



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Estudio preliminar sobre el papel de la MMP9 en el cáncer de mama triple negativo

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción: Biología Celular y Molecular

Lic. Santiago Rodríguez

Tutora: Dra. Teresa Freire

Co-tutora: Dra. María Florencia Festari

Laboratorio de Inmunomodulación y Vacunas

Departamento de Inmunobiología

Facultad de Medicina

Julio 2023

Tabla de contenido

Agradecimientos	8
Resumen	11
Introducción	14
Situación actual del cáncer de mama	15
Inmunoterapia: una opción prometedora en CMTN	18
Glicosilación y cáncer	19
Antígeno Tn	21
MMP9	24
• Características generales.....	24
• MMP9 y Cáncer.....	25
Sistema inmune y cáncer.....	27
Antecedentes inmediatos a este trabajo	31
Hipótesis y objetivos	34
Hipótesis de trabajo	35
Objetivos Generales	35
Objetivos específicos.....	35
Materiales y métodos.....	36
Cultivo de células tumorales	37
Generación de sublíneas celulares derivadas de la línea 4T1-Tn ⁺	37
Evaluación del crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	37
Evaluación de la expresión génica por RT-qPCR	38
Preparación de lisados proteicos	39
Cuantificación de Proteínas	39
Western Blot	40
Ensayo de Formación de colonias	41
Determinación de micrometástasis pulmonares.....	41
Proliferación de esplenocitos	42
Determinación de citoquinas por ELISA.....	43
Recuento leucocitario en sangre.....	44
Citometría de flujo.....	44
Evaluación de la actividad metaloproteasa	45
Análisis estadísticos	46
Resultados.....	47

1- Generación de un modelo que permita estudiar el papel de la MMP9 en células tumorales con O-glicosilación truncada (Tn ⁺) utilizando la línea celular 4T1.	48
2- Evaluación de los niveles de MMP9 en los clones obtenidos respecto a las células tumorales Tn ⁺ , por RT-qPCR y <i>Western blot</i>	50
3- Evaluación del impacto de la MMP9 en la progresión tumoral a través de la determinación del crecimiento tumoral y el análisis de micrometástasis pulmonares en ratones inoculados con las células 4T1-Tn ⁺ y los clones obtenidos.	53
4- Análisis de diversos componentes del sistema inmune, tanto local como sistémicamente, en ratones portadores de tumores derivados de las diferentes líneas celulares estudiadas.	57
Discusión y perspectivas.	68
Generación de clones Tn ⁺ /C12 y Tn ⁺ /A3.	69
Papel de los niveles de MMP9 en la progresión tumoral.	74
Conclusiones	79
Anexo	81
Bibliografía	84

Índice de Figuras

Figura 1: Índice de mortalidad prematura por cáncer globalmente.	15
Figura 2: Incidencia y mortalidad del cáncer en mujeres uruguayas (ordenados por incidencia).	16
Figura 3: Frecuencia de generación de metástasis en distintos órganos en función del tipo de cáncer de mama.....	17
Figura 4: Principales glicanos asociados a tumor.....	21
Figura 5: Proceso de O-glicosilación de tipo mucina.....	22
Figura 6: Dominios y sitios de O-glicosilación de la MMP9.	24
Figura 7: Hipótesis de la inmunoedición en el cáncer.	29
Figura 8: Estrategia para generar el modelo tumoral 4T1-Tn ⁺	31
Figura 9: Crecimiento tumoral y sobrevida de ratones inyectados con células 4T1-wt y 4T1-Tn ⁺	32
Figura 10: Expresión génica de la familia de las metaloproteasas (MMPs) por RNAseq en líneas 4T1-wt y 4T1-Tn ⁺	32
Figura 11: Expresión génica de la Mmp9 en las líneas celulares 4T1-wt y Tn ⁺ analizada mediante RT-qPCR.....	48
Figura 12: Análisis de los niveles proteicos de MMP9 en líneas tumorales 4T1 wt y Tn ⁺	49
Figura 13: Estrategia de gating para seleccionar clones GFP ⁺	50
Figura 14: Screening por RT-qPCR de la expresión de Mmp9 de los clones candidatos 4T1 Tn ⁺ /MMP9 ⁻	51
Figura 15: Screening por Western blot de la expresión de la MMP9 de los clones candidatos 4T1 Tn ⁺ /MMP9 ⁻	51
Figura 16: Evaluación de la expresión génica de Mmp9 en tumores generados a partir de la inyección de los clones Tn ⁺ , Tn ⁺ /C12 y Tn ⁺ /A3 en la mama de ratones BALB/c. 52	
Figura 17: Expresión proteica de MMP9 en tumores generados a partir de la inyección de los clones 4T1 Tn ⁺ , Tn ⁺ /C12 y Tn ⁺ /A3 en la mama de ratones BALB/c.	53
Figura 18: Evaluación del crecimiento tumoral en ratones inoculados con células 4T1 Tn ⁺ , Tn ⁺ /A3 y Tn ⁺ /C12.....	54
Figura 19: Ensayo de formación de colonias de las células 4T-wt, Tn ⁺ , Tn ⁺ /A3 y Tn ⁺ /C12 55	
Figura 20: Evaluación de la capacidad metastásica in vivo de las líneas 4T1-Tn ⁺ , Tn ⁺ /A3 y Tn ⁺ /C12 -mediante la cuantificación de micrometástasis clonogénicas en pulmón... 57	
Figura 20: Recuento leucocitario de sangre de ratones con tumores de mama generados a partir de la inyección de las distintas líneas 4T1 en estudio (Tn ⁺ , Tn ⁺ /C12 y Tn ⁺ /A3).	59
Figura 21: Evaluación de la producción de citoquinas por esplenocitos provenientes de ratones con tumores de mama generados por la inyección de las diferentes líneas 4T1 en estudio (Tn ⁺ , Tn ⁺ /C12 y Tn ⁺ /A3).	60

Figura 22: Relación entre los niveles de IFN- γ , IL-10 e IL-17 secretadas por los esplenocitos de ratones inyectados con las diferentes líneas 4T1 en estudio (Tn ⁺ , Tn ⁺ /C12 y Tn ⁺ /A3).....	61
Figura 23: Análisis de poblaciones celulares mieloides presentadoras de antígeno en el microambiente tumoral por citometría de flujo.....	63
Figura 24: Análisis de poblaciones linfocitarias reguladoras CD4 ⁺ en el microambiente tumoral.....	65
Figura 25: Análisis de las poblaciones linfocitarias T CD8 ⁺ en el microambiente tumoral.	67
Figura 26: Evaluación de la actividad metaloproteasa total en las líneas 4T1 Tn ⁺ , Tn ⁺ /C12 y Tn ⁺ /A3.....	82
Figura 27: Evaluación de la actividad metaloproteasa total en tumores generados a partir de la inyección de células 4T1 Tn ⁺ , Tn ⁺ /C12 y Tn ⁺ /A3 en la mama de ratones BALB/c.....	83

Índice de Tablas

Tabla 1: Secuencia de nucleótidos de los <i>primers</i> utilizados en qPCR.....	39
Tabla 2: Anticuerpos y concentraciones utilizadas en <i>Western Blot</i>	41
Tabla 3: Citoquinas y concentraciones utilizados en ELISA	43
Tabla 4: Anticuerpos y concentraciones utilizados en ELISA	43
Tabla 5: Anticuerpos utilizados para citometría de flujo	45
Tabla 6: Comparación de <i>CRISTA Score</i> entre genes <i>on/off target</i>	71
Tabla 7: Cociente neutrófilo/linfocito en sangre de ratones inoculados con las líneas en estudio y en ratones control (<i>naïve</i>)	76

Lista de abreviaturas

α - anti

ACK - *Ammonium-chloride-potassium*

ANOVA - *Analysis of Variance*

APCs - Células presentadoras de antígeno

APMA - 4-aminophenilmercurico acetato

ARNm - ARN mensajero

Asn - Asparagina

BCA - Ácido bicinconínico

BSA - Albúmina de suero bovino

C1GalT1 - Core 1 GalNAc β 1,3-Galactosiltransferasa 1

cDNA - ADN copia

CMTN - Cáncer de mama triple negativo

Covid-19 - *Coronavirus disease-19*

CRISPR/Cas9 - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/Caspasa9*

DEPC - *Diethyl pyrocarbonate*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

Dpto - Departamento

EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético

EGFR - *Epidermal growth factor receptor*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunoasorbent Assay*

ERBB2 - Receptor proteína-tirosina-quinasa erbB-2

F - *Forward*

FBS - Suero fetal bovino

GalNAc - *N-Acetil-Galactosamina*

GALNT1 - *N-Acetil-Galactosaminil-Transferasa 1*

G-CSF - *Granulocyte colony stimulating factor*

GFP - *Green fluorescent protein*

GlcNAc - *N-Acetil-Glucosamina*

HDR - *Homology directed repair*

HR - Receptor de hormonas

HRP - *Horseradish peroxidase*

IL - Interleuquina

LIMV - Laboratorio de Inmunomodulación y Vacunas

MeFI - Mediana de intensidad de fluorescencia

MMPs - Metaloproteasas de matriz

MPM - Marcador de peso molecular

NHEJ - *Non homologous end joining*

NMD - *Nonsense mediated mRNA decay*

ON - *Overnight*

OPD - o-Phenylenediamina dihydrochlorido

PAM - *Protospacer adjacent motif*

PBS - Buffer fosfato salino

ppGalNAc-Ts - polipetidil-N-Acetil-Galactosaminil-Transferasas

qPCR. - *quantitative polymerase chain reaction*

R - *Reverse*

RIPA - *Radioimmunoprecipitation assay*

RNAseq - Secuenciación de ARN

RPM - Revoluciones por minuto

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

RT-qPCR - *Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*

SDS - Sodio dodecil sulfato

Ser - Serina

sTn - Antígeno Tn sialilado

Thr - Treonina

TIMP - *Tissue inhibitor of metalloprotease.*

UdelaR - Universidad de la República

UDP-GalNAc - Urididina difosfato - N-Acetil-Glucosamina

UFC - Unidades formadoras de colonias

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*

Agradecimientos

Si bien este documento trata sobre mi trabajo de Maestría, durante todo este tiempo también sucedieron un montón de otras cosas que hicieron enriquecer el camino recorrido. Cada persona tiene sus luchas internas y cada uno sabe lo que le cuesta hacer frente a las mismas. En este sentido, el enfrentarme a mí mismo durante este tiempo dónde los desafíos fueron moneda corriente, me ha permitido conocerme un poquito más.

Muchas personas fueron parte de este camino, pero hay una en especial que estuvo siempre incondicionalmente. Ella logró sostenerme cuando ni siquiera yo mismo confiaba en mí. En el día a día, es quién me empuja a ser mejor persona y mejor científico. También tiene una gran capacidad para empatizar (me vendría bien un poquito) que ha hecho que me sienta comprendido. Me resulta raro poner “Adri”, así que voy a decir como siempre: gracias linda !!!

En lo académico, agradecerles a Teresa y Florencia porque me han hecho crecer en toda esta etapa de formación, que es clave. Encontrar siempre buena disposición por parte de ellas, es algo que valoro mucho. Incluso tuve el privilegio de trabajar con ellas codo con codo, donde pude aprender mucho. Por otra parte, durante este tiempo, pude conocerlas en mayor profundidad y hay banderas que cada una levanta que intento incorporar en el día a día. En el caso de Teresa, siempre admiré su espíritu de guerrera ante la adversidad y en el caso de Flor, siempre rescaté su capacidad para entender que la familia viene primero y el trabajo después.

Quiero agradecer a mi familia, por haberme inculcado enseñanzas que me duran para toda la vida y que me han ayudado a ser una mejor versión de mí. “Siempre copia lo bueno de las personas”; “Hay que hacer las cosas bien, para que salgan más o menos”; “En la vida todo es voluntad” son algunas de ellas que no me olvido más.

Agradecer a mis compañeros del LIMV y en extensión al Dpto. de Inmunobiología, que hacen que el ambiente de trabajo sea agradable, por su buena disposición para ayudar en lo que necesite y por su interés en discutir científicamente el trabajo que uno realiza, con el fin de mejorarlo.

A los miembros del tribunal, Dra. Florencia Palacios, Dra. Dahiana Amarillo y Dr. Ernesto Rodríguez por aceptar evaluar este trabajo.

Me gustaría también agradecer a la gente del Dpto. de Genética, al cual de vez en cuando la ando molestando y siempre me ayudaron con la mejor onda.

Les debía una mención especial a Gonza, Rodri y Joaco, con quienes empecé a recorrer este camino y hoy son amigos que agradezco tener.

Por último, agradecer a las agencias financiadoras que han permitido que el presente trabajo haya sido realizado, así como la presentación de resultados en congresos (CAP, PEDECIBA, Fundación Manuel Pérez y CSIC).

Resumen

En la actualidad el cáncer representa una de las principales causas de muerte tanto en Uruguay como a nivel mundial. En particular, el cáncer de mama constituye el tipo de cáncer más frecuente a nivel global. El entendimiento de la respuesta inmune anti-tumoral asociado al conocimiento de la biología molecular de la célula tumoral, han colocado a la inmunoterapia como primera opción en el tratamiento en diferentes tipos de cáncer. Por dicho motivo, la comprensión de los mecanismos por los cuales las células tumorales adquieren mayor malignidad y modulan la respuesta inmune es relevante para poder continuar desarrollando nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer.

La presencia del glicoantígeno Tn (Ser/Thr-GalNAc), producto de una O-glicosilación incompleta, en las células tumorales se correlaciona con una mayor agresividad tumoral, desarrollo de metástasis y evasión del sistema inmune. Los antecedentes de este trabajo sugieren que la presencia del antígeno Tn en las células tumorales de mama podría estar favoreciendo una expresión aumentada de la Metaloproteasa 9 de Matriz (MMP9). La MMP9 es una proteína O-glicosilada involucrada en la remodelación de la matriz extracelular, en procesos de invasividad tumoral y en el desarrollo de metástasis.

El presente trabajo buscó evaluar si los niveles de MMP9 se encuentran asociados con la agresividad tumoral, así como con la respuesta inmune anti-tumoral en un modelo de cáncer de mama murino con O-glicosilación truncada (Tn⁺).

Para poder evaluar el papel de la MMP9 en el contexto tumoral, se generaron dos subclones con el gen *Mmp9* potencialmente mutado (Tn⁺/A3 y Tn⁺/C12) utilizando la tecnología CRISPR/Cas9, derivados del clon parental (4T1-Tn⁺). Al ser inoculados en ratones, ambos clones desarrollaron tumores que presentaron una fuerte reducción en el crecimiento tumoral, en relación al clon parental Tn⁺. También se obtuvo un menor desarrollo de micrometástasis a nivel pulmonar en aquellos ratones inoculados con las células tumorales Tn⁺/A3 y Tn⁺/C12.

Adicionalmente, se evaluó el microambiente inmune a nivel tumoral, donde se constató cambios en poblaciones inmunes presentadoras de antígeno, así como en poblaciones linfocitarias reguladoras. Particularmente, se observó un aumento de células mieloides presentadoras de antígeno, así como de su expresión de MHCII en ratones portadores de tumores Tn⁺/A3 y Tn⁺/C12, en relación a aquellos portadores de tumores Tn⁺. A su vez, se obtuvo una disminución en la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁺ y T CD4⁺ IL-10⁺, así como en la expresión de Foxp3 e IL-10, dentro de la población T CD4⁺ en ausencia de MMP9 en las células tumorales.

Por otro lado, se abordó el estudio de la respuesta inmune a nivel sistémico. Al evaluar la composición leucocitaria en sangre de ratones portadores de tumor, se observó una disminución de la proporción entre neutrófilos y linfocitos circulantes en los ratones con tumores derivados de los clones Tn⁺/A3 y Tn⁺/C12. Además, se evaluó la capacidad de esplenocitos derivados de ratones portadores de tumor de producir diferentes citoquinas, ante un estímulo policlonal de linfocitos T, donde se detectó un aumento en la producción de citoquinas a nivel del bazo, para los ratones con tumores derivados de los clones seleccionados.

En suma, los resultados obtenidos resaltan el papel de la MMP9 con O-glicosilación incompleta en el desarrollo tumoral, así como en el desarrollo de metástasis. A su vez, el trabajo realizado permite profundizar en el vínculo entre la respuesta inmune anti-tumoral y los diferentes parámetros clinicopatológicos, contribuyendo así al eventual desarrollo de futuras inmunoterapias dirigidas.

Introducción

Situación actual del cáncer de mama

Según la organización mundial de la salud, en 2019 el cáncer ocupó la primera o segunda causa de muerte antes de los 70 años de edad en 112 de 183 países (61,2%) (Sung *et al.* 2021). Este porcentaje ha aumentado respecto al anterior, estudio llevado a cabo en el 2015, donde el promedio de países en los cuales el cáncer representó la primera o segunda causa de muerte fue de 52.9% (Bray *et al.* 2018).

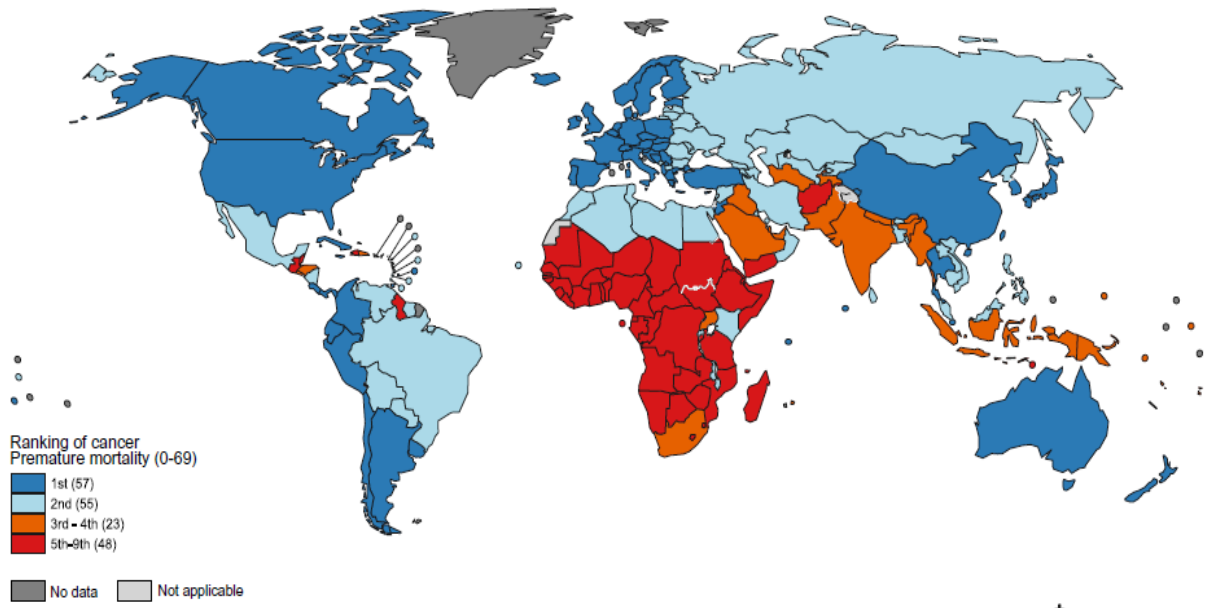


Figura 1: Índice de mortalidad prematura por cáncer globalmente. El puesto que ocupa la mortalidad prematura (antes de los 70 años de edad) por cáncer en cada país se muestra según el código de colores especificado. Modificado de Sung *et al.* (2021).

El cáncer fue responsable de aproximadamente 10 millones de muertes a nivel mundial en el año 2020 (Sung *et al.* 2021). El cáncer de mama presenta la mayor incidencia, no solo en el sexo femenino, sino también cuando se consideran ambos sexos (Sung *et al.* 2021). En términos de mortalidad, el cáncer de mama también ocupa el primer puesto dentro del sexo femenino (Sung *et al.* 2021). En nuestro país, el cáncer de mama ocupa el primer puesto en mujeres, tanto en incidencia como en mortalidad (Figura 2).

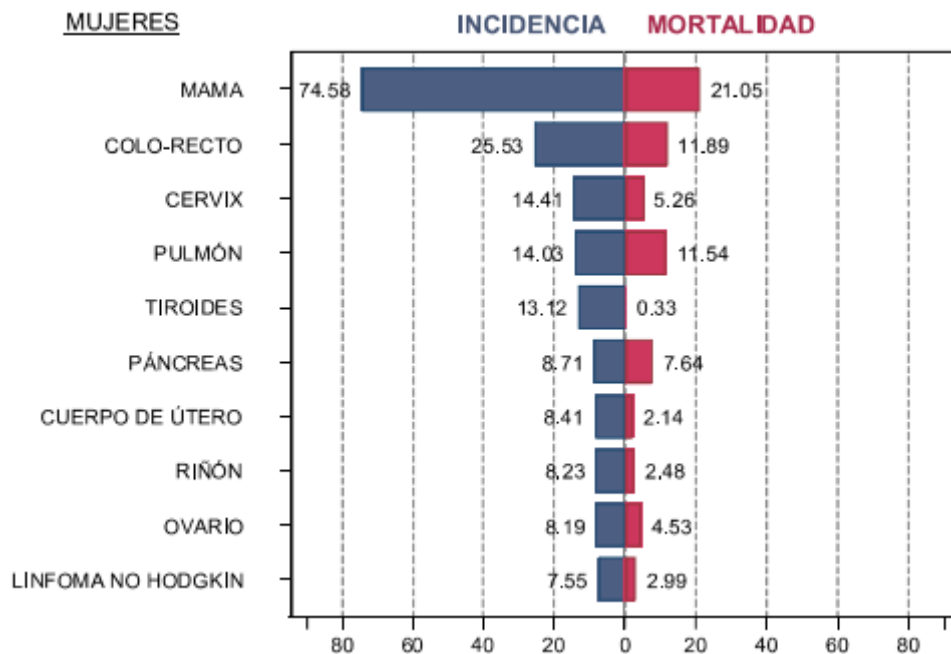


Figura 2: Incidencia y mortalidad del cáncer en mujeres uruguayas (ordenados por incidencia). Para cada órgano se muestra la tasa de incidencia y mortalidad de cáncer, ajustada por edad a la población mundial estándar, expresada en casos por 100000. Datos del quinquenio 2014-2018. Modificado de Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer (2022).

Debido a la existencia de heterogeneidad molecular, el cáncer de mama se puede clasificar en tres grandes categorías (Bianchini *et al.* 2016). Aquellos que expresen al menos un 1% de células positivas para receptores de estrógeno o progesterona, entran en la categoría de positivos para receptor de hormonas (HR⁺). En estos casos, la terapia hormonal para abrogar la señalización mediada por estos receptores es la primera opción de tratamiento (Hammond *et al.* 2010). Una segunda categoría es para aquellos tumores de mama que presentan una expresión aberrante de ERBB2 (anteriormente llamado HER2 o HER2/Neu), el cual es un receptor transmembrana con actividad tirosinquinasa, perteneciente a la familia de los receptores para el factor de crecimiento epidermal. Este tipo de cáncer representa aproximadamente el 20% de los pacientes diagnosticados con cáncer de mama, los cuales son tratados con inmunoterapia utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra ERBB2, como el trastuzumab (Piccart-Gebhart *et al.* 2005; Wolff *et al.* 2013). Cabe resaltar que también puede darse una combinación en la expresión de los marcadores anteriormente mencionados. Por ejemplo, un tumor de mama podría expresar ERBB2 y ser HR⁺ simultáneamente (Waks y Winer 2019).

Introducción

Por último, el cáncer de mama triple negativo (CMTN) representa aproximadamente el 15% de los tumores de mama y se define por la ausencia de receptores de estrógeno, de progesterona y de ERBB2 (Bianchini *et al.* 2016). En este caso, al carecer de blancos moleculares no se dispone de opciones terapéuticas específicas, siendo la quimioterapia la primera opción de tratamiento para estos pacientes (Denkert *et al.* 2017). Esto se asocia con un peor pronóstico en comparación a los otros subtipos de cáncer de mama (Malorni *et al.* 2012).

La fase final de la progresión tumoral es el desarrollo de metástasis. La metástasis consiste en la propagación de células tumorales desde un tumor primario hacia sitios distantes.

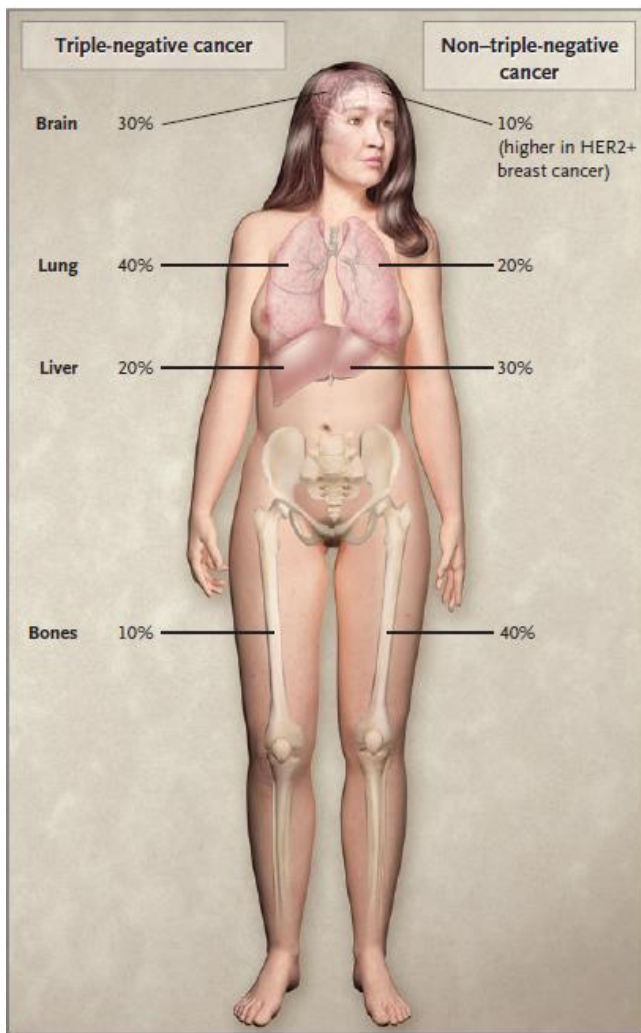


Figura 3: Frecuencia de generación de metástasis en distintos órganos en función del tipo de cáncer de mama. Los porcentajes mostrados son aproximados y corresponden al primer sitio en el cual se desarrolló metástasis en mujeres con cáncer de mama. Extraído de Foulkes *et al.* 2010.

Esta diseminación de células tumorales a órganos distales se produce vía linfática y/o sanguínea. Diferentes tumores presentan distinto tropismo de tejido, lo cual se explica en parte por la formación de nichos pre-metastásicos (Kitamura, Qian, y Pollard 2015). Particularmente, en el caso del CMTN, el sitio mayoritario de formación de metástasis es el pulmón, en segundo lugar, el cerebro y en tercer lugar el hígado (ver Figura 3) (Foulkes *et al.* 2010).

El cáncer de mama puede presentarse en cuatro estadios diferentes. El estadio I, corresponde a tumores menores a 2 centímetros de lado sin afectación de nódulos

linfáticos. Este estadio presenta una sobrevida específica de 5 años en el 99% de los tumores positivos para receptores hormonales, 94% para aquellos ERBB2 positivos y de un 85% en caso de ser triple negativo. En el otro extremo, es decir en el estadio IV, el cual presenta metástasis distante, la mediana de sobrevida es aproximadamente 5 años para los subtipos HR⁺ y ERBB2⁺, y de 1 año para el triple negativo (Waks y Winer 2019).

Debido al pronóstico desfavorable para el CMTN, la quimioterapia es administrada generalmente en todos los pacientes con tumores mayores a 5 mm, independientemente del involucramiento de nódulos linfáticos (Waks y Winer 2019). Por estas razones, el desarrollo de otros tipos de terapia es primordial.

Inmunoterapia: una opción prometedora en CMTN

En los últimos años, la inmunoterapia ha tomado mucha relevancia en el tratamiento contra el cáncer (Stephen Hodi *et al.* 2010; Topalian *et al.* 2012), convirtiéndose en determinados escenarios la primera opción terapéutica como es el caso del melanoma, del cáncer de pulmón y de riñón (Tang *et al.* 2018).

La inmunoterapia es capaz de inducir respuestas duraderas y de generar memoria, además de generar una respuesta policlonal, la cual es capaz de combatir la heterogeneidad propia de las células tumorales (Ribas y Wolchok 2018).

En este sentido, los tumores pueden ser clasificados desde una perspectiva inmunológica en tumores “calientes” o “fríos”. Aquellos que son considerados “calientes” presentan un gran infiltrado linfocitario. Otras características adicionales tienen que ver con la expresión de PD-L1 por parte de las células tumorales, así como su inestabilidad genómica. Por el contrario, los tumores “fríos”, o inmunológicamente ignorantes, se distinguen por poseer un bajo infiltrado leucocitario, baja expresión de PD-L1 y una baja carga mutacional. Adicionalmente, estos presentan baja expresión de neo-antígenos así como de moléculas asociadas a la presentación de antígenos vía MHC-I (Galon y Bruni 2019).

Particularmente para el CMTN negativo, la propensión a generar neo-antígenos es elevada, debido a la alta inestabilidad genómica y a la alta carga mutacional que presenta (Bianchini *et al.* 2016). Los neo-antígenos pueden ser detectados por el sistema inmune adaptativo como moléculas no propias y por tanto pueden desencadenar una respuesta inmune efectora (Brown *et al.* 2014). Además, este subtipo

de cáncer de mama, presenta un alto infiltrado linfocitario a nivel tumoral, así como una alta expresión de PD-L1 en comparación a otros subtipos de cáncer de mama (Wimberly *et al.* 2015; Ali *et al.* 2015). Por tanto, debido a las características recién mencionadas, pacientes con CMTN podrían beneficiarse de eventuales inmunoterapias, con lo cual el estudio del CMTN desde un punto de vista inmunológico, puede tener un gran impacto a nivel clínico.

Glicosilación y cáncer

Hanahan y Weinberg son responsables de haber realizado una actualización de los “*hallmarks*” o características distintivas de un fenotipo tumorigénico (Hanahan y Weinberg 2000; 2011). Cada *hallmark* representa o reúne un conjunto de procesos, los cuales a su vez se encuentran regulados por una amplia variedad de fenómenos, como las modificaciones post-traduccionales. En particular, la glicosilación es un proceso que repercute en todas estas características (Hanahan y Weinberg 2011). De esta manera, la desregulación en el proceso de la glicosilación promueve la adquisición de varios de los *hallmarks* anteriormente mencionados.

La glicosilación es considerada una de las modificaciones post-traduccionales más frecuentes y complejas. Esta involucra el proceso de adición de glicanos a proteínas y lípidos (Chia, Goh y Bard 2016). Ocurre a nivel del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi. Allí, enzimas llamadas glicosiltransferasas y glicosidasas actúan de forma ordenada para dar lugar a los diferentes tipos de glicanos (Reily *et al.* 2019). La glicosilación influye en el plegamiento de proteínas, en su transporte, estabilidad, y función. Por tanto, las funciones biológicas de los glicanos son varias y diversas, y van desde la conformación de la barrera física protectora de las células epiteliales hasta la modulación de las respuestas inmunes (Varki 2017).

Los principales tipos de glicosilación de las proteínas son la O-glicosilación y la N-glicosilación. La O-glicosilación, la cual se inicia en el aparato de Golgi, consiste en la unión del glicano mediante un átomo de oxígeno presente en residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) en el esqueleto polipeptídico (Reily *et al.* 2019). En el caso de la O-glicosilación de tipo mucina (principal tipo de O-glicosilación), el primer azúcar que se une a la serina o treonina es la N-Acetil-Galactosamina (GalNAc) (Vasudevan y Haltiwanger 2014). Este tipo de O-glicosilación es abundante en varias glicoproteínas extracelulares, así como en secretadas (Reily *et al.* 2019). Adicionalmente, este tipo de O-glicosilación es la que presenta un alto grado de regulación, ya que puede ser iniciada

por hasta 20 isoenzimas (ppGalNAc-Ts) (Steentoft *et al.* 2013). A partir de este momento, se hablará de O-glicosilación en referencia a la O-glicosilación de tipo mucina.

Por otra parte, los N-glicanos se encuentran unidos mediante un átomo de nitrógeno presente en un residuo de asparagina (Asn), la cual pertenece a la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (donde "X" es cualquier aminoácido excepto prolina). En el caso de la N-glicosilación, que se inicia en el retículo endoplásmico, la N-Acetil-Glucosamina (GlcNAc) es el residuo unido al aminoácido de Asn (Reily *et al.* 2019). A diferencia de la O-glicosilación, la N-glicosilación es iniciada únicamente por un complejo oligosacariltransferasa, el cual transfiere un glicano complejo pre-formado, limitando una regulación diferencial en este tipo de glicosilación (Steentoft *et al.* 2013).

La glicosilación es un proceso frecuentemente alterado en las células tumorales, lo que favorece la progresión tumoral (Figura 4) (Pinho y Reis 2015). Las células tumorales presentan una gran variedad de alteraciones en su glicosilación en comparación con las células normales. Este cambio en la heterogeneidad de los glicanos o glicofenotipo, es el resultado de dos grandes procesos según Kannagi y colegas (Kannagi *et al.* 2008). Uno tiene que ver con un fenómeno de síntesis incompleta o truncada y el otro fenómeno, con un proceso de síntesis *de novo* (Kannagi *et al.* 2008). En el contexto tumoral, los cambios asociados a cáncer más frecuentes tienen que ver con la sialilación, fucosilación, O-glicosilación truncada y ramificación de la N-glicosilación (Christiansen *et al.* 2014).

En general, la alteración de la glicosilación en las células tumorales puede deberse a un cambio en los niveles de enzimas llamadas glicosiltransferasas (Buckhaults *et al.* 1997), a una desregulación en la función de chaperonas (Schietinger *et al.* 2006) y/o un cambio en la actividad de glicosidasas (Kakugawa *et al.* 2002). En segundo lugar, la expresión modificada de glicanos puede deberse a cambios en la conformación terciaria del esqueleto peptídico. La relativa abundancia o disponibilidad de nucleótidos donadores de azúcar, y cofactores necesarios, también pueden afectar el proceso de glicosilación (Kumamoto *et al.* 2001). Por último, cambios en la localización intracelular de glicosiltransferasas pueden impactar en la actividad de las mismas (Gill *et al.* 2010).

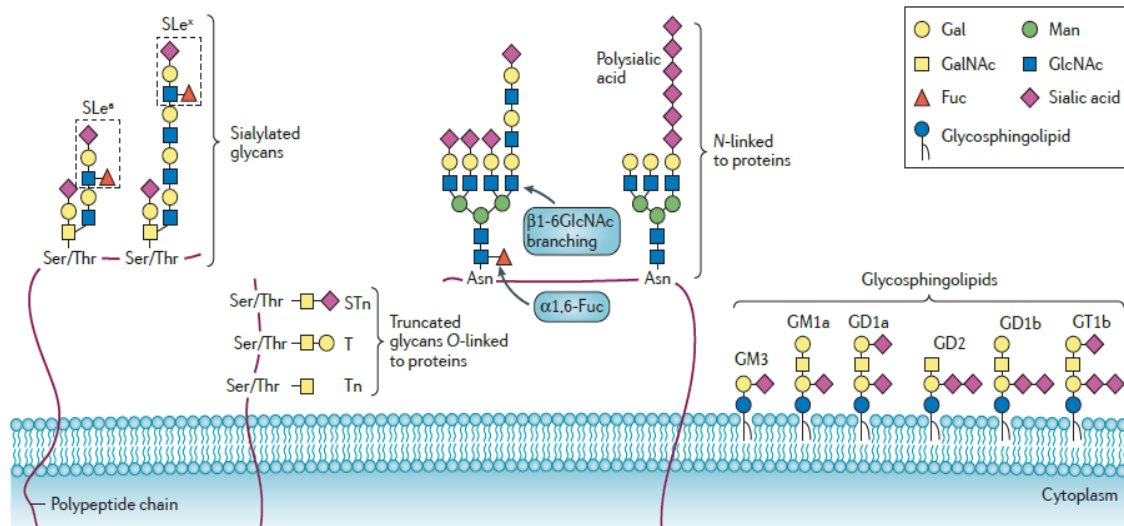


Figura 4: Principales glicanos asociados a tumor. Las células tumorales presentan un glicofenotipo particular, donde las estructuras mostradas se hacen más frecuentes. Se puede distinguir un aumento de estructuras sialiladas, como el Sialil Lewis x (SLe^x) y SLe^a. Otro patrón característico son los O-glicanos truncados, donde podemos distinguir al antígeno Tn, el antígeno T y el sTn. También se puede observar un aumento de β 1,6-*N*-glicanos complejos ramificados, así como de ácido polisialílico. Además, ciertos glicosfingolípidos sialilados, como GM3, GM1a, GD1a, GD2, GD1b y GT1b, se han asociado al proceso de malignidad. Extraído de Pinho y Reis 2015.

Los glicoconjugados específicos de cáncer pueden ser utilizados como biomarcadores para definir la eficacia de un tratamiento oncológico (Katz y Alsharedi 2018) o pueden ser explotados en futuras terapias dirigidas, limitando así el daño inespecífico. Además, la interferencia de las interacciones lectina-glicano puede impactar en múltiples procesos que favorecen la progresión tumoral. El hecho de que las células tumorales suelen utilizar el proceso de glicosilación a su favor, incrementando por ejemplo la resistencia a diversas drogas, genera la posibilidad de aumentar la eficacia de terapias ya existentes (Mereiter *et al.* 2019).

Antígeno Tn

Dentro de los O-glicanos truncados asociados a tumor, podemos distinguir al antígeno Tn, al antígeno Tn sialilado (sTn) y al antígeno T [Gal-β (1→3) GalNAc] (Rodríguez, Schetters, y Van Kooyk 2018). Particularmente, el antígeno Tn se forma por la adición de una unidad de GalNAc a un residuo de Ser o Thr mediante un enlace tipo alfa. Aunque fue descubierto en 1957, no se asoció con el cáncer hasta 1969, cuando se demostró que Tn se encuentra sobreexpresado en alrededor del 90% de los tumores de

mama (Chia, Goh, y Bard 2016). Posteriormente, se describió la presencia del antígeno Tn entre un 70 y 90% de tumores sólidos en humanos (colon, pulmón, cuello de útero, vejiga, ovario, estómago y próstata), no encontrándose en los tejidos normales, lo cual ha llevado a considerarlo un “*pan-carcinoma antigen*” (Chia, Goh, y Bard 2016). Además, el antígeno Tn ha sido reportado como un factor pronóstico en cáncer de mama, pulmón, entre otros (Laack *et al.* 2002; Welinder *et al.* 2013; Konno *et al.* 2002).

El antígeno Tn es sintetizado por una familia de enzimas denominadas polipeptidil-*N*-Acetil-Galactosaminil-Transferasas (ppGalNAc-Ts por sus siglas en inglés), las cuales se ubican de forma transmembranaria en el aparato de Golgi. Allí, estas enzimas catalizan la adición del monosacárido GalNAc desde UDP-GalNAc al grupo hidroxilo presente en los residuos de Ser o Thr en el esqueleto polipeptídico. Este paso constituye el primero de una serie de adición de azúcares por otras glicosiltransferasas que actúan de forma secuencial en el aparato de Golgi para formar O-glicanos complejos (Figura 5).

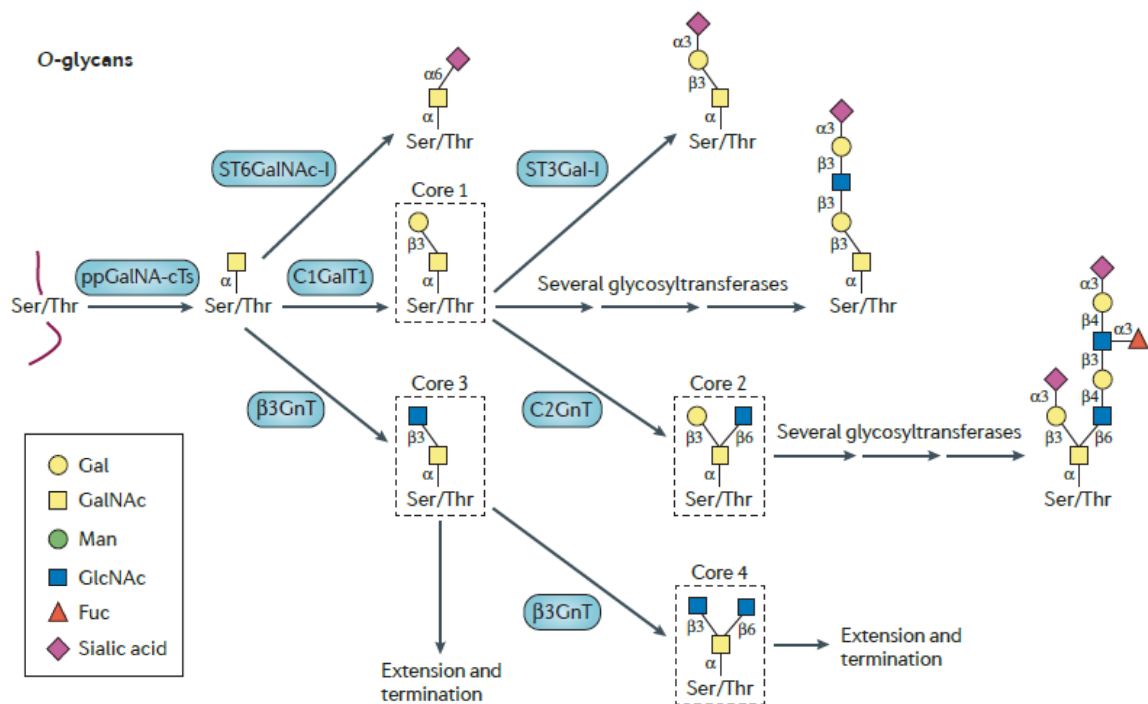


Figura 5: Proceso de O-glicosilación de tipo mucina. Este tipo de glicosilación representa el tipo de O-glicosilación más abundante. Las principales enzimas involucradas son: ppGalNAc-Ts (polipeptidil-*N*-Acetil-Galactosaminil-Transferasa); ST6GalNAc-I (α -GalNAc α -2-6-sialiltransferasa 1), C1GalT1 (Core 1 GalNAc β 1,3-Galactosiltransferasa 1); β 3GnT (β -1,3-*N*-acetilglucosamintransferasa); ST3Gal-I (α -2,3-sialiltransferasa 1); C2GnT (Core 2 β 1,6-*N*-Acetilglucosamintransferasa). Gal (galactosa); GalNAc (*N*-acetil-Galactosamina); Man (manosa); GlcNAc (*N*-Acetil-Glucosamina); Fuc (fucosa); Sialic Acid (ácido siálico). Modificado de Pinho y Reis 2015.

La expresión del antígeno Tn es consecuencia de varios posibles eventos que ocurren en las células tumorales. Como se puede ver en la Figura 5, la enzima C1GalT1 (Core 1 GalNAc β 1,3-Galactosiltransferasa 1), también conocida como T-sintasa, se encarga de añadir una galactosa al antígeno Tn, para formar lo que se denomina el antígeno T o TF y continuar así con la elongación del core 1 (Fu *et al.* 2016). A su vez, la chaperona COSMC es clave para el correcto plegamiento y actividad de la T sintasa (Fu *et al.* 2016). Por tanto, la inactivación de la chaperona COSMC favorece la expresión del antígeno Tn. En este sentido, existen una serie de trabajos que han reportado un vínculo entre la expresión del antígeno Tn y la adquisición de diferentes características asociadas a la agresividad tumoral. En un modelo murino de glioblastoma, se inactivó la chaperona COSMC para emular la alta expresión del antígeno Tn observada en tejidos provenientes de pacientes con este tipo de cáncer (Dusoswa *et al.* 2020) y se observó que la presencia del antígeno Tn se asocia a un aumento en la frecuencia de macrófagos inmunosupresores en el microambiente tumoral. Como consecuencia, estos macrófagos facilitan la progresión tumoral al colaborar con el mantenimiento de un microambiente inmunosupresor. Por otra parte, en un modelo murino de cáncer de pulmón, donde también se usó la estrategia de inactivar a la chaperona COSMC, se vio que la presencia del antígeno Tn en las células tumorales favorece el proceso de angiogénesis. Esta promoción del proceso angiogénico, es dependiente de la presencia de células MGL2⁺ en ratones portadores de tumor (da Costa *et al.* 2021). Por último, también se ha observado que una mayor presencia del antígeno Tn en células de CMTN, favorece un mayor desarrollo de micrometástasis pulmonares (Festari *et al.* 2022).

En conclusión, el antígeno Tn es un biomarcador de relevancia asociado a la agresividad tumoral y además participa o modula tres procesos claves que contribuyen a la progresión tumoral, como es la inmunoregulación, la angiogénesis y el proceso de metástasis.

MMP9

- **Características generales**

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) conforman una familia de endopeptidasas dependientes de zinc (Klein y Bischoff 2011). Existen distintos grupos de MMPs: gelatinasas, colagenasas, estromelinas, matrilisinas y metaloproteasas de matriz de tipo membranas (Nagase, Visse, y Murphy 2006). Particularmente, la MMP9 pertenece al subgrupo de las gelatinasas. Como se puede ver en la Figura 6, esta enzima presenta varios dominios. En el extremo *N*-terminal, se encuentra un dominio el cual contiene una secuencia de péptido señal, la cual se encarga de dirigir a las MMPs hacia el retículo endoplasmático. Además, este pro-dominio cumple la función de mantener a la MMP9 inactiva, siendo su clivado necesario para su actividad. Continuando hacia el extremo C-terminal, se encuentra el dominio catalítico, el cual contiene el sitio de unión para zinc. En el extremo C-terminal, se distingue el dominio tipo hemopexina, el cual juega un importante papel en la unión del sustrato, así como en la interacción de la enzima con inhibidores naturales como aquellos de tipo TIMP (*Tissue inhibitor of metalloprotease*). Por último, entre el dominio tipo hemopexina y el dominio catalítico, existe una región *linker* o bisagra, rica en prolina la cual le aporta flexibilidad a la MMP9 (Ram, Sherer, y Shoenfeld 2006). Es importante destacar que dentro de la región bisagra existe una región altamente O-glicosilada (Vandooren, Van Den Steen, y Opdenakker 2013).

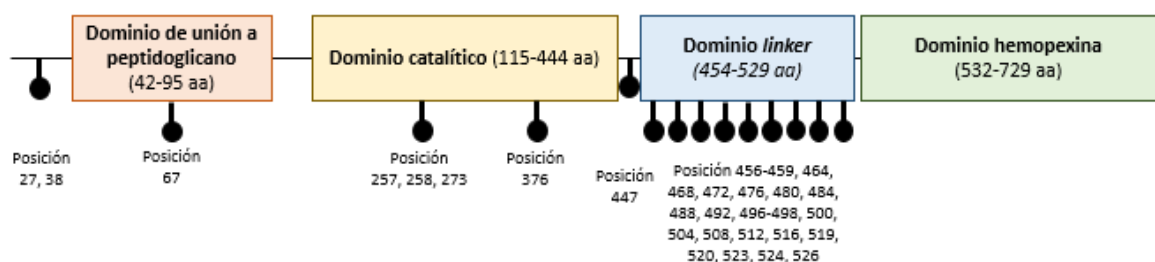


Figura 6: Dominios y sitios de O-glicosilación de la MMP9. Los dominios fueron determinados utilizando el *software* InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>.) Los sitios potenciales de O-glicosilación se determinaron utilizando el *software* NetOGlyc – 4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetOGlyc-4.0/>.) y se indican con un símbolo negro, junto con la posición del aminoácido en la secuencia proteica. aa (aminoácido).

Diferentes tipos de células son capaces de sintetizar y secretar MMP9. Entre ellas se destacan los neutrófilos, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales, así como también las células tumorales (Vandooren, Van Den Steen, y Opdenakker 2013). Como se indicó anteriormente, la MMP9 es sintetizada como una pre-proenzima, la cual debe sufrir dos procesamientos para volverse activa. El primer clivado ocurre a la altura de la secuencia señal a nivel intracelular, de manera que la MMP9 cuando es secretada al medio extracelular, lo hace en forma de pro-MMP9. Una vez en el medio extracelular, otras proteasas como la MMP3 clivan la pro-MMP9 inactiva para generar la MMP9 activa, removiendo el dominio propeptídico (Huang 2018).

Fisiológicamente, la MMP9 puede utilizar una variedad de sustratos pertenecientes a la matriz extracelular, como gelatina, colágeno y elastina, entre otros (Ram, Sherer, y Shoenfeld 2006).

• **MMP9 y Cáncer**

La asociación entre cáncer y metaloproteasas de matriz se ha reportado por primera vez hace varias décadas atrás. Las MMPs participan en el remodelado de la matriz extracelular, promoviendo la invasión de las células tumorales, así como el desarrollo de metástasis (L. A. Liotta, K. Tryggvason, S. Garbisa, Ian Hart 1980). Sin embargo, actualmente se hizo evidente que la asociación entre MMPs y cáncer es más compleja, y que las MMPs participan en más procesos aparte de degradar barreras físicas (Kessenbrock, Plaks, y Werb 2010).

La señalización a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), es un potente inductor de la proliferación celular y un importante regulador de la homeostasis tisular. Un mal funcionamiento de este eje debido a mutaciones genéticas es frecuentemente reportado en el cáncer de mama, así como en otros tipos de tumores (Hynes y Lane 2005). Se ha observado que la activación de EGFR resulta en un aumento de la MMP9, la cual en consecuencia degrada la E-cadherina (Cowden Dahl *et al.* 2008). Por consiguiente, la acción de la MMP9 puede llevar a la pérdida de uniones estrechas célula-célula, así como modificaciones en la arquitectura epitelial, que conducen a la disrupción de la polaridad celular, ambos procesos característicos de la transición epitelio mesenquimal (Orlichenko y Radisky 2008; Kalluri y Weinberg 2009).

Introducción

El TGF- β es una citoquina que normalmente inhibe la proliferación y el crecimiento celular, así como su diferenciación y por lo tanto posee una acción antitumoral. Sin embargo, las células tumorales suelen acumular mutaciones que las vuelven insensibles al TGF- β y por tanto su efecto se concentra en el resto de las células presentes en el microambiente tumoral (Massagué 2008). El TGF- β es capaz de asociarse (junto con LTBP1) a la matriz extracelular como mecanismo regulatorio de su actividad. Se ha reportado que LTBP1 puede ser un sustrato de la MMP9, lo cual aumentaría la disponibilidad de TGF- β al liberarlo de su unión a la matriz extracelular (Dallas *et al.* 2002). Por otra parte, se ha mostrado que la MMP9 puede co-localizar con el receptor de membrana CD44 en la superficie de células de carcinoma mamario murino y en células de melanoma humano (Yu y Stamenkovic 1999). El anclaje de MMP9 a CD44 permitiría el clivado, y por consiguiente la activación, del TGF- β en su forma latente (Yu y Stamenkovic 2000). A su vez, la activación de TGF- β puede llevar a un circuito regulatorio positivo ya que el TGF- β puede potenciar la expresión y síntesis de la MMP9, todo lo cual favorece la progresión tumoral (Sun *et al.* 2008).

La MMP9 también puede modular el tráfico leucocitario al ser capaz de procesar distintas moléculas quimiotácticas, lo cual en parte la vuelve responsable de regular el microambiente tumoral (Van Lint y Libert 2007). Interesantemente, algunas quimioquinas blanco de procesamiento por la MMP9 se ven potenciadas en su actividad biológica luego de la acción de la MMP9, mientras que por el contrario algunas otras se ven inactivadas (Van den Steen *et al.* 2000; McQuibban *et al.* 2001).

La IL-8 (o CXCL8) es conocida en el contexto tumoral por su capacidad de promover el reclutamiento de neutrófilos, así como de células mieloides supresoras, al microambiente tumoral. A su vez, la transición epitelio mesenquimal en las células tumorales se ve inducida por la IL-8 (Palena, Hamilton, y Fernando 2012). La MMP9 es capaz de procesar la IL-8 dando como resultado un fragmento con mayor actividad biológica al unirse a neutrófilos (Van den Steen *et al.* 2000). Cabe destacar que, a su vez, los neutrófilos son una importante fuente de MMP9 (Deryugina *et al.* 2014). Además, la IL-8 es capaz de inducir la expresión y secreción de MMP9 por parte de las células tumorales, así como su liberación en neutrófilos, lo cual se correlaciona con un mayor nivel de angiogénesis (Xue *et al.* 2022; Bekes *et al.* 2011).

Por otro lado, la MMP9 puede procesar algunas citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β , participando así en la modulación del sistema inmune (Van Lint y Libert 2007). En el caso del TNF- α , es capaz de liberarlo de la superficie celular, convirtiéndolo a su

forma soluble (Gearing *et al.* 1994). Además, la MMP9 es capaz de procesar la forma inactiva pro-IL-1 β , generando su forma activa (Schönbeck, Mach, y Libby 1998).

Una de las estrategias por las cuales las células tumorales se benefician, es a través de la evasión de señales apoptóticas. La apoptosis es un proceso normalmente iniciado por la señalización de receptores extracelulares, los cuales llevan a la degradación de compartimientos intracelulares, así como del ADN nuclear. Se ha documentado que particularmente la inhibición de la MMP9 junto con la MMP2, aumenta el efecto de agentes apoptóticos como TNF- α y TRAIL sobre células tumorales de mama y melanoma (Nyormoi, Mills, y Bar-Eli 2003).

Anteriormente se mencionó que el cambio en la localización de las enzimas participantes del proceso de glicosilación conduce a la aparición de glico-antígenos incompletos. En este sentido, se ha reportado que la re-localización de la GALNT1 al retículo endoplasmático incrementa en gran medida el crecimiento tumoral y reduce la esperanza de vida. A su vez, la presencia de GALNT1 en el retículo endoplasmático favorece la O-glicosilación truncada. En dicho sistema, donde se favorecía una mayor presencia del antígeno Tn en la metaloproteasa de matriz 14 (MMP14), se observó que al mutar los sitios de O-glicosilación, la actividad metaloproteasa se veía reducida. Por otra parte, el silenciamiento de la MMP14 en dicho modelo, disminuyó el crecimiento tumoral *in vivo* (Nguyen *et al.* 2017). Por lo tanto, existen indicios de que cambios en la glicosilación podrían afectar la actividad metaloproteasa, y en consecuencia la agresividad tumoral.

Sistema inmune y cáncer

Para ejercer sus funciones efectoras, el sistema inmune debe primeramente ser capaz de reconocer el blanco contra el cual será dirigido su respuesta. Partiendo de esta base, la propia naturaleza de un tumor, representa la primera barrera con la cual la inmunidad antitumoral debe enfrentarse, ya que las células tumorales, si bien no son células normales, no dejan de ser células intrínsecamente propias (Houghton y Guevara-Patiño 2004).

A su vez, el propio crecimiento tumoral se asocia a procesos de rápida proliferación y necrosis, así como expresión de neo-antígenos, los cuales en principio deberían activar al sistema inmune. Sin embargo, en la mayoría de los casos la enfermedad suele

Introducción

progresar, lo que sugiere que las células tumorales utilizan diversos mecanismos de inmunoescape (Woo, Corrales, y Gajewski 2015).

Los tumores modulan al sistema inmune mediante tres grandes estrategias. La primera tiene que ver con interferir en el reconocimiento por el sistema inmune (Jhunjhunwala, Hammer, y Delamarre 2021). Una segunda estrategia consiste en modular el reclutamiento de distintas poblaciones leucocitarias al microambiente tumoral. Por último, el tumor es capaz de modificar la expansión y función de diversas poblaciones inmunes presentes en el infiltrado tumoral (Kitamura, Qian, y Pollard 2015).

Debido a una vasculatura tumoral desorganizada, sumado a diversas señales quimiotácticas impartidas tanto por el microambiente tumoral como por el propio tumor, y a la existencia de profundas alteraciones en el tejido conectivo y el estroma asociado (producto del crecimiento tumoral), la migración de células inmunes efectoras puede verse entorpecida en gran medida. En el caso de que estas células logren infiltrarse en el lecho tumoral, el microambiente tumoral, así como moléculas presentes en el tumor, son capaces de modificar estas células hacia un perfil tolerogénico o regulador (Turley, Cremasco, y Astarita 2015). De esta manera, los tumores logran modular al sistema inmune prácticamente en todos los pasos de la respuesta antitumoral.

La teoría de la immunoedición se propone como forma de interacción entre el sistema inmune y el crecimiento tumoral. Este, es un concepto que fue cambiando durante varios años. De hecho, en 1978 fue abandonado y luego reincorporado casi tres décadas después, cuando se descubrió que el sistema inmune no solo controla el tumor en términos cuantitativos sino también cualitativos, lo que está determinado por su inmunogenicidad (Dunn *et al.* 2002; Shankaran *et al.* 2001). Este concepto implica que el sistema inmune determina el fenotipo inmunogénico que el tumor va a tener. Por lo tanto, la acción del sistema inmune sobre un tumor puede tener una consecuencia beneficiosa en la medida que el tumor es erradicado, o una consecuencia negativa, dado que puede favorecer la expansión de células tumorales no inmunogénicas en forma descontrolada en un hospedero inmunocompetente (Dunn *et al.* 2002).

A su vez, el proceso de immunoedición tumoral también ocurre en pacientes que reciben inmunoterapia, donde los mecanismos de resistencia a la misma parecen solaparse ampliamente con los mecanismos de inmunoescape utilizados por las células tumorales a medida que sufren el proceso de immunoedición por el sistema inmune (Donnell, Teng y Smyth 2019).

Introducción

Esquemáticamente se plantean tres fases en el proceso de inmunoección tumoral, denominadas “eliminación”, “equilibrio” y “escape” (Schreiber, Old, y Smyth 2011) (Figura 7).

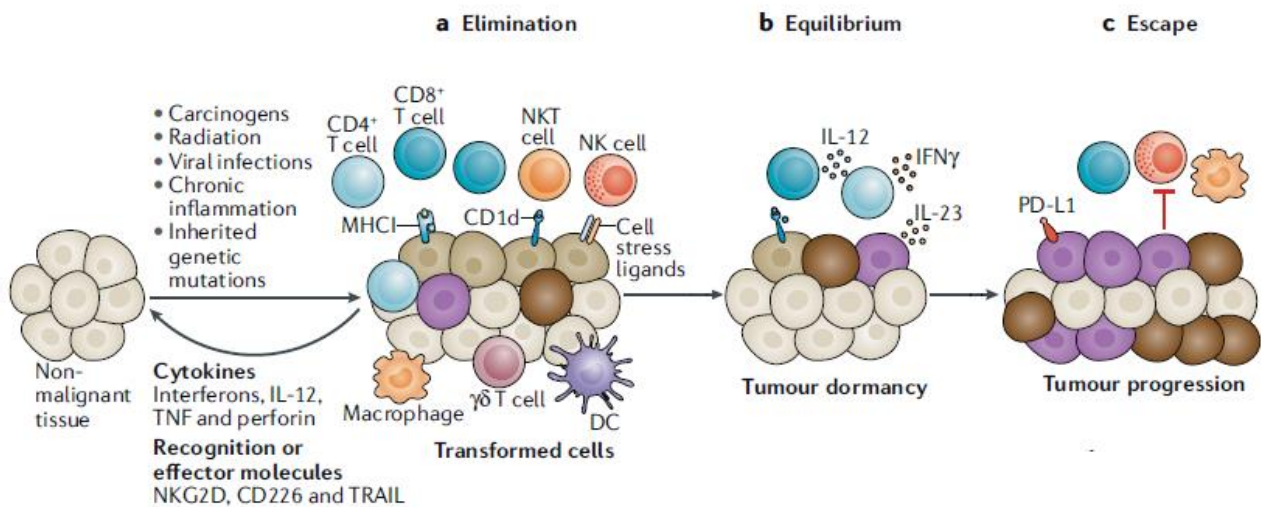


Figura 7: Hipótesis de la inmunoección en el cáncer. Se muestra cómo el sistema inmune moldea la población de células tumorales y por tanto ejerce una presión selectiva sobre este. Modificado de Donnell, Teng, y Smyth 2019.

Durante la fase de eliminación, tanto el sistema inmune innato como adaptativo actúan coordinadamente para reconocer y matar células transformadas. En menor medida algunos sub-clones de células tumorales son capaces de sobrevivir a la acción del sistema inmune, lo cual lleva a una fase de equilibrio, donde el sistema inmune logra contener el tumor, pero no erradicarlo. Esta constante presión selectiva ejercida por el sistema inmune, sumado a una inestabilidad genética propia de las células tumorales, genera el escenario propicio para que aquellos sub-clones tumorales cuya inmunogenicidad es baja sean seleccionados para proliferar debido a su capacidad para evadir al sistema inmune. De esta manera, el tumor eventualmente puede entrar en la fase de “escape”, donde su crecimiento no es limitado y se torna evidente a nivel clínico (Donnell, Teng, y Smyth 2019).

Los tumores además de modificar el infiltrado leucocitario son capaces de ejercer un efecto a nivel sistémico. Un ejemplo de ello, se produce a nivel de la médula ósea, donde distintos factores liberados por las células tumorales impactan en el proceso de hematopoyesis (Kowanetz *et al.* 2010). A través de la secreción de altos niveles del factor estimulador de colonias granulocíticas (*granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF), algunos tumores ejercen una presión a nivel hematopoyético, no solamente a través de la generación de nuevas células, sino que también sesgando la diferenciación

de células de estirpe mieloide hacia un fenotipo de neutrófilo (Semerad *et al.* 2002). En algunos escenarios, la presión llega a ser tan grande, que se produce la liberación de células mieloides inmaduras desde la médula ósea (Coffelt, Wellenstein, y De Visser 2016).

Por otra parte, se ha observado que linfocitos T reguladores se encuentran presentes a nivel del tumor primario, y se acumulan en ganglios linfáticos y en sangre en varios escenarios tumorales (Liyanage *et al.* 2002; Wolf *et al.* 2003). Un mayor número de linfocitos T reguladores generalmente se correlaciona con un pronóstico desfavorable (Saleh y Elkord 2020). También se ha reportado en un modelo experimental de CMTN (utilizando células murinas 4T1), que la metástasis pulmonar es un proceso facilitado por los linfocitos T reguladores. En dicho trabajo, plantean que a través de un aumento de las quimioquinas CCL17 y CCL22 se reclutan células tumorales y linfocitos T reguladores CCR4⁺ al pulmón, donde estos últimos median la eliminación de las células asesinas naturales, las cuales, de lo contrario, estarían evitando el desarrollo de metástasis (Olkhanud *et al.* 2009). Además, se ha reportado una disfunción de linfocitos T citotóxicos en el microambiente tumoral, resultado de una interacción entre células presentadoras de antígeno y linfocitos T reguladores, donde estos últimos regulan a la baja la expresión de moléculas co-estimuladoras en las células presentadoras de antígeno (APCs) así como su expansión en el tumor (Bauer *et al.* 2014; Jang *et al.* 2017).

Antecedentes inmediatos a este trabajo

En el Laboratorio de Inmunomodulación y Vacunas perteneciente al Departamento de Inmunobiología de la Facultad de Medicina (UdelaR), hemos desarrollado modelos tumorales experimentales con O-glicosilación truncada, particularmente con una alta expresión del antígeno Tn. Para generar la línea 4T1-Tn⁺ se utilizó la tecnología *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/Caspase 9* (CRISPR/Cas9), dirigido contra la chaperona *Cosmc*, promoviendo así el bloqueo del proceso de la O-glicosilación (Figura 8). Las células fueron seleccionadas y clonadas por citometría de flujo utilizando como herramienta el anticuerpo monoclonal 83D4 que reconoce *clusters* de Tn di- o tri-méricos (Osinaga *et al.* 2000).

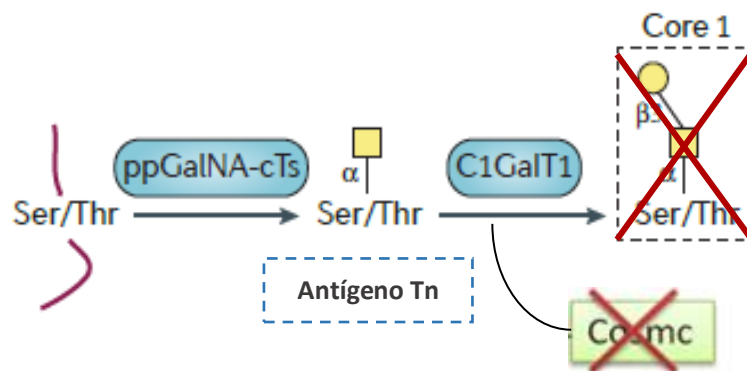


Figura 8: Estrategia para generar el modelo tumoral 4T1-Tn⁺. Se mutó la chaperona *Cosmc* (necesaria para el correcto plegamiento de la enzima C1GalT1) en la línea celular murina 4T1, mediante la estrategia de CRISPR/Cas9. Esto conlleva a que todos los O-glicanos de esta célula queden truncados en forma de antígeno Tn.

Luego de obtenida la línea 4T1-Tn⁺, se realizó una caracterización glicofenotípica de *N* y *O*-glicanos presentes en la superficie celular, constatando cómo único cambio, el aumento del antígeno Tn en relación a la línea parental (Festari *et al.* 2022).

Por otro lado, la línea 4T1-Tn⁺ resultó ser mucho más agresiva que la línea parental 4T1 wt, ya que indujo un mayor crecimiento tumoral y una menor sobrevida de los ratones portadores de tumores (Figura 9) (Festari *et al.* 2022).

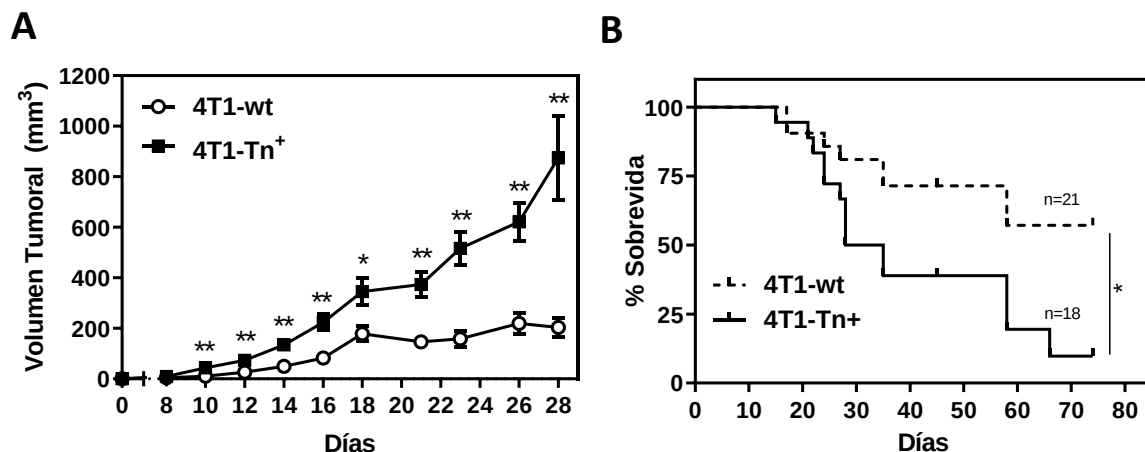


Figura 9: Crecimiento tumoral y supervivencia de ratones inyectados con células 4T1-wt y 4T1-Tn⁺. Se inyectaron 70.000 células tumorales en la cuarta mama derecha subcutáneamente. **(A)** Evaluación del crecimiento tumoral en ratones inoculados con células 4T1-wt o Tn⁺. Para el cálculo del volumen tumoral se utilizó la fórmula $V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (R \cdot r^2)$, siendo “R” el radio mayor y “r” el radio menor. **(B)** Curva Kaplan–Meier indicando la supervivencia luego de extracción del tumor primario al día 15. Modificado de Festari *et al.* 2022.

Posteriormente, se buscó profundizar en los mecanismos moleculares por los cuales la línea celular Tn⁺ presenta una mayor agresividad tumoral. Para ello se realizó un estudio de RNAseq (secuenciación de ARN) y se determinó la expresión diferencial de genes entre las líneas Tn⁺ y la *wild type* (wt). Encontramos que la familia de las metaloproteasas se encuentra diferencialmente expresada entre ambas líneas celulares por lo que podría estar involucrada en el comportamiento más agresivo de la línea 4T1-Tn⁺ (Figura 10) (Festari *et al.*, manuscrito en preparación).

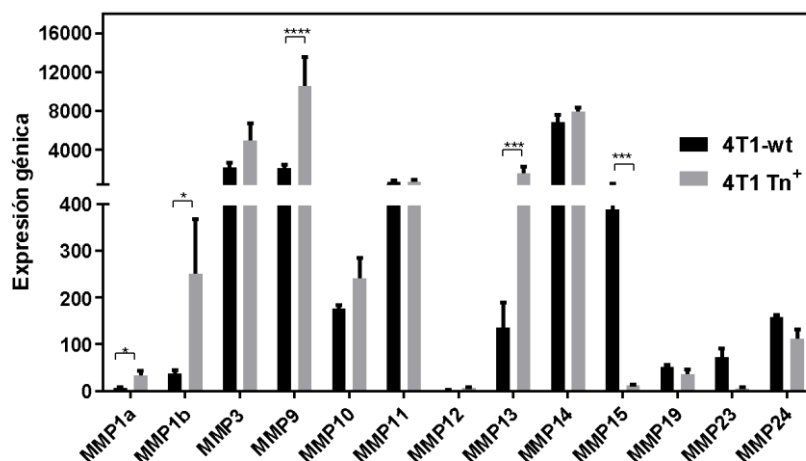


Figura 10: Expresión génica de la familia de las metaloproteasas (MMPs) por RNAseq en líneas 4T1-wt y 4T1-Tn⁺. Las células 4T1-wt y Tn⁺ se cultivaron *in vitro*, y en fase exponencial de crecimiento se cosecharon para aislar el ARN con el kit RNA easy. Un total de 4 µg de ARN

Introducción

fue utilizado para la preparación de las librerías de ARNm. Se generaron doce librerías utilizando el *kit Illumina Truseq Stranded mRNA*. Las librerías fueron secuenciadas utilizando la plataforma *NextSeq Illumina* (Macrogen). Análisis estadístico determinado con un test t de student no pareado. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Festari *et al.* en preparación.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis de trabajo

Considerando que: i) algunas MMPs están aumentadas en el modelo experimental de CMTN Tn⁺; ii) la MMP9 favorece la invasión celular y metástasis; iii) la actividad de las MMPs pueden estar regulada por su O-glicosilación; iv) la expresión del antígeno Tn representa una ventaja para la progresión de las células tumorales; la hipótesis de este trabajo es que existen mayores niveles de MMP9 activa en células 4T1-Tn⁺ respecto a las 4T1-wt, lo que podría estar favoreciendo que estas células presenten un mayor crecimiento tumoral y un mayor desarrollo de metástasis.

Objetivos Generales

El objetivo general de este trabajo consistió en estudiar el papel de la MMP9 en un modelo experimental de CMTN metastásico murino con sobreexpresión del antígeno tumoral Tn. Este objetivo general incluyó los siguientes objetivos específicos:

Objetivos específicos

- 1- Generar un modelo que permita estudiar el papel de la MMP9 en células tumorales con O-glicosilación truncada (Tn⁺) utilizando la línea celular 4T1.
- 2- Evaluar los niveles de MMP9 en los clones obtenidos respecto a las células tumorales Tn⁺, por RT-qPCR y *Western blot*
- 3- Evaluar el impacto de la MMP9 en la progresión tumoral a través de la determinación del tamaño tumoral y el análisis de micrometástasis pulmonares en ratones inoculados con las células 4T1-Tn⁺ y con los clones obtenidos.
- 4- Analizar diversos componentes del sistema inmune, tanto local como sistémicamente, en ratones portadores de tumores derivados de las diferentes líneas celulares estudiadas.

Materiales y métodos

Cultivo de células tumorales

Las células de origen murino de CMTN 4T1, fueron obtenidas de ATCC (CRL-2539™) y cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con glutamina (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Capricorn o Gibco), 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (medio completo). Las células se mantuvieron en estufa humidificada, a 37°C y 5% de CO₂. Para despegar las células, éstas se lavaron dos veces con buffer fosfato salino pH 7.4 (PBS por sus siglas en inglés, el cual contiene NaCl 0.137 M, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 0.01 M y KH₂PO₄ 1.8 mM en H₂O), posteriormente fueron incubadas con Tripsina (500 mg/L) y EDTA (220 mg/L) por un tiempo de entre 7 y 10 minutos a 37°C y finalmente fueron resuspendidas en PBS. La viabilidad celular y el conteo de las mismas se realizó con azul de tripán, utilizando una cámara de Neubauer.

Generación de sublíneas celulares derivadas de la línea 4T1-Tn⁺

Las variantes celulares fueron generadas a partir de la línea celular 4T1-Tn⁺, previamente generada por nuestro grupo de trabajo (Festari *et al.* 2022) utilizando la tecnología de CRISPR/Cas9. Se utilizaron paralelamente dos plásmidos pSpCas9 (BB)-2A-GFP (PX458) de la empresa GenScript (NJ, USA) conteniendo secuencias que codifican para ARN guías complementarios al gen *Mmp9*. La secuencia de los ARN guía comerciales utilizados fueron: ACAACTCGTCGTCGTCGAAA y ATTCGACGACGACGAGTTG. Las células 4T1 Tn⁺ fueron depositadas en placas de 6 pocillos (3,75 x 10⁵ células/pocillo) y luego de 24 horas, 2.5 µg de plásmido fue transfectado utilizando Lipofectamina 3000 (Invitrogen) según instrucciones del fabricante. Luego de 48 horas, las células GFP⁺ se clasificaron utilizando un citómetro de flujo (BD FACSAria™ Fusion) y se clonaron por *Single Cell Deposition*.

Evaluación del crecimiento tumoral *in vivo*

Para este ensayo, primero se recolectaron las células tumorales y se realizaron 3 lavados con PBS estéril. Posteriormente se contaron y concentraron a 7 x 10⁵ células/mL. Se utilizaron ratones hembras de 6 a 8 semanas de la cepa BALB/c que

fueron anestesiados intraperitonealmente con una solución de ketamina 10 mg/mL y xilacina 0.1% en PBS estéril. Posteriormente se inyectaron 70.000 células tumorales en la cuarta mama derecha subcutáneamente. Alrededor del día 12 post-inyección, se comenzó a medir el tamaño tumoral cada 3-4 días utilizando un calibre. Para el cálculo del volumen tumoral se utilizó la fórmula $V=4/3.\pi.(R.r^2)$, siendo “R” el radio mayor y “r” el radio menor. Para el seguimiento del crecimiento tumoral, el volumen tumoral fue graficado en función del tiempo. Los ratones fueron sacrificados entre los días 35 y 40 post-inyección para análisis posteriores.

Evaluación de la expresión génica por RT-qPCR

Para evaluar la expresión génica por RT-qPCR de los distintos genes analizados, primero se realizaron extracciones de ARN utilizando Tri-Reagent (Sigma), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para el caso de muestras provenientes de tumor, estas fueron disgregadas utilizando un émbolo. A partir de este paso, las muestras provenientes de lisado tumoral o línea celular fueron tratadas de igual forma. Se agregó cloroformo (aproximadamente un cuarto del volumen inicial de muestra con Tri-Reagent) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 12000 revoluciones por minuto (RPM) a 4°C durante 15 minutos. La fase acuosa (superior) se pasó a otro tubo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en presencia de isopropanol. Luego se centrifugó a 12000 RPM a 4°C durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se lavó con etanol 75%, centrifugando a 7500 RPM a 4°C durante 5 minutos. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en H₂O con *Diethyl pyrocarbonate* (DEPC).

El ARN obtenido se cuantificó midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermofisher). La preparación de ADN copia (cDNA) se realizó con el kit comercial SensiFAST cDNA Synthesis (Bioline) a partir de 1 a 3 µg de ARN.

A partir de 1 µg de cDNA, se realizó una PCR cuantitativa haciendo uso del kit comercial SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline) y *primers* específicos (4 µM, IDT). Los *primers* utilizados se detallan en la **Tabla 1**. El equipo utilizado para realizar la PCR cuantitativa fue el ECO™ Real-Time PCR System (Illumina) y el programa consistió en una etapa inicial de 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C. La curva de *melting* se realizó en tres etapas de 15 segundos cada una, partiendo de una temperatura de 95°C, luego pasando a una de 55°C y

culminando nuevamente a 95°C. Para normalizar la expresión génica se utilizó el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen 2001), donde el gen constitutivo de referencia utilizado fue *Gapdh*.

Tabla 1: Secuencia de nucleótidos de los *primers* utilizados en qPCR

Primer	Secuencia
MMP9.2 (F)	5'- CGT CGT GAT CCC CAC TTA CT - 3'
MMP9.2 (R)	5'- AAC ACA CAG GGT TTG CCT TC - 3'
GAPDH (F)	5' - ATG ACA TCA AGA AGG TGG TGA AG - 3'
GAPDH (R)	5' - TCC TTG GAG GCC ATG TAG G - 3'

Preparación de lisados proteicos

Se obtuvieron lisados proteicos a partir de líneas celulares y a partir de tumores provenientes de ratones inyectados con las líneas celulares. Para el caso de las primeras, se recolectaron las células, se realizaron 2 lavados con PBS y se las incubó con buffer RIPA [150 mM NaCl, 0.5 % deoxicolato de sodio, 0.1% de SDS (sodio dodecil sulfato), 50 mM de Tris pH 8, 1 % de NP-40 e inhibidor de proteasa (P2714-1BTL, Sigma, conteniendo, AEBSF 0.2Mm, Aprotinina 0.03, μ M, Bestatina 11.6 μ M, E-64 1.4 μ M, Leupeptina 0.1 μ M y EDTA 0.1 mM)]. Para el caso de las muestras de tumores, se incubó directamente el tumor (previamente disgregado con tijeras) con buffer RIPA y se continuó disgregando utilizando un émbolo. A partir de este momento ambos tipos de muestras fueron tratadas de la misma manera. Se vortexearon las muestras cada 5 minutos durante 30 minutos (incubación en hielo) y luego fueron sonicadas por un total de 40 segundos a media potencia. Posteriormente se centrifugaron a 10000 RPM durante 15 minutos a 4°C, y se recolectó el sobrenadante.

Cuantificación de Proteínas

La cuantificación de la concentración proteica, fue realizada mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), utilizando el kit comercial Pierce™ *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El protocolo

realizado consistió en agregar 10 μ L del estándar o de la muestra con 200 μ L de reactivo BCA-CuSO₄ (en proporción 50:1). Para realizar la curva de calibración se hicieron diluciones seriadas al medio, a partir de un estándar de la albúmina sérica bovina (BSA, 2 mg/mL). Una vez dispensadas las muestras y el estándar y agregado el reactivo, se procedió a incubar la placa a 37°C por 30 minutos, y posteriormente se realizó la lectura de absorbancia a 570 nm (Smith *et al.* 1985).

Western Blot

Las muestras analizadas mediante Western Blot fueron de dos tipos: por un lado, líneas celulares en cultivo y por el otro, tumores provenientes de ratones BALB/c inyectados con las mismas.

Para realizar la electroforesis, se sembraron los lisados celulares (25 μ g para los proveniente de las líneas celulares y 50 μ g para los derivados de los tumores) en un gel de poliacrilamida (10% para el gel separador y 5% para el gel concentrador con buffer Tris-HCl, pH 8.8 y pH 6.8, respectivamente). El marcador de peso molecular utilizado fue *AccuRuler RCB Prestained Protein Ladder* (Maestrogen). Las muestras fueron pre-tratadas con buffer de muestra (Tris-HCl 0.0625 M pH 6.8, SDS 2%, β -Mercaptoetanol 1%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.01%) para luego ser calentadas durante 5 minutos en baño de agua a ebullición. La corrida electroforética se realizó a 50 V durante 5 minutos y luego a 200 V durante 1 hora y media aproximadamente.

La transferencia se realizó a una membrana de nitrocelulosa (ÄmershamTM ProtranTM, GE Healthcare) utilizando un equipo de transferencia semi-seca (TE70 PWR, Amersham Biosciences) con buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 10% pH 8,3) a 150 mA durante 1 hora. Previo a bloquear *overnight* (ON) con BSA 5% a 4 °C, se procedió a cortar la membrana horizontalmente en función del peso molecular, de manera que el segmento superior contuviera a la MMP9 y el inferior a la GAPDH. Al día siguiente, luego de lavar 2 veces las membranas con PBS-Tween 0.2%, el segmento superior de membrana fue incubado con anticuerpo α -MMP9, y el inferior con anticuerpo α -GAPDH (Tabla 2) durante una 1 hora y media a temperatura ambiente. Luego de realizar 3 lavados con PBS-Tween 0.2%, se incubó el anticuerpo secundario correspondiente (ver Tabla 2), durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 0.2%, para luego agregar solución de revelado

quimioluminiscente (*ECLTM Western Blotting Detection Reagents*, GE Healthcare), la cual se dejó incubando por 1 minuto en oscuridad. Posteriormente se procedió a revelar con el equipo *ImageQuant LAS 500* (GE Healthcare).

Tabla 2: Anticuerpos y concentraciones utilizadas en *Western Blot*.

Anticuerpo primario	Empresa y n° catálogo	Concentración utilizada (mg/mL)	Anticuerpo secundario	Empresa y n° catálogo	Concentración utilizada (mg/mL)
α -MMP9 (IgG policlonal, generado en conejo)	ab38898 (Abcam)	2.5×10^{-3}	α -IgG conejo (IgG, generado en cabra)	ab205718 (Abcam)	1×10^{-3}
α -GAPDH (IgM monoclonal, generado en ratón)	G8795 (Sigma)	2×10^{-4}	α -IgM ratón (policlonal, generado en cabra)	A8786 (Sigma)	Dilución 1:1500

Ensayo de Formación de colonias

Las líneas celulares fueron recolectadas y dispensadas en placas de 100 mm estériles (500 células/placa) con medio completo e incubadas durante 11 días en estufa humidificada a 37°C con suministro de 5% de CO₂. Posteriormente, las colonias se tiñeron con solución de cristal violeta (cristal violeta 0.05% m/v, formaldehído 1%, metanol 1%, en PBS) y se la dejó actuar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se removió la solución de cristal violeta, se lavaron las placas con H₂O corriente, y se dejaron secar ON (*overnight*) para luego proceder a contar las colonias. Para el cálculo del número de colonias, se realizó el promedio entre las placas contadas.

Determinación de micrometástasis pulmonares

Para cuantificar las micrometástasis pulmonares, los ratones portadores de tumores de mama se sacrificaron aproximadamente a los 40 días post-inyección. Los pulmones de dichos ratones, así como de ratones controles (sin tumor), fueron extraídos, dispuestos

en placas con 3 mL de PBS estéril y disgregados mecánicamente. A continuación, se agregaron 30 mg de colagenasa tipo IV (Gibco) a cada muestra y se incubaron en agitación (150 RPM) durante 1 hora a 37°C. Luego, se centrifugaron a 1500 RPM y a 4°C durante 5 minutos, y los *pellets* se resuspendieron en 10 mL de PBS estéril. Posteriormente, se filtraron con filtros de 40 µm y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Luego de descartar el sobrenadante, se realizaron 2 lavados con medio completo. Descartado el sobrenadante, se agregó medio completo suplementado con tioguanina (60 µM, Sigma Aldrich) y luego se dispensó en placas de 6 pocillos estériles, realizando diluciones seriadas al medio. Luego de aproximadamente 15 días de incubación en estufa humidificada a 37°C y suministro de CO₂, se procedió a realizar la tinción de colonias celulares con Cristal Violeta como se mencionó para el ensayo anterior, corrigiendo el número de colonias por el factor de dilución del pocillo correspondiente, para luego realizar el promedio de los pocillos contados.

Proliferación de esplenocitos

Veinticuatro horas previo al sacrificio de los ratones portadores de tumores de mama, se realizó la incubación a 4°C de una placa de 96 pocillos sensibilizada con 100 µL por pocillo de α-CD3 (0.5 µg/mL) en PBS estéril. El día del sacrificio de los ratones, se retiró el bazo de los mismos y se los depositó en placas con 3 mL de medio completo (RPMI), para luego disgregarlos mecánicamente. Una vez culminada la disgregación, se centrifugaron a 1500 RPM durante 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos ACK (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA) por muestra y se lo dejó actuar durante 1 minuto. A continuación, se agregó PBS estéril para cortar la reacción de lisis celular y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Se retiró el sobrenadante y se realizó un nuevo lavado con PBS estéril. Los *pellets* obtenidos se resuspendieron en medio completo y las células se contaron y concentraron a 5x10⁶ células/mL. Posteriormente, se dispensaron 500000 células por pocillo en presencia o ausencia de α-CD3, y se agregaron 100 µL de anti-CD28 (1 µg/mL) diluido en medio completo a los pocillos con α-CD3, mientras que a los pocillos conteniendo esplenocitos sin estimular se les agregó 100 µL de medio completo. Ambas placas fueron incubadas en estufa humidificada a 37°C con suministro de CO₂ durante 4 días. El sobrenadante fue utilizado para evaluar los niveles de citoquinas por la técnica de ELISA *sandwich*.

Determinación de citoquinas por ELISA

Los niveles de IFN- γ , IL-17 e IL-10, se determinaron mediante la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) *sandwich*. En primer lugar, placas de 96 pocillos (NUNC F, Maxisorp) fueron sensibilizadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo de captura (Tabla 4) en buffer fosfato 100 mM pH 9. Para el caso particular de la evaluación de la citoquina IL-10, se utilizó buffer fosfato 0.2 M pH 6. Al siguiente día, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0.1%. Posteriormente, se bloqueó con solución de gelatina 1%, Tween 0.1% en PBS y se incubó la placa durante 1 hora a 37°C. Se realizaron 3 lavados, y se procedió a la incubación de las muestras durante 1 hora a 37°C (para el caso de IL-17 e INF- γ) o toda la noche a 4°C (para IL-10). La curva de calibración se realizó haciendo diluciones seriadas al medio de la citoquina recombinante correspondiente (Tabla 3). Luego de realizar 3 lavados, se añadió el anticuerpo de detección biotinilado correspondiente (Tabla 4) diluido en gelatina 0.5% en PBS-Tween 0.1%) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Transcurrido este tiempo se realizaron nuevamente 3 lavados y se agregó Streptavidin-HRP (N° catálogo 554066, BD Bioscience) diluida 1/1000 en PBS. A continuación, se realizaron 6 lavados y se procedió al revelado. Este consistió en una solución 0.5 g/L de o-Phenylenediamina dihydrochlorido (OPD) en buffer Citrato-Fosfato (0,1 M pH 5) con Peróxido de Hidrógeno 0,12%. La placa se incubó en la oscuridad hasta observar el desarrollo del color, momento en el cual se detuvo la reacción con H₂SO₄ 12,5% o HCl 3% y se realizó la lectura a 492 nm.

Tabla 3: Citoquinas y concentraciones utilizados en ELISA

Citoquina	Concentración (ng/ μ L)
IL-10	4.0
INF- γ	4.0
IL-17	2.0

Tabla 4: Anticuerpos y concentraciones utilizados en ELISA

Anticuerpo	Captura (mg/mL)	N° Catálogo	Biotinilado (mg/mL)	N° Catálogo
α -IL-10	2.66X10 ⁻³	551215 (BD Bioscience)	1.33X10 ⁻³	554423 (BD Bioscience)
α -INF- γ	1 X10 ⁻³	551309 (BD Bioscience)	5 X10 ⁻⁴	551506 (BD Bioscience)
α -IL-17	2.5 X10 ⁻³	555068(BD Bioscience)	1.25 X10 ⁻³	555067 (BD Bioscience)

Recuento leucocitario en sangre

Para cuantificar las poblaciones leucocitarias en sangre de los ratones *naïve* y portadores de tumor, se utilizó un analizador hematológico automático (BC-5000 Vet, Mindray). La sangre fue extraída de la vena mandibular, previo al sacrificio de los ratones y resuspendida en citrato de sodio 4%, para el posterior conteo.

Citometría de flujo

Los tumores se disgregaron mecánicamente y luego se les agregó colagenasa tipo IV (Gibco) a una concentración de 10 mg/mL y se incubó en agitación durante 1 hora a 37 °C. Luego, se pasaron las células por filtros de 40 µm, se centrifugaron a 1500 RPM durante 5 minutos a 4 °C y a los *pellets* se les agregó buffer ACK durante 1 minuto para lisar los glóbulos rojos. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS y finalmente las células fueron resuspendidas en medio RPMI con antibiótico y antimicótico (1% v/v). En este punto, se hizo una división de las células ya que a algunas les hicimos solo marcación membranaria y otras se evaluaron con anticuerpos contra blancos intracelulares. A estas últimas se les agregó brefeldina a una concentración final de 5 µg/mL y se las incubó a 4°C durante 6 horas previo a la marcación.

Para la marcación con los anticuerpos específicos contra blancos membranarios, primeramente, se dispensaron aproximadamente 200000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo cónico. Luego de haber sido centrifugadas a 2000 RPM durante 5 minutos a 4 °C, se agregó en cada pocillo 50 µL de la mezcla de anticuerpos membranarios (Tabla 5) en buffer FACS (2% FBS en PBS) y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Luego se realizaron dos lavados con buffer FACS, se resuspendieron las células en 200 µL de buffer FACS y se analizaron con un citómetro de flujo Accuri C6 Plus (BD Biosciences), adquiriendo 50000 eventos por muestra analizada.

Para el caso de la marcación intracelular, luego de dispensar las células en la placa, se realizó un lavado con buffer FACS, se continuó con el agregado y resuspensión en 50 µL por pocillo del buffer de fijación (Biolegend) y se dejó actuar por 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo, se realizaron 2 lavados con buffer permeabilizante (Permwash, Biolegend), se agregaron 50 µL de la mezcla de anticuerpos intracelulares (Tabla 5) diluidos en buffer de permeabilización y se los incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados, el primero con Permwash y el segundo con buffer FACS, para luego

resuspender finalmente las células en 200 μ L de buffer FACS. Posteriormente, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo utilizando un citómetro BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences), donde se adquirieron 50000 eventos por muestra analizada. Los datos se analizaron con el software *BD Accuri™ C6 Plus*.

Tabla 5: Anticuerpos utilizados para citometría de flujo

	Anticuerpo	Clon	[μ g/mL]
Membranarios	α -CD45	104	1.3 y 1.7
	α -CD11b	M1/70	0.4
	α -CD11c	N418	0.6
	α -MHC II	M5/114.15.2	0.25
	α -CD4	GK1.5	0.3
	α -CD 8	53-6.7	1
Intracelulares	α -IL-10	JES5-16E3	4
	α -IL-4	11B11	10
	α -IL-17	TC11-18H10.1	2
	α -Foxp3	FJK-16s	2

Evaluación de la actividad metaloproteasa

Para este ensayo se utilizó el kit *MMP Activity Assay Kit* (ab112147, Abcam) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó una placa de 96 pocillos negra con fondo transparente, donde se mezclaron 25 μ L de lisados proteicos (provenientes de tumores o de líneas celulares) con 25 μ L de 2 mM de APMA (4-aminophenilmercurico acetato) y se incubó por 2 horas a 37°C. Posteriormente, 50 μ L de *MMP red solution* (sustrato de la reacción) diluido 1/100 en *Assay Buffer* (buffer de reacción) se agregaron en cada pocillo y se cuantificó la fluorescencia (excitación/emisión = 540/590 nm) cada 5 minutos por un período de 95 minutos a temperatura ambiente utilizando el equipo *Varioskan Flash* (Thermo Scientific). La actividad metaloproteasa fue normalizada por la cantidad

de proteína presente en la muestra. Los resultados obtenidos se graficaron como las unidades de fluorescencia relativa por mg de proteína total en función del tiempo (minutos).

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el *software* Prism (Graph-Pad Prism 8.01). Se utilizó el *test* t de *student* no pareado o el ANOVA de una vía, para determinar la significancia de las diferencias entre grupos. Se consideró estadísticamente significativo un p valor de $p < 0.05$. Los datos son representativos de al menos dos experimentos individuales. Los asteriscos se correlacionan con la significancia del resultado, siendo * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ y $p < 0.0001$.

Resultados

1- Generación de un modelo que permita estudiar el papel de la MMP9 en células tumorales con O-glicosilación truncada (Tn⁺) utilizando la línea celular 4T1.

Como se mencionó en la introducción, a partir del estudio de *RNAseq* de las líneas 4T1-wt y Tn⁺, se obtuvieron diferencias en los niveles de expresión de la MMP9 entre las 2 líneas celulares, por lo que fue relevante confirmar este resultado utilizando otras estrategias. Por un lado, evaluamos la expresión génica de la *Mmp9*, y por otro lado los niveles proteicos mediante *Western blot*.

En relación a la evaluación de la expresión génica de *Mmp9* por RT-qPCR en ambas líneas celulares (Figura 11), la línea 4T1-Tn⁺ presentó mayores niveles de expresión respecto a la línea 4T1-wt. Por tanto, el análisis por RT-qPCR permite confirmar el resultado del estudio transcriptómico realizado por *RNAseq*.

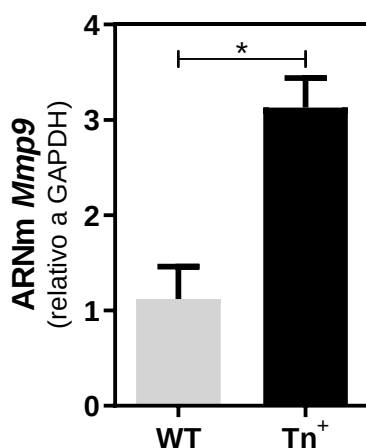


Figura 11: Expresión génica de la *Mmp9* en las líneas celulares 4T1-wt y Tn⁺ analizada mediante RT-qPCR. Los niveles de ARNm se normalizaron utilizando la expresión constitutiva del gen *Gapdh*. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Los asteriscos corresponden a las diferencias significativas, * $p < 0.05$, determinadas con un test t de student no pareado.

En relación a la evaluación de la expresión de la MMP9 en las células 4T1-wt y Tn⁺ por *Western Blot* (Figura 12), esta fue realizada a partir de lisados proteicos totales de las respectivas líneas celulares. La línea 4T1-Tn⁺ presentó mayores niveles de MMP9 activa que la línea 4T1-wt.

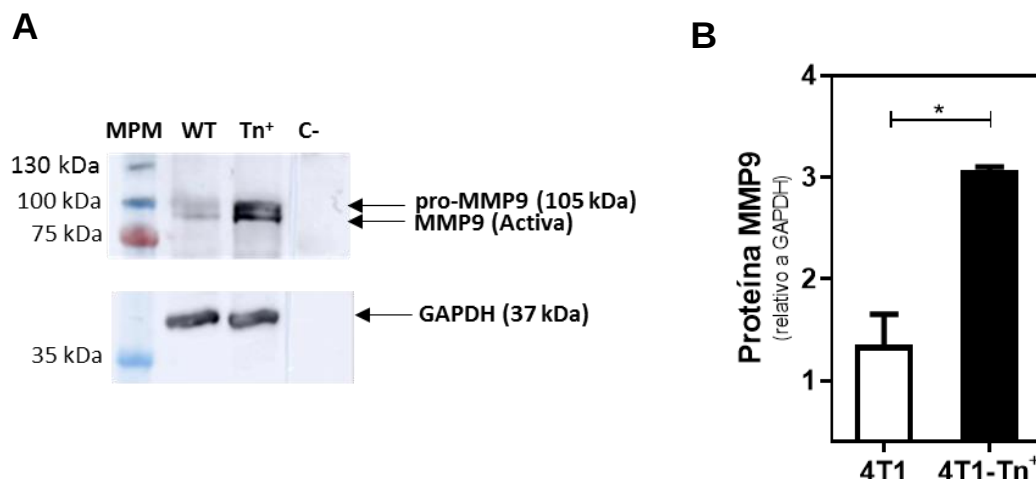


Figura 12: Análisis de los niveles proteicos de MMP9 en líneas tumorales 4T1 wt y Tn⁺.

Las muestras analizadas provienen de lisados totales de cada una de las líneas celulares celulares **(A)** Resultado de un *Western Blot* representativo revelado mediante quimioluminiscencia. **(B)** Cuantificación correspondiente a la MMP9 activa, utilizando *ImageJ*. Para normalizar la expresión de la MMP9 se utilizó GAPDH por ser una proteína de expresión constitutiva. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado con un test t de student no pareado con * $p < 0.05$.

En su conjunto, los resultados indican mayores niveles de MMP9 tanto a nivel transcripcional como proteico en la línea 4T1-Tn⁺ respecto a la línea wt, resultado que nos permitió continuar en generar un modelo que nos permitiera evaluar el papel de la MMP9 en células tumorales con *O*-glicosilación truncada. Para esto, utilizamos el sistema CRISPR/Cas9 dirigido a secuencias específicas del gen de la *Mmp9* con el fin de anular su expresión o función. Para ello, las células 4T1 Tn⁺ se transfectaron con ARN guías que permitieran la generación de un corte doble hebra en el gen *Mmp9*. La identificación de los clones que lograron incorporar el plásmido fue posible gracias a la presencia del gen reportero GFP. El aislamiento de los clones GFP⁺ fue realizado por citometría de flujo mediante *Single Cell Deposition* (Figura 13). A continuación, los clones obtenidos fueron expandidos y los denominamos Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3.

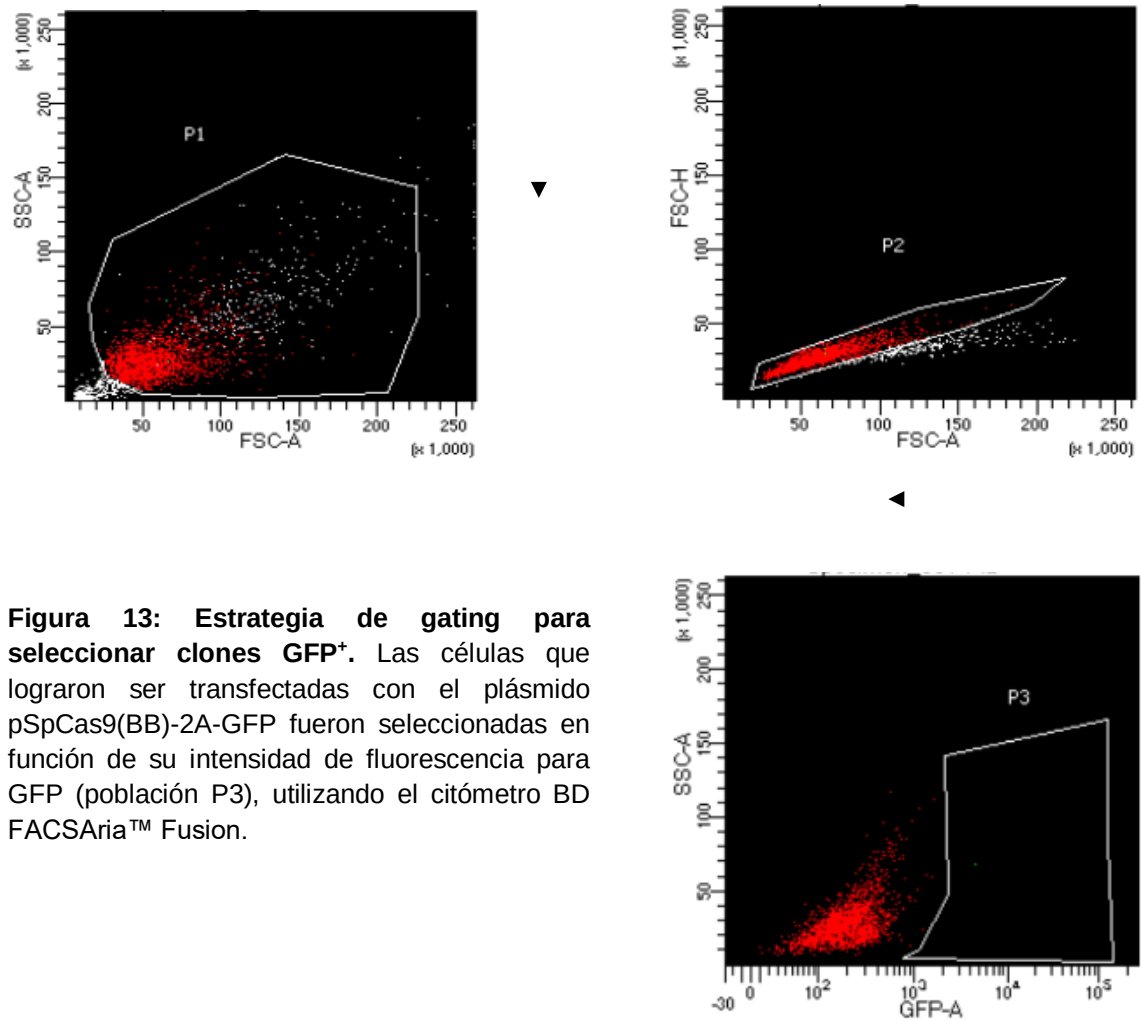


Figura 13: Estrategia de gating para seleccionar clones GFP⁺. Las células que lograron ser transfectadas con el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP fueron seleccionadas en función de su intensidad de fluorescencia para GFP (población P3), utilizando el citómetro BD FACSAria™ Fusion.

Posteriormente, analizamos los niveles de expresión génica y proteicos de MMP9 en los clones obtenidos Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3 (Figuras 14 y 15).

2- Evaluación de los niveles de MMP9 en los clones obtenidos respecto a las células tumorales Tn⁺, por RT-qPCR y *Western blot*.

Cuando se cuantificó la expresión génica relativa del gen *Mmp9* por RT-qPCR (Figura 14), se obtuvo una baja significativa en el clon Tn⁺/C12, respecto al clon parental Tn⁺.

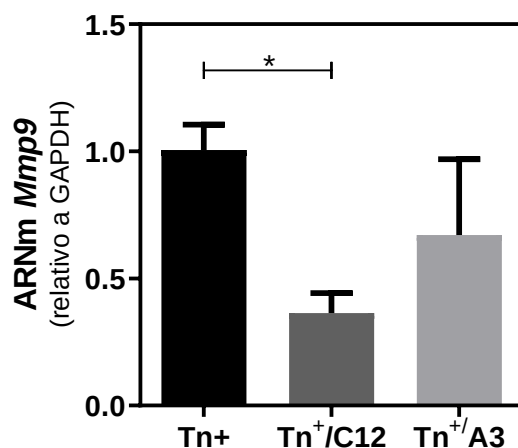


Figura 14: Screening por RT-qPCR de la expresión de Mmp9 de los clones candidatos 4T1 Tn⁺ /MMP9⁻. Los niveles de ARN-m se normalizaron utilizando la expresión constitutiva del gen *Gapdh*. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado con un test t de student no pareado con * p<0.05.

En cuanto a la evaluación de los niveles proteicos de MMP9 activa por *Western blot* (Figura 15), ambos clones presentaron una baja significativa respecto al clon parental Tn⁺. Es importante aclarar que en cada carril se sembró un pool de lisados celulares, por tanto, cada muestra es heterogénea y representativa.

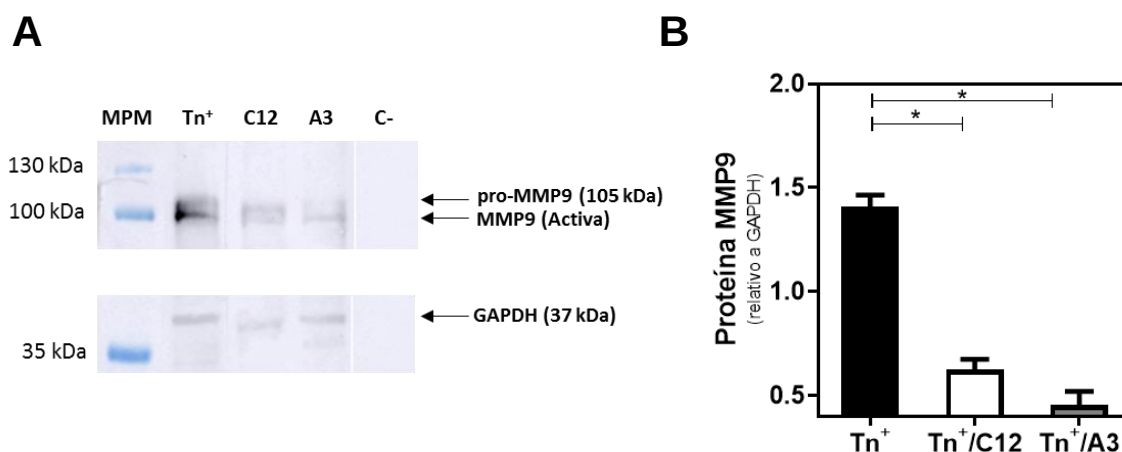


Figura 15: Screening por Western blot de la expresión de la MMP9 de los clones candidatos 4T1 Tn⁺ /MMP9⁻. Las muestras analizadas provienen de lisado de células 4T1 Tn⁺, 4T1 Tn⁺/C12 y 4T1 Tn⁺/A3. **(A)** Resultado representativo de un *Western Blot* revelado mediante quimioluminiscencia **(B)** Cuantificación correspondiente al ensayo, utilizando el software *ImageJ*. Para normalizar la expresión de la MMP9 activa se utilizó GAPDH por ser una proteína de expresión constitutiva. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado con un *test t de student* no pareado con * p<0.05.

Resultados

A continuación, realizamos la inyección de las líneas celulares en estudio en la mama de ratones hembra BALB/c para generar tumores y proceder al estudio de los niveles de expresión de la MMP9 en los mismos. Los niveles de expresión de la MMP9 en los tumores fueron nuevamente evaluados por RT-qPCR (Figura 16) y por *Western Blot* (Figura 17).

Como se puede observar en la Figura 16, los tumores generados por ambos clones obtenidos en el presente trabajo, presentaron menores niveles de ARNm correspondiente a la *Mmp9* respecto a los tumores 4T1 Tn⁺.

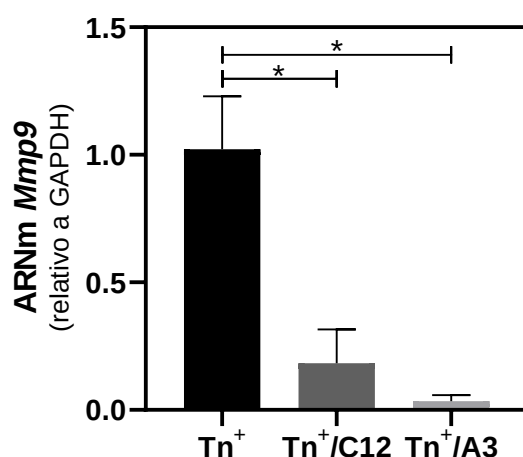


Figura 16: Evaluación de la expresión génica de *Mmp9* en tumores generados a partir de la inyección de los clones Tn⁺, Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3 en la mama de ratones BALB/c. Los niveles de ARNm se normalizaron utilizando la expresión constitutiva del gen *Gapdh*. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado con un análisis ANOVA de una vía con * $p < 0.05$.

Adicionalmente, se pudo evidenciar una baja significativa en los niveles proteicos de MMP9 proveniente de tumores derivados de los clones Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3, respecto a los generados por la línea parental 4T1 Tn⁺ (Figura 17).

En conclusión, tanto los lisados celulares como los lisados tumorales de los clones obtenidos, presentaron menores niveles de MMP9, respecto a la línea parental Tn⁺.

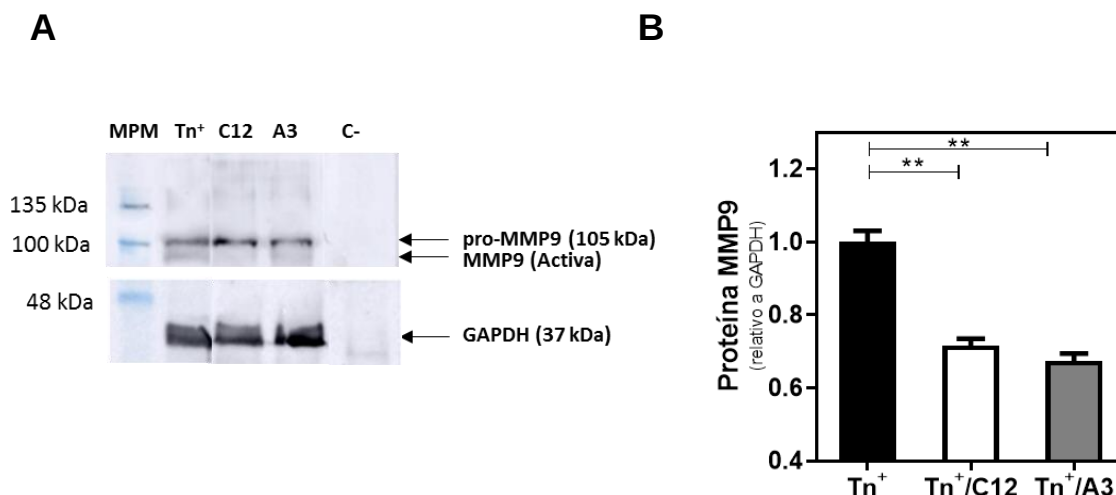


Figura 17: Expresión proteica de MMP9 en tumores generados a partir de la inyección de los clones 4T1 Tn⁺, Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3 en la mama de ratones BALB/c. Las muestras analizadas provienen de lisados tumorales. **(A)** Resultado de un *Western Blot* representativo revelado mediante quimioluminiscencia. **(B)** Cuantificación correspondiente a la MMP9 activa, utilizando *ImageJ*. Para normalizar la expresión de la MMP9 se utilizó GAPDH por ser una proteína de expresión constitutiva. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado con un test t de student no pareado con * $p < 0.05$.

3- Evaluación del impacto de la MMP9 en la progresión tumoral a través de la determinación del crecimiento tumoral y el análisis de micrometástasis pulmonares en ratones inoculados con las células 4T1-Tn⁺ y los clones obtenidos.

Un aspecto crucial al estudiar la agresividad de una línea celular es el crecimiento tumoral. Previamente, nuestro grupo de trabajo comprobó que la línea 4T1-Tn⁺ genera tumores de mayor tamaño que la 4T1-wt (Festari *et al.* 2022).

En el presente trabajo, observamos que los clones obtenidos Tn⁺/A12 y Tn⁺/A3, los cuales presentan menores niveles de MMP9 en relación al clon parental Tn⁺; generaron tumores con un tamaño significativamente menor que los derivados de la línea Tn⁺ previo al sacrificio (Figura 18), lo que estaría indicando que ambos clones celulares

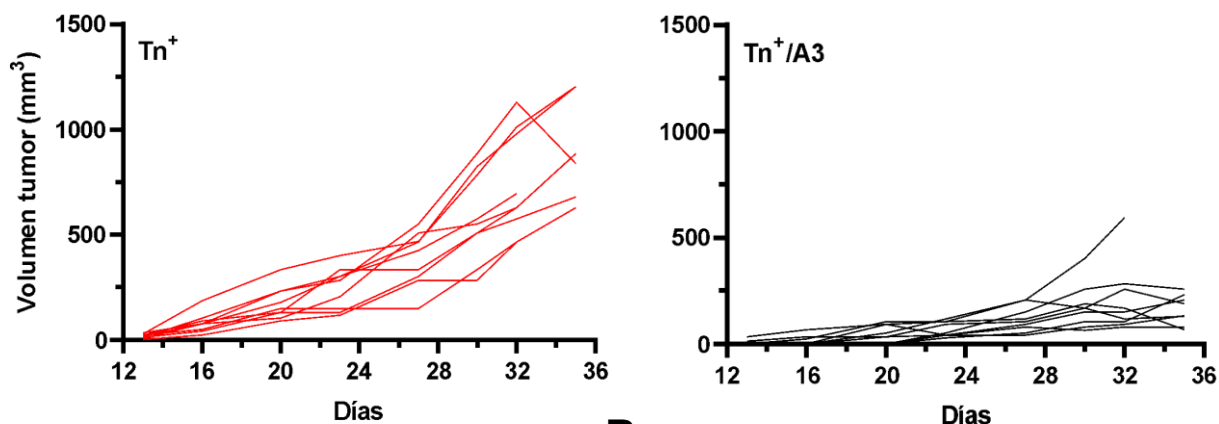
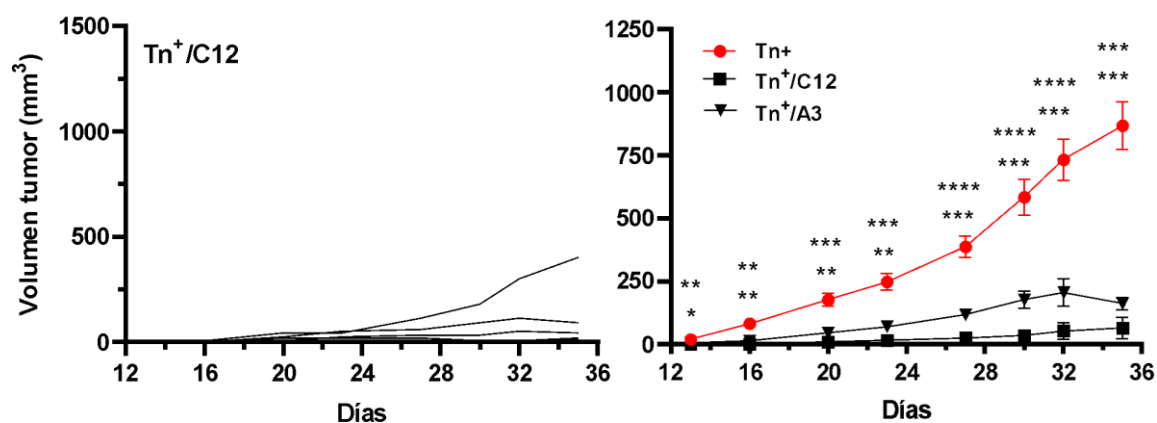
A**B**

Figura 18: Evaluación del crecimiento tumoral en ratones inoculados con células 4T1 Tn⁺, Tn⁺/A3 y Tn⁺/C12. Para este ensayo se inyectaron subcutáneamente 70000 células tumorales en la cuarta mama derecha de ratones hembra BALB/c al día cero. Luego se midió periódicamente el tamaño tumoral utilizando un calibre y se calculó el volumen tumoral. Se muestran los resultados correspondientes a uno (n=9 para cada línea celular) de tres experimentos independientes. **(A)** Crecimiento tumoral individual para cada grupo de ratones. **(B)** Promedio del crecimiento tumoral para cada grupo de ratones. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Los asteriscos corresponden a diferencias significativas entre el grupo Tn⁺ y Tn⁺/C12 (asteriscos superiores) y el grupo Tn⁺ y Tn⁺/A3 (asteriscos inferiores). Análisis estadístico determinado por un análisis ANOVA de dos vías con * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

presentaron una menor agresividad que la línea Tn⁺ y que la MMP9 podría estar mediando este comportamiento.

En particular, el clon Tn⁺/C12 fue el que generó tumores con menor crecimiento a lo largo del tiempo en los tres experimentos realizados de forma independiente. Los

Resultados

tumores generados por el clon $Tn^+/A3$ también exhibieron menor crecimiento en la totalidad de los experimentos en comparación a la línea Tn^+ , aunque su disminución no fue tan marcada como lo que se observó para el clon $Tn^+/C12$.

A continuación, se realizaron dos estrategias complementarias para evaluar la capacidad metastásica de los clones obtenidos: por un lado, realizamos un ensayo de formación de colonias *in vitro* y luego el estudio de las micrometástasis pulmonares *in vivo*.

El ensayo de formación de colonias permite evaluar la habilidad de una célula de sufrir divisiones en forma ilimitada (Franken *et al.* 2006). Los resultados que se muestran en la Figura 18 demuestran que las células Tn^+ presentan mayor capacidad de crecer y formar colonias en las condiciones ensayadas y que dicha capacidad se ve afectada cuando la MMP9 se encuentra disminuida. En particular, los clones $Tn^+/C12$ y $Tn^+/A3$ presentaron una considerable reducción de esta capacidad, tanto respecto a la línea Tn^+ como a la wt.

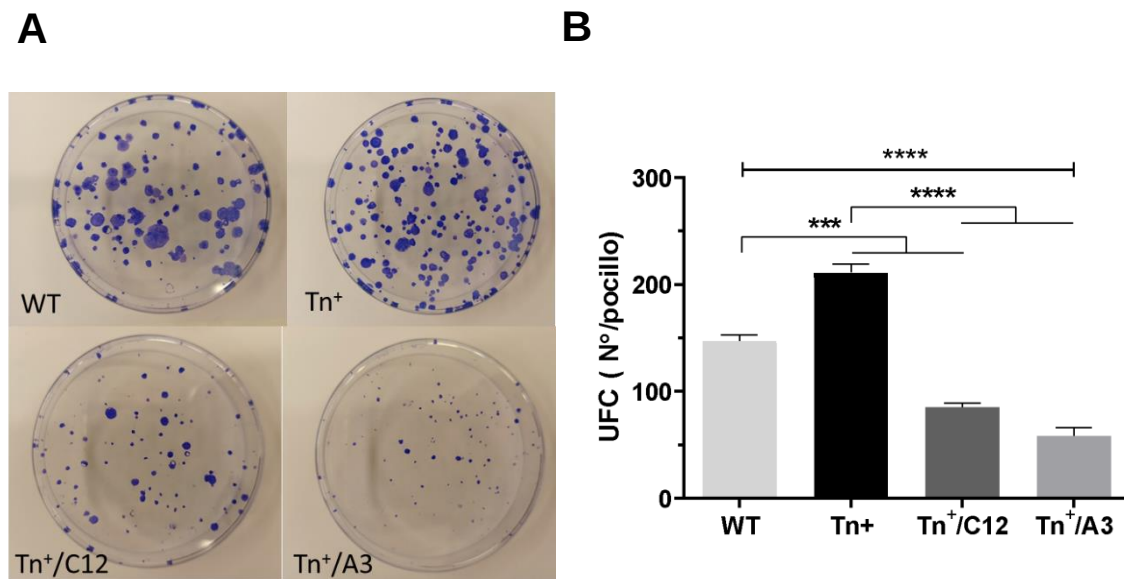


Figura 19: Ensayo de formación de colonias de las células 4T-wt, Tn^+ , $Tn^+/A3$ y $Tn^+/C12$.

Se dispensaron 500 células en placas estériles de 100 mm (por triplicado) y se incubaron en medio completo durante 11 días a 37°C. Las colonias se visualizaron por tinción con cristal violeta. **(A)** Imágenes representativas de las placas obtenidas para cada uno de los clones estudiados. **(B)** Se representa el promedio de las unidades formadoras de colonias para cada grupo. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado por un análisis ANOVA de una vía con * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Resultados

El segundo ensayo que realizamos aborda el papel de la MMP9 en procesos metastásicos (Figura 20). Particularmente, se evaluó el desarrollo de micrometástasis a nivel pulmonar, ya que es el sitio primario de metástasis en el cáncer de mama y en particular en el modelo 4T1 (Pulaski y Ostrand-Rosenberg 1998). Como las células 4T1 son resistentes a la droga 6-tioguanina (droga citotóxica) (Pulaski y Ostrand-Rosenberg 1998), las micrometástasis a diferentes órganos se puede cuantificar fácilmente al incubar las células provenientes del órgano en estudio en un medio conteniendo dicha droga.

Para este ensayo se plaquearon células provenientes de los pulmones de los ratones que habían generado tumores mamarios luego de inyectarles las diferentes líneas celulares y estas se incubaron durante 15 días aproximadamente en presencia de la droga citotóxica. Transcurrido dicho tiempo, las células tumorales se tiñeron con cristal violeta para su cuantificación.

En la Figura 20 se muestra el resultado de uno de dos experimentos, donde se observa que los animales inyectados con la línea celular Tn^+ presentaron un nivel alto de micrometástasis, mientras que en aquellos inoculados con los clones $Tn^+/C12$ y $Tn^+/A3$ el fenómeno fue visiblemente menor o incluso no ocurrió.

Particularmente, el clon $Tn^+/C12$ se asoció con niveles detectables de micrometástasis mientras que el clon $Tn^+/A3$, con niveles considerablemente menores que los obtenidos con la línea Tn^+ . El resultado obtenido a partir de este ensayo sugiere la importancia de la MMP9 en relación al potencial metastásico de las células tumorales 4T1 Tn^+ .

En conclusión, en esta sección se evaluó el crecimiento tumoral y se realizaron dos ensayos (*in vitro* e *in vivo*) para estudiar la capacidad de formar colonias y la capacidad metastásica de las líneas tumorales generadas, encontrando estos tres parámetros disminuidos en los clones obtenidos.

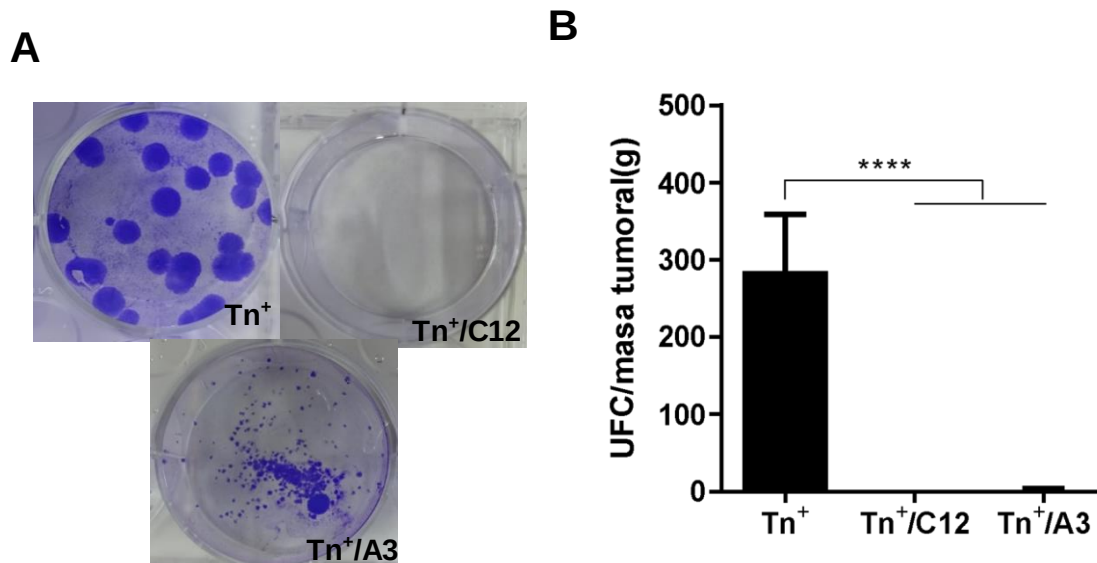


Figura 20: Evaluación de la capacidad metastásica in vivo de las líneas 4T1-Tn⁺, Tn⁺/A3 y Tn⁺/C12 -mediante la cuantificación de micrometástasis clonogénicas en pulmón. Los ratones fueron inyectados como se indicó en la Figura 17. Entre el día 35 y 40 post-inyección, se procedió a sacrificar los ratones y remover, disociar y cultivar los pulmones en presencia de 6-tioguanina (60 μ M), de forma de poder así determinar el número de colonias metastásicas. Luego de aproximadamente 15 días de incubación en estufa humidificada a 37°C y con suministro de CO₂, se procedió a realizar la tinción de colonias celulares con Cristal Violeta **(A)** Imágenes representativas del número de colonias obtenidas para el clon Tn⁺ y para los clones Tn⁺/A3 y Tn⁺/C12. **(B)** Resultados de dos experimentos independientes, dónde el número de colonias tumorales fue cuantificado y normalizado por el peso tumoral. Cada grupo estuvo compuesto por al menos 5 ratones. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado por un análisis ANOVA de una vía con ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

4- Análisis de diversos componentes del sistema inmune, tanto local como sistémicamente, en ratones portadores de tumores derivados de las diferentes líneas celulares estudiadas.

Para analizar la respuesta inmune sistémica es clave saber cuáles son las poblaciones leucocitarias presentes en la sangre de los ratones a los que les generamos tumores, así como también estudiar órganos como el bazo que representa un repositorio de linfocitos T y B.

Para abordar el primer punto, se extrajo sangre de la vena mandibular de ratones inyectados con las diferentes líneas 4T1 en estudio, y se realizó un recuento leucocitario

Resultados

de la misma (Figura 20). Los controles correspondieron a sangre de ratones no inoculados con células tumorales. En la Figura 20 se puede observar una disminución en la concentración sanguínea de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos en los ratones inoculados con las líneas celulares Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3, respecto al grupo Tn⁺. El grupo control (*naïve*) fue el que presentó en gran medida el menor número de todas estas poblaciones leucocitarias.

Por otra parte, al estudiar la distribución porcentual de dichas poblaciones celulares observamos que cada grupo de ratones evaluados presentó una distribución distinta (Figura 20B). Sin embargo, para todos los grupos, la suma de las frecuencias correspondientes a neutrófilos y linfocitos representaron más de un 80% de los leucocitos analizados. En este sentido, el grupo Tn⁺ fue el que presentó la mayor proporción de neutrófilos, en oposición al grupo *naïve*, que presentó el menor porcentaje de dichas células. Contrariamente, el grupo *naïve* presentó la mayor representación de linfocitos en sangre, mientras que el grupo Tn⁺ presentó la frecuencia más baja de estas células en relación a los demás grupos.

Teniendo en cuenta estas observaciones, encontramos que la relación neutrófilo/linfocito es la que se vio más afectada al comparar los distintos grupos evaluados. De hecho, los ratones inyectados con los clones Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3 fueron los que presentaron una relación neutrófilo/linfocito menor en relación a los inyectados con el clon Tn⁺, asemejándose al patrón de los ratones control.

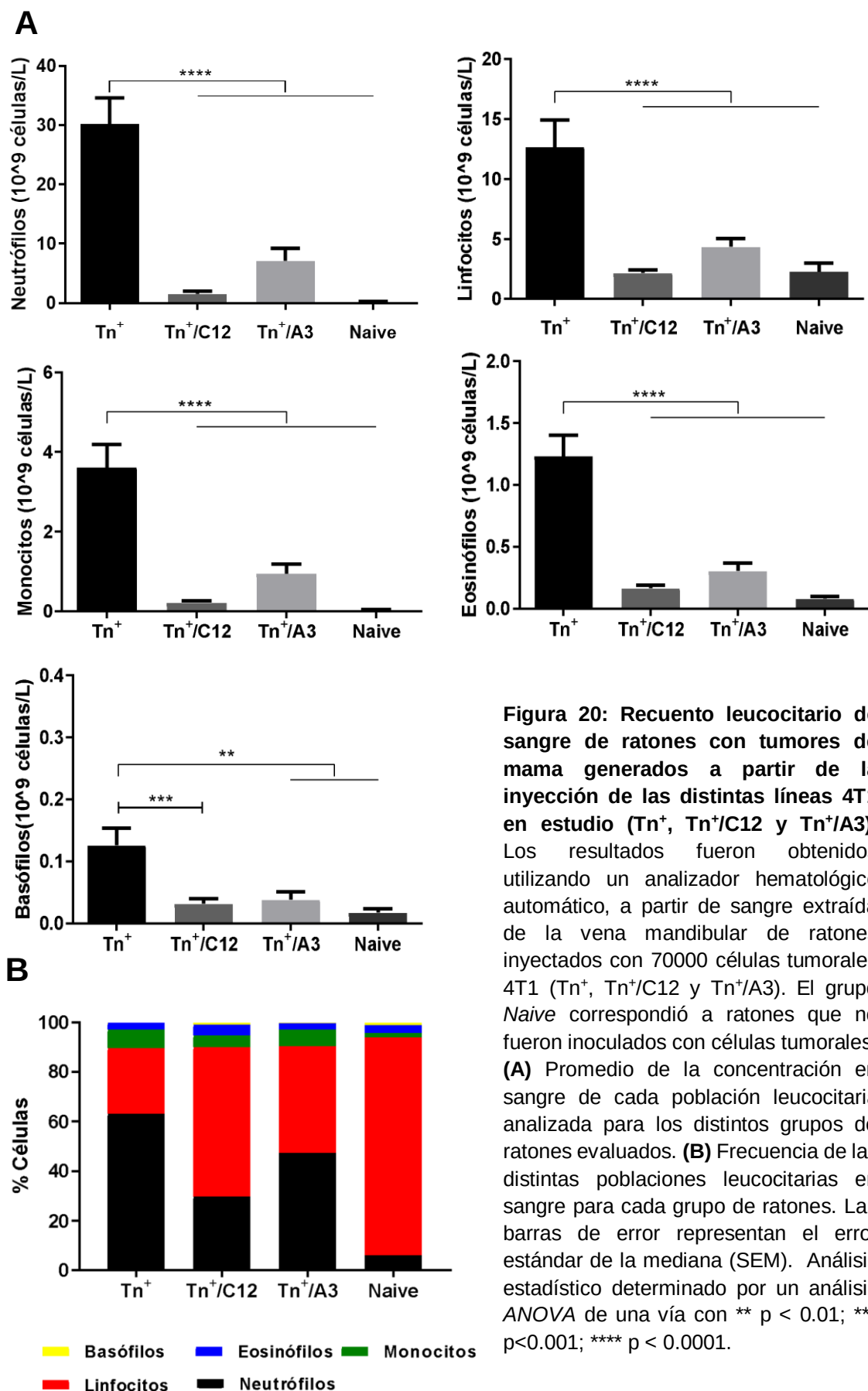


Figura 20: Recuento leucocitario de sangre de ratones con tumores de mama generados a partir de la inyección de las distintas líneas 4T1 en estudio (Tn⁺, Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3). Los resultados fueron obtenidos utilizando un analizador hematológico automático, a partir de sangre extraída de la vena mandibular de ratones inyectados con 70000 células tumorales 4T1 (Tn⁺, Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3). El grupo *Naive* correspondió a ratones que no fueron inoculados con células tumorales. **(A)** Promedio de la concentración en sangre de cada población leucocitaria analizada para los distintos grupos de ratones evaluados. **(B)** Frecuencia de las distintas poblaciones leucocitarias en sangre para cada grupo de ratones. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado por un análisis ANOVA de una vía con ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Con el fin de caracterizar aún más el *estatus* inmunitario a nivel sistémico de los ratones con tumores mamarios generados con las diferentes líneas en estudio, se realizó un ensayo de proliferación de esplenocitos que brinda información sobre la polarización de los linfocitos T en el bazo. Para ello, cultivamos durante 4 días células provenientes del bazo de los ratones inoculados con las células en estudio, en presencia o ausencia de un estímulo policlonal de linfocitos T (anticuerpos α -CD3 y α -CD28) y luego se evaluaron los niveles de citoquinas (IFN- γ , IL-17 e IL-10) presentes en el sobrenadante de cultivo por ELISA (Figura 21). Los ratones portadores de tumores Tn⁺/A3 presentaron mayor capacidad de producir IFN- γ respecto a los ratones portadores de tumores Tn⁺, a nivel del bazo (Figura 21). Sin embargo, este efecto no se observó para el caso de la citoquina IL-17. A su vez, los sobrenadantes de esplenocitos correspondientes a los ratones portadores de tumores Tn⁺/C12 presentaron mayor capacidad de producir IL-10, respecto a los ratones portadores de tumores Tn⁺ (Figura 21).

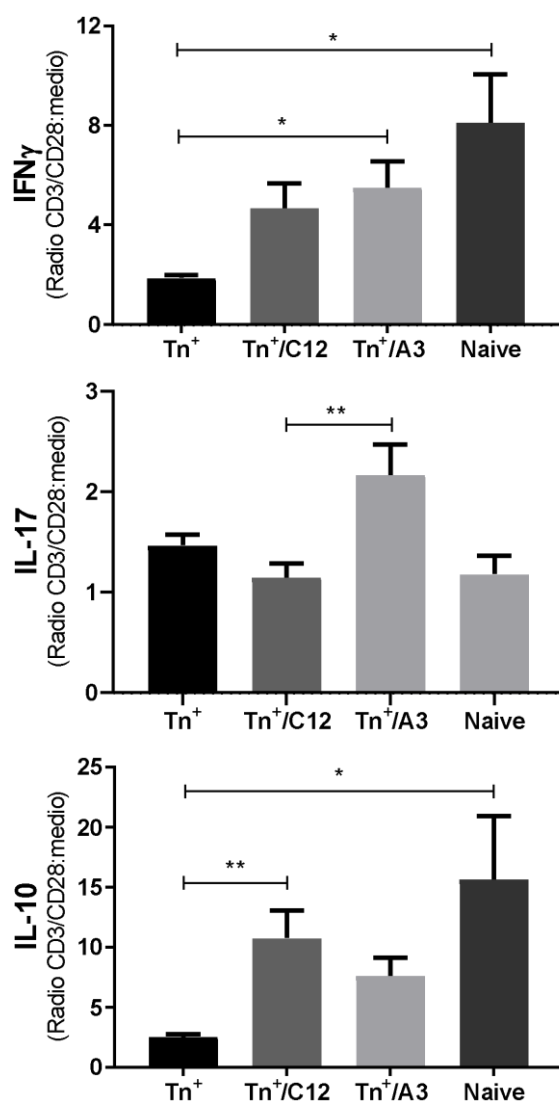


Figura 21: Evaluación de la producción de citoquinas por esplenocitos provenientes de ratones con tumores de mama generados por la inyección de las diferentes líneas 4T1 en estudio (Tn⁺, Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3). Los ratones BALB/c inyectados con células tumorales 4T1 (Tn⁺, Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3) fueron sacrificados al día 35 post inyección. El grupo *Naive* corresponde a ratones que no fueron inoculados con células tumorales. En el día del sacrificio, se extrajeron los bazos de los ratones y se disgregaron para obtener una suspensión celular de esplenocitos, los que se cultivaron durante 4 días en presencia o ausencia de estímulos policlonales de linfocitos T. Se muestran los niveles de IFN- γ , IL-17 e IL-10 (evaluados por ELISA *sándwich*) presentes en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos (radio entre condición con estímulo/ sin estímulo policlonal). Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado por un análisis ANOVA de una vía con * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Con el fin de obtener mayor información a partir de los datos obtenidos, se procedió a estudiar la proporción relativa de las citoquinas evaluadas. Para ello se realizaron los cocientes entre las absorbancias obtenidas para cada citoquina, como se indica en la Figura 23.

Se observó que los esplenocitos derivados de los animales inoculados con los clones Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3 presentaron una proporción menor de IL-17 respecto a los niveles de IL-10, en comparación al grupo Tn⁺. Por otra parte, los esplenocitos de los animales inoculados con el clon Tn⁺/C12 presentaron mayores niveles de IFN- γ en relación a los niveles de IL-17, respecto al grupo Tn⁺. En conclusión, los esplenocitos derivados de los animales inoculados con Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3 se caracterizan por una producción de citoquinas diferente a la del clon Tn⁺ al ser estimulados policlionalmente.

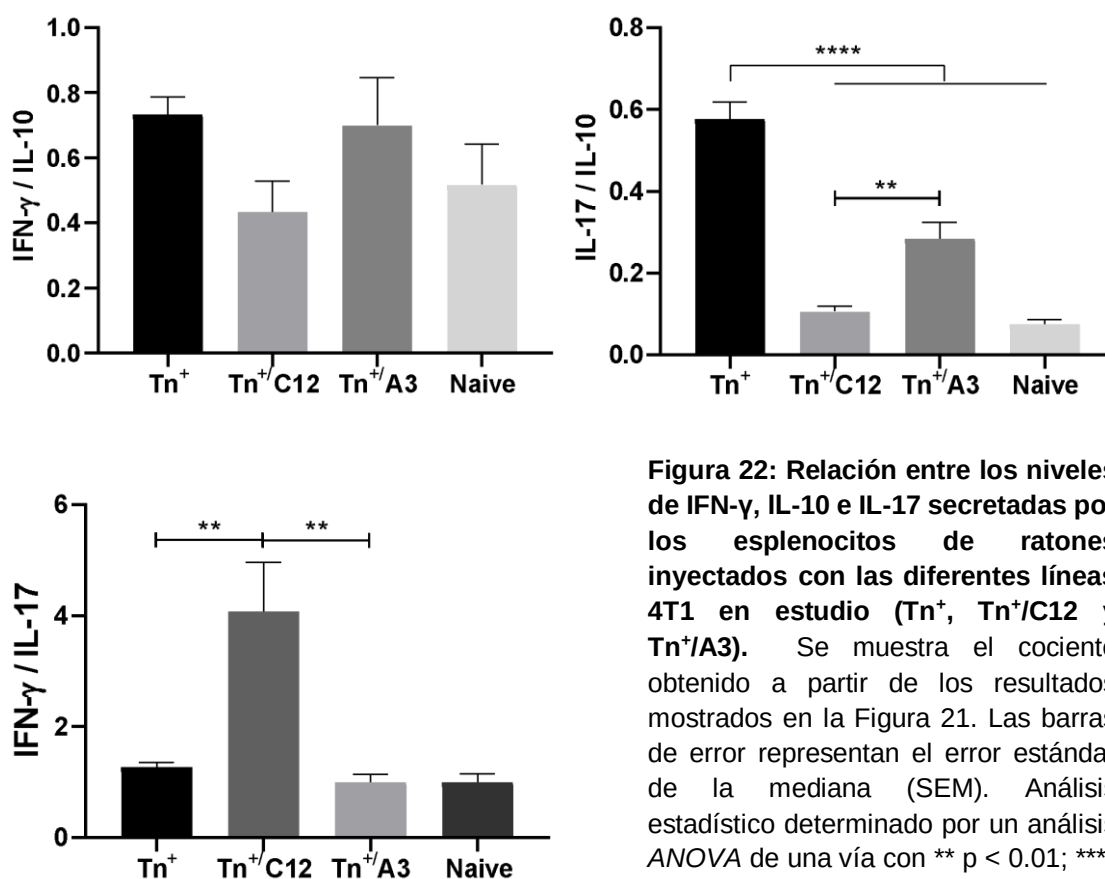
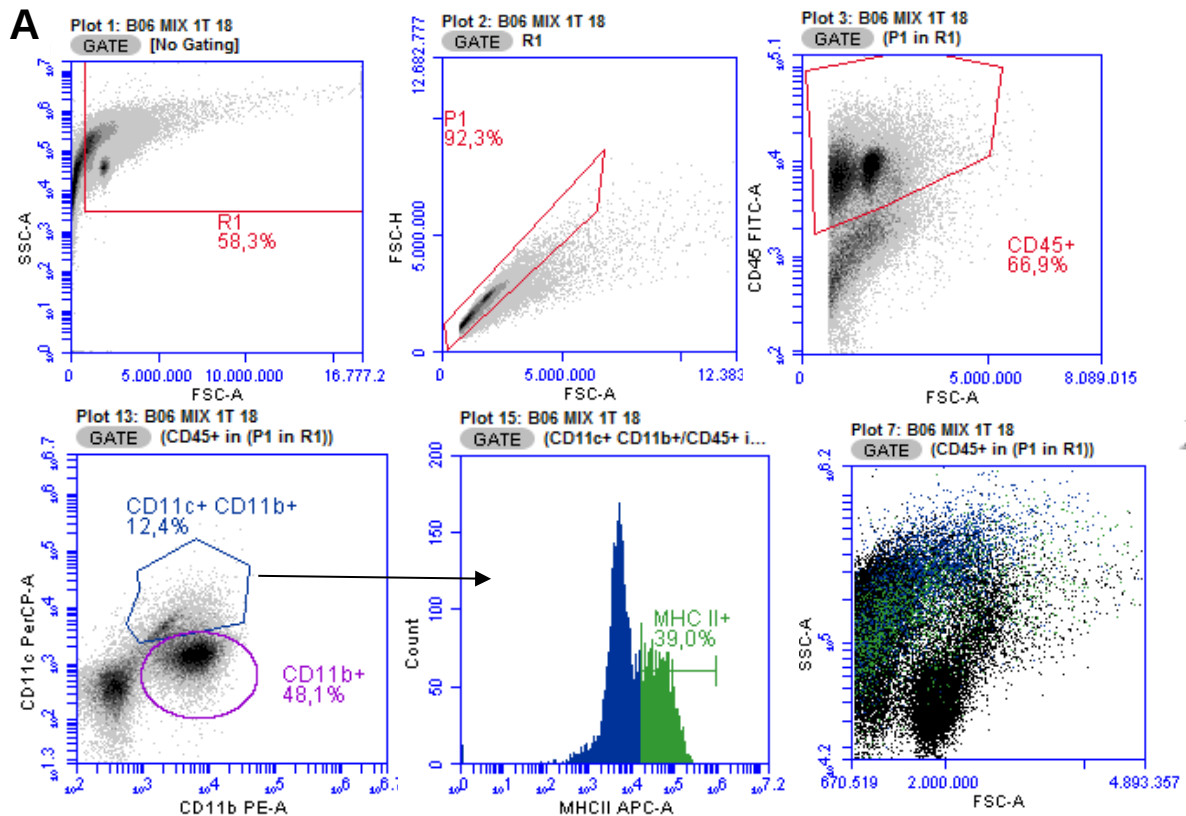


Figura 22: Relación entre los niveles de IFN- γ , IL-10 e IL-17 secretadas por los esplenocitos de ratones inyectados con las diferentes líneas 4T1 en estudio (Tn⁺, Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3). Se muestra el cociente obtenido a partir de los resultados mostrados en la Figura 21. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado por un análisis ANOVA de una vía con ** p < 0.01; **** p < 0.0001.

Para evaluar si los clones obtenidos en el presente trabajo presentaban una capacidad distinta para modular el infiltrado leucocitario, particularmente a nivel del microambiente tumoral, se realizó el análisis por citometría de flujo de las diferentes poblaciones inmunes en los tumores generados a partir de la inyección de las líneas celulares 4T1 en ratones BALB/c. Particularmente, buscamos estudiar poblaciones mieloides presentadoras de antígeno, así como poblaciones linfocitarias reguladoras. Para el primer caso, se evaluaron las poblaciones CD11b⁺ y CD11c⁺ (que podrían corresponder a células dendríticas de origen mieloide) dentro de la población CD45⁺ (leucocitos). Adicionalmente, se analizó la expresión de MHCII por estas células, fundamental para la presentación de antígenos (Cabeza-Cabrerizo *et al.* 2021). En la Figura 23A se muestra gráficamente la estrategia de *gating* utilizada en la citometría de flujo para seleccionar las poblaciones de interés.

No se detectaron diferencias entre los grupos estudiados en la frecuencia de células CD45⁺ en el tumor. Lo mismo sucedió para aquellas células CD11c⁺CD11b⁺ dentro de la población CD45⁺ (Figura 23B). Sin embargo, se observó un aumento de la población MHCII⁺/CD11c⁺CD11b⁺ en los ratones con tumores provenientes de los clones Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3 en relación a los ratones inyectados con células tumorales Tn⁺. Además, se detectaron mayores niveles de MHCII en la población CD11c⁺CD11b⁺ proveniente del infiltrado tumoral de los ratones con tumores Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3, en comparación con Tn⁺ (Figura 23C).



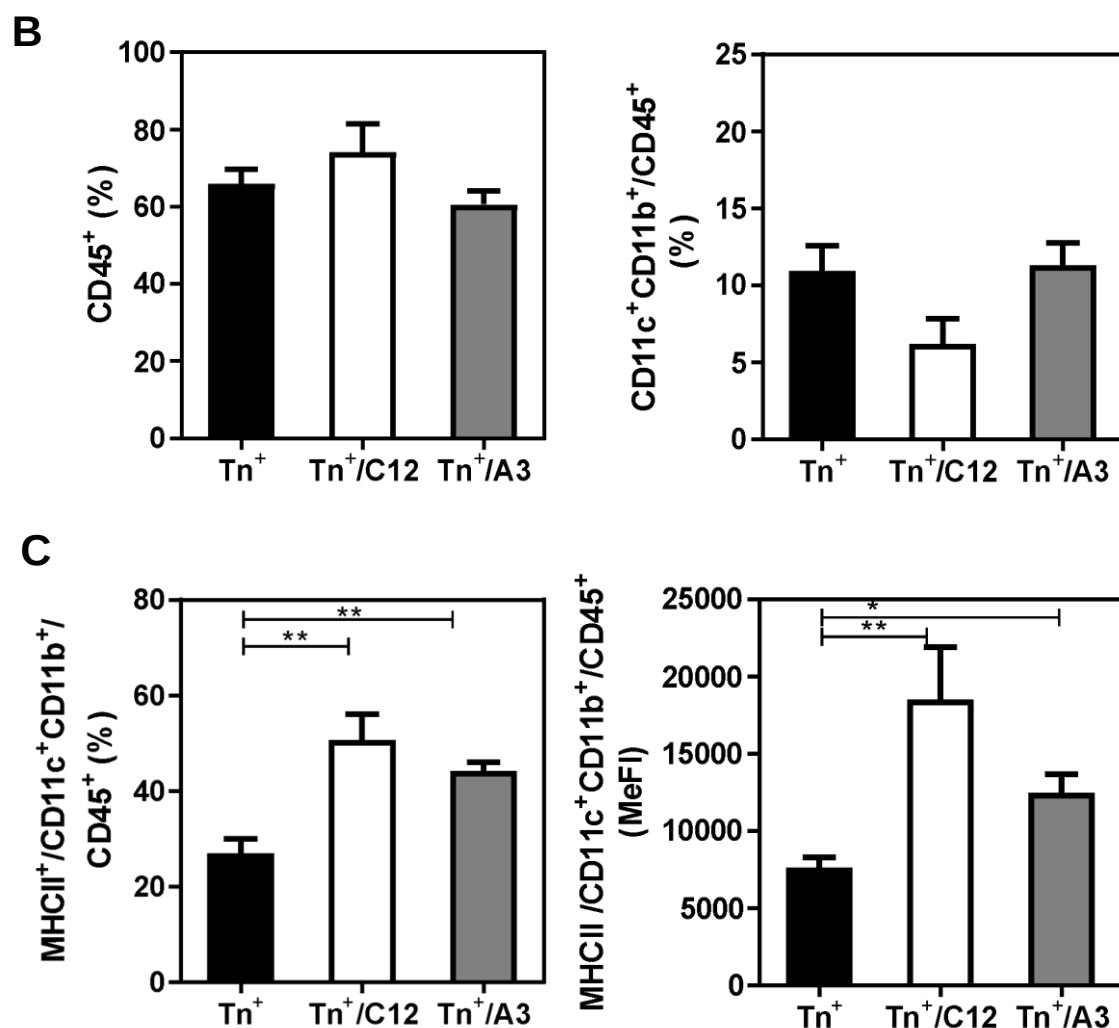
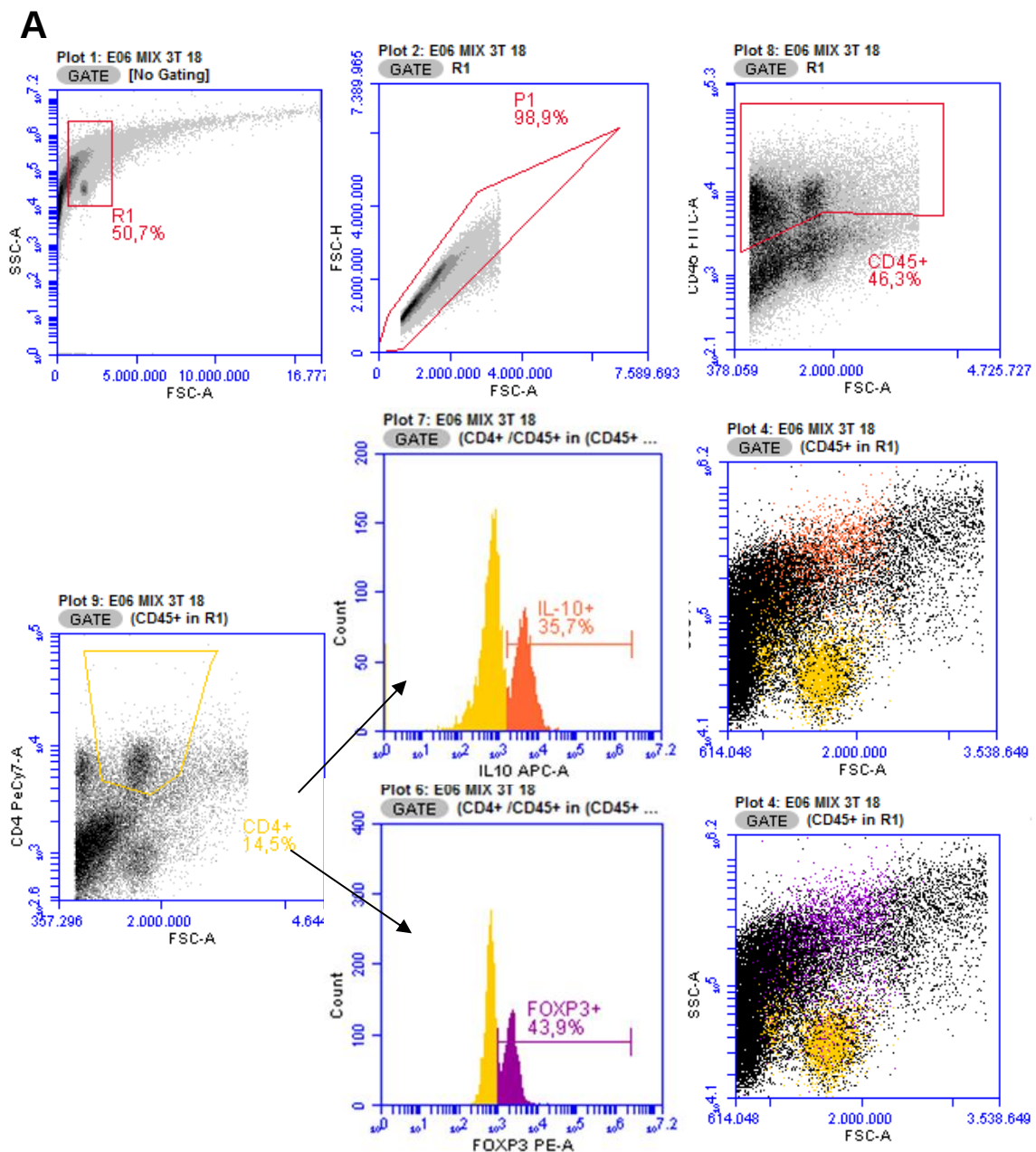


Figura 23: Análisis de poblaciones celulares mieloides presentadoras de antígeno en el microambiente tumoral por citometría de flujo. Los ratones con tumores de mama generados por la inyección de células 4T1 Tn⁺, Tn⁺/C12, o Tn⁺/A3, fueron sacrificados al día 42 post-inyección para extraer los tumores para su posterior análisis por citometría de flujo. **(A)** Estrategia de *gating* utilizada. En primer lugar, se seleccionó la población CD45⁺, luego dentro de la misma se seleccionó la población CD11b⁺CD11c⁺. **(B)** Frecuencia de las poblaciones analizadas. Se muestra el porcentaje de células CD45⁺ en relación a las células totales presentes en el microambiente tumoral y el porcentaje de células CD11b⁺CD11c⁺ en la población CD45⁺. **(C)** Frecuencia y mediana de intensidad de fluorescencia (MeFI) de células MHCII⁺ en la población CD11b⁺CD11c⁺. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado por un análisis ANOVA de una vía con * p < 0.05, ** p < 0.01.

Por otra parte, el estudio de poblaciones linfocitarias reguladoras se abordó a partir del análisis de dos combinaciones de marcadores. Por un lado, se estudiaron las células Foxp3⁺, dentro de una población CD4⁺/CD45⁺; y en forma paralela, se estudiaron las células IL-10⁺, dentro de una población CD4⁺/CD45⁺ (Figura 24A). Foxp3 es un factor de transcripción que se encuentra particularmente aumentado en ciertas poblaciones de

linfocitos T reguladores y su acción pone en marcha un programa funcional que le confieren a los linfocitos T reguladores sus capacidades supresoras. Por otra parte, la secreción de IL-10 por parte de los linfocitos T reguladores es uno de los mecanismos por el cual estos ejercen sus capacidades supresoras (Lu, Barbi, y Pan 2017).

En primer lugar, no se observaron diferencias en la frecuencia de células $CD4^+/CD45^+$, las cuales serán referenciadas como linfocitos T $CD4^+$ (Figura 24B). Sin embargo, el porcentaje de células $Foxp3^+$ o $IL-10^+$ en esta población sí se encontró modificado. Particularmente, se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos T $CD4^+Foxp3^+$ y linfocitos T $CD4^+IL-10^+$ en aquellos ratones con tumores provenientes del clon $Tn^+/C12$, en relación a los ratones con tumores Tn^+ .



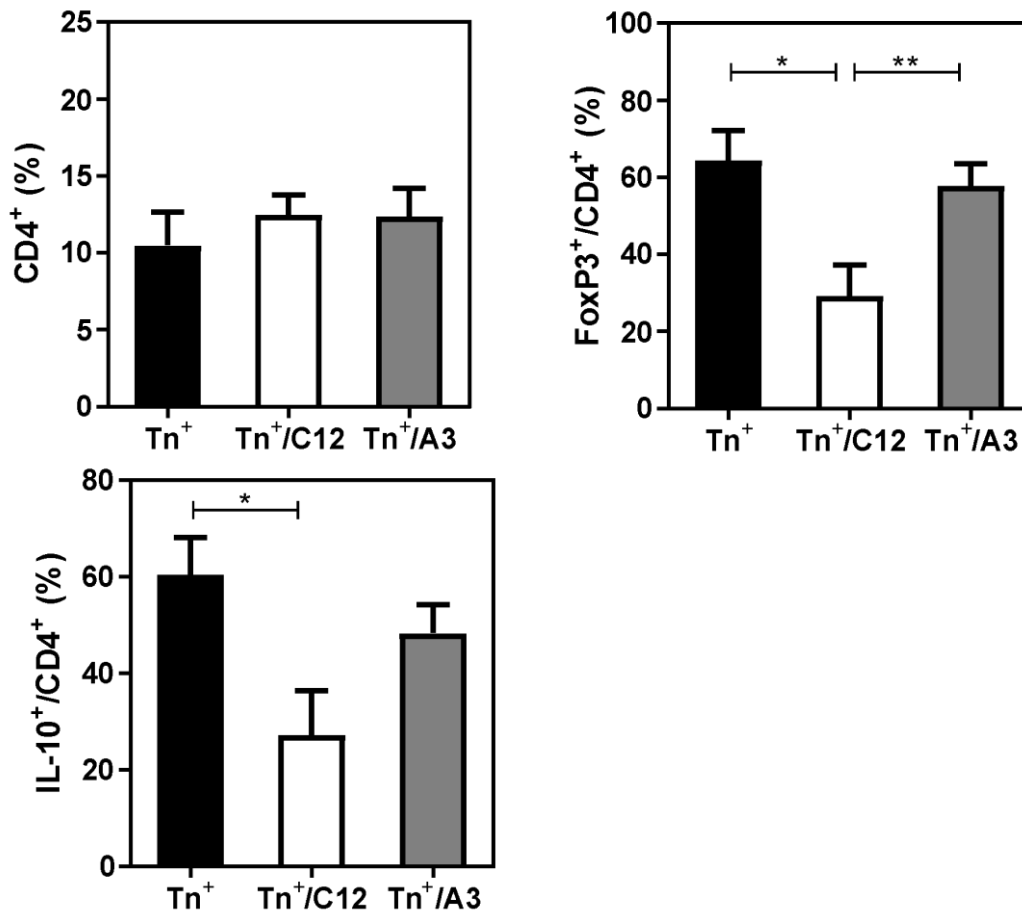
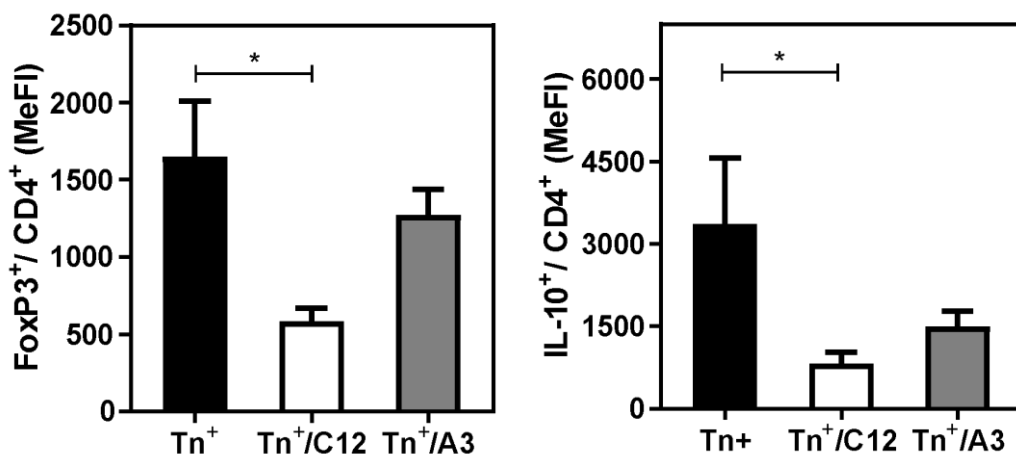
B**C**

Figura 24: Análisis de poblaciones linfocitarias reguladoras CD4⁺ en el microambiente tumoral. Los ratones con tumores de mama generados por la inyección de células 4T1 Tn⁺, Tn⁺/C12 o Tn⁺/A3, fueron sacrificados al día 42 post-inyección para extraer los tumores para su posterior análisis por citometría de flujo. **(A)** Estrategia de *gating* utilizada. En primer lugar, se seleccionó la población CD4⁺, dentro de la población CD45⁺. A partir de dicha selección, se estudiaron 2 poblaciones: IL-10⁺ o Foxp3⁺. **(B)** Porcentaje de células IL-10⁺ o Foxp3⁺ dentro de la población CD4⁺/CD45⁺. **(C)** Mediana de intensidad de fluorescencia (MeFI) de células IL-10⁺

y Foxp3⁺. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado por un análisis ANOVA de una vía con * p < 0.05, ** p < 0.01.

En términos de mediana de intensidad de fluorescencia de Foxp3 e IL-10 (dentro de la población CD4⁺/CD45⁺), el grupo de ratones con tumores Tn⁺/C12 presentó una baja en relación a los niveles presentes en el infiltrado tumoral de los ratones con tumores Tn⁺ (Figura 24C). Sin embargo, estos resultados no se evidenciaron con el clon Tn⁺/A3.

Adicionalmente, también se estudiaron las poblaciones linfocitarias T CD8⁺ (Figura 25). Al igual que con el estudio de las T CD4⁺, se analizó primeramente la frecuencia de las células CD8⁺/CD45⁺, discriminando aquellas positivas para Foxp3 o para IL-10, así como la mediana de intensidad de fluorescencia de los marcadores Foxp3 e IL-10. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas para ninguna variable estudiada entre los distintos grupos.

En conclusión, los tumores provenientes de células Tn⁺/C12 o Tn⁺/A3, presentan características inmunológicas diferentes a los de los tumores Tn⁺ a nivel del microambiente tumoral.

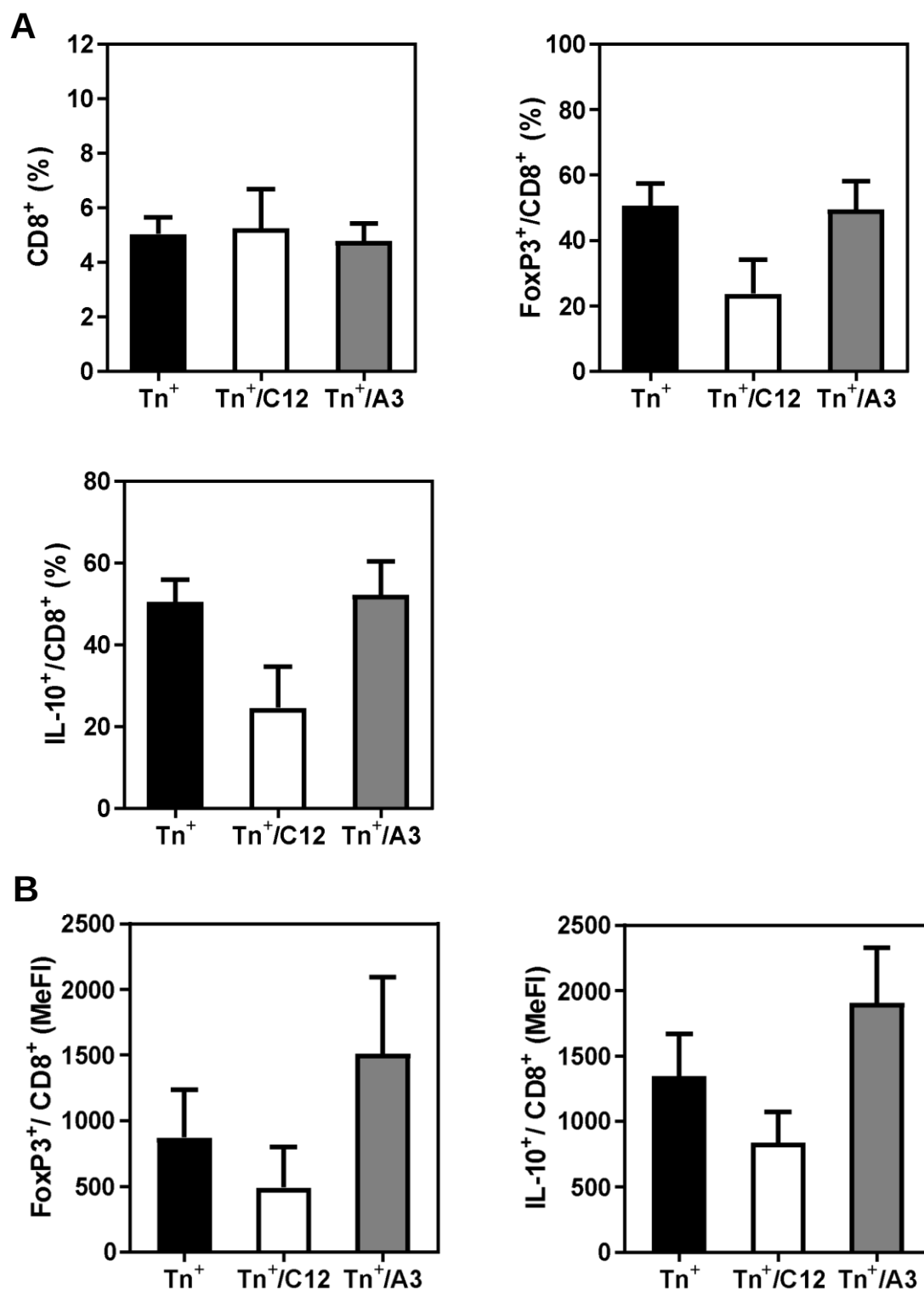


Figura 25: Análisis de las poblaciones linfocitarias T CD8⁺ en el microambiente tumoral. Los ratones con tumores de mama generados por la inyección de células 4T1 Tn⁺, Tn⁺/C12 o Tn⁺/A3, fueron sacrificados al día 42 post-inyección para extraer los tumores para su posterior análisis por citometría de flujo. **(A)** Porcentaje de células Foxp3⁺ e IL-10⁺ dentro de la población CD8⁺/CD45⁺. **(B)** Mediana de intensidad de fluorescencia (MeFI) de células Foxp3⁺ e IL-10⁺. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). Análisis estadístico determinado por un análisis ANOVA de una vía.

Discusión y perspectivas

Generación de clones Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3

El presente trabajo buscó explorar el posible rol de la MMP9 en la agresividad tumoral en un modelo de CMTN con glicosilación aberrante. En particular, nos propusimos estudiar si la MMP9 es responsable de que las células 4T1 Tn⁺ presenten mayor crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis que las células 4T1 wt (como fue reportado previamente por nuestro grupo de investigación, Festari *et al.* 2022). Para alcanzar dicho objetivo la estrategia elegida consistió en utilizar la tecnología CRISPR/Cas9 para anular la expresión o función de la MMP9 en las células Tn⁺. Como resultado se obtuvieron dos clones celulares, los cuales se denominaron Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3. Dichos clones presentaron fenotipos distintos respecto al clon parental, 4T1-Tn⁺.

Ambos clones obtenidos mostraron niveles de MMP9 significativamente menores que la línea parental Tn⁺. Sin embargo, evidenciamos que no se logró abolir completamente la expresión de la MMP9, lo que podría ser explicado por fenómenos intrínsecos de la estrategia CRISPR/Cas9. Particularmente, este sistema genera un corte doble hebra en el ADN complementario al ARN guía utilizado. Este daño en el ADN puede ser reparado básicamente por dos estrategias conocidas como NHEJ (*non homologous end joining*) y HDR (*homology directed repair*) (Yeh, Richardson, y Corn 2019). En las células de mamíferos, el mecanismo que mayormente opera es el NHEJ. Por otro lado, el HDR generalmente está activo solamente en células que se están dividiendo y requiere de proteínas que se expresan predominantemente en la fase S y G2 del ciclo celular (Moynahan y Jasin 2010; Heyer, Ehmsen, y Liu 2010). Cuando opera el mecanismo de reparación no homóloga, se pueden producir inserciones o deleciones en el sitio a ser reparado. Esta mutación ocasionada por la acción inicial de la nucleasa Cas9, puede ocasionar la pérdida de función del gen blanco mediante varias vías. Se puede dar lugar a la generación de una proteína inestable o no funcional como resultado de una alteración en el marco de lectura. Otra alternativa que no es excluyente, es que el hecho de que se produzcan inserciones o deleciones genere la formación de codones de terminación prematuros. Estos codones prematuros son detectados por la maquinaria NMD (*nonsense mediated mRNA decay*), la cual funciona como control de calidad de los ARNm. En caso de detectarse un codón de terminación prematuro, el ARNm en cuestión es degradado (Popp y Maquat 2016). El conocimiento de este fenómeno es utilizado en el diseño de ARN guías y así mejorar la eficiencia de que se produzcan codones prematuros de terminación. En este sentido, es mejor considerar como blanco de acción de CRISPR/Cas9 aquellos exones que se encuentren ubicados hacia el

extremo 5', para que aumente la probabilidad de introducir un codón de terminación o un cambio de marco de lectura al inicio de la proteína (Doench *et al.* 2014). En nuestro caso particular se utilizó un ARN guía capaz de reconocer y unirse a una región del exón 4 (contando desde el extremo N-terminal en la hebra positiva), habiendo 13 exones en el gen de la MMP9. El análisis de la expresión proteica de MMP9 por *Western Blot* indica menores niveles de MMP9 activa, por lo que no parecería haber un codón *stop* prematuro sino más bien una mutación puntual que podría afectar el marco de lectura y la activación de la MMP9.

Por otra parte, el mecanismo de reparación de corte doble hebra en células diploides, mediante la reparación no homóloga, puede resultar en la generación de una mutación en un solo alelo (Shalem, Sanjana, y Zhang 2015), por lo que este fenómeno podría estar explicando por qué los clones Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3 presentaron cierto nivel de expresión de la MMP9. Adicionalmente, se ha reportado que la edición génica mediante CRISPR/Cas9 puede dar lugar a fenómenos de “salteo de exones”, donde el ARNm presenta un marco de lectura inalterado codificando para proteínas que son igualmente funcionales (Mou *et al.* 2017).

Por otra parte, los ARN guías necesitan un compromiso entre las secuencias reconocidas, y su especificidad génica, evitando las posibles mutaciones en genes que no son de interés, pero que presentan secuencias complementarias a las del ARN guía seleccionado. Estos sitios se conocen como *off target*, y representan secuencias con alta similitud respecto al sitio *on target*. A su vez, los sitios *off target* deben presentar la secuencia PAM correspondiente a la Cas9 utilizada (NGG), para que la nucleasa Cas9 pueda reconocer el sitio de acción. Utilizando al algoritmo disponible en línea *Crista* (crista.tau.ac.il), identificamos posibles secuencias *off target* en el genoma de ratón, algunas correspondientes a secuencias codificantes de genes según la herramienta *Blast* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A partir de esto, surgieron tres genes candidatos que nos gustaría analizar y que podrían estar influyendo en el fenotipo de los clones generados en caso de estar mutados. Estos son el gen *Ank3*, *Ttll7* y *Pdk2*. *Ank3* típicamente es un gen asociado al desarrollo neuronal que codifica para la proteína del mismo nombre y que forma parte del citoesqueleto y afecta la motilidad y proliferación celular (Dima *et al.* 2013; Legge *et al.* 2019). Sin embargo, se ha reportado que *Ank3* puede ser usado como un factor pronóstico para ciertos subtipos de melanoma (Lattanzi *et al.* 2019) y de cáncer de mama (Kurozumi *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2022). *Pdk2* está implicado en el metabolismo celular, particularmente su acción favorece la reprogramación metabólica hacia la glicólisis (Seton-Rogers 2016). En este sentido, se ha reportado que la sobreexpresión de *Pdk2* podría estar reflejando un peor

pronóstico en leucemia mieloide aguda (Cui *et al.* 2020). Además, se ha reportado que el microARN MiR-422a, que reprime a PDK2, está disminuido en cáncer gástrico, lo cual está vinculado con el tamaño tumoral (He *et al.* 2018). Por último, *Ttl7* codifica para una proteína involucrada en la poliglutamilación de la tubulina, lo cual afecta la función de los microtúbulos y la distribución del retículo endoplásmico (Janke *et al.* 2005; Zheng *et al.* 2022). Por otra parte, la morfología del retículo endoplásmico puede estar involucrada en promover el proceso de apoptosis (Zheng *et al.* 2018). Por tanto, una afectación en el citoesqueleto debido a una mutación en *Ttl7* podría estar promoviendo la apoptosis de las células tumorales.

En este escenario, la identificación de posibles mutaciones en *Mmp9* y estos genes es esencial y objeto de nuestro trabajo actual. Es importante aclarar que el score del ARN guía utilizado para generar una mutación en el gen de la *Mmp9* es francamente superior en relación al score de los genes *off target* (Tabla 6).

Tabla 6: Comparación de CRISTA Score entre genes *on/off target*

Gen	CRISTA Score
<i>Mmp9</i>	0,847454775
<i>Ank3</i>	0,268533604
<i>Pdk2</i>	0,203894819
<i>Ttl7</i>	0,174466675

Los valores de CRISTA Score (0-1) fueron obtenidos a partir del algoritmo disponible en línea *Crista* (crista.tau.ac.il), siendo un valor cercano a 1 un score que refleja mayor alineación a la secuencia diana. La secuencia del ARN guía utilizada es: ATTCGACGACGACGAGTTG (NGG).

El comportamiento de los clones Tn⁺/A3 y Tn⁺/C12 fue claramente menos agresivo que el de la línea parental Tn⁺. Además de los posibles efectos *off target*, ¿es posible que existan otros genes cuya expresión sea responsable del fenotipo de los clones generados? En este sentido, cuando se generó la línea 4T1 Tn⁺, el estudio comparativo entre la misma y la línea wt por *RNAseq* (Festari *et al.*, manuscrito en preparación), mostró que existen múltiples genes con expresión diferencial además de la MMP9. De esta manera, es razonable asumir que la MMP9 no sería la única responsable en explicar una mayor agresividad de las células 4T1 Tn⁺ respecto a las wt. Esto demuestra que cuando uno modifica genéticamente una línea celular por mutación de un gen, es posible que se desregule la expresión de otros genes que de algún modo poseen un

vínculo con el gen alterado. Por tanto, sería de orden, aplicar la misma estrategia de CRISPR/Cas9 dirigida al gen de la *Mmp9* en las células 4T1 wt y analizar su efecto *in vivo*. Es importante destacar que en este trabajo limitamos el número de ratones por dos razones: 1) éticas y 2) durante la pandemia del Covid-19 la producción de animales disminuyó considerablemente. Esta estrategia también nos permitiría profundizar en el rol específico de Tn en el vínculo de la MMP9 con la agresividad en el CMTN.

Otro fenómeno interesante de discutir, es la variabilidad presentada entre los dos clones obtenidos en este trabajo, a pesar de que estos provienen de la utilización del mismo ARN guía. En teoría, el corte doble hebra realizado por la Cas9 es el mismo en ambos clones. Sin embargo, la mutación es dependiente de un sistema de reparación que es propenso al error (NHEJ). Por lo tanto, un mismo daño en el ADN podría ser reparado de forma diferente en dos células distintas. Otro aspecto relacionado a esto, y que no es frecuentemente mencionado, tiene que ver con el hecho de asumir homogeneidad celular en la línea parental. Este fenómeno va de la mano con problemas para encontrar reproducibilidad en establecer un genotipo/fenotipo robusto, cuando se modifica el genoma en líneas celulares. Existen una variedad de factores, como condiciones de cultivo, número de pasajes, contaminaciones no detectadas, cambios genéticos (sobre todo cuando hablamos de células tumorales, como ya se explicó en la introducción), que pueden impactar en la reproducibilidad de los resultados (Westermann *et al.* 2022). Adicionalmente, si consideramos que, en nuestro caso, se partió de una línea celular (4T1 Tn⁺) la cual a su vez es el resultado de haber utilizado también la tecnología de CRISPR/Cas9 en las células 4T1 wt, los fenómenos de heterogeneidad celular dentro de la población Tn⁺, podría ser mayor. Otro aspecto que podría estar vinculado es el proceso de clasificación de una única célula por pocillo por citometría de flujo propiamente dicho, donde podría llegar a pasar que en un pocillo de la placa sean colocados más de un clon celular.

Es interesante resaltar que la glicosilación aberrante de la MMP9 con Tn podría estar influenciando su función y por ende su rol pro-tumoral. Se han reportado diferencias entre la glicosilación de la MMP9 proveniente de neutrófilos y de células tumorales de mama (MCF-7). Particularmente, la MMP9 proveniente de neutrófilos, presenta O-glicanos ricos en galactosa y alrededor de un 11 % de estructuras con repetidos de N-Acetil-lactosamina. Por el contrario, la MMP9 derivada de las células tumorales de mama presenta estructuras de tipo core 1 sialiladas. Esta diferencia en la O-glicosilación impacta en la interacción de la MMP9 con la galectina-3, donde la MMP9 proveniente de tumor presenta una menor interacción. Se ha sugerido que este hecho podría generar una mayor dispersión de la MMP9 a través de la matriz extracelular, ya que la interacción

MMP9-galectina-3 provocaría una retención de la MMP9 en la superficie celular y por tanto una acción más local de la misma (Fry *et al.* 2006). Por tanto, alteraciones en la O-glicosilación de la MMP9 pueden impactar en su localización, lo cual influye en su acción a distancia, y por ende en el proceso invasivo y metastásico.

Por otro lado, se ha demostrado que el dominio rico en residuos potencialmente O-glicosilados presente en la MMP9 influye en la unión de su dominio hemopexina con inhibidores como TIMP-1. De hecho, la eliminación de este dominio resulta en una disminución de la afinidad entre la MMP9 y TIMP-1. Además, este dominio sería importante para la correcta orientación del dominio hemopexina, lo cual permitiría una correcta interacción con TIMP-1 o con sustratos de la MMP9 (Van Den Steen *et al.* 2006; Rosenblum *et al.* 2010). También puede afectar la interacción de la MMP9 con receptores *cargo*, que mediarían su internalización. Se ha reportado que la endocitosis de MMP9, vía el receptor LRP-1 y megalina, sería a través del dominio hemopexina, donde su correcta orientación es requerida para el proceso de internalización (Van Den Steen *et al.* 2006). Por tanto, existe evidencia para plantear que la correcta orientación del dominio hemopexina, la cual es dependiente del dominio rico en O-glicanos, podría también ser responsable de que la pro-MMP9 sea correctamente procesada por otras MMPs (como la MMP2, la MMP3, entre otras), afectando los niveles de MMP-9 activa generada. Por tanto, es importante abordar el estudio de la glicosilación en los clones obtenidos ya que la O-glicosilación de la MMP9 podría estar afectando su biodisponibilidad, ya sea por la interacción con inhibidores, por su internalización o activación.

Por otro lado, para poder determinar el efecto que ejerce la presencia del antígeno Tn sobre la acción de la MMP9 en las células de CMTN, debemos determinar su patrón de O-glicosilación al ser producidas por las células 4T1-Tn⁺ y wt. Para ello, podríamos purificar la MMP9 proveniente de dichas líneas celulares, realizar un análisis glicoproteómico por espectrometría de masa y comparar su actividad en presencia y ausencia de un inhibidor de MMP9 como es TIMP-1. Esto último podría hacerse con ensayos de zimografía, donde se prepara un gel de poliacrilamida en presencia de gelatina y luego se tiñe con azul de coomasie. Las zonas donde hubo actividad metaloproteasa pueden cuantificarse ya que aparecen como bandas no teñidas (<https://www.abcam.com/protocols/gelatin-zymography-protocol>). En este sentido, en la sección “Anexo” se muestran resultados preliminares sobre la actividad metaloproteasa total presente en las células tumorales y tumores obtenidos de ratones. En estas condiciones, no encontramos diferencias en la actividad MMP total, sugiriendo la

necesidad de realizar un ensayo de mayor especificidad como la zimografía con gelatina.

Papel de los niveles de MMP9 en la progresión tumoral

Otro aspecto interesante a estudiar es si la MMP9 de alguna manera influencia la respuesta inmunológica contra el tumor. En este sentido, se realizaron dos abordajes. Uno de ellos a nivel sistémico y el otro a nivel del microambiente tumoral.

En relación al análisis de las poblaciones leucocitarias a nivel sistémico, los tumores Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3 presentaron un cociente neutrófilo/linfocito menor, similar a los ratones *naïve*.

Una de las características del modelo 4T1, es que estos tumores producen excesivas cantidades del factor de crecimiento G-CSF, el cual provoca un importante cambio en el número de neutrófilos en circulación, así como de neutrófilos asociados a tumor (Swierczak *et al.* 2014). De esta manera, en el modelo trabajado, los niveles de G-CSF podrían estar implicados en la diferenciación de neutrófilos y aumentar su número a nivel sistémico. Por ello, sería interesante poder evaluar los niveles de G-CSF (por ELISA) en el sobrenadante de cultivo de los clones obtenidos y de la línea parental Tn⁺.

Por otro lado, resulta relevante detenerse a analizar el posible papel de los neutrófilos en el cáncer. En determinados sistemas de estudio los neutrófilos presentan una acción antitumoral, donde ejercen citotoxicidad directa hacia las células tumorales además de inhibir procesos metastásicos (Cameron 1983; Granot *et al.* 2011). Sin embargo, existen trabajos que demuestran que los neutrófilos favorecen la progresión tumoral, facilitando procesos angiogénicos y potenciando la movilidad, migración e invasión de las células tumorales (Coffelt, Wellenstein, y De Visser 2016). Además, los neutrófilos son capaces de inhibir la acción antitumoral de otras células inmunes, como los linfocitos citotóxicos mediante la producción de especies reactivas del nitrógeno (Coffelt *et al.* 2015).

El hecho de haber detectado cambios en los niveles de neutrófilos a nivel sistémico, cobra relevancia si nos enfocamos en el pulmón, sitio principal de metástasis en este modelo, ya que se ha reportado que su acumulación es capaz de favorecer un nicho pre-metastásico (Wculek y Malanchi 2015). Teniendo en cuenta que obtuvimos una mayor capacidad de formar colonias, así como una mayor capacidad metastásica a nivel pulmonar para el clon Tn⁺, se podría establecer la siguiente pregunta: ¿los niveles de MMP9 producidos por las células tumorales, afectan el número de neutrófilos a nivel

pulmonar? ¿Cuál es el papel de los neutrófilos en el desarrollo de metástasis pulmonares en el modelo trabajado? Estas preguntas cobran aún más relevancia si además consideramos que los neutrófilos son una importante fuente de MMP9 (Deryugina *et al.* 2014). Interesantemente, se ha planteado que en el modelo murino de cáncer de mama 4T1 existe un condicionamiento de neutrófilos por parte del tumor primario, el cual les otorgaría un rol anti-metastásico en el pulmón, aunque esto es insuficiente para evitar el desarrollo de metástasis pulmonares (Granot *et al.* 2011). Los autores proponen a la quimioquina CCL2 (secretada por los tumores 4T1) como un mediador clave para que los neutrófilos adquieran un fenotipo protector. Otros mediadores como CCL3, CXCL1, CXCL12 y CXCL16 también serían capaces de inducir fuertemente una capacidad citotóxica en los neutrófilos. Por otra parte, la capacidad citotóxica de los neutrófilos dependería de la secreción local de TGF- β por parte de los tumores 4T1. Interesantemente, la MMP9 es capaz de activar el TGF- β (Kobayashi *et al.* 2014) y este último induce la expresión de la MMP9 (Moore-Smith *et al.* 2017). Entonces, se podría plantear que los tumores derivados de los clones Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3 presentan un menor nivel de TGF- β activo, debido a una menor acción de la MMP9 asociado a un papel citotóxico anti-tumoral de los neutrófilos y menor desarrollo de metástasis. Por otra parte, se ha reportado que el clivaje de CCL2 por parte de la MMP9, reduce su actividad quimiotáctica (Denney, Clench, y Woodroffe 2009). Por tanto, los tumores Tn⁺ podrían ser más agresivos, debido a que la acción de la MMP9 reduciría la actividad de la CCL2, la cual ya no estaría favoreciendo una función antitumoral por parte de los neutrófilos. Adicionalmente, se podría plantear que la MMP9 no sólo es capaz de modular el perfil funcional de los neutrófilos, sino también su tráfico. Sería de gran interés evaluar en nuestro modelo tumoral con O-glicosilación truncada, si los neutrófilos presentan un rol citotóxico sobre las células tumorales y si la MMP9 juega un rol en este circuito. Para ello, se podría aislar neutrófilos provenientes de animales con o sin tumor y evaluar su actividad citotóxica *ex vivo* en co-cultivos con células tumorales y la expresión de moléculas como especies reactivas del oxígeno y nitrógeno.

Si bien aún no está aceptada la significancia clínica de la proporción neutrófilo/linfocito, existe una asociación general entre el mismo y el pronóstico en el cáncer de mama (Zhang *et al.* 2020). Particularmente se plantea que un alto número de neutrófilos y un bajo número de linfocitos en circulación podría sugerir un estado de inmunosupresión (Shaul y Fridlender 2019). De hecho, dos estudios en pacientes con CMTN proponen que una relación neutrófilo/linfocito superior a 2 (Bozkurt *et al.* 2015) o a 3 (Pistelli *et al.* 2015) estaría indicando un menor tiempo libre de enfermedad, así como una menor sobrevida general. En nuestro caso (Tabla 7) el cociente neutrófilo/linfocito es más bajo

para los clones Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3, lo que va en la misma línea con lo reportado en la literatura.

Tabla 7: Cociente neutrófilo/linfocito en sangre de ratones inoculados con las líneas en estudio y en ratones control (*naïve*)

Cociente (neutrófilo/linfocito)	
Tn⁺	2,4
Tn⁺/C12	0,7
Tn⁺/A3	1,6
Naïve	0,1

El cociente neutrófilo/linfocito se ha estudiado como parámetro asociado al pronóstico en cáncer de mama. Una relación neutrófilo/linfocito menor está asociada a un mejor pronóstico.

Para realizar el cálculo se utilizó la concentración celular en sangre de cada tipo celular obtenida con un analizador hematológico automático.

En relación al infiltrado leucocitario a nivel tumoral, los ratones con tumores Tn⁺/C12 o Tn⁺/A3 presentaron mayores niveles de células MHCII⁺ CD11b⁺ CD11c⁺ que los ratones portadores de tumores Tn⁺. Asimismo, ambos clones, presentaron mayores niveles de intensidad de fluorescencia para MHCII, en poblaciones CD11b⁺CD11c⁺. Este hecho podría explicarse por la MMP9 sobre diferentes mediadores capaces de modular células presentadoras de antígeno. Particularmente, ciertos factores como VEGF, son capaces de inhibir la diferenciación y maduración de las células dendríticas (Gabrilovich *et al.* 1996; Ohm y Carborne 2001). Adicionalmente, factores como TGF-β, IL-10 e IL-6, suelen promover la conversión de células dendríticas hacia un fenotipo tolerogénico (Jhunjhunwala, Hammer, y Delamarre 2021). En este sentido, la MMP9 podría regular la acción de estas moléculas ya que se ha reportado que es capaz de, por ejemplo, favorecer la disponibilidad de VEGF, al liberarlo de la membrana celular, así como de la matriz extracelular (Bergers *et al.* 2000). A su vez, como mencionamos anteriormente, la MMP9 es capaz de clivar y activar el TGF-β latente. Por lo tanto, la ausencia de MMP9 se acompañaría de menores niveles de VEGF y TGF-β en el microambiente tumoral y una mayor estimulación del sistema inmune.

La caracterización de la población inmune eventualmente afectada por la MMP9, es importante para poder definir el rumbo de futuras investigaciones sobre el papel de la MMP9 en la inmunomodulación. Como perspectivas adicionales sería interesante evaluar la expresión de marcadores asociados a la función de las células mieloides presentadoras de antígeno, como CD40, CD80 o CD86 y MHC de clase I. Además, se podría profundizar en su caracterización, como por ejemplo a través del análisis de la expresión de F4/80 y CD68 los cuales son característicos de macrófagos, y así poder discriminar entre células dendríticas y macrófagos. Por otro lado, podríamos analizar los niveles de TGF- β y VEGF en el microambiente tumoral y establecer si existe algún vínculo con el fenotipo de las APCs. Además, se podría evaluar si la presencia de Tn en MMP9 afecta el clivado de TGF- β y VEGF a través de la utilización de MMP9 producida por las líneas Tn⁺ y wt.

Para complementar el trabajo realizado, sería conveniente identificar poblaciones linfocitarias citotóxicas, ya que son claves en la eliminación de células tumorales. Se ha reportado que la ausencia de MMP9 por parte de las células tumorales, evita el clivado de quimioquinas como CXCL9, CXCL10 y CXCL11, las cuales favorecen el reclutamiento de linfocitos T CD8⁺ a la interface vascular del tumor (Juric *et al.* 2018; Mikucki *et al.* 2015). En este sentido, se podría evaluar los niveles de MHCI en APC del microambiente tumoral en conjunto con marcadores asociados a la función citotóxica de linfocitos T CD8⁺ activados (IFN- γ o granzima B).

Por otra parte, la profundización en el estudio de los linfocitos T reguladores también es necesaria. Uno de los clones obtenidos (Tn⁺/C12) presentó una menor proporción de células Foxp3⁺/CD4⁺ e IL-10⁺/CD4⁺, en relación al grupo Tn⁺. Para evaluar su función reguladora podríamos purificarlos y analizar su capacidad supresora de la activación de linfocitos T en un cultivo alogénico mixto. En cuanto a la evaluación de la proliferación de esplenocitos derivados de animales con tumor y estimulados en forma policlonal, se destacó la variación de los niveles de IL-10 e IFN- γ , donde estos se vieron aumentados particularmente en los clones Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3, respectivamente. La IL-10 es capaz de favorecer la progresión tumoral al afectar los niveles de MHCII en las APCs y de MHCI en las células tumorales (Mannino *et al.* 2015). Sin embargo, el aumento de IL-10, no necesariamente refleja un escenario global de inmunosupresión dado que a menudo se encuentra acompañado de la producción de otras citoquinas. De hecho, se ha reportado un efecto anti-tumoral por parte de la IL-10 a través de la expansión y activación directa de linfocitos T CD8⁺ residentes en el tumor (Mumm *et al.* 2011; Emmerich *et al.* 2012). Por otra parte, la IL-10 es capaz de inhibir la expresión de IL-17 e IL-23 (Stewart *et al.* 2013), las cuales suelen estar asociadas a una progresión tumoral, debido a que

Discusión y perspectivas

generan una inflamación crónica (Langowski *et al.* 2006; Langowski, Kastelein, y Oft 2007).

Conclusiones

Conclusiones

Tomando en cuenta que las diferencias en los niveles de expresión de la MMP9 en las células tumorales Tn⁺ impactaron fuertemente en la progresión tumoral, tanto en el crecimiento tumoral como en el desarrollo de micrometástasis pulmonares podemos sugerir que la MMP9 (O-glicosilada con Tn) posee un rol crucial en el contexto tumoral.

Evidenciamos que los niveles de expresión de esta enzima se asocian a la presencia de diversos componentes inmunes, tanto celulares como mediadores solubles, a nivel sistémico y a nivel tumoral, con lo cual podemos también sugerir que la MMP9 es capaz de modular el perfil inmunológico de la respuesta anti-tumoral en el contexto de la glicosilación aberrante. Sería interesante seguir profundizando en la relación entre, MMP9, APCs y linfocitos T reguladores, así como en el rol del neutrófilo y su asociación con esta enzima en el CMTN. Sin embargo, aún resta analizar la existencia de una eventual modulación de la actividad de la MMP9 en función de su O-glicosilación. Esto nos permitirá dilucidar si las células Tn⁺ son más agresivas que las wt debido únicamente a un cambio en los niveles de expresión de la MMP9 y/o a un efecto glico-dependiente, en donde la acción de la enzima se vea afectada por la presencia de Tn. La importancia de estudiar el rol de la glicosilación en la MMP9 es esencial ya que de confirmarse un efecto glico-dependiente, existen múltiples aspectos mecánicos a evaluar como por ejemplo, la interacción de la MMP9 con moléculas como las galectinas, las cuales juegan diversos roles en la progresión tumoral (Salatino y Rabinovich 2020).

Anexo

Evaluación de la actividad metaloproteasa en clones 4T1 Tn⁺ y Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3

Además de evaluar los niveles de expresión de la MMP9 en las distintas variantes celulares estudiadas, se realizaron estudios preliminares de la actividad metaloproteasa. Para ello, se utilizó un kit comercial con el cual se puede cuantificar la actividad metaloproteasa total. Si bien no es un kit que nos permita evaluar la actividad metaloproteasa específica de la MMP9, la información proporcionada por este ensayo es un insumo más a la hora de caracterizar las variantes celulares en cuestión.

En la Figura 26 se puede ver el resultado obtenido a partir de las líneas celulares, mientras que en la Figura 27 se puede observar el resultado al evaluar muestras tumorales.

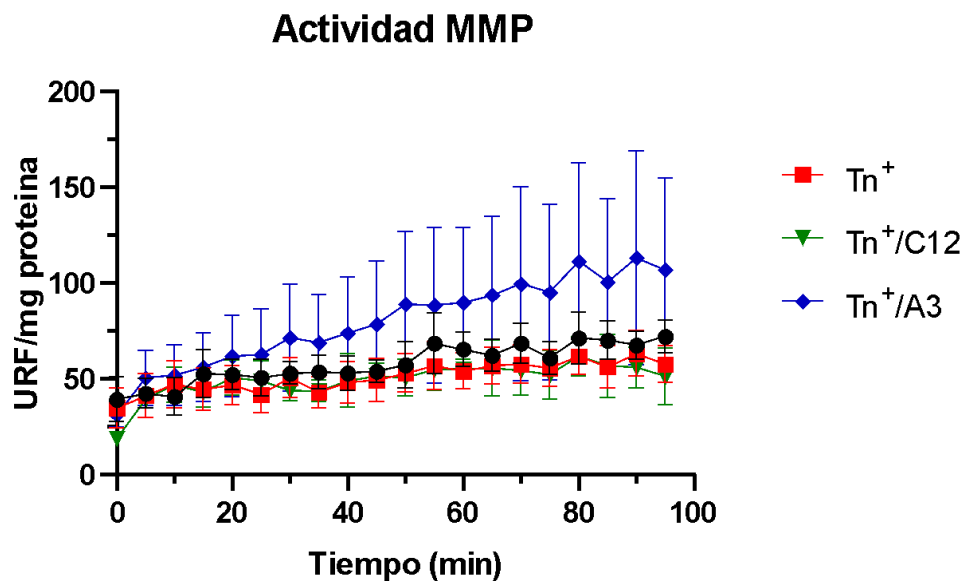


Figura 26: Evaluación de la actividad metaloproteasa total en las líneas 4T1 Tn⁺, Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3. En este ensayo la actividad metaloproteasa es proporcional a las unidades de fluorescencia relativa (RFU), las cuales fueron medidas cada 5 minutos durante un período total de 95 minutos. Las RFUs fueron normalizadas por la cantidad de proteína total en cada una de las muestras evaluadas. Las muestras provienen de lisados celulares totales de las líneas en estudio. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). El análisis estadístico utilizado fue *Two-way ANOVA*.

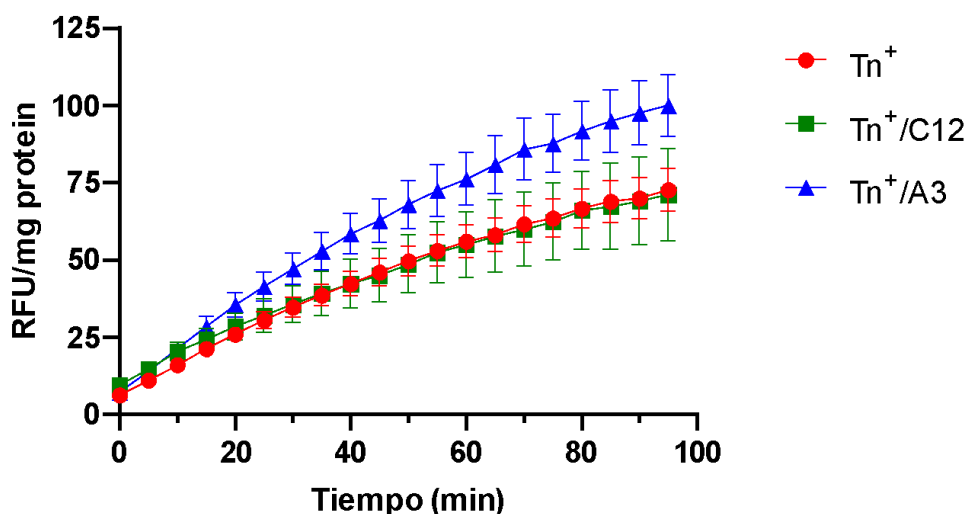


Figura 27: Evaluación de la actividad metaloproteasa total en tumores generados a partir de la inyección de células 4T1 Tn⁺, Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3 en la mama de ratones BALB/c. En este ensayo la actividad metaloproteasa es proporcional a las unidades de fluorescencia relativa (RFU), las cuales fueron medidas cada 5 minutos durante un período total de 95 minutos. Las RFUs fueron normalizadas por la cantidad de proteína total en cada una de las muestras evaluadas. Las muestras provienen de lisados celulares totales de tumores generados con cada línea en estudio. Se inyectaron 9 ratones para cada línea estudiada. Las barras de error representan el error estándar de la mediana (SEM). El análisis estadístico utilizado fue *Two-way ANOVA*

A partir de los resultados mostrados en esta sección, podemos concluir que no se detectaron diferencias en cuanto a la actividad metaloproteasa total, por lo cual podría existir un mecanismo de compensación en los clones Tn⁺/C12 y Tn⁺/A3, debido a sus niveles inferiores de MMP9 respecto a la línea Tn⁺.

Como perspectiva, sería de interés aislar la MMP9 proveniente de la línea 4T1 wt y 4T1 Tn⁺ y evaluar su actividad mediante la utilización de sustratos fluorescentes de la MMP9, donde existen dos opciones. Aquellos que presentan también un *quencher* además del fluoróforo, donde la acción de la MMP estaría liberando al *quencher* y por tanto una mayor lectura de fluorescencias estaría asociado indirectamente a una mayor acción de la MMP. La otra estrategia, tiene que ver un péptido fluorescente, donde la acción de la MMP estaría disminuyendo la fluorescencia del mismo.

Bibliografía

Bibliografía

- Ali, Hamid R., S. E. Glont, F. M. Blows, E. Provenzano, S. J. Dawson, B. Liu, L. Hiller, et al. 2015. "PD-L1 Protein Expression in Breast Cancer Is Rare, Enriched in Basal-like Tumours and Associated with Infiltrating Lymphocytes." *Annals of Oncology* 26 (7): 1488–93. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv192>.
- Bauer, Christian A., Edward Y. Kim, Francesco Marangoni, Esteban Carrizosa, Natalie M. Claudio, y Thorsten R. Mempel. 2014. "Dynamic Treg Interactions with Intratumoral APCs Promote Local CTL Dysfunction." *Journal of Clinical Investigation* 124 (6): 2425–40. <https://doi.org/10.1172/JCI66375>.
- Bekes, Erin M., Bernhard Schweighofer, Tatyana A. Kupriyanova, Ewa Zajac, Veronica C. Ardi, James P. Quigley, y Elena I. Deryugina. 2011. "Tumor-Recruited Neutrophils and Neutrophil TIMP-Free MMP-9 Regulate Coordinately the Levels of Tumor Angiogenesis and Efficiency of Malignant Cell Intravasation." *American Journal of Pathology* 179 (3): 1455–70. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.031>.
- Bergers, Gabriele, Rolf Brekken, Gerald McMahon, Thiennu H. Vu, Takeshi Itoh, Kazuhiko Tamaki, Kazuhiko Tanzawa, et al. 2000. "Matrix Metalloproteinase-9 Triggers the Angiogenic Switch during Carcinogenesis." *Nature Cell Biology* 2 (10): 737–44. <https://doi.org/10.1038/35036374>.
- Bianchini, Giampaolo, Justin M. Balko, Ingrid A. Mayer, Melinda E. Sanders, y Luca Gianni. 2016. "Triple-Negative Breast Cancer: Challenges and Opportunities of a Heterogeneous Disease." *Nature Reviews Clinical Oncology* 13 (11): 674–90. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>.
- Bozkurt, Oktay, Halit Karaca, Veli Berk, Mevlude Inanc, Ayse Ocak Duran, Ersin Ozaslan, Mahmut Ucar, y Metin Ozkan. 2015. "Predicting the Role of the Pretreatment Neutrophil to Lymphocyte Ratio in the Survival of Early Triple-Negative Breast Cancer Patients." *Journal of B.U.ON.* 20 (6): 1432–39.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, y Ahmedin Jemal. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Brown, Scott D., Rene L. Warren, Ewan A. Gibb, Spencer D. Martin, John J. Spinelli, Brad H. Nelson, y Robert A. Holt. 2014. "Neo-Antigens Predicted by Tumor Genome Meta-Analysis Correlate with Increased Patient Survival." *Genome Research* 24 (5): 743–50. <https://doi.org/10.1101/GR.165985.113>.
- Buckhaults, Phillip, Lin Chen, Nevis Fregien, y Michael Pierce. 1997. "Transcriptional Regulation of N-Acetylglucosaminyltransferase V by the Src Oncogene." *Journal of Biological Chemistry* 272 (31): 19575–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19575>.
- Cabeza-Cabrerizo, Mar, Ana Cardoso, Carlos M. Minutti, Mariana Pereira Da Costa, and Caetano Reis E Sousa. 2021. "Dendritic Cells Revisited." *Annual Review of Immunology* 39: 131–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-061020-053707>.
- Cameron, Deborah J. 1983. "A Comparison of the Cytotoxic Potential in Polymorphonuclear Leukocytes Obtained from Normal Donors and Cancer Patients." *Clinical Immunology and Immunopathology* 28 (1): 115–24. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(83\)90194-0](https://doi.org/10.1016/0090-1229(83)90194-0).
- Chia, Joanne, Germaine Goh, y Frederic Bard. 2016. "Short O-GalNAc Glycans:

- Regulation and Role in Tumor Development and Clinical Perspectives.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1860 (8): 1623–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.008>.
- Christiansen, Maja N., Jenny Chik, Ling Lee, Merrina Anugraham, Jodie L. Abrahams, y Nicolle H. Packer. 2014. “Cell Surface Protein Glycosylation in Cancer.” *PROTEOMICS* 14 (4–5): 525–46. <https://doi.org/10.1002/PMIC.201300387>.
- Coffelt, Seth B., Kelly Kersten, Chris W. Doornebal, Jorieke Weiden, Kim Vrijland, Cheei Sing Hau, Niels J.M. Verstegen, *et al.* 2015. “IL-17-Producing $\Gamma\delta$ T Cells and Neutrophils Conspire to Promote Breast Cancer Metastasis.” *Nature* 522 (7556): 345–48. <https://doi.org/10.1038/nature14282>.
- Coffelt, Seth B., Max D. Wellenstein, y Karin E. De Visser. 2016. “Neutrophils in Cancer: Neutral No More.” *Nature Reviews Cancer* 16 (7): 431–46. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.52>.
- Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. 2022. “Situación Epidemiológica Del Uruguay En Relación Al Cáncer.” *Registro Nacional Del Cáncer*, 1–61. http://www.comisioncancer.org.uy/uc_513_1.html.
- Cowden Dahl, Karen D., Jaime Symowicz, Yan Ning, Elisa Gutierrez, David A. Fishman, Brian P. Adley, M. Sharon Stack, y Laurie G. Hudson. 2008. “Matrix Metalloproteinase 9 Is a Mediator of Epidermal Growth Factor–Dependent E-Cadherin Loss in Ovarian Carcinoma Cells.” *Cancer Research* 68 (12): 4606–13. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5046>.
- Cui, Longzhen, Zhiheng Cheng, Yan Liu, Yifeng Dai, Yifan Pang, Yang Jiao, Xiaoyan Ke, *et al.* 2020. “Overexpression of PDK2 and PDK3 Reflects Poor Prognosis in Acute Myeloid Leukemia.” *Cancer Gene Therapy* 27 (1–2): 15–21. <https://doi.org/10.1038/s41417-018-0071-9>.
- Costa, Valeria da, Sandra J. van Vliet, Paula Carasi, Sofía Frigerio, Pablo A. García, Diego O. Croci, María Florencia Festari, *et al.* 2021. “The Tn Antigen Promotes Lung Tumor Growth by Fostering Immunosuppression and Angiogenesis via Interaction with Macrophage Galactose-Type Lectin 2 (MGL2).” *Cancer Letters* 518 (June): 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.06.012>.
- Dallas, Sarah L., Jennifer L. Rosser, Gregory R. Mundy, y Lynda F. Bonewald. 2002. “Proteolysis of Latent Transforming Growth Factor- β (TGF- β)-Binding Protein-1 by Osteoclasts. A Cellular Mechanism for Release of TGF- β from Bone Matrix.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (24): 21352–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111663200>.
- Denkert, Carsten, Cornelia Liedtke, Andrew Tutt, y Gunter von Minckwitz. 2017. “Molecular Alterations in Triple-Negative Breast Cancer—the Road to New Treatment Strategies.” *The Lancet* 389 (10087): 2430–42. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32454-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32454-0).
- Denney, Helen, Malcolm R. Clench, y M. Nicola Woodroffe. 2009. “Cleavage of Chemokines CCL2 and CXCL10 by Matrix Metalloproteinases-2 and -9: Implications for Chemotaxis.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 382 (2): 341–47. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2009.02.164>.
- Deryugina, Elena I., Ewa Zajac, Anna Juncker-Jensen, Tatyana A. Kupriyanova, Lisa Welter, y James P. Quigley. 2014. “Tissue-Infiltrating Neutrophils Constitute the Major In Vivo Source of Angiogenesis-Inducing MMP-9 in the Tumor

- Microenvironment.” *Neoplasia* 16 (10): 771–88.
<https://doi.org/10.1016/J.NEO.2014.08.013>.
- Dima, Danai, Jigar Jogia, David Collier, Evangelos Vassos, Katherine E. Burdick, y Sophia Frangou. 2013. “Independent Modulation of Engagement and Connectivity of the Facial Network during Affect Processing by CACNA1C and ANK3 Risk Genes for Bipolar Disorder.” *JAMA Psychiatry* 70 (12): 1303–11.
<https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.2099>.
- Doench, John G., Ella Hartenian, Daniel B. Graham, Zuzana Tothova, Mudra Hegde, Ian Smith, Meagan Sullender, Benjamin L. Ebert, Ramnik J. Xavier, y David E. Root. 2014. “Rational Design of Highly Active SgRNAs for CRISPR-Cas9–Mediated Gene Inactivation.” *Nature Biotechnology* 2014 32:12 32 (12): 1262–67.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3026>.
- Donnell, Jake S O, Michele W L Teng, y Mark J Smyth. 2019. “Cancer Immunoediting and Resistance to T Cell-Based Immunotherapy.” *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>.
- Dunn, Gavin P., Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, y Robert D. Schreiber. 2002. “Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape.” *Nature Immunology* 3 (11): 991–98. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>.
- Dusoswa, Sophie A., Jan Verhoeff, Erik Abels, Santiago P. Méndez-Huergo, Diego O. Croci, Lisan H. Kuijper, Elena de Miguel, et al. 2020. “Glioblastomas Exploit Truncated O-Linked Glycans for Local and Distant Immune Modulation via the Macrophage Galactose-Type Lectin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (7): 3693–3703.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1907921117>.
- Emmerich, Jan, John B. Mumm, Ivan H. Chan, Drake LaFace, Hoa Truong, Terrill McClanahan, Daniel M. Gorman, y Martin Oft. 2012. “IL-10 Directly Activates and Expands Tumor-Resident CD8+ T Cells without De Novo Infiltration from Secondary Lymphoid Organs.” *Cancer Research* 72 (14): 3570–81.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0721>.
- Festari, María Florencia, Valeria Da Costa, Santiago A. Rodríguez-Zraquia, Monique Costa, Mercedes Landeira, Pablo Lores, Patricia Solari-Saquieres, M. Gabriela Kramer, y Teresa Freire. 2022. “The Tumor-Associated Tn Antigen Fosters Lung Metastasis and Recruitment of Regulatory T Cells in Triple Negative Breast Cancer.” *Glycobiology* 32 (5): 366–79. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab123>.
- Foulkes, William D., Ian E. Smith, and Jorge S. Reis-Filho. “Triple-Negative Breast Cancer.” *The new England journal of medicine* 2010.
- Franken, Nicolaas A.P., Hans M. Rodermond, Jan Stap, Jaap Haveman, y Chris van Bree. 2006. “Clonogenic Assay of Cells in Vitro.” *Nature Protocols* 2006 1:5 1 (5): 2315–19. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- Fridlender, Zvi G., Jing Sun, Samuel Kim, Veena Kapoor, Guanjin Cheng, Leona Ling, G. Scott Worthen, y Steven M. Albelda. 2009. “Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF-β: ‘N1’ versus ‘N2’ TAN.” *Cancer Cell* 16 (3): 183–94. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>.
- Fry, Simon A, Philippe E Van Den Steen, Louise Royle, X Mark R Wormald, Anthony J Leatham, Ghislain Opdenakker, James M McDonnell, Raymond A Dwek, y Pauline

Bibliografía

- M Rudd. 2006. "Cancer-Associated Glycoforms of Gelatinase B Exhibit a Decreased Level Of," 15249–58.
- Fu, C., H. Zhao, Y. Wang, H. Cai, Y. Xiao, Y. Zeng, y H. Chen. 2016. "Tumor-Associated Antigens: Tn Antigen, STn Antigen, and T Antigen." *Hla* 88 (6): 275–86. <https://doi.org/10.1111/tan.12900>.
- Gabrilovich, Dmitry I., Hailei L. Chen, Khaled R. Girgis, H. Thomas Cunningham, GERALYN M. MENY, Sorena Nadaf, Denise Kavanaugh, y David P. Carbone. 1996. "Production of Vascular Endothelial Growth Factor by Human Tumors Inhibits the Functional Maturation of Dendritic Cells." *Nature Medicine* 2:10 2 (10): 1096–1103. <https://doi.org/10.1038/nm1096-1096>.
- Galon, Jérôme, y Daniela Bruni. 2019. "Approaches to Treat Immune Hot, Altered and Cold Tumours with Combination Immunotherapies." *Nature Reviews Drug Discovery* 18 (3): 197–218. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0007-y>.
- Gearing, A. J.H., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, et al. 1994. "Processing of Tumour Necrosis Factor- α Precursor by Metalloproteinases." *Nature* 370 (6490): 555–57. <https://doi.org/10.1038/370555a0>.
- Gill, David J., Joanne Chia, Jamie Senewiratne, y Frederic Bard. 2010. "Regulation of O-Glycosylation through Golgi-to-ER Relocation of Initiation Enzymes." *Journal of Cell Biology* 189 (5): 843–58. <https://doi.org/10.1083/JCB.201003055>.
- Granot, Zvi, Erik Henke, Elizabeth A. Comen, Tari A. King, Larry Norton, y Robert Benezra. 2011. "Tumor Entrained Neutrophils Inhibit Seeding in the Premetastatic Lung." *Cancer Cell* 20 (3): 300–314. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.012>.
- Hammond, M. Elizabeth H., Daniel F. Hayes, Mitch Dowsett, D. Craig Allred, Karen L. Hagerty, Sunil Badve, Patrick L. Fitzgibbons, et al. 2010. "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 28 (16): 2784–95. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.6529>.
- Hanahan, Douglas, y Robert A. Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100 (1): 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- . 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- He, Zhongyuan, Zheng Li, Xuan Zhang, Kai Yin, Weizhi Wang, Zhipeng Xu, Bowen Li, et al. 2018. "MiR-422a Regulates Cellular Metabolism and Malignancy by Targeting Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2 in Gastric Cancer Article." *Cell Death and Disease* 9 (5). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0564-3>.
- Heyer, Wolf Dietrich, Kirk T. Ehmsen, y Jie Liu. 2010. "Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes." <https://doi.org/10.1146/Annurev-Genet-051710-150955> 44 (November): 113–39. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-051710-150955>.
- Houghton, Alan N., y José A. Guevara-Patiño. 2004. "Immune Recognition of Self in Immunity against Cancer." *The Journal of Clinical Investigation* 114 (4): 468–71. <https://doi.org/10.1172/JCI22685>.
- Huang, Hao. 2018. "Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and

- MMP-9 Biosensors: Recent Advances." *Sensors (Switzerland)* 18 (10): 5–7. <https://doi.org/10.3390/s18103249>.
- Hynes, Nancy E., y Heidi A. Lane. 2005. "ERBB Receptors and Cancer: The Complexity of Targeted Inhibitors." *Nature Reviews Cancer* 2005 5:5 5 (5): 341–54. <https://doi.org/10.1038/nrc1609>.
- Jang, Jung Eun, Cristina H. Hajdu, Caroline Liot, George Miller, Michael L. Dustin, y Dafna Bar-Sagi. 2017. "Crosstalk between Regulatory T Cells and Tumor-Associated Dendritic Cells Negates Anti-Tumor Immunity in Pancreatic Cancer." *Cell Reports* 20 (3): 558–71. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.062>.
- Janke, Carsten, Krzysztof Rogowski, Dorota Wloga, Catherine Regnard, V Kajava, Jean-marc Strub, Nevzat Temurak, Juliette Van Dijk, y Dominique Boucher. 2005. "Tubulin Polyglutamylase Enzymes Are Members of the TTL Domain Protein Family." *Journal of the Franklin Institute* 202 (6): 834. [https://doi.org/10.1016/s0016-0032\(26\)90726-6](https://doi.org/10.1016/s0016-0032(26)90726-6).
- Jhunjhunwala, Suchit, Christian Hammer, y Lélia Delamarre. 2021. "Antigen Presentation in Cancer: Insights into Tumour Immunogenicity and Immune Evasion." *Nature Reviews Cancer* 21 (5): 298–312. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00339-z>.
- Juric, Vladi, Chris O'Sullivan, Erin Stefanutti, Maria Kovalenko, Andrew Greenstein, Vivian Barry-Hamilton, Igor Mikaelian, et al. 2018. "MMP-9 Inhibition Promotes Anti-Tumor Immunity through Disruption of Biochemical and Physical Barriers to T-Cell Trafficking to Tumors." *PLoS ONE* 13 (11): 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207255>.
- Kakugawa, Yoichiro, Tadashi Wada, Kazunori Yamaguchi, Hideaki Yamanami, Kiyoaki Ouchi, Ikuro Sato, y Taeko Miyagi. 2002. "Up-Regulation of Plasma Membrane-Associated Ganglioside Sialidase (Neu3) in Human Colon Cancer and Its Involvement in Apoptosis Suppression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16): 10718–23. <https://doi.org/10.1073/PNAS.152597199/ASSET/A3BA628F-2475-4D42-9AA0-5C9D5DCAB527/ASSETS/GRAPHIC/PQ1525971006.JPEG>.
- Kalluri, Raghu, y Robert A Weinberg. 2009. "Review Series The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition." *The Journal of Clinical Investigation* 119. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.
- Kannagi, Reiji, Jun Yin, Keiko Miyazaki, y Mineko Izawa. 2008. "Current Relevance of Incomplete Synthesis and Neo-Synthesis for Cancer-Associated Alteration of Carbohydrate Determinants—Hakomori's Concepts Revisited." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780 (3): 525–31. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2007.10.007>.
- Katz, Heather, y Mohamed Alsharedi. 2018. "Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer." *Medical Oncology* 35 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1007/S12032-017-1071-6/METRICS>.
- Kessenbrock, Kai, Vicki Plaks, y Zena Werb. 2010. "Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment." *Cell* 141 (1): 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>.
- Kitamura, Takanori, Bin Zhi Qian, y Jeffrey W. Pollard. 2015. "Immune Cell Promotion of Metastasis." *Nature Reviews Immunology* 15 (2): 73–86. <https://doi.org/10.1038/nri3789>.

Bibliografía

- Klein, T., y R. Bischoff. 2011. "Physiology and Pathophysiology of Matrix Metalloproteases." *Amino Acids*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0689-x>.
- Kobayashi, Tetsu, Hui Jung Kim, Xiangde Liu, Hisatoshi Sugiura, Tadashi Kohyama, Qihong Fang, Fu Qiang Wen, et al. 2014. "Matrix Metalloproteinase-9 Activates TGF- β and Stimulates Fibroblast Contraction of Collagen Gels." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 306 (11): L1006. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00015.2014>.
- Konno, Akira, Yutaka Hoshino, Shinya Terashima, Ryoichi Motoki, y Takanori Kawaguchi. 2002. "Carbohydrate Expression Profile of Colorectal Cancer Cells Is Relevant to Metastatic Pattern and Prognosis." *Clinical and Experimental Metastasis* 19 (1): 61–70. <https://doi.org/10.1023/A:1013879702702/METRICS>.
- Kowanetz, Marcin, Xiumin Wu, John Lee, Martha Tan, Thijs Hagenbeek, Xueping Qu, Lanlan Yu, et al. 2010. "Granulocyte-Colony Stimulating Factor Promotes Lung Metastasis through Mobilization of Ly6G+Ly6C+ Granulocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (50): 21248–55. https://doi.org/10.1073/PNAS.1015855107/SUPPL_FILE/PNAS.201015855SI.PDF.
- Kumamoto, Kensuke, Yoshiko Goto, Koji Sekikawa, Seiichi Takenoshita, Nobuhiro Ishida, Masao Kawakita, y Reiji Kannagi. 2001. "Increased Expression of UDP-Galactose Transporter Messenger RNA in Human Colon Cancer Tissues and Its Implication in Synthesis of Thomsen-Friedenreich Antigen and Sialyl Lewis A/X Determinants" | Cancer Research | American Association for Cancer Research." 2001. <https://aacrjournals.org/cancerres/article/61/11/4620/507652/Increased-Expression-of-UDP-Galactose-Transporter>.
- Kurozumi, Sasagu, Chitra Joseph, Sara Raafat, Sultan Sonbul, Yousif Kariri, Sami Alsaeed, Marian Pigera, et al. 2019. "Utility of Ankyrin 3 as a Prognostic Marker in Androgen-Receptor-Positive Breast Cancer." *Breast Cancer Research and Treatment* 176 (1): 63–73. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05216-w>.
- Laack, Eckart, Haleh Nikbakht, Anja Peters, Christian Kugler, Yvonne Jasiewicz, Lutz Edler, Dieter Kurt Hossfeld, y Udo Schumacher. 2002. "Lectin Histochemistry of Resected Adenocarcinoma of the Lung: Helix Pomatia Agglutinin Binding Is an Independent Prognostic Factor." *American Journal of Pathology* 160 (3): 1001–8. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64921-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64921-8).
- Langowski, John L., Robert A. Kastelein, y Martin Off. 2007. "Swords into Plowshares: IL-23 Repurposes Tumor Immune Surveillance." *Trends in Immunology* 28 (5): 207–12. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2007.03.006>.
- Langowski, John L., Xueqing Zhang, Lingling Wu, Jeanine D. Mattson, Taiying Chen, Kathy Smith, Beth Basham, Terrill McClanahan, Robert A. Kastelein, y Martin Off. 2006. "IL-23 Promotes Tumour Incidence and Growth." *Nature* 2006 442:7101 442 (7101): 461–65. <https://doi.org/10.1038/nature04808>.
- Lattanzi, Michael, Yesung Lee, Danny Simpson, Una Moran, Farbod Darvishian, Randie H. Kim, Eva Hernando, et al. 2019. "Primary Melanoma Histologic

- Subtype: Impact on Survival and Response to Therapy." *Journal of the National Cancer Institute* 111 (2): 186–88. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy086>.
- Legge, Sophie E., Hannah J. Jones, Kimberley M. Kendall, Antonio F. Pardiñas, Georgina Menzies, Matthew Bracher-Smith, Valentina Escott-Price, et al. 2019. "Association of Genetic Liability to Psychotic Experiences with Neuropsychotic Disorders and Traits." *JAMA Psychiatry* 76 (12): 1256–65. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.2508>.
- Lint, Philippe Van, y Claude Libert. 2007. "Chemokine and Cytokine Processing by Matrix Metalloproteinases and Its Effect on Leukocyte Migration and Inflammation." *Journal of Leukocyte Biology* 82 (6): 1375–81. <https://doi.org/10.1189/JLB.0607338>.
- L. A. Liotta, K. Tryggvason, S. Garbisa, Ian Hart, C. M. Foltz & S. Shafie. 1980. "Metastatic Potential Correlates with Enzymatic Degradation of Basement Membrane Collagen."
- Livak, Kenneth J., y Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method." *Methods* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Liyanage, Udaya K., Todd T. Moore, Hong-Gu Joo, Yoshiyuki Tanaka, Virginia Herrmann, Gerard Doherty, Jeffrey A. Drebin, et al. 2002. "Prevalence of Regulatory T Cells Is Increased in Peripheral Blood and Tumor Microenvironment of Patients with Pancreas or Breast Adenocarcinoma." *The Journal of Immunology* 169 (5): 2756–61. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.169.5.2756>.
- Malorni, L., P. B. Shetty, C. De Angelis, S. Hilsenbeck, M. F. Rimawi, R. Elledge, C. K. Osborne, S. De Placido, y G. Arpino. 2012. "Clinical and Biologic Features of Triple-Negative Breast Cancers in a Large Cohort of Patients with Long-Term Follow-Up." *Breast Cancer Research and Treatment* 136 (3): 795–804. <https://doi.org/10.1007/S10549-012-2315-Y/METRICS>.
- Mannino, Mark H., Ziwen Zhu, Huaping Xiao, Qian Bai, Mark R. Wakefield, y Yujiang Fang. 2015. "The Paradoxical Role of IL-10 in Immunity and Cancer." *Cancer Letters* 367 (2): 103–7. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2015.07.009>.
- Massagué, Joan. 2008. "TGF β in Cancer." *Cell* 134 (2): 215–30. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>.
- McQuibban, G. Angus, Georgina S. Butler, Jiang Hong Gong, Linda Bendall, Christopher Power, Ian Clark-Lewis, y Christopher M. Overall. 2001. "Matrix Metalloproteinase Activity Inactivates the CXC Chemokine Stromal Cell-Derived Factor-1." *Journal of Biological Chemistry* 276 (47): 43503–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107736200>.
- Mereiter, Stefan, Meritxell Balmaña, Diana Campos, Joana Gomes, y Celso A. Reis. 2019. "Glycosylation in the Era of Cancer-Targeted Therapy: Where Are We Heading?" *Cancer Cell* 36 (1): 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.06.006>.
- Mikucki, M. E., D. T. Fisher, J. Matsuzaki, J. J. Skitzki, N. B. Gaulin, J. B. Muhitch, A. W. Ku, et al. 2015. "Non-Redundant Requirement for CXCR3 Signalling during Tumoricidal T-Cell Trafficking across Tumour Vascular Checkpoints." *Nature Communications* 2015 6:1 6 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms8458>.
- Moore-Smith, Lakisha D, Tatyana Isayeva, Joo Hyoung Lee, Andra Frost, y Selvarangan

Bibliografía

- Ponnazhagan. 2017. "Silencing of TGF-B1 in Tumor Cells Impacts MMP-9 in Tumor Microenvironment." <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09062-y>.
- Mou, Haiwei, Jordan L. Smith, Lingtao Peng, Hao Yin, Jill Moore, Xiao Ou Zhang, Chun Qing Song, et al. 2017. "CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Induces Exon Skipping by Alternative Splicing or Exon Deletion." *Genome Biology* 18 (1): 4–11. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1237-8>.
- Moynahan, Mary Ellen, y Maria Jasin. 2010. "Mitotic Homologous Recombination Maintains Genomic Stability and Suppresses Tumorigenesis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11:3 11 (3): 196–207. <https://doi.org/10.1038/nrm2851>.
- Mumm, John B., Jan Emmerich, Xueqing Zhang, Ivan Chan, Lingling Wu, Smita Mauze, Steven Blaisdell, et al. 2011. "IL-10 Elicits IFN γ -Dependent Tumor Immune Surveillance." *Cancer Cell* 20 (6): 781–96. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.003>.
- Nagase, Hideaki, Robert Visse, y Gillian Murphy. 2006. "Structure and Function of Matrix Metalloproteinases and TIMPs." *Cardiovascular Research*. Oxford Academic. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>.
- Nguyen, Anh Tuan, Joanne Chia, Manon Ros, Kam Man Hui, Frederic Saltel, y Frederic Bard. 2017. "Organelle Specific O-Glycosylation Drives MMP14 Activation, Tumor Growth, and Metastasis." *Cancer Cell* 32 (5): 639-653.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.10.001>.
- Nyormoi, O, L Mills, y M Bar-Eli. 2003. "An MMP-2/MMP-9 Inhibitor, 5a, Enhances Apoptosis Induced by Ligands of the TNF Receptor Superfamily in Cancer Cells." *Cell Death and Differentiation* 10: 558–69. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401209>.
- Ohm, J. E., y D. P. Carbone. 2001. "VEGF as a Mediator of Tumor-Associated Immunodeficiency." *Immunologic Research* 23 (2–3): 263–72. <https://doi.org/10.1385/IR:23:2-3:263/METRICS>.
- Olkhanud, Purevdorj B., Dolgor Baatar, Monica Bodogai, Fran Hakim, Ronald Gress, Robin L. Anderson, Jie Deng, Mai Xu, Susanne Briest, y Arya Biragyn. 2009. "Breast Cancer Lung Metastasis Requires Expression of Chemokine Receptor CCR4 and Regulatory T Cells." *Cancer Research* 69 (14): 5996–6004. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4619/654997/P/BREAST-CANCER-LUNG-METASTASIS-REQUIRES-EXPRESSION>.
- Orlichenko, Lidiya S., y Derek C. Radisky. 2008. "Matrix Metalloproteinases Stimulate Epithelial-Mesenchymal Transition during Tumor Development." *Clinical and Experimental Metastasis* 25 (6): 593–600. <https://doi.org/10.1007/S10585-008-9143-9/METRICS>.
- Osinaga, Eduardo, Sylvie Bay, Diana Tello, Alvaro Babino, Otto Pritsch, Karine Assemet, Daniele Cantacuzene, Hiroshi Nakada, y Pedro Alzari. 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. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01248-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01248-5).
- Palena, Claudia, Duane H. Hamilton, y Romaine I. Fernando. 2012. "Influence of IL-8 on the Epithelial–Mesenchymal Transition and the Tumor Microenvironment." <http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fon.12.59> 8 (6): 713–22. <https://doi.org/10.2217/FON.12.59>.
- Piccart-Gebhart, Martine J., Marion Procter, Brian Leyland-Jones, Aron Goldhirsch,

Bibliografía

- Michael Untch, Ian Smith, Luca Gianni, et al. 2005. "Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer." *New England Journal of Medicine* 353 (16): 1659–72. https://doi.org/10.1056/NEJMOA052306/SUPPL_FILE/NEJM_PICCART_1659SA1-2.PDF.
- Pinho, Salomé S., y Celso A. Reis. 2015. "Glycosylation in Cancer: Mechanisms and Clinical Implications." *Nature Reviews Cancer* 15 (9): 540–55. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>.
- Pistelli, Mirco, Mariagrazia De Lisa, Zelmira Ballatore, Miriam Caramanti, Alessandra Pagliacci, Nicola Battelli, Francesca Ridolfi, et al. 2015. "Pre-Treatment Neutrophil to Lymphocyte Ratio May Be a Useful Tool in Predicting Survival in Early Triple Negative Breast Cancer Patients." <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1204-2>.
- Popp, Maximilian W., y Lynne E. Maquat. 2016. "Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine." *Cell* 165 (6): 1319–22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.053>.
- Pulaski, Beth A., y Suzanne Ostrand-Rosenberg. 1998. "Reduction of Established Spontaneous Mammary Carcinoma Metastases Following Immunotherapy with Major Histocompatibility Complex Class II and B7.1 Cell-Based Tumor Vaccines." *Cancer Research* 58 (7): 1486–93.
- Ram, Maya, Yaniv Sherer, y Yehuda Shoenfeld. 2006. "Matrix Metalloproteinase-9 and Autoimmune Diseases." *Journal of Clinical Immunology* 26 (4): 299–307. <https://doi.org/10.1007/s10875-006-9022-6>.
- Reily, Colin, Tyler J Stewart, Matthew B Renfrow, y Jan Novak. 2019. "Glycosylation in Health and Disease HHS Public Access." <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0129-4>.
- Ribas, Antoni, y Jedd D Wolchok. 2018. "Cancer Immunotherapy Using Checkpoint Blockade" 1355 (March): 1350–55.
- Rodríguez, Ernesto, Sjoerd T.T. Schetters, y Yvette Van Kooyk. 2018. "The Tumour Glyco-Code as a Novel Immune Checkpoint for Immunotherapy." *Nature Reviews Immunology* 18 (3): 204–11. <https://doi.org/10.1038/nri.2018.3>.
- Rosenblum, Gabriel, Philippe E. van den Steen, Sidney R. Cohen, Arkady Bitler, David D. Brand, Ghislain Opdenakker, and Irit Sagi. 2010. "Direct Visualization of Protease Action on Collagen Triple Helical Structure." *PLOS ONE* 5 (6): e11043. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0011043>.
- Salatino, Mariana, y Gabriel A Rabinovich. 2020. "Sweetening the Hallmarks of Cancer: Galectins as Multifunctional Mediators of Tumor Progression" 217 (2): 1–14.
- Saleh, Reem, y Eyad Elkord. 2020. "FoxP3+ T Regulatory Cells in Cancer: Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets." *Cancer Letters* 490 (October): 174–85. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2020.07.022>.
- Schietinger, Andrea, Mary Philip, Barbara A. Yoshida, Parastoo Azadi, Hui Liu, Stephen C. Meredith, y Hans Schreiber. 2006. "A Mutant Cheperone Converts a Wild-Type Protein into a Tumor-Specific Antigen." *Science* 314 (5797): 304–8. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1129200/SUPPL_FILE/SCHIETINGER.SOM.PDF.

- Schönbeck, Uwe, François Mach, y Peter Libby. 1998. "Generation of Biologically Active IL-1 β by Matrix Metalloproteinases: A Novel Caspase-1-Independent Pathway of IL-1 β Processing." *The Journal of Immunology* 161 (7): 3340–46. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.161.7.3340>.
- Schreiber, Robert D., Lloyd J. Old, y Mark J. Smyth. 2011. "Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion." *Science* 331 (6024): 1565–70. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.
- Semerad, Craig L., Fulu Liu, Alyssa D. Gregory, Katherine Stumpf, y Daniel C. Link. 2002. "G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood." *Immunity* 17 (4): 413–23. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00424-7).
- Seton-Rogers, Sarah. 2016. "Tumour Metabolism: Adapting to Harsh Conditions." *Nature Reviews Cancer* 16 (10): 616–17. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.98>.
- Shalem, Ophir, Neville E. Sanjana, y Feng Zhang. 2015. "High-Throughput Functional Genomics Using CRISPR-Cas9." *Nature Reviews Genetics* 16 (5): 299–311. <https://doi.org/10.1038/nrg3899>.
- Shankaran, Vijay, Hiroaki Ikeda, Allen T. Bruce, J. Michael White, Paul E. Swanson, Lloyd J. Old, y Robert D. Schreiber. 2001. "IFN γ , and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity." *Nature* 410 (6832): 1107–11. <https://doi.org/10.1038/35074122>.
- Shaul, Merav E., y Zvi G. Fridlender. 2019. "Tumour-Associated Neutrophils in Patients with Cancer." *Nature Reviews Clinical Oncology* 16 (10): 601–20. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0222-4>.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, y D. C. Klenk. 1985. "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid." *Analytical Biochemistry* 150 (1): 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Steen, Philippe E. Van den, Paul Proost, Anja Wuyts, Jo Van Damme, y Ghislain Opdenakker. 2000. "Neutrophil Gelatinase B Potentiates Interleukin-8 Tenfold by Aminoterminal Processing, Whereas It Degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- α and Leaves RANTES and MCP-2 Intact." *Blood* 96 (8): 2673–81. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V96.8.2673>.
- Steen, Philippe E. Van Den, Ilse Van Aelst, Vibeke Hvidberg, Helene Piccard, Pierre Fiten, Christian Jacobsen, Soren K. Moestrup, et al. 2006. "The Hemopexin and O-Glycosylated Domains Tune Gelatinase B/MMP-9 Bioavailability via Inhibition and Binding to Cargo Receptors." *Journal of Biological Chemistry* 281 (27): 18626–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512308200>.
- Stephen Hodi, F, Steven J O, David F McDermott, Robert W Weber, Jeffrey A Sosman, John B Haanen, Rene Gonzalez, et al. 2010. "Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma A Bs Tr Ac T." *N Engl j Med* 8: 711–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>.
- Stewart, C. Andrew, Hannah Metheny, Noriho Iida, Loretta Smith, Miranda Hanson, Folkert Steinhagen, Robert M. Leighty, et al. 2013. "Interferon-Dependent IL-10 Production by Tregs Limits Tumor Th17 Inflammation." *The Journal of Clinical Investigation* 123 (11): 4859–74. <https://doi.org/10.1172/JCI65180>.
- Sun, Limin, Michelle E. Diamond, Adam J. Ottaviano, Mathew J. Joseph, Vijayalakshmi

Bibliografía

- Ananthanarayan, y Hidayatullah G. Munshi. 2008. "Transforming Growth Factor-B1 Promotes Matrix Metalloproteinase-9- Mediated Oral Cancer Invasion through Snail Expression." *Molecular Cancer Research* 6 (1): 10–20. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0208>.
- Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, y Freddie Bray. 2021. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71 (3): 209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Swierczak, Agnieszka, Andrew D Cook, Jason C Lenzo, Christina M Restall, Judy P Doherty, Robin L Anderson, y John A Hamilton. 2014. "The Promotion of Breast Cancer Metastasis Caused by Inhibition of CSF-1R/CSF-1 Signaling Is Blocked by Targeting the G-CSF Receptor." <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0190>.
- Tang, Jun, Laura Pearce, Jill O'donnell-Tormey, y Vanessa M. Hubbard-Lucey. 2018. "Trends in the Global Immuno-Oncology Landscape (Nature Reviews Drug Discovery, (2018) 17, (783-784), 10.1038/Nrd.2018.202)." *Nature Reviews Drug Discovery* 17 (12): 783–84. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.167>.
- Topalian, Suzanne L., F. Stephen Hodi, Julie R. Brahmer, Scott N. Gettinger, David C. Smith, David F. McDermott, John D. Powderly, et al. 2012. "Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer." *New England Journal of Medicine* 366 (26): 2443–54. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1200690/SUPPL_FILE/NEJMOA1200690_DISCLOSURES.PDF.
- Turley, Shannon J., Viviana Cremasco, y Jillian L. Astarita. 2015. "Immunological Hallmarks of Stromal Cells in the Tumour Microenvironment." *Nature Reviews Immunology* 15 (11): 669–82. <https://doi.org/10.1038/nri3902>.
- Vandooren, Jennifer, Philippe E. Van Den Steen, y Ghislain Opdenakker. 2013. "Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9): The next Decade." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 48 (3): 222–72. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.770819>.
- Varki, Ajit. 2017. "Biological Roles of Glycans." *Glycobiology* 27 (1): 3–49. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww086>.
- Vasudevan, Deepika, y Robert S. Haltiwanger. 2014. "Novel Roles for O-Linked Glycans in Protein Folding." *Glycoconjugate Journal* 31 (6): 417–26. <https://doi.org/10.1007/S10719-014-9556-4/METRICS>.
- Waks, Adrienne G., y Eric P. Winer. 2019. "Breast Cancer Treatment: A Review." *JAMA - Journal of the American Medical Association* 321 (3): 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>.
- Wculek, Stefanie K, y Ilaria Malanchi. 2015. "Neutrophils Support Lung Colonization of Metastasis-Initiating Breast Cancer Cells." *Nature*, 1–21. <https://doi.org/10.1038/nature16140>.
- Welinder, Charlotte, Bo Baldetorp, Ola Blixt, Dorthe Grabau, y Bo Jansson. 2013. "Primary Breast Cancer Tumours Contain High Amounts of IgA1 Immunoglobulin: An Immunohistochemical Analysis of a Possible Carrier of the Tumour-Associated Tn Antigen." *PLOS ONE* 8 (4): e61749. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061749>.

Bibliografía

- Westermann, Lukas, Yong Li, Burulca Göcmen, Matthias Niedermoser, Kilian Rhein, Johannes Jahn, Isabel Cascante, et al. 2022. "Wildtype Heterogeneity Contributes to Clonal Variability in Genome Edited Cells." *Scientific Reports* 12 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22885-8>.
- Wimberly, Hallie, Jason R Brown, Kurt Schalper, Herbert Haack, Matthew R Silver, Christian Nixon, Veerle Bossuyt, Lajos Pusztai, Donald R Lannin, y David L Rimm. 2015. "PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer." <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0133>.
- Wolf, Anna Maria, Dominik Wolf, Michael Steurer, Guenther Gastl, Eberhard Gunsilius, y Beatrix Grubeck-Loebenstein. 2003. "Increase of Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Cancer Patients 1." <http://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/9/2/606/2086643/df0203000606.pdf>.
- Wolff, Antonio C., M. Elizabeth H. Hammond, David G. Hicks, Mitch Dowsett, Lisa M. McShane, Kimberly H. Allison, Donald C. Allred, et al. 2013. "Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast." *Journal of Clinical Oncology* 31 (31): 3997–4013. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.9984>.
- Woo, Seng Ryong, Leticia Corrales, y Thomas F. Gajewski. 2015. "Innate Immune Recognition of Cancer." <https://doi.org/10.1146/Annurev-Immunol-032414-112043> 33 (April): 445–74. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032414-112043>.
- Xue, Jun Chao, Han Yu Zhou, Liu Shen Yan Yu, y Yan Yan Wu. 2022. "Effect of IL-8 on Hepatocellular Carcinoma-Associated Metastasis by Targeting MMP9 in Mice." *Translational Cancer Research* 11 (7): 2050–60. <https://doi.org/10.21037/TCR-22-37/COIF>.
- Yeh, Charles D., Christopher D. Richardson, y Jacob E. Corn. 2019. "Advances in Genome Editing through Control of DNA Repair Pathways." *Nature Cell Biology* 2019 21:12 21 (12): 1468–78. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0425-z>.
- Yu, Qin, y Ivan Stamenkovic. 1999. "Localization of Matrix Metalloproteinase 9 to the Cell Surface Provides a Mechanism for CD44-Mediated Tumor Invasion." *Genes & Development* 13 (1): 35–48. <https://doi.org/10.1101/GAD.13.1.35>.
- . 2000. "Cell Surface-Localized Matrix Metalloproteinase-9 Proteolytically Activates TGF- β and Promotes Tumor Invasion and Angiogenesis." *Genes & Development* 14 (2): 163–76. <https://doi.org/10.1101/GAD.14.2.163>.
- Zhang, Wei, Yimin Shen, Huanhuan Huang, Sheng Pan, Jingxin Jiang, Wuzhen Chen, Ting Zhang, Chao Zhang, y Chao Ni. 2020. "A Rosetta Stone for Breast Cancer: Prognostic Value and Dynamic Regulation of Neutrophil in Tumor Microenvironment." *Frontiers in Immunology* 11 (August): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01779>.
- Zhang, Dongni, Wenping Lu, Zhili Zhuo, Heting Mei, Xiaoqing Wu, e Yongjia Cui. 2022. "Construction of a Breast Cancer Prognosis Model Based on Alternative Splicing and Immune Infiltration." *Discover Oncology* 13 (1). <https://doi.org/10.1007/s12672-022-00506-0>.
- Zheng, Pengli, Christopher J. Obara, Ewa Szczesna, Jonathon Nixon-Abell, Kishore K. Mahalingan, Antonina Roll-Mecak, Jennifer Lippincott-Schwartz, y Craig Blackstone. 2022. "ER Proteins Decipher the Tubulin Code to Regulate Organelle

Bibliografia

Distribution.” *Nature* 601 (7891): 132–38. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04204-9>.

Zheng, Pengli, Qingzhou Chen, Xiaoyu Tian, Nannan Qian, Peiyuan Chai, Bing Liu, Junjie Hu, et al. 2018. “DNA Damage Triggers Tubular Endoplasmic Reticulum Extension to Promote Apoptosis by Facilitating ER-Mitochondria Signaling.” *Cell Research* 28 (8): 833–54. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0065-z>.