompañada de la producción de INF γ evidenciando preferentemente una respuesta celular tipo Th1.

Por otro lado, detectamos cruzada entre los péptidos C317 y EM5 ya que células de ganglios drenantes de ratones inmunizados con C317, mostraron altos niveles producción de INF γ , al ser re-estimulados con EM5 y viceversa (Figura 14). Dicha reactividad cruzada entre C317 y EM5 se puede explicar por el hecho de que la secuencia de EM5 se encuentra dentro de la de C317 y porque es la región inmunodominante de la misma.

Un resultado llamativo consistió en que la presencia de los dos residuos de GalNAc en EM5-2Tn enmascara el epítipo T de C317 (conteniendo en la secuencia EM5-2Tn). En efecto, esplenocitos activados *in vivo* con EM5-2Tn, no son re-estimulados *in vitro* por los péptidos no glicosilados, y viceversa. Ya se ha reportado previamente que los azúcares unidos a péptidos enmascaran epitopes T. Incluso se ha observado que determinadas modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, glicosilación y metilación, conducen a la generación de neo-epitopes [123, 125]. Aparentemente, esta sería la situación para el caso del glicopéptido EM5-2Tn.

Cabe destacar que no se observaron niveles importantes de producción de IL5 cuando fueron re-estimuladas las células de los ganglios drenantes de los diferentes grupos de ratones. La producción de IL17 tampoco fue importante, excepto para el grupo de ratones inmunizados con EM5-2Tn cuyas células de ganglio drenante fueron re-estimuladas con EM5-2Tn. En este sentido resulta interesante destacar resultados publicados recientemente que demuestra que la glicosilación de un péptido tipo mucina MUC6 con el antígeno Tn (MUC6:Tn) afecta de manera importante la inmunogenicidad del mismo, y abroga la respuesta Th1 generada por MUC6 y promueve una respuesta de tipo Th17 [117].

En términos generales observamos que en estas condiciones experimentales el tipo de respuesta T generada se asemeja a una respuesta T de tipo Th1 a juzgar por el tipo de citoquinas evaluadas. Dentro de las perspectivas de este trabajo se encuentra la posibilidad de evaluar otras citoquinas específicas para los diferentes subsets de células T, como ser TNF para la población Th1 ó IL4, IL9, IL10 para Th2 [126]. Por otro lado los esplenocitos activados *in vivo* por los péptidos evaluados, reconocieron antígenos provenientes de células tumorales TA3/Ha, y no de PancO2, lo que indicaría que dicha reactividad cruzada se da por la porción peptídica y no por el antígeno Tn.

Los resultados anteriormente expuestos nos condujeron a investigar si alguno de los péptidos evaluados logran inducir o activar células con capacidad citotóxica capaces de eliminar células tumorales. Dentro de las poblaciones celulares que se han visto implicadas en la eliminación de las células tumorales se encuentran los linfocitos TCD8 y las células NK. Mientras que la actividad de las NK está regulada por un balance entre señales provenientes de receptores activadores (que reconocen moléculas tales como MICA/MICB) e inhibidores que reconocen por ejemplo moléculas de MHC de clase I, que expresión reducida en muchos tipos de células tumorales [45], la actividad de los linfocitos T citotóxicos esta regulada por el reconocimiento mediante su TCR de complejos específicos péptido-molécula de MHC de clase I.

Una vez activadas, tanto las NK como los linfocitos T citotóxicos, conducen a la apoptosis de las células blanco mediante la liberación de gránulos conteniendo moléculas de perforina y de granzima, o mediante interacciones entre receptores de membrana como Fas/Fas-L [46]. A su vez las células NK también pueden desencadenar sus mecanismos efectores ante el reconocimiento de anticuerpos IgG unidos a la superficie de las células tumorales, fenómeno conocido como citotoxicidad celular inducida por anticuerpos (ADCC) [4].

Con el objetivo de evaluar la capacidad citotóxica de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados previamente con EM5, EM5-2Tn ó C317, se cultivaron los mismos con células tumorales PancO2 y TA3/Ha. Los esplenocitos de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn y C317 mediaron una eliminación de células tumorales (tanto PancO2 como TA3Ha) más efectiva que los esplenocitos de ratones inmunizados con PBS . Dicho efecto resultó más evidente cuando la proporción de células efectoras a tumorales es de 10:1. Por otro lado y para nuestra sorpresa, es interesante destacar que si bien hemos observado un efecto inductor en cuanto a la eliminación de células tumorales por esplenocitos de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn y C317, el mismo no parece estar mediado por el antígeno Tn, ya que se observan niveles de eliminación similares tanto para esplenocitos de ratones inmunizados con EM5 como con EM5-2Tn.

Dada la relevancia de este experimento en cuanto a la eliminación de células tumorales por parte de esplenocitos de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn y C317, nos hemos planteado como perspectiva, evaluar la muerte celular de las células tumorales en otros modelos experimentales como podría ser la determinación de apoptosis por citometría de flujo.

Asimismo, resulta de gran interés evaluar si este efecto observado *in vitro* se puede extrapolar a la

situación *in vivo* lo que podría representar un aumento en la supervivencia de ratones con cáncer. Con este fin, en este momento, nos encontramos evaluando el potencial anti-tumoral de los péptidos en protocolos profilácticos y terapéuticos en ratones con cáncer (para PancO2 y TA3/Ha).

Con respecto a la respuesta humoral inducida por C317, EM5 y EM-2Tn, hemos evaluado por ELISA la presencia de anticuerpos IgG e IgM específicos. Se observó una producción de IgG anti-C317 y anti-EM5 importante con respecto al suero de ratones control. Cabe destacar que a nivel de la especificidad de anticuerpos también se observó una reacción cruzada entre el péptido EM5 y C317. En la misma línea que los resultados obtenidos para la respuesta celular T, los anticuerpos específicos contra C317 reconocen de manera importante a EM5. Los anticuerpos IgG inducidos tras la inmunización de ratones con EM5 ó C317 fueron capaces de reconocer antígenos presentes en un extracto proteico proveniente de las líneas tumorales PancO2 (cáncer de páncreas) y TA3/Ha (cáncer de mama). Sin embargo, únicamente los obtenidos tras inmunizar con C317 reconocieron de forma significativa antígenos nativos expresados en la superficie de las células tumorales TA3/Ha.

Una razón que podría explicar el hecho de que los anticuerpos presentes en los sueros obtenidos inmunizando con EM5 reconocen antígenos tumorales por ELISA, mientras que no reconocen células tumorales PancO2 ó TA3/Ha por citometría de flujo, radica en el principio de detección utilizados por ambas técnicas. En el ELISA se evalúa el reconocimiento de antígenos totales que se encuentran de forma desnaturalizada, mientras que en la citometría de flujo evaluamos el reconocimiento de estructuras nativas presentes en la superficie celular.

Un aspecto que llamó nuestra atención, fue que no observamos títulos detectables de IgG ni IgM capaces de reconocer ninguno de los péptidos, en sueros de ratones inmunizados con EM5-2Tn, lo que se correlacionó con la ausencia de reconocimiento del antígeno provenientes de extractos proteicos derivados de PancO2 y TA3/Ha. Sin embargo, los sueros obtenidos tras la inmunización con EM5-2Tn, mostraron un reconocimiento de las células tumorales TA3/Ha, evaluado por citometría de flujo.

Dicho reconocimiento, podría estar mediado por el antígeno Tn, ya que dichas células presentan altos contenidos de mucinas de membrana exponiendo Tn. Para demostrarlo, debemos llevar a cabo ensayos de inhibición del reconocimiento de dichos sueros utilizando GalNAc como inhibidores. También pretendemos realizar estudios para evaluar la capacidad de dicho antígeno de mediar citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC).

3 Evaluación de los mecanismos responsables de la respuesta anti-tumoral inducida por EM5, EM5-2Tn y C317

La observación de que los péptidos analizados en este trabajo (EM5, EM5-2Tn y C317) son capaces de inducir una respuesta inmunitaria que reconozca células tumorales, ya sea a nivel celular como humoral, plantean cuestiones fundamentales a la hora de interpretar estos resultados como por ejemplo: ¿a qué nivel en el establecimiento de la generación de la respuesta inmune estos péptidos inducen el potencial anti-tumoral?; ¿qué actores celulares median dicha capacidad anti-tumoral?. Dado que hemos observado una estimulación de la respuesta inmune adaptativa a nivel celular y humoral un candidato a ser estudiado son las células dendríticas por dos razones fundamentales: i) las células dendríticas son primordiales a la hora de establecer una respuesta inmune adaptativa celular y humoral ya que la presentación de antígenos y la posterior migración al ganglio drenante posibilita la activación de los linfocitos T y B vírgenes, ii) las mismas son capaces de generar la polarización de la respuesta celular de linfocitos T cooperadores a diferentes sub-poblaciones (Th1, Th2, Th17, Treg, entre otras).

En este sentido hemos evaluado el efecto de los péptidos EM5, EM5-2Tn y C317 en las células dendríticas, con el objetivo último de evaluar si los mismos son capaces de generar cambios fenotípicos en las mismas que modulen la respuesta inmune.

Como primer aproximación determinamos, mediante citometría de flujo y microscopía confocal que los péptidos evaluados son internalizados exitosamente por células dendríticas. En cuanto al mecanismo por el cual los mismos son internalizados, el mismo no parece estar mediado por receptores dependientes de calcio, como podría ser endocitosis mediada por MGL ya que no se observaron cambios en la internalización en presencia de un agente quelante.

Los resultados de internalización antigénica, muestran que todas las moléculas son internalizadas en niveles similares y que la presencia de dos residuos de GalNAc sobre el péptido EM5 no es suficiente para permitir su reconocimiento por el receptor MGL, como ya se ha reportado para otros péptidos glicosilados con el antígeno Tn. En efecto, en este caso los péptidos que fueron reconocidos por el receptor MGL presentaban múltiples residuos de GalNAc [117].

Sería interesante glicosilar EM5 en lugares adicionales como por ejemplo en los cuatro residuos hidroxilados restantes (MSLLSPSTPLHAITS, representados en azul), y evaluar si su internalización puede ser potenciada tras el reconocimiento por el MGL.

En cuanto a la distribución de los péptidos evaluados en el espacio intracelular podemos decir, que

los mismos tienen una distribución citoplasmática, y que co-localiza con la molécula LAMP-1 (Lysosomal – associated membrane protein). LAMP-1 es un marcador de endosomas tardíos, por lo que, dada la colocalización con la marcación de los péptidos internalizados, los mismos parecen estar localizados en dichos compartimentos.

En segunda instancia hemos observado que los péptidos EM5, EM5-2Tn y C317 tienen un potencial inmuno-modulador sobre las células dendríticas maduras en presencia de zymosan mientras que registramos un aumento dosis dependiente de IL6 e IL12 por CDs maduras en presencia de LPS.

Determinadas estructuras PAMPs, como el LPS, activan macrófagos y DC interactuando con receptores tipo toll (TLRs), lo que resulta en la translocación de NF- κ B al núcleo e induce la activación de un programa transcripcional pro-inflamatorio [128].

Además, los TLR en DC pueden cooperar entre sí, de manera de sinergizar sus funciones. Por ejemplo, se ha descrito la cooperación entre TLR9 y TLR4, inducida en BMDC por CpG y LPS respectivamente [130]. En este caso, la estimulación simultánea de LPS y CpG produjo efectos aditivos en la producción de LPS [128, 129].

En nuestro caso, los 3 péptidos evaluados en este trabajo indujeron una mayor producción de IL12 e IL6 por células dendríticas cuando fueron incubadas junto con LPS. Una hipótesis que podría explicar este hecho, es que estos péptidos podrían actuar como PAMPs uniéndose por ejemplo a un TLR que actuaría sinérgicamente con el TLR4, en un caso parecido al descrito para TLR4 y TLR9 [129].

Por otro lado, otra posibilidad podría ser que los péptidos de C317 se unieran con el LPS, actuando sinérgicamente a través del TLR4. En efecto, se ha demostrado que la Hsp60 se une a LPS bacteriano generando un complejo Hsp60-LPS, lo que aumenta de manera sinérgica la producción de IL12 en células dendríticas y macrófagos [130]. Dicha hipótesis estaría de acuerdo con el hecho de que ninguno de los péptidos evaluados por separado induce la producción de las citoquinas evaluadas (IL12, IL6 y IL10).

La eventual posibilidad de haber identificado moléculas derivadas de helmintos capaces de actuar

singérgicamente con TLR en la producción de un fenotipo pro inflamatorio, resulta interesante, ya que por el momento la mayor parte de los PAMPs de helmintos identificados comprenden estructuras glucídicas, que conducen a la producción de IL10 y otras citoquinas anti-inflamatorias, lo que se encuentra asociado a una polarización T de tipo Th2, o incluso Treg [131, 132].

La exposición a diversos patógenos puede inducir la proliferación y la activación de diferentes poblaciones celulares del sistema inmune. A modo de ejemplo tras la exposición a determinados parásitos helmintos se observan aumentos importantes en la población de eosinófilos [132]. En este sentido nos hemos propuesto evaluar ciertas poblaciones celulares de estirpe mieloide y linfocitarias en el bazo de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn y C317. En cuanto a las poblaciones mieloides estudiadas se observamos un aumento significativo en la población mieloide Ly6G⁺ Ly6C^{High} / CD11b⁺ la cual podría corresponder a la población identificada como MDSCs (por su sigla en inglés Myeloid-derived supressor cells). Las MDSCs constituyen una población heterogénea que consiste en células progenitoras mieloides y en células inmaduras mieloides (IMCs, por su sigla Immature myeloid cells) En individuos normales las IMC dan origen a granulocitos, macrófagos o células dendríticas [133]. Sin embargo en condiciones patológicas como sepsis o trauma, se bloquea la diferenciación de las IMCs en células mieloides maduras. El uso de anticuerpos específicos permitió identificar dos poblaciones de MDSC: las MDSC granulocíticas CD11b⁺ Ly6G⁺Ly6C^{low} y las MDSC monocíticas CD11b⁺ Ly6G⁻Ly6C^{high} [136]. De manera interesante estas dos sub-poblaciones parecen estar involucradas en la patogénesis en cáncer [137].

En cuanto a las poblaciones linfocitarias estudiadas resulta interesante destacar que para el grupo de ratones inmunizados con EM5 se observó un aumento en la poblaciones linfocitarias CD62L⁺/CD4⁺/CD3⁺, CD62L⁺/CD8⁺/CD3⁺, CD62L⁺/CD4⁺CD8⁺/CD3⁺ parece estar aumentada con respecto al grupo control.

CD62L ó L-selectina, es una molécula de adhesión que interviene en la regulación de la migración de linfocitos hacia los sitios de inflamación y de la re-circulación de linfocitos entre sangre y tejidos linfoides. Dicha re-circulación de linfocitos es clave en el proceso de inmuno-vigilancia y en generar respuestas inmunes adaptativas rápidas y eficientes [136].

Por otro lado, la población linfocitaria CD69⁺/NK1.1⁺CD49b⁺ correspondiente a células NK

activadas, se vió aumentada en todos los grupos de ratones (inmunizados con EM5, EM5-2Tn y C317), con respecto al control. De manera interesante, este resultado concuerda con los datos obtenidos en cuanto a la citotoxicidad de células tumorales, en las que se observó un mayor citotoxicidad celular para el grupo de ratones inmunizados con los antígenos EM5, EM5-2Tn y C317.

CD69 es una lectina tipo II de la familia de receptores NK y constituye un marcador temprano de activación linfocitaria. Su expresión se ha reportado en todas las poblaciones derivadas de la médula ósea excepto los eritrocitos [137]. Experimentos *in vitro* han sugerido que CD69 tiene una función pro-inflamatoria.

Los resultados obtenidos, en cuanto al incremento de la población CD69⁺/NK1.1⁺CD49b⁺ en esplenocitos de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn y C317, resultan de gran interés si se los relaciona con la capacidad de eliminación de células tumorales observada para los esplenocitos de ratones inmunizados con dichos antígenos en los ensayos de citotoxicidad. Como mencionamos anteriormente, las células NK se activan como resultado de un balance dinámico entre señales provenientes de receptores inhibitorios y estimuladoras.

Desde 1999 es sabido que las funciones efectoras de las NK pueden a su vez ser estimuladas por contacto directo con las CDs, descubrimiento que llevó a la elaboración del concepto de lo que se conoce hoy como DAKs (dendritic cell activated killers). Posteriormente, se demostró que la interacción entre NK y CD era compleja y que era bi-direccional: las CDs pueden estimular la activación de las NK y a su vez las NK pueden estimular la maduración ó apoptosis de CDs dependiendo del estado de activación de las células en cuestión [138].

Resulta interesante destacar que las NK también responden, en particular citoquinas expresadas por las CDs. En particular, es sabido que tras ciertos estímulos, como ser patógenos o ligandos de TLR, las CD constituyen una fuente importante de citoquinas, como ser IL12, IL18, IL15 e interferones de tipo I que afectan otras poblaciones celulares, como ser las NK [139]. Estudios *in vitro* sugirieron que la IL12 derivada de CDs activadas por diferentes estímulos (LPS, Poly IC, *actinobacillus*), tiene un rol fundamental en la activación y posterior producción de INF γ por parte de las NK en diversos sistemas.

En este contexto y teniendo en cuenta nuestros resultados resultaría interesante purificar la población CD69⁺/NK1.1⁺CD49b⁺ en esplenocitos de ratones inmunizados con EM5, EM5-2Tn y C317

para evaluar su capacidad citotóxica *in vitro*.

Por otro lado, y teniendo en cuenta la bi-direccionalidad en cuanto a la modulación de las funciones entre CD y NK resulta interesante evaluar si CDs maduras en diferentes condiciones, activan la función citotóxica de células NK. Para esto podrían realizarse co-cultivos de NKs y CD previamente incubadas con diversos estímulos de maduración, como ser, en presencia de LPS e inclusive ó teniendo en cuenta un posible rol sinérgico de los péptidos sobre las vías de señalización de TLR, en presencia de los péptidos EM5, EM5-2Tn y C317.

Como conclusión general de este trabajo de maestría podemos destacar que hemos identificado péptidos derivados de una proteína de tipo mucina de *E. granulosus* que son inmunogénicos en los modelos murinos evaluados. Los mismos son capaces de inducir una respuesta humoral y celular, en particular de tipo Th1 que reconoce antígenos de células tumorales. Dichos péptidos parecen estimular el efecto citotóxico que media la eliminación de células tumorales PancO2 y TA3/Ha.

El hecho de que se observó:

- i) una respuesta inmunitaria celular generada por dichos péptidos, en particular de tipo Th1 que reconoce antígenos tumorales,**
- ii) una respuesta humoral no sólo capaz de reconocer los péptidos sino también antígenos presentes en las líneas tumorales,**
- iii) un efecto citotóxico de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con los péptidos sobre las células tumorales evaluadas,**
- iv) una internalización eficaz de los péptidos por parte de las células dendríticas,**
- v) un aumento de la producción de IL12 por células dendríticas maduras en presencia de los péptidos y LPS y**
- vi) un aumento en la población de células NK activadas en esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos,**

constituyen resultados alentadores que nos incentivan a continuar explorando las propiedades anti- tumorales de dichos péptidos. En particular, hipotetizamos que los péptidos evaluados, en conjunto con LPS, actúan sinérgicamente aumentando la producción de IL12 por células dendríticas, las cuales activan a las células NK, responsables de la actividad citotóxica sobre

células tumorales. Como perspectiva nos planteamos, entre otras, profundizar en ensayos que nos permitan evaluar el rol de las NK *in vitro* en eliminar las células tumorales (purificando células NK activadas en un cell sorter), así como evaluar *in vivo* la capacidad anti-tumoral de los péptidos en ensayos profilácticos y terapéuticos.

Referencias Bibliográficas

1. Franco, E.L., *Epidemiology in the Study of Cancer*, in *Encyclopedia of Cancer*, J.R. Bertino, Editor. 1997, Academic Press: New York. p. 621-641.
2. Masters, G., Vokes, EE., *Radiotherapy and Concomitant Chemotherapy*, in *Encyclopedia of Cancer*, J.R. Bertino, Editor. 1997, Academic Press: New York. p. 1471-1511.
3. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, SL., Matsudaira, P., Baltimore, D, Darnell, J., *Cancer*, in *Molecular Cell Biology*, W.H. Freeman, Editor. 2000, W. H. Freeman: New York. p. 935-973.
4. Kumar, V., Abbas, A., *Robbins & Cotran Patologia Humana* 2005, Madrid: ELSEVIER
5. Der, C.J., T.G. Krontiris, and G.M. Cooper, *Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. 79(11): p. 3637-40.
6. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
7. Fong, P.C., et al., *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers*. N Engl J Med, 2009. **361**(2): p. 123-34.
8. Fong, P.C., et al., *Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval*. J Clin Oncol, 2010. **28**(15): p. 2512-9.
9. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Science, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.
10. Peoples, G.E., et al., *Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(2): p. 432-6.
11. Linley, A.J., M. Ahmad, and R.C. Rees, *Tumour-associated antigens: considerations for their use in tumour immunotherapy*. Int J Hematol, 2011. **93**(3): p. 263-73.
12. Gendler, S.J. and A.P. Spicer, *Epithelial mucin genes*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 607-34.
13. Kesisis, G., et al., *Biological markers in breast cancer prognosis and treatment*. J BUON, 2010. **15**(3): p. 447-54.
14. Ramanathan, R.K., et al., *Phase I study of a MUC1 vaccine composed of different doses of MUC1 peptide with SB-AS2 adjuvant in resected and locally advanced pancreatic cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(3): p. 254-64.
15. Bos, J.L., *ras oncogenes in human cancer: a review*. Cancer Res, 1989. **49**(17): p. 4682-9.
16. Druker, B.J., et al., *Chronic myelogenous leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ

- Program, 2001: p. 87-112.
17. Pandolfi, P.P., *Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 769-75.
 18. Hehlmann, R., A. Hochhaus, and M. Baccarani, *Chronic myeloid leukaemia*. Lancet, 2007. **370**(9584): p. 342-50.
 19. Riley, C.L., et al., *Tumour antigen-targeted immunotherapy for chronic myeloid leukaemia: is it still viable?* Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(9): p. 1489-99.
 20. Corman, J.M., E.E. Sercarz, and N.K. Nanda, *Recognition of prostate-specific antigenic peptide determinants by human CD4 and CD8 T cells*. Clin Exp Immunol, 1998. **114**(2): p. 166-72.
 21. Jaramillo, A., et al., *Identification of HLA-A3-restricted CD8+ T cell epitopes derived from mammaglobin-A, a tumor-associated antigen of human breast cancer*. Int J Cancer, 2002. **102**(5): p. 499-506.
 22. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
 23. Young, L.S. and P.G. Murray, *Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours*. Oncogene, 2003. **22**(33): p. 5108-21.
 24. Boxus, M. and L. Willems, *Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation*. Br J Cancer, 2009. **101**(9): p. 1497-501.
 25. Hassan, M.M., et al., *The association of family history of liver cancer with hepatocellular carcinoma: a case-control study in the United States*. J Hepatol, 2009. **50**(2): p. 334-41.
 26. Lajer, C.B. and C. von Buchwald, *The role of human papillomavirus in head and neck cancer*. APMIS, 2010. **118**(6-7): p. 510-9.
 27. Malanchi, I., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 promotes retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle progression*. J Virol, 2004. **78**(24): p. 13769-78.
 28. Hwang, S.G., et al., *Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner*. J Biol Chem, 2002. **277**(4): p. 2923-30.
 29. Harper, D.M., *Impact of vaccination with Cervarix (trade mark) on subsequent HPV-16/18 infection and cervical disease in women 15-25 years of age*. Gynecol Oncol, 2008. **110**(3 Suppl 1): p. S11-7.
 30. Haas, G.G., Jr., O.J. D'Cruz, and L.E. De Bault, *Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis*. Am J Reprod Immunol Microbiol, 1988. **18**(2): p. 47-51.

31. Freire, T., et al., *Carbohydrate antigens: synthesis aspects and immunological applications in cancer*. Mini Rev Med Chem, 2006. **6**(12): p. 1357-73.
32. Strebhardt, K. and A. Ullrich, *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(6): p. 473-80.
33. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
34. Kaplan, D.H., et al., *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
35. Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber, *Interferons, immunity and cancer immunoediting*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 836-48.
36. Shankaran, V., et al., *IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
37. Brennan, A.J., et al., *Perforin deficiency and susceptibility to cancer*. Cell Death Differ, 2010. **17**(4): p. 607-15.
38. Clementi, R., et al., *A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4424-8.
39. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
40. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
41. Sims, G.P., et al., *HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 367-88.
42. Smyth, M.J., N.Y. Crowe, and D.I. Godfrey, *NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma*. Int Immunol, 2001. **13**(4): p. 459-63.
43. Clark, W.H., Jr., et al., *Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(24): p. 1893-904.
44. Clemente, C.G., et al., *Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma*. Cancer, 1996. **77**(7): p. 1303-10.
45. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
46. Lanier, L.L., *Evolutionary struggles between NK cells and viruses*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 259-68.
47. Hallett, W.H., et al., *Sensitization of tumor cells to NK cell-mediated killing by proteasome inhibition*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 163-70.

48. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
49. Zagzag, D., et al., *Downregulation of major histocompatibility complex antigens in invading glioma cells: stealth invasion of the brain*. Lab Invest, 2005. **85**(3): p. 328-41.
50. Chang, C.C., et al., *Defective human leukocyte antigen class I-associated antigen presentation caused by a novel beta2-microglobulin loss-of-function in melanoma cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(27): p. 18763-73.
51. Macian, F., et al., *T-cell anergy*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(2): p. 209-16.
52. Li, Z., L. Chen, and Z. Qin, *Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity*. Cell Mol Immunol, 2009. **6**(6): p. 415-22.
53. Nagaraj, N.S. and P.K. Datta, *Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer*. Expert Opin Investig Drugs, 2010. **19**(1): p. 77-91.
54. Murugaiyan, G. and B. Saha, *Protumor vs antitumor functions of IL-17*. J Immunol, 2009. **183**(7): p. 4169-75.
55. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 170-81.
56. O'Connell, J., et al., *Resistance to Fas (APO-1/CD95)-mediated apoptosis and expression of Fas ligand in esophageal cancer: the Fas counterattack*. Dis Esophagus, 1999. **12**(2): p. 83-9.
57. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
58. Hortobagyi, G.N., *Trastuzumab in the treatment of breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1734-6.
59. Kawakami, Y., et al., *Recognition of shared melanoma antigens in association with major HLA-A alleles by tumor infiltrating T lymphocytes from 123 patients with melanoma*. J Immunother, 2000. **23**(1): p. 17-27.
60. Dillman, R.O., *Cancer immunotherapy*. Cancer Biother Radiopharm, 2011. **26**(1): p. 1-64.
61. Przepiorka, D. and P.K. Srivastava, *Heat shock protein--peptide complexes as immunotherapy for human cancer*. Mol Med Today, 1998. **4**(11): p. 478-84.
62. Lotze, M.T., et al., *Dendritic cell based therapy of cancer*. Adv Exp Med Biol, 1997. **417**: p. 551-69.
63. Gilboa, E., S.K. Nair, and H.K. Lyerly, *Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines*. Cancer Immunol Immunother, 1998. **46**(2): p. 82-7.

64. Tuma, R.S., *Immunotherapies in clinical trials: do they demand different evaluation tools?* J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(10): p. 780-1.
65. Tacke, P.J., et al., *Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 790-802.
66. Bonifaz, L.C., et al., *In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination.* J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 815-24.
67. Proudfoot, O., V. Apostolopoulos, and G.A. Pietersz, *Receptor-mediated delivery of antigens to dendritic cells: anticancer applications.* Mol Pharm, 2007. **4**(1): p. 58-72.
68. van Vliet, S.J., E. Saeland, and Y. van Kooyk, *Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function.* Trends Immunol, 2008. **29**(2): p. 83-90.
69. Varki, A.P., et al., *Working group report: the roles of glycans in hemostasis, inflammation and vascular biology.* Glycobiology, 2008. **18**(10): p. 747-9.
70. Jensen, P.H., D. Kolarich, and N.H. Packer, *Mucin-type O-glycosylation--putting the pieces together.* FEBS J, 2010. **277**(1): p. 81-94.
71. Hang, H.C. and C.R. Bertozzi, *The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation.* Bioorg Med Chem, 2005. **13**(17): p. 5021-34.
72. Hanisch, F.G., *O-glycosylation of the mucin type.* Biol Chem, 2001. **382**(2): p. 143-9.
73. Schwientek, T., et al., *Functional conservation of subfamilies of putative UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases in Drosophila, Caenorhabditis elegans, and mammals. One subfamily composed of l(2)35Aa is essential in Drosophila.* J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22623-38.
74. Clausen, H. and E.P. Bennett, *A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation.* Glycobiology, 1996. **6**(6): p. 635-46.
75. Hollingsworth, M.A. and B.J. Swanson, *Mucins in cancer: protection and control of the cell surface.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 45-60.
76. Sperandio, M., *Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo.* FEBS J, 2006. **273**(19): p. 4377-89.
77. Ichikawa, S., et al., *Tumoral calcinosis presenting with eyelid calcifications due to novel missense mutations in the glycosyl transferase domain of the GALNT3 gene.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(11): p. 4472-5.
78. Allen, A.C., et al., *Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients.* Kidney Int, 2001. **60**(3): p. 969-73.
79. Ono, M. and S. Hakomori, *Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness.*

- Glycoconj J, 2004. **20**(1): p. 71-8.
80. Brockhausen, I., *Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1473**(1): p. 67-95.
81. Osinaga, E., *Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites*. IUBMB Life, 2007. **59**(4-5): p. 269-73.
82. Freire, T., et al., *Enzymatic large-scale synthesis of MUC6-Tn glycoconjugates for antitumor vaccination*. Glycobiology, 2006. **16**(5): p. 390-401.
83. Springer, G.F., *T and Tn, general carcinoma autoantigens*. Science, 1984. **224**(4654): p. 1198-206.
84. Ohno, S., et al., *Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in endometrial cancer: its relationship with tumor-produced cyclooxygenase-2, tumor-infiltrated lymphocytes and patient prognosis*. Anticancer Res, 2006. **26**(6A): p. 4047-53.
85. Freire, T., et al., *Molecular basis of incomplete O-glycan synthesis in MCF-7 breast cancer cells: putative role of MUC6 in Tn antigen expression*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7880-7.
86. Springer, G.F., *Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy*. J Mol Med (Berl), 1997. **75**(8): p. 594-602.
87. Morita, N., et al., *Inhibition of cancer cell growth by anti-Tn monoclonal antibody MLS128*. Biosci Trends, 2009. **3**(1): p. 32-7.
88. Osinaga, E., et al., *Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy*. FEBS Lett, 2000. **469**(1): p. 24-8.
89. Bay, S., O. Berthier-Vergnes, and D. Cantacuzene, *Synthesis of alpha- and beta-biotinylated T-antigen*. Carbohydr Res, 1997. **298**(3): p. 153-61.
90. Lo-Man, R., et al., *A fully synthetic therapeutic vaccine candidate targeting carcinoma-associated Tn carbohydrate antigen induces tumor-specific antibodies in nonhuman primates*. Cancer Res, 2004. **64**(14): p. 4987-94.
91. Sheehan, J.K., K. Oates, and I. Carlstedt, *Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins*. Biochem J, 1986. **239**(1): p. 147-53.
92. Mall, A.S., *Analysis of mucins: role in laboratory diagnosis*. J Clin Pathol, 2008. **61**(9): p. 1018-24.
93. Byrd, J.C. and R.S. Bresalier, *Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2004. **23**(1-2): p. 77-99.
94. Gendler, S.J., et al., *Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin*. J Biol Chem, 1990. **265**(25): p. 15286-93.

95. Gum, J.R., et al., *Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism*. J Biol Chem, 1989. **264**(11): p. 6480-7.
96. Peter-Katalinic, J., *Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins*. Methods Enzymol, 2005. **405**: p. 139-71.
97. Cao, Y., et al., *Mucins (MUC1 and MUC3) of gastrointestinal and breast epithelia reveal different and heterogeneous tumor-associated aberrations in glycosylation*. J Histochem Cytochem, 1997. **45**(11): p. 1547-57.
98. Nakamori, S., et al., *MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma*. Gastroenterology, 1994. **106**(2): p. 353-61.
99. Chang, S.K., et al., *Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer*. Gastroenterology, 1994. **107**(1): p. 28-36.
100. Sylvester, P.A., et al., *Differential expression of the chromosome 11 mucin genes in colorectal cancer*. J Pathol, 2001. **195**(3): p. 327-35.
101. Matsuda, K., et al., *Clinical significance of MUC1 and MUC2 mucin and p53 protein expression in colorectal carcinoma*. Jpn J Clin Oncol, 2000. **30**(2): p. 89-94.
102. Velcich, A., et al., *Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2*. Science, 2002. **295**(5560): p. 1726-9.
103. Vlad, A.M. and O.J. Finn, *Glycoprotein tumor antigens for immunotherapy of breast cancer*. Breast Dis, 2004. **20**: p. 73-9.
104. Dube, V., et al., *Mucinous ovarian tumors of Mullerian-type: an analysis of 17 cases including borderline tumors and intraepithelial, microinvasive, and invasive carcinomas*. Int J Gynecol Pathol, 2005. **24**(2): p. 138-46.
105. Slovin, S.F., S.J. Keding, and G. Ragupathi, *Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(4): p. 418-28.
106. von Mensdorff-Pouilly, S., et al., *Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein*. Int J Biol Markers, 2000. **15**(4): p. 343-56.
107. Grinstead, J.S., J.T. Schuman, and A.P. Campbell, *Epitope mapping of antigenic MUC1 peptides to breast cancer antibody fragment B27.29: a heteronuclear NMR study*. Biochemistry, 2003. **42**(48): p. 14293-305.
108. Kagan, E., et al., *Comparison of antigen constructs and carrier molecules for augmenting the immunogenicity of the monosaccharide epithelial cancer antigen Tn*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(5): p. 424-30.
109. Theodoropoulos, G., et al., *The role of mucins in host-parasite interactions: Part II -*

- helminth parasites*. Trends Parasitol, 2001. **17**(3): p. 130-5.
110. Nyame, A.K., Z.S. Kwar, and R.D. Cummings, *Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics*. Arch Biochem Biophys, 2004. **426**(2): p. 182-200.
 111. Alvarez Errico, D., et al., *O-glycosylation in Echinococcus granulosus: identification and characterization of the carcinoma-associated Tn antigen*. Exp Parasitol, 2001. **98**(2): p. 100-9.
 112. Freire, T., et al., *Mucin-type O-glycosylation in Fasciola hepatica: characterisation of carcinoma-associated Tn and sialyl-Tn antigens and evaluation of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity*. Int J Parasitol, 2003. **33**(1): p. 47-56.
 113. Thors, C., et al., *Immunoglobulin uptake and processing by Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol, 2006. **28**(9): p. 421-8.
 114. Casaravilla, C., et al., *Mucin-type O-glycosylation in helminth parasites from major taxonomic groups: evidence for widespread distribution of the Tn antigen (GalNAc-Ser/Thr) and identification of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity*. J Parasitol, 2003. **89**(4): p. 709-14.
 115. Freire, T., et al., *Sialyl-Tn antigen expression and O-linked GalNAc-Thr synthesis by Trypanosoma cruzi*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(4): p. 1309-16.
 116. Akgul, H., et al., *Echinococcus against cancer: why not?* Cancer, 2003. **98**(9): p. 1999-2000.
 117. Freire, T., et al., *Tn glycosylation of the MUC6 protein modulates its immunogenicity and promotes the induction of Th17-biased T cell responses*. J Biol Chem, 2011. **286**(10): p. 7797-811.
 118. Satthaporn, S. and O. Eremin, *Dendritic cells (II): Role and therapeutic implications in cancer*. J R Coll Surg Edinb, 2001. **46**(3): p. 159-67.
 119. Cella, M., et al., *Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells*. Nature, 1997. **388**(6644): p. 782-7.
 120. Palucka, K. and J. Banchereau, *Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity*. J Clin Immunol, 1999. **19**(1): p. 12-25.
 121. Ninomiya, T., et al., *Dendritic cells with immature phenotype and defective function in the peripheral blood from patients with hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 1999. **31**(2): p. 323-31.
 122. Fink, A.L., *Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid*. Fold

- Des, 1998. **3**(1): p. R9-23.
123. Freire, T., et al., *UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (ppGalNAc-T6) mRNA as a potential new marker for detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(6): p. 1383-8.
124. Freitas, J.M., et al., *The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting Trypanosoma cruzi strains*. *PLoS One*, 2009. **4**(4): p. e5113.
125. Quinn, M.T., et al., *A carbohydrate neoepitope that is up-regulated on human mononuclear leucocytes by neuraminidase treatment or by cellular activation*. *Immunology*, 2001. **104**(2): p. 185-97.
126. Feili-Hariri, M., D.H. Falkner, and P.A. Morel, *Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy*. *J Leukoc Biol*, 2005. **78**(3): p. 656-64.
127. O'Boyle, K.P., et al., *Specificity analysis of murine monoclonal antibodies reactive with Tn, sialylated Tn, T, and monosialylated (2-->6) T antigens*. *Hybridoma*, 1996. **15**(6): p. 401-8.
128. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. *Immunity*, 2011. **34**(5): p. 637-50.
129. Theiner, G., et al., *TLR9 cooperates with TLR4 to increase IL-12 release by murine dendritic cells*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(1): p. 244-52.
130. Osterloh, A. and M. Breloer, *Heat shock proteins: linking danger and pathogen recognition*. *Med Microbiol Immunol*, 2008. **197**(1): p. 1-8.
131. Thomas, P.G. and D.A. Harn, Jr., *Immune biasing by helminth glycans*. *Cell Microbiol*, 2004. **6**(1): p. 13-22.
132. Behm, C.A. and K.S. Ovington, *The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice*. *Parasitol Today*, 2000. **16**(5): p. 202-9.
133. Nagaraj, S. and D.I. Gabrilovich, *Myeloid-derived suppressor cells in human cancer*. *Cancer J*, 2010. **16**(4): p. 348-53.
134. Youn, J.I., et al., *Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. *J Immunol*, 2008. **181**(8): p. 5791-802.
135. Movahedi, K., et al., *Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity*. *Blood*, 2008. **111**(8): p. 4233-44.
136. Grailer, J.J., M. Kodera, and D.A. Steeber, *L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation*. *J Dermatol Sci*, 2009. **56**(3): p. 141-7.

137. Sancho, D., M. Gomez, and F. Sanchez-Madrid, *CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation*. Trends Immunol, 2005. **26**(3): p. 136-40.
138. Walzer, T., et al., *Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2252-8.