



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



# *Caracterización del reconocimiento antigénico de un nuevo Anticuerpo quimérico a utilizar en inmunoterapia del cáncer*

Tesina de Fin de Grado de la Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias

UdelaR

**LAURA MORENO CARBONELL**

Orientador: Dr. Álvaro Pittini

Co-orientador: Dr. Eduardo Osinaga

**Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral**

**Institut Pasteur de Montevideo**

**Unidad Académica de Inmunobiología**

**Facultad de Medicina, UdelaR**

Agosto de 2024

## **AGRADECIMIENTOS**

A Eduardo y Nora, por haber confiado en mí y abrirme las puertas de su laboratorio.

A Álvaro, por ser el mejor tutor de tesis que me pudo haber tocado. Gracias por enseñarme mucho más que ciencia. Sos un referente, tanto como científico como persona.

A mis compañeras del LGIT, Vivi y Euge, por siempre estar dispuestas a prestarme una mano con lo que estuviera a su alcance.

A la Unidad Académica de Inmunobiología de Facultad de Medicina, por permitirme trabajar mientras realicé esta tesina.

A mis padres, por confiar tanto en mí y apoyarme en todas mis decisiones, sin su cariño no hubiera sido posible llegar hasta acá. A mi hermana, por ser mi cable a tierra en los momentos en que más lo necesité. Al resto de mi familia, tíos y primos, gracias por tanto amor.

A Chris, por ser el mejor compañero de ruta. Gracias por tu amor, tu confianza y palabras de aliento.

A mis amigos del alma, Vale, Vicky, Maitu, Rosi, Caro y Tincho. Gracias por bancarme tantos años y nunca dudar que iba a llegar acá.

A los amigos que me dio facultad, en especial Belu M, Jani, Belu I y Santi. A los chicos del grupito de inmuno, Anto, Naty, Mateo y Agus. Y a todos los que de alguna manera contribuyeron a que mi paso por facultad fuera más lindo, ¡gracias!

Por último, a mi suegra preferida. Estés donde estés, ojalá estés orgullosa. Esta tesina va dedicada para vos y mi papá.

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>DAB</b>	Diaminobencidina
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>HER2</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2
<b>HPA</b>	Aglutinina <i>Helix Pomatia</i>
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>OSM</b>	Mucina submaxilar ovina
<b>PBS</b>	<i>Buffer</i> fosfato salino
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>ppGalNAcTs</b>	N- $\alpha$ -acetilgalactosaminatransferasas
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SPR</b>	Resonancia plasmática de superficie

<b>TBS</b>	Solución salina tamponada con Tris
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
<b>TRITC</b>	Isotiocianato de tetrametilrodamina
<b>VEGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

## RESUMEN

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada de células que adquirieron mutaciones que les brindan ventajas con respecto a las células normales. En la actualidad, el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo responsable de millones de decesos anualmente. Uno de los mayores desafíos de esta enfermedad radica en la falta de terapias efectivas.

La presente tesina se centra en la caracterización y evaluación de un nuevo anticuerpo, denominado Tándem IgG/IgA, diseñado para su aplicación en inmunoterapia del cáncer. Este anticuerpo se generó a partir del anticuerpo Chi-Tn (IgG1), al cual se le han añadido al extremo carboxilo terminal los dominios CH2 y CH3 de la IgA2, con el objetivo de combinar las ventajas funcionales de ambos tipos de inmunoglobulinas. El anticuerpo Tándem IgG/IgA, al igual que el anticuerpo Chi-Tn, está dirigido contra el antígeno Tn, un antígeno carbohidrato asociado a tumores (TACA) que se expresa en un alto porcentaje de carcinomas malignos, pero no en tejidos sanos.

En esta tesina se evaluó al anticuerpo Tándem IgG/IgA en términos de su producción, estructura y funcionalidad, utilizando diferentes abordajes metodológicos (SDS-PAGE, Western Blot, Citometría de Flujo, Inmunofluorescencia indirecta e Inmunohistoquímica). Los estudios mostraron que el anticuerpo Tándem IgG/IgA mantiene características estructurales de ambos tipos de inmunoglobulinas y demuestra una alta capacidad para reconocer el antígeno Tn en diversas líneas celulares tumorales (Bxpc3, T3M4, L3.6, CT26 y MC38) y en cortes histológicos de tejidos tumorales humanos.

Los resultados obtenidos muestran que el anticuerpo Tándem IgG/IgA conserva la capacidad de reconocer al antígeno Tn en diferentes presentaciones, lo que lo posiciona como un potencial candidato para la inmunoterapia dirigida en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Sin embargo, se requiere realizar ensayos adicionales *in vitro* e *in vivo* para evaluar su capacidad de generar muerte celular tumoral. Este trabajo abre nuevas perspectivas para la utilización de anticuerpos en Tándem IgG/IgA en la inmunoterapia del cáncer, con la posibilidad de mejorar la eficacia y especificidad del tratamiento antitumoral.

**Palabras clave:** Cáncer; Inmunoterapia; Glicobiología; Antígeno Tn; Anticuerpo en Tándem IgG/IgA

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
1.1 Cáncer: definición y epidemiología.....	8
1.2 Cáncer e inmunidad.....	10
1.3 Teoría de inmunoedición tumoral.....	12
1.3.1 Eliminación.....	13
1.3.2 Equilibrio.....	14
1.3.3 Escape.....	15
1.4 Tratamiento del cáncer.....	17
1.4.1 Inmunoterapia.....	19
1.5 Antígenos carbohidratos asociados a tumores (TACAs).....	22
1.5.1 Antígeno Tn.....	25
1.5.2 Anticuerpos anti-Tn.....	27
1.6 Nueva generación: anticuerpos quiméricos.....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
2.1 Objetivo general.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
3.1 Generación de anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA.....	33
3.2 SDS-PAGE.....	33
3.3 Western Blot.....	34
3.4 Líneas celulares.....	34
3.5 Citometría de flujo.....	35
3.6 Inmunofluorescencia indirecta.....	36

3.7 Inmunohistoquímica en tejido tumoral humano crecido en ratón.....	37
3.8 Biotinilación de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA.....	38
3.8.1 Biotinilación.....	38
3.8.2 ELISA.....	38
3.8.3 Cuantificación.....	39
3.9 Inmunohistoquímica en <i>array</i> de tejidos tumorales humanos.....	40
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 Evaluación de la producción de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA.....	41
4.1.1 SDS-PAGE.....	41
4.1.2 Western Blot.....	42
4.2 Evaluación de la capacidad del nuevo anticuerpo en Tándem IgG/IgA de reconocer líneas celulares tumorales Tn positivas.....	43
4.2.1 Citometría de flujo.....	43
4.2.2 Inmunofluorescencia indirecta.....	45
4.3 Evaluación de la capacidad del nuevo anticuerpo en Tándem IgG/IgA de reconocer tejidos tumorales humanos.....	48
4.3.1 Inmunohistoquímica en tejido tumoral de A549 crecido en ratón.....	48
4.3.2 Inmunohistoquímica en <i>array</i> de tejidos tumorales humanos.....	49
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
5.1 Evaluación de la producción de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA.....	54
5.2 Evaluación de la capacidad del nuevo anticuerpo en Tándem IgG/IgA de reconocer líneas celulares tumorales Tn positivas.....	55
5.3 Evaluación de la capacidad del nuevo anticuerpo en Tándem IgG/IgA de reconocer tejidos tumorales humanos.....	58
<b>6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>61</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>63</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>66</b>

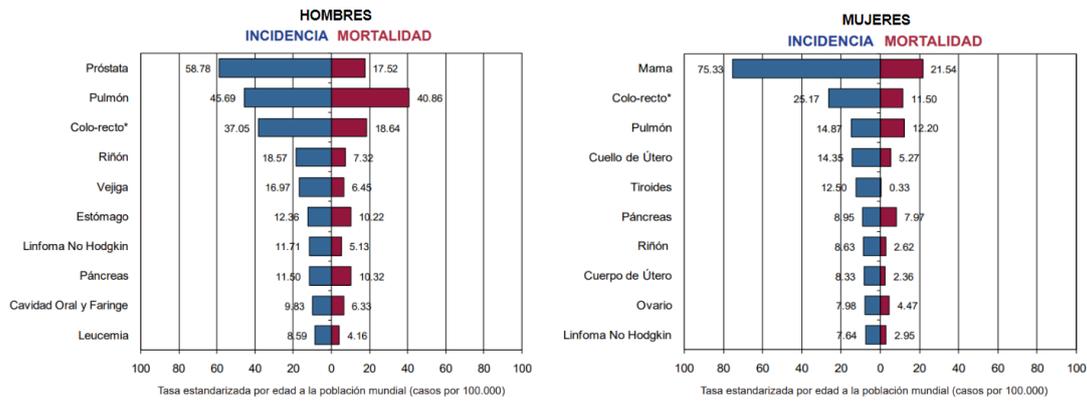
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cáncer: definición y epidemiología

El cáncer constituye un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada de células transformadas que, debido a alteraciones a nivel genético y epigenético, presentan ventajas selectivas con respecto a las células normales (Brown et. al, 2023). Las mutaciones presentes en las células tumorales son resultado de errores durante la replicación y/o reparación del ADN, y pueden ser causadas por factores exógenos tales como rayos UV o agentes químicos carcinógenos; así como por factores endógenos, como especies reactivas del oxígeno, fallas en el funcionamiento de enzimas relacionadas con la replicación o reparación del ADN, entre otros (Martincorena & Campbell, 2015). Estas mutaciones suelen encontrarse en genes relacionados con procesos como la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, así como procesos metabólicos, confiriéndoles a las células tumorales la capacidad de crecer y dividirse de manera descontrolada. Además, en ocasiones, ciertas mutaciones les permiten a las células tumorales invadir vasos sanguíneos o linfáticos y migrar hacia otros sitios del organismo, en un proceso conocido como metástasis (O'Connor & Adams, 2010).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo responsable de aproximadamente 10 millones de decesos en el año 2020 (OMS, 2020). Según las estadísticas proporcionadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, se estima que para el año 2040, el número de muertes ascenderá a 16,4 millones, consolidándose como uno de los principales problemas de salud a nivel global (National Cancer Institute, 2020). En Estados Unidos, el cáncer es la causa de muerte más frecuente en personas menores a 85 años, y se estima que en el año 2024 causará en ese país más de 600.000 muertes (Siegel, et al., 2024).

En Uruguay, las cifras no son menos preocupantes que en el resto del mundo. En nuestro país, el cáncer es la causa de muerte más frecuente en personas menores a 70 años, y se calcula que en el período comprendido entre los años 2015 y 2019 fue responsable de 8244 muertes al año en promedio. Los tipos de cáncer más frecuentes en Uruguay son el cáncer de mama, próstata, colorrectal y pulmón. En cuanto a la mortalidad, en mujeres el cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor tasa de mortalidad, seguido del cáncer de pulmón; mientras que, en los hombres, las estadísticas las lidera el cáncer de pulmón, seguido del colorrectal (**Fig. 1**) (Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2023).

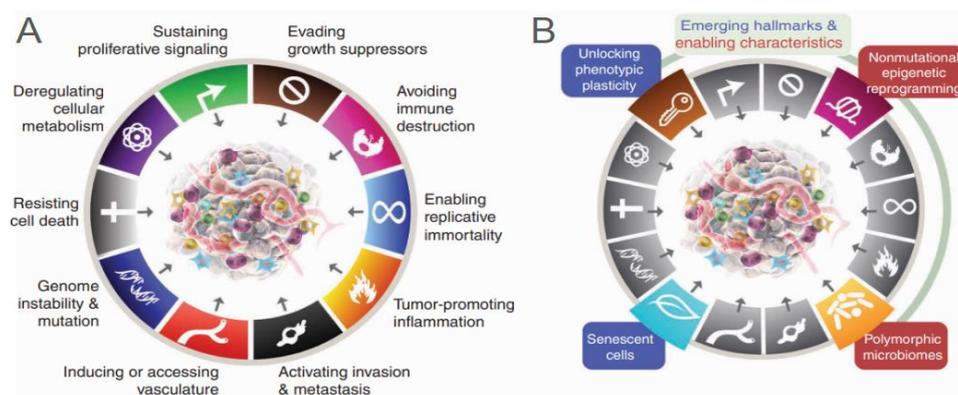


**Figura 1. Epidemiología del cáncer en Uruguay en el período 2015-2019.** Se muestran las tasas de incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en hombres y mujeres en Uruguay. Tomado y modificado de la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer (2023).

En el año 2000, Douglas Hanahan y Robert Weinberg publicaron un artículo en la revista *Cell*, donde detallaron seis alteraciones en la fisiología celular que dictan el proceso de transformación de una célula normal en una célula neoplásica y la generación de un tumor maligno. A estos seis elementos fundamentales los denominaron *hallmarks* del cáncer, y son: mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de señales supresoras del crecimiento, resistencia a la muerte celular programada, inmortalidad replicativa, inducción del proceso de angiogénesis y adquisición de la capacidad de invadir tejidos (metástasis). De este modo, los autores lograron reducir la alta complejidad y heterogeneidad del cáncer a seis características que se repiten en la mayoría, si no en todos los tipos de tumores (Hanahan & Weinberg, 2000).

En el año 2011, Hanahan y Weinberg publicaron una actualización de los *hallmarks* del cáncer. En este artículo, los autores plantearon dos “características habilitadoras”, responsables de permitir a las células adquirir los *hallmarks* ya mencionados. Por un lado, plantean la inestabilidad genómica, que eventualmente causa la generación de mutaciones al azar, acelerando la adquisición de estas características en las células y brindándoles ventajas selectivas. Por otro lado, mencionan a la inflamación crónica como otra característica habilitadora, ya que paradójicamente, la inflamación provee una variedad de moléculas al microambiente tumoral que eventualmente terminan favoreciendo la progresión y crecimiento del tumor. Asimismo, los autores proponen dos nuevos *hallmarks* emergentes. El primero, la reprogramación del metabolismo energético, refiere a cambios en las células a nivel metabólico que les permiten redirigir su metabolismo para favorecer los procesos de crecimiento y división celular. El segundo, la inmunoevasión, refiere a la capacidad de las células tumorales de evadir los mecanismos de detección y destrucción del sistema inmune (Fig. 2, A) (Hanahan & Weinberg, 2011).

En 2022, Hanahan publicó una nueva actualización sobre los *hallmarks*. En ella, definió nuevos elementos importantes en la generación de tumores neoplásicos. La plasticidad fenotípica, que le permite a las células neoplásicas evadir las restricciones de la diferenciación terminal y lograr proliferar; la reprogramación epigenética, que refiere a cambios no mutacionales a nivel de la cromatina que generan cambios en la expresión génica de las células; los microbiomas polimórficos, referidos a la variedad de microorganismos presentes en la epidermis y los tejidos mucosos, que tienen impacto sobre la salud y enfermedad de los individuos; y las células senescentes, que contribuirían a la proliferación celular, evasión de la apoptosis, inducción de la angiogénesis, estimulación de la metástasis y supresión de mecanismos inmunes (**Fig. 2, B**) (Hanahan, 2022).



**Figura 2. Hallmarks del cáncer.** En la Figura 2A, se observan los ocho *hallmarks* y las dos características habilitadoras propuestas por Hanahan y Weinberg en 2011. En la Figura 2B, se añaden los cuatro elementos propuestos por Hanahan en el año 2022. Tomado de Hanahan, 2022.

Los avances en el estudio del cáncer a nivel molecular de los últimos tiempos han permitido dilucidar la heterogeneidad genética, transcriptómica y epigenética de los tumores, dirigiendo cada vez más los esfuerzos del personal científico y médico al desarrollo de la medicina personalizada (Palucka & Coussens, 2016). De esta manera, la comprensión del cáncer ha evolucionado, desde entender a los tumores únicamente como masas de células que crecen descontroladamente, a comprenderlos como tejidos heterogéneos formados por una gran variedad de células, que interactúan entre sí de maneras diversas dentro del microambiente tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011).

## 1.2 Cáncer e inmunidad

A pesar de que actualmente la estrecha relación entre el cáncer y el sistema inmune nos resulta obvia, la comprensión de cómo estos dos elementos interactúan y su importancia es relativamente reciente en la historia. Uno de los primeros intentos de la comunidad

científica en relacionar al sistema inmune y el cáncer fue por parte de los alemanes Fehleisen y Busch, quienes de manera independiente observaron como pacientes oncológicos que cursaban erisipela presentaban una disminución significativa del tamaño tumoral (Busch, 1867; Fehleisen, 1882). No obstante, fue el cirujano William Bradley Coley, el cual hoy en día se considera el padre de la inmunoterapia, quien realizó avances significativos en el año 1891 (Dobosz & Dzieciatkowski, 2019). Coley observó que numerosos casos de pacientes con cáncer presentaban remisión espontánea luego de desarrollar erisipela, por lo que decidió inocular con toxinas estreptocócicas para tratar a pacientes con sarcoma. Sus intentos fueron exitosos, llegando incluso a denominar a estas toxinas como “toxinas de Coley” (Coley, 1893). Sin embargo, debido a diversos factores, los avances de Coley no siguieron desarrollándose de manera profunda en la comunidad científica (Dobosz & Dzieciatkowski, 2019).

Si bien hubo algunos descubrimientos importantes luego de Coley, no fue sino hasta la segunda mitad del siglo XX que la inmunología recobró importancia. Esta época estuvo marcada por hitos como el descubrimiento del interferón (Isaacs & Lindenmann, 1957), las células T (Miller et al., 1967), las células dendríticas (Steinman, 1973) y las células *natural killers* (NKs) (Kiessling et al., 1975). Con el resurgimiento de la inmunología, resurgió también un concepto que había sido dejado atrás: la inmunovigilancia. La noción de que el sistema inmune tiene la capacidad de reconocer y eliminar células malignas fue concebida por primera vez por Paul Ehrlich (Ehrlirch, 1909). Pasaron más de cuarenta años para que el concepto planteado por Ehrlich fuera definido como la teoría de la inmunovigilancia. Esto fue llevado a cabo por dos científicos, Burnet y Thomas, basándose en la observación de que, al realizar trasplantes singénicos de tumores en ratones, existía un rechazo inmuno-mediado de los mismos (Burnet, 1957; Thomas, 1959). No obstante, la obtención de resultados no concluyentes sumados a la observación por parte de otros científicos de que ratones nude atímicos no presentaban mayor riesgo de desarrollar cáncer con respecto a los *wild type* (Ryagaard & Povlsen, 1974), llevaron a que la teoría se abandonara.

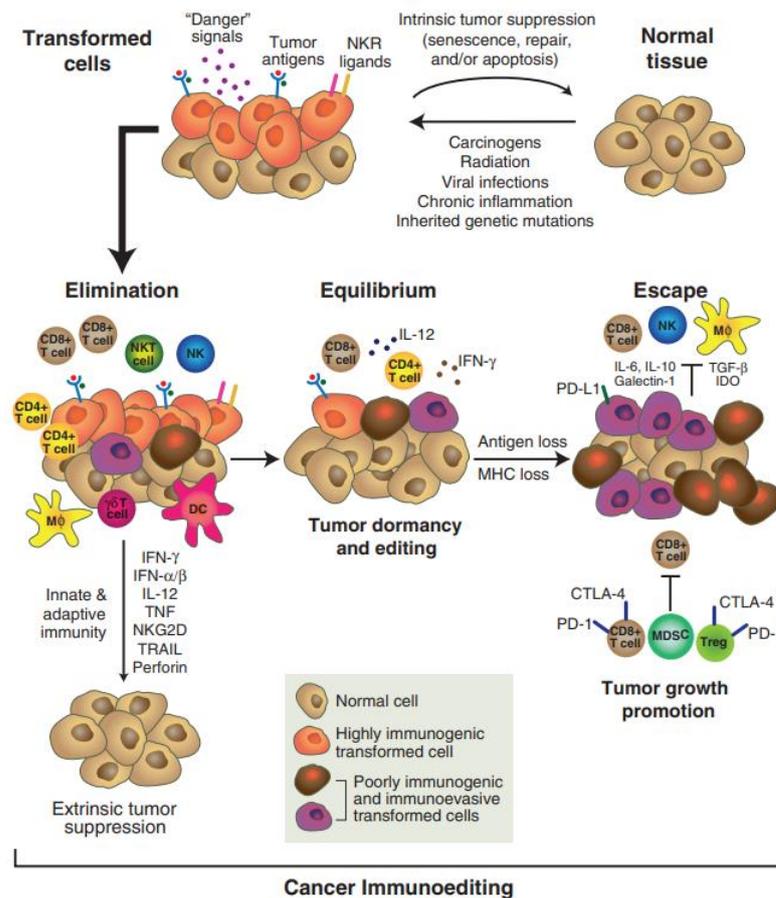
En la década de 1990, el concepto de inmunovigilancia recobró fuerza debido a una serie de nuevos descubrimientos. En 1994, Dighe y colaboradores reportaron que sin la acción del IFN- $\gamma$ , la tumorigenicidad de las células tumorales aumentaba significativamente, demostrando la importancia de esta citoquina en la inmunidad antitumoral (Dighe, 1994). Adicionalmente, en 1998, se descubrió que ratones deficientes para el receptor de IFN- $\gamma$  desarrollaban tumores con mayor velocidad que los ratones *wild type* al ser expuestos a metilcolantreno, un carcinógeno químico (Kaplan et al., 1998). A esto, se le sumaron nuevas observaciones tales como que ratones *knockout* para perforina eran más propensos a desarrollar tumores al ser expuestos al metilcolantreno (van den Broek, et al., 1996; Street, et al., 2001), o que ratones deficientes en RAG2 eran más susceptibles a desarrollar sarcoma

inducido por metilcolantreno (Shankaran, et al., 2001). Las observaciones mencionadas en ratones, sumadas a observaciones en seres humanos, relacionadas a la mayor susceptibilidad de individuos inmunodeprimidos a desarrollar cáncer, soportan la teoría de la inmunovigilancia. Sin embargo, estos hallazgos seguían sin explicar cómo el cáncer podía ocurrir en personas inmunocompetentes. Para responder a esta pregunta, Schreiber propuso el término inmunoedición (Manjili, 2011).

### **1.3 Teoría de inmunoedición tumoral**

Originalmente, el concepto de inmunovigilancia refería a la capacidad del sistema inmune de proteger al organismo contra la aparición de tumores y de actuar únicamente en etapas tempranas de la transformación de las células tumorales. Sin embargo, en 2001 un hallazgo importante añadió información crucial: el sistema inmune no sólo tiene un rol protector contra los tumores, sino que también tiene un rol “modelador” sobre la inmunogenicidad del tumor, promoviendo la selección de células tumorales menos inmunogénicas capaces de evadir los mecanismos de destrucción (Shankaran, et al., 2001). Este rol dual del sistema inmune es lo que explica la paradoja del desarrollo de tumores en individuos inmunocompetentes, y es lo que llevó a Dunn y colaboradores a actualizar el término de inmunovigilancia, para plantear el de inmunoedición (Dunn, et al., 2002).

La teoría de inmunoedición tumoral plantea que el proceso de desarrollo de un tumor maligno ocurre en tres fases conocidas como las “3 E”: Eliminación, Equilibrio y Escape (**Fig. 3**). Estas fases ocurren secuencialmente, aunque ciertas células tumorales pueden partir desde una fase más tardía, sin tener que pasar por las fases más tempranas. Es importante mencionar que para que el mecanismo de inmunoedición ocurra, primero deben fallar los mecanismos de supresión tumoral intrínsecos, es decir, reparación del ADN, senescencia y/o muerte programada (Schreiber et al., 2011).



**Figura 3. Inmunoección del cáncer.** Según la teoría de inmunoección tumoral, el proceso de desarrollo de un cáncer ocurre en tres fases secuenciales: Eliminación, Equilibrio y Escape. Tomado de Schreiber et al., 2011.

### 1.3.1 Eliminación

A esta primera fase, Schreiber la describe como una versión actualizada del concepto de inmunovigilancia. En esta fase, el sistema inmune innato y adaptativo trabajan en conjunto para detectar y eliminar células transformadas que han escapado a los mecanismos de supresión tumoral intrínsecos, antes de que se desarrolle un tumor clínicamente detectable (O'Donnell et al., 2018; Schreiber et al., 2011).

Actualmente, sabemos que la presencia de células transformadas puede generar la aparición de "señales de peligro" que alertan al sistema inmune. Por ejemplo, se ha observado que algunas células tumorales presentan altos niveles de moléculas pro-fagocíticas expuestas en su superficie, como la fosfatidilserina o la calreticulina (Vallabhapurapu et al., 2015; Chao et al., 2010). En este mismo sentido, en algunos casos las células tumorales presentan aumentada su expresión de moléculas de estrés celular como MICA/B en humanos, o RAE-1 y H60 en ratones. Estas moléculas de estrés celular son ligandos NKG2-D, un receptor activador presente en las células *natural killers* y en otras células de origen linfocítico como linfocitos

TCD8<sup>+</sup> activados, linfocitos NKT, etc. La unión de los ligandos al receptor NKG2-D promueve la liberación de citoquinas proinflamatorias al microambiente, contribuyendo a la respuesta inmune antitumoral (Guerra et al., 2008; Schreiber et al., 2011).

Además, las células tumorales exhiben antígenos que las diferencian de las células normales. Estos antígenos pueden ser reconocidos por células inmunes, las cuales si se activan pueden contribuir a la eliminación del tumor (Schreiber et al., 2011; Ponomarev & Shubina, 2019). Los antígenos tumorales se pueden dividir en dos categorías principales: antígenos asociados a tumores (TAA), o antígenos específicos de tumores (TSA) (Feola et al., 2020). Los TAA comprenden proteínas propias cuya expresión se encuentra alterada en las células tumorales con respecto a las células normales. Estos últimos, incluyen proteínas restringidas a células germinales, o proteínas involucradas en la diferenciación de ciertos linajes celulares, entre otras (Hollingsworth & Jansen, 2019). Los TSA se conforman por dos subcategorías, los neoantígenos y los antígenos oncovirales. Los neoantígenos refieren a antígenos específicos de tumores producto de mutaciones en el ADN de las células tumorales, y tienen la particularidad de ser específicos de cada paciente (Xie et al., 2023). Por último, los antígenos oncovirales, como su nombre lo indica, son proteínas que tienen origen viral e inducen la transformación de células normales a células malignas. Un virus muy conocido por poseer la capacidad de transformar células normales es el Virus del Papiloma Humano (Feola et al., 2020).

Cuando las células del sistema inmune innato y adaptativo son capaces de eliminar completamente a las células tumorales, la fase de eliminación representa un punto final del proceso de inmunoección (Schreiber et al., 2011). Sin embargo, en ocasiones algunas variantes de células tumorales pueden resistir el proceso de eliminación, y entrar en la siguiente etapa de la inmunoección.

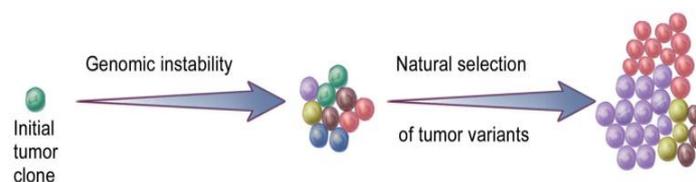
### **1.3.2 Equilibrio**

En la fase de equilibrio, el sistema inmune adaptativo se encarga de mantener bajo control el crecimiento del tumor. Esto se debe principalmente a que la velocidad de proliferación de las células tumorales se iguala a la velocidad de muerte de las mismas provocada por las células del sistema inmune (Phan & Croucher, 2020). Además, se ha propuesto que el sistema inmune en la fase de equilibrio permite la permanencia de células tumorales residuales en un estado funcional de dormancia, y estas células pueden permanecer en ese estado latente por años antes de reanudar su proliferación (Aguirre-Ghiso, 2007). La fase de equilibrio es la etapa más larga del proceso de inmunoección, la cual puede durar incluso durante toda la vida del individuo, y su principal diferencia con la fase de eliminación es que en esta fase no interviene el sistema inmune innato, sino que únicamente interviene el sistema inmune adaptativo (Schreiber, 2011).

En el año 1998, dos pacientes fueron sometidos a un trasplante de riñón que resultó en ambos casos satisfactorio. Sin embargo, a los dos años, ambos pacientes fallecieron debido a un melanoma secundario, sin poderse localizar en ninguno de ellos un melanoma primario. Al rastrear los casos, se encontró que los dos pacientes habían recibido un riñón del mismo donante, a quien en 1982 le habían removido un melanoma primario y presentaba un diagnóstico clínico libre de enfermedad. Los melanomas secundarios de los pacientes se podrían explicar por la presencia de células de melanoma en los riñones trasplantados en un estadio de equilibrio (MacKie et al., 2003). Este y otros casos clínicos similares fueron los pioneros en plantear la idea del equilibrio. No obstante, la evidencia más contundente provino de un estudio donde se demostró que ratones inmunocompetentes tratados con dosis bajas de metilcolantreno, albergaban células tumorales ocultas, incluso sin desarrollar tumores clínicamente detectables. Se demostró además que estas células neoplásicas eran células transformadas pero no proliferativas, y que el bloqueo de componentes del sistema inmune adaptativo provocaba la aparición de tumores en el sitio de inoculación de manera acelerada en la mitad de los ratones (Koebel et al., 2007).

### 1.3.3 Escape

Los mismos mecanismos inmunes responsables de mantener al tumor en fase de equilibrio, son los que terminan ejerciendo presión selectiva sobre las células tumorales, promoviendo la supervivencia de aquellas que poseen las mutaciones más inmunoevasivas (**Fig. 4**). Estas células malignas capaces de evadir los mecanismos de reconocimiento y destrucción del sistema inmune pueden entonces ingresar a la fase de escape, reanudar su proliferación y transformarse en tumores clínicamente detectables (Schreiber et al., 2011).



**Figura 4. Selección natural de variantes de células tumorales inmunoevasivas.** La acción prolongada del sistema inmune en la fase de equilibrio ejerce presión selectiva y favorece la selección de variantes de células tumorales que logran escapar de la acción de las células inmunes. Tomado de Khong & Restifo, 2002.

Existen diversidad de mecanismos por los cuales las células tumorales son capaces de evadir la acción del sistema inmune. La pérdida de antígenos inmunogénicos capaces de activar al sistema inmune es frecuente en células tumorales que logran ingresar a la fase de escape. Adicionalmente, las células tumorales pueden inhibir la maduración de células

dendríticas mediante la secreción de diversas moléculas inmunosupresoras como IL-10 (Williams et al., 2004), factor estimulante de colonias de macrófagos o M-CSF (Nefedova et al., 2004), factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF (Gabrilovich et al., 1996), TGF- $\beta$  (Zong et al., 2016), e indolamina 2,3-dioxigenasa o IDO (Munn y Mellor, 2016) en el microambiente tumoral. Otro mecanismo por el cual las células tumorales son capaces de evadir al sistema inmune es mediante la alteración de la vía de presentación de antígenos en MHC I (Dhatchinamoorthy et al., 2021), evitando así la acción citotóxica de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En este sentido, se ha visto en algunos tipos de cáncer la reducción o incluso pérdida completa de la expresión de las proteínas TAP1/TAP2, tapasina, ERAP,  $\beta$ 2-microglobulina, componentes del inmunoproteasoma y MHC I (Drake et al., 2002; Taylor & Balko, 2022).

Las células tumorales también pueden promover el reclutamiento de poblaciones de células inmunosupresoras al microambiente tumoral, entre las que se destacan las células T reguladoras (T<sub>REG</sub>) y las células mieloides supresoras (MDSCs) (Schreiber et al., 2011). Las T<sub>REG</sub> son una subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> caracterizadas funcionalmente por ser capaces de regular las respuestas efectoras del sistema inmune. Uno de los factores de transcripción maestros de este subtipo celular es el factor de transcripción FOXP3, sin embargo, no todas las T<sub>REG</sub> expresan este marcador. La función de los linfocitos T<sub>REG</sub> consiste en regular las respuestas inmunes efectoras y los mecanismos de tolerancia. Esto lo logran a través de diferentes mecanismos moleculares, entre los cuales se encuentran: la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$ ; la expresión de las moléculas inhibitoras CTLA-4, PD-1 y PD-L1; y la privación de IL-2. De esta manera, los linfocitos T<sub>REG</sub> son capaces de suprimir la acción de los linfocitos T efectores (Togashi et al., 2019). Por otra parte, las MDSCs son neutrófilos o monocitos que han sido activados patológicamente, y tienen una potente actividad inmunosupresora. Existen diferencias particulares entre las MDSCs de origen monocítico y granulocítico, aunque ambos tipos de células comparten ciertas características bioquímicas que les permiten ejercer su función inmunosupresora. Entre ellas, se encuentran la sobreexpresión del factor de transcripción STAT3, inducción de estrés del retículo endoplasmático y expresión de arginasa 1 (Veglia et al., 2021). Las células tumorales pueden secretar quimioquinas como CCL2, CCL5 o CXCL5, lo que promueve el reclutamiento de MDSCs al microambiente tumoral (O'Donnell et al., 2018). Se ha visto que las MDSCs favorecen el crecimiento del tumor, debido a que principalmente promueven la supervivencia de las células tumorales, la angiogénesis, invasión y metástasis (Condamine et al., 2015). Además de las T<sub>REG</sub> y las MDSCs, una tercera población que puede ser reclutada al microambiente son los macrófagos asociados a tumores o TAMs. Los TAMs son capaces de secretar las citoquinas IL-10 y TGF- $\beta$ , promoviendo la invasión y metástasis, neovascularización de los tejidos tumorales e inhibición de las funciones de los linfocitos T efectores (Mantovani et al., 2017).

Otro mecanismo por el cual los tumores pueden evadir la respuesta inmune es la modulación de la expresión de transportadores celulares de las células inmunes. El microambiente tumoral puede modular la expresión de transportadores de lípidos, glucosa, lactato, aminoácidos y nucleósidos en las células del sistema inmune, afectando su funcionalidad y la capacidad de reconocer y destruir células tumorales (Chen et al., 2023). Todos los mecanismos mencionados anteriormente, promueven la evasión del sistema inmune y el inmunoescape, favoreciendo el crecimiento tumoral y dificultando la eliminación del tumor. Comprender la importancia del sistema inmune en la eliminación de un tumor fue lo que llevó al surgimiento de las inmunoterapias, tratamientos que revolucionaron al mundo de la oncología y serán descritos más adelante en este trabajo.

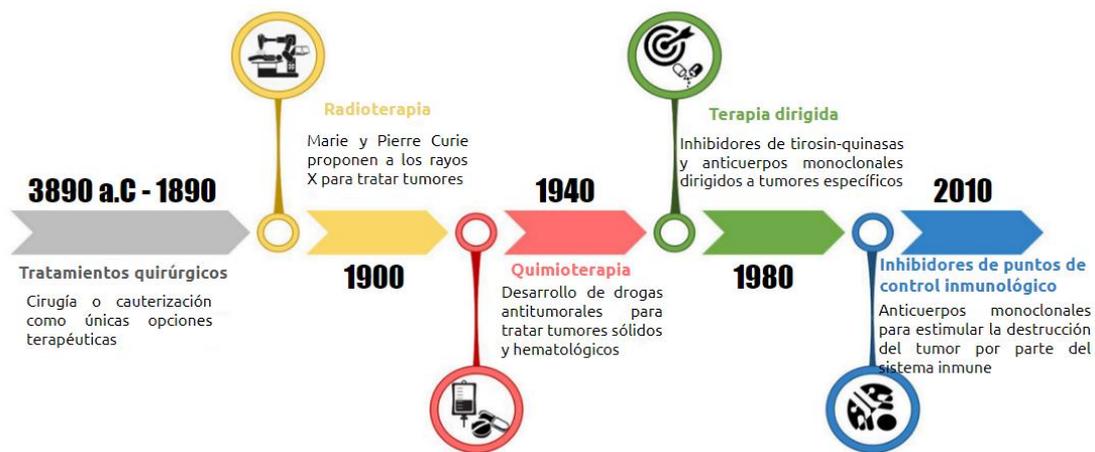
#### 1.4 Tratamiento del cáncer

Si bien el cáncer es definido de manera frecuente como una “enfermedad moderna”, existen registros de cánceres desde la Antigüedad. Se han encontrado papiros del antiguo Egipto que describen entre otras cosas, casos de cánceres de mama y su extirpación quirúrgica, así como información sobre cánceres de piel, estómago, colorrectal y de útero. En aquella época, no se atribuían causas biológicas a la enfermedad, sino que se adjudicaba a la voluntad divina (Falzone et al., 2018). Desde entonces y hasta el siglo XIX inclusive, el enfoque terapéutico se centraba en la realización de cirugías radicales para extraer los tumores superficiales, mientras que para aquellos catalogados como incurables se recurría a terapias paliativas, a menudo empleando extracto de *Papaver somniferum*, planta de la cual se obtiene el opio (Faguet, 2014).

A fines del siglo XIX, Wilhelm Conrad Röntgen describió por primera vez los rayos X (Röntgen, 1896). Sólo unos años después, Marie y Pierre Curie identificaron una sustancia con gran poder radioactivo, a la que llamaron Radio, y propusieron su uso terapéutico (Curie & Curie, 1899). No fue hasta el año 1920 que Claudius Regaud llevó a cabo un experimento en carneros donde demostró que el fraccionamiento de la radiación en múltiples dosis tenía la capacidad de tratar diversos tipos de cáncer de manera efectiva, al tiempo que reducía los efectos secundarios adversos asociados. Esto dio nacimiento a la radioterapia moderna como la conocemos actualmente (Deloch et al., 2016). A partir del siglo XX, el rápido avance de la ciencia y el aumento del interés en el cáncer por parte de los científicos y empresas farmacéuticas ha permitido el surgimiento de numerosas terapias (**Fig. 5**).

En la década de los 40, durante la Segunda Guerra Mundial, un descubrimiento accidental volvió a revolucionar el campo de la oncología. En el afán de desarrollar nuevas

armas químicas útiles para la guerra, la fabricación de bombas de gas pimienta demostró que la mostaza nitrogenada utilizada era altamente citotóxica, sobre todo para células con altas tasas de renovación. Esto es debido a que las mostazas nitrogenadas son agentes alquilantes, que generan entrecruzamientos intercatenarios y mutaciones puntuales en el ADN que llevan a la muerte celular (Brookes, 1990; Falzone et al., 2018). Este hito representó el nacimiento de la quimioterapia, e inició una serie de descubrimientos de diversos agentes quimioterapéuticos que son utilizados hasta el día de hoy. Entre ellos, encontramos agentes alquilantes como el cisplatino o la ciclofosfamida, antimetabolitos como el metotrexato, y taxanos como el docetaxel, entre otros (Anand et al., 2023).



**Figura 5. Línea temporal de las terapias utilizadas para tratar el cáncer a lo largo de la historia.** Luego del descubrimiento de la radioterapia a principios del siglo XX, el rápido avance de la ciencia permitió el surgimiento de diversas terapias antitumorales, que buscan ser cada vez más efectivas y menos tóxicas para los pacientes oncológicos. Tomado y modificado de Falzone et al., 2018.

Sin embargo, los agentes quimioterapéuticos no dejan de ser fármacos citotóxicos que no distinguen entre células transformadas y células normales. Esto acarrea consigo daño a tejidos sanos y por lo tanto numerosos efectos secundarios, siendo los más comunes anemia, fatiga, pérdida de pelo, náuseas y vómitos, diarrea, entre muchos otros (National Cancer Institute).

En la década de 1980, los avances en la biología celular, biología molecular e inmunología permitieron identificar moléculas con un rol activo en la transformación neoplásica. El nuevo enfoque de la oncología ahora estaba en desarrollar terapias dirigidas hacia blancos moleculares específicos, mediante el bloqueo con moléculas inhibitoras o anticuerpos monoclonales (Falzone et al., 2018).

### 1.4.1 Inmunoterapia

Comprender a fondo los mecanismos por los cuales el sistema inmune es capaz de reconocer, destruir y modular la inmunogenicidad del cáncer, permitió el surgimiento de una nueva forma de encarar el tratamiento del cáncer: la inmunoterapia (Shimu et al., 2022). Actualmente, existen más de una docena de inmunoterapias aprobadas para el tratamiento del cáncer, y muchas otras se encuentran en etapas de ensayos clínicos (Riley et al., 2019). Entre las estrategias terapéuticas contra el cáncer que involucran al sistema inmune destacan el uso de citoquinas, inhibidores de puntos de control inmunológico, vacunas antitumorales, radioinmunoterapia, anticuerpos monoclonales, células T con receptores de antígeno quiméricos (células CAR T) y terapia con virus oncolíticos (Kumar et al., 2021).

El uso de citoquinas como monoterapia en el tratamiento del cáncer está considerablemente limitado debido a sus bajas tasas de respuesta y toxicidad dosis-dependiente. Hasta la fecha, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) ha aprobado dos citoquinas para su uso en este contexto. La IL-2 ha sido aprobada para el tratamiento del carcinoma renal avanzado (RCC) y el melanoma metastásico, mientras que el IFN $\alpha$  se emplea en el tratamiento de la leucemia de células pilosas, linfoma folicular, melanoma y sarcoma de Kaposi asociado al SIDA (Berraondo et al., 2018).

Las vacunas antitumorales buscan desencadenar la respuesta inmune contra el tumor, y pueden ser administradas de manera profiláctica o como tratamiento una vez que el cáncer ya se ha desarrollado. Pueden clasificarse en cuatro grandes grupos de acuerdo a su composición: vacunas basadas en células, vacunas basadas en vectores virales, vacunas basadas en epítopes tumorales peptídicos y vacunas de ácidos nucleicos. Estos tipos de vacunas principalmente están diseñadas para activar una respuesta inmune adaptativa celular y/o humoral contra antígenos tumorales, que pueden ser compartidos o personalizados para cada paciente (Liu et al., 2022; Lin et al., 2022). Actualmente, sólo unas pocas vacunas antitumorales han sido aprobadas por la FDA. Sin embargo, varios estudios que evalúan la eficacia de estas se encuentran en la etapa de ensayos clínicos. Entre las vacunas aprobadas por la FDA encontramos a la vacuna contra el bacilo Calmette-Guerin (BCG) para el tratamiento del cáncer de vejiga, Sipuleucel-T para el cáncer de próstata metastásico y talimogene laherparepvec para el melanoma recurrente (Hargrave et al., 2023).

Las terapias celulares que utilizan células CAR T implican la extracción de linfocitos T del paciente, los cuales son luego genéticamente modificados para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) en su membrana. Este receptor está compuesto por un ectodominio de reconocimiento, una región bisagra, un dominio transmembrana y un dominio citosólico. En el dominio citosólico se encuentra uno o más motivos activadores, el principal de ellos es

derivado del CD3 $\zeta$ , y puede presentarse junto con dominios coestimuladores que varían según el tipo de CAR. Actualmente, los CAR T aprobados se dirigen contra el antígeno CD19 o contra el antígeno de maduración de la célula B (BCMA), y están indicados para algunos tipos de leucemia, linfomas de células B y mielomas (Cappell & Kochenderfer, 2023). Si bien es un tratamiento que ha revolucionado el campo de la oncología, sigue presentando grandes limitaciones. Algunas de ellas son la poca eficacia para tratar tumores sólidos, gran toxicidad y desarrollo de resistencia (Sternner & Sternner, 2021).

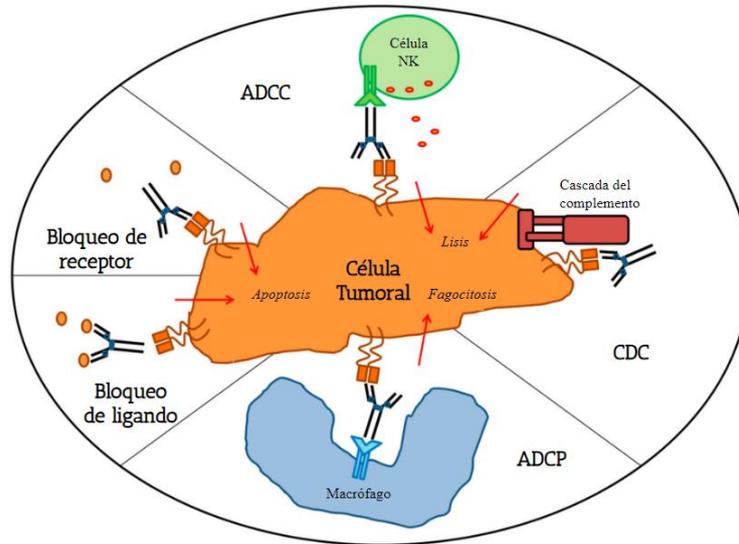
Los anticuerpos monoclonales surgieron a mediados de la década de 1970 con el desarrollo de la técnica de hibridomas por parte de Köhler y Milstein (Köhler & Milstein, 1975). Originalmente se obtenían anticuerpos murinos, por lo que su uso estaba restringido al diagnóstico de tumores. Sin embargo, más adelante surgieron técnicas que permitieron humanizar a los anticuerpos monoclonales, abriendo la posibilidad de utilizarlos en terapia. En el año 1997 la FDA aprobó el primer anticuerpo monoclonal terapéutico, el Rituximab, un anticuerpo anti-CD20 utilizado para el tratamiento de linfoma de células B (Zahavi & Weiner, 2020). Hoy en día, existen más de un centenar de anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA para el tratamiento de una gran diversidad de patologías, y casi la mitad de estos anticuerpos son para uso en terapias del cáncer (Delgado & Garcia-Sanz, 2023).

Los anticuerpos monoclonales utilizados en terapia del cáncer se pueden clasificar en tres categorías: aquellos que interfieren con procesos pro-tumorales como la angiogénesis o migración celular, aquellos que reconocen antígenos de superficie presentes en células del sistema inmune, y por último aquellos que reconocen directamente antígenos de superficie de células tumorales (Delgado & Garcia-Sanz, 2023).

El primer grupo lo conforman anticuerpos como el Ramucirumab, un anticuerpo que se une al VEGFR2 e impide la unión de su ligando VEGF, inhibiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos (Krupitskaya & Wakelee, 2009); o el Gemtuzumab ozogamicina, un anticuerpo monoclonal conjugado a droga que reconoce la molécula de adhesión CD33 y es utilizado en leucemia mieloide aguda (Godwin et al., 2017). El segundo grupo lo conforman una serie de anticuerpos que reconocen moléculas inmunomoduladoras presentes en células inmunes, y son conocidos como inhibidores de puntos de control inmunológico o *immune checkpoint inhibitors* (Delgado & Garcia-Sanz, 2023). Dentro de ellos encontramos al Ipilimumab, un anticuerpo monoclonal que reconoce la molécula CTLA-4 expresada en células T activadas y células T reguladoras. Esta molécula compite con el receptor CD28 por las señales coestimuladoras CD80 y CD86. CTLA-4 posee mayor afinidad por CD80 y CD86 que CD28, por lo que su bloqueo permite inhibir sus efectos inmunomoduladores y reactivar la respuesta inmune antitumoral (Graziani et al., 2012; Riley et al., 2019). Además del bloqueo

de CTLA-4, dentro de los inhibidores de puntos de control inmunológico encontramos anticuerpos dirigidos contra el eje PD-1/PD-L1. La interacción de PD-1, expresado en linfocitos T activados, con su ligando PD-L1, regula negativamente los mecanismos efectores de las células T. Esto es aprovechado por muchas células tumorales, que sobreexpresan PD-L1 para inhibir la respuesta efectora de linfocitos T. El bloqueo de cualquiera de estas dos moléculas revierte los efectos inmunosupresores en varios tipos de cáncer, reactivando la respuesta inmune antitumoral. Dentro de los anticuerpos contra el eje PD-1/PD-L1 aprobados por la FDA encontramos al Pembrolizumab (anti-PD-1), Nivolumab (anti-PD-1), Atezolizumab (anti-PD-L1), Avelumab (anti-PD-L1) y Durvalumab (anti-PD-L1) (Riley et al., 2019).

Finalmente, el último grupo de anticuerpos monoclonales utilizados en terapia del cáncer lo conforman varios anticuerpos dirigidos contra blancos moleculares específicos expresados en células tumorales. A su vez, podemos clasificarlos en dos subgrupos: aquellos que reconocen antígenos de superficie de células tumorales, y aquellos que reconocen receptores o ligandos importantes para la supervivencia tumoral. Dentro del primer subgrupo encontramos por ejemplo al Rituximab y Ofatumumab, que reconocen la molécula CD20, o Alemtuzumab, dirigido hacia la glicoproteína CD52 (Miller et al., 2013). En el segundo, encontramos al Cetuximab, que reconoce al receptor EGFR y estimula su internalización y degradación, y a los anticuerpos monoclonales Trastuzumab y Pertuzumab, que reconocen al receptor HER2 y bloquean su señalización (Delgado & Garcia-Sanz, 2023). Además del bloqueo de la molécula blanco, estos anticuerpos monoclonales son capaces de desencadenar mecanismos efectores que promueven la muerte celular tumoral (**Fig. 6**). Entre ellos, se ha visto que son capaces de desencadenar citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) en las células NKs, promover la fijación del complemento por vía clásica, y estimular la fagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) por parte de los macrófagos (Zahavi & Weiner, 2020). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra blancos moleculares específicos representan una estrategia prometedora en inmunoterapia, permitiendo la administración de anticuerpos que reconocen antígenos expresados en células tumorales pero no en células sanas, canalizando así la muerte celular selectiva hacia los tumores y reduciendo al mínimo los efectos adversos en tejidos sanos.



**Figura 6. Mecanismos efector desencadenados por anticuerpos monoclonales.** ADCC: citotoxicidad mediada por anticuerpos; CDC: citotoxicidad dependiente del complemento; ADCP: fagocitosis celular dependiente de anticuerpos. Tomado y modificado de Zahavi & Weiner, 2020.

### 1.5 Antígenos carbohidratos asociados a tumores (TACAs)

Como se mencionó anteriormente, existen dos grupos de antígenos tumorales, los TAA y los TSA. Dentro del primer grupo, se suele mencionar principalmente a antígenos de origen proteico. Sin embargo, existe también un grupo muy importante de antígenos carbohidratos asociados a tumores (TACAs).

Los glicanos o polisacáridos, son moléculas esenciales para la vida y están presentes en todos los seres vivos. En los mamíferos, los glicanos pueden estar conformados por una combinación de diez monosacáridos en total: glucosa (Glc), galactosa (Gal), manosa (Man), fucosa (Fuc), xilosa (Xyl), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), ácido glucurónico (GlcA), ácido idurónico (IdoA) y ácidos siálicos (SAs), que se unen entre sí por enlaces  $\alpha$  o  $\beta$ -glucosídicos, formando estructuras que pueden ser en cadena o ramificadas. En las células, los glicanos se pueden encontrar unidos a proteínas o lípidos, formando estructuras más complejas como glicoproteínas, proteoglicanos y glucolípidos (Kudelka et al., 2015).

En humanos, existen dos tipos de glicosilación por las cuales una proteína puede unirse a un glicano: *N*-glicosilación y *O*-glicosilación. La *N*-glicosilación consiste en la unión entre un *core* glucídico cuya estructura es variable, y un residuo de asparagina (Asn) que se encuentre en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, siendo X cualquier aminoácido menos prolina. Esta

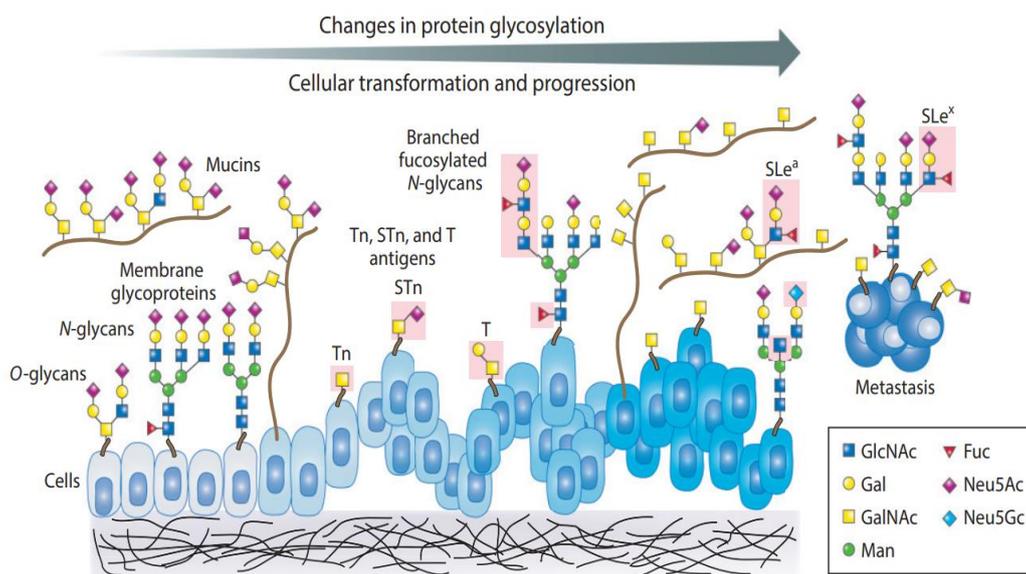
unión se da específicamente entre una GlcNAc y el nitrógeno de la cadena lateral del residuo de Asn, mediante un enlace amida. Por otra parte, la *O*-glicosilación ocurre sobre aminoácidos que poseen un grupo funcional hidroxilo en su cadena lateral, como la serina y treonina, aunque en ciertos casos se puede dar sobre residuos de tirosina (Reily et al., 2019; Kudelka et al., 2015). Este tipo de glicosilación tiene gran importancia en las mucinas, glicoproteínas con alto porcentaje de *O*-glicosilación que forman parte del mucus (Johansson & Hansson, 2016).

La glicosilación de proteínas y lípidos se extiende a lo largo de todos los seres vivos y posee gran importancia en numerosos procesos fisiológicos de las células. Por ejemplo, las estructuras glucídicas presentes en la superficie celular influyen las interacciones con el medio extracelular proveyendo ligandos importantes en procesos como la adhesión celular. Además, los glicanos de superficie pueden alterar de manera directa la funcionalidad y señalización proteica. Los glicanos también pueden contribuir en procesos como el plegamiento de proteínas, regulación de proteínas nucleares y citosólicas, inmunovigilancia, procesos inflamatorios, acción de diversas hormonas, entre otros (Varki, 1993; Moremen et al., 2012).

Teniendo en cuenta la relevancia e impacto de los glicanos en diversos procesos biológicos, es esperable que cambios en la glicosilación de las células estén asociados a cambios en la biología de las mismas, y en particular, a la transformación celular. En el cáncer, las modificaciones en la glicosilación celular suelen estar estrechamente ligadas a cambios asociados a las glicosiltransferasas y/o glucosidasas, enzimas encargadas de catalizar la formación o hidrólisis de enlaces glicosídicos, respectivamente (Lairson et al., 2008; Stowell et al., 2015). En las células tumorales, puede verse alterada la expresión y actividad de glicosiltransferasas y glucosidasas específicas, la localización de glicosiltransferasas, la expresión de chaperonas involucradas en el correcto plegamiento de estas enzimas, así como variaciones en la abundancia de sustratos y/o cofactores involucrados en el proceso de glicosilación (Stowell et al., 2015; Pinho & Reis, 2015).

Los cambios en la expresión de proteínas involucradas en la biosíntesis de glicanos pueden deberse a mutaciones a nivel genético y/o epigenético, y varían según el tipo de cáncer. Existen tres tipos de alteraciones en la glicosilación de las células producto de cambios en la expresión de estas proteínas, que comúnmente se encuentran asociadas al cáncer: a) aumento en la expresión de glicanos truncados o incompletos, b) aumento de las ramificaciones en *N*-glicanos complejos, y c) aumento o cambios en la presencia de glicanos que contienen ácido siálico (Mantuano et al., 2020). Cada una de estas alteraciones da lugar a diferentes antígenos glucídicos que son específicos de células tumorales, y que a su vez están asociados a diferentes etapas de la progresión tumoral (**Fig. 7**). Por ejemplo, los *O*-glicanos truncados dan lugar a

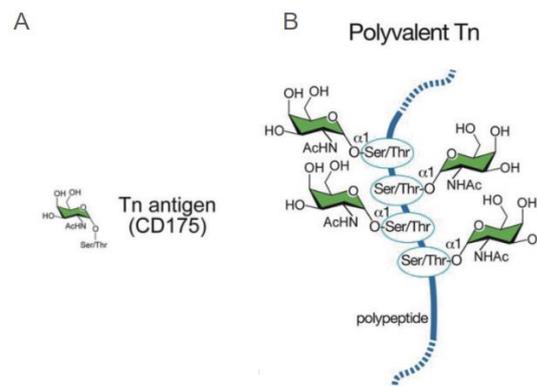
tres estructuras principalmente: el antígeno T (también llamado TF o Thomsen-Friedenreich), antígeno Tn, y su forma sialilada, sialil-Tn (STn). La expresión de estos O-glicanos truncados en tejidos sanos es rara en comparación con tejidos tumorales (Cao et al., 1996; Mantuano et al., 2020). La neo y sobre-expresión de los antígenos Tn y STn ha sido reportada en numerosos tumores epiteliales y no epiteliales, y su expresión se asocia a un pronóstico más desfavorable para pacientes con cáncer. Además, se ha reportado que, en algunos tipos de cáncer, niveles elevados de STn sérico se correlacionan con tamaños tumorales mayores y presencia de metástasis (Mercanoglu et al., 2024). Por otra parte, la sobreexpresión de la  $\beta$ 1,6-Nacetilglucosaminiltransferasa V, o MGAT5, puede generar un incremento en las ramificaciones de N-glicanos, promoviendo la adhesión, migración y metástasis de células tumorales (Granovsky et al., 2000; Hou et al., 2016). Por último, alteraciones en la sialilación generan un aumento en los antígenos sialil-Lewis<sup>a</sup> y sialil-Lewis<sup>x</sup> (SLe<sup>a</sup> y SLe<sup>x</sup>, respectivamente), cuya expresión en tejidos sanos es baja. La importancia de los antígenos SLe<sup>a</sup> y SLe<sup>x</sup> radica en que ambos son ligandos de la E-selectina, molécula expresada en células endoteliales, por lo que pueden mediar procesos como la adhesión, migración y extravasación vascular. En consecuencia, tanto los antígenos SLe<sup>a</sup> como SLe<sup>x</sup> están asociados a metástasis y son marcadores de progresión tumoral (Kudelka et al., 2015; Shiozaki et al., 2011).



**Figura 7. Aberraciones en la glicosilación de proteínas solubles y de membrana dan lugar a numerosos antígenos tumorales glucídicos.** Estos cambios en la glicosilación pueden ocurrir en diferentes etapas de la transformación celular, siendo sus productos biomarcadores tumorales. En rosado se resaltan los diferentes antígenos carbohidratos asociados a tumores. Tomado de Stowell et al., 2015.

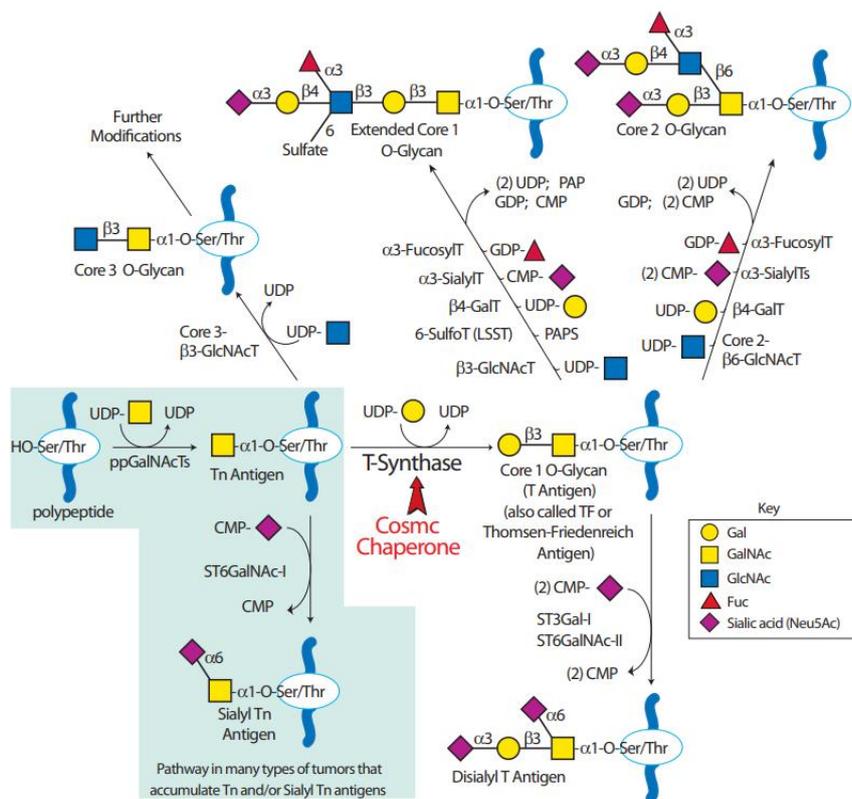
### 1.5.1 Antígeno Tn

La biosíntesis de los *O*-glicanos tipo mucina comienza generalmente en el aparato de Golgi, con la adición de una GalNAc a un residuo de serina o treonina, reacción catalizada por la familia de enzimas GalNAc transferasas polipeptídicas, o ppGalNAcTs. El producto de esta reacción es el antígeno Tn, que consta por lo tanto de un residuo de serina o treonina unido a una molécula de GalNAc. En secuencias polipeptídicas con numerosos residuos de serina o treonina contiguos, se pueden presentar varios antígenos Tn seguidos, en una estructura conocida como *clusters* de Tn (**Fig. 8**) (Ju et al., 2014).



**Figura 8. Estructura del antígeno mono-Tn (A) y cluster de Tn (B).** En una proteína con *O*-glicosilación, puede haber un antígeno Tn único, o varios antígenos Tn contiguos. Esto último requiere de secuencias polipeptídicas que contengan numerosos residuos de serina o treonina adyacentes. Tomado y modificado de Ju et al., 2014.

Normalmente, una vez generado el antígeno Tn, el proceso continúa con la adición de una molécula de galactosa (Gal) por acción de una enzima cuya expresión es ubicua en las células de mamíferos, la T-sintasa. La nueva estructura formada, Gal $\beta$ 1-3-GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr, se conoce como *Core 1*, antígeno T o antígeno TF. El disacárido que conforma el *Core 1* puede ser modificado por una gran variedad de enzimas con expresión diferencial en los diferentes tejidos, formando estructuras como el *Core 2* o *Core 1* extendido (Ju et al., 2014; Kudelka et al., 2015). Alternativamente, el antígeno Tn puede dar lugar al *Core 3*, una estructura cuya expresión está restringida al epitelio del tracto gastrointestinal (**Fig. 9**) (Ju et al., 2014).



**Figura 9. Biosíntesis de O-glicanos.** La biosíntesis de O-glicanos tiene siempre como primer paso la adición de una molécula de GalNAc a un residuo de serina o treonina para formar un precursor conocido como antígeno Tn. A partir de allí, el precursor puede seguir varias vías para formar diversas estructuras como el *core 1*, *core 1* extendido, *core 2*, *core 3* o el sialil-Tn. Cosmc es una chaperona importante para el plegamiento de la T-sintasa, enzima encargada de catalizar la formación del antígeno T o *core 1*. Tomado de Ju et al., 2014.

La línea celular de linfocitos T Jurkat, derivada de un adolescente masculino que padecía leucemia linfoblástica aguda, se caracteriza por expresar altos niveles de antígeno Tn y bajos niveles de O-glicanos complejos (Schneider et al., 1977; Piller et al., 1990). En el año 2002, Ju y Cummings publicaron un artículo en donde reportaron que esta línea celular expresaba niveles normales del transcrito del gen *T-sintasa*, aunque niveles bajos de la proteína T-sintasa. Los investigadores descubrieron que la causa de la degradación de la T-sintasa no radicaba en una mutación en el gen que codifica para la *T-sintasa*, sino en una mutación de un gen ligado al cromosoma X que denominaron *Cosmc*. Su producto proteico, Cosmc (Chaperona Molecular Específica Core 1  $\beta$ 3-galactosiltransferasa), es una chaperona cuyo rol es colaborar en el correcto plegamiento de la T-sintasa activa (Ju & Cummings, 2002). Esto fue un descubrimiento importante ya que implica que en ausencia de la chaperona Cosmc funcional, la T-sintasa sintetizada carece de actividad y es rápidamente degradada, generando una acumulación de Tn en las células y ausencia de estructuras glucídicas más complejas (Ju et al., 2014).

Además de los defectos en la chaperona Cosmc, existen otros factores que pueden causar una expresión anormal del antígeno Tn en células tumorales. Entre ellos, se encuentran alteraciones en la expresión y/o localización de ppGalNAcTs, una familia de enzimas conformada en humanos por 20 isoformas diferentes (Chia et al., 2016). Se ha observado que la relocalización de ppGalNAcTs desde el aparato de Golgi al retículo endoplasmático causa un aumento considerable del antígeno Tn en líneas celulares de cáncer de mama (Gill et al., 2013). Otras causas menos específicas que pueden provocar modificaciones en la expresión de Tn incluyen alteraciones en la expresión de transportadores de nucleótidos unidos a azúcares (Kabuß et al., 2005), alteraciones en el pH del Golgi (Rivinoja et al., 2009), alteraciones en el estado de oligomerización de glicosiltransferasas (Hassinen et al., 2010), entre otras.

El antígeno Tn es de gran relevancia en el ámbito de la oncología, y se estima que se expresa en más el 70% de los carcinomas humanos, incluyendo cáncer de colon (Itzkowitz et al., 1989), cáncer de mama (Tsuchiya et al., 1999), cáncer de ovario (Inoue et al., 1991), cáncer de cuello de útero (Terasawa et al., 1996) y cáncer de páncreas (Itzkowitz et al., 1991), entre otros. Esto, sumado a que la expresión de Tn es prácticamente nula en tejidos sanos, lo vuelve una molécula con gran potencial de ser biomarcador en gran variedad de tipos de cáncer (Fu et al., 2016). Además de su expresión diferencial, existe evidencia concluyente que vincula la sobreexpresión de Tn con fenotipos inmunosupresores y tolerogénicos, así como con la capacidad de promover la transición epitelio-mesenquimal (Matsumoto et al., 2023). Un estudio realizado por el Centro Nacional del Cáncer de EEUU, en el cual se buscó clasificar y priorizar antígenos tumorales para su utilización en terapias, ha ubicado al antígeno Tn en el lugar 50 en esta lista generada, destacándose por su especificidad, oncogenicidad y número de epítopes (Cheever et al., 2009).

### **1.5.2 Anticuerpos anti-Tn**

La alta expresión del antígeno Tn en un elevado porcentaje de carcinomas, su escasa expresión en tejidos sanos y su implicación en procesos como la carcinogénesis y la metástasis, lo convierten en un potencial y prometedor blanco molecular para terapias antitumorales. Esto último ha impulsado el desarrollo de numerosos anticuerpos monoclonales dirigidos contra Tn, destinados tanto al diagnóstico como al tratamiento de diversos tipos de cáncer (Berois et al., 2022). Entre ellos encontramos a los anticuerpos IgG3 CU-1 (Takahashi et al., 1988) y MLS128 (Numata et al., 1990); a los IgM 5F4 (Thurnher et al., 1993), 83D4 (Pancino et al., 1990) y PMH1 (Reis et al., 1998); y a las IgG1 Chi-Tn (Oppezzo et al., 2000) y Remab6 (Matsumoto et al., 2019), entre muchos otros.

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado el potencial de los anticuerpos anti-Tn en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, en experimentos *in vitro* con la línea celular Jurkat, el anticuerpo quimérico IgG1 cKM3413 fue capaz de desencadenar ADCC contra las células tumorales. Adicionalmente, ratones C.B-17/lcr-scid Jcl inoculados con células Jurkat y tratados con cKM3413 presentaron mejor supervivencia que aquellos tratados con PBS (Ando et al., 2008). Por su parte, el anticuerpo monoclonal Remab6-AF (Remab6 afucosilado) logró desencadenar una potente ADCC *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama y colorrectal. Asimismo, este anticuerpo fue capaz de reducir significativamente el tamaño tumoral en un modelo tumoral murino de xenotrasplante (Matsumoto et al., 2023).

El laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral del Institut Pasteur de Montevideo cuenta con una amplia trayectoria en la generación y estudio de anticuerpos monoclonales contra el antígeno Tn. El primer anticuerpo en ser generado fue el 83D4, una IgM de ratón generada utilizando la técnica de hibridomas que surgió a partir de la utilización de cáncer de mama humano como inmunógeno (Pancino et al., 1990). En particular, el anticuerpo 83D4 demostró ser capaz de reconocer *clusters* de Tn compuestos por dos o tres repeticiones contiguas de Tn (Osinaga et al., 2000), en numerosos tejidos tumorales humanos, pero no en tejidos normales (Charpin et al., 1992). Dado que su origen murino limitaba su uso terapéutico, se generó un anticuerpo quimérico ratón/humano a partir del dominio variable del 83D4 y el dominio constante de una IgG1 humana. Este anticuerpo se nombró Chi-Tn (Oppezco et al., 2000). Chi-Tn demostró tener una potente actividad antitumoral *in vivo*, induciendo la remisión tumoral completa en un 90% de los ratones inoculados con células de cáncer de mama, cuando se asociaba a ciclofosfamida. Adicionalmente, ratones deficientes en el receptor FcγR no eran capaces de rechazar al tumor, sugiriendo que Chi-Tn ejercía su mecanismo antitumoral a través de la estimulación de la ADCC (Hubert et al., 2011). Asimismo, el Chi-Tn conjugado a auristatina F, un inhibidor del ciclo celular, mostró una gran actividad antitumoral sobre tumores de melanoma humano desarrollados en ratones nude (Sedlik et al., 2016). Por último, se generaron inmunonanopartículas de quitosano conteniendo la droga docetaxel, y recubiertas con el anticuerpo Chi-Tn, que demostraron poseer una mayor actividad citotóxica sobre células de cáncer de pulmón humano, a comparación del docetaxel libre (Castro et al., 2021).

## **1.6 Nueva generación: anticuerpos quiméricos**

Actualmente, todos los anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA para uso terapéutico son del isotipo IgG. Particularmente, la gran mayoría de estos anticuerpos pertenecen a la subclase IgG1 (Zahavi & Weiner, 2020). La predominancia de la subclase IgG1 se debe a diversos factores, entre ellos: es la subclase más abundante en suero, es fácil de

producir y purificar a gran escala, se encuentra ampliamente estudiada y caracterizada, y posee una vida media prolongada en suero (Cottignies-Calamarte et al., 2023). Su elevada vida media, de aproximadamente 21 días, se debe a que este isotipo posee un sitio de unión al receptor Fc neonatal, o FcRn (Van Tetering et al., 2020). A pH ácido, este receptor puede unirse a la IgG que es internalizada vía endosomal, protegiéndola de la degradación. La IgG puede entonces volver a ser secretada al medio extracelular, aumentando su vida media sérica (Roopenian & Akilesh, 2007). Además de las ventajas ya mencionadas, la IgG1 es capaz de desencadenar mecanismos efectoros dependientes de Fc, como la ADCC por parte de las células NK, o la ADCP en macrófagos, aumentando su capacidad citotóxica contra células tumorales (Zahavi & Weiner, 2020).

Por su parte, el isotipo IgA es el segundo isotipo más abundante en suero luego de la IgG, y en mucosas, representa el 90% del total de anticuerpos (Heineke & Van Egmond, 2017). Sin embargo, presenta algunas desventajas que han limitado su uso en la inmunoterapia del cáncer, reflejado en la ausencia de anticuerpos IgA aprobados por la FDA. Debido a la complejidad de sus patrones de glicosilación y su región bisagra, la producción y purificación de IgA a gran escala es costosa y laboriosa (Cottignies-Calamarte et al., 2023). Adicionalmente, el isotipo IgA carece de sitio de unión al receptor FcRn, por lo que su vida media en suero es acotada con respecto a la IgG, manteniéndose en suero aproximadamente de 4 a 7 días (Roopenian & Akilesh, 2007; Van Tetering et al., 2020). Asimismo, debido a que los ratones no expresan el receptor Fc $\alpha$ RI (CD89), los ensayos *in vivo* en ratones requieren el uso de ratones transgénicos CD89+ (Heemskerk et al., 2021). A pesar de estas limitaciones, la IgA presenta numerosas ventajas que la vuelven un isotipo prometedor para ser utilizado en inmunoterapia del cáncer. En particular, dada la alta expresión de CD89 en neutrófilos, es capaz de desencadenar en estas células numerosos mecanismos dependientes de anticuerpo de manera mucho más potente y eficiente que las IgGs (Heemskerk et al., 2021). Por ejemplo, la IgA estimula la ADCP por parte de neutrófilos, monocitos y macrófagos (Wills et al., 2018). Asimismo, se ha reportado que IgA estimula la formación de trampas extracelulares (NETs), degranulación y trogocitosis por parte de los neutrófilos, mecanismos altamente citotóxicos (Aleyd et al., 2014; Heemskerk et al., 2021). En el mismo sentido, el isotipo IgA induce una mayor producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en los neutrófilos con respecto al isotipo IgG, potenciando aún más la ADCP, ADCC y NETosis (Aleyd et al., 2014). Considerando que los neutrófilos son los leucocitos mayoritarios en circulación, representando entre un 50 a 70% del total, y que exhiben numerosos mecanismos citotóxicos antitumorales, ha surgido entre la comunidad científica el interés por desarrollar nuevas estrategias terapéuticas cuyo objetivo es activar al receptor CD89, incorporando así a los neutrófilos como células efectoras citotóxicas en tratamientos para el cáncer con anticuerpos monoclonales (Behrens et al., 2022; Heemskerk & Van Egmond, 2018).

En los últimos años, han surgido diversas estrategias que buscan sobrepasar las limitaciones que presenta la IgA, a modo de poder aprovechar sus potenciales efectos antitumorales en terapia del cáncer. Una primera estrategia consiste en generar quimeras IgG-IgA, o “bi-isotipos”, que poseen en su región Fc características tanto de las regiones Fc de IgG como de IgA (Cottignies-Calamarte et al., 2023). Este es el caso del anticuerpo Trastuzumab-IgGA, generado a partir de Trastuzumab, una IgG1 anti-HER2. Para generar el Trastuzumab-IgGA, residuos de la región Fc del Trastuzumab que se determinó no intervenían en la unión con FcR $\gamma$ , fueron reemplazados por aminoácidos importantes en la interacción con CD89. Este anticuerpo quimera demostró desencadenar más ADCC y ADCP respecto a su anticuerpo parental, aunque las modificaciones realizadas en su región Fc abolieron la unión con los receptores CD16a y FcRn, disminuyendo su biodisponibilidad *in vivo* (Kelton et al., 2014). Una segunda estrategia consiste en generar anticuerpos biespecíficos, que reconocen a CD89 a través de un paratope y a un antígeno tumoral a través del otro. Este es el caso del TrisomAb anti-EGFR y TrisomAb anti-gp75, dos anticuerpos monoclonales generados por Heemskerk y colaboradores. Estos anticuerpos biespecíficos, que reconocen CD89 y EGFR o gp75, obtuvieron resultados prometedores. Ambos demostraron niveles aumentados de ADCC, ADCP y trogocitosis tanto *in vitro* como *in vivo* en comparación con los anticuerpos parentales IgG e IgA. Además, en ratones transgénicos CD89<sup>+</sup>, el anticuerpo presentó una vida media más prolongada en comparación al parental IgA, debido a su capacidad de unirse al receptor FcRn. Por último, el TrisomAb logró una disminución del tamaño tumoral mayor en comparación con sus anticuerpos parentales IgG e IgA, en un modelo tumoral utilizando ratones transgénicos CD89<sup>+</sup> (Heemskerk et al., 2021). Una última estrategia, consiste en fusionar un Fc $\alpha$  en tándem a una región Fc de IgG. Ejemplos de esto son el anticuerpo quimérico generado por Borrok y colaboradores, que consiste en el Trastuzumab fusionado en tándem al Fc $\alpha$  de la IgA2, en la región C-terminal del Fc $\gamma$ . Esta quimera obtuvo buenos rendimientos de producción, similares al parental IgG. Además, mantuvo su unión al FcRn y por lo tanto su elevada vida media en suero, y demostró estimular la ADCC y ADCP en neutrófilos de manera más potente en relación al IgG (Borrok et al., 2015). Por otro lado, Li y colaboradores desarrollaron un anticuerpo en tándem IgG1/IgA2 a partir del Rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20. Esto lo lograron mediante la fusión en tándem del Fc $\alpha$ 2 al Fc $\gamma$ 1 por un *linker* de poliglicina, generando un anticuerpo que mantuvo la unión al FcRn. El Rituximab IgG1/IgA2 mostró niveles aumentados de ADCC a comparación del parental en ratones transgénicos CD89<sup>+</sup>. Además, se observó una mayor disminución del volumen tumoral en ratones tratados con el anticuerpo en tándem, a comparación de los tratados con IgG o IgA (Li et al., 2017).

En nuestro equipo de investigación, reconocemos y valoramos las ventajas significativas que la IgA puede ofrecer en el ámbito de la inmunoterapia contra el cáncer. En

este contexto, hemos diseñado en conjunto con la Unidad Tecnológica de Ingeniería de Proteínas del Institut Pasteur de Montevideo, un nuevo anticuerpo en tándem IgG1/IgA2, mediante la fusión de los dominios CH2 y CH3 de una IgA2 con la estructura de la IgG1 del anticuerpo Chi-Tn. Esta combinación pretende potenciar la eficacia de la IgG1 en la inmunidad antitumoral, al aprovechar las propiedades únicas de la IgA2 para desencadenar de manera más potente mecanismos efectoros como la ADCP o ADCC mediada por neutrófilos, mientras mantiene todas las ventajas del isotipo IgG.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad del reconocimiento del nuevo anticuerpo en Tándem IgG/IgA por el antígeno Tn en líneas celulares y tejidos tumorales humanos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Evaluar la producción y purificación del anticuerpo Chi-Tn y del anticuerpo en Tándem IgG/IgA.
- Estudiar la capacidad del nuevo anticuerpo en Tándem IgG/IgA de reconocer líneas celulares tumorales Tn positivas.
- Estudiar la capacidad del nuevo anticuerpo en Tándem IgG/IgA de reconocer tejidos tumorales humanos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Generación de anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA

La producción de los anticuerpos monoclonales Chi-Tn y Tándem IgG/IgA fue realizada por la Unidad Tecnológica de Ingeniería de Proteínas del Institut Pasteur de Montevideo.

#### 3.2 SDS-PAGE

A modo de evaluar la producción de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA se realizaron dos SDS-PAGE, una en condiciones reductoras y la otra en condiciones no reductoras.

Para la electroforesis en condiciones reductoras, se preparó un gel de poliacrilamida al 10%, de 1,5 mm de espesor. En eppendorfs de 1,5 mL se mezclaron las diferentes muestras a sembrar con *buffer* de muestra 6X ( $\beta$ -mercaptoetanol 25%, SDS 2,5%, glicerol 50%, buffer Tris-HCl 0,125 M, azul de bromofenol 0,1 mg/mL, pH 6,8). A continuación, las muestras se incubaron 5 minutos a 99°C para favorecer la desnaturalización de las proteínas. Una vez hecho esto, se sembró en cada pocillo 10 ug de proteína totales, variando el volumen sembrado según la concentración de cada muestra. Como marcador de peso molecular (MPM) se utilizó el *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, #26616 de ThermoFisher Scientific. Las muestras fueron corridas en primer lugar a 20 mA hasta que las mismas alcanzaran el gel separador, para luego aumentar la corriente a 35 mA hasta la finalización de la corrida.

Para la electroforesis en condiciones no reductoras, se preparó un gel de poliacrilamida al 7% a modo de resolver mejor las bandas de mayor tamaño. Las muestras fueron mezcladas con *buffer* Laemmli 2X (SDS 4%, glicerol 20%, buffer Tris-HCl 0,125 M, azul de bromofenol 0,004%, pH 6,8) e incubadas a 99°C por 5 minutos para favorecer la desnaturalización. Para la siembra y la corrida de las muestras se siguió el mismo protocolo que para la electroforesis en condiciones reductoras.

Una vez finalizada la corrida, ambos geles fueron fijados en una solución de etanol 50% y ácido acético 10% por 20 minutos. A continuación, se retiró la solución de fijación y se agregó solución de tinción (40 mL de Coomassie coloidal y 10 mL de etanol 95%). Los geles se dejaron en solución de tinción *overnight* bajo agitación. El desteñido se realizó al día siguiente con agua destilada, la cual fue cambiada con regularidad hasta poder observar las bandas con claridad. Las imágenes fueron tomadas en el equipo Amersham ImageQuant™ 800.

### 3.3 Western Blot

En primer lugar, se preparó un gel de poliacrilamida al 10% de 1,5 mm de espesor. Se tomó un volumen suficiente de muestra (Chi-Tn y Tándem IgG/IgA) y se agregó *buffer* de muestra 6X a una concentración final de 1X. Las muestras fueron incubadas a 99°C por 5 minutos para favorecer la desnaturalización. A continuación, se sembraron 5 µg de proteína por pocillo junto con el MPM *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, #26616 de ThermoFisher Scientific. Las muestras fueron corridas en primer lugar a 20 mA hasta que las mismas alcanzaran el gel separador, para luego aumentar la corriente a 35 mA hasta la finalización de la corrida.

Finalizada la corrida, el gel fue equilibrado en *buffer* de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, EtOH 20%) durante 5-10 minutos. Paralelamente, fueron equilibradas en el mismo *buffer* de transferencia dos almohadillas para blotting y una membrana de nitrocelulosa de GE Healthcare. A continuación, se transfirieron las proteínas a la membrana mediante la técnica de electrotransferencia semi-seca, durante 40 minutos a 150 mA. Al finalizar la transferencia, la membrana fue incubada en rojo Pounceau durante 1 minuto y luego se lavó en agua destilada para visualizar las bandas. Una vez visualizados los carriles en la membrana de nitrocelulosa, se procedió a cortarlos de manera individual. Las tiras de membrana fueron incubadas en solución de bloqueo (leche descremada 5%, Tween20 0,1% PBS 1X) *overnight* a 4°C.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS Tween20 0,1%. A continuación, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente. Las membranas que contenían al anticuerpo Chi-Tn y al Tándem IgG/IgA se incubaron con un anticuerpo policlonal de ratón anti-IgG humana conjugado a FITC (Dako F0202) en dilución 1/1000. En paralelo, una membrana en la cual se había transferido el Tándem IgG/IgA se incubó con un anticuerpo policlonal de ratón anti-IgA humana conjugado a TRITC (Sigma-Aldrich SAB3701237), en dilución 1/1000. Ambos anticuerpos fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad.

A continuación, se procedió a realizar tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween20 0,1% e inmediatamente se cubrieron ambas tiras con film (Amersham Hyperfilm ECL GE). Las imágenes fueron tomadas utilizando el equipo Amersham ImageQuant™ 800.

### 3.4 Líneas celulares

Para la realización de esta Tesina de grado, se utilizaron las líneas celulares de cáncer de colon de ratón MC38 *wild type*, MC38-COSMC KO y CT26. Adicionalmente, se trabajó con las líneas celulares de cáncer de páncreas humano T3M4, L3.6 y BxPC3. Todas las líneas

celulares fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) suplementado con SFB 10%, glutamina 2 mM y piruvato 1 mM (de ahora en más, medio completo). Las células se incubaron a 37°C en una estufa con saturación de CO<sub>2</sub> al 5%. Los pasajes celulares se realizaron lavando las células con PBS e incubando con una solución de Tripsina 0,25% - EDTA. Las líneas celulares se almacenaron a una temperatura de -80°C en una solución 9:1 de SFB y DMSO, respectivamente.

### 3.5 Citometría de flujo

Para los ensayos de citometría de flujo, se utilizaron las líneas celulares CT26, T3M4, L3.6 y BxPC3 en fase exponencial de crecimiento. Las células se tripsinizaron y se contaron en cámara de Neubauer. Luego, se realizó un lavado de 5 minutos en PBS y posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Para fijar las células, el *pellet* se resuspendió en PFA 4% a una concentración final de 2x10<sup>6</sup> células/mL y se realizó una incubación de 30 minutos en hielo. Una vez fijadas, las células fueron lavadas en 5 mL de PBS y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos.

A continuación, se permeabilizaron las células. Para esto, los *pellets* fueron resuspendidos en PBS - SFB 1% - Tween20 0,1% a una concentración final de 1x10<sup>6</sup> células/mL. En una placa de 96 pocillos con fondo en V, se sembró 1x10<sup>5</sup> células por pocillo y se realizó una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se centrifugaron a 400 g por 3 minutos y se descartó el sobrenadante. Se vortexeó la placa brevemente para disgregar el *pellet* y se agregó 25 µL de los anticuerpos Chi-Tn o Tándem IgG/IgA diluidos en PBS - SFB 1% - Tween20 0,1% a una concentración de 10 µg/mL; para el control positivo se utilizó HPA 50 µg/mL; para el control sin marca y el control negativo sin primario se agregaron 25 µL de PBS - SFB 1% - Tween20 0,1%. Las células se dejaron incubando toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Cada condición se realizó por triplicado.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados con PBS - SFB 1% - Tween20 0,1%, centrifugando 3 minutos a 400 g y vortexeando la placa para disgregar el *pellet* de células entre cada lavado. A continuación, se sembró 50 µL del anticuerpo policlonal de ratón anti-IgG humana conjugado a FITC (Dako Fo202) diluido 1/200 en PBS - SFB 1% - Tween20 0,1% por 45 minutos en hielo y oscuridad. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS - SFB 1% - Tween20 0,1%, se resuspendieron las células en 150 µL de PBS y se procedió a medir en el citómetro BD Accuri™ C6.

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software FlowJo 7.6. Para la estrategia de *gating*, se seleccionó primero la población de células (excluyendo el debris), y luego los *singlets*. Tomando como referencia el control negativo sin primario, se definió la zona de

células Tn positivas como la zona de intensidad de fluorescencia hacia la derecha de la población celular, donde se observa menos del 0,5% de eventos (**Fig. S1**). Para los análisis estadísticos, se utilizó el software GraphPad Prism 8, utilizando el test one-way ANOVA (*one-way Analysis of Variance*). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

### 3.6 Inmunofluorescencia indirecta

En una placa de 24 pocillos, se colocaron cubreobjetos circulares previamente esterilizados con etanol al 70%. La placa se expuso durante 15 minutos a luz ultravioleta en cámara de flujo, asegurándose de que el etanol se evaporara completamente. A continuación, en cada pocillo se sembró 1 mL de medio completo conteniendo  $1 \times 10^4$  células, las cuales se cultivaron en las condiciones anteriormente descritas, hasta llegar a una confluencia del 70%, aproximadamente.

Una vez crecidas, se retiró el medio de los pocillos y se realizó un lavado con 1 mL de PBS frío durante 5 minutos. Luego, se procedió a fijar las células con 500  $\mu$ L de PFA 4% por pocillo, durante 20 minutos en hielo. Al finalizar la fijación, se realizaron tres lavados con 1 mL de PBS frío y se permeabilizaron las células con 500  $\mu$ L de PBS - BSA 2% - Tritón X100 0,3% por pocillo, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con solución de lavado (PBS - BSA 1% - Tritón X100 0,15%). Luego, los vidrios fueron transferidos a una superficie plana cubierta con *parafilm*, y se incubaron con 30  $\mu$ L de: solución de lavado; Chi-Tn 10  $\mu$ g/mL o Tándem IgG/IgA 10  $\mu$ g/mL según correspondiese, dejando la cara del cubreobjetos con las células adheridas en contacto con las diferentes soluciones. Los vidrios se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Al día siguiente, se volvieron a colocar los vidrios en la placa de 24 pocillos y se realizaron tres lavados de 5 minutos con solución de lavado. A continuación, los vidrios fueron transferidos nuevamente a una superficie plana cubierta con *parafilm*, colocándolos sobre 30  $\mu$ L del anticuerpo secundario (policlonal de ratón anti-IgG humana conjugado a FITC [Dako F0202]) diluido 1/50 en solución de lavado. Los vidrios se incubaron por 45 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se realizaron tres lavados de 5 minutos con solución de lavado y un lavado con PBS frío. Finalmente, se realizó una incubación de 5 minutos con una solución de DAPI 1 mg/mL (D9542 Sigma-Aldrich) diluido 1/1000 en PBS, y un último lavado con agua destilada.

Para el montaje de los vidrios, se colocó 10  $\mu$ L de medio de montaje (ProLong Gold Antifade Mountant #P36930) sobre un portaobjetos, y se dispusieron los vidrios sobre la gota

de montante. Los portaobjetos se dejaron secar en oscuridad por 24 horas, para finalmente observarlos bajo el microscopio Confocal Zeiss LSM 800.

### **3.7 Inmunohistoquímica en tejido tumoral humano crecido en ratón**

Para la inmunohistoquímica en tejido tumoral de humano crecido en ratón, se partió de cortes histológicos parafinados de tumores generados con la línea celular de cáncer de pulmón humano A549 en ratones nude. En primer lugar, se realizó la desparafinación de los cortes histológicos. Para ello, se realizaron tres incubaciones de 5 minutos en Xilol, y luego 3 incubaciones en isopropanol. Luego, se realizaron dos lavados de 5 minutos, uno en agua destilada y otro en PBS. A continuación, se procedió a realizar el bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en PBS. Para ello se realizaron dos incubaciones de 15 minutos con dicha solución, al finalizar se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS. Luego se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos, incubando 20 minutos a temperatura ambiente con una solución de suero de cabra al 30% en PBS. Finalizado el bloqueo de sitios inespecíficos, se realizó un único lavado de 5 minutos con PBS y se continuó con la incubación de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA, ambos a una concentración de 1 µg/mL; para el control negativo se utilizó PBS. Los portaobjetos con PBS o los anticuerpos se incubaron durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS y luego se procedió con la incubación del anticuerpo secundario. Se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG humana conjugado a HRP (Dako P0214), en una dilución de 1/400 en PBS, el cual fue incubado durante 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS. A continuación, se realizó una incubación de 5 minutos en oscuridad con una solución de DAB 500 µg/mL - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 1 µl/mL de TBS. A continuación, se realizó un lavado de 10 minutos con agua corriente, y uno de 5 minutos con agua destilada. Para la tinción de los núcleos, se realizó una incubación de 5 minutos con hematoxilina de Mayer, y luego se procedió a realizar nuevamente un lavado de 10 minutos con agua corriente y uno de 5 minutos con agua destilada.

Para la deshidratación, en primer lugar se realizaron dos incubaciones de 5 minutos cada una en isopropanol, seguida de una última incubación de 5 minutos en Xilol. Finalmente, se procedió al montaje de las láminas, utilizando el bálsamo de montaje *Entellan<sup>TM</sup> new* de MERCK. Los portaobjetos se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente, para luego ser observados bajo microscopio óptico.

## **3.8 Biotinilación de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA**

### **3.8.1 Biotinilación**

Para poder realizar la inmunohistoquímica en tejidos tumorales humanos, fue necesario realizar la biotinilación de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA. Esto se debe a que los tejidos humanos pueden contener anticuerpos de origen humano, propios del tejido, por lo que no es posible utilizar como método de revelado un anticuerpo secundario anti-IgG humano. La biotinilación de los anticuerpos permite utilizar estreptavidina conjugada a HRP como método de revelado.

Para la biotinilación se utilizó el kit *EZ Link™ NHS LC-LC Biotin Reagent* de Thermo Scientific™. En primer lugar, se calcularon los milimoles de biotina necesarios para lograr obtener un buen rendimiento en la biotinilación. En nuestro caso, decidimos utilizar la biotina en una proporción aproximada de 50:1 con respecto a los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA. Una vez calculados los milimoles necesarios, se preparó una solución *stock* de biotina 10  $\mu$ M disuelta en DMSO.

Los anticuerpos junto con la biotina se incubaron por 40 minutos a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, se continuó con la purificación de los anticuerpos biotinilados. A modo de eliminar la biotina libre en solución, se realizó una diálisis contra PBS utilizando la membrana de diálisis *SnakeSkin™ Dialysis Tubing 3.5K MWCO* de ThermoScientific™. Las soluciones se dejaron dializando durante 24 horas en cámara fría, con dos cambios de PBS.

### **3.8.2 ELISA**

De manera de poder verificar la biotinilación de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA, se realizó un ensayo de ELISA. En primer lugar, se realizó la sensibilización de una placa de 96 pocillos Nunc MaxiSorp (ThermoScientific #442404) con asialo OSM (aOSM). Para ello, se diluyó la aOSM en buffer carbonato pH 9,6 a una concentración final de 0,01  $\mu$ g/ $\mu$ L, se sembraron 100  $\mu$ L de la solución por pocillo, y se dejó incubando toda la noche a 4°C, en cámara húmeda.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween20 0,1%. A continuación, se realizó el bloqueo de la placa. Para ello, se sembraron 200  $\mu$ L de una solución de PBS-BSA 0,5% por pocillo, y se dejó incubando durante 1 hora y 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Finalizado el bloqueo, se realizaron tres lavados con PBS-Tween20 0,1% y se procedió a incubar los anticuerpos primarios. Tanto el anticuerpo Chi-Tn como el Tándem IgG/IgA se utilizaron a una concentración de 1  $\mu$ g/mL diluidos en PBS; para el control negativo se utilizó

PBS y para el control positivo HPA conjugada a biotina a una concentración de 5 µg/mL diluida en PBS. Se sembraron 100 µL por pocillo de los anticuerpos primarios, PBS o HPA-biotina, y se dejó incubando la placa durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Luego, se realizaron tres lavados con PBS-Tween20 0,1%. Posteriormente, se agregó 100 µL por pocillo de estreptavidina conjugada a HRP (Po397 Dako) diluida 1/1000 en PBS- Tween20 0,1%- BSA 0,5%, y se dejó incubando durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Al finalizar la incubación, se realizaron cinco lavados con PBS- Tween20 0,1%.

Para el revelado, se preparó una solución *stock* de TMB (Sigma-Aldrich #860336) 5 mg/mL en DMSO. A continuación, se agregaron 200 µL de la solución *stock* de TMB y 2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% a 10 mL de buffer citrato fosfato pH 5 (solución de revelado). Se agregó 100 µL de solución de revelado por pocillo, se dejó incubar 10 minutos y se detuvo la reacción con 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. Detenida la reacción, se midió la absorbancia a 450 nm en el lector de placas Varioskan Flash de Thermo Scientific.

### **3.8.3 Cuantificación**

La determinación de la concentración de los anticuerpos biotinilados Chi-Tn y Tándem IgG/IgA se realizó por dos metodologías: BCA y Absorbancia a 280 nm.

Para el método de cuantificación por BCA, en primer lugar se prepararon soluciones de BSA a concentraciones de 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 y 0,1 mg/mL para la construcción de la curva de calibración. En una placa de 96 pocillos, se sembraron 10 µL por pocillo de cada solución de BSA por duplicado. A su vez se sembraron 10 µL por pocillo de las soluciones de Chi-Tn y Tándem IgG/IgA biotinilados, por triplicado, en tres condiciones: sin diluir, y diluciones 1/2 y 1/4 en PBS.

Adicionalmente, se preparó una solución de BCA-CuSO<sub>4</sub> 5% en relación 50:1. Se agregaron 200 µL de BCA-CuSO<sub>4</sub> 5% por pocillo, y se incubó la placa por 30 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 562 nm en el lector de placas Varioskan Flash de Thermo Scientific.

Para la determinación de la concentración por absorbancia, se utilizó el equipo NanoDrop DS-11 FX+ de DeNovix y se midió la absorbancia a 280 nm de ambas soluciones de anticuerpos. Para el cálculo de las concentraciones, se utilizó el valor de Abs 0,1%, que corresponde a la absorbancia a 280 nm de una solución de 1 mg/mL. Para el caso del Chi-Tn (IgG1), el valor de Abs 0,1% es de 1,370, mientras que para el Tándem IgG/IgA es de 1,395.

### 3.9 Inmunohistoquímica en *array* de tejidos tumorales humanos

Para la inmunohistoquímica en *array* de tejidos tumorales humanos se utilizó el *array* politumor BC000119b. Además, como testigo positivo de la técnica, se utilizaron cortes histológicos de un tumor generado a partir de células A549 crecido en ratones nude.

En primer lugar, se procedió a la desparafinación del *array* y las láminas de A549, realizando tres incubaciones de 5 minutos en Xilol, y otras tres en isopropanol. Luego se realizó un lavado de 5 minutos en agua destilada y un último lavado con PBS. A continuación, se procedió a realizar el bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en PBS. Para ello se realizaron dos incubaciones de 15 minutos con dicha solución, al finalizar se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS. Luego se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos, incubando 20 minutos a temperatura ambiente con una solución de suero de cabra al 30% en PBS. Finalizado el bloqueo de sitios inespecíficos, se realizó un lavado en PBS.

El portaobjeto con los cortes histológicos del tumor de A549 se dividió en tres: control negativo, control positivo y Tándem IgG/IgA biotinilado. Para el control negativo se utilizó PBS, para el control positivo se utilizó HPA biotinilada en una concentración de 10 µg/mL, y el Tándem IgG/IgA biotinilado en una concentración de 20 µg/mL. Para el caso del *array* politumor, se utilizó el Tándem IgG/IgA biotinilado en una concentración de 20 µg/mL. Tanto el *array* como los cortes histológicos del tumor de A549 fueron incubados con las soluciones mencionadas anteriormente, toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS. A continuación, se realizó una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente con el reactivo *Streptavidin HRP (ready-to-use)* de Abcam (ab64269). Finalizados los 20 minutos, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS. Luego, se procedió a agregar sobre los cortes histológicos una solución de DAB 500 µg/mL - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 1 µl/mL en buffer TBS, la cual se incubó por 5 minutos en oscuridad. Posteriormente, se realizó un lavado de 5 minutos con agua corriente, y uno con agua destilada. Para la tinción de los núcleos, se realizó una incubación de 5 minutos con hematoxilina de Meyer, seguida de un lavado de 10 minutos en agua corriente y otro de 5 minutos en agua destilada.

Finalmente, se deshidrataron los cortes histológicos, realizando dos incubaciones de 5 minutos en isopropanol y una incubación en Xilol. A continuación, se llevó a cabo el montaje de cortes histológicos, utilizando el bálsamo de montaje *Entellan<sup>TM</sup> new* de MERCK. Los portaobjetos se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente, para luego ser observados bajo microscopio óptico.

## 4. RESULTADOS

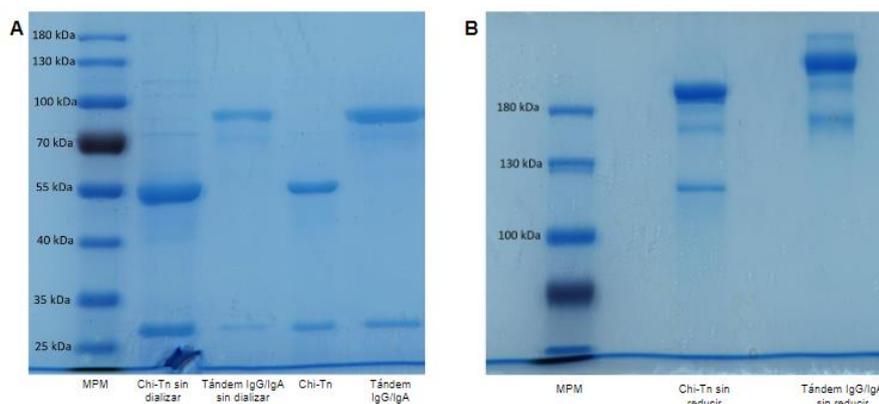
### 4.1 Evaluación de la producción de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA

En primer lugar, se buscó verificar la correcta producción de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA. Para ello, se realizaron electroforesis SDS-PAGE de los anticuerpos en condiciones reductoras y no reductoras, así como ensayos de Western Blot.

#### 4.1.1 SDS-PAGE

Con el fin de evaluar la producción de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA producidos en el Institut Pasteur, se llevaron a cabo dos electroforesis SDS-PAGE, una en condiciones reductoras y otra en condiciones no reductoras. Para la primera, se preparó un gel de poliacrilamida al 10% y se redujeron las muestras con el agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol a modo de reducir los enlaces disulfuro que unen las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos. Adicionalmente, se incluyeron muestras de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA previas a la diálisis, para evaluar si este paso mejoraba considerablemente o no la pureza de las muestras. Para el caso de Chi-Tn, se observan dos bandas, de 26 y 55 kDa aproximadamente, que coinciden con los pesos moleculares de la cadena liviana y pesada de la IgG respectivamente. En el carril donde se sembró el Tándem IgG/IgA, se observaron también dos bandas, de 26 y 85 kDa aproximadamente. El grado de pureza de cada muestra fue calculado mediante el software de análisis de imágenes ImageJ (Schneider et al., 2012). Los resultados obtenidos indicaron una pureza del 95% para el Chi-Tn sin dializar, del 86% para el Tándem IgG/IgA sin dializar, del 95% para el Chi-Tn posterior a la diálisis y del 93% para el Tándem IgG/IgA posterior a la diálisis (**Fig. 10, A**).

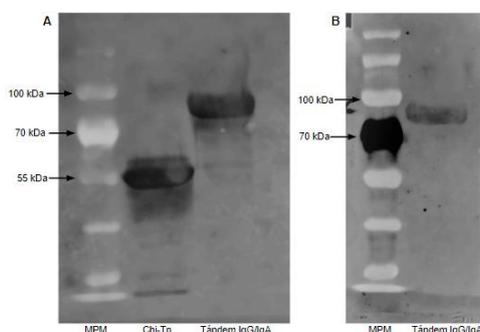
La segunda electroforesis se llevó a cabo en condiciones no reductoras, a modo de evaluar la integridad de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA, además de confirmar el mayor tamaño de este último con respecto a su parental IgG. En este caso, se preparó un gel de poliacrilamida al 7% de manera de resolver mejor las bandas de mayor tamaño. Para el caso del Chi-Tn, se observa una banda prominente mayor a 180 kDa, así como bandas de menor tamaño, de alrededor de 150 y 120 kDa. Para el caso del Tándem IgG/IgA, también se observa una banda prominente mayor a 180 kDa, con menor movilidad electroforética que la banda observada para el Chi-Tn, de acuerdo con lo esperado. Adicionalmente a la banda principal, se observa una banda tenue de mayor tamaño, así como 2 bandas tenues de menor tamaño (**Fig. 10, B**).



**Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE del anticuerpo Tándem IgG/IgA.** A la izquierda (A), se muestra la electroforesis del gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes y reductoras. A la derecha (B) se muestra la electroforesis del gel de poliacrilamida al 7% en condiciones desnaturalizantes y no reductoras. Debajo de cada carril se indica la muestra cargada. A la izquierda del marcador de peso molecular (MPM) se indican los pesos moleculares.

#### 4.1.2 Western Blot

Con el fin de complementar los resultados obtenidos por electroforesis SDS-PAGE, se realizó un ensayo de Western Blot. Los anticuerpos secundarios utilizados para el revelado fueron un anti-IgG humano conjugado a FITC, y un anti-IgA humano conjugado a TRITC, que se utilizaron por separado para confirmar la presencia de los dominios Fc de IgG e IgA en el Tándem IgG/IgA. De acuerdo con lo esperado, la banda de 85 kDa perteneciente a la cadena pesada del Tándem IgG/IgA se tiñó con los dos anticuerpos secundarios, confirmando la presencia de ambos dominios Fc en la estructura. El parental Chi-Tn no fue evaluado con el anticuerpo secundario anti-IgA humano conjugado a TRITC, con el cual se esperaba un resultado negativo. Sin embargo, la tinción con el anticuerpo anti-IgG humano conjugado a FITC arrojó un resultado positivo, de acuerdo con lo esperado (**Fig. 11**).



**Figura 11. Estudio de la presencia de los dominios Fc de IgG e IgA en la estructura de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA.** Ensayos de Western Blot realizados con los anticuerpos secundarios anti-IgG de humano conjugado a FITC (A) y anti-IgA de humano conjugado a TRITC (B).

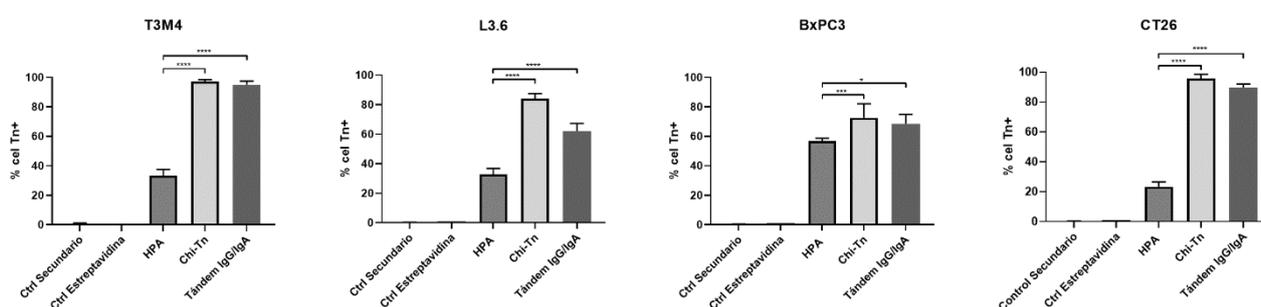
Debajo de cada carril se muestra la muestra cargada. A la izquierda del marcador de peso molecular (MPM) se indican los pesos moleculares.

## 4.2 Evaluación de la capacidad del nuevo anticuerpo en Tándem IgG/IgA de reconocer líneas celulares tumorales Tn positivas

Una vez verificada la correcta producción del Tándem IgG/IgA, se quiso evaluar su capacidad de reconocer el antígeno Tn en líneas celulares tumorales de varios tipos de cáncer. Para ello, se realizaron los inmunoensayos de citometría de flujo e inmunofluorescencia indirecta, en las líneas celulares T3M4, L3.6, BxPC3 y CT26. Adicionalmente, se evaluaron las líneas celulares MC38 *wild type* y MC38-COSMC KO por inmunofluorescencia indirecta.

### 4.2.1 Citometría de flujo

Se realizaron ensayos de citometría de flujo utilizando varias líneas celulares tumorales, a modo de evaluar la unión del anticuerpo Tándem IgG/IgA al antígeno Tn. En primer lugar, se realizó un ensayo para optimizar la concentración de anticuerpo primario. Los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA fueron utilizados a una concentración de 40 µg/mL con intención de marcar las líneas CT26, L3.6, T3M4 y BxPC3. Como control positivo, se utilizó una solución de HPA 50 µg/mL. HPA es una lectina obtenida del caracol romano *Helix pomatia*, que reconoce residuos de GalNAc terminales, entre los que se encuentra el antígeno Tn. El porcentaje de células marcadas con ambos anticuerpos fue significativamente mayor en comparación con el porcentaje de células marcadas utilizando la lectina HPA en las cuatro líneas celulares, sugiriendo la presencia de interacciones inespecíficas para ambos anticuerpos (Fig. 12).

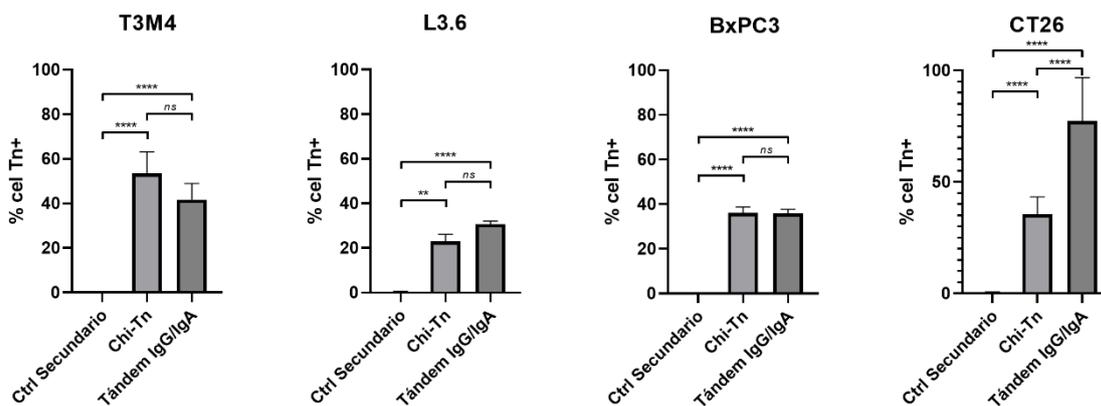


**Figura 12. Estudio comparativo del reconocimiento generado por los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA sobre diferentes líneas celulares tumorales por citometría de flujo.**

Estudio por citometría de flujo de la capacidad de reconocimiento de las líneas celulares de cáncer páncreas T3M4 (A), L3.6 (B), BxPC3 (C) y la línea celular de cáncer de colon CT26 (D) por los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA, ambos en una concentración de 40 µg/mL. Se utilizó como control positivo de la presencia de GalNAc terminales la lectina HPA. Como controles negativos se muestran el control utilizando solamente el anticuerpo secundario (Ctrl Secundario) y el control

utilizando solamente estreptavidina (Ctrl Estreptavidina). Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de dos experimentos independientes. Se indica la estadística intraexperimento: \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

A partir de estos resultados, se decidió realizar los ensayos de citometría de flujo utilizando una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  para ambos anticuerpos, a modo de minimizar el reconocimiento inespecífico. Los nuevos ensayos fueron realizados en las cuatro líneas celulares: T3M4, L3.6, BxPC3 y CT26 (**Fig. 13**). Para las tres líneas celulares de cáncer de páncreas, los resultados del porcentaje de células marcadas fueron concordantes entre ambos anticuerpos. Para la línea T3M4 se obtuvo un porcentaje de  $53\% \pm 10$  con Chi-Tn, y  $42\% \pm 7$  con Tándem IgG/IgA; para L3.6 los resultados fueron de  $23\% \pm 3$  con Chi-Tn y  $30\% \pm 1,5$  con Tándem IgG/IgA; y finalmente para BxPC3 se obtuvo un porcentaje de  $36\% \pm 3$  con Chi-Tn y  $36 \pm 2$  con Tándem IgG/IgA. Sin embargo, para el caso de la línea celular CT26 de carcinoma de colon murino, los resultados obtenidos por Chi-Tn y Tándem IgG/IgA presentaron diferencias estadísticamente significativas. En este caso el anticuerpo Tándem IgG/IgA, dio porcentajes de marca bastante más elevados, de  $77\% \pm 19$  de células positivas, mientras que el anticuerpo Chi-Tn dio un resultado de  $36\% \pm 8$  de células Tn positivas.



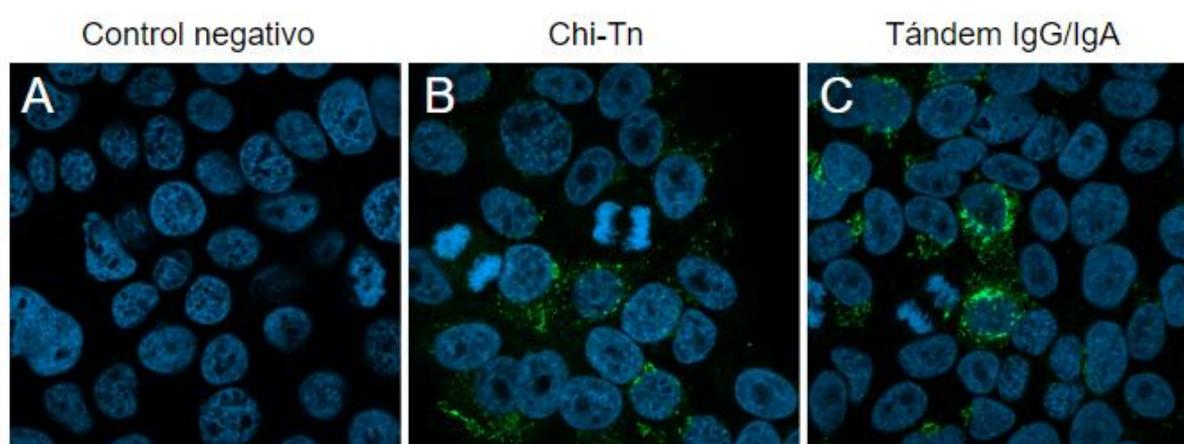
**Figura 13. Estudio comparativo del reconocimiento generado por los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA sobre diferentes líneas celulares tumorales por citometría de flujo.**

Estudio por citometría de flujo de la capacidad de reconocimiento de las líneas celulares de cáncer páncreas T3M4 (A), L3.6 (B), BxPC3 (C) y la línea celular de cáncer de colon CT26 (D) por los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA, ambos en una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Como control negativo se muestra el control utilizando solamente el anticuerpo secundario (Ctrl Secundario). Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de dos experimentos independientes. Se indica la estadística intraexperimento: \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns: no significativo.

#### 4.2.2 Inmunofluorescencia indirecta

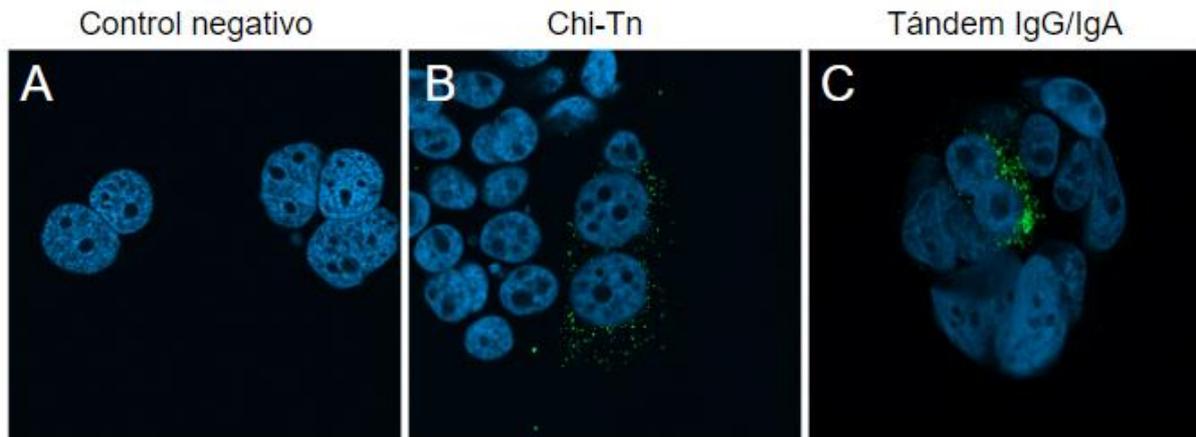
A continuación, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta con las líneas celulares de cáncer de páncreas T3M4, L3.6 y BxPC3 y CT26, de manera de complementar los resultados obtenidos por citometría de flujo. Todas las células fueron permeabilizadas previo a la tinción, de manera de marcar el antígeno Tn tanto de membrana como intracelular. Ambos anticuerpos, Chi-Tn y Tándem IgG/IgA, fueron incubados en una concentración de 10 µg/mL. Para todos los casos, se realizaron controles a modo de descartar un reconocimiento inespecífico por parte del anticuerpo secundario. Todas las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 de la Unidad de Bioimagenología Avanzada (UBA) del Institut Pasteur de Montevideo, en una magnificación 630X.

Como se observa en las Figuras 14, 15 y 16, las líneas celulares T3M4, L3.6 y BxPC3 mostraron un marcaje similar por los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA. Por otra parte, los controles con solamente el anticuerpo secundario no dieron marca, por lo que se descartó un reconocimiento inespecífico por parte de este. Como se puede observar en la Figura 14, la línea celular T3M4 parece tener un marcaje más intenso y un mayor porcentaje de células marcadas en comparación con las líneas celulares L3.6 y BxPC3 (**Fig. 15 y Fig. 16**). Esto concuerda con los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, donde la línea T3M4 arrojó los porcentajes de células Tn positivas más altos, seguida por BxPC3 y finalmente L3.6. En las tres líneas celulares de cáncer de páncreas, la señal fluorescente se dispone en un patrón granular, distribuida de manera tanto perinuclear como citoplasmática.

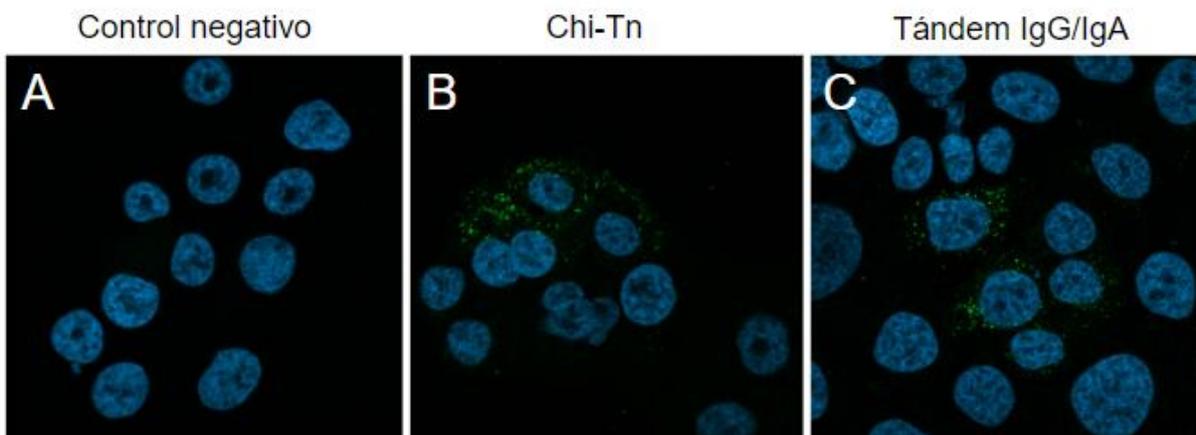


**Figura 14. Estudio comparativo del reconocimiento generado por los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA sobre células T3M4 por inmunofluorescencia indirecta.** Se crecieron, fijaron y permeabilizaron células T3M4 en portaobjetos de vidrio, luego se realizaron los marcajes utilizando solamente el anticuerpo secundario conjugado a FITC como control negativo (A), el anticuerpo Chi-Tn (B), o el anticuerpo Tándem IgG/IgA (C). Se marcaron los núcleos celulares utilizando una solución de DAPI. En la Figura se muestra un campo representativo para cada condición

evaluada. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Zeiss LSM 800, con una magnificación 630X.



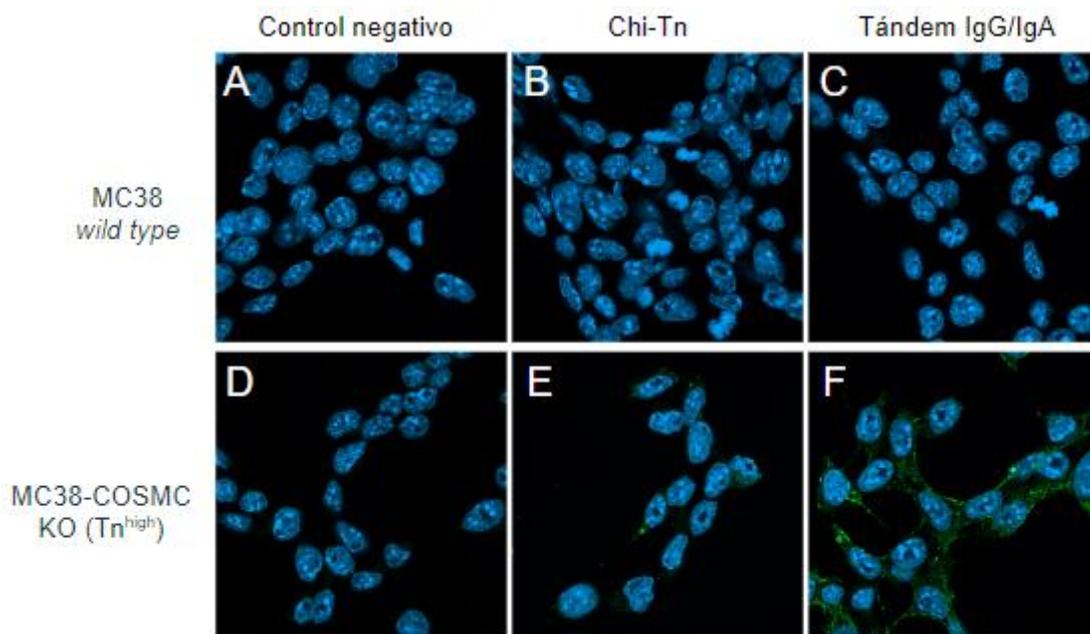
**Figura 15. Estudio comparativo del reconocimiento generado por los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA sobre células L3.6 por inmunofluorescencia indirecta.** Se crecieron, fijaron y permeabilizaron células L3.6 en portaobjetos de vidrio, luego se realizaron los marcajes utilizando solamente el anticuerpo secundario conjugado a FITC como control negativo (A), el anticuerpo Chi-Tn (B), o el anticuerpo Tándem IgG/IgA (C). Se marcaron los núcleos celulares utilizando una solución de DAPI. En la Figura se muestra un campo representativo para cada condición evaluada. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Zeiss LSM 800, con una magnificación 630X.



**Figura 16. Estudio comparativo del reconocimiento generado por los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA sobre células BxPC3 por inmunofluorescencia indirecta.** Se crecieron, fijaron y permeabilizaron células BxPC3 en portaobjetos de vidrio, luego se realizaron los marcajes utilizando solamente el anticuerpo secundario conjugado a FITC como control negativo (A), el anticuerpo Chi-Tn (B), o el anticuerpo Tándem IgG/IgA (C). Se marcaron los núcleos celulares utilizando una solución de DAPI. En la Figura se muestra un campo representativo para cada condición evaluada. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Zeiss LSM 800, con una magnificación 630X.

A continuación, se evaluó por inmunofluorescencia indirecta el reconocimiento de las líneas celulares MC38 y MC38-COSMC KO por ambos anticuerpos, Chi-Tn y Tándem IgG/IgA a una concentración de 10 µg/mL. Las MC38 son una línea celular de adenocarcinoma de colon murino, que no expresan el antígeno Tn. Por su parte, las MC38-COSMC KO fueron generadas mediante la eliminación del gen *C1GALT1C1* (gen que codifica para la chaperona Cosmc), lo que genera una sobreexpresión del antígeno Tn (Cornelissen et al., 2020). Se realizaron controles utilizando solamente el control secundario conjugado a FITC, a modo de descartar un reconocimiento inespecífico por parte de este anticuerpo. Todas las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 de la Unidad de Bioimagenología Avanzada (UBA) del Institut Pasteur de Montevideo, en una magnificación 630X.

De acuerdo a lo esperado, las células MC38 *wild type* no presentaron marca en ninguno de los casos, confirmando la ausencia del antígeno Tn (**Fig. 17, A-C**). En cambio, las células MC38-COSMC KO presentaron una fuerte marca para ambos anticuerpos, denotando la sobreexpresión del antígeno Tn, y confirmando que el nuevo anticuerpo generado por nuestro laboratorio, Tándem IgG/IgA, reconoce de manera específica el antígeno Tn. La señal fluorescente se dispuso mayormente de manera citoplasmática y a nivel de la membrana. Las células incubadas con el anticuerpo Tándem IgG/IgA presentaron mayor tinción, a comparación de aquellas incubadas con el anticuerpo Chi-Tn (**Fig. 17, D-F**). Para todos los casos, los controles secundarios no presentaron marca, descartando una interacción inespecífica del anticuerpo secundario.



**Figura 17.** Estudio comparativo del reconocimiento generado por los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA sobre células MC38 *wild type* (A-C) y MC38-COSMC KO (D-F) por

**inmunofluorescencia indirecta.** Se crecieron, fijaron y permeabilizaron células MC38 *wild type* y MC38-COSMC KO en portaobjetos de vidrio, luego se realizaron los marcajes utilizando solamente el anticuerpo secundario conjugado a FITC como control negativo (A, D), el anticuerpo Chi-Tn (B, E), o el anticuerpo Tándem IgG/IgA (C, F). Se marcaron los núcleos celulares utilizando una solución de DAPI. En la Figura se muestra un campo representativo para cada condición evaluada. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Zeiss LSM 800, con una magnificación 630X.

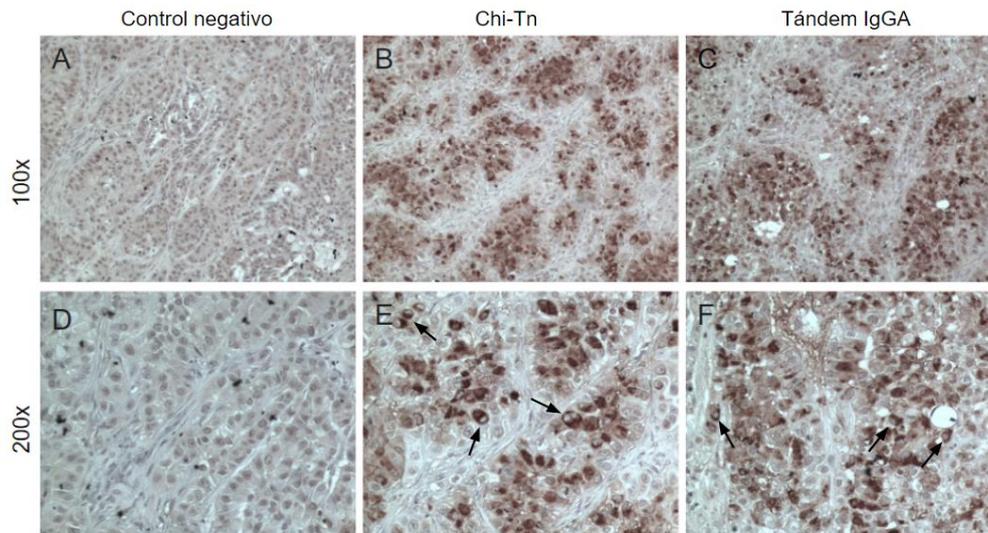
### **4.3 Evaluación de la capacidad del nuevo anticuerpo en Tándem IgG/IgA de reconocer tejidos tumorales humanos**

Una vez confirmado el reconocimiento del antígeno Tn por parte del anticuerpo Tándem IgG/IgA en diferentes líneas celulares, se buscó evaluar su capacidad de reconocer Tn en tejidos tumorales humanos. Para ello, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en tejidos humanos crecidos en ratón, así como en un *array* de tejidos que contiene 190 cortes de tejidos tumorales humanos.

#### **4.3.1 Inmunohistoquímica en tejido tumoral de A549 crecido en ratón**

Para este ensayo, se utilizaron cortes histológicos parafinados de tumores generados en ratones nude con la línea celular de cáncer de pulmón humano A549. Para el marcado de estos cortes histológicos, se utilizaron ambos anticuerpos, Chi-Tn y Tándem IgG/IgA, a una concentración de 1 µg/mL. Adicionalmente, se realizó un control sin anticuerpo primario, incubado solamente con el anticuerpo secundario, para descartar interacciones inespecíficas del anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado a HRP.

De acuerdo a lo esperado, el control incubado solamente con el anticuerpo secundario no generó ninguna marca, descartando interacción inespecífica por parte de este anticuerpo (**Fig. 18, A, D**). Por su parte, los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA fueron capaces de marcar intensamente los cortes histológicos, observándose una intensidad y área positiva de marca similar para ambos anticuerpos. En particular, se observa un marcaje perinuclear y citoplasmático intenso sobre células tumorales, señalado con flechas negras, mientras que no se observa marca sobre el tejido estromal normal (**Fig. 18, B-C, E-F**).



**Figura 18. Inmunohistoquímicas utilizando los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA de tejido tumoral generado a partir de células A549 en ratones nude.** Se muestran imágenes representativas de los cortes histológicos marcados en inmunohistoquímica con el anticuerpo secundario (control negativo) (A, D); Chi-Tn (B, E) y Tándem IgG/IgA (C, F). En flechas negras se señala ejemplos de marcaje perinuclear y citoplasmático. Las imágenes fueron tomadas utilizando microscopía de campo claro a una magnificación de 100x y 200x según se indica en la Figura.

#### **4.3.2 Inmunohistoquímica en *array* de tejidos tumorales humanos**

Una vez confirmado el reconocimiento de células tumorales por el anticuerpo Tándem IgG/IgA sobre un tejido tumoral generado a partir de células de origen humano, se buscó evaluar el reconocimiento del anticuerpo sobre varios cortes histológicos pertenecientes a varios tipos de tumores humanos. Para ello, se utilizó el *array* politumor BC000119b. Este *array* en particular contiene 190 cortes histológicos de adenocarcinoma de mama, carcinoma de pulmón de células escamosas, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de próstata y adenocarcinoma de páncreas.

En primer lugar, se procedió a la biotilación de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA. Los anticuerpos biotilados permiten utilizar estreptavidina como método de revelado, para evitar el uso de anticuerpos secundarios anti-IgG humana, que podrían reconocer anticuerpos ya propios de los tejidos, dando lugar a un marcado inespecífico.

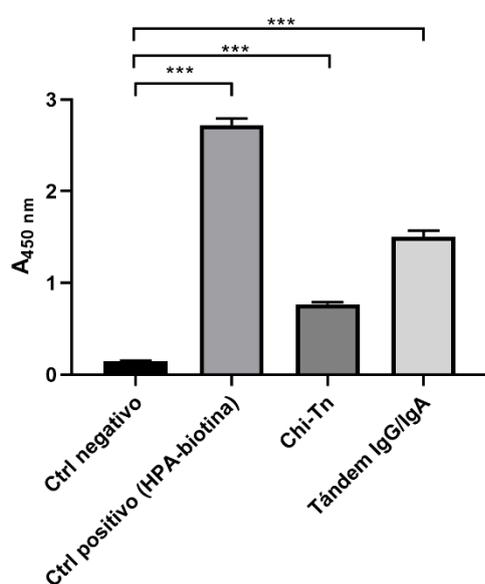
A continuación, se procedió a cuantificar los anticuerpos biotilados. La cuantificación se realizó por dos métodos: por la determinación de la Absorbancia a 280 nm, y por el método colorimétrico BCA. Para el caso de la cuantificación por absorbancia a 280 nm, se midió la absorbancia de los anticuerpos biotilados a esta longitud de onda en un equipo NanoDrop. Utilizando los valores de Abs 0,1% de la IgG y de la IgGA, se calcularon las concentraciones de Chi-Tn y Tándem IgG/IgA, respectivamente. Para el método de BCA, se

realizó una curva de calibración de acuerdo con lo descrito en la sección de Materiales y Métodos (**Fig. S2**). Una vez obtenida la ecuación de la recta de la curva de calibración mediante ajuste lineal, se procedió a calcular las concentraciones de cada anticuerpo. Teniendo en cuenta que la concentración de los *stocks* a partir de los cuales se partió para la biotilación había sido calculada mediante absorbancia a 280 nm, que no se observan grandes diferencias entre los dos métodos utilizados, y que los resultados obtenidos mediante este método eran más coherentes con respecto a la concentración inicial (0,41 mg/mL para Chi-Tn y 0,3 mg/mL para Tándem IgG/IgA), se decidió continuar trabajando con la concentración calculada mediante absorbancia a 280 nm, y no con las concentraciones obtenidas utilizando el método de BCA (Tabla 1).

**Tabla 1. Concentración calculada para los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA biotinilados, por Absorbancia a 280 nm y por BCA.**

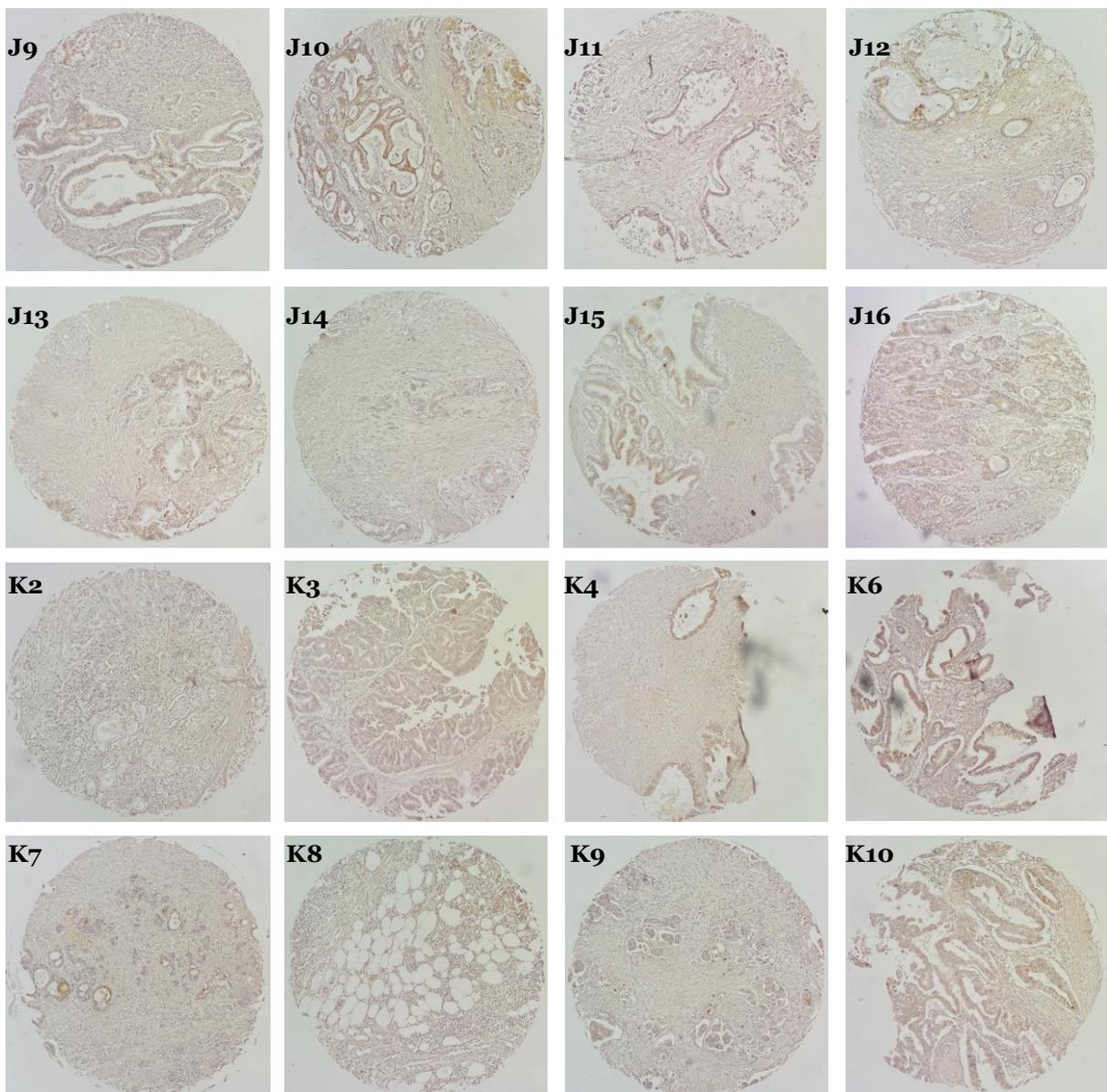
Método	Chi-Tn	Tándem IgG/IgA
Absorbancia 280 nm	0,32 mg/mL	0,21 mg/mL
BCA	0,45 mg/mL	0,28 mg/mL

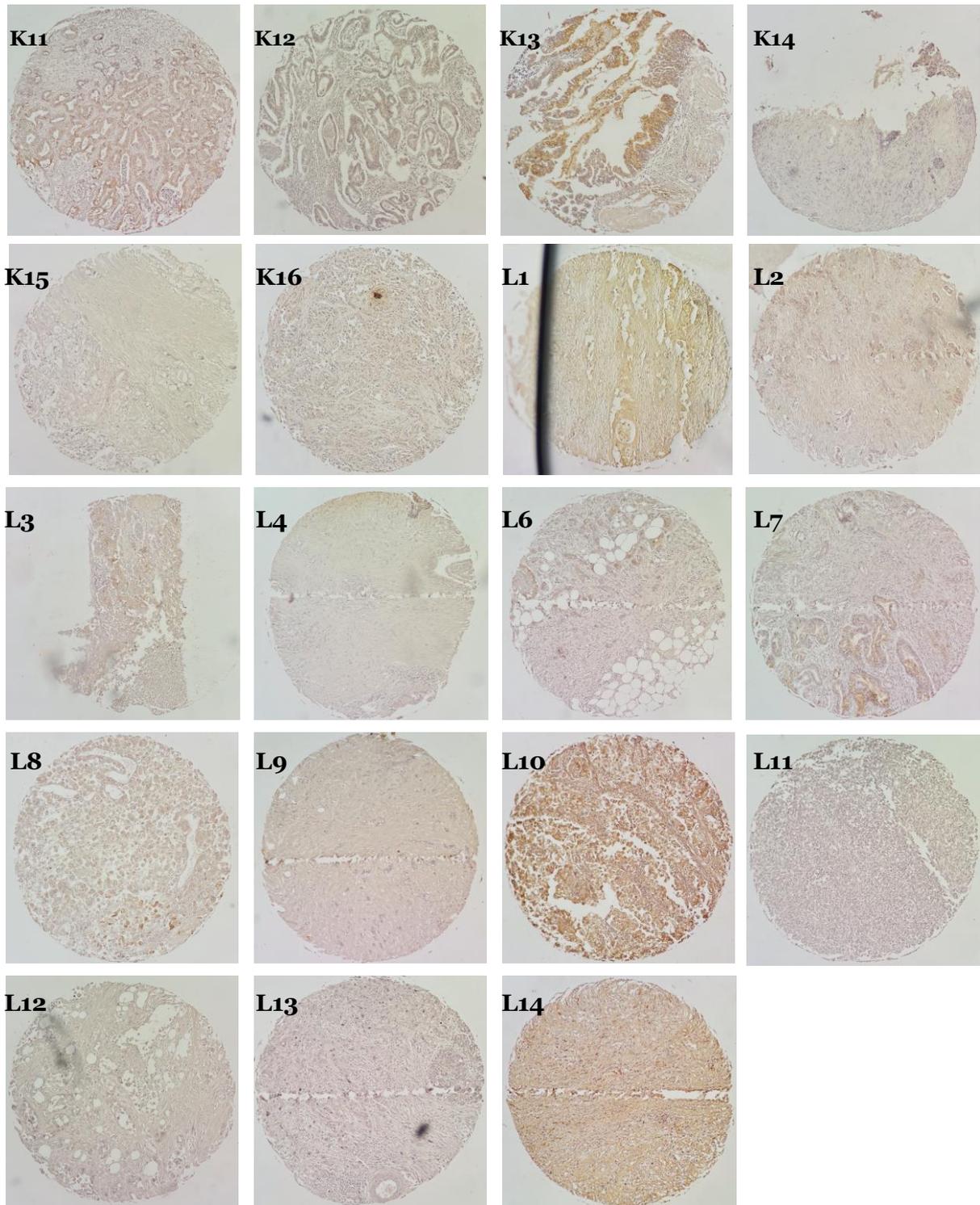
Finalmente, la biotilación de ambos anticuerpos se evaluó mediante la técnica de ELISA, utilizando aOSM como antígeno para sensibilizar las placas y HPA biotinilada como control positivo. La absorbancia a 450 nm, tanto del Chi-Tn como del Tándem IgG/IgA, fue significativamente mayor con respecto al control negativo, confirmando su biotilación. En orden de intensidad de señal, la mayor señal la obtuvo el control con HPA-biotina, seguida por el Tándem IgG/IgA y por último el Chi-Tn (**Fig. 19**).



**Figura 19. Ensayo de ELISA para evaluar la biotilación de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA.** Los pocillos de una placa de 96 *wells* fueron sensibilizados con aOSM en una concentración de 0,01 µg/mL. Como control negativo se utilizó un control sin anticuerpo primario (Ctrl negativo) y como control positivo se utilizó a la lectina HPA conjugada a biotina (Ctrl positivo). Los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA fueron utilizados a una concentración de 1 µg/mL. Para revelar, se utilizó una solución de estreptavidina conjugada a HRP. Para cada muestra se presentan los datos como el promedio y la desviación estándar de los pocillos triplicados. Se muestra la estadística intraexperimento: \*\*\*\*p<0,0001.

Una vez cuantificados los anticuerpos y verificada su biotilación, se procedió a realizar una inmunohistoquímica en el *array* comercial politumor BC000119b (**Fig. S3**). Como testigos positivos de la técnica, se utilizaron cortes histológicos de tumor de A549 crecido en ratones nude (**Fig. S4**). Dentro del *array*, se decidió centrar el análisis en los cortes histológicos de cáncer de páncreas, por ser de especial interés en nuestro laboratorio. A cada corte histológico se le asignó un *score* de marca según el método semicuantitativo combinado (Fedchenko & Reifenrath, 2014). Este consiste en asignar un valor a la intensidad de marca y un valor al porcentaje de células marcadas. La intensidad de marca puede tomar cuatro valores: 0, 1, 2 o 3, que corresponden a una intensidad nula, leve, moderada o fuerte, respectivamente. El porcentaje de células marcadas también puede tomar cuatro valores: 0, 1, 2 o 3. 0 corresponde a un porcentaje nulo de células marcadas, 1 a un porcentaje entre 0 y 30%, 2 a un porcentaje entre 30 y 60%, y 3 a un porcentaje mayor a 60% de células marcadas. El *score* de marca se obtuvo sumando los valores de intensidad y porcentaje, tomando valores entre 0 y 6.





**Figura 20. Inmunohistoquímica de cortes histológicos de cáncer de páncreas humanos utilizando el anticuerpo Tándem IgG/IgA.** Se muestran los cortes histológicos de cáncer de páncreas presentes en el *array* politumor BCO00119b. Las muestras fueron marcadas con el anticuerpo Tándem IgG/IgA biotinilado, a una concentración de 20 µg/mL. El revelado se realizó con estreptavidina conjugada a HRP. Todas las imágenes fueron tomadas en microscopio óptico a una magnificación de 100X.

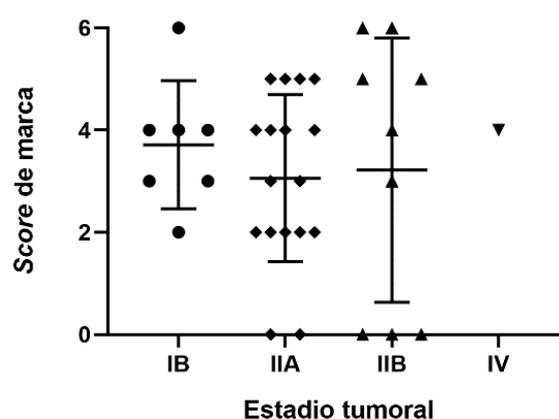
Como se observa en la Figura 20, de 35 cortes histológicos de cáncer de páncreas humano, 30 resultaron positivos, es decir que el anticuerpo Tándem IgG/IgA fue capaz de reconocer antígeno Tn en un 86% de las muestras. Adicionalmente, un 55% de los cortes histológicos presentaron un *score* de marca mayor o igual a 4 (Tabla 2; Tabla S1).

Dada la relación entre la presencia de antígeno Tn y la malignidad y agresividad tumoral reportada en la bibliografía, se buscó analizar si existía una relación estadísticamente significativa entre el estadio tumoral y el *score* de marca obtenido para cada muestra. Para ello, se agruparon las muestras según su estadio y se graficó su *score* correspondiente. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre el estadio de progresión tumoral y el *score* de marca obtenido utilizando el anticuerpo Tándem IgG/IgA sobre los cortes histológicos estudiados (**Fig. 21**).

**Tabla 2. Análisis del *score* de marca utilizando el anticuerpo Tándem IgG/IgA obtenido para las inmunohistoquímicas de los cortes histológicos de cáncer de páncreas humano mediante el método semicuantitativo combinado.** En la tabla se indica el número de muestras para cada valor de *score*, así como el porcentaje relativo de cada *score* sobre el total de muestras.

Score	Número de muestras	% Relativo
0	5	14
2	6	17
3	5	14
4	10	29
5	6	17
6	3	9

**Figura 21. Correlación entre el *score* de marca asignado a cada corte histológico y su estadio de progresión tumoral.** Las muestras se agruparon según su estadio tumoral, y se graficaron los *scores* de marca asignados (●: IB; ◆: IIA; ▲: IIB; ▼: IV). Se representan las medias de cada grupo, así como su desviación estándar. El estudio estadístico se realizó mediante un test one-way ANOVA.



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Evaluación de la producción de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA

La evaluación de la producción de los anticuerpos Chi-Tn (IgG) y Tándem IgG/IgA se realizó mediante las técnicas de SDS-PAGE y Western Blot. Con respecto a la SDS-PAGE, la misma fue realizada en condiciones reductoras y no reductoras. Mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, se buscó evaluar la presencia y tamaño molecular de las cadenas pesadas y livianas de ambos anticuerpos. Para el caso del Chi-Tn, se obtuvieron dos bandas prominentes, de 55 y 26 kDa, que se corresponden con la cadena pesada y la liviana, respectivamente. En cuanto al Tándem IgG/IgA, se obtuvieron dos bandas, de 85 y 26 kDa, lo cual se corresponde con los pesos moleculares esperados para la cadena pesada y liviana respectivamente (**Fig. 10, A**). Teniendo en cuenta que cada dominio de inmunoglobulina pesa alrededor de 13 kDa (Bowen & Casadevall, 2018), y que el anticuerpo Tándem IgG/IgA se generó incorporando al extremo C-terminal de las cadenas pesadas del anticuerpo Chi-Tn (IgG1) los dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> de una IgA<sub>2</sub>, el aumento en aproximadamente 30 kDa del tamaño de la banda pesada del Tándem IgG/IgA coincide con lo esperado. Adicionalmente, se realizó el análisis del grado de pureza de las muestras previo y posterior a la diálisis. Mientras que la pureza del anticuerpo Chi-Tn no varió luego de la diálisis, manteniéndose en un 95%, el grado de pureza del Tándem IgG/IgA aumentó considerablemente luego de este procedimiento, de un 86% a un 93%. La obtención de muestras de anticuerpos puras es de vital importancia para el estudio de actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* de los mismos. Teniendo en cuenta que el Tándem IgG/IgA es un anticuerpo con potencial uso en inmunoterapia, un grado de pureza alto es indispensable para evaluar su actividad biológica, tanto en líneas celulares como en modelos animales. En conclusión, realizar una diálisis posterior a la producción de los anticuerpos, en especial del anticuerpo Tándem IgG/IgA, es necesario para obtener muestras de calidad.

Por su parte, la SDS-PAGE en condiciones no reductoras se realizó en busca de evaluar la integridad estructural de ambos anticuerpos, así como su peso molecular. En contra de lo esperado, esta electroforesis arrojó numerosas bandas, tanto para el caso del Chi-Tn como el Tándem IgG/IgA, de varios pesos moleculares. Para el caso del Chi-Tn, se observan bandas tenues de 120, 160 y 180 kDa, así como una banda más intensa de tamaño mayor a 180 kDa; mientras que para el Tándem IgG/IgA, se observa una banda de aproximadamente 165 kDa, así como bandas mayores a 180 kDa (**Fig. 10**). Debido a que no contamos con un marcador de peso molecular de mayor rango, el peso molecular de las bandas mayores a 180 kDa no pudo ser determinado. Se ha reportado que la observación de numerosas bandas en electroforesis no reductora de anticuerpos es un fenómeno frecuente. Esto se debe al

desplegado diferencial de los dominios Fab, CH2 y CH3 en condiciones no reductoras, que genera bandas de tamaños diferentes al esperado. Se ha visto que el agregado de ciertos alcoholes, como el butanol o isopropanol, pueden revertir este efecto si se calienta la muestra a no más de 50°C, ya que por encima de esta temperatura vuelven a apreciarse numerosas bandas (Kirley & Norman, 2018). Debido a esto, sería deseable evaluar el peso molecular del Tándem IgG/IgA nativo mediante otras técnicas como espectrometría de masas, que permitan obtener resultados más certeros. En términos generales, los resultados obtenidos fueron concordantes, obteniéndose bandas de mayor tamaño para el Tándem IgG/IgA con respecto al Chi-Tn, denotando el mayor tamaño molecular del anticuerpo en tándem.

Por último, la evaluación de la presencia de los dominios Fc $\gamma$  y Fc $\alpha$  en el anticuerpo Tándem IgG/IgA mediante Western Blot arrojó resultados positivos. Tanto con el revelado con el anticuerpo secundario anti-IgG humana como con el anticuerpo anti-IgA humana se observó una banda de 85 kDa, que coincide con el peso molecular de la cadena pesada del Tándem IgG/IgA como con los resultados de la SDS-PAGE reductora. Para el caso del Western Blot revelado con un anticuerpo anti-IgG humana, se observan algunas bandas minoritarias, de menor peso molecular, que podrían corresponder a productos de degradación (**Fig. 11**). La confirmación de la presencia del Fc $\alpha$  en la estructura del anticuerpo Tándem IgG/IgA es de gran importancia, ya que es lo que lo distingue frente a su antecesor, el Chi-Tn. Esta característica estructural es lo que, en teoría, le permitiría al Tándem IgG/IgA ser capaz de activar potentes mecanismos efectores en neutrófilos, a comparación de su parental IgG (Heemskerk et al., 2021).

En suma, la producción de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA fue de buena calidad, obteniéndose muestras con un alto grado de pureza. Además, los ensayos de Western Blot permitieron obtener resultados preliminares de que el Tándem IgG/IgA presenta los dominios Fc tanto de la IgG como de la IgA, por lo que en principio presentaría la ventaja respecto a su parental Chi-Tn de poder ser reconocido por el receptor CD89 (Fc $\alpha$ RI). Si bien estos son resultados alentadores, es necesario continuar con la caracterización del Tándem IgG/IgA, mediante ensayos *in vitro*, para confirmar su interacción con el receptor CD89, así como para evaluar su capacidad de activar al receptor. Adicionalmente, sería deseable confirmar que el Tándem IgG/IgA mantiene su capacidad de unión al receptor FcRn y, por lo tanto, una vida media en suero similar a su parental, el Chi-Tn.

## **5.2 Evaluación de la capacidad del nuevo anticuerpo en Tándem IgG/IgA de reconocer líneas celulares tumorales Tn positivas**

Luego de evaluar la producción del nuevo anticuerpo Tándem IgG/IgA, se estudió su capacidad de reconocer al antígeno Tn, en particular, *clusters* de Tn. Resultados previos

obtenidos por el Dr. Federico Carrión del Laboratorio de Inmunovirología del Institut Pasteur de Montevideo, mediante la técnica de Biacore SPR, indicaron que existía reconocimiento del antígeno Tn por parte del anticuerpo Tándem IgG/IgA (datos no publicados). En esta tesina, se buscó complementar estos resultados mediante diferentes abordajes. En primer lugar, se evaluó la capacidad del Tándem IgG/IgA de reconocer células Tn positivas, mediante ensayos de citometría de flujo e inmunofluorescencia indirecta. En los ensayos de citometría de flujo, se trabajó con tres líneas celulares de carcinoma de páncreas (T3M4, L3.6 y Bxpc3) y una línea de carcinoma de colon (CT26). Los ensayos de optimización de la concentración de anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA, mostraron como resultado que a concentraciones altas (40 µg/mL), ambos anticuerpos presentan interacciones inespecíficas, detectando porcentajes de células Tn positivas más elevados que los reales. Esto se deduce porque el porcentaje de células Tn positivas detectado por ambos anticuerpos es significativamente mayor al detectado por la lectina HPA (**Fig. 12**). De no presentar interacciones inespecíficas, el porcentaje de células Tn positivas detectado mediante los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA debería ser igual o menor al detectado por HPA. Esto se debe a que la HPA no es una lectina específica del antígeno Tn, sino que reconoce cualquier estructura que tenga un residuo de GalNAc terminal. Incluso, se ha reportado que la lectina HPA es capaz de reconocer al antígeno T, cuya estructura es Gal-β(1→3)GalNAc (Sanchez et al., 2006). Para sobrepasar esto, se decidió trabajar con concentraciones de anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA más bajas. En particular, se escogió trabajar con una concentración de 10 µg/mL, que se encuentra dentro del rango recomendado por varios manuales de citometría de flujo (Yale School of Medicine, 2019). Para las tres líneas celulares de cáncer de páncreas, se obtuvieron resultados concordantes, sin diferencias significativas entre el anticuerpo Chi-Tn y el Tándem IgG/IgA. Además, el porcentaje de células Tn positivas detectado por los anticuerpos fue similar o menor al detectado por HPA en el ensayo anterior, por lo que se concluye que se logró minimizar las interacciones inespecíficas (**Fig. 13, A-C**). Para el caso de la línea de carcinoma de colon CT26, se obtuvieron porcentajes de células Tn positivas significativamente mayores para el Tándem IgG/IgA con respecto al Chi-Tn (**Fig. 13, D**). Esta disparidad entre ambos anticuerpos podría explicarse por la expresión de receptores de IgA capaces de promover la interacción del Tándem IgG/IgA con las células, hecho que no sucedería con el Chi-Tn. En efecto, se ha reportado la expresión de un receptor de IgA, diferente al CD89 y al pIgR, en varias líneas celulares de carcinoma de colon (Kitamura et al., 2000). En caso de que la unión de este receptor no afecte el reconocimiento por parte de CD89, esto podría presentar una ventaja para el Tándem IgG/IgA como agente terapéutico en cáncer de colon.

Una vez analizado el reconocimiento del antígeno Tn por citometría de flujo, se decidió realizar ensayos de inmunofluorescencia indirecta para complementar los resultados. En este caso, se trabajó primero con las tres líneas celulares de cáncer de páncreas (T3M4, BxPC3 y

L3.6). Las imágenes mostraron resultados concordantes con los obtenidos mediante citometría de flujo. Además, las células T3M4 parecen mostrar un mayor porcentaje de células Tn positivas y marcaje más intenso. En todos los casos se observa que no todas las células son Tn positivas, resultado que concuerda con lo obtenido por citometría de flujo. *A priori*, esperaríamos obtener un 100% de marcaje, ya que son líneas celulares y no poblaciones heterogéneas de varios tipos celulares. Sin embargo, la heterogeneidad observada en la expresión del antígeno Tn dentro de una misma línea celular, es un fenómeno común entre líneas celulares tumorales, cuya alta variabilidad genética genera subpoblaciones heterogéneas (Ben-David et al., 2018). Inclusive, esta disparidad en la expresión se ha reportado para el antígeno Tn en otras líneas celulares tumorales (Guillot, 2002). Adicionalmente, se ha reportado que la expresión del antígeno Tn varía en función de la fase del ciclo celular en la cual se encuentre la célula, explicando también esta disparidad en la expresión dentro de una misma línea (Liu & Li, 2018). En cuanto a la disposición del marcado, esta se distribuyó en un patrón granular en todos los casos. Los gránulos se dispusieron predominantemente de manera perinuclear para las líneas T3M4 y L3.6 (**Fig. 14, Fig. 15**), mientras que para BxPC3 la marca se distribuyó principalmente a lo largo del citoplasma (**Fig. 16**). El patrón granular coincide con lo reportado en otras líneas celulares, y podría estar asociado al tráfico vesicular de proteínas O-glicosiladas en el aparato de Golgi (Guillot, 2002; Fisher & Ungar, 2016). T3M4, BxPC3 y L3.6 son líneas celulares de cáncer pancreático ductal (PDAC) humano, un cáncer cuya mortalidad ronda el 98% (Thomas et al., 2019). Si bien la expresión del antígeno Tn en estas líneas ya ha sido previamente reportada (Hofmann et al., 2015; Thomas et al., 2019), la confirmación del reconocimiento por parte del anticuerpo en Tándem IgG/IgA las vuelve excelentes candidatas para realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro*, que permitan elucidar la capacidad del Tándem IgG/IgA de inducir muerte celular dependiente de anticuerpo.

Ya analizadas las líneas celulares de páncreas, se procedió a realizar ensayos de inmunofluorescencia indirecta con las líneas celulares MC38 *wild type* y MC38-COSMC KO (Tn<sup>high</sup>). MC38 es una línea celular de adenocarcinoma de colon de origen murino, en concreto de la cepa de ratones C57BL/6. En particular, la línea MC38 Tn<sup>high</sup> se generó a partir de la delección del gen *C1GALT1C1*, que codifica para la proteína chaperona Cosmc. La delección de esta chaperona, importante en el plegamiento de la enzima T-sintasa funcional, genera que esta última sea rápidamente degradada. Dado que la T-sintasa es la enzima encargada de convertir al antígeno Tn en antígeno T, la delección del gen de que codifica para Cosmc genera una acumulación de Tn en las MC38 (Ju et al., 2014; Cornelissen et al., 2020). Se observó que, de acuerdo con lo esperado, la línea MC38 *wild type* no expresa el antígeno Tn (**Fig. 17, A-C**), mientras que MC38-COSMC KO presenta una marca intensa, en aproximadamente el 100% de las células (**Fig. 17, D-F**). El marcado se dispone en un patrón granular,

distribuyéndose a nivel de la membrana y el citosol. Contar con dos líneas celulares de cáncer de colon, una Tn negativa y otra Tn positiva, plantea una oportunidad interesante. La posibilidad de realizar ensayos *in vivo* en ratones C57BL/6, con tumores Tn negativos y Tn positivos, permite analizar el efecto directo del anticuerpo Tándem IgG/IgA en la reducción tumoral y la supervivencia de los ratones. Sin embargo, es importante aclarar que este tipo de ensayos requieren utilizar ratones transgénicos que expresen CD89, ya que al contrario que los humanos, los ratones no expresan este receptor (Heemskerk et al., 2021).

En suma, el anticuerpo Tándem IgG/IgA fue capaz de reconocer al antígeno Tn en numerosas líneas celulares, tanto de cáncer de páncreas como de cáncer de colon. Mientras que, en las líneas de páncreas, el Tándem IgG/IgA se comportó de manera similar al Chi-Tn, en las líneas de colon el anticuerpo Tándem IgG/IgA marcó con mayor intensidad y en un mayor porcentaje a las líneas celulares MC38-COSMC KO y CT26, respectivamente.

### **5.3 Evaluación de la capacidad del nuevo anticuerpo en Tándem IgG/IgA de reconocer tejidos tumorales humanos**

Finalmente, se evaluó la capacidad del anticuerpo Tándem IgG/IgA de reconocer al antígeno Tn en tejidos tumorales de origen humano. Para ello, en primer lugar se realizó un ensayo de inmunohistoquímica en tejido tumoral generado a partir de la línea celular A549 crecido en ratones nude. A549 es una línea celular de cáncer de pulmón humano, uno de los cánceres con mayor incidencia y mortalidad a nivel nacional, tanto en hombres como en mujeres (Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2023). Los resultados para el Tándem IgG/IgA fueron ampliamente satisfactorios, demostrando que es un anticuerpo capaz de reconocer al antígeno Tn con la misma capacidad que su anticuerpo predecesor, el Chi-Tn. Ambos anticuerpos fueron capaces de marcar con gran intensidad el tejido de A549, cuya marca se distribuyó de manera citoplasmática y perinuclear (**Fig. 18**).

A continuación, se decidió llevar a cabo un ensayo de inmunohistoquímica en un *array* de tejidos tumorales comercial. La gran cantidad de cortes histológicos de pacientes con cáncer permite obtener información valiosa acerca del reconocimiento del antígeno Tn por parte del Tándem IgG/IgA, en varios tipos de cáncer.

El primer paso para llevar a cabo la inmunohistoquímica de este *array* de tejidos fue la biotinylación del anticuerpo Tándem IgG/IgA. Esto se debe a que la presencia de anticuerpos humanos propios de los tejidos en los cortes histológicos del *array* podría dar como resultado un gran marcaje inespecífico al revelar con un anticuerpo secundario anti-IgG humana. Biotinylar el anticuerpo permite revelar con estreptavidina-HRP, sobrepasando la limitación anteriormente mencionada. La biotinylación del Tándem IgG/IgA fue confirmada mediante

un ensayo de ELISA, el cual mostró que a la misma concentración que el Chi-Tn biotinilado, y a pesar de ser una molécula de mayor tamaño, el Tándem IgG/IgA biotinilado presentó una mayor señal respecto al Chi-Tn biotinilado (**Fig. 19**). Este resultado podría deberse a que el mayor tamaño molecular del Tándem IgG/IgA, permite que exista una mayor cantidad de sitios de biotinilación posibles y por lo tanto existe la posibilidad de que la señal se encuentre amplificada. La cuantificación de la concentración de los anticuerpos biotinilados mediante absorbancia a 280 nm resultó más coherente que la cuantificación por BCA. Esto se puede observar claramente en los resultados obtenidos para el Chi-Tn, cuya concentración inicial era de 0,41 mg/mL. Mientras que la concentración obtenida luego de la biotinilación por el método de Absorbancia a 280 nm fue de 0,32 mg/mL, la concentración del Chi-Tn biotinilado obtenida mediante el método BCA fue de 0,45 mg/mL, es decir, se obtuvo una concentración mayor a la inicial. Es probable que esto pueda ser explicado porque, como se mencionó anteriormente, la concentración de los *stocks* de partida había sido determinada mediante absorbancia a 280 nm y no por BCA. Adicionalmente, realizar una curva de calibración puede acarrear errores que se vean reflejados en la concentración final calculada, por ejemplo, por estándares en mal estado o errores en la manipulación. Como conclusión, se lograron obtener soluciones de los anticuerpos Chi-Tn y Tándem IgG/IgA biotinilados a una concentración de 0,32 mg/mL y 0,21 mg/mL, respectivamente. Estos anticuerpos podrán ser utilizados en ensayos que requieran un revelado con estreptavidina conjugada a una molécula reportera.

Una vez obtenido el anticuerpo Tándem IgG/IgA biotinilado, se procedió a analizar el *array* comercial politumor. Para esta tesina, se decidió centrar el análisis en los cortes histológicos de cáncer de páncreas, debido a que es uno de los cánceres más letales, con una tasa de supervivencia a 5 años que oscila entre el 2 y el 9% (Hu et al., 2021). A nivel nacional, el cáncer de páncreas es el cáncer más mortal, teniendo tasas de incidencia y mortalidad similares, tanto en hombres como en mujeres (Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2023). Dada su alta letalidad y la falta de terapias que sean efectivas para su tratamiento, urge encontrar nuevas alternativas terapéuticas que sean eficaces en tratar este tipo de cáncer. En este trabajo, se encontró que el Tándem IgG/IgA fue capaz de reconocer al antígeno Tn en un 86% de los cortes histológicos de cáncer de páncreas, porcentaje que coincide con lo reportado en la bibliografía (Itzkowitz et al., 1991). En general, el marcaje más intenso se observó en estructuras excretoras como conductos de excreción y acinos pancreáticos (**Fig. 20**). Esto puede explicarse por el hecho de que, tanto las células ductales como las acinares están especializadas en producir grandes cantidades de enzimas digestivas pancreáticas, sujetas a numerosas modificaciones postraduccionales dentro del aparato de Golgi, incluyendo la O-glicosilación (Cooley et al., 2020). Es probable que, alteraciones en la expresión y/o localización de ppGalNAcTs a nivel del Golgi, causen un aumento considerable en la expresión de antígeno Tn en este tipo de estructuras (Gill et al., 2013).

El análisis de los *scores* de marca mostró que más de la mitad de los cortes histológicos de cáncer de páncreas presentaban un *score* igual o mayor a 4, denotando un marcaje intenso de Tn, así como un alto porcentaje de células marcadas (Tabla 2). En cuanto a la correlación entre el *score* de marca y el estadio tumoral de cada muestra, no se encontró una relación significativamente estadística entre ambas variables (**Fig. 21**). Esta ausencia de correlación ya ha sido reportada en otros tipos de cáncer, como cáncer de mama (Imai et al., 2001) y adenocarcinoma de colon (Ohshio et al., 1995). Sin embargo, esta falta de correlación podría resultar positiva para el Tándem IgG/IgA, ya que sería posible utilizarlo como agente terapéutico en cualquier tumor de páncreas Tn positivo, independientemente de su grado de avance.

Si bien los resultados obtenidos para el resto de los cortes histológicos del *array* no se muestran en este trabajo, merece la pena mencionar que el Tándem IgG/IgA fue capaz de reconocer al antígeno Tn en un gran porcentaje de muestras de cáncer de mama, pulmón y colon. Esto, en conjunto con todos los resultados obtenidos a lo largo de esta tesina, plantean al Tándem IgG/IgA como un potencial agente inmunoterapéutico para ser utilizado en varios tipos de cáncer de gran incidencia y mortalidad, como son los cánceres de mama, pulmón, colon y páncreas (Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2023). Adicionalmente, las ventajas estructurales que presenta el Tándem IgG/IgA con respecto a su antecesor, Chi-Tn, hacen que valga la pena explorar su capacidad como anticuerpo inmunoterapéutico, ya sea para ser utilizado como monoterapia, o en terapia combinada con inhibidores de punto de control inmunológicos (Li et al., 2023).

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo, se logró evaluar satisfactoriamente la capacidad del anticuerpo Tándem IgG/IgA de reconocer al antígeno Tn, tanto en líneas celulares tumorales como en tejidos tumorales de origen humano. La evaluación de la producción del Tándem IgG/IgA, así como de su anticuerpo parental, Chi-Tn, mostraron resultados positivos. Ambos anticuerpos se obtuvieron con un alto grado de pureza, un factor importante para poder utilizarlos en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, el Tándem IgG/IgA demostró contar con el dominio Fca en su estructura, que lo diferencia del Chi-Tn y le brinda las ventajas de una IgA.

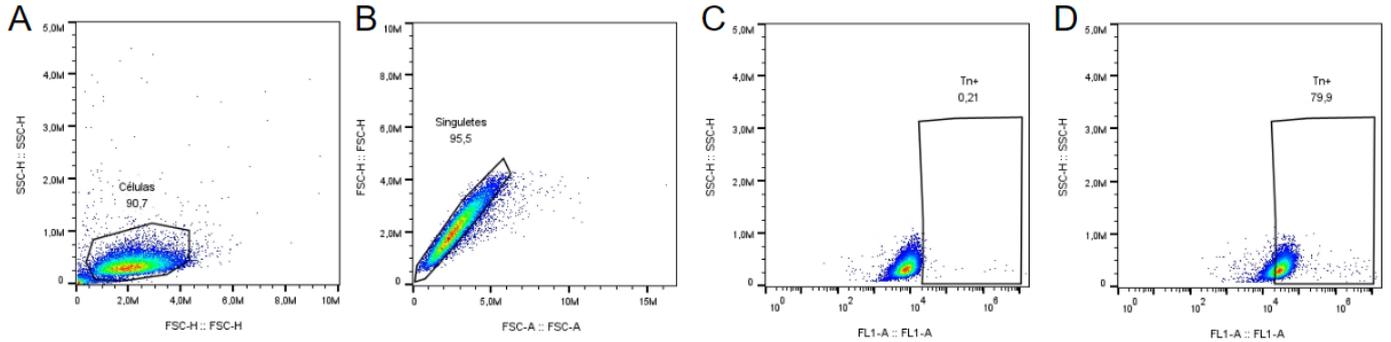
Con respecto al reconocimiento del antígeno Tn en líneas celulares, el Tándem IgG/IgA fue capaz de reconocer todas las líneas celulares Tn positivas, incluyendo líneas de cáncer de páncreas (T3M4, BxPC3, L3.6) y cáncer de colon (CT26, MC38-COSMC KO). Mientras que en las líneas de páncreas presentó un reconocimiento similar al Chi-Tn, en líneas de colon se observó un mayor reconocimiento por parte del Tándem IgG/IgA, tanto por citometría de flujo como por inmunofluorescencia indirecta. Esto último puede ser explicado por la presencia de receptores de IgA en células epiteliales intestinales, que aumentan la captación del anticuerpo en tándem. En resumen, el Tándem IgG/IgA fue capaz de reconocer al antígeno Tn en todas las líneas celulares anteriormente mencionadas, y estas líneas pueden ser por lo tanto utilizadas en ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Asimismo, la línea MC38-COSMC KO, puede ser utilizada en ensayos de citotoxicidad *in vivo* en ratones C57BL/6.

Finalmente, el Tándem IgG/IgA fue capaz de reconocer tejidos tumorales humanos. Por un lado, presentó una capacidad similar al Chi-Tn de reconocer al antígeno Tn en un tejido de la línea celular de cáncer de pulmón humano A549. Por otro lado, fue capaz de reconocer el antígeno Tn en un 86% de los cortes histológicos de cáncer de páncreas presentes en el *array* de tejidos tumorales comercial, marcando principalmente estructuras excretoras. Más de la mitad de los cortes histológicos presentaron un *score* de marca igual o mayor a 4, aunque no se encontró correlación entre el *score* y el estadio tumoral de las muestras. Además del reconocimiento de Tn en muestras de cáncer de páncreas, el Tándem IgG/IgA fue capaz de reconocer numerosos cortes histológicos de cáncer de mama, pulmón y colon (datos no mostrados).

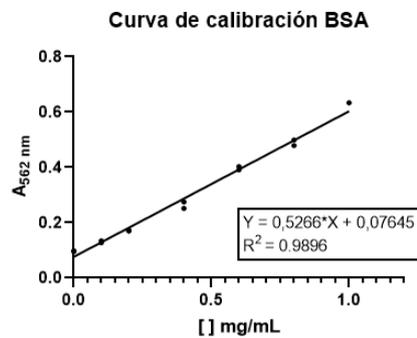
En suma, el Tándem IgG/IgA resultó ser un candidato interesante como anticuerpo inmunoterapéutico para una gran variedad de tipos de tumores, incluyendo algunos de los cánceres más incidentes y mortales a nivel nacional e internacional, como el cáncer de páncreas, colon, pulmón y mama. Sin embargo, resta continuar con su caracterización y

evaluación de la capacidad antitumoral de este anticuerpo, tanto *in vitro* como *in vivo*, para confirmar su efectividad como anticuerpo monoclonal a utilizar en inmunoterapia del cáncer. Además, es deseable evaluar la farmacocinética de este anticuerpo en suero, es decir, si su vida media en suero se mantiene por varios días, al igual que ocurre con la IgG, como lo es su parental, el Chi-Tn (IgG<sub>1</sub>). Adicionalmente, resulta importante determinar su capacidad de desencadenar muerte celular tumoral dependiente de anticuerpos, tanto *in vitro* como *in vivo*, así como su capacidad de activar mecanismos citotóxicos en células que presenten receptores de IgA como los neutrófilos, los leucocitos más abundantes en sangre.

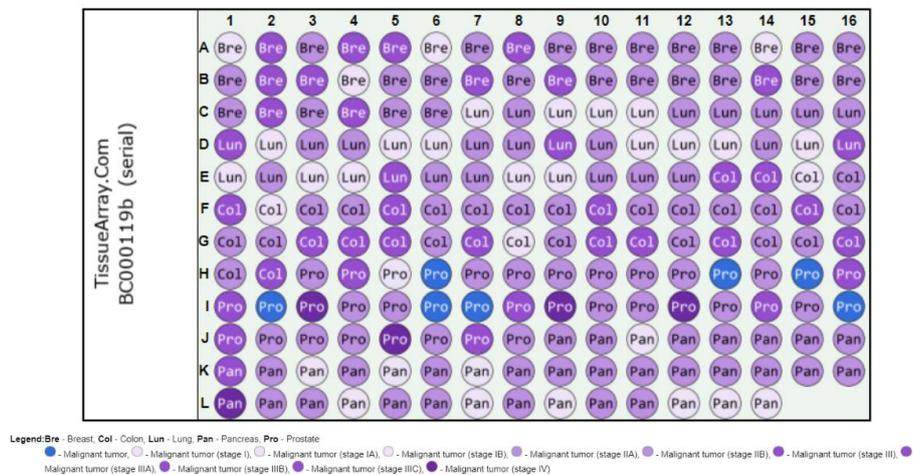
## 7. ANEXO



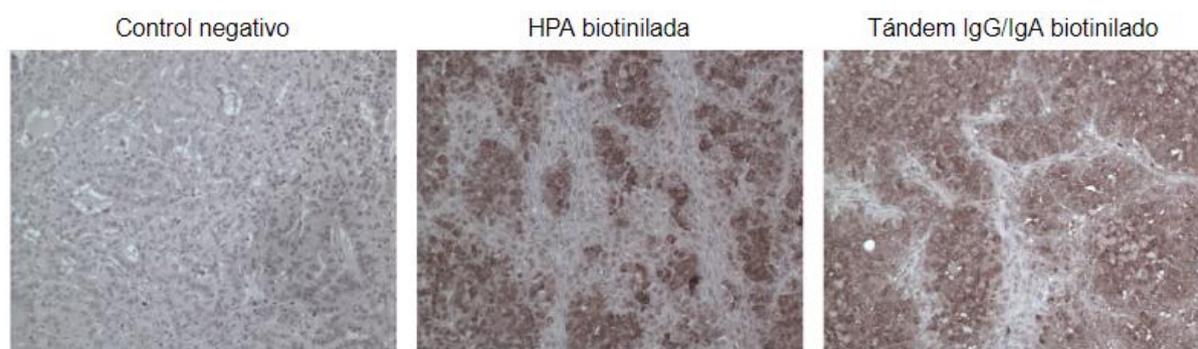
**Figura S1. Estrategia de *gating* utilizada para el análisis de datos obtenidos por citometría de flujo.** Se muestra una representación esquemática de la estrategia de *gating*, donde en primer lugar se seleccionaron las células (A), luego los singuletes (B), y finalmente, se definió la zona de células Tn positivas (C). Por último, se muestra un caso representativo de una muestra con células Tn positivas (D).



**Figura S2. Curva de calibración obtenida para el método de cuantificación BCA.** Se muestran la ecuación de la recta obtenida mediante ajuste lineal, así como el coeficiente  $R^2$ .



**Figura S3. Array comercial politumor BC00011b.** En esta tesina se analizaron los cortes histológicos de carcinoma de páncreas, representados en la Figura como Pan (J9-L14).



**Figura S4. Inmunohistoquímicas con el anticuerpo Tándem IgG/IgA biotinilado, en cortes histológicos de tumor de A549 crecido en ratones nude.** Las muestras se utilizaron como testigos positivos de la técnica de inmunohistoquímica en *array* comercial. HPA biotinilada fue utilizada como control positivo. Las imágenes fueron tomadas en microscopio óptico, a una magnificación de 100X.

**Tabla S1. Valores de intensidad de marca, porcentaje de células marcadas, score de marca y estadios de desarrollo de las muestras de cáncer de páncreas del *array* comercial BC00011b analizadas.**

Muestra	Intensidad de marca	% de células marcadas	Score	Estadio de desarrollo
J9	1	1	2	IIA
J10	2	2	4	IIA
J11	0	0	0	IIB
J12	2	1	3	IIA
J13	0	0	0	IIA
J14	1	1	2	IIA
J15	2	2	4	IIB
J16	1	2	3	IIA
K2	0	0	0	IIB
K3	1	3	4	IB
K4	2	2	4	IIA
K6	2	3	5	IIB
K7	2	1	3	IB
K8	1	1	2	IIA
K9	1	1	2	IIA
K10	2	3	5	IIA
K11	2	3	5	IIA

K12	2	3	5	IIA
K13	3	3	6	IIB
K14	2	2	4	IIA
K15	0	0	0	IIB
K16	1	3	4	IIA
L1	2	2	4	IV
L2	2	3	5	IIA
L3	0	0	0	IIA
L4	2	2	4	IB
L6	2	1	3	IIB
L7	2	2	4	IB
L8	2	3	5	IIB
L9	1	1	2	IB
L10	3	3	6	IIB
L11	1	1	2	IIA
L12	2	2	4	IB
L13	1	2	3	IB
L14	3	3	6	IB

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Ghiso, J. A.** (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*, 7(11), 834–846.
- Aleyd, E., Van Hout, M. W. M., Ganzevles, S. H., Hoeben, K. A., Everts, V., Bakema, J. E., & Van Egmond, M.** (2014). IgA enhances NETosis and release of neutrophil extracellular traps by polymorphonuclear cells via Fcα receptor I. *The Journal of Immunology*, 192(5), 2374–2383.
- Anand, U., Dey, A., Chandel, A. K. S., Sanyal, R., Mishra, A., Pandey, D. K., De Falco, V., Upadhyay, A., Kandimalla, R., Kalra, R. S., Dhanjal, J. K., Dewanjee, S., Vallamkondu, J., & De La Lastra, J. M. P.** (2023). Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & Diseases*, 10(4), 1367–1401.
- Ando, H., Matsushita, T., Wakitani, M., Sato, T., Kodama-Nishida, S., Shibata, K., Shitara, K., & Ohta, S.** (2008). Mouse-Human Chimeric Anti-Tn IgG1 Induced Anti-tumor Activity against Jurkat Cells *in Vitro* and *in Vivo*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(9), 1739–1744.
- Behrens, L. M., Van Egmond, M., & Van Den Berg, T. K.** (2022). Neutrophils as immune effector cells in antibody therapy in cancer. *Immunological Reviews*, 314(1), 280–301.
- Ben-David, U., Siranosian, B., Ha, G., Tang, H., Oren, Y., Hinohara, K., Strathdee, C. A., Dempster, J., Lyons, N. J., Burns, R., Nag, A., Kugener, G., Cimini, B., Tsvetkov, P., Maruvka, Y. E., O'Rourke, R., Garrity, A., Tubelli, A. A., Bandopadhyay, P., Golub, T. R.** (2018). Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature*, 560(7718), 325–330.
- Berois, N., Pittini, A., & Osinaga, E.** (2022). Targeting tumor glycans for cancer therapy: Successes, limitations, and perspectives. *Cancers*, 14(3), 645.
- Berraondo, P., Sanmamed, M. F., Ochoa, M. C., Etxeberria, I., Aznar, M. A., Pérez-Gracia, J. L., Rodríguez-Ruiz, M. E., Ponz-Sarvisé, M., Castañón, E., & Melero, I.** (2018). Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer*, 120(1), 6–15.
- Borrok, M. J., Luheshi, N. M., Beyaz, N., Davies, G. C., Legg, J. W., Wu, H., Dall'Acqua, W. F., & Tsui, P.** (2015). Enhancement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by endowing IgG with FcαRI (CD89) binding. *MAbs*, 7(4), 743–751.
- Bowen, A., & Casadevall, A.** (2018). The role of the constant region in Antibody-Antigen interactions: redefining the modular model of immunoglobulin structure. *In Elsevier eBooks* (pp. 145–170).
- Brookes, P.** (1990). The early history of the biological alkylating agents, 1918–1968. *Mutation Research*, 233(1–2), 3–14.

- Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J.** (2023). Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research*, 21(11), 1142–1147.
- Busch W.** (1867). Aus der Sitzung der medicinischen. *Berlin Klin Wochenschr*; 5, 137.
- Burnet, F.M.** (1957) Cancer—a biological approach. *Br Med J*, 1(5023), 841–847.
- Cao, Y., Stosiek, P., Springer, G. F., & Karsten, U.** (1996). Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochemistry and Cell Biology*, 106(2), 197–207.
- Cappell, K. M., & Kochenderfer, J. N.** (2023). Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 20(6), 359–371.
- Castro, A., Berois, N., Malanga, A., Ortega, C., Oppezzo, P., Pristch, O., Mombrú, A. W., Osinaga, E., & Pardo, H.** (2021). Docetaxel in chitosan-based nanocapsules conjugated with an anti-Tn antigen mouse/human chimeric antibody as a promising targeting strategy of lung tumors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 806–814.
- Chao, M. P., Jaiswal, S., Weissman-Tsukamoto, R., Alizadeh, A. A., Gentles, A. J., Volkmer, J., Weiskopf, K., Willingham, S. B., Raveh, T., Park, C. Y., Majeti, R., & Weissman, I. L.** (2010). Calreticulin Is the Dominant Pro-Phagocytic Signal on Multiple Human Cancers and Is Counterbalanced by CD47. *Science Translational Medicine*, 2(63), 63ra94–63ra94.
- Charpin, C., Pancino, G., Osinaga, E., Bonnier, P., Lavaut, M.N., Allasia, C., Roseto, A.** (1992). Monoclonal antibody 83D4 immunoreactivity in human tissues: cellular distribution and microcytophotometric analysis of immunoprecipitates on tissue sections. *Anticancer Research*, 12(1):209-223.
- Cheever, M. A., Allison, J. P., Ferris, A., Finn, O. J., Hastings, B. M., Hecht, T. T., Mellman, I., Prindiville, S. A., Viner, J. L., Weiner, L. M., & Matrisian, L. M.** (2009). The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clinical Cancer Research*, 15(17), 5323–5337.
- Chen, L., Wang, Y., Hu, Q., Liu, Y., Qi, X., Tang, Z., Hu, H., Lin, N., Zeng, S., & Yu, L.** (2023). Unveiling tumor immune evasion mechanisms: abnormal expression of transporters on immune cells in the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 14.
- Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer.** (2023). Situación epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer. Disponible en: <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/SITUACION-EPIDEMIOLOGICA-DEL-URUGUAY-EN-RELACION-AL-CANCER-uc311>
- Condamine, T., Ramachandran, I., Youn, J. H., & Gabrilovich, D. I.** (2015). Regulation of tumor metastasis by Myeloid-Derived suppressor cells. *Annual Review of Medicine*, 66(1), 97–110.

- Cooley, M., Jones, E., Gorelick, F., & Groblewski, G.** (2020). Pancreatic acinar cell protein synthesis, intracellular transport, and export. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base* [Dataset].
- Cornelissen, L. A., Blanas, A., Zaal, A., Van Der Horst, J. C., Kruijssen, L. J., O'Toole, T., Van Kooyk, Y., & Van Vliet, S. J.** (2020). TN antigen expression contributes to an immune suppressive microenvironment and drives tumor growth in colorectal cancer. *Frontiers in Oncology*, 10.
- Cottignies-Calamarte, A., Tudor, D., & Bomsel, M.** (2023). Antibody Fc-chimerism and effector functions: When IgG takes advantage of IgA. *Frontiers in Immunology*, 14.
- Curie, P., & Curie, M.** (1899). Sur la radioactivité provoquée par les rayons de Bécquerel. *Comp. Rendus Acad. Sci.*, 129, 714–716.
- Delgado, M., & Garcia-Sanz, J. A.** (2023). Therapeutic Monoclonal Antibodies against Cancer: Present and Future. *Cells*, 12(24), 2837.
- Deloch, L., Derer, A., Hartmann, J., Frey, B., Fietkau, R., & Gaipl, U. S.** (2016). Modern radiotherapy concepts and the impact of radiation on immune activation. *Frontiers in Oncology*, 6.
- Dhatchinamoorthy, K., Colbert, J. D., & Rock, K. L.** (2021). Cancer immune evasion through loss of MHC Class I antigen presentation. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J., & Schreiber, R. D.** (1994). Enhanced *in vivo* growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN- $\gamma$  receptors. *Immunity*, 1(6), 447–456.
- Dobosz, P., & Dzieciatkowski, T.** (2019). The intriguing history of cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D.** (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991–998.
- Ehrlich, P.** (1909). Über den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskde*, 5, 273–290.
- Faguet, G. B.** (2014). A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *International Journal of Cancer*, 136(9), 2022–2036.
- Falzone, L., Salomone, S., & Libra, M.** (2018). Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Frontiers in Pharmacology*, 9.
- Fedchenko, N., & Reifenrath, J.** (2014). Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagnostic Pathology*, 9(1).
- Fehleisen F.** (1882). Ueber die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen. *Deutsch Med Wochenschr*; 8, 553-4.

- Feola, S., Chiaro, J., Martins, B., & Cerullo, V.** (2020). Uncovering the Tumor Antigen Landscape: What to Know about the Discovery Process. *Cancers*, 12(6), 1660.
- Fisher, P., & Ungar, D.** (2016). Bridging the Gap between Glycosylation and Vesicle Traffic. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4.
- Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. B., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., & Carbone, D. P.** (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Medicine*, 2(10), 1096–1103.
- Gill, D. J., Tham, K. M., Chia, J., Wang, S. C., Steentoft, C., Clausen, H., Bard-Chapeau, E. A., & Bard, F.** (2013). Initiation of GalNAc-type O-glycosylation in the endoplasmic reticulum promotes cancer cell invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(34).
- Godwin, C. D., Gale, R. P., & Walter, R. B.** (2017). Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 31(9), 1855–1868.
- Granovsky, M., Fata, J. E., Pawling, J., Muller, W. J., Khokha, R., & Dennis, J. W.** (2000). Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nature Medicine*, 6(3), 306–312.
- Graziani, G., Tentori, L., & Navarra, P.** (2012). Ipilimumab: A novel immunostimulatory monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Pharmacological Research*, 65(1), 9–22.
- Guerra, N., Tan, Y. X., Joncker, N. T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N. R., & Raulet, D. H.** (2008). NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity*, 28(4), 571–580.
- Guillot, J.** (2002). Detection of Glycoconjugates in Breast Cancer Cell Lines: Confocal Fluorescence Microscopy. *Molecular Genetics; Lung and Breast Carcinomas*, 487–491.
- Hanahan, D.** (2022). Hallmarks of Cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hargrave, A., Mustafa, A. S., Hanif, A., Tunio, J. H., & Hanif, S. N. M.** (2023). Recent Advances in Cancer Immunotherapy with a Focus on FDA-Approved Vaccines and Neoantigen-Based Vaccines. *Vaccines*, 11(11), 1633.
- Hassinen, A., Rivinoja, A., Kauppila, A., & Kellokumpu, S.** (2010). Golgi N-Glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17771–17777.
- Heemskerk, N., Grujjs, M., Temming, A. R., Heineke, M. H., Gout, D. Y., Hellingman, T., Tuk, C. W., Winter, P. J., Lissenberg-Thunnissen, S.,**

- Bentlage, A. E., De Donatis, M., Bögels, M., Rösner, T., Valerius, T., Bakema, J. E., Vidarsson, G., & Van Egmond, M.** (2021). Augmented antibody-based anticancer therapeutics boost neutrophil cytotoxicity. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(6).
- Heemskerk, N., & Van Egmond, M.** (2018). Monoclonal antibody-mediated killing of tumour cells by neutrophils. *European Journal of Clinical Investigation*, 48(S2).
- Heineke, M. H., & Van Egmond, M.** (2017). Immunoglobulin A: magic bullet or Trojan horse? *European Journal of Clinical Investigation*, 47(2), 184–192.
- Hofmann, B. T., Schlüter, L., Lange, P., Mercanoglu, B., Ewald, F., Fölster, A., Picksak, A., Harder, S., Gammal, A. T. E., Grupp, K., Güngör, C., Drenckhan, A., Schlüter, H., Wagener, C., Izbicki, J. R., Jücker, M., Bockhorn, M., & Wolters-Eisfeld, G.** (2015). COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, 14(1).
- Hollingsworth, R. E., & Jansen, K.** (2019). Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *Npj Vaccines*, 4(1).
- Hou, S., Hang, Q., Isaji, T., Lu, J., Fukuda, T., & Gu, J.** (2016). Importance of membrane-proximal N-glycosylation on integrin  $\alpha 1$  in its activation and complex formation. *The FASEB Journal*, 30(12), 4120–4131.
- Hubert, P., Heitzmann, A., Viel, S., Nicolas, A., Sastre-Garau, X., Oppezzo, P., Pritsch, O., Osinaga, E., & Amigorena, S.** (2011). Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity Synapses Form in Mice during Tumor-Specific Antibody Immunotherapy. *Cancer Research*, 71(15), 5134–5143.
- Hu, J., Zhao, C., Chen, W., Liu, Q., Li, Q., Lin, Y., & Gao, F.** (2021). Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World Journal of Gastroenterology*, 27(27), 4298–4321.
- Imai, J., Ghazizadeh, M., Naito, Z., & Asano, G.** (2001). Immunohistochemical expression of T, Tn and sialyl-Tn antigens and clinical outcome in human breast carcinoma. *Anticancer research*, 21(2B), 1327–1334.
- Inoue, M., Ton, S., Ogawa, H., & Takahashi, O.** (1991). Expression of TN and Sialyl-TN antigens in tumor tissues of the ovary. *American Journal of Clinical Pathology*, 96(6), 711–716.
- Isaacs, A., & Lindenmann, J.** (1957). Virus Interference. I. The Interferon. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 147(927), 258–267.
- Itzkowitz, S. H., Kjeldsen, T., Frieria, A. M., Hakomori, S., Yang, U. S., & Kim, Y. S.** (1991). Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human pancreas. *Gastroenterology*, 100(6), 1691–1700.
- Itzkowitz, S. H., Yuan, M., Montgomery, C. K., Kjeldsen, T., Takahashi, H. K., Bigbee, W. L., Kim, Y. S.** (1989). Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Research*, 49(1), 197–204.
- Johansson, M., & Hansson, G. C.** (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 639–649.

- Ju, T., Aryal, R. P., Kudelka, M. R., Wang, Y., & Cummings, R. D.** (2014). The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer. *Disease Markers. Section a, Cancer Biomarkers*, 14(1), 63–81.
- Ju, T., & Cummings, R. D.** (2002). A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1  $\beta$ -galactosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 16613–16618.
- Kabuß, R., Ashikov, A., Oelmann, S., Gerardy-Schahn, R., & Bakker, H.** (2005). Endoplasmic reticulum retention of the large splice variant of the UDP-galactose transporter is caused by a dilysine motif. *Glycobiology*, 15(10), 905–911.
- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., & Schreiber, R. D.** (1998). Demonstration of an interferon  $\gamma$ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7556–7561.
- Kelton, W., Mehta, N., Charab, W., Lee, J., Lee, C., Kojima, T., Kang, T. H., & Georgiou, G.** (2014). IgGA: A “Cross-Isotype” Engineered Human Fc Antibody Domain that Displays Both IgG-like and IgA-like Effector Functions. *Chemistry & Biology*, 21(12), 1603–1609.
- Kiessling, R., Klein, E., & Wigzell, H.** (1975). “Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* 5(2), 112–7.
- Khong, H. T., & Restifo, N. P.** (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nature Immunology*, 3(11), 999–1005.
- Kirley, T. L., & Norman, A. B.** (2018). Unfolding of IgG domains detected by non-reducing SDS-PAGE. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(2), 944–949.
- Kitamura, T., Garofalo, R. P., Kamijo, A., Hammond, D. K., Oka, J. A., Caffisch, C. R., Shenoy, M., Casola, A., Weigel, P. H., & Goldblum, R. M.** (2000). Human intestinal epithelial cells express a novel receptor for IGA. *The Journal of Immunology*, 164(10), 5029–5034.
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J., & Schreiber, R. D.** (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450(7171), 903–907.
- Köhler, G., & Milstein, C.** (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497.
- Krupitskaya, Y., & Wakelee, H. A.** (2009). Ramucirumab, a fully human mAb to the transmembrane signaling tyrosine kinase VEGFR-2 for the potential treatment of cancer. *Current opinion in investigational drugs*, 10(6), 597–605.
- Kudelka, M. R., Ju, T., Heimbürg-Molinaro, J., & Cummings, R. D.** (2015). Simple sugars to complex Disease—Mucin-Type O-Glycans in cancer. In *Advances in Cancer Research* (pp. 53–135).

- Kumar, A. R., Devan, A. R., Nair, B., Vinod, B. S., & Nath, L. R.** (2021). Harnessing the immune system against cancer: current immunotherapy approaches and therapeutic targets. *Molecular Biology Reports*, 48(12), 8075–8095.
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G., & Sg, W.** (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 521–555.
- Li, B., Jin, J., Guo, D., Tao, Z., & Hu, X.** (2023). Immune Checkpoint Inhibitors Combined with Targeted Therapy: The Recent Advances and Future Potentials. *Cancers*, 15(10), 2858.
- Li, B., Xu, L., Tao, F., Xie, K., Wu, Z., Li, Y., Li, J., Chen, K., Pi, C., Mendelsohn, A., Larrick, J. W., Gu, H., & Fang, J.** (2017). Simultaneous exposure to FcγR and FcαR on monocytes and macrophages enhances antitumor activity *in vivo*. *Oncotarget*, 8(24), 39356–39366.
- Lin, M. J., Svensson-Arvelund, J., Lubitz, G. S., Marabelle, A., Melero, I., Brown, B. D., & Brody, J. D.** (2022). Cancer vaccines: the next immunotherapy frontier. *Nature Cancer*, 3(8), 911–926.
- Liu, C., & Li, J.** (2018). O-GLCNAC: a sweetheart of the cell cycle and DNA damage response. *Frontiers in Endocrinology*, 9.
- Liu, J., Fu, M., Wang, M., Wan, D., Wei, Y., & Wei, X.** (2022). Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1).
- MacKie, R. M., Reid, R., & Junor, B. J. R.** (2003). Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery. *The New England Journal of Medicine*, 348(6), 567–568.
- Manjili, M. H.** (2011). Revisiting cancer immunoediting by understanding cancer immune complexity. *The Journal of Pathology*, 224(1), 5–9.
- Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., & Allavena, P.** (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(7), 399–416.
- Mantuano, N. R., Natoli, M., Zippelius, A., & Läubli, H.** (2020). Tumor-associated carbohydrates and immunomodulatory lectins as targets for cancer immunotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(2), e001222.
- Martincorena, I., & Campbell, P. J.** (2015). Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, 349(6255), 1483–1489.
- Matsumoto, Y., Jia, N., Heimburg-Molinaro, J., & Cummings, R. D.** (2023). Targeting Tn-positive tumors with an afucosylated recombinant anti-Tn IgG. *Scientific Reports*, 13(1).
- Matsumoto, Y., Kudelka, M. R., Hanes, M. S., Lehoux, S., Dutta, S., Jones, M. B., Stackhouse, K. A., Cervoni, G. E., Heimburg-Molinaro, J., Smith, D. F., Ju, T., Chaikof, E. L., & Cummings, R. D.** (2019). Identification of Tn Antigen O-GalNAc-expressing glycoproteins in human carcinomas using novel anti-Tn recombinant antibodies. *Glycobiology*.

- Mercanoglu, B., Karstens, K., Giannou, A. D., Meiners, J., Lücke, J., Seeger, P., Brackrock, V., Güngör, C., Izbicki, J. R., Bockhorn, M., Hackert, T., Melling, N., & Wolters-Eisfeld, G.** (2024). A comprehensive analysis of TN and STN antigen expression in esophageal adenocarcinoma. *Cancers*, 16(2), 240.
- Miller, J. F., Mitchell, G. F., & Weiss, N. S.** (1967). Cellular basis of the immunological defects in thymectomized mice. *Nature*. 214(5092), 992–7.
- Miller, M. J., Foy, K. C., & Kaumaya, P. T. P.** (2013). Cancer immunotherapy: present status, future perspective, and a new paradigm of peptide immunotherapeutics. *Discovery Medicine*, 15(82), 166–176.
- Moremen, K. W., Tiemeyer, M., & Nairn, A. V.** (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(7), 448–462.
- Munn, D. H., & Mellor, A. L.** (2016). IDO in the tumor microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends in Immunology*, 37(3), 193–207.
- National Cancer Institute.** Side Effects of Cancer Treatment. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/side-effects>
- National Cancer Institute.** (2020). Cancer statistics. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
- Nefedova, Y., Huang, M., Kusmartsev, S., Bhattacharya, R., Cheng, P., Salup, R., Jove, R., & Gabrilovich, D. I.** (2004). Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *Journal of Immunology*, 172(1), 464–474.
- Numata, Y., Nakada, H., Fukui, S., Kitagawa, H., Ozaki, K., Inoue, M., Kawasaki, T., Funakoshi, I., & Yamashina, I.** (1990). A monoclonal antibody directed to Tn antigen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 170(3), 981–985.
- O'Connor, C. M. & Adams, J. U.** (2010). *Essentials of Cell Biology*. Cambridge, MA: NPG Education.
- O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J.** (2018). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(3), 151–167.
- Ohshio, G., Imamura, T., Imamura, M., Yamabe, H., Sakahara, H., Nakada, H., & Yamashina, I.** (1995). Distribution of Tn antigen recognized by an anti-Tn monoclonal antibody (MLS128) in normal and malignant tissues of the digestive tract. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 121(4), 247–252.
- OMS.** (2022). Cáncer. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Oppezzo, P., Osinaga, E., Tello, D., Bay, S., Cantacuzene, D., Irigoín, F., Ferreira, A., Roseto, A., Cayota, A., Alzari, P., & Pritsch, O.** (2000). Production and functional characterization of two Mouse/Human chimeric

- antibodies with specificity for the Tumor-Associated TN-Antigen. *Hybridoma*, 19(3), 229–239.
- Osinaga, E., Bay, S., Tello, D., Babino, A., Pritsch, O., Assemat, K., Cantacuzene, D., Nakada, H., & Alzari, P.** (2000). Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy. *FEBS Letters*, 469(1), 24–28.
- Palucka, A. K., & Coussens, L. M.** (2016). The basis of oncoimmunology. *Cell*, 164(6), 1233–1247.
- Pancino, G., Osinaga, E., Vorauber, W., Kakouche, A., Mistro, D., Charpin, C., & Roseto, A.** (1990). Production of a monoclonal antibody as immunohistochemical marker on paraffin embedded tissues using a new immunization method. *Hybridoma*, 9(4), 389–395.
- Phan, T. G., & Croucher, P. I.** (2020). The dormant cancer cell life cycle. *Nature Reviews Cancer*, 20(7), 398–411.
- Piller, V., Piller, F., & Fukuda, M. N.** (1990). Biosynthesis of truncated O-glycans in the T cell line Jurkat. Localization of O-glycan initiation. *Journal of Biological Chemistry*, 265(16), 9264–9271.
- Pinho, S. S., & Reis, C. A.** (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15(9), 540–555.
- Ponomarev, A. V., & Shubina, I. Z.** (2019). Insights Into Mechanisms of Tumor and Immune System Interaction: Association With Wound Healing. *Frontiers in Oncology*, 9.
- Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B., & Novák, J.** (2019). Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(6), 346–366.
- Reis, C. A., Sørensen, T., Mandel, U., David, L., Mirgorodskaya, E., Roepstorff, P., Kihlberg, J., Stig Hansen, J-E., Clausen, H.** (1998). Development and characterization of an antibody directed to an a-N-acetyl-D-galactosamine glycosylated MUC2 peptide. *Glycoconjugate Journal*, 15(1), 51–62.
- Riley, R. S., June, C. H., Langer, R., & Mitchell, M. J.** (2019). Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 18(3), 175–196.
- Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppila, A., & Kellokumpu, S.** (2009). Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *Journal of Cellular Physiology*, 220(1), 144–154.
- Röntgen, W. C.** (1896). On a new kind of rays. *Science*, 3, 227–231.
- Roopenian, D. C., & Akilesh, S.** (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews. Immunology*, 7(9), 715–725.
- Rygaard, J., & Povlsen, C. O.** (1974). The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumors. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand Microbiol Immunol.*, 82(1), 99–106

- Sanchez, J., Lescar, J., Chazalet, V., Audfray, A., Gagnon, J., Alvarez, R., Breton, C., Imberty, A., & Mitchell, E. P.** (2006). Biochemical and Structural Analysis of *Helix pomatia* Agglutinin. *Journal of Biological Chemistry*, 281(29), 20171–20180.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
- Schneider, U., Schwenk, H. U., & Bornkamm, G. W.** (1977). Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*, 19(5), 621–626.
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J.** (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity’s Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, 331(6024), 1565–1570.
- Sedlik, C., Heitzmann, A., Viel, S., Sarkouh, R. A., Batische, C., Schmidt, F., De La Rochere, P., Amzallag, N., Osinaga, E., Oppezzo, P., Pritsch, O., Sastre-Garau, X., Hubert, P., Amigorena, S., & Piaggio, E.** (2016). Effective antitumor therapy based on a novel antibody-drug conjugate targeting the Tn carbohydrate antigen. *Oncoimmunology*, 5(7), e1171434.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D.** (2001). IFN- $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), 1107–1111.
- Shimu, A. S., Wei, H., Li, Q., Zheng, X., & Li, B.** (2022). The new progress in cancer immunotherapy. *Clinical and Experimental Medicine*, 23(3), 553–567.
- Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Takahashi, K., Moriya, S., & Miyagi, T.** (2011). Regulation of sialyl lewis antigen expression in colon cancer cells by sialidase NEU4. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21052–21061.
- Siegel R. L., Giaquinto A. N., & Jemal A.** (2024). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.*, 74(1), 12-49.
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A.** (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *Journal of Experimental Medicine*, 137(5), 1142–1162.
- Sterner, R. C., & Sterner, R. M.** (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal*, 11(4).
- Stowell, S. R., Ju, T., & Cummings, R. D.** (2015). Protein glycosylation in cancer. *Annual Review of Pathology-mechanisms of Disease*, 10(1), 473–510.
- Street, S. E., Cretney, E., & Smyth, M. J.** (2001). Perforin and IFN- $\gamma$  activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*, 97(1), 192–197.
- Takahashi, H. K., Metoki, R., & Hakomori, S.** (1988). Immunoglobulin G3 monoclonal antibody directed to Tn antigen (tumor-associated alpha-N-acetylgalactosaminyl epitope) that does not cross-react with blood group A antigen. *Cancer Research*, 48(15), 4361–4367.

- Taylor, B. C., & Balko, J. M.** (2022). Mechanisms of MHC-I downregulation and role in immunotherapy response. *Frontiers in Immunology*, 13.
- Terasawa, K., Furumoto, H., Kamada, M., & Aono, T.** (1996). Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in the neoplastic transformation of uterine cervical epithelial cells. *Cancer research*, 56(9), 2229–2232.
- Thomas, D., Sagar, S., Caffrey, T., Grandgenett, P. M., & Radhakrishnan, P.** (2019). Truncated O-glycans promote epithelial-to-mesenchymal transition and stemness properties of pancreatic cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(10), 6885–6896.
- Thomas, L.** (1959). Delayed hypersensitivity in health and disease. In: Lawrence, HS., editor. *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. Hoeber-Harper; New York, p. 529-532.
- Thurnher, M., Clausen, H., Sharon, N., & Berger, E.** (1993). Use of O-glycosylation-defective human lymphoid cell lines and flow cytometry to delineate the specificity of Moluccella laevis lectin and monoclonal antibody 5F4 for the Tn antigen (GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr). *Immunology Letters*, 36(3), 239–243.
- Togashi, Y., Shitara, K., & Nishikawa, H.** (2019). Regulatory T cells in cancer immunosuppression – implications for anticancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(6), 356–371.
- Tsuchiya, A., Kanno, M., Kawaguchi, T., Endo, Y., Zhang, G., Ohtake, T., & Kimijima, I.** (1999). Prognostic relevance of tn expression in Breast Cancer. *Breast Cancer*, 6(3), 175–180.
- Vallabhapurapu, S. D., Blanco, V. M., Sulaiman, M. K., Vallabhapurapu, S. L., Chu, Z., Franco, R. S., & Qi, X.** (2015). Variation in human cancer cell external phosphatidylserine is regulated by flippase activity and intracellular calcium. *Oncotarget*, 6(33). , 34375–34388.
- van den Broek, M. E., Kägi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W. K., Melief, C. J. M., Zinkernagel, R. M., & Hengartner, H.** (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med*, 184(5), 1781–1790.
- Van Tetering, G., Evers, M., Chan, C., Stip, M., & Leusen, J.** (2020). FC Engineering Strategies to advance IGA Antibodies as Therapeutic Agents. *Antibodies*, 9(4), 70.
- Varki, A.** (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3(2), 97–130.
- Veglia, F., Sanseviero, E., & Gabrilovich, D. I.** (2021). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nature Reviews Immunology*, 21(8), 485–498.
- Williams, L. M., Ricchetti, G. A., Śarmā, U., Smallie, T., & Foxwell, B. M. J.** (2004). Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation – a continuing puzzle. *Immunology*, 113(3), 281–292.

- Wills, S., Hwang, K., Liu, P., Dennison, S. M., Tay, M. Z., Shen, X., Pollara, J., Lucas, J. T., Parks, R., Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayapan, S., Kaewkungwal, J., Thomas, R., Kim, J. H., Michael, N. L., Robb, M. L., McRaven, M., Montefiori, D. C., Tomaras, G. D.** (2018). HIV-1-Specific IgA Monoclonal Antibodies from an HIV-1 Vaccinee Mediate Galactosylceramide Blocking and Phagocytosis. *Journal of Virology*, 92(7).
- Xie, N., Shen, G., Gao, W., Huang, Z., Huang, C., & Fu, L.** (2023). Neoantigens: promising targets for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1).
- Yale School of Medicine.** (2019). *Flow cytometry (FACS) staining protocol (Cell surface staining)*. Disponible en: <https://medicine.yale.edu/immuno/flowcore/protocols/analysis/>
- Zahavi, D., & Weiner, L.** (2020). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Antibodies*, 9(3), 34.
- Zong, J., Keskinov, A. A., Shurin, G. V., & Shurin, M. R.** (2016). Tumor-derived factors modulating dendritic cell function. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65(7), 821–833.