



**FACULTAD DE
MEDICINA**



Maestría en Ciencias Biomédicas
Programa para la Investigación Biomédica **Pro.In.Bio**

Dra. Guillermina Rado

Directora académica: Dra. Teresa Freire

Codirectora académica: Dra. Valeria da Costa

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

Mayo 2026

Tabla de contenido

Abreviaturas	6
Agradecimientos	10
Resumen	12
Introducción	14
Cáncer de pulmón: relevancia epidemiológica y características clínicas	14
Glicosilación de proteínas: tipos, biosíntesis y relevancia en cáncer	14
N-glicosilación: biosíntesis, procesamiento y diversidad estructural	17
O-glicanos tipo mucina y su alteración en la transformación maligna	19
O-GlcNAcilación intracelular: regulación dinámica y rol en cáncer	21
Eje PD-1/PD-L1 y su papel en la modulación de la respuesta inmune adaptativa	22
Abordaje terapéutico del NSCLC	23
Glicosilación de PD-L1: regulación funcional, estabilidad y respuesta a la inmunoterapia	25
Metabolismo de la glucosa: rutas centrales y destinos celulares	28
Glucólisis: vía central del catabolismo de la glucosa	28
Ciclo de Krebs y regulación del metabolismo energético	30
Fosforilación oxidativa: producción mitocondrial de ATP acoplada al transporte de electrones	34
Fermentación láctica: regeneración de NAD⁺ en condiciones de anaerobias	36
Transportadores de glucosa y su papel en el metabolismo tumoral	36
Reprogramación metabólica tumoral: lactato, simbiosis metabólica y glicosilación	37
Heterogeneidad metabólica en el microambiente tumoral	39
Rol del lactato en la modulación del sistema inmune tumoral	40
Interacción entre reprogramación metabólica y glicosilación aberrante en cáncer	41
Particularidades del ciclo de Krebs en células tumorales	41
Hipótesis	44
Objetivo general	44
Objetivos específicos	44
Materiales y métodos	45
Cultivo celular	45

Citometría de flujo: caracterización del glicofenotipo y detección de PD-L1.....	46
Marcación extracelular de lectinas <i>in vitro</i>	46
Marcación intracelular de lectinas <i>in vitro</i>	46
Expresión de PD-L1 tras tratamiento con moduladores metabólicos.....	46
Detección de PD-L1 posterior al tratamiento con PNGasa-F <i>in vitro</i>	47
Procesamiento de muestras tumorales y análisis por citometría de flujo	47
Estudios de mitocondrias, ROS, necrosis y apoptosis.....	47
Procesamiento y análisis	48
Cuantificación de expresión génica por RT-PCR en tiempo real	48
Cuantificación de proteínas	50
Estudio del metabolismo celular.....	50
Ensayo de viabilidad celular con Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT).....	51
Determinación de lactato en medio de cultivo y en suero	52
Determinación de glucosa en medio de cultivo.....	53
Western blot y lectin blot	54
Evaluación del crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	56
Modelo de crecimiento tumoral	56
Estimulados <i>ex vivo</i> de esplenocitos murinos	57
ELISA INF- γ esplenocitos murinos	58
Resultados.....	59
Detección del antígeno Tn ⁺ mediante citometría de flujo.....	59
Caracterización funcional del metabolismo glucolítico y mitocondrial	61
Alteraciones en metabolitos extracelulares y parámetros bioenergéticos	63
Caracterización de la N-glicosilación y O-glicosilación intracelular (O-GlcNAc)	64
Expresión de genes relacionados al metabolismo celular	66
Efecto de la inhibición de la LDH	69
Efecto de la inhibición de LDH en la expresión génica de enzimas metabólicas	72
Efecto de la inhibición de LDH sobre la proliferación y viabilidad celular.....	76
Estudio de la expresión de PD-L1.....	77
Impacto de distintos inhibidores metabólicos sobre la expresión de PD-L1.....	78
Efecto de inhibidores de la glicosilación sobre la expresión de PD-L1	80
Impacto de distintos inhibidores metabólicos en el perfil de glicosilación celular.....	83
Impacto del tratamiento con oxamato en un modelo <i>in vivo</i>	85

Efecto del tratamiento anti-PD-L1 en tumores WT y Tn ⁺	89
<i>Discusión y perspectivas</i>	91
El antígeno Tn como marcador tumoral y modulador del microambiente tumoral	91
Reprogramación metabólica de las células Tn ⁺ : más allá del efecto Warburg clásico....	91
Regulación metabólica y redox de la expresión de PD-L1 en células Tn ⁺	99
Modulación metabólica mediante inhibición de LDH y efectos sobre PD-L1	99
Perspectivas.....	106
<i>Anexo</i>	108
<i>Bibliografía</i>	109

Abreviaturas

2-OG / α -KG / KG: α -cetoglutarato

4T1: línea celular murina de cáncer de mama

7-AAD: 7-aminoactinomicina D

Ac-CoA: acetil-coenzima A

ADP: adenosina difosfato

AA: antimicina A

ATP: adenosina trifosfato

ATP dep: consumo de oxígeno dependiente de ATP

ATP indep: consumo de oxígeno independiente de ATP

ATPsin: ATP sintasa

Basal OCR: velocidad de consumo de oxígeno basal

B7-1 (CD80): ligando coestimulador/inhibitorio CD80

BCA: ácido bicinconánico

CAF / CAFs: fibroblastos asociados a cáncer (*Cancer-Associated Fibroblasts*)

CAIX: anhidrasa carbónica IX

CBP: Cáncer de pulmón (cáncer bronquio pulmonar)

CoQ / UQ: coenzima Q / ubiquinona

CMYC: factor de transcripción c-Myc

ConA: Concanavalina A

CTC / CTCs: células tumorales circulantes (*Circulating Tumor Cells*)

Cyt c: citocromo c

DBA: lectina *Dolichos biflorus*

DCA: dicloroacetato

DHR123: dihidrorodamina 123

DLD (E3): dihidrolipoamida deshidrogenasa (subunidad E3 del complejo PDH)

DLAT (E2): dihidrolipoamida acetiltransferasa (E2 del complejo PDH)

DLST (E2k): dihidrolipoamida S-succiniltransferasa (subunidad del KGDHC)

E3BP / PDHX: proteína de unión a E3 (E3-binding protein; componente del complejo PDH)

ECAR: tasa de acidificación extracelular (*Extracellular Acidification Rate*)

ECPCP: nanopartículas/polímeros basados en PEG

EMT: transición epitelio–mesénquima (*Epithelial–Mesenchymal Transition*)

ER / RE: retículo endoplasmático

ETC: cadena de transporte de electrones (*Electron Transport Chain*)

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

F6P (F-6-P): fructosa-6-fosfato

FACS: citometría de flujo

FAD / FADH₂: flavín adenín dinucleótido (oxidado / reducido)

FCCP: carbonil cianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona

FDA: *Food and Drug Administration*

Fe-S: centro hierro–azufre

FMN: flavina mononucleótido

FucT / FucTs: fucosiltransferasa(s)

GA: glicosilación aberrante

GALA: vía de activación GalNAc-T

GALNT / ppGalNAc-T: polipéptido-GalNAc transferasas

GalNAc: N-acetilgalactosamina

GCNT / GCNTs: β 1,6-N-acetilglucosaminiltransferasas

GFAT: glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa

GFPT1 / GFPT2: glutamina–fructosa-6-fosfato aminotransferasa 1 / 2

GlcNAc: N-acetilglucosamina
GlcNAc-6P: N-acetilglucosamina-6-fosfato
GLS: glutaminasa
GLUD: glutamato deshidrogenasa
GLUL: glutamina sintetasa
GLUT / GLUTs: familia de transportadores de glucosa
GLUT1: transportador de glucosa 1
GNK: glucosamina quinasa
GNPNAT / GNPAT1: glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa
GPI: fosfoglucoisomerasa
G-6-P: glucosa-6-fosfato
Glyc: glucólisis
Glyc ferm: glucólisis fermentativa
Glyc ox: glucólisis oxidativa
GSH: glutatión reducido

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos (*Hepatocyte Growth Factor*)
HBP: vía biosintética de las hexosaminas (*Hexosamine Biosynthetic Pathway*)
HIF / HIFs: factores inducibles por hipoxia
HIF-1 α / HIF-2 α / HIF-3 α : subunidades alfa de HIF
HIF-1 β : subunidad beta constitutiva de HIF
HK: hexoquinasa
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)
HRE / HREs: elementos de respuesta a hipoxia

IACS-010759: inhibidor de OXPHOS (complejo I; según literatura)
ICI: inhibidores de puntos de control inmunitario (*Immune Checkpoint Inhibitors*)
IDH1 / IDH2 / IDH3 (IDH3A): isocitrato deshidrogenasa 1/2/3 (subunidad alfa en IDH3)
IFN- γ : interferón gamma
IGF2: Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 2
IHQ / IHQ: inmunohistoquímica
IL-10: interleucina 10
IMM: membrana mitocondrial interna
IMS: espacio intermembrana mitocondrial

KDM / JMJD: desmetilasas de histonas (dominio Jumonji C)
KGDHC: complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa

La (lactilación): modificación por grupo lactilo (según contexto)
LDH: lactato deshidrogenasa
LDH-A / LDHB: subunidades A/B de lactato deshidrogenasa
Le x / SLe x / Le y : antígenos Lewis x / sialil-Lewis x / Lewis y
LPS: lipopolisacárido

mAb / mAb (s): anticuerpo(s) monoclonal(es)
MAT: microambiente tumoral
MCT / MCTs: transportadores de monocarboxilatos
MDSC / MDSCs: células mieloides supresoras
MFI: mediana de intensidad de fluorescencia (*Median Fluorescence Intensity*)
MGL2: receptor lectínico (macrophage galactose-type lectin 2) que reconoce GalNAc/Tn
mtROS: especies reactivas del oxígeno mitocondriales
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NAD $^+$ / NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado / reducido)
NAGK: N-acetilglucosamina quinasa
Neu5Ac: ácido N-acetilneuramínico
NF- κ B: factor nuclear kappa B
NK: células *Natural Killer*
Non Mit OCR: consumo de oxígeno no mitocondrial

NSCLC: cáncer de pulmón de células no pequeñas (*Non-Small Cell Lung Cancer*)

OCR: tasa de consumo de oxígeno (*Oxygen Consumption Rate*)

O-GalNAc / O-GalNAcilación: O-glicosilación tipo mucina iniciada por GalNAc

O-GlcNAc / O-GlcNAcilación: O-glicosilación intracelular por GlcNAc

OGA: O-GlcNAcase (hidrolasa de O-GlcNAc)

OGDH (E1k): α -cetoglutarato deshidrogenasa (subunidad del KGDHC)

OGT: O-GlcNAc transferasa

OMM: membrana mitocondrial externa

OSMI-1: inhibidor de OGT

OST: oligosacariltransferasa

OXPHOS: fosforilación oxidativa

PCC: propionil-CoA carboxilasa

PD-1: receptor de muerte celular programada 1

PD-L1: ligando 1 de muerte celular programada

PDH / PDHc / PDHC: (complejo) piruvato deshidrogenasa

PDHA (PDHA1): subunidad E1 α del complejo PDH

PDHB: subunidad E1 β del complejo PDH

PDHX (E3BP): ver E3BP/PDHX

PDK / PDK1–PDK4: quinasas de la piruvato deshidrogenasa

PDP1: fosfatasa 1 del complejo PDH

PDX: xenoinjerto derivado de paciente (*Patient-Derived Xenograft*)

PEG: polietilenglicol

PFK1 / PFK-1: fosfofructoquinasa 1

PGK1: fosfoglicerato quinasa 1

PGM1 / PGM2: fosfoglucomutasa 1 / 2

PGM3: fosfoglucomutasa 3 (GlcNAc-fosfomutasa)

Pi: fosfato inorgánico

PHD / PHDs: prolil-hidroxilasas dependientes de 2-OG (regulan HIF)

PNGasa F: peptidil-N-glicosidasa F

PPP: vía de las pentosas fosfato

PPGalNAc-T: ver GALNT/ppGalNAc-T

PTMs: modificaciones postraduccionales

qPCR / RT-qPCR: PCR cuantitativa / PCR cuantitativa con transcripción reversa

RL2: anticuerpo anti-O-GlcNAc

ROS: especies reactivas del oxígeno

SCLC: cáncer de pulmón de células pequeñas (*Small Cell Lung Cancer*)

SDH: succinato deshidrogenasa

Ser / Thr / Asn: serina / treonina / asparagina

Seahorse: plataforma de análisis metabólico en tiempo real

sTn: antígeno sialil-Tn

TAM / TAMs: macrófagos asociados a tumor (*Tumor-Associated Macrophages*)

TAT: tirosina aminotransferasa

TCA: ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs)

TCR: receptor de células T (*T Cell Receptor*)

TET1–3: dioxigenasas TET

TGF- β 1: factor de crecimiento transformante beta 1

Th1: linfocitos T helper 1

TMG: Thiamet-G

TNBC: cáncer de mama triple negativo (*Triple-Negative Breast Cancer*)

Tn⁺ / Tn*: antígeno Tn⁺ / células positivas para Tn

TPP / ThDP: pirofosfato/difosfato de tiamina

TPP*: catión trifenílfosfonio (vector mitocondrial en fármacos)

Treg / Tregs: linfocitos T reguladores

UDP-GalNAc: uridina difosfato-N-acetilgalactosamina

UDP-GlcNAc: uridina difosfato-N-acetilglucosamina

UAP1: UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa

UTP: uridina-5'-trifosfato

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VHL: von Hippel-Lindau

VVL / VVA: lectina *Vicia villosa* (reconoce GalNAc/Tn)

WB: western blot

WGA: aglutinina de germen de trigo (*Wheat Germ Agglutinin*)

WT: tipo salvaje (*Wild Type*)

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer profundamente a mis tutoras, la Dra. Teresa Freire y la Dra. Valeria da Costa, por su apoyo constante y su compromiso a lo largo de todo este trabajo. En especial, les agradezco la confianza que depositaron en mí desde el inicio, cuando no sabía absolutamente nada del mundo científico, y la generosidad con la que me guiaron en este camino.

Agradezco también a los integrantes del laboratorio, Juan Oliva, María Eugenia Cedrés, Mercedes Landeira, Pablo Lores, Monique Costa, Matías Chalkling, Sofia Balbuena, Ignacio García, Florencia Festari, Miguel Suarez, Santiago Rodríguez, por el apoyo cotidiano, las discusiones científicas, la colaboración experimental y el excelente ambiente de trabajo, que hicieron de este proceso una experiencia de aprendizaje enriquecedora tanto a nivel profesional como personal.

A la Dra. Celia Quijano y a la Dra. Inés Marmisolle, por su valioso apoyo y asesoramiento en la realización de los experimentos de metabolismo celular.

A la Facultad de Medicina y al Programa de Posgrado pro.In.Bio, agradezco el espacio de formación, los recursos brindados y el marco institucional que permitió llevar adelante esta tesis. Asimismo, reconozco el apoyo de las instituciones y organismos que financiaron este trabajo. A la CAP por la beca de Maestría y Finalización. A CSIC, por el financiamiento del proyecto “Estudio del metabolismo de la glucosa y la glicosilación aberrante en las propiedades inmunomoduladores y angiogénicas en el cáncer de pulmón”. Al programa MIA de CSIC por el financiamiento para la asistencia al 14.º Congreso Latinoamericano y del Caribe de Inmunología.

A los miembros del tribunal, por tomarse el tiempo de evaluar este trabajo.

Finalmente, agradezco a mi familia y a mis amigas por su acompañamiento incondicional, su paciencia y su apoyo permanente, que fueron esenciales para transitar este proceso con dedicación y perseverancia.

Resumen

Las células cancerosas presentan una reprogramación metabólica caracterizada por una dependencia de la glicólisis anaerobia aun en presencia de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Warburg. Esta alteración metabólica conduce a la producción de grandes cantidades de lactato en el microambiente tumoral (MAT), así como a un aumento del flujo de glucosa hacia vías alternativas de procesamiento, como la vía biosintética de las hexosaminas (HBP). Se ha reportado que el incremento del lactato en el MAT favorece el crecimiento tumoral y la evasión inmunológica de las células tumorales mediante el aumento de la expresión de PD-L1 en membrana, una molécula clave en la inmunorregulación. En paralelo, los adenocarcinomas presentan patrones de glicosilación aberrante (GA), los cuales se asocian con una mayor agresividad e invasión tumoral. En este contexto, resulta relevante destacar que la vía HBP es responsable de la generación del intermediario carbohidrato común UDP-GlcNAc, necesario tanto para la glicosilación intracelular como extracelular de las proteínas.

En función de estos antecedentes, el objetivo del presente proyecto es analizar cómo la O-glicosilación aberrante se asocia con el metabolismo de la glucosa, y cómo estas alteraciones influyen en las características inmunoregulatoras de la célula tumoral. Para ello, se utilizó un modelo de cáncer de pulmón con GA desarrollado en nuestro laboratorio mediante la tecnología CRISPR/Cas9, a partir de la mutación de la chaperona COSMC en la línea tumoral murina de carcinoma de Lewis LL/2.

Entre nuestros hallazgos, observamos que las células con GA presentan un metabolismo energético exacerbado en comparación con las células WT. Este fenotipo se caracteriza por un alto consumo de oxígeno junto con un metabolismo glucolítico predominantemente fermentativo. Asimismo, estas células exhiben una mayor actividad mitocondrial, un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y una expresión diferencial de enzimas metabólicas. Encontramos además una relación directa entre el metabolismo celular y la glicosilación proteica, ya que la utilización de múltiples inhibidores de enzimas metabólicas indujo un patrón alterado de reconocimiento por lectinas. En líneas

generales produce alteraciones tanto en vías de la O-glicosilación y N-glicosilación membrana rías, como en la O-glicosilación intracelular.

Otro hallazgo relevante fue que la inhibición de la producción de lactato mediante oxamato, un inhibidor de la lactato deshidrogenasa (LDH-A), incrementó la detección de PD-L1 a nivel proteico. De manera similar, la deglicosilación de PD-L1 mediante PNGasa-F aumentó su detección proteica. Sin embargo, en contraste con estos resultados, la inhibición de LDH-A se asoció con una disminución en la expresión de PD-L1 a nivel transcripcional.

Finalmente, nuestro modelo de GA presentó una mayor detección de PD-L1 en células tumorales *in vitro* e *in vivo*, acompañada de una respuesta *in vivo* superior a la inmunoterapia anti-PD-L1. Además, evidenciamos que las células con GA fueron más susceptibles a la inhibición de LDH-A *in vivo*, reforzando la estrecha interrelación entre metabolismo, glicosilación y respuesta inmunológica tumoral. En conjunto, estos resultados respaldan un modelo en el cual la intersección entre el estado metabólico y las vías de glicosilación desempeña un papel central en la regulación de PD-L1 y en la modulación de la eficacia de la inmunoterapia, destacando a la GA como potenciales biomarcadores predictivos de respuesta a inmunoterapia.

Introducción

Cáncer de pulmón: relevancia epidemiológica y características clínicas

El cáncer representa uno de los principales desafíos en términos sociales, de salud pública y económicos en el siglo XXI y constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con alrededor de 10 millones anuales (1).

En el año 2022 el cáncer de pulmón (CBP) causó alrededor de 1.8 millones de muertes a nivel mundial, convirtiéndose en el tipo de cáncer con mayor mortalidad (1). En Uruguay, este tipo de cáncer ocupa el segundo lugar entre los cánceres más frecuentes en hombres y el tercero en mujeres, siendo el más mortal en hombres y la tercera causa de muerte por cáncer en mujeres (2). Las tasas de incidencia y mortalidad en nuestro país están entre las más altas a nivel mundial en hombres, y en el segundo quintil en mujeres (2).

El CBP se divide en dos tipos según sus características histológicas: células no pequeñas (NSCLC, del inglés Non-Small Cell Lung Cancer) y de células pequeñas (SCLC, del inglés Small Cell Lung Cancer) (3). El NSCLC es el más común, representando entre el 80 y el 85% de los casos, y se clasifica según su histología en adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas y carcinomas de células grandes (4). La tasa de supervivencia a 5 años para el NSCLC es del 32 %, lo que es inferior al de otros tipos de cáncer (5).

Glicosilación de proteínas: tipos, biosíntesis y relevancia en cáncer

La glicosilación de proteínas es un proceso esencial en la biología. Los glicanos cumplen diversas funciones, como el mantenimiento de la estructura celular, las interacciones entre células, las interacciones con la matriz extracelular, la regulación de la integridad y función de las proteínas, la señalización de receptores y la modulación de las respuestas inmunitarias (6).

En células de mamífero existen varios tipos de glicosilación, que describimos a continuación:

Para glicoproteínas membranales y extracelulares:

- **N-glicosilación**, glicanos unidos a un residuo de asparagina (Asn) dentro de una secuencia peptídica consenso conocida como Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto la prolina (Figura 1) (6).
- **O-GalNAcilación**, glicanos que se unen a los grupos hidroxilo de los residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) (Figura 1) (6).

Para glicoproteínas intracelulares en citoplasma o núcleo:

- **O-GlcNAcilación**, una glicosilación no canónica que consiste en un residuo único (no elongado) de GlcNAc unido a una serina (Ser) o treonina (Thr) en proteínas intracelulares (Figura 1) (6).

El proceso de glicosilación depende de la producción de un donante común, uridina difosfato N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), que se genera a través de la vía de las hexosaminas (HBP, Figura 1)(6).

Esta vía consume aproximadamente entre el 2 y el 5 % de la glucosa que ingresa a las células no tumorales y, en conjunto con la glutamina, la acetil-coenzima A (Ac-CoA) y el uridina-5'-trifosfato (UTP), permite la síntesis del aminoazúcar UDP-GlcNAc (7). La HBP comparte sus dos pasos iniciales con la glucólisis, separándose de esta última a nivel de la fructosa-6-fosfato (F6P) (7).

El paso limitante de la vía está catalizado por la glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT, Figura 1), que convierte F6P y glutamina en glucosamina-6-fosfato y glutamato (7). Asimismo, la glucosamina que ingresa a la célula puede ser fosforilada a glucosamina-6-fosfato por acción de la glucosamina quinasa (GNK) (7). Posteriormente, la glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa (GNPNAT, Figura 1) utiliza Ac-CoA para generar N-

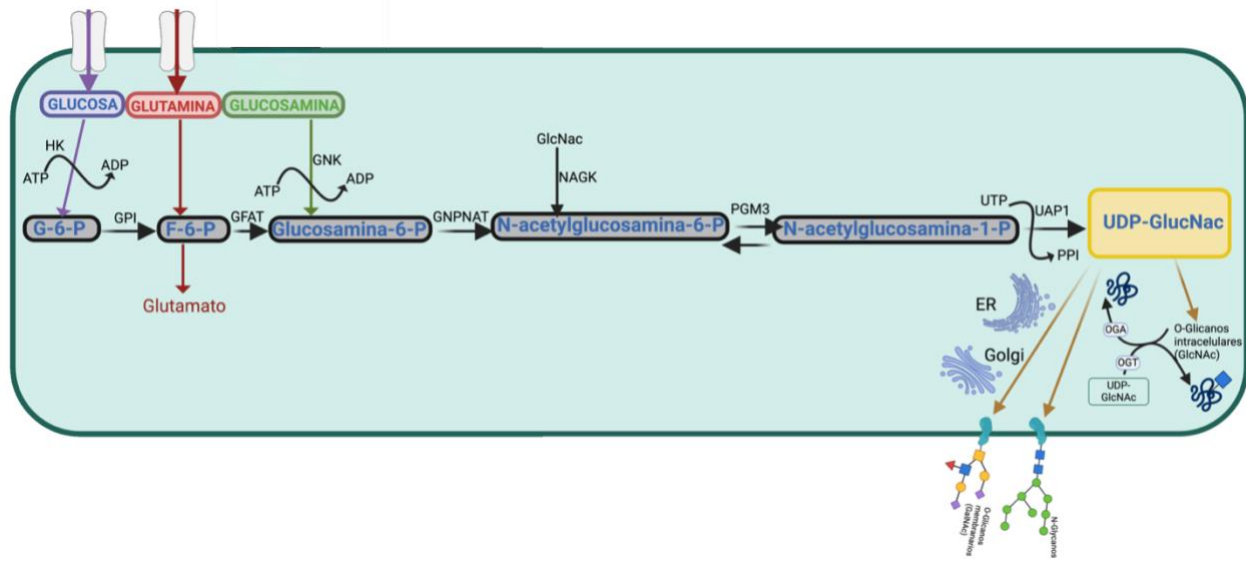


Figura 1. Integración del metabolismo de la glucosa y la glicosilación celular.

Esquema de la HBP, mostrando la convergencia metabólica hacia la síntesis de **UDP-GlcNac**, donador común de azúcares para la glicosilación de proteínas. HK, hexoquinasa; GPI, fosfoglucoisomerasa; GFAT, glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa; GNPAT, glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa; NAGK, N-acetilglucosamina quinasa; GNK: quinasa de glucosamina PGM3, fosfoglucomutasa 3 (GlcNac-fosfomutasa); UAP1, UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa; G-6-P, glucosa-6-fosfato; F-6-P, fructosa-6-fosfato; UDP-GlcNac, uridina difosfato N-acetilglucosamina; ER, retículo endoplasmático; Golgi, aparato de Golgi.

acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNac-6P, Figura 1) (7). Este intermediario es luego convertido a GlcNac-1-fosfato mediante la GlcNac-fosfomutasa (PGM3, Figura 1) (7). Finalmente, la UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa (UAP1, Figura 1) cataliza la reacción entre GlcNac-1-fosfato y UTP para producir UDP-GlcNac (7).

Existe abundante evidencia que demuestra que los adenocarcinomas presentan modificaciones en la glicosilación de proteínas, lo que conduce a la generación de patrones de glicanos aberrantes. Estas alteraciones incluyen la pérdida o sobreexpresión de determinados glicanos, el aumento de estructuras incompletas o truncadas y, en menor medida, la aparición de nuevas estructuras glicosídicas, contribuyendo a una mayor diversidad molecular dentro

del microambiente tumoral (MAT) (8), esta glicosilación aberrante impacta sobre la proliferación y supervivencia celular, así como sobre la modulación de la respuesta inmune antitumoral, favoreciendo de este modo el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis (9). Se postula que este patrón diferencial de glicosilación en las células tumorales podría originarse a partir de modificaciones en el flujo de la HBP, de la reprogramación metabólica, así como de mutaciones o cambios en la expresión y actividad de las enzimas responsables de los procesos de glicosilación, entre otros factores (7).

N-glicosilación: biosíntesis, procesamiento y diversidad estructural

La síntesis de los N-glicanos presenta dos fases (Figura 2) (6). La primera ocurre en el retículo endoplasmático (RE) y comienza con el ensamblado del precursor de N-glicanos ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) sobre el carrier lipídico dolicol fosfato (Dol-P) que luego es transferido en bloque a una Asn, en una secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, sobre proteínas secretorias o membranas por el complejo oligosacáridotransferasa (Ost) (Figura 2) (6).

En la segunda fase, este oligosacárido es procesado por una serie de glicosidasas y posteriormente glicosiltransferasas en el lumen del ER y en el aparato de Golgi, para, por último, dirigirse a la membrana celular (Figura 2) (6). Durante este procesamiento, emergen tres estructuras principales de N-glicanos:

- I) El tipo alto en manosa (sintetizado en el RE), son glicanos inmaduros (Figura 2) (6).
- II) El tipo híbrido, (sintetizado en Golgi), estos son un punto medio entre los otros dos tipos de N-Glicanos (6).
- III) El tipo complejo, también sintetizado en el aparato de Golgi, este tipo de glicano se caracteriza por la adición de N-acetilglucosamina (GlcNAc), llevando a la

elongación de las cadenas conocidas como antenas (estructuras bi-, tri- o tetra-antennarias) (6).

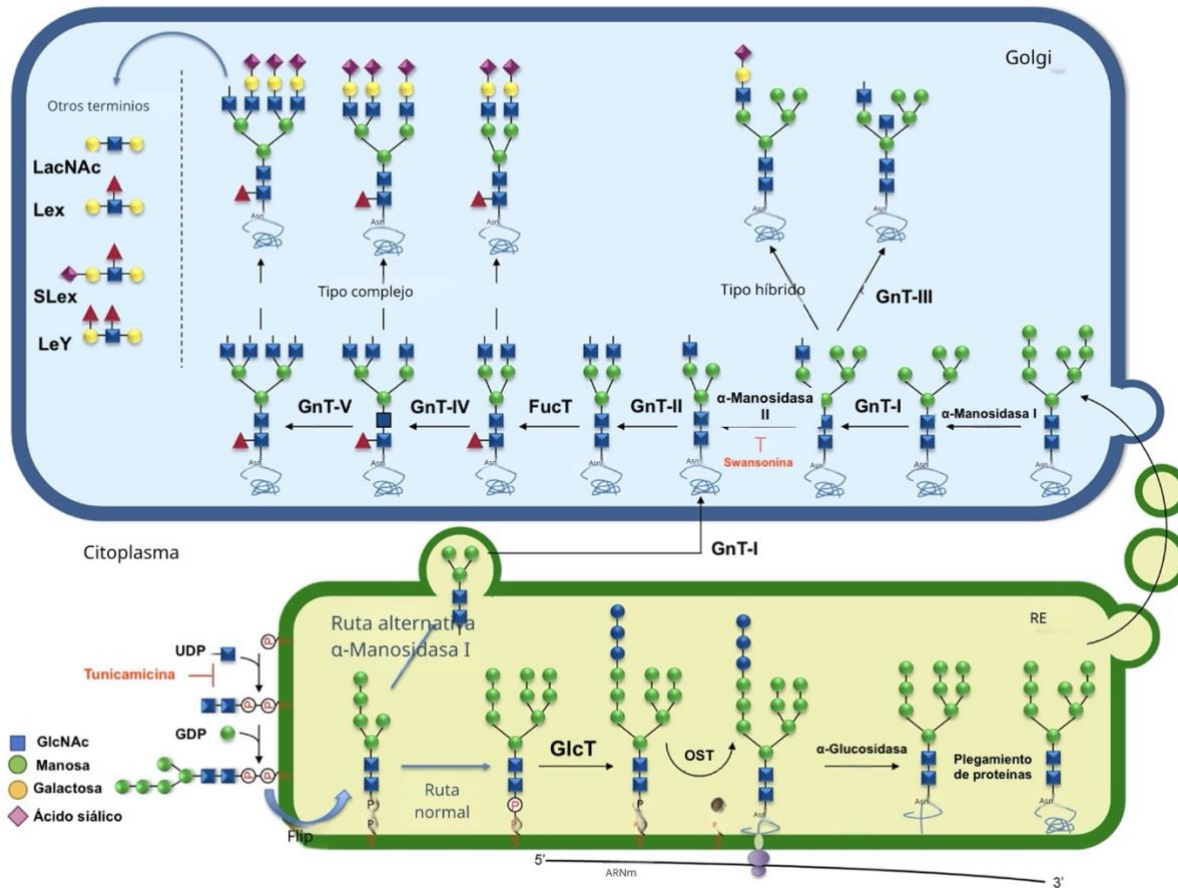


Figura 2. Procesamiento de N-glicanos en el RE y el aparato de Golgi.

Esquema del procesamiento secuencial de los N-glicanos desde su ensamblaje inicial en el retículo endoplasmático (RE) hasta la generación de estructuras de tipo alto en manosa, híbridas y complejas en el aparato de Golgi. En el RE, el oligosacárido precursor es transferido a residuos de asparagina (Asn) por la oligosacaryltransferasa (OST) y posteriormente procesado por α -glucosidasas y α -manosidasas. En el Golgi, la acción coordinada de N-acetilglucosaminiltransferasas (GnT-I, GnT-II, GnT-III, GnT-IV y GnT-V), α -manosidasa II y fucosiltransferasas (FucT) conduce a la formación de N-glicanos complejos y a la generación de motivos como LacNAc, Lewis x (Le^x), sialil-Lewis x ($SLex$) y Lewis y (Le^y). Se indican inhibidores clásicos de la vía, incluyendo tunicamicina (OST), castanospermine (Cast) y 1-deoxynojirimicina (DNJ) (α -glucosidasas), 1-deoxymannojirimicina (DMJ) (α -manosidasa I) y swainsonina (α -manosidasa II). Imagen adaptada de: Vasconcelos-dos-Santos A, Oliveira IA, Lucena MC, Mantuano NR, Whelan SA, Dias WB, et al. Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for

O-glicanos tipo mucina y su alteración en la transformación maligna

Los O-glicanos de tipo mucina (O-GalNAc), se sintetizan en el aparato de Golgi y, a diferencia de los N-glicanos, se añaden en tándem al núcleo peptídico de una proteína (10) (Figura 3).

El primer paso en la biosíntesis de los glicanos O-GalNAc consiste en la incorporación de GalNAc (proveniente de UDP-GalNAc) a una Ser o Thr a través de un enlace α , gracias a la acción de una familia de enzimas conocidas como polipéptido-GalNAc transferasas (ppGalNAc-Ts o GALNTs) (Figura 3) (11).

Luego, la T-sintasa, también conocida como core 1 β 1,3-galactosiltransferasa (C1GALT1), cataliza la galactosilación del O-GalNAc para formar el core 1 (Gal β 1-3GalNAc-O-Ser/Thr) (12) (Figura 3). Esta actividad está presente en la mayoría de las células, pero requiere de la chaperona molecular C1GALT1C1 (COSMC) para el correcto plegado de la T-sintasa y por tanto, para su correcto funcionamiento (Figura 3)(13).

El core 2 se genera a partir del core 1 mediante la incorporación de una GlcNAc ramificada en enlace β 1-6, reacción catalizada por las β 1,6-N-acetilglucosaminiltransferasas del core 2 (GCNT1, GCNT2 y GCNT3 en humanos) (14) (Figura 3). Alternativamente, la adición

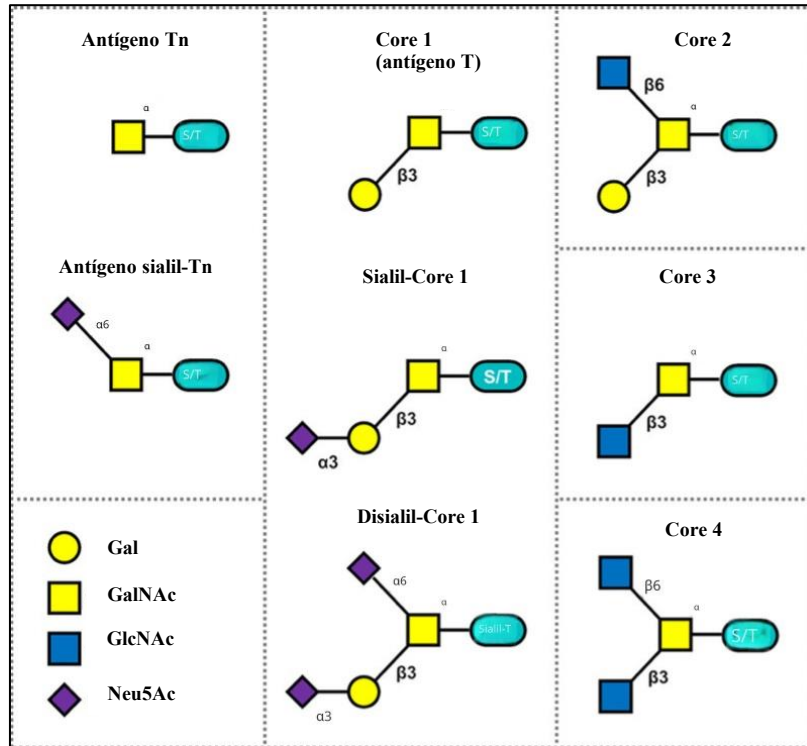


Figura 3. Estructuras representativas de O-glicanos tipo mucina.

Esquema de los principales O-glicanos derivados de la O-GalNAcilación, incluyendo el antígeno Tn, sialil-Tn, core 1 (antígeno T), core 2, core 3, core 4 y sus variantes sialiladas. Los glicanos se muestran unidos a residuos de serina/treonina (S/T). Imagen adaptada de: Thompson, Nicole & Wakarchuk, Warren. (2022). O-glycosylation and its role on therapeutic proteins. Bioscience reports. 42. 10.1042/BSR20220094.

de GlcNAc a través de un enlace β 1-3 da lugar a la formación del core 3, proceso mediado por la β 1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa 6 (B3GNT6) (15) (Figura 3). El core 3 puede servir como sustrato para la enzima core 4, GCNT3, que añade GlcNAc en un enlace β 1-6 a GalNAc (Figura 3) (11).

En numerosos cánceres humanos se observa un proceso de O-glicosilación incompleta que conduce a la expresión en la superficie celular de O-glicanos truncados (16). Entre estos se incluyen el antígeno Tn, su forma sialilada sialil-Tn(sTn) y el antígeno T elongado. Estas estructuras han sido identificadas en distintos tipos de cáncer, como pulmón, colon, estómago

y páncreas, y se asocian estrechamente con la transformación maligna, el aumento de la proliferación tumoral y el desarrollo de capacidades metastásicas (17–21).

La aparición de O-glicanos truncados en el cáncer se atribuye a múltiples mecanismos, entre los que se encuentran la sobreexpresión de GALNTs (22) o de sialiltransferasas (23), la relocalización de GALNTs desde el aparato de Golgi hacia el RE mediante la vía GALA (24,25), alteraciones en el pH intracelular (26), así como la hipermetilación de histonas o mutaciones en la chaperona asociada a la T-sintasa, COSMC (27,28), entre otros factores. En ausencia de una COSMC funcional, la T-sintasa no se pliega correctamente, lo que impide la elongación de los core 1 y 2 (29) y favorece la acumulación significativa de los antígenos Tn y sTn en la superficie celular (30).

Nuestro laboratorio ha desarrollado modelos preclínicos para evaluar la función inmunomoduladora y angiogénica de la glicosilación incompleta en el CBP. Concretamente, generamos líneas celulares que presentan un bloqueo de la O-glicosilación induciendo la expresión del glicoantígeno tumoral Tn y así pudimos evaluar su función durante el crecimiento tumoral (17). Para ello generamos células tumorales que expresan el antígeno Tn modificadas genéticamente por medio de la tecnología CRISPR/Cas9 en las líneas tumorales murinas de carcinoma de Lewis, LL/2, al mutar la chaperona COSMC (17). Los principales resultados obtenidos muestran un crecimiento tumoral acelerado en ratones con tumores Tn⁺, así como un aumento en el infiltrado inmune de linfocitos T reguladores, acompañado por una mayor expresión de IL-10 (17).

O-GlcNAcilación intracelular: regulación dinámica y rol en cáncer

Como se señaló previamente, la O-GlcNAcilación es una forma particular de glicosilación que consiste en la adición de un único residuo de GlcNAc, no elongado, a residuos de Ser o Thr de proteínas intracelulares (31). A diferencia de otros tipos de glicosilación, este proceso tiene lugar en compartimentos como el citosol, el núcleo o la mitocondria (32).

La O-GlcNAcilación es un proceso altamente dinámico y reversible, en el cual la incorporación de GlcNAc es catalizada por la O-GlcNAc transferasa (OGT), mientras que su remoción está mediada por la O-GlcNAcase (OGA) (Figura 1) (31). Se ha propuesto que este tipo de glicosilación actúa de manera coordinada con la fosforilación, funcionando como un sistema regulatorio del tipo “encendido–apagado” que modula numerosos procesos intracelulares, incluyendo la actividad proteica y la regulación de la expresión génica, un ejemplo de esto último es que la modificación epigenética mediante la monoubiquitinación de la histona H2B en la Lys120 inhibe el metabolismo tipo Warburg y el desarrollo tumoral, esto está regulado por O-GlcNAcilación en la ser112 de dicha proteína (33,34).

Asimismo, la O-GlcNAcilación se activa en respuesta a la privación de nutrientes y a condiciones de estrés celular (35), desempeñando un rol clave en el desarrollo y la progresión del cáncer (36). Este fenómeno se ha reportado en el cáncer de mama (37,38), de próstata (39), de pulmón (40), colo-rectal (40,41) y de hígado (42).

Por otro lado, se ha mostrado una relación entre los niveles de O-GlcNAc y diversas características distintivas del cáncer, como angiogénesis y metástasis (43). Además, muchos supresores tumorales y oncogenes conocidos por ser iniciadores clave (*drivers*) del fenotipo maligno, están regulados por O-GlcNAc (como p53, NFκB, c-Myc, HIF-1α y AKT) (43).

Eje PD-1/PD-L1 y su papel en la modulación de la respuesta inmune adaptativa

El receptor de muerte celular programada 1 (PD-1) es una proteína transmembrana perteneciente a la familia CD28/CTLA-4, que se expresa en diversas células del sistema inmune activadas, como linfocitos T, linfocitos B, monocitos y otras células inmunes. Su interacción con su ligando PD-L1 en células dendríticas (CD) regula negativamente la respuesta inmune, favoreciendo la tolerancia inmunológica y el mantenimiento de la homeostasis (44).

Sin embargo, en el contexto tumoral, la interacción de PD-1 en las células T con PD-L1 en las células tumorales, las CD o los macrófagos, conduce a la inhibición de la proliferación de

los linfocitos T y su producción de citoquinas, constituyendo un mecanismo de evasión inmunológica (45,46). Asimismo, la vía PD-1/PD-L1 favorece, no solo, el agotamiento de las células T, sino que también promueve el desarrollo de células T reguladoras (Tregs) y la disminución de la respuesta inmune humoral, ya que las células B pueden expresar PD-1 o PD-L1 (45,46).

PD-L1 puede interactuar con B7-1 (CD80) presente en la membrana de las CD, una proteína que regula la activación o inhibición de las células T a través de CD28 y CTLA-4 (47). Esta interacción PD-L1:B7-1 puede ocurrir en cis o en trans. La unión en cis interfiere con la señalización de los ejes PD-1/PD-L1 y B7-1/CTLA-4, favoreciendo la activación y proliferación de las células T, mientras que la interacción en trans se asocia con una disminución de la activación de las células T(47). En conjunto, estos mecanismos destacan la complejidad de las interacciones de PD-L1 en la modulación de la respuesta inmune, más allá del eje clásico PD-1/PD-L1, y subrayan la importancia del contexto celular en la regulación de la activación o inhibición de las células T (47).

Abordaje terapéutico del NSCLC

El tratamiento de los pacientes con NSCLC ha involucrado tradicionalmente una aproximación multidisciplinaria, incluyendo una combinación de cirugía, radioterapia, y/o quimioterapia (QT), dependiendo de la resecabilidad, el estadio del cáncer, el subtipo histológico (escamoso frente a no escamoso) y el estado general del paciente (4). Un alto porcentaje de los pacientes con NSCLC experimenta una refractariedad innata o una resistencia secundaria a los tratamientos tradicionales, lo que pone de manifiesto la necesidad de explorar alternativas terapéuticas innovadoras (45). Hoy en día contamos con estrategias más novedosas como la inmunoterapia (IT) utilizando los inhibidores de puntos de control inmunitarios (por su sigla en inglés: ICI) (48).

Entre los ICI se encuentran los anticuerpos monoclonales dirigidos a las proteínas PD-1 y PD-L1 así como los anticuerpos anti-CTLA4; estos últimos se utilizan menos frecuentemente

en el tratamiento del NSCLC (48,49). Atezolizumab y pembrolizumab son anticuerpos monoclonales (mAbs) que se dirigen a PD-L1 y PD-1, respectivamente (Figura 4) (50,51). La FDA ha aprobado el uso de estas terapias para una amplia variedad de cánceres, incluidos el NSCLC, el carcinoma hepatocelular y el melanoma. Pembrolizumab también está aprobado para el linfoma de Hodgkin clásico, cáncer colorrectal, gástrico, esofágico, cervical, renal y de mama triple negativo (50,51).

Se ha descrito que las ICI generan un aumento significativo en la supervivencia de los pacientes con NSCLC en comparación con la QT convencional, tanto en estudios de vida real (EVR) (52–54), como en ensayos clínicos aleatorizados (ECA) (55–57). Además, existe evidencia de que los pacientes con NSCLC que recibieron ICI en monoterapia presentaron una supervivencia mayor frente a quienes recibieron regímenes combinados (58). Sin embargo, solo una pequeña porción de los mismos desarrolla respuestas clínicas duraderas, mientras que la mayoría desarrollan respuestas transitorias o son refractarios al tratamiento (58,59).

La tasa de respuesta a la inmunoterapia PD1/PD-L1 en pacientes no seleccionados con NSCLC es solo del 15–20%, mientras que aumenta hasta el 45% en pacientes positivos para PD-L1 (49). Generalmente, la expresión de PD-L1 se evalúa mediante inmunohistoquímica (IHQ) de muestras de biopsia del tejido. Sin embargo, la detección mediante esta técnica no siempre se correlaciona con la respuesta real del paciente al tratamiento (60), ya que las respuestas también pueden ocurrir en pacientes que no expresan PD-L1 (58). Esto podría deberse a que la glicosilación de PD-L1 afecta la unión con el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 (60), lo que lleva a lecturas inexactas de expresión en algunas muestras de pacientes, lo que resulta en resultados terapéuticos aparentemente inconsistentes. Además, la eliminación de los N-glicanos de PD-L1 mediante el uso de la enzima peptídica-N-glicosidasa-F (PNGasa-F) mejora la señal anti-PD-L1 por IHQ (60). Así, la selección adecuada de pacientes con cáncer capaces de responder a la inmunoterapia anti-PD1 representa un enorme desafío clínico. En este contexto, la desglucosilación de biopsias tumorales podría representar un enfoque novedoso para la selección de candidatos para la terapia anti-PD1.

Interesantemente, la expresión de PD-L1 puede verse alterada por la interacción con otros fármacos y moléculas, como la metformina (61), amlodipina (62), estatinas (63), colesterol (64), Vitamina D (65) y lactato (66). Además, factores como la microbiota (67–72), el uso de antibióticos (73,74) y los niveles de lactato deshidrogenasa A (LDHA) (75,76) pueden ser predictores de la respuesta o no a la ICI en NSCLC.

Glicosilación de PD-L1: regulación funcional, estabilidad y respuesta a la inmunoterapia

PD-L1 es una glicoproteína, sufre glicosilación en residuos específicos, principalmente en N35, N192, N200 y N219 para N- glicosilación, y O176 para O- glicosilación, en humanos

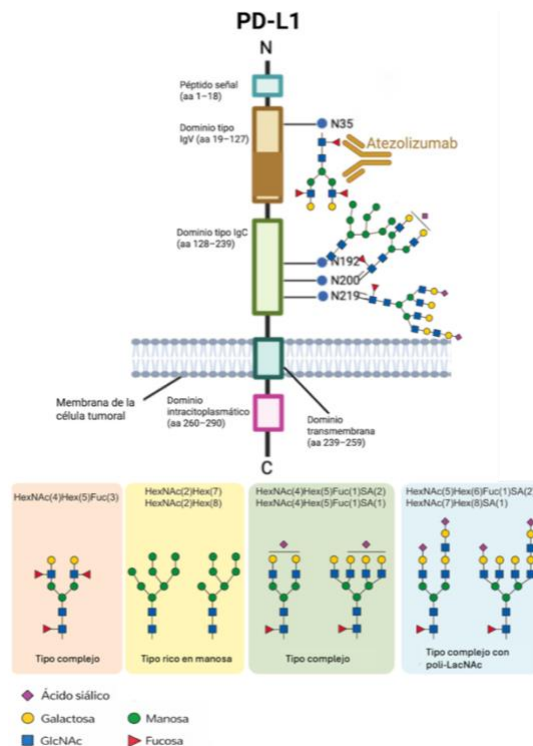


Figura 4. Estructura y glicosilación de PD-L1 humana.

Esquema de la proteína PD-L1 mostrando sus dominios extracelulares tipo Ig, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático. Se indican los principales sitios de N-glicosilación (N35, N192, N200 y N219) y la composición de los glicanos asociados. Con el recuadro marrón se ilustra la región de unión de atezolizumab en PD-L1 (aa ~56–122 del dominio extracelular (IgV) de PD-L1).

(datos obtenidos utilizando el software NetNGlyc 1.0 y NetOGlyc 4.0) (77). En ratón los sitios posibles de glicosilación son: N35, N191, N199, N218, N236, N283, para N- glicosilación, mientras que para la O- glicosilación son O181 y O175 (datos obtenidos utilizando el software NetNGlyc 1.0 y NetOGlyc 4.0). Las estructuras de glicanos en los residuos N35 y N200 de la PD-L1 presente en la superficie celular son de tipo complejo en humanos (Figura 4) (77). En contraste, el residuo N219 presenta glicanos con modificaciones terminales de poli-LacNAc, en humanos (Figura 4) (77). Finalmente, el residuo N192 humano exhibe una estructura de glicano rica en manosa, lo que lo distingue de los otros sitios (Figura 4) (77). No se han reportado estudios sobre la glicosilación del PD-L1 murino.

El estado de glicosilación de PD-L1 no solo afecta la unión de los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-PD-L1, sino también su función. De hecho, varios autores han demostrado la importancia de la glicosilación en PD-L1 (78,79). Se han reportado una relación inversa entre la supervivencia en pacientes con cáncer y la expresión de genes relacionados con la N-glicosilación (80). Esto sugiere que este tipo de glicosilación puede ser un factor a considerar a la hora de la elección de este tratamiento (78,80).

En este sentido, resulta interesante que cuando GFAT (Figura 1), la enzima limitante de la HBP, se inhibe en cáncer de pulmón, se reduce la glicosilación de PD-L1, lo que conduce a una potenciación de la respuesta inmune antitumoral (81,82). Esto podría explicarse por el hecho de que cuando PD-L1 se encuentra glicosilado es estable en membrana. Cuando la glicosilación de PD-L1 es aberrante, la proteína no se expresa en membrana, debido a que es sometido a la Degradación Asociada al Retículo Endoplasmático (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation: ERAD) y la ligasa E3 conduciendo a su degradación por el proteasoma (61). Curiosamente, un mAb dirigido a PD-L1 glicosilado bloqueó la interacción con PD-1, promovió la internalización de PD-L1 y su degradación en células de cáncer de mama triple negativo *in vitro*, también erradicó tumores en ratones (79). La glicosilación de PD-L1 depende de la entrada de glucosa a la célula tumoral, al inhibir GLUT-1, la captación de glucosa por las células cancerosas disminuye y, por lo tanto, el crecimiento tumoral (83). Interesantemente, se vio una sinergia en la terapia combinada con anti-PD-L1 e inhibidores de GLUT-1, se cree

que el suministro de glucosa a los linfocitos T reguladores (Tregs) produce una reorganización metabólica, llevándolos a un estado inmunoestimulador (83).

La glicosilación de PD-L1 también es esencial para la interacción con PD-1. De hecho, se vio que PD-L1 altamente manosilada muestra una capacidad de unión a PD-1 atenuada, lo que produce una mayor activación de células T citotóxicas *in vitro* (82). La N- glicosilación también es fundamental en la expresión de PD-L1 en microvesículas, alteraciones en la misma se vieron relacionadas con la inhibición de la proliferación de células T CD8+ *in vitro* (84). El papel de la glicosilación en la respuesta a la inmunoterapia anti-PD-L1 también se ha relacionado con linfomas no-Hodgkin y linfomas difusos de células B grandes (85). La alta expresión de la proteína glicosiltransferasa 1 (GLT1D1) se correlaciona con un mal pronóstico en estos pacientes y con una mayor N-glicosilación de PD-L1 en la superficie, lo que promueve la función inmunosupresora de PD-L1 a través de su interacción con PD-1 (85).

En vistas a lo expresado anteriormente, el uso de inhibidores de N-glicosilación, como la tunicamicina, swainsonina o kifunensina en conjunto con IT, resulta tentador (86,87). Sin embargo, este enfoque debe ser evaluado cuidadosamente, ya que la N-glicosilación es importante para la función correcta de todas las glicoproteínas (88). De hecho, aunque se vio que la swainsonina produce sinergia con la terapia anti-PD-L1 en un modelo murino *in vivo* (86), falló en un ensayo clínico de fase II (89). Por otro lado, se encontró que la inhibición de la N-glicosilación de PD-L1 con kifunensina reduce las metástasis en un modelo murino de cáncer de mama *in vitro* (78), pero nunca se escaló a estudios clínicos con este compuesto. También, se ha visto que en cáncer de mama triple negativo el lactato altera la glicosilación de PD-L1 (90).

La O-GlcNAcilación regula el tráfico intracelular de PD-L1, inhibiendo su degradación lisosomal y favoreciendo la evasión inmune tumoral (91). Además, niveles elevados de OGT, particularmente en exosomas derivados de células madre de cáncer esofágico, promueven la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8⁺, contribuyendo a la supresión de la respuesta inmune antitumoral (92). La glicosilación de PD-1 no es esencial para la interacción PD-1/PD-L1 (93), pero si para la unión de anticuerpos terapéuticos anti-PD-1 (94,95)

Metabolismo de la glucosa: rutas centrales y destinos celulares

La glucosa ocupa una posición central en el metabolismo debido a su alta concentración de energía potencial, lo que la convierte en un excelente combustible (96). La oxidación completa de la glucosa produce dióxido de carbono y agua, liberando energía que puede ser utilizada para diversas funciones celulares (96).

En los mamíferos, la glucosa tiene cinco destinos principales dentro de la célula:

1. **Síntesis de polisacáridos complejos:** La glucosa puede ser utilizada para formar polisacáridos que se destinarán a producir la matriz extracelular o para la formación de paredes celulares (96).
2. **Almacenamiento intracelular:** La glucosa puede ser almacenada dentro de la célula como glucógeno (96).
3. **Oxidación a piruvato a través de la glucólisis:** En este proceso, la glucosa se descompone en un compuesto de tres carbonos, el piruvato, liberando ATP y produciendo intermediarios metabólicos que participan en otras rutas metabólicas(96).
4. **Vía de las pentosas fosfato:** La glucosa también puede ser oxidada mediante la vía de las pentosas fosfato, que no sólo produce ribosa 5-fosfato, esencial para la síntesis de ácidos nucleicos, sino también NADPH, que es crucial para los procesos biosintéticos reductivos, como la síntesis de ácidos grasos y la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (96).

Glucólisis: vía central del catabolismo de la glucosa

La glucólisis es un proceso en el cual una molécula de glucosa se descompone a través de una serie de reacciones enzimáticas para generar dos moléculas de piruvato (Figura 5) (96). A lo largo de estas reacciones, parte de la energía se conserva en forma de ATP y nucleótidos de nicotinamida (NAD^+ o NADH) (96). La glucólisis constituye una vía metabólica central y casi universal en el catabolismo de la glucosa, siendo la ruta que maneja el mayor flujo de carbono en la mayoría de las células (96).

La glucosa, de seis carbonos, se descompone en dos moléculas de piruvato, de tres carbonos cada una, a través de 10 pasos, de los cuales los primeros 5 corresponden a la fase

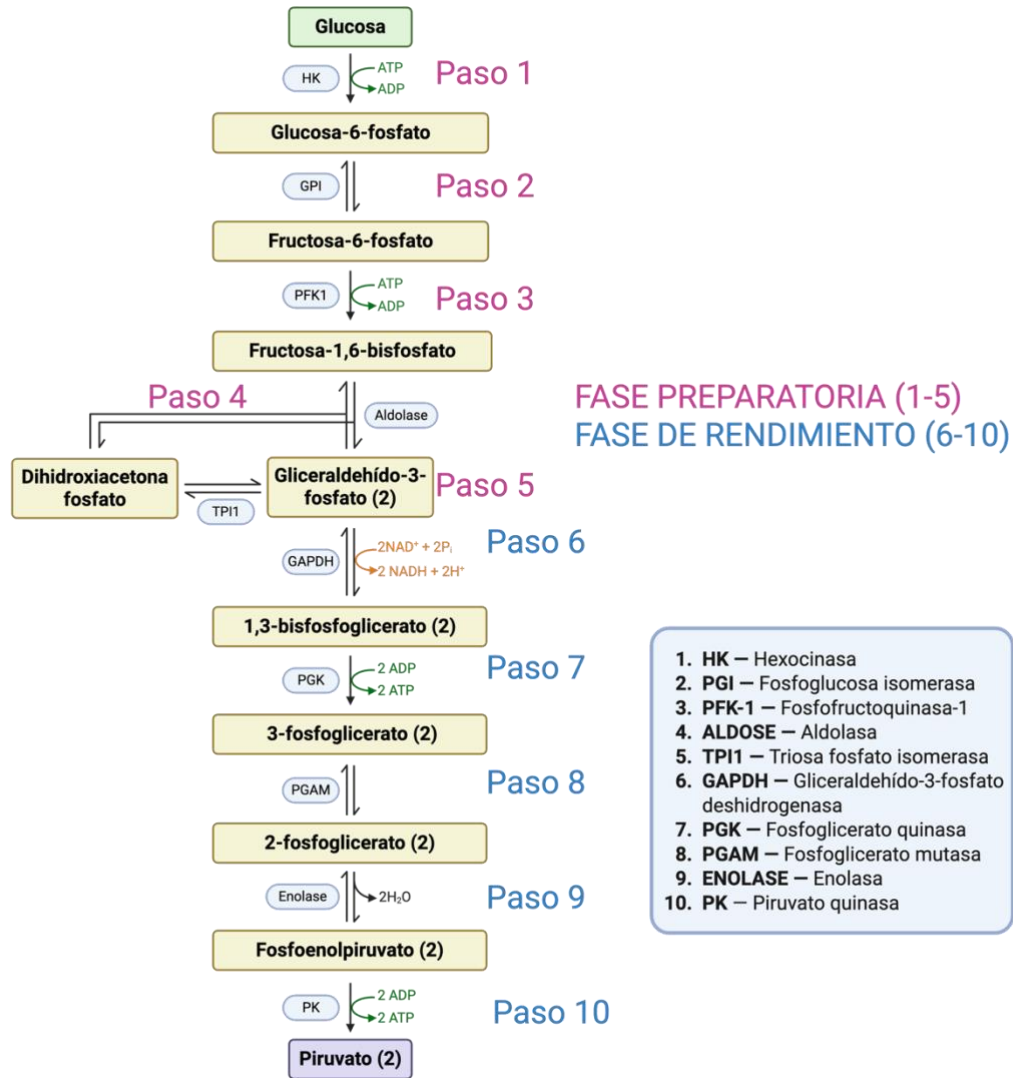


Figura 5. Esquema de la glucólisis.

Representación de las diez reacciones enzimáticas de la glucólisis, desde la conversión de glucosa en piruvato. Se distinguen la fase preparatoria (pasos 1–5), caracterizada por el consumo de ATP, y la fase de rendimiento (pasos 6–10), en la que se produce ATP y NADH. Se indican los intermediarios metabólicos, las enzimas involucradas y el balance energético de la vía.

preparatoria (Figura 5) (96). En este proceso, la glucosa se fosforila inicialmente en el grupo hidroxilo del C-6 (paso 1, Figura 5) (96). La glucosa-6-fosfato resultante se transforma en fructosa-6-fosfato (paso 2, Figura 5), que luego se fosforila nuevamente en el C-1, generando

fructosa-1,6-bisfosfato (paso 3, Figura 5) (96). En ambas fosforilaciones, el ATP actúa como donante del grupo fosforilo (96).

La fructosa-1,6-bisfosfato se divide en dos moléculas de tres carbonos: dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato (paso 4, Figura 5), lo que constituye el paso de "lisis" que da nombre a la vía. La dihidroxiacetona fosfato se isomeriza para formar otra molécula de gliceraldehído-3-fosfato (paso 5, Figura 5), completando la primera fase de la glucólisis (96). Es importante señalar que antes de la división de la glucosa en dos fragmentos de tres carbonos se invierten dos moléculas de ATP, pero esta inversión será compensada más tarde (96). En resumen, durante la fase preparatoria de la glucólisis, se utiliza energía del ATP, lo que incrementa la energía libre de los intermediarios y convierte las cadenas de carbono de todas las hexosas metabolizadas en un producto común: el gliceraldehído-3-fosfato (96).

La obtención de energía tiene lugar en la fase de rendimiento de la glucólisis (96). En esta etapa, cada molécula de gliceraldehído-3-fosfato se oxida y fosforila utilizando fosfato inorgánico (y no ATP) para formar 1,3-bisfosfoglicerato (paso 6, Figura 5) (96). Posteriormente, cuando las dos moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato avanzan hacia su conversión en piruvato (pasos 7 a 10, Figura 5), se libera energía que se conserva mediante la fosforilación de cuatro moléculas de ADP a ATP (96).

El rendimiento neto de la vía es de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, dado que en la fase preparatoria se invirtieron dos ATP (96). Además, en la fase de rendimiento se generan dos moléculas de NADH por cada molécula de glucosa, lo que representa otra forma de conservación de energía (96).

Las enzimas que median estas reacciones se describen en la Figura 5 (96).

Ciclo de Krebs y regulación del metabolismo energético

La molécula de piruvato es clave en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas (96). Cuando el piruvato entra a las mitocondrias a través de transportadores específicos puede ser dirigido hacia su oxidación a través del ciclo de Krebs o ciclo del ácido

tricloracético (TCA, Figura 6) (96). Este ciclo es una vía catabólica central casi universal en la que los productos derivados del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas se oxidan hasta dióxido de carbono (CO_2) (96). La mayor parte de la energía liberada en estas reacciones de oxidación se conserva temporalmente en forma de los coenzimas reducidos NADH y nucleótidos de flavina (FAD) (96). En condiciones aeróbicas, estas coenzimas transfieren sus electrones a la cadena respiratoria mitocondrial, donde la energía del flujo electrónico se aprovecha para la síntesis de ATP (96).

En la matriz mitocondrial, el piruvato es oxidado irreversiblemente a acetil-CoA por el complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa (PDH, Figura 6). Este complejo PDH está compuesto por múltiples copias de tres enzimas: E1 (piruvato deshidrogenasa), E2 (dihidrolipoil transacetilasa) y E3 (dihidrolipoil deshidrogenasa), que realizan cinco reacciones consecutivas de descarboxilación y deshidrogenación del piruvato sin permitir que los intermediarios se liberen de la superficie del complejo (96).

Luego el acetil-CoA se oxida, donde primero la citrato sintasa une acetil-CoA con oxalacetato para formar citrato (Figura 6). Posteriormente, el citrato se convierte en isocitrato por acción de la aconitasa (Figura 6). El isocitrato es deshidrogenado y descarboxilado por la isocitrato deshidrogenasa para formar α -cetoglutarato, que a su vez es convertido en succinil-CoA por la α -cetoglutarato deshidrogenasa, perdiendo otra molécula de CO_2 (Figura 6). Finalmente, el succinato se transforma en oxalacetato a través de las enzimas succinato deshidrogenasa, fumarasa y malato deshidrogenasa, completando el ciclo. En cada vuelta, entran dos carbonos como acetil-CoA y salen dos como CO_2 , mientras que el oxalacetato se regenera para reiniciar el proceso (Figura 6). Cuatro de los ocho pasos de este proceso son oxidaciones, en las cuales la energía de oxidación se conserva de manera muy eficiente en forma de las coenzimas reducidas NADH y FADH_2 (Figura 6) (96). Estos dos transportadores donan sus electrones a la cadena respiratoria, donde el flujo de electrones impulsa la síntesis de ATP (96).

Los intermediarios del TCA se desvían frecuentemente como precursores en diversas rutas biosintéticas (Figura 6) (96). En rojo se indican cuatro reacciones anapleróticas que reponen los intermediarios del ciclo cuando estos se encuentran disminuidos (Figura 6) (96).

El ciclo de Krebs requiere una regulación estricta, esta se produce a varios niveles, incluida la oxidación del piruvato a acetil-CoA (catalizada por el complejo PDH), la entrada de acetil-CoA en el ciclo (la reacción de la citrato sintasa) y el transporte de piruvato a la mitocondria por el transportador mitocondrial de piruvato (MPC) (96).

El complejo PDH está fuertemente inhibido alostéricamente por los productos de la reacción catalizada por el mismo (ATP, acetil-CoA y NADH) y por ácidos grasos de cadena larga (que pueden metabolizarse generando acetil-coA) (96). El AMP, CoA, y NAD, que se acumulan cuando el flujo por el ciclo de Krebs es bajo, son activadores alostéricos de este complejo enzimático. Así, la actividad del complejo PDH se desactiva cuando se dispone de abundante combustible en forma de ácidos grasos y acetil-CoA y se vuelve a activar cuando las demandas energéticas son elevadas. El complejo PDH es inhibido por la fosforilación reversible de los residuos Ser en por la PDH quinasa, que es una parte intrínseca del complejo PDH. La PDH quinasa es activada alostéricamente por los productos del complejo PDH (ATP, NADH y acetil-

CoA) y es inhibida por los sustratos del complejo PDH (ADP y piruvato). El complejo también contiene PDH fosfatasa, que invierte la inhibición por PDH quinasa (96).

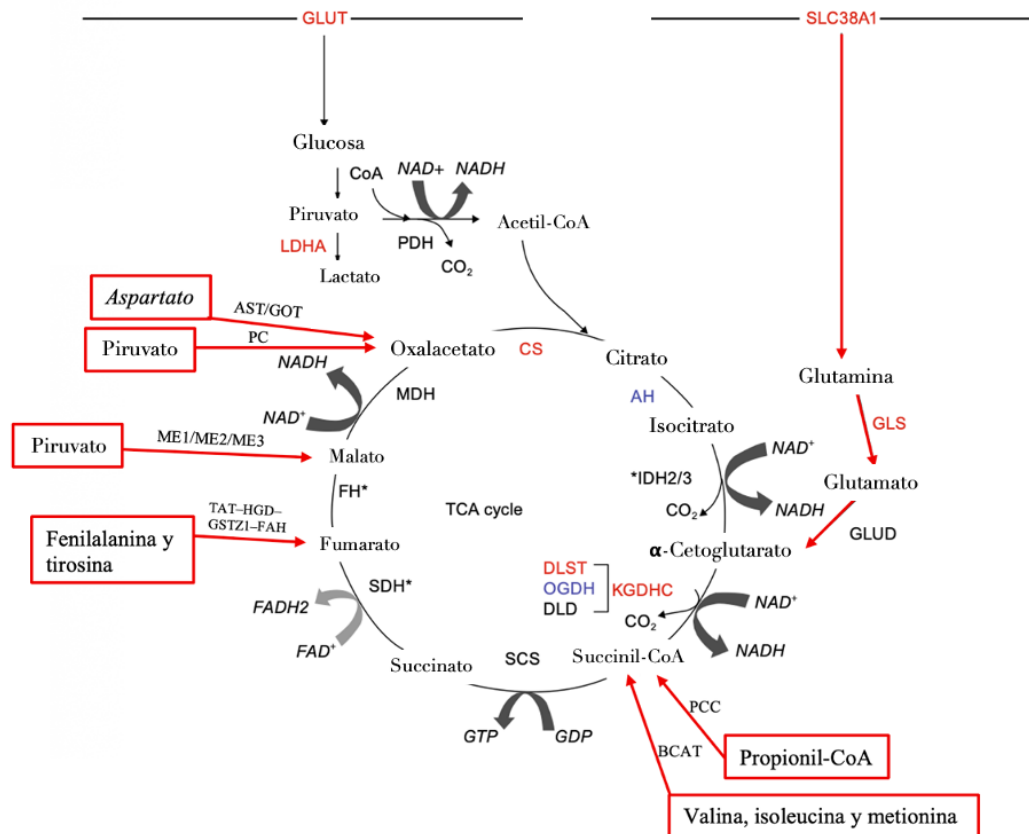


Figura 6. Integración metabólica del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y reacciones anapleróticas.

Se muestra el ciclo del TCA y las principales vías metabólicas que contribuyen al ingreso y reposición de sus intermediarios. Las reacciones anapleróticas se indican en rojo. La entrada de nutrientes a la célula está mediada por el transportador de glucosa (GLUT) y el transportador de glutamina (SLC38A1). Las enzimas responsables de las reacciones anapleróticas incluyen la piruvato carboxilasa (PC), la enzima málica (ME1/ME2/ME3), la aspartato aminotransferasa (AST/GOT), la glutaminasa (GLS) y la glutamato deshidrogenasa (GLUD). El catabolismo de fenilalanina y tirosina contribuye a la generación de fumarato mediante la tirosina aminotransferasa (TAT), la homogentisato dioxigenasa (HGD), la maleylacetoacetato isomerasa (GSTZ1) y la fumarylacetoacetato hidrolasa (FAH), mientras que el propionil-CoA ingresa al ciclo como succinil-CoA a través de la propionil-CoA carboxilasa (PCC). Las reacciones del ciclo del TCA están catalizadas por la citrato sintasa (CS), la aconitasa hidratasa (AH), la isocitrato deshidrogenasa (IDH2/3), el complejo α-cetoglutarato deshidrogenasa (KGDHC) compuesto por OGDH, DLST y DLD, la succinil-CoA sintetasa (SCS), la succinato deshidrogenasa (SDH), la fumarasa (FH) y la malato deshidrogenasa (MDH). Se indican los cofactores redox $NAD^+/NADH$ y $FAD/FADH_2$ asociados a las reacciones oxidativas del ciclo, así como la lactato deshidrogenasa A (LDH-A) involucrada en la interconversión piruvato-lactato.

Imagen adaptada de: Anderson NM, Mucka P, Kern JG, Feng H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell*. 2018 Feb;9(2):216-237. doi: 10.1007/s13238-017-0451-1. Epub 2017 Jul 26. PMID: 28748451; PMCID: PMC5818369

Los pasos catalizados por la citrato sintasa, la isocitrato deshidrogenasa y la cetoglutarato deshidrogenasa también pueden ser regulados en función de la proporción ATP/ADP Acetil-CoA/CoA y NADH/NAD (96).

Fosforilación oxidativa: producción mitocondrial de ATP acoplada al transporte de electrones

La fosforilación oxidativa representa la etapa final del catabolismo en condiciones aerobias. En este proceso convergen las oxidaciones de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, y la energía liberada se utiliza para la síntesis de ATP. Constituye la principal fuente de producción de ATP en condiciones fisiológicas normales (96).

Esta vía final común comienza con la entrada de electrones en una serie de transportadores conocidos como cadena respiratoria. La mayoría de estos electrones proviene de la acción de deshidrogenasas que los recolectan a partir de rutas catabólicas y los transfieren a aceptores universales de electrones: NADH o FAD (96).

Los transportadores están organizados en complejos multiproteicos que acoplan la transferencia de electrones al bombeo de protones (Figura 7). El complejo I transfiere electrones del NADH a la ubiquinona. El complejo II capta electrones de la oxidación del succinato y también los transfiere a la ubiquinona. Esta, al ser lipofílica, difunde por la membrana mitocondrial interna y entrega los electrones al citocromo b del complejo III (Figura 7)(96). En este complejo, los electrones se transfieren a un centro Fe-S, luego al citocromo c y finalmente al complejo IV (citocromo c oxidasa). Este último, que contiene cobre y citocromos a y a₃, acumula electrones y los transfiere al oxígeno molecular, reduciéndolo a agua (Figura 7) (96).

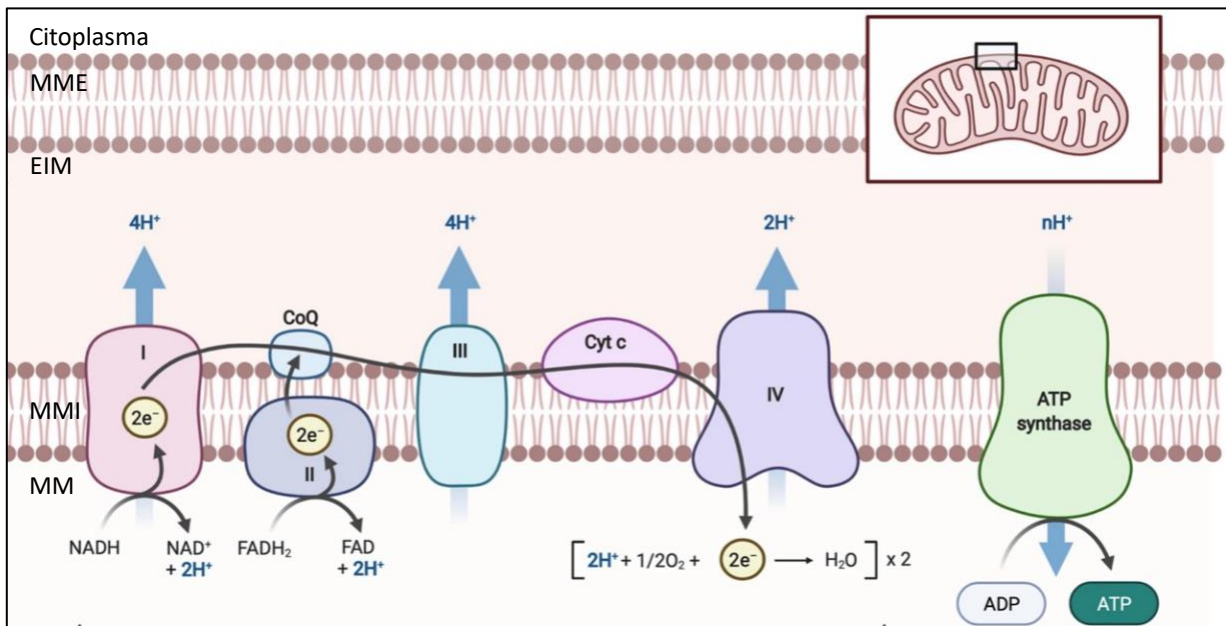


Figura 7. Fosforilación oxidativa y cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Esquema de la cadena respiratoria localizada en la membrana mitocondrial interna (MMI), que muestra el flujo de electrones desde NADH y succinato hacia el oxígeno molecular (O_2), con formación de agua (H_2O), acoplado al bombeo de protones (H^+) al espacio intermembrana (IMS) y a la síntesis de ATP por la ATP sintasa. Abreviaciones: MM, matriz mitocondrial; MME, membrana mitocondrial externa; EIM, espacio intermembrana; I-IV, complejos I-IV de la cadena respiratoria; CoQ, coenzima Q (ubiquinona); Cyt c, citocromo c; NADH/NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleótido reducido/oxidado; H⁺, protones; O₂, oxígeno molecular; H₂O, agua; ADP, adenosina difosfato; Pi, fosfato inorgánico; ATP, adenosina trifosfato. Imagen obtenida de: Anwar S, Woodling NS, Niccoli T. Mitochondria Dysfunction in Frontotemporal Dementia/Amyotrophic Lateral Sclerosis: Lessons From *Drosophila* Models. *Front Neurosci*. 2021 Nov 24;15:786076. doi: 10.3389/fnins.2021.786076. PMID: 34899176; PMCID: PMC8652125.

Gran parte de la energía libre liberada por la transferencia de electrones y la reducción del oxígeno se conserva como un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas como subproductos son neutralizadas por enzimas protectoras como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. A niveles bajos, estas ROS actúan como señales que coordinan la fosforilación oxidativa con otras rutas metabólicas (96).

El flujo de electrones a través de los complejos I, III y IV impulsa el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, lo que hace que la matriz se vuelva más alcalina en relación con el espacio intermembrana. Este gradiente de protones genera una fuerza protón-motriz que proporciona la energía necesaria para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. La enzima responsable de catalizar esta reacción es la ATP

sintasa, un complejo multiproteico que se encuentra en la membrana mitocondrial interna mitocondria (96).

Fermentación láctica: regeneración de NAD^+ en condiciones de anaerobias

Cuando los tejidos no pueden recibir suficiente oxígeno, el NAD^+ se regenera a partir del NADH mediante la reducción del piruvato a lactato. La reducción del piruvato en esta vía es catalizada, como se dijo anteriormente, por la LDH-A, siendo este un proceso reversible. El lactato formado puede ser reciclado; se transporta en la sangre hacia el hígado, donde se convierte en glucosa (96).

Transportadores de glucosa y su papel en el metabolismo tumoral

El transporte de monosacáridos, polioles y otros compuestos pequeños de carbono a través de las membranas celulares eucariotas es llevado a cabo por proteínas integrales de membrana pertenecientes a la familia GLUT. Las 14 proteínas GLUT están formadas por alrededor de 500 residuos de aminoácidos y se clasifican en tres grupos según la similitud en su secuencia: Clase 1 (GLUTs 1–4, 14), Clase 2 (GLUTs 5, 7, 9 y 11) y Clase 3 (GLUTs 6, 8, 10, 12 y HMIT). Todas las proteínas GLUT presentan 12 segmentos transmembranales, un único sitio de N-glicosilación, un dominio citoplasmático central relativamente grande, y muestran una disposición topológica en la que tanto los extremos N-terminal como C-terminal están ubicados en el citoplasma (97).

Dado que la internalización/transporte de glucosa por parte de la célula tumoral es fundamental para su crecimiento, el bloqueo de esta familia de receptores es una estrategia para el tratamiento contra el cáncer. De todos estos, los más relacionados con la transformación maligna son los GLUT 1, GLUT 3 y GLUT 4 (97). Un estudio reciente mostró que los patrones de expresión de los transportadores de glucosa de clase I se asociaron con los resultados clínicos en el adenocarcinoma pulmonar (98). La expresión aislada de GLUT3 estuvo vinculada a un pronóstico negativo, mientras que la expresión única de GLUT4 se asoció con

un pronóstico más favorable (98). Además, la expresión del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 2 (IGF2) y GLUT1 en macrófagos se correlaciona con la gravedad y el estado metastásico del cáncer de pulmón (99).

Reprogramación metabólica tumoral: lactato, simbiosis metabólica y glicosilación

Las células cancerosas clásicamente se caracterizan por presentar un metabolismo basado en fermentación láctica como principal fuente de energía, aún en presencia de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Warburg. Es una vía metabólica que promueve el alto consumo de glucosa y glutamina para la producción rápida de energía, transforma el piruvato en lactato acumulando dicho metabolito. Este cambio en el metabolismo celular es impulsado por la hipoxia presente dentro del tumor y por mutaciones en oncogenes y supresores tumorales (100,101).

El lactato posee propiedades que favorecen el crecimiento tumoral (102). Por un lado, se ha observado que la inhibición de la expresión de la LDH-A previene el crecimiento tumoral *in vivo* (103). Por otro lado, se ha evidenciado que altas concentraciones de lactato producidas por células tumorales inducen la expresión de la molécula inmunoreguladora PD-L1 (66). Además, la inhibición de la expresión de la LDH por oxamato mejora la eficacia del tratamiento anti-PD-1 en un modelo de ratón humanizado de cáncer de pulmón (104). Por lo tanto, podríamos afirmar que, la producción elevada de lactato por células tumorales contribuye a la protección de célula tumoral por mecanismos inmunes que se encuentran mediados por el aumento de PD-L1 y favorece la evasión inmunológica.

Por estas razones, el lactato, que antes se consideraba sólo un subproducto metabólico, se ha reconocido como un metabolito esencial dentro del MAT (105,106). El lactato puede regular el metabolismo de las células inmunitarias e inhibir su activación y proliferación. Suprime las actividades antitumorales de los linfocitos T CD8+ y de las células NK (*natural killer*), al tiempo que favorece el reclutamiento de células inmunosupresoras como los

linfocitos T reguladores (Tregs) y las células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs), dando como resultado la evasión inmune (107). Una de las funciones emergentes del lactato es la lactilación de proteínas, un mecanismo que regula la expresión génica y que también influye en la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 (105,106). La lactilación es el proceso por el cual un grupo lactilo se adiciona a los residuos de aminoácido lisina en las colas de las histonas y sirve como una modificación epigenética que estimula directamente la transcripción génica (105,106).

En una cohorte de pacientes con melanoma que recibieron inmunoterapia anti-PD-1, la alta expresión de LDH-A por *single cell RNAseq* se asoció con una mala respuesta al tratamiento (108). De manera similar, en bases de datos de diversos cánceres, incluyendo NSCLC, la mayor expresión de LDH-A se correlacionó con una mayor probabilidad de resistencia a la inmunoterapia (108).

El lactato producido dentro de una célula, puede ser aprovechado por las células vecinas como combustible para la oxidación, como precursor para la gluconeogénesis y como fuente de intermediarios del ciclo de TCA (102). El ácido láctico es transportado a través de las membranas mediante una familia de cuatro transportadores (MCTs: H⁺/lactato) (102). La dirección del intercambio depende de los gradientes de concentración tanto de protones como de iones monocarboxilato (los MCTs transportan de manera eficiente lactato, piruvato y moléculas de cuerpos cetónicos como D-b-hidroxibutirato y acetoacetato) (102).

MCT1 es el transportador más ampliamente expresado y facilita la entrada de lactato y piruvato a la célula, es inducido por c-Myc y se regula durante la transición epitelio mesenquimal (EMT) por miR-205 (102). En contraste, MCT4 es un exportador eficiente de lactato expresado en células glucolíticas, e inducido por señales de hipoxia y redox (102). MCT2 es muy similar a MCT1, aunque muestra una mayor afinidad por el ácido L-láctico y el piruvato, pero se expresa menos que MCT1 en tejidos humanos (102). MCT3 es funcionalmente similar a MCT4, cumpliendo la misma función en el epitelio pigmentario retinal (102). Aunque los miembros de la familia MCT no están glicosilados, todos requieren asociación con una proteína glicosilada, ya sea basigin (CD147) o embigin, para su correcta translocación a la membrana

plasmática (102). MCT1, MCT3 y MCT4 se unen preferentemente a basigin, mientras que MCT2 se une preferentemente a embigin (102).

La disrupción de la interacción MCT4–basigin inhibe la respuesta a la hipoxia, la proliferación y la progresión tumoral en un modelo de glioblastoma (102). Se ha visto que una mayor expresión de MCT1 y MCT4 está vinculada a un mal pronóstico en carcinoma de próstata y colorectal, neuroblastoma y tumores estromales gastrointestinales (102). El bloqueo farmacológico utilizando inhibidores de MCT1 es muy eficiente para detener el crecimiento tumoral (102).

Heterogeneidad metabólica en el microambiente tumoral

El metabolismo celular en el MAT es heterogéneo (102). De esta forma podemos dividir a las células tumorales en dos grupos: oxigenadas e hipóxicas (102). Las células cancerosas oxigenadas, cercanas a los vasos sanguíneos, se mantienen gracias a una ubicación privilegiada con gran disponibilidad de nutrientes (102). Estas pueden establecer una simbiosis metabólica con células cancerosas hipóxicas (102). Entonces la glucosa se desvía principalmente para alimentar el metabolismo de las células cancerosas hipóxicas distantes, mediante fermentación láctica, este lactato, que es descartado por las células cancerosas hipóxicas a través de MCT4, puede ingresar mediante MCT1 a la célula oxigenada y ser utilizado para la oxidación (102). En este escenario de heterogeneidad tisular, es probable que las células que cargan lactato utilicen la isoforma LDH-B para convertir el lactato en piruvato, mientras que las células productoras de lactato prefieren usar LDH-A para alimentar la biosíntesis del mismo (102).

Por otro lado, se vio que las células cancerosas oxidativas son más propensas a la glutaminólisis al aumentar la expresión del transportador de glutamina ASCT2 y la glutaminasa 1 (GLS1) para alimentar el ciclo del TCA (102).

Otro ejemplo de simbiosis metabólica en el MAT es el que ocurre entre las células tumorales y los fibroblastos asociados a tumor (CAF) (102). Los CAF que se encuentran en la

cercanía de las células tumorales hipóxicas exhiben una expresión aumentada de MCT1 (102). Se vio que las células tumorales derivadas de pacientes con cáncer de pulmón y gástrico resistente a los inhibidores de c-Met, educan a las CAFs para cargar y utilizar lactato, lo que desencadena circuitos proinflamatorios llevando a la producción aberrante del factor de crecimiento de hepatocitos (hepatocyte growth factor; HGF) estromal, lo que fomenta la resistencia a drogas antitumorales (102).

Rol del lactato en la modulación del sistema inmune tumoral

Por otro lado, las células inmunes presentes en el MAT también se pueden ver afectadas por la presencia de lactato (102). El entorno rico en lactato tiene la capacidad de polarizar a los macrófagos asociados al tumor (TAMs) hacia el fenotipo M2, lo que otorga una ventaja en el crecimiento tumoral *in vivo*. También se ha visto que el lactato cumple funciones inmunosupresoras sobre las células T efectoras, al ingresar a los sitios inflamatorios, los subconjuntos de células T CD4+ y CD8+ perciben altas concentraciones de lactato a través de los transportadores MCT2 y MCT1, respectivamente, y sufren inactivación, lo que promueve la generación de Treg. El lactato secretado por el tumor también inhibe la función de las células NK al estimular el reclutamiento de células inmunosupresoras, como las MDSCs. Asimismo, se ha reportado que la acumulación de lactato en el MAT favorece la diferenciación de las células dendríticas (DC) hacia un fenotipo tolerogénico. Además, la acidosis altera la producción de citoquinas inflamatorias necesarias para la polarización de las células Th1, así como para la diferenciación de DC inflamatorias. Por otro lado, el lactato promueve la degradación de antígenos, lo que impide la presentación de antígenos por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I, lo que hace que las DC no puedan activar respuestas antitumorales (102).

Por último, el lactato estabiliza el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1) al inhibir las hidroxilasas prolinas dependientes de Fe²⁺ y 2-oxaglutarato, evitando su degradación proteosomal (102).

Interacción entre reprogramación metabólica y glicosilación aberrante en cáncer

El incremento en la ingesta de glucosa y glutamina provocado por la reprogramación metabólica de la célula tumoral potencia el flujo hacia la HBP, contribuye finalmente al incremento de las concentraciones de UDP-GlcNAc, aumentando la O-GlcNAcilación intracelular (109). Además, el aumento de UDP-GlcNAc podría ser responsable de las alteraciones que presentan las células tumorales en sus O- y N-glicanos extracelulares (110). Este aumento de la O-glicosilación intracelular promueve el efecto Warburg y las propiedades malignas de la célula tumoral (111). Uno de los mecanismos moleculares más interesantes en esta regulación la constituye el ejemplo de la O-GlcNAcilación de la enzima PFK-1 (Figura 1), la cual inhibe su actividad, contribuyendo a la acumulación de intermediarios glicolíticos redirigiéndolos a la vía de las pentosas fosfato, lo que aumenta la disponibilidad de nucleótidos, necesarios para la proliferación de la célula tumoral (112). También se incrementa el flujo de la HPB, induciendo mayor glicosilación (112). El bloqueo de su glicosilación aumenta su actividad inhibe la proliferación tumoral y la formación de tumores *in vivo* (112).

Particularidades del ciclo de Krebs en células tumorales

El ciclo de Krebs en el cáncer también tiene sus particularidades. Como mencionamos anteriormente en células tumorales, la principal fuente de piruvato es la glucosa, que ingresa mediante transportadores GLUT1 y GLUT3. Sin embargo, la glucosa importada rara vez alimenta el ciclo del TCA: la mayoría de los tumores hacen fermentación láctica (efecto Warburg), produciendo lactato, incluso en presencia de oxígeno. Como la glucólisis anaeróbica solo genera 2 ATP por glucosa, las células tumorales dependen más de otros combustibles como la glutamina y los ácidos grasos para reponer los intermediarios del TCA y cubrir sus necesidades energéticas (113).

La glutamina, el aminoácido más abundante en el cuerpo humano, puede ingresar al ciclo del TCA en forma de α -cetoglutarato (α -KG, figura 6). La glutaminólisis (degradación de

glutamina), es fundamental para reponer los intermediarios del ciclo en células en proliferación. La glutamina es primero hidrolizada por la glutaminasa (GLS) para generar glutamato, que posteriormente puede ser deshidrogenado por glutamato deshidrogenasa (GLUD) para formar α -KG. Este compuesto es un sustrato para la descarboxilación oxidativa por el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDHC) o para la carboxilación reductiva por IDH2 (113).

El tercer tipo de fuente de combustible en las células tumorales son los ácidos grasos, que ingresan al ciclo del TCA después de someterse a β -oxidación para generar acetil-CoA. El acetil-CoA es el sustrato tanto para la síntesis de ácidos grasos como para el ciclo del TCA, lo que hace que la lipogénesis sea un punto de convergencia importante entre el flujo del ciclo del TCA y la biosíntesis celular (114).

La familia de enzimas IDH está compuesta por tres isoformas (IDH1, IDH2 e IDH3) que convierten isocitrato en α -cetoglutarato (α -KG) de manera reversible (en el caso de la IDH1 y la IDH2), mientras que para la IDH3 esta reacción es irreversible siendo una de las enzimas limitantes de reacción del TCA (96,115). Solo IDH2 e IDH3 se expresan en la mitocondria, mientras que IDH1 se expresa en el citoplasma (115). Se han reportado que existen mutaciones de alta frecuencia en IDH1/2 glioma de bajo grado y glioblastoma secundario (115). Estas mutaciones otorgan una nueva función enzimática, resultando en la capacidad adquirida de convertir α -KG en 2-hidroxi-glutarato (2-HG), un oncometabolito (115).

Se demostró que IDH3 α está sobreexpresado de manera aberrante en varios cánceres y que participa en la inducción tanto de la reprogramación metabólica como la angiogénesis mediada por HIF-1 (116).

KGDHC, una enzima limitante del ciclo del TCA, está compuesta por tres subunidades: OGDH (α -cetoglutarato deshidrogenasa), DLST (dihidrolipoamida S-succiniltransferasa), DLD (dihidrolipoamida deshidrogenasa)(96). Existe controversia entre la expresión de OGDH en el cáncer, supuestamente esta está subregulada en cáncer colorrectal debido a la hipermetilación del promotor, y una hipermetilación similar del promotor se ha documentado

en cáncer de mama, pulmón, esófago, cuello uterino y páncreas (117–119). Interesantemente, se ha visto que la DLST puede ser un marcador de metástasis en NSCLC (120). La depleción de DLST suprime el crecimiento e induce la muerte en ciertos subgrupos de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (TNBC) que son capaces de utilizar anaplerosis a partir de glutamina (121).

Hipótesis

Considerando que los tumores generados por las células GA son de mayor tamaño, más agresivos y con un mayor infiltrado de células inmunes reguladoras, nuestra hipótesis es que la glicosilación aberrante en células tumorales caracterizada por la expresión del antígeno Tn en un modelo de cáncer de pulmón preclínico se asocia con una reprogramación metabólica, y conduce a aumentar la producción de lactato. Este fenotipo metabólico favorece la agresividad tumoral y contribuye a la generación de un MAT inmunosupresor, caracterizado por una mayor expresión de PD-L1 en las células tumorales.

Objetivo general

Analizar como la GA de la célula tumoral se asocia con el metabolismo de la glucosa y sus propiedades inmunoreguladoras en un modelo de cáncer de pulmón preclínico.

Objetivos específicos

- I) Estudiar el metabolismo energético aerobio y anaerobio en células tumorales LL/2 con y sin GA.
- II) Estudiar la expresión de PD-L1 en células tumorales y tumores con y sin GA.
- III) Analizar si perturbaciones en el metabolismo de la glucosa afectan la detección de PD-L1 membranario en la célula tumoral.
- IV) Evaluar el papel de la glicosilación de PD-L1 en su detección utilizando anticuerpos.
- V) Analizar si el bloqueo de la síntesis de lactato afecta diferencialmente el crecimiento tumoral en presencia o ausencia de GA.
- VI) Analizar si la inmunoterapia anti-PD-L1 afecta diferencialmente el crecimiento tumoral en presencia o ausencia de GA.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Las células WT y Tn⁺ se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Capricorn o Gibco), suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado (FBS, Capricorn) y antibiótico–antimicótico (Thermo Fisher) a una concentración final de 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 0,25 µg/mL de anfotericina B, al cual se denominó “medio completo”.

Para los experimentos con oxamato, este compuesto se utilizó a una concentración final de 30 mM durante 24 horas. En los ensayos que se evaluaron inhibidores del metabolismo mitocondrial, las células se incubaron durante 24 horas con antimicina A, oligomicina o rotenona, cada uno a una concentración final de 1 µM.

Para inhibir la glicosilación celular se emplearon dos estrategias: inhibición de la N-glicosilación mediante swainsonine (2 µg/mL por 24 horas) y tunicamicina (5 µg/mL por 24 horas), y modulación de la O-glicosilación intracelular mediante OSMI-1, inhibidor de O-GlcNAc transferasa (20 µM por 24 horas), y Thiamet G (TMG), inhibidor de O-GlcNAcasa (20 µM por 24 horas).

Para todos los experimentos con inhibidores, las células se sembraron en placas P6 a una densidad de 300.000 células por pocillo, se dejaron 24 horas en medio completo para asegurar la adhesión y luego se adicionó el inhibidor correspondiente durante el tiempo establecido.

Las células se mantuvieron a 37 °C en una cámara humidificada con 21 % de O₂ y 5 % de CO₂. Para las condiciones de hipoxia, se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 1 % de O₂ y 5 % de CO₂. La cosecha se realizó con buffer fosfato salino PBS 1X (preparado a partir de PBS 10X, compuesto por NaCl 0,137 M, Na₂HPO₄ 0,01 M y NaH₂PO₄ 0,002 M; pH 7,4) suplementado

con EDTA 2 mM durante 10 minutos. Para el almacenamiento, aproximadamente 3×10^6 células se congelaron en FBS con 10 % de DMSO y se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Citometría de flujo: caracterización del glicofenotipo y detección de PD-L1

Las células en cultivo se cosecharon con EDTA 2,5 mM, se resuspendieron en buffer FACS (PBS + 2 % FBS).

Marcación extracelular de lectinas *in vitro*

Las lectinas biotinizadas se preincubaron con estreptavidina conjugada a un fluoróforo durante 50 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla se incubó con las células durante 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las lectinas utilizadas (Vector Labs) fueron Vicia villosa lectin (VVL, $40\text{ }\mu\text{g/mL}$), Wheat germ agglutinin (WGA, $1\text{ }\mu\text{g/mL}$), Concanavalin A (ConA, $1\text{ }\mu\text{g/mL}$) y Dolichos biflorus agglutinin (DBA, $40\text{ }\mu\text{g/mL}$).

Marcación intracelular de lectinas *in vitro*

La marcación intracelular se realizó con los buffers de fijación y permeabilización de BioLegend siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la marcación extracelular, las células se fijaron 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con buffer de permeabilización diluido y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con WGA ($1\text{ }\mu\text{g/mL}$) en buffer de permeabilización.

Expresión de PD-L1 tras tratamiento con moduladores metabólicos

Para evaluar la expresión de PD-L1 bajo inhibición metabólica, las células se incubaron durante toda la noche con un modulador por vez, ácido láctico, oxamato, antimicina A, oligomicina, rotenona, OSMI-1, TMG, swainsonine, tunicamicina, empleando las

concentraciones detalladas previamente. Se utilizó el anticuerpo anti-PD-L1 conjugado a APC (clon 10F.9G2, BioLegend concentración 2 µg/mL).

Detección de PD-L1 posterior al tratamiento con PNGasa-F in vitro

1x10⁶ células se fijaron con 200 µL de Fixation Buffer (BioLegend) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se incubaron con PNGasa-F (400 U/mL) durante 4 horas a 37 °C.

Procesamiento de muestras tumorales y análisis por citometría de flujo

Para los estudios *in vivo*, los tumores se disgregaron mecánicamente y se incubaron con colagenasa tipo IV (100 U/mL) durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, los tejidos se filtraron mediante un filtro de 40 µm y los eritrocitos se lisaron con buffer Ammonium-Chloride-Potassium (ACK) (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA). Se utilizaron los anticuerpos anti-CD45 (clon 104, 0,5 µg/mL), anti-PD-L1 (clon 10F.9G2, BioLegend concentración 2 µg/mL) y lectina DBA (40 µg/mL).

Potencial de membrana, niveles de oxidantes, necrosis y apoptosis

Las células WT y Tn⁺ se cultivaron en presencia o ausencia de oxamato según se describió previamente. La cosecha y adquisición se realizaron siguiendo los mismos procedimientos aplicados para la caracterización fenotípica.

Como controles positivos se utilizaron células tratadas con Tween 5 % para inducir necrosis y células tratadas con estaurosporina para inducir apoptosis. Las células se incubaron con Anexina V (1:200, Invitrogen) durante 40 minutos a 4 °C, junto con MitoTracker (1:100–

1:800, Invitrogen M7510) y DHR123 (1:100–1:800) para evaluar el potencial mitocondrial y los niveles de oxidantes. Posteriormente se adicionó 7-AAD (1:100), se incubó durante 5 minutos en oscuridad.

Procesamiento y análisis

Entre 50.000 y 200.000 células se dispusieron por pocillo y se incubaron con anticuerpos o lectinas diluidos en PBS con 2 % FBS y 0,02 % NaN_3 durante 30 minutos a 4 °C. Tras dos lavados con buffer FACS, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en un BD Accuri C6, adquiriendo 10.000-20.000 eventos por muestra. Los análisis se realizaron utilizando el software BD CSampler Plus Software (BD Biosciences, versión 1.0.23.1) o FlowJo (Versión X.0.7).

Cuantificación de expresión génica por RT-PCR en tiempo real

Las células WT y Tn^+ fueron cultivadas en medio completo bajo las condiciones de control y oxamato, como se describió en el apartado anterior. El ARN total de los tumores se aisló utilizando TRI-Reagent (Sigma-Aldrich). Se centrifugaron las células a 1000 g por 5 min. Posteriormente los pellets fueron lisados con el reactivo TRI Reagent® (Sigma-Aldrich). Se empleó un volumen de 1 mL de TRI Reagent por cada 5×10^6 células. Para el aislamiento del ARN se adicionó 200 μl de cloroformo por cada mililitro de TRI Reagent a las muestras, posteriormente se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó la mezcla resultante a $12.000 \times g$ durante 15 minutos a 2–8 °C, y por último se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio.

A dicha fase se le adicionó 0,5 ml de isopropanol por cada ml de TRI-Reagent utilizado, mezclando adecuadamente. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5–10 minutos y posteriormente se centrifugaron a $12.000 \times g$ durante 10 minutos a 2–8 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de ARN agregando 1 mL de etanol al 75 %. Se agitaron las muestras en vórtex y luego se centrifugaron a $7.500 \times g$ durante 5 minutos a 2–

8 °C. El ARN precipitado se visualizó como un pellet en el fondo o lateral del tubo. Por último, se resuspendió el pellet en 20 µl de agua ultrapura y se almacenaron las muestras a –70°C.

El ARN total fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro Nanodrop, y posteriormente, se sintetizó cDNA utilizando el kit SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la cuantificación de la expresión génica por RT-PCR en tiempo real, las muestras fueron analizadas en un Eco Real-Time PCR System (Illumina) utilizando el kit SensiFAST™ SYBR No-ROX (BIO-98005).

Los primers utilizados se detallan en el Anexo 1. Se utilizaron dos tipos de programas en función de cada gen: uno de duración corta y otro largo. El programa corto para realizar las amplificaciones comenzó con una activación de la polimerasa durante 2 minutos a 95°C. El ciclo de amplificación consistió en 40 ciclos, cada uno de 5 segundos a 95°C, seguido de 30 segundos a la temperatura de *melting* (T_m) de cada primer, según se indica en el Anexo 1 y un ciclo que consistió en 15 segundos a 95°C, seguido de 15 segundos a 55°C, y nuevamente 15 segundos a 95°C.

El programa largo para las amplificaciones incluyó una activación de la polimerasa durante 10 minutos a 95°C. El ciclo de amplificación constó de 40 ciclos, cada uno de 15 segundos a 95°C, seguido de 30 segundos a la temperatura de *melting* (T_m) de cada primer, y 30 segundos a 72°C y un ciclo que consistió en 15 segundos a 95°C, seguido de 15 segundos a 55°C, y nuevamente 15 segundos a 95°C.

La normalización de los datos de expresión génica se realizó utilizando el gen de referencia β-actina, cuya expresión se considera constante en las condiciones experimentales. Los resultados se ajustaron utilizando el método ΔΔC_t, lo que permitió corregir las variaciones técnicas y obtener valores relativos precisos de la expresión génica. Ecuación utilizada: $2^{-((Cq_{gen} - Cq_{\beta-actina}) - (Cq_{promedio\ gen\ WT} - Cq_{promedio\ \beta-actina\ WT}))}$

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA), el cual se fundamenta en la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ por los enlaces peptídicos bajo condiciones alcalinas, seguido de la formación de un complejo entre Cu^+ y el reactivo BCA, que produce una coloración violeta intensa. La intensidad de este color es estable y se incrementa proporcionalmente con la concentración de proteínas presentes en la muestra.

Para el análisis se utilizó el reactivo comercial BCA Protein Assay Kit (Sigma merck, Cat. No. 71285-3). El protocolo consistió en mezclar 10 μL de cada muestra con 200 μL del reactivo BCA- CuSO_4 , preparado en una proporción 50:1. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y, posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm.

Para la construcción de la curva estándar, se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como proteína de referencia, realizando diluciones seriadas en medio acuoso a partir de una solución madre de 2 mg/mL.

Estudio del metabolismo celular

El análisis del metabolismo de la glucosa y el mitocondrial, que incluyó la determinación de la velocidad de acidez extracelular (ECAR) y la tasa de consumo de oxígeno (OCR) se realizó utilizando el analizador de flujo extracelular XF96 (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA).

Un día antes del experimento, los cartuchos de la placa de cultivo celular XF96, que ya contenían los sensores, fueron pre-incubados en 1 ml de solución de calibración Seahorse a 37°C en una estufa sin CO_2 .

48 hs previo al experimento, las células (LL2 WT/ Tn^+) se sembraron a una densidad de 10,000 células por pocillo, en una placa P24 utilizando medio de cultivo RPMI completo.

El día del experimento de metabolismo mitocondrial, se sustituye el medio de cultivo de las células por 1 ml de medio Seahorse G que es un medio modificado de Dulbecco's (sigma D5030) a una concentración de 8.3 g/L, suplementado con 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 10 mM de D-glucosa, se incuban las células 1 hora a 37 C en una estufa sin CO₂. Antes del ensayo se saca 1 ml de medio y agregue 500 uL del medio Seahorse G fresco.

Tras monitorear la respiración basal, se inyectaron las siguientes sustancias en los pocillos: 1 µM de oligomicina, seguido de dos inyecciones sucesivas de 1 µM de cianuro de carbono-p trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). Finalmente, se añadió una mezcla de 1 µM de rotenona y 1 µM de antimicina.

Para el ensayo de metabolismo de la glucosa, se utilizó medio Seahorse G suplementado con 2 mM de glutamina y 1 mM de piruvato de sodio como suplemento. El resto de las condiciones experimentales se comparten con el ensayo de metabolismo mitocondrial.

Después de medir la respiración basal, se procedió a inyectar 10 mM de D-glucosa en los pocillos, seguido de dos inyecciones de 40 mM de oxamato. Finalmente, se inyectaron 50 mM de 2-deoxiglucosa.

Los resultados obtenidos de las mediciones de OCR y ECAR fueron normalizados según la concentración de proteínas de las muestras, que se determinó mediante el ensayo de proteína BCA.

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

Se recolectaron las células LL/2 WT/Tn⁺, se contaron y se plaquearon en placas de 96 pocillos partiendo de una concentración de 200000 células por pocillo en 200 µl de medio de cultivo, y realizando diluciones seriadas al medio con o sin 300 mM de Oxamato. Después de 24 y 48 horas en cultivo, se retiraron 100 µl de medio y se agregó MTT (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 2,5 mg/ml y se incubó por 4 horas a 37°C. Finalmente, se agregaron 100

μL de 0.1 M HCl en alcohol isopropílico para disolver los cristales de MTT, se dejó incubando la solución durante la noche (ON). Al día siguiente se midió la absorbancia a 570 nm.

Determinación de lactato en medio de cultivo y en suero

La cuantificación de L-lactato se realizó utilizando un kit colorimétrico (Abcam, ab65331), que se basa en la oxidación enzimática del L-lactato por lactato deshidrogenasa, generando un intermediario que reacciona con una sonda cromogénica para producir un color estable, medible a 450 nm. Este método permite detectar L(+)-lactato en un rango dinámico de 0,02 a 10 mM en distintas matrices biológicas sin requerir pretratamiento ni purificación previa de las muestras.

Las muestras analizadas correspondieron a sobrenadantes de cultivo celular y suero de ratón. Se utilizaron 10 μL de sobrenadante puro y 1 μL de suero puro por condición, y ambos se llevaron a un volumen final de 50 μL por pocillo mediante dilución en *Assay Buffer 12*.

La curva estándar se preparó a partir de un estándar de lactato a 1 M, elaborándose un set fresco para cada ensayo. Cada estándar se preparó en un volumen final de 50 μL , combinando el volumen apropiado del estándar con *Assay Buffer 12* para obtener cantidades finales de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mM de lactato por pocillo.

El mix de reacción se preparó inmediatamente antes de su uso. El *Reaction Mix* estuvo compuesto por 46 μL de *Assay Buffer 12*, 2 μL de *Developer Solution III* y 2 μL de *Enzyme Mix XV* por pocillo. Para los pocillos destinados al control de fondo, se utilizó un *Background Reaction Mix*, elaborado sustituyendo la enzima por *Assay Buffer 12* (48 μL de *Assay Buffer 12* y 2 μL de *Developer Solution III* por pocillo).

A cada pocillo que contenía estándares o muestras se añadieron 50 μL del *Reaction Mix*, y a los pocillos de fondo, 50 μL del *Background Reaction Mix*. Tras la adición de los reactivos, la placa se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos a temperatura

ambiente, protegida de la luz. Finalmente, la absorbancia se midió a 450 nm en un lector de placas, observándose que la señal permaneció estable durante al menos cuatro horas.

Determinación de glucosa en medio de cultivo

Las concentraciones de glucosa se determinaron con un kit comercial (Glucosa-TR spinreact). El método se basa en una reacción enzimática secuencial. Primero, la glucosa oxidasa (GOD) oxida la β -D-glucosa a ácido glucónico, produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Luego, el H_2O_2 generado reacciona con fenol y ampirona en presencia de peroxidasa, formando un compuesto quinónico coloreado. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

Se sembraron células LL2 WT/Tn⁺ en medio RPMI completo con o sin oxamato, a una concentración inicial de 150000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, y se realizaron diluciones seriadas. Las células se incubaron durante 24 horas.

Posteriormente, se midió la concentración de glucosa siguiendo el protocolo del fabricante. El reactivo de trabajo se distribuyó en un volumen de 200 μ L por pocillo de p96, manteniendo la relación volumétrica equivalente al método original en cubeta. A continuación, se añadieron 2 μ L del estándar de glucosa a los pocillos destinados al patrón, mientras que los pocillos correspondientes a las muestras recibieron 2 μ L de cada muestra. Los pocillos correspondientes a la condición blanco contenían únicamente el reactivo de trabajo. Tras la adición de los componentes, la placa se mezcló suavemente mediante una breve agitación y se incubó durante 10 minutos a 37 °C. El color generado se mantuvo estable durante al menos 30 minutos, permitiendo una lectura confiable en ese intervalo.

La absorbancia se registró a 505 nm, utilizando el pocillo blanco como referencia. La concentración de glucosa se calculó a partir de la relación entre la absorbancia corregida de la muestra y la del patrón, según la ecuación:

$$\frac{(A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco}}{(A) \text{ Patrón} - (A) \text{ Blanco}} \times 100 \text{ (Conc. Patrón)} = \text{mg/dL de glicosa en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0555= mmol/L.

El valor obtenido se normalizó en función de la proliferación celular, medida mediante MTT.

Western blot y lectin blot

Para los ensayos de Western blot, las células LL2 WT y Tn⁺ se sembraron en placas P6 a una densidad de 300.000 células por pocillo y se dejaron crecer durante 24 horas. Posteriormente, se expusieron durante 24 horas a tres condiciones experimentales: la primera consistió en la incubación con INF γ obtenido a partir de esplenocitos de ratón *naïve* activados con ConA (Sobrenadante de esplenocito, SNE 1/10); la segunda incluyó la incubación con oxamato a 30 mM combinado con SNE 1/10; y la tercera correspondió al tratamiento con PNGasa-F, siguiendo el protocolo detallado en la sección de citometría y sin adición de SNE, con su respectivo control sin SNE.

Finalizados los tratamientos, se retiró el medio y se lavaron las células con PBS. Tras eliminar el exceso de líquido, se añadió directamente el buffer de muestra reductor SDS 1X (derivado de una preparación 4X con Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, SDS 2 %, β -mercaptoetanol 5 %, glicerol 10 % y azul de bromofenol 0,01 %) para inducir la lisis celular. Las muestras se mantuvieron en hielo y la lisis se completó por sonicación durante 10 a 15 segundos. De cada condición se tomaron 20 μ L, se calentaron a 95–100 °C durante 5 minutos, se enfriaron en hielo y luego se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE, utilizando un gel separador con 12 % de acrilamida/bis-acrilamida y un gel concentrador de 6 % de acrilamida/bis-acrilamida. La corrida electroforética se realizó en buffer de corrida Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3) a 120 V durante aproximadamente

1 hora. En el primer carril se sembró un marcador de peso molecular para permitir la estimación del tamaño de las bandas y la verificación de la transferencia.

Una vez finalizada la separación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia semiseco, utilizando un buffer de transferencia compuesto por Tris 0,25 M, glicina 1,92 M y metanol al 20 % (pH aproximado 8,3). Tras la transferencia, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente. Para los ensayos dirigidos a PD-L1 se utilizó como buffer de bloqueo una solución de leche descremada al 5 % en TBSt (derivado de TBS 10X compuesto por Tris base 1 M y NaCl 1,5 M, con adición de Tween-20 al 0,1 %). En los ensayos dirigidos a RL2 y en el lectin blot con ConA se empleó FBS al 5 % en TBSt como buffer de bloqueo.

Las membranas bloqueadas se incubaron toda la noche a 4 °C con sus respectivos anticuerpos primarios. El anticuerpo anti-PD-L1 (Cell Signaling; cat 60475 clon D4H1Z; 1 µg/ml) se diluyó en FBS al 5 % en TBS, mientras que el anticuerpo anti-RL2 (NB300524B 2 µg/ml) se preparó en FBS al 2,5 % en TBSt. El anticuerpo anti-β-actina (sc-47778: 0,4 µg/ml) y anti-GAPDH (sigma G8795; 0.050 µg/ml) se incubó en FBS al 1 % en TBSt. En el caso del lectin blot, se utilizó lectina ConA biotilada a 1 µg/mL preparada en el mismo buffer utilizado para RL2. Tras esta incubación, las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos con TBSt.

Posteriormente se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios, todos diluidos en FBS al 1 % en TBSt. Las membranas destinadas a PD-L1 se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rabano (HRP, abcam ab6721: a una concentración de 1 µg/ml); las destinadas a β-actina, con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP (Abcam ab6728: a una concentración de 1 µg/ml); mientras que las utilizadas para lectin blot y RL2 se incubaron con avidina-peroxidasa (sigma A315: a una concentración de 1 µg/ml). Para concluir esta etapa, las membranas se lavaron cinco veces durante 10 minutos con TBS.

La detección de las bandas se realizó mediante el sustrato quimioluminiscente Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, preparado mezclando en partes iguales los reactivos A y B

inmediatamente antes de su aplicación. Las membranas se incubaron durante 1 minuto con la mezcla, se retiró el exceso y la señal se detectó mediante un sistema ImageQuant 500.

Evaluación del crecimiento tumoral *in vivo*

Se utilizaron ratones C57BL/6 adquiridos de la Unidad de Reactivos Biológicos de Experimentación (URBE, Facultad de Medicina).

Para los experimentos se utilizaron hembras de 6 a 8 semanas de edad. Durante los experimentos, los ratones se alojaron en URBE, siguiendo las normas de la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA, Uruguay). Todos los procedimientos involucrando animales fueron aprobados por el Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Protocolo No 1489 titulado: "Tratamiento combinado anti-PD-L1 contra el cáncer").

Modelo de crecimiento tumoral

Se desarrolló un modelo de crecimiento tumoral mediante la inoculación subcutánea de células LL/2 Tn⁺ y WT parentales en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6 o MGL2-DTR.

Las células LL/2 se recolectaron cuando alcanzaron una confluencia del 60-70%, se contaron y luego se prepararon en una concentración de 5×10^6 células/ml. Los ratones C57BL/6 fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (10 mg/ml) y xilacina (0.1%) en PBS, y se les inocularon 500,000 células en 100 μ l de PBS, utilizando agujas de 25 gauge, de manera subcutánea en el flanco izquierdo.

Se monitoreó la aparición de tumores, y cuando estos se hicieron visibles, se midió su tamaño cada 2-3 días. El volumen tumoral se calculó con la fórmula $V = 3/4 \cdot \pi \cdot (r_1 \cdot r_2^2)$, donde r_1 es el radio mayor y r_2 el radio menor. Los animales fueron sacrificados cuando el tumor más grande alcanzó un radio de 12.5 mm. Los tumores fueron extraídos, pesados y procesados para análisis de microscopía, PCR, lisado tumoral para Western blot o citometría de flujo.

La evaluación del efecto del oxamato *in vivo* se realizó en ratones con tumores detectables. Una vez que los tumores fueron detectados, al día 14 días tras la inyección de las células tumorales, los ratones fueron divididos aleatoriamente en grupos de tratamiento, recibiendo oxamato por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 30 mg/kg de peso corporal o el vehículo (PBS) como control. El tratamiento se administró una vez al día durante 10 días consecutivos. Al día 24 tras la inyección, los tumores fueron extraídos, pesados y procesados para su análisis mediante citometría de flujo. A su vez se recolectaron muestras de suero para determinar el lactato sérico.

La evaluación del efecto de la inmunoterapia anti-PD-L1 *in vivo* (10F.9G2, BioXcell) se realizó en ratones con tumores no detectables. Al día 9 tras la inyección de las células tumorales, los ratones fueron divididos aleatoriamente en grupos de tratamiento, recibiendo anti-PDL1 por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis total de 2 µg/g de peso corporal (dividido en 5 inyecciones) o el vehículo (control isotipo; LTF-2, BioXcell) como control. El tratamiento se administró al día 9, día 15, día 19, día 22 y día 25. Al día 30 los tumores y bazo fueron extraídos, pesados y procesados para su análisis por ELISA. A su vez se recolectaron muestras de suero para determinar el lactato sérico.

Estimulados *ex vivo* de esplenocitos murinos

Se extrajo el bazo de ratones C57BL/6 bajo estrictas condiciones de esterilidad, utilizando una cabina de flujo laminar. Los tejidos se disgregaron mecánicamente y se procedió al recuento celular. Posteriormente, los esplenocitos se sembraron en placas de 96 pocillos, colocando 100 µL por pocillo a una concentración final de 1×10^7 células/mL en medio RPMI. Las células se estimularon durante toda la noche con anticuerpo anti-CD28 (BioLegend, Cat. 102112, clon 37.51; 0,2 µg/mL) y anticuerpo anti-CD3 (BioLegend, Cat. 100331, clon 145-2C11; 0,1 µg/mL). Se incluyeron controles no estimulados, a los cuales se les agregó un volumen equivalente de PBS.

ELISA INF- γ esplendorcitos murinos

El ensayo ELISA se realizó utilizando placas de alta unión NUNC Maxisorp. Todos los reactivos se prepararon el mismo día de uso y las incubaciones se llevaron a cabo protegidas de la luz cuando correspondía. Las placas fueron sensibilizadas incubando 50 μ L por pocillo de anticuerpo purificado anti-INF γ (Cat 551309 BD Biosciences, a una concentración de uso de 4 ng/ μ L: dilución 1/500) diluido en buffer fosfato 100 mM pH 9.0. La sensibilización se realizó durante la noche (ON) a 4 °C. Posteriormente, las placas se bloquearon con 100 μ L de PTG (PBS con 0,1% Tween-20 y 1% gelatina) durante 1 hora a 37 °C. Se añadieron 50 μ L de cada muestra, previamente diluidas en PTG 0,5%, y se incubaron 1 hora a 37 °C. La curva de calibración se preparó mediante diluciones seriadas 1:2 del estándar de rIFN-g en PTG 0,5%. Tras el lavado correspondiente, se adicionaron 50 μ L de anticuerpo biotinilado anti-INF γ (cat 551506 BD Biosciences, a una concentración de uso de 4 ng/ μ L: dilución 1/500) diluido en PTG y se incubó 1 hora a 37 °C. Luego del lavado, se agregó estreptavidina conjugada a peroxidasa (HRP) diluida 1:1000 en PBS y se incubó 30 min a 37 °C. El revelado se realizó con 0,01 g de OPD (o-fenilendiamina) 80 μ L de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La reacción se dejó desarrollar hasta alcanzar la intensidad deseada y se detuvo añadiendo HCl 3 M. La absorbancia se midió a 492 nm.

Resultados

Detección del antígeno Tn⁺ mediante citometría de flujo

Con el objetivo de estudiar el impacto de la glicosilación incompleta en la progresión tumoral y en la modulación del microambiente inmunológico, nuestro laboratorio desarrolló un modelo preclínico de carcinoma broncopulmonar (CBP). En particular, en el marco de la tesis doctoral de Valeria Da Costa, se generó una línea tumoral murina con bloqueo de la O-glicosilación, lo que condujo a la expresión del glicoantígeno tumoral Tn⁺. Este modelo se obtuvo mediante la edición genética de la chaperona COSMC utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 en la línea de carcinoma de Lewis LL/2 (17).

Para confirmar la presencia del antígeno Tn en nuestro modelo derivado de la línea LL/2, evaluamos el reconocimiento de células WT y Tn⁺ por parte de las lectinas VVL (Figura. 8A; reconoce O-GalNAc terminal, Tabla 1) y DBA (Figura. 8B; reconoce O-GalNAc terminal y no terminal, Tabla 1) mediante citometría de flujo. Ambas lectinas presentaron una mayor reactividad con las células Tn⁺ que, en las WT, evidenciando mayor exposición de residuos terminales de O-GalNAc.

En conjunto, el incremento simultáneo en la unión de ambas lectinas confirma que las células Tn⁺ expresan niveles elevados del antígeno Tn, reproduciendo adecuadamente el fenotipo esperado de glicosilación aberrante.

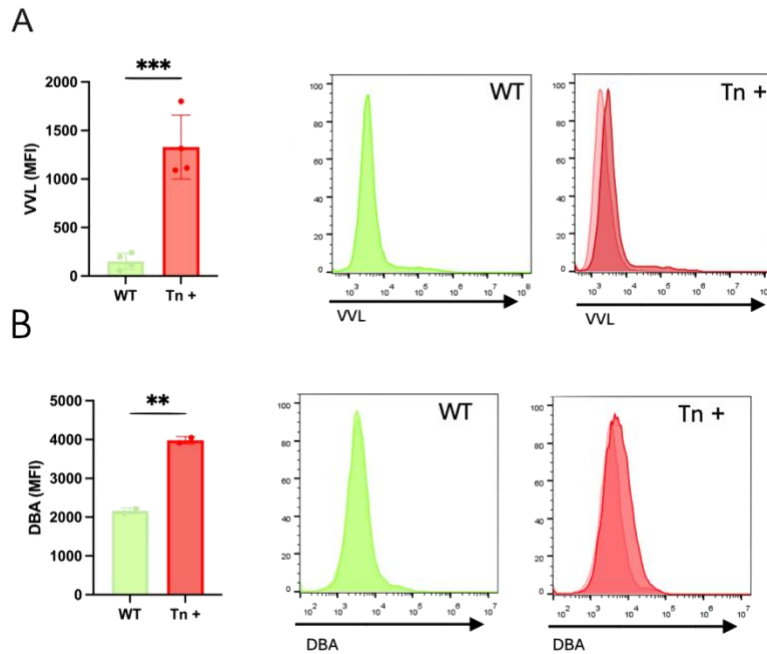


Figura 8 Detección del antígeno Tn⁺ en células WT y Tn⁺ mediante citometría de flujo. Mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) de la lectina VVL (A) y DBA (B) en células WT y Tn⁺, con histogramas representativos. Los datos se expresan como media \pm error estándar (SE). Las diferencias estadísticas se calcularon mediante una prueba t no pareada de dos colas. **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001.

Tabla 1. Lectinas utilizadas y sus ligandos

Lectina	Unión primaria	Unión secundaria / afinidad ampliada	Tipo de glicano
VVL / VVA (<i>Vicia villosa</i> lectin)	Tn, α -GalNAc	B-GalNAc	O-glicanos membranaarios
DBA (<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin)	α -GalNAc, grupo sanguíneo A		O-glicanos membranaarios
ConA (Concanavalin A)	α Man β > α Glc		N-glicanos de alta manosa, híbridos
WGA (Wheat germ agglutinin)	GlcNAc β (1,4)GlcNAc β (1,4)GlcNAc β (1,4)GlcNAc > GlcNAc β (1,4)GlcNAc > GlcNAc	internal GlcNAc in polyactosamine repeats > (Sialic acid (Neu5Ac)	N-glicanos complejos / O-GlcNAc intracelular

Caracterización funcional del metabolismo glucolítico y mitocondrial

Para comparar el perfil metabólico de las células Tn⁺ con el de las células WT, se realizaron estudios de glicólisis y respiración mitocondrial utilizando la plataforma Seahorse. La actividad glucolítica, analizada mediante la medición de la velocidad de acidificación extracelular (ECAR) reveló diferencias entre las células Tn⁺ y WT. Estas fueron inicialmente mantenidas en un medio sin glucosa, registrándose la acidificación basal previa a cualquier estímulo. Al adicionar glucosa, ambas líneas celulares mostraron un aumento evidente en ECAR, reflejando la activación de la glicólisis, aunque la respuesta fue mayor en las células Tn⁺,

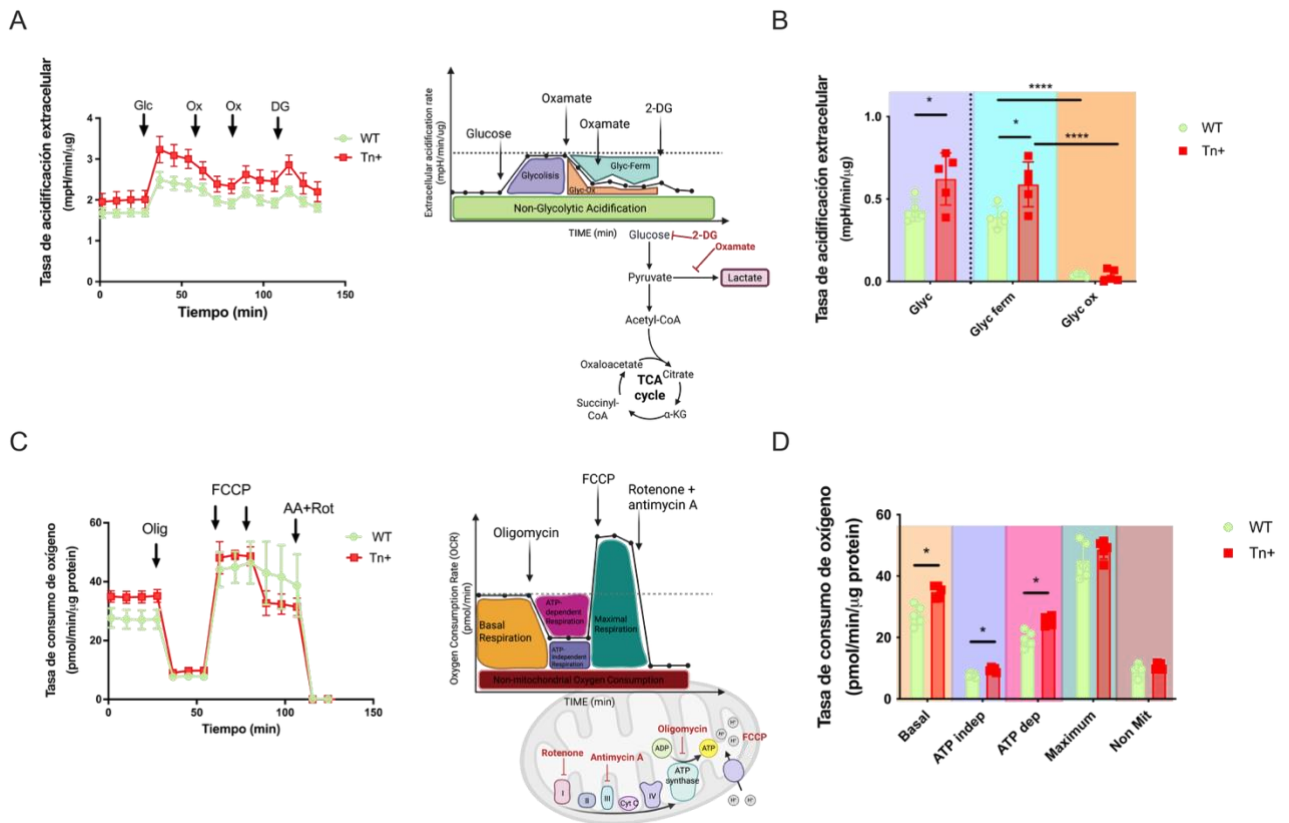


Figura 9. Análisis metabólico mediante Seahorse en células WT y Tn⁺.

(A) Medida de acidificación extracelular (ECAR) durante el ensayo glucolítico. (B) ECAR correspondiente a glucólisis (Glyc), glucólisis anaerobia (Glyc ferm) y Glucólisis oxidativa (Glyc ox). (C) Tasa de consumo de oxígeno (OCR) durante el ensayo mitocondrial. (D) OCR basal (Basal), OCR independiente de ATP (ATP indep), OCR dependiente de ATP (ATP dep), respiración máxima (Maximum) y consumo no mitocondrial (Non Mit). Todos los valores fueron normalizados por contenido proteico (BCA). Los datos se expresan como media \pm SE. Los colores de fondo de las graficas de barra corresponden con los colores de las areas de la curva del seahorse. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante un ANOVA de una vía (ordinary one-way ANOVA). * $P \leq 0.05$, **** $P \leq 0.0001$.

lo que indica una mayor capacidad glucolítica en estas células en relación con las WT (Figura 9A y 9B).

Posteriormente, la adición de oxamato (Compuesto analogo estructural del Piruvato, inhibidor competitivo de la LDH) permitió discriminar los componentes fermentativo y oxidativo del flujo glucolítico. Este análisis evidenció que las células Tn⁺ presentan una mayor capacidad fermentativa que las células WT, mientras que el componente oxidativo no mostró diferencias significativas entre ambas (Figura 9B).

La incorporación final de 2-deoxi-D-glucosa bloqueó la vía glucolítica, confirmando la especificidad del ensayo. En su conjunto, estos resultados indican que las células Tn⁺ dependen en mayor medida del metabolismo fermentativo del piruvato.

Por otro lado, el metabolismo mitocondrial se evaluó midiendo la velocidad de consumo de oxígeno (OCR) en células cultivadas en medio suplementado con glucosa, piruvato y glutamina (Figura 9C). Las células Tn⁺ exhibieron un mayor consumo basal de oxígeno en comparación con las células WT, indicando una mayor demanda energética de las células Tn⁺ (Figura 9C y 9D). Tras la adición de oligomicina (inhibidor de la enzima ATP sintetasa), se observó que el OCR disminuyó en ambas líneas celulares, permitiendo identificar la fracción del consumo de O₂ dependiente de la síntesis de ATP. En este punto, las células Tn⁺ mostraron un mayor consumo de oxígeno dependiente de ATP, así como un mayor consumo independiente de ATP, en relación con las células WT (Figura 2D). La adición de FCCP (desacoplante de la bomba de protones de la membrana mitocondrial) permitió medir la capacidad máxima de respiración mitocondrial. En este parámetro, no se detectaron diferencias significativas entre ambas líneas celulares, lo que implica que frente a altas demandas energéticas ambas células responden de la misma manera (Figura 9D). Finalmente, la incorporación de rotenona y antimicina A redujo el OCR al nivel no mitocondrial, que tampoco mostró diferencias entre Tn⁺ y WT (Figura 9D).

En conjunto, estos resultados indican que las células Tn⁺ presentan un aumento en el consumo basal de oxígeno y en los componentes dependiente e independiente de la síntesis

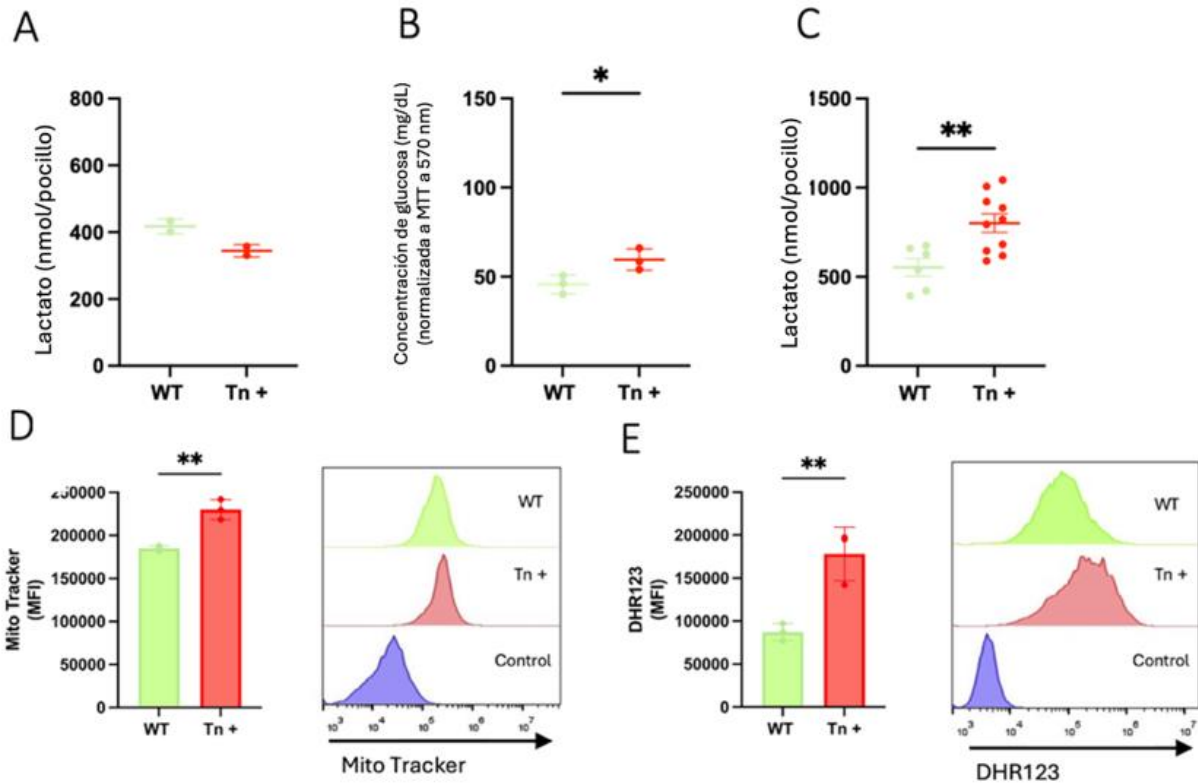


Figura 10. Alteraciones en metabolitos extracelulares, actividad mitocondrial y estrés oxidativo en células WT y Tn⁺.

(A) Detección de lactato en sobrenadante de cultivo de células WT y Tn⁺ mediante kit colorimétrico (B) Concentración de glucosa en sobrenadante de cultivo de células WT y Tn⁺ (C) Concentración de lactato sérico en ratones C57BL/6 inoculados con células WT o Tn⁺ (D) Actividad mitocondrial evaluada por citometría de flujo con MitoTracker y (E) detección de especies reactivas del oxígeno mediante la sonda DHR123 de células WT y Tn⁺, ambos con sus respectivos histogramas. Los datos se expresan como media ± SE. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante un test t no pareado de dos colas. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01.

de ATP, mientras que la capacidad máxima de respiración y el consumo no mitocondrial permanecen similares.

Alteraciones en metabolitos extracelulares y parámetros bioenergéticos

A continuación, analizamos distintos marcadores metabólicos con el fin de entender las diferencias en el metabolismo de las células WT y Tn⁺ descritas anteriormente.

Primeramente, cuantificamos el lactato en el sobrenadante de cultivo mediante la utilización de un ensayo colorimétrico, para el cual no se observaron diferencias significativas en la concentración de lactato entre las células WT y Tn⁺, sugiriendo que la producción extracelular *in vitro* de lactato en condiciones basales es comparable entre ambas líneas celulares (Figura 10A). Por otro lado, evaluamos la concentración de glucosa en el sobrenadante de cultivo de células WT y Tn⁺, mediante el uso de un ensayo colorimétrico comercial, observando un leve aumento de glucosa residual en los sobrenadantes de células Tn⁺, lo que podría indicar un menor consumo de glucosa en estas condiciones (Figura 10B). En contraste, al analizar la concentración de lactato en suero de ratones portadores de tumores derivados de las células Tn⁺ fue mayor que en aquellos derivados de células WT (Figura 10B), lo que sugiere que, *in vivo*, los tumores Tn⁺ podrían asociarse a una respuesta sistémica con mayor producción de lactato.

Para profundizar en otros aspectos bioenergéticos, analizamos la actividad mitocondrial mediante citometría de flujo utilizando la sonda MitoTracker. Las células Tn⁺ exhibieron una mayor señal mitocondrial en comparación con las WT (Figura 10D), lo que sugiere una mayor actividad mitocondrial asociada a la glicosilación aberrante.

Finalmente, evaluamos la producción de ROS intracelulares utilizando la sonda DHR123. Las células Tn⁺ presentaron niveles más elevados de ROS que las WT (Figura 10E), evidenciando un estado redox alterado asociado a un incremento del estrés oxidativo en estas células.

Caracterización de la N-glicosilación y O-glicosilación intracelular (O-GlcNAc)

Para explorar otras vías de glicosilación en nuestras líneas celulares evaluamos la presencia de N-glicanos membranaarios y O-glicanos intracelulares en estas células. En la Figura 11A se muestra la reactividad de la lectina Conavalina A (ConA, Tabla 1) por citometría de flujo. Esta lectina reconoce preferencialmente N-glicanos de alta manosa, correspondientes a

estructuras inmaduras del proceso de N-glicosilación. Observamos que las células WT presentan una mayor unión de ConA, indicando una mayor abundancia de N-glicanos ricos en manosa en comparación con las células Tn⁺. Por otro lado, en la Figura 11B se presenta la reactividad de la aglutinina de germen de trigo (WGA, Tabla 1), una lectina que reconoce N-glicanos complejos (O-GlcNAc terminal). Las células WT exhibieron una mayor reactividad por esta lectina respecto de las células Tn⁺, sugiriendo una reducción global de N-glicanos, tanto inmaduros como complejos, en las células Tn⁺.

Además, realizamos un lectin blot para confirmar estos resultados. En la Figura 11C se muestra el patrón de reconocimiento de lisados celulares totales por ConA, normalizado por GAPDH. Este análisis confirmó los hallazgos obtenidos por citometría: la señal de ConA fue más intensa en las células WT, lo que refuerza la idea de una menor presencia de N-glicanos de alta manosa en las células Tn⁺.

Para analizar la O-GlcNAc silación intracelular, realizamos una citometria de flujo con marcación intracelular utilizando la lectina WGA. Este ensayo mostró que las células Tn⁺ presentan mayores niveles de O-GlcNAc intracelular (Figura 11D). Interesantemente, en ambas líneas celulares se pueden diferenciar tres subpoblaciones con diferentes niveles de O-

GlcNAc intracelular, observándose en las células Tn⁺ un aumento en la población de mayor intensidad de señal.

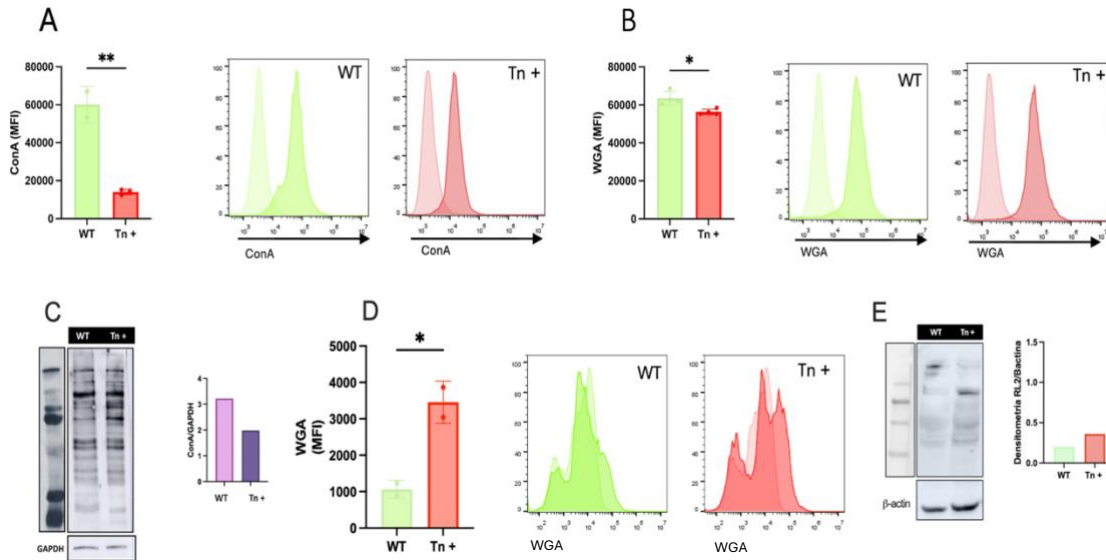


Figura 11 Diferencias en la N-glicosilación y O-glicosilación intracelular entre células WT y Tn⁺.

(A) MFI de ConA membranaria (N-glicanos de alta manosa) en células WT y Tn⁺ por citometría de flujo (B) MFI de WGA membranaria (N-glicanos complejos) en células WT y Tn⁺ por citometría de flujo, ambas con histogramas representativos. (C) Lectin blot de ConA, lisado celular total WT y Tn⁺ normalizado por GAPDH. (D) MFI intracelular de WGA (O-GlcNAc) por citometría de flujo en células WT y Tn⁺, con histogramas representativos. (E) Western blot de lisado celular total con el anticuerpo RL2 (O-GlcNAc) normalizado con β Actina. Los datos se expresan como media \pm SE. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante un test t no pareado de dos colas. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

Finalmente, la Figura 11E presenta un Western blot para lisado celular total con el anticuerpo RL2 normalizado por la expresión de β -actina, el cual reconoce residuos de O-GlcNAc

Aquí también se detecta una mayor señal de O-GlcNAc en las células Tn⁺ en comparación con las WT, indicando una modulación diferencial de la vía de O-glicosilación intracelular asociada al fenotipo Tn⁺.

Expresión de genes relacionados al metabolismo celular

Para poder profundizar en los cambios metabólicos descritos anteriormente, evaluamos la expresión génica por RT-qPCR de un panel de enzimas metabólicas en células WT

y Tn⁺. En la Tabla 2 se muestran las distintas enzimas codificadas por cada gen analizado, en conjunto con su función.

En el conjunto de genes correspondientes a las enzimas de la glicólisis (GLUT1, HK, PFK1, PGM1, PGM2, PGK1) ambas líneas celulares mostraron una expresión génica similar (Figure 12A-F). En relación con las enzimas encargadas del metabolismo de lactato, aunque la expresión génica de la LDH-A fue similar en ambas líneas, la de la LDH-B fue significativamente menor en las células Tn⁺ en relación con las WT. (Figura 12G-H).

Posteriormente, analizamos la expresión génica de los tres componentes del complejo piruvato deshidrogenasa: PDHA, PDHB y PDHX, responsables de la conversión de piruvato hacia acetil-CoA. Los resultados de la PCR cuantitativa indicaron una disminución en la expresión génica de los componentes PDHB y PDHX, pero no de PDHA, en células Tn⁺ con respecto a las WT (Figura 12I-K), lo que podría asociarse con una disminución de la actividad PDH, potencialmente disminuyendo la entrada de piruvato a TCA.

En cuanto a la expresión génica de las enzimas del ciclo de Krebs (IDH1, IDH3, DLST y OGDH), se registraron niveles de expresión más elevados en las células Tn⁺ para IDH3, responsables de la producción de α -cetoglutarato en localizaciones mitocondriales, y DLST componente del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa, lo que podría reflejar un refuerzo general del flujo de TCA. Sin embargo, observamos una disminución en la expresión génica de la IDH1 en las células Tn⁺ en comparación con WT, lo que sugiere que la

Tabla 2. Nombre y función de las enzimas analizadas por RT-qPCR.

Gen	Enzima codificada	Función de la enzima	Proceso metabólico
GLUT1	Transportador de glucosa 1	Transporta glucosa al interior de la célula	Entrada de glucosa / Glicólisis
HK	Hexoquinasa	glucosa \rightarrow glucosa-6P	Glicólisis (primer paso de la glicólisis)
PFK1	Fosfofructoquinasa 1	fructosa-6P \rightarrow fructosa-1,6-bisfosfato	Glicólisis(paso limitante)
PGM1	Fosfoglucomutasa 1	glucosa-1P \leftrightarrow glucosa-6P	glucogenogénesis
PGM2	Fosfoglucomutasa 2	glucosa-1P \leftrightarrow glucosa-6P	glucogenogénesis

PGK1	Fosfoglicerato quinasa 1	1,3-BPG → 3-PG	Glicólisis
LDH-A	Lactato deshidrogenasa A	Piruvato → lactato reversible	Fermentación/ Glicólisis
LDHB	Lactato deshidrogenasa B	Lactato → piruvato reversible	Metabolismo del lactato
PDHA	Subunidad E1 α del complejo PDH	piruvato → acetil-CoA	Entrada al TCA
PDHB	Subunidad E1 β del complejo PDH	piruvato → acetil-CoA	Entrada al TCA
PDHX	Componente accesorio del complejo PDH	Regulación y ensamblaje del complejo PDH	Entrada al TCA
IDH1	Isocitrato deshidrogenasa 1 (citosólica)	Isocitrato → α -cetoglutarato, reversible	TCA / Redox
IDH3A	Subunidad alfa de la Isocitrato deshidrogenasa 3 (mitocondrial)	Isocitrato → α -cetoglutarato irreversible	TCA
OGDH	α -cetoglutarato deshidrogenasa (E1 de KGDH)	Descarboxilación de α -KG → succinil-CoA	TCA
DLST	Dihidrolipoamida S-succiniltransferasa (E2 del α -KGDH)	α -cetoglutarato → succinil-CoA	TCA
ATP sin	ATP sintasa	Síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.	Fosforilación oxidativa
GLUL	Glutamina sintetasa	Glutamato → glutamina	Metabolismo de glutamina
GFPT1	Glutamina-fructosa-6P aminotransferasa 1	Fructosa-6-fosfato+ glutamina → glucosamina-6-fosfato + glutamato	paso limitante del HBP
GFPT2	Glutamina-fructosa-6P aminotransferasa 2	Fructosa-6-fosfato+ glutamina → glucosamina-6-fosfato + glutamato	paso limitante del HBP
GNPNAT1	Glucosamina-6P N-acetiltransferasa	Glucosamina-6-fosfato+ Acetil-CoA → N-acetilglucosamina-6-fosfato + CoA	N-glicosilación
OGT	O-GlcNAc transferasa	Agrega O-GlcNAc a proteínas citosólicas y nucleares	O-glicosilación intracelular / HBP
CMYC	C-Myc	Regula genes de glicólisis, glutaminólisis y proliferación	Regulación transcripcional del metabolismo
HIF1a	Factor inducible por hipoxia 1	Activa glicólisis e inhibe PDH bajo hipoxia	Hipoxia / Regulación metabólica
HIF2a	Factor inducible por hipoxia 2	Regula metabolismo lipídico, supervivencia y adaptación hipóxica	Hipoxia / Regulación metabólica

actividad citoplasmática de la enzima IDH podría estar disminuida (Figura 12L). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre la expresión génica de la ATP sintasa mitocondrial y OGCD entre las líneas celulares (Figura 12P).

Respecto del metabolismo de glutamina, la expresión de GLUL (Fig 12Q) y para las enzimas responsables de la HBP (Figura 12R-U), no se obtuvo diferencias significativas entre ambas líneas celulares.

Por último, evaluamos la expresión génica de factores de transcripción relacionados con el metabolismo celular (cMyc, HIF1 α y HIF2). Observamos que las células Tn⁺ presentan mayor expresión génica de HIF1a, pero menor expresión de HIF2. Esto podría explicar el patrón de expresión diferencial de ciertas enzimas metabólicas entre ambas líneas celulares. Por otro lado, cMyc no se encontró diferencialmente expresado entre las líneas analizadas.

Efecto de la inhibición de la LDH

Con el fin de analizar los cambios provocados por el aumento de lactato, procedimos a analizar distintos parámetros metabólicos en presencia o ausencia de oxamato, un inhibidor competitivo de la enzima LDH.

Como se observa en la Figura 13A, la adición de oxamato al cultivo celular de las células WT y Tn⁺ disminuyó drásticamente la concentración extracelular de lactato en el medio de cultivo, confirmando que el tratamiento fue efectivo en la inhibición de la actividad de LDH. Por otro lado, la disminución de lactato se acompañó de un aumento de la concentración de glucosa en el sobrenadante del cultivo tras el tratamiento con oxamato (Figura 13B). En estas condiciones, los niveles de glucosa aumentaron significativamente y se aproximaron a la concentración inicial presente en el medio RPMI (200 mg/dL), lo que sugiere una gran reducción en el consumo de glucosa por parte de las células cuando la conversión de piruvato a lactato se encuentra bloqueada.

A continuación, se evaluó el efecto de la inhibición de LDH sobre la actividad mitocondrial utilizando la sonda Myotracker por citometría de flujo. La presencia de oxamato resultó en una disminución de la actividad relativa mitocondrial en ambas líneas celulares (Figura 13C), lo que indica que la inhibición de la vía fermentativa podría estar asociada a una reducción del metabolismo oxidativo.

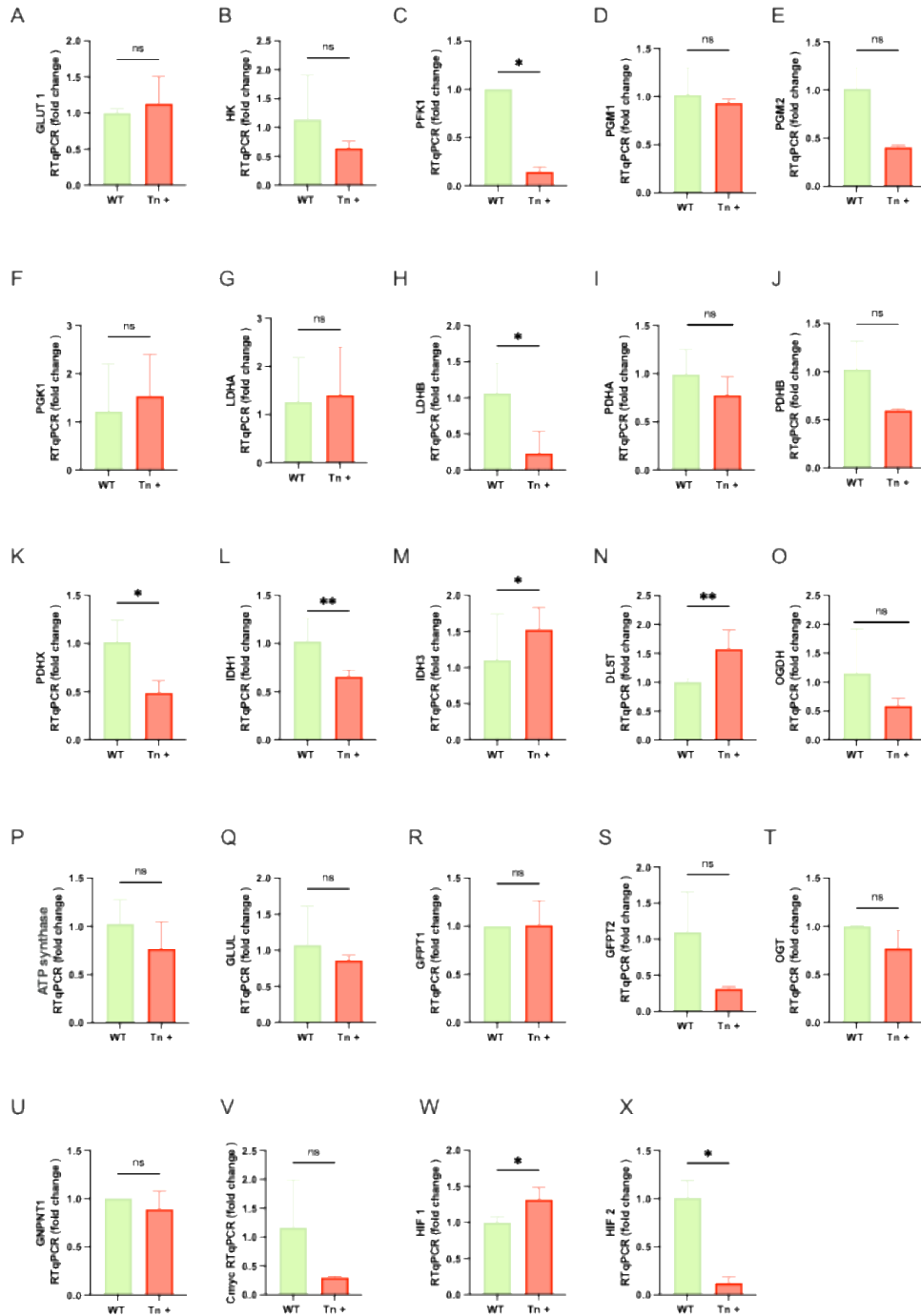


Figura 12. Expresión génica de enzimas metabólicas en células WT y Tn⁺ analizada por RT-qPCR.

(A–W) Análisis de la expresión génica de enzimas asociadas a rutas metabólicas centrales en células WT y Tn⁺. Se evaluaron genes de glicólisis (A) GLUT1, (B) HK, (C) PFK1, (D) PGM1, (E) PGM2, (F) PGK1, (G) LDH-A, (H) LDHB; conversión de piruvato (I) PDHA, (J) PDHB, (K) PDHX; ciclo de Krebs (L) IDH1, (M) IDH3, (N) DLST, (O) OGDH; OXFOx ATPsin (P) metabolismo de glutamina (Q) GLUL; vía de la hexosamina (R) GFPT1, (S) GFPT2, (T) OGT, (U) GNPAT1; y factores de regulación metabólica (V) CMyc, (W) HIF1 α , (X) HIF2. Los datos se expresan como media \pm SE relativo a β actina. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante un test t no pareado de dos colas. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

Finalmente, se analizó la generación de ROS utilizando la sonda DHR123. A diferencia de los parámetros anteriores, el tratamiento con oxamato no produjo cambios significativos en los niveles de ROS en ninguna de las líneas celulares (Figura 13D), indicando que la

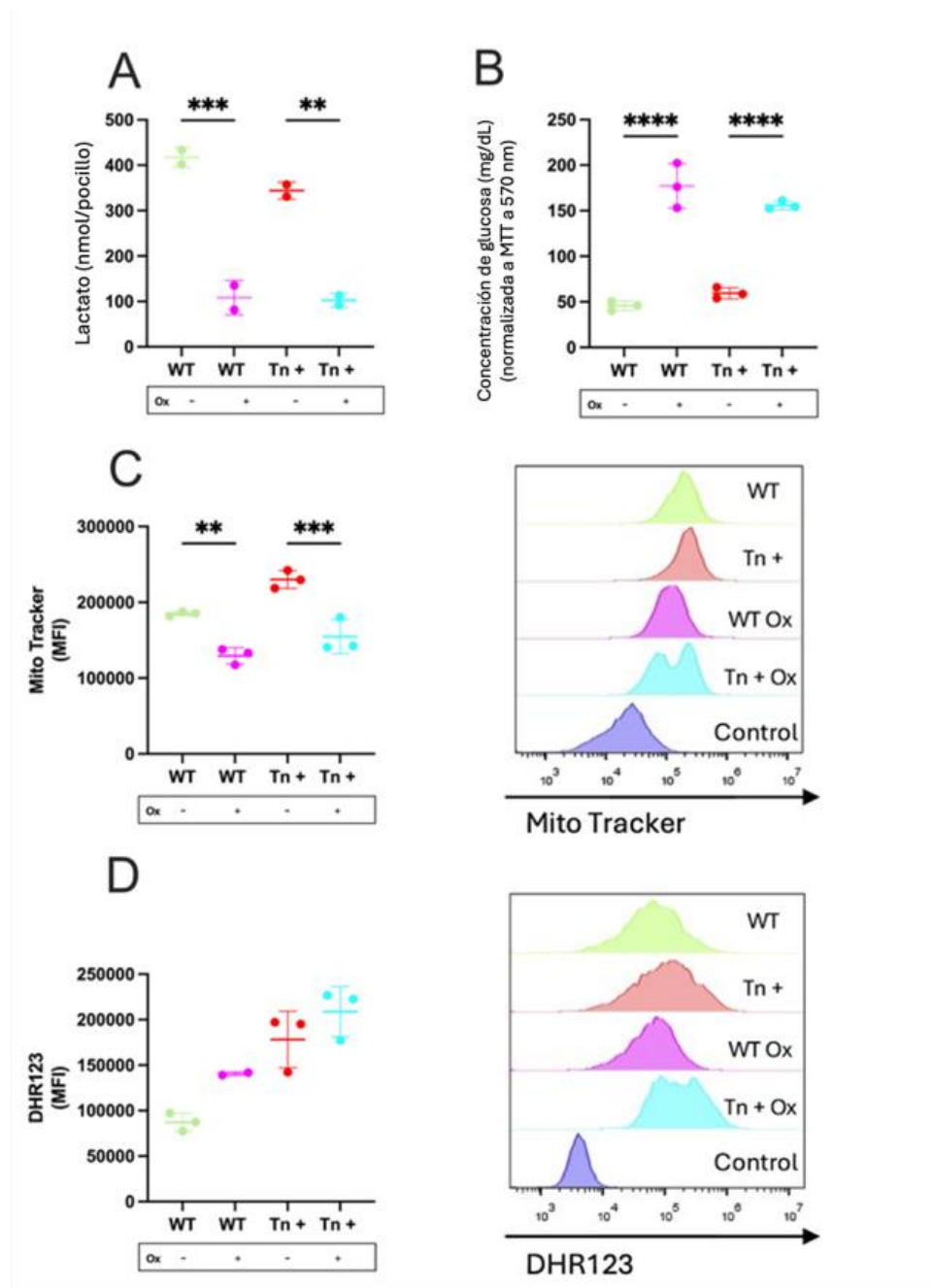


Figura 13. Efecto del inhibidor de LDH (oxamato) sobre el metabolismo de células WT y Tn⁺.

(A) Concentración de lactato en sobrenadante de cultivo celular medida mediante kit colorimétrico de células WT y Tn⁺ en presencia o ausencia de oxamato (B) Concentración de glucosa en sobrenadante celular medida mediante kit colorimétrico de células WT y Tn⁺ en presencia o ausencia de oxamato (C) Actividad mitocondrial evaluada por citometría de flujo mediante MitoTracker y (D) detección de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante la sonda DHR123, en células WT y Tn⁺ en presencia o ausencia de, ambos con histogramas respectivos. Los datos se expresan como media \pm SE. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante un ANOVA de una vía (ordinary one-way ANOVA). ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$

inhibición de LDH no impactó de manera relevante sobre el estado redox global bajo las condiciones evaluadas.

Efecto de la inhibición de LDH en la expresión génica de enzimas metabólicas

Para complementar los resultados sobre el efecto de la inhibición de la síntesis de lactato en nuestro modelo tumoral, analizamos posibles cambios en la expresión génica de las enzimas metabólicas analizadas previamente mediante RT-qPCR, comparando células WT y Tn⁺ tratadas y no tratadas. En general, la exposición a oxamato no produjo cambios significativos en la expresión de la mayoría de los genes metabólicos evaluados, indicando que la inhibición aguda de LDH no genera una reprogramación transcripcional amplia en estas vías bajo las condiciones estudiadas (Figura 14).

Sin embargo, se identificaron dos excepciones. Por un lado, se observó una disminución significativa de la expresión génica de HIF-1 α únicamente en las células Tn⁺ tratadas con oxamato en comparación con las células Tn⁺ no tratadas (Figura 14W), sugiriendo que la inhibición de LDH podría modular la expresión de factores de respuesta a hipoxia específicamente en el contexto del fenotipo Tn⁺. Por otra parte, se detectó una disminución significativa en la expresión de PGM2 en las células WT tratadas con oxamato respecto de su condición control (Figura 14E). Dado que PGM2 participa en la interconversión de intermediarios fosforilados entre la glucólisis y la vía de las pentosas (Figura 1), estos resultados podrían reflejar una respuesta compensatoria de las células WT ante la perturbación del metabolismo del piruvato.

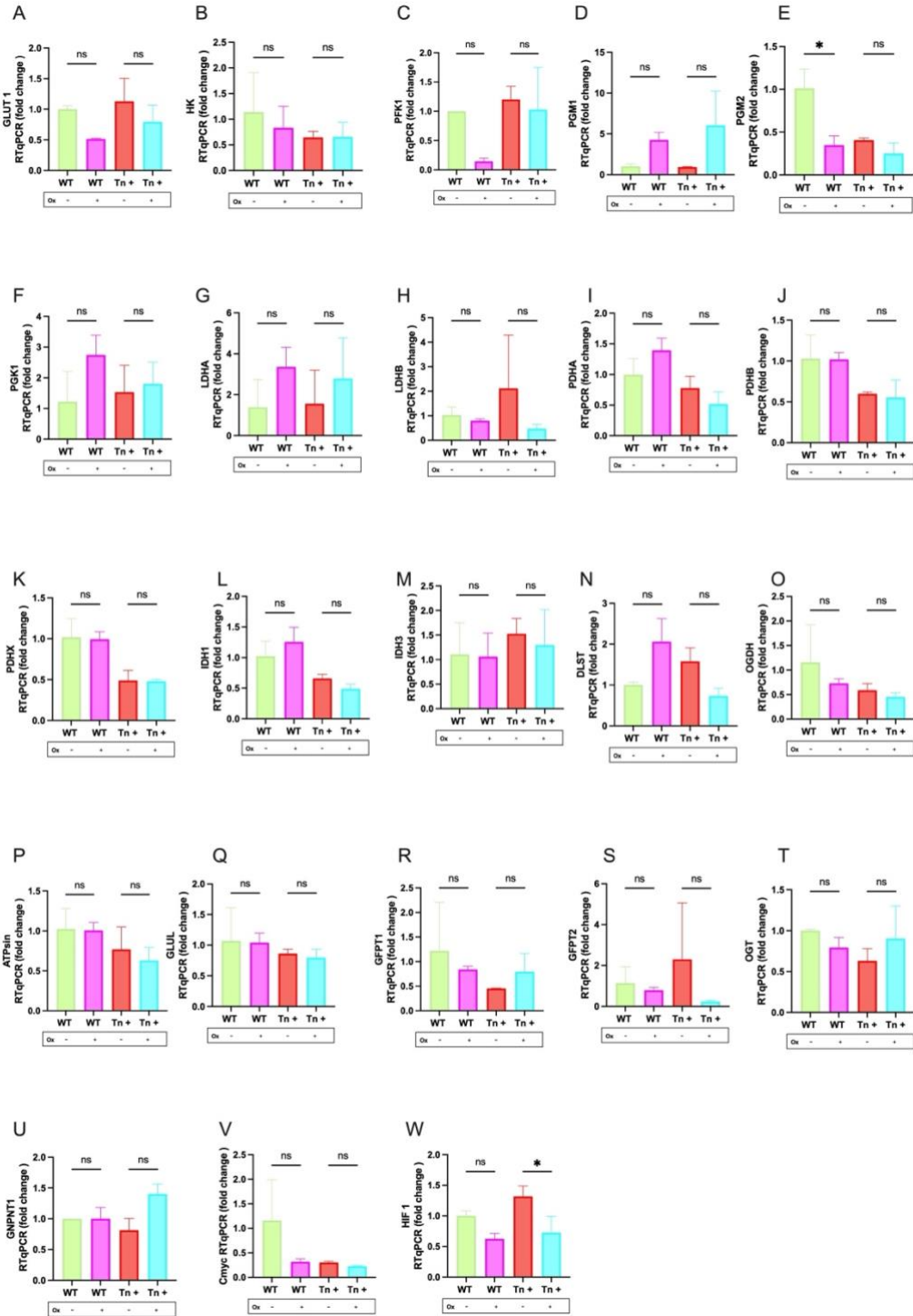


Figura 14. Expresión de genes metabólicos en células WT y Tn⁺ en presencia o ausencia de oxamato.

(A–W) Análisis de la expresión génica relativa al gen de la Bactina de genes asociados a rutas metabólicas centrales en células WT y Tn⁺. Se evaluaron genes de glicólisis (A) GLUT1, (B) HK, (C) PFK1, (D) PGM1, (E) PGM2, (F) PGK1, (G) LDH-A, (H) LDHB; conversión de piruvato (I) PDHA, (J) PDHB, (K) PDHX; ciclo de Krebs (L) IDH1, (M) IDH3, (N) DLST, (O) OGDH; OXFOX ATPsin (P) metabolismo de glutamina (Q) GLUL; vía de la hexosamina (R) GFPT1, (S) GFPT2, (T) OGT, (U) GNPNT1; y factores de regulación metabólica (V) CMyc, (W) HIF1, (X) HIF2. Los datos se expresan como media ± SE. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante un ANOVA de una vía (ordinary one-way ANOVA). *P < 0.05

Efecto de la inhibición de LDH sobre la proliferación y viabilidad

celular

A continuación, evaluamos el efecto de la inhibición de LDH por oxamato en la proliferación y la viabilidad celular de las líneas WT y Tn⁺. En la Figura 15A se muestra el ensayo de proliferación celular evaluado por MTT luego de 24 horas de incubación de las células con oxamato, donde se observó que el tratamiento con oxamato redujo significativamente la proliferación en ambas líneas celulares. En la figura 15B vemos el porcentaje de proliferación para las células WT y Tn⁺ tratadas con oxamato. Nótese que, a una concentración de 10.000 células sembradas, el inhibidor disminuyó la proliferación de las células WT en un 50%, mientras que para las células Tn⁺ esta inhibición representó un 20%.

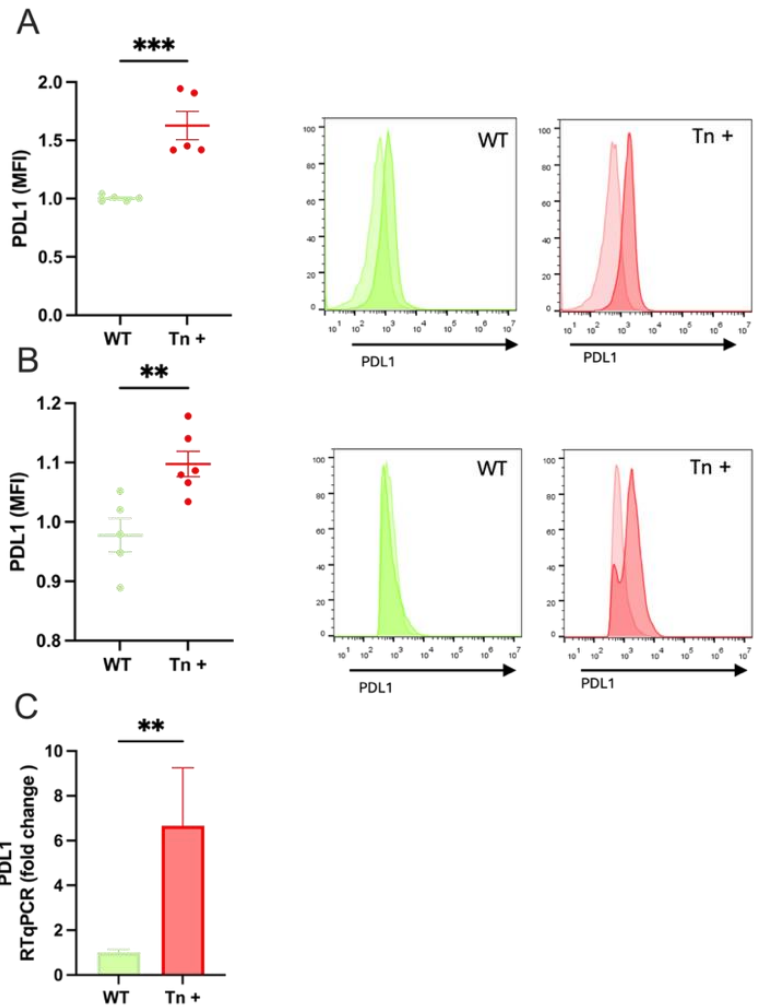


Figura 16 . Expresión de PD-L1 en células WT y Tn⁺ in vitro e in vivo.

*Detección de PD-L1 por citometría de flujo en células WT y Tn⁺ (A) y en tumores derivados de células WT y Tn⁺ (B), con histogramas respectivos. (C) Expresión génica de PD-L1 evaluada por RT-qPCR en células WT y Tn⁺ normalizado por b-actina. Los datos se expresan como media \pm error estándar (SE). Las diferencias estadísticas se calcularon mediante un test t no pareado de dos colas. *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001.*

Con el objetivo de determinar si la reducción en la proliferación podía atribuirse a un aumento en la muerte celular, analizamos la viabilidad celular mediante citometría de flujo utilizando los marcadores 7-AAD y anexina V, que permiten discriminar entre células viables, necróticas y en apoptosis temprana o tardía (Figura 15C). Las células 7-AAD⁺/anexina⁻ como necróticas; las anexina⁺/7-AAD⁻ como apoptosis temprana; y las doble positivas como

apoptosis tardía. En la Figura 15D se presenta el análisis de necrosis, que muestra que el tratamiento con oxamato aumenta el porcentaje de necrosis en células Tn⁺, no así en las WT. En contraposición, el tratamiento con oxamato no aumentó el porcentaje de células apoptóticas en ambos casos (Figuras 15D y 15E). En conjunto, estos resultados indican que la inhibición de LDH-A mediante oxamato reduce la proliferación de ambas líneas celulares — aparentemente en mayor medida en las células WT, pero afecta de manera diferencial su viabilidad: las células Tn⁺ presentan un incremento de la necrosis.

Estudio de la expresión de PD-L1

Antecedentes de nuestro grupo de investigación indican que los tumores derivados de las células Tn⁺ son más agresivos *in vivo* (122). Para evaluar si esta agresividad se relaciona con una mayor capacidad de evasión inmunológica, analizamos la expresión de PD-L1 tanto en las líneas celulares *in vitro* como en los tumores. Por otro lado, se sabe que la glicosilación afecta la estabilidad del PD-L1, ya que es indispensable para su expresión en membrana (60). Por otro lado, al deglicosilar biopsias de tumores con PNGasa-F se aumenta la detección por IHQ, dilucidando la importancia de la glicosilación para la unión al anticuerpo (60). El análisis de PD-L1 por citometría de flujo en células WT y Tn⁺ cultivadas *in vitro* (Figura 16A) y en tumores WT y Tn⁺ (Figura 16B), indicó que en presencia de glicosilación aberrante hay un aumento de PD-L1 en comparación con las células WT.

Finalmente, en la Figura 16C se presenta la expresión génica de PD-L1 evaluada por RT-qPCR en células WT y Tn⁺. En concordancia con los datos obtenidos por citometría, las células Tn⁺ mostraron niveles significativamente más altos de PD-L1 a nivel transcripcional. En conclusión, estos resultados demuestran que en presencia de glicosilación aberrante hay una mayor expresión de PD-L1, tanto a nivel de membrana, tanto *in vitro* como *in vivo*, como a nivel transcripcional *in vitro*.

Impacto de distintos inhibidores metabólicos sobre la expresión de PD-L1

Dado que está ampliamente documentado que el lactato incrementa la expresión de PD-L1 (66), decidimos evaluar la detección de dicha molécula en presencia del inhibidor de LDH, oxamato.

En la Figura 17A se muestra la detección de PD-L1 por citometría de flujo en células tratadas o no con oxamato. En ambas líneas celulares, el tratamiento con oxamato produjo un aumento significativo en la señal de PD-L1 detectado por citometría de flujo. Por otro lado, la Figura 17B presenta el análisis de expresión génica de PD-L1 evaluado mediante RT-qPCR bajo las mismas condiciones. En este caso, se observó que el tratamiento con oxamato no modificó la expresión transcripcional de PD-L1 en las células WT, mientras que en las células Tn⁺ se detectó una disminución significativa en relación al control, lo que contrasta con el aumento observado a nivel proteico. Estos resultados fueron confirmados al evaluar la expresión de PD-L1 por Western blot en células WT y Tn⁺ cultivadas en presencia o ausencia de oxamato. Como se muestra en la Figura 17C, en ambas líneas celulares se observó un aumento en la detección de PD-L1 tras la inhibición de LDH.

Para complementar estos resultados analizamos la expresión de PD-L1 en células WT y Tn⁺ mediante citometría de flujo tras el tratamiento con ácido láctico (Figura 17D) y bajo condiciones de hipoxia (Figura 17E), respectivamente. En ambos casos se observó que estas condiciones incrementan la detección de PD-L1 exclusivamente en la línea WT.

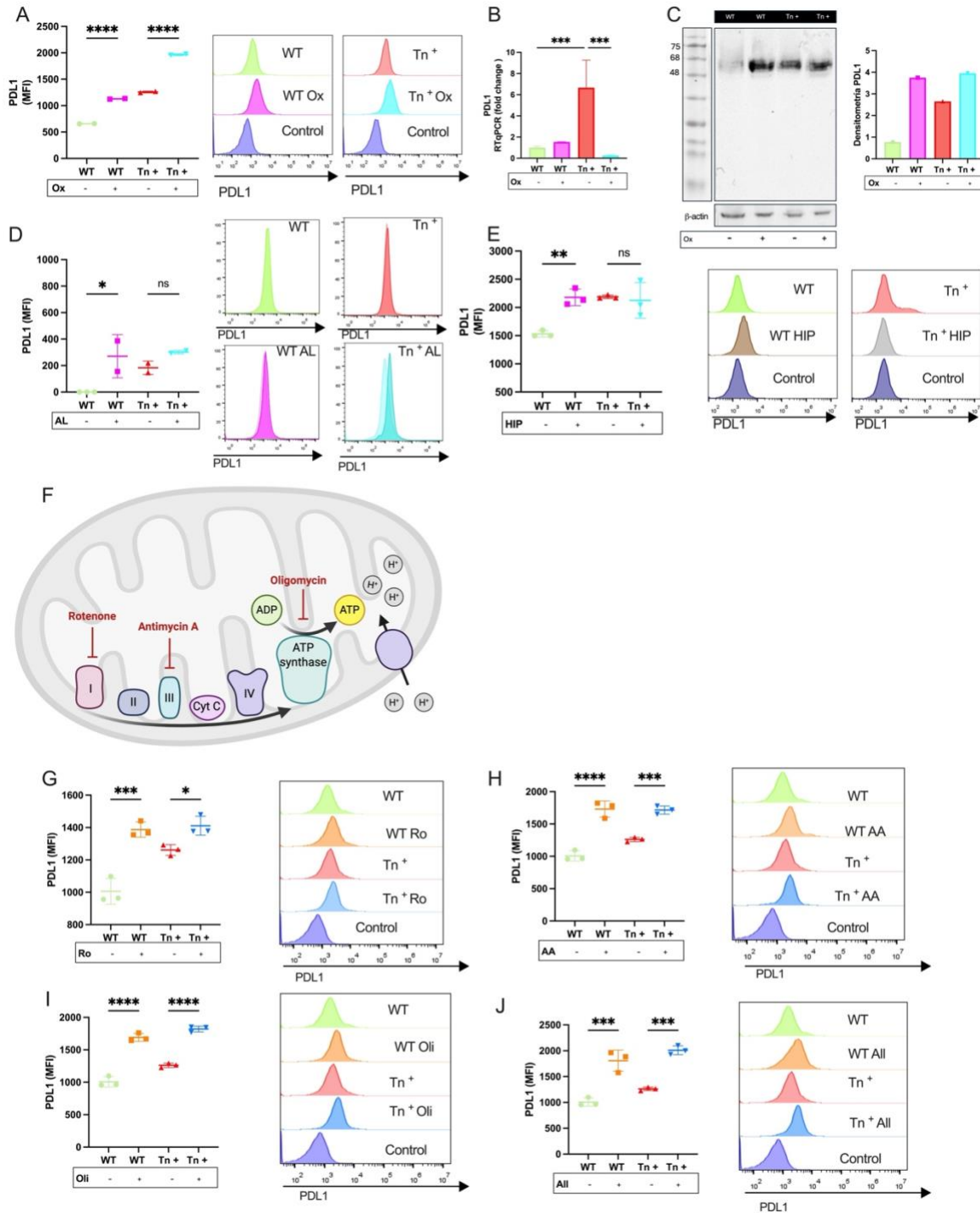


Figura 17. Modulación de PD-L1 por inhibidores de LDH y de la fosforilación oxidativa en células WT y Tn⁺.

(A) Detección de PD-L1 por citometría de flujo en células WT y Tn⁺ tratadas con Oxamato (Ox) con histogramas respectivos. (B) Expresión génica de PD-L1 por RT-qPCR normalizada por β actina (C) Western blot de PD-L1 en células WT y Tn⁺ tratadas o no con oxamato. (D) Detección de PD-L1 por citometría de flujo tras tratamiento con ácido láctico (AL) (D) y condición de hipoxia (HIPO) (E) en células WT y Tn⁺ con histogramas respectivos. (F) Esquema de los inhibidores mitocondriales utilizados: rotenona (Ro: complejo I), antimicina A (AA: complejo III) y oligomicina (Oli: ATP sintasa). PD-L1 por citometría de flujo en células WT y Tn⁺ tratadas con rotenona (G), antimicina A (H), oligomicina (I) y combinado con los tres inhibidores mitocondriales (All) (J), con sus respectivos histogramas. Los datos se expresan como media \pm error estándar (SE). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante un ANOVA de una vía (ordinary one-way ANOVA). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

Dado que la inhibición de la fermentación láctica alteró la detección de PD-L1,

decidimos analizar si la inhibición de la fosforilación oxidativa también modula o influye en la expresión de esta molécula. Para ello, utilizamos tres inhibidores mitocondriales: i) la rotenona, que actúa sobre el complejo I de la cadena respiratoria; la antimicina A, que inhibe el complejo III; y la oligomicina, que bloquea la ATP sintasa (Figura 17F).

En las Figuras 17G, 17H y 17I se muestran los análisis por citometría de flujo de células WT y Tn⁺ tratadas con rotenona, antimicina A y oligomicina, respectivamente. En los tres casos, la inhibición de diferentes componentes de la cadena respiratoria produjo un aumento en la detección de PD-L1 en la superficie de ambas líneas celulares.

Finalmente, en la Figura 17I se evaluó el tratamiento combinado con rotenona, antimicina A y oligomicina. De manera consistente con los resultados individuales, el uso simultáneo de los inhibidores mitocondriales también indujo un aumento en la expresión de PD-L1 por citometría de flujo en ambas líneas celulares, aunque no aumento con respecto al uso individual de los inhibidores.

En conjunto, la Figura 17 muestra que la inhibición de vías metabólicas, tanto fermentativas como mitocondriales, se asocia con un aumento en la detección de PD-L1 en células WT y Tn⁺, independientemente del punto de la vía afectado.

Efecto de inhibidores de la glicosilación sobre la expresión de PD-L1

Como dijimos anterioremente, PD-L1 se encuentra N-glicosilado, y esta modificación postraduccional es esencial para su adecuada expresión en la membrana plasmática. Algunos estudios han demostrado que la inhibición de la N-glicosilación interrumpe el transporte de la proteína hacia la superficie celular (61). Además, se ha observado que la deglicosilación de biopsias de pacientes mediante PNGasa-F incrementa la detección de PD-L1 en dichos tejidos, dado que los N-glicanos de la proteína dificultan la unión del anticuerpo empleado en la IHQ (60). A partir de esta evidencia, resulta relevante evaluar la detección de PD-L1 en presencia de inhibidores de la N-glicosilación.

En la Figura 18A se presenta un esquema ilustrativo del punto de acción de los inhibidores utilizados. La tunicamicina inhibe la *UDP-N-acetilglucosamina: dolicol-P N-acetilglucosamina-1-P transferasa* (GPT), enzima responsable del primer paso del ensamblaje del precursor lipídico de los N-glicanos, bloqueando por completo la N-glicosilación. Por otro lado, la swainsonina inhibe la *manosidasa II*, una enzima tardía del procesamiento de N-glicanos, lo que resulta en la acumulación de glicanos de alta manosa.

Primeramente, evaluamos la expresión de PD-L1 por citometría de flujo tras el tratamiento con swainsonina. No se observaron diferencias significativas en la expresión de PD-L1 en ninguna de las dos líneas celulares (Figura 18B). Para confirmar la eficacia del tratamiento, se analizó la unión de ConA, una lectina que reconoce N-glicanos ricos en manosa, observándose un aumento significativo en ambas líneas celulares tratadas (Figura 18C), lo que valida el bloqueo esperado del procesamiento de N-glicanos.

En segundo lugar, evaluamos la detección de PD-L1 tras el tratamiento con tunicamicina. En este caso, las células WT no mostraron cambios significativos en la expresión de PD-L1. Sin embargo, en las células Tn⁺ se observó una disminución en la detección de PD-L1 por citometría de flujo (Figura 18D). La eficacia del inhibidor se confirmó a través de la unión de ConA, que disminuyó significativamente en ambas líneas tras el tratamiento con tunicamicina (Figura 18E), consistente con la ausencia de N-glicanos por inhibición del primer paso de la vía.

En tercer lugar, analizamos el efecto de la PNGasa-F, una enzima que escinde los N-glicanos de proteínas ya presentes en la membrana, en la expresión de PD-L1. Las células fueron fijadas previamente para asegurar que solo se eliminaran los N-glicanos de proteínas ya expresadas en superficie. Tras el tratamiento con PNGasa-F, se observó un aumento en la detección de PD-L1 por citometría de flujo (Figura 18F). Este aumento no reflejó una mayor expresión, sino una mayor accesibilidad del anticuerpo a PD-L1 debido a la eliminación de N-

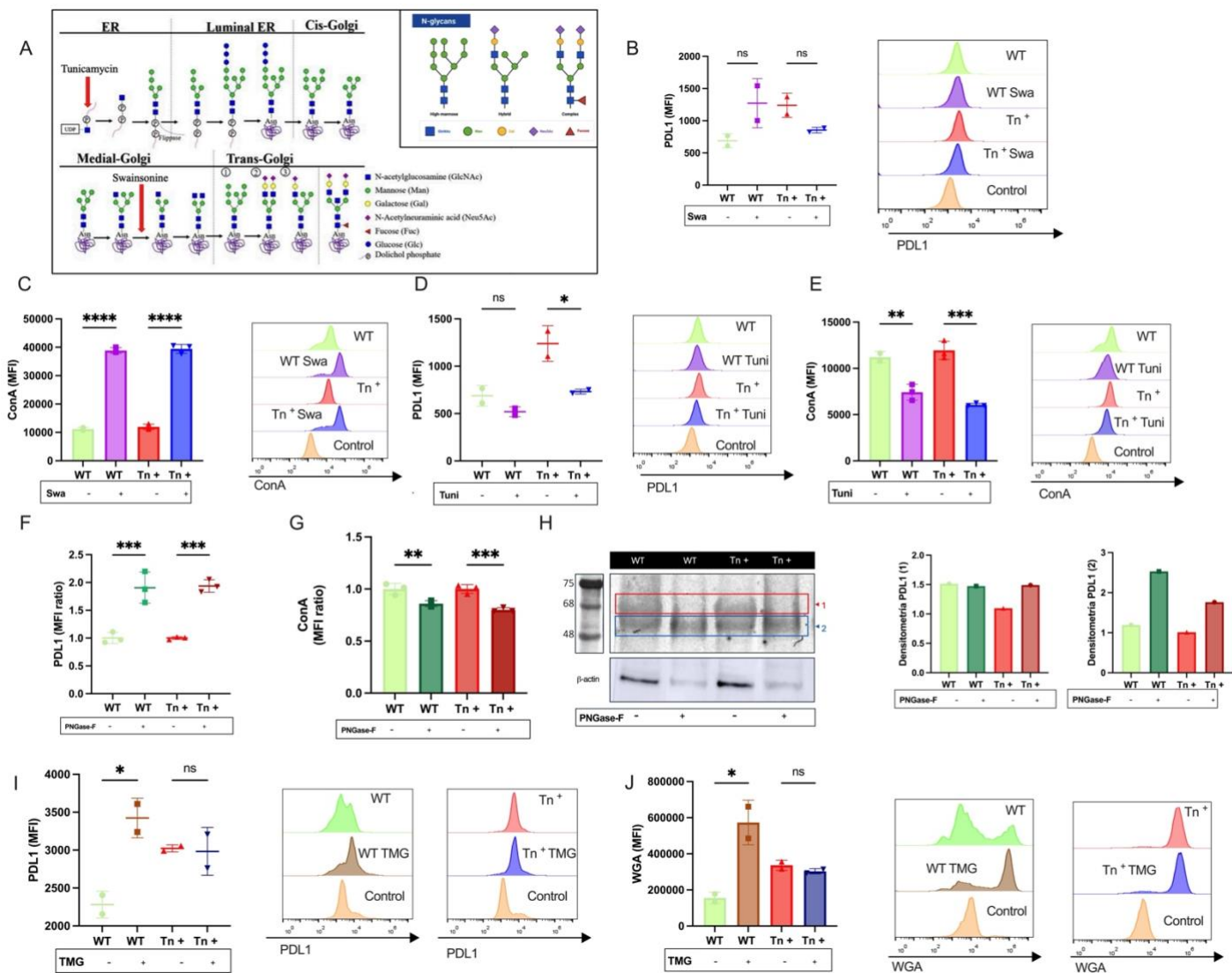


Figura 18. Modulación de la expresión y detección de PD-L1 mediante inhibidores de la N-glicosilación y la O-glicosilación intracelular.

Esquema del punto de acción de los inhibidores de N glicosilación: la tunicamicina bloquea la enzima GPT (primer paso de la N-glicosilación) y la swainsonina inhibe la mannosidasa II, generando N-glicanos ricos en manosa. Detección de PD-L1 y ConA por citometría de flujo en células WT y Tn⁺ tratadas con swainsonina (Swa) (B y C respectivamente), tunicamicina (Tuni) (D y E respectivamente) y PNGasa F (F y G respectivamente), con histogramas respectivos. (H) Western blot de PD-L1 en células WT y Tn⁺ tratadas o no con PNGasa F, con su respectiva densitometría. Detección de PD-L1 y WGA intracelular por citometría de flujo en células WT y Tn⁺ tratadas con TMG (I y J respectivamente) y OSMI-1 (K y L respectivamente), con histogramas respectivos. Los datos se expresan como media ± error estándar (SE). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante un ANOVA de una vía (ordinary one-way ANOVA). *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, ****P ≤ 0.0001.

glicanos que normalmente enmascaran su epítipo. En paralelo, la reactividad de ConA disminuyó como se esperaba (Figura 18G). En la Figura 18H se muestra un Western blot de PD-L1, donde se observa una reducción del peso molecular tras el tratamiento con PNGasa-F, consistente con la eliminación de los N-glicanos.

Dado que la O-glicosilación intracelular regula la función de múltiples enzimas metabólicas (123), y considerando que observamos que el metabolismo celular influye en la detección de PD-L1, decidimos evaluar cómo se modifica la expresión de esta proteína al potenciar o inhibir dicha vía.

El inhibidor TMG, que bloquea la enzima OGA (responsable de remover O-GlcNAc, potencia la O-glicosilación intracelular), generó un aumento en la señal de PD-L1 en células WT (Figura 18I), acompañado de un aumento en la señal intracelular de WGA (lectina asociada a O-glicanos), confirmando la eficacia del inhibidor (Figura 18J). En las células Tn⁺ no se observaron cambios significativos en la señal de WGA tras el tratamiento con TMG.

Impacto de distintos inhibidores metabólicos en el perfil de glicosilación celular

La inhibición de la producción de lactato altera el consumo de glucosa por parte de las células como vimos en la figura 13B, esto podría estar alterando la disponibilidad de intermediarios para la vía de las HBP y otras rutas productoras de azúcares nucleotídicos. En consecuencia, el bloqueo de LDH puede inducir alteraciones en la N- y O-glicosilación de proteínas de superficie tumoral. Con el fin de analizar cómo el metabolismo de la glucosa puede influir en el perfil de glicanos, evaluamos el reconocimiento por lectinas de células WT y Tn⁺ cultivadas en presencia del inhibidor de la fermentación láctica, oxamato. En la Figura 19A se muestra el reconocimiento de WGA (Tabla 1; GlcNAc β terminal presente en N glicanos complejos) en presencia del tratamiento con oxamato. En ambas líneas celulares, WT y Tn⁺, se observó un aumento en la unión de WGA luego de la inhibición de LDH (Figura 19A). Por otro lado, en la Figura 19B se muestra la unión de ConA, lectina que reconoce N-glicanos ricos en manosa (Tabla 1). En este caso, el tratamiento con oxamato produjo una disminución en su unión de la línea WT, pero no de la Tn⁺ (Figura 19B).

Finalmente, evaluamos el reconocimiento de las líneas celulares por parte de VVL (Figura 19C) y DBA (Figura 19D). La VVL es una lectina asociada al reconocimiento de estructuras terminales de O-GalNAc (Tabla 1). En ambas líneas celulares, el tratamiento con oxamato produjo un aumento en la señal de VVL (Figura 19A), indicando una mayor exposición de glicanos tipo Tn u O-glicanos truncados en la superficie celular bajo esta condición. Por otro lado, DBA, al igual que VVL, reconoce O-GalNAc terminal y no terminal en estructuras tipo grupo sanguíneo A (Tabla 1). En este caso, el tratamiento con oxamato produjo un aumento en la señal de DBA en las células Tn⁺, mientras que en las células WT se observó una ligera disminución (Figura 19D), sugiriendo que la inhibición de LDH modula diferencialmente la exposición de O-glicanos dependiendo del fenotipo celular.

Alternativamente evaluamos la señal de DBA y ConA tras el tratamiento con ácido láctico (Figura 19 E-F). En ambas líneas celulares, WT y Tn⁺, se observó un aumento en la reactividad de DBA (Figura 12 E), consistente con un incremento generalizado en la exposición de O-glicanos bajo condiciones de alta disponibilidad de lactato. Por otro lado la ConA (Figura 19F), la exposición a ácido láctico disminuyó la reactividad de ConA únicamente en la línea WT. Por último, en la Figura 19G se observa la reactividad de la lectina DBA en condiciones de hipoxia, las cuales disminuye su reactividad en las células Tn⁺.

Las diferencias metabólicas de las células WT y Tn⁺ pueden modular de manera específica las rutas biosintéticas de azúcares nucleotídicos, como UDP-GalNAc, influyendo diferencialmente sobre la actividad de enzimas del Golgi o de glicosiltransferasas concretas. Por lo tanto, evaluamos el perfil de glicanos de superficie en células tratadas con inhibidores de la cadena respiratoria (Figuras 19H-19K) El tratamiento con rotenona (Figura 19H) o antimicina A (Figura 19I) produjeron un aumento significativo de la señal de DBA en las células Tn⁺, sin cambios en las células WT. Por otro lado, el tratamiento con oligomicina resultó en un aumento de la señal de DBA únicamente en las células WT (Figura 19J). Finalmente, la Figura 19K muestra la detección de DBA tras el uso combinado de los tres inhibidores mitocondriales, observándose nuevamente un aumento significativo solo en las células Tn⁺.

En conjunto, la Figura 19 demuestra que tanto los inhibidores de la fermentación como los de la fosforilación oxidativa pueden modular la exposición de glicanos reconocidos por lectinas en la superficie celular, y que estos efectos son dependientes del tipo de glicano y del fenotipo celular. En particular, las células Tn⁺ muestran una mayor sensibilidad a los inhibidores mitocondriales en términos de aumento en la exposición de O-glicanos detectados por DBA. En conclusión, estos resultados sugieren que el tipo de estrés mitocondrial determina qué pasos de la glicosilación se ven afectados y que las dos líneas celulares responden de manera diferencial debido a sus perfiles basales de glicosilación inherentemente distintos.

Impacto del tratamiento con oxamato en un modelo *in vivo*

Para evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de lactato en el crecimiento tumoral, analizamos como el tratamiento con oxamato puede modular el crecimiento tumoral en un modelo preclínico. Para ello, utilizamos ratones C57BL/6 inoculados con 5×10^5 células tumorales WT o Tn⁺. Los animales fueron aleatorizados en cuatro grupos: WT/control (n=6; PBS), WT/oxamato (n=4), Tn⁺/control (n=6) y Tn⁺/oxamato (n=6). El tratamiento con oxamato se administró por vía intraperitoneal alrededor del día 14 post-inoculación, momento en el que los tumores fueron detectables, y por 10 días, a una dosis diaria de 30 mg de oxamato por kg de ratón.

Como se muestra en la Figura 20A, los tumores derivados de células Tn⁺ exhibieron un crecimiento más acelerado que los tumores WT, consistentemente con observaciones previas (17). Por otro lado, el tratamiento con oxamato produjo una disminución leve del crecimiento tumoral únicamente en los tumores Tn⁺, mientras que en los tumores WT no se observó un efecto evidente del inhibidor.

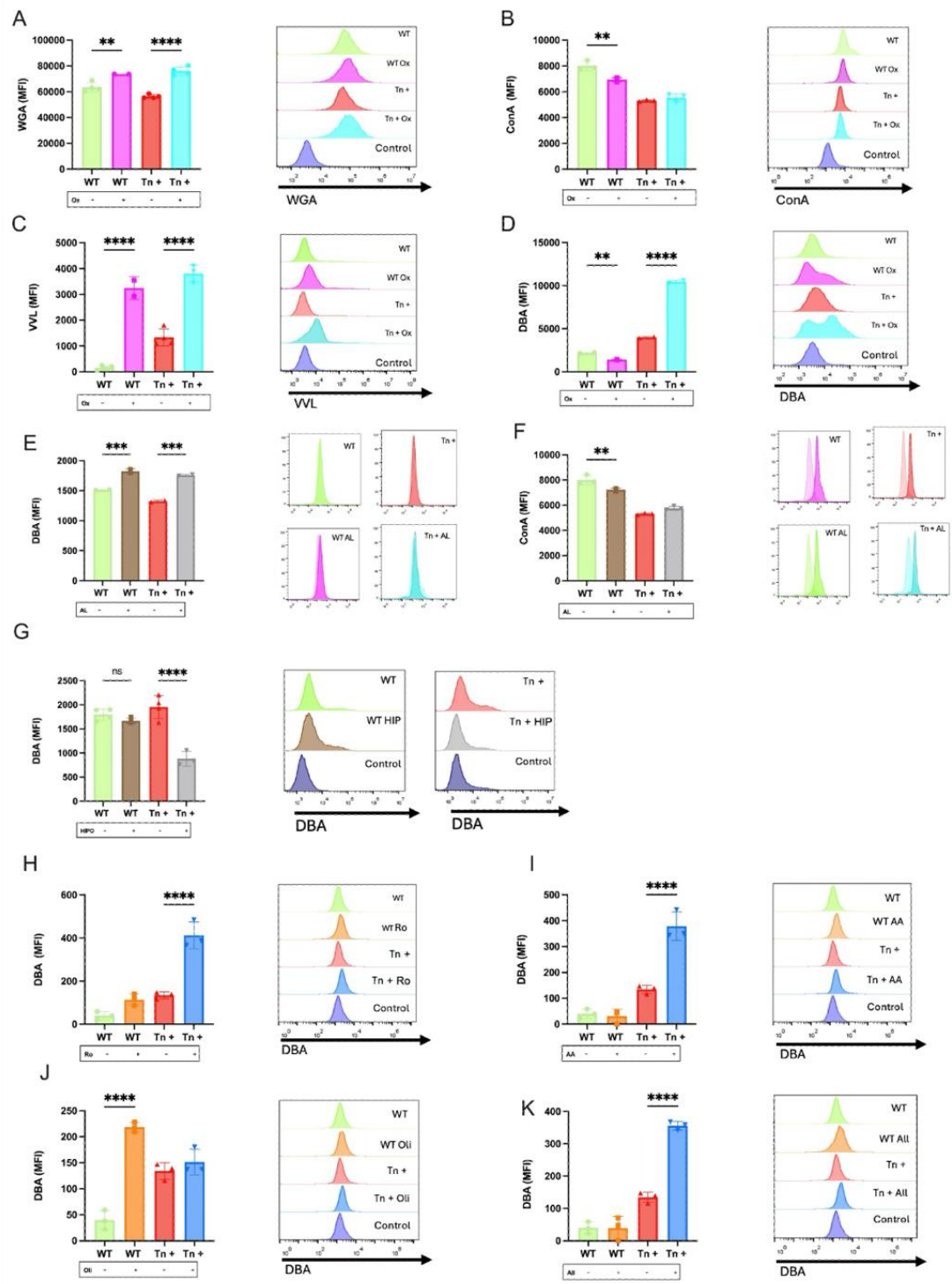


Figura 19. Detección de lectinas en células WT y Tn⁺ tratadas con diferentes inhibidores metabólicos.

Reconocimiento de WGA (A) ConA (B) VVL (C) y DBA (D) por citometría de flujo en células WT y Tn⁺ tratadas con oxamato (Ox), con histogramas respectivos. Reconocimiento de DBA (E) ConA (F) por citometría de flujo en células WT y Tn⁺ tratadas con ácido láctico (AL), con histogramas respectivos. Reconocimiento de DBA por citometría de flujo en células WT y Tn⁺ bajo condiciones de hipoxia (hipo) (G), tratadas con Rotenona (Ro) (H), Antimycina (AA) (I), Oligomicina (J) o su combinación (All) (K), con histogramas respectivos. Los datos se expresan como media \pm SE. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante un ANOVA de una vía (ordinary one-way ANOVA). ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

Al día 24 , los tumores Tn⁺ alcanzaron volúmenes significativamente mayores que los

tumores WT (Figura 20B). El tratamiento con oxamato redujo el volumen de los tumores Tn⁺, aunque de forma modesta, mientras que en los tumores WT no produjo cambios significativos (Figura 20B).

En la Figura 20C se muestra el porcentaje de volumen tumoral en WT/oxamato y Tn⁺/oxamato respecto a su control. Se observa que los tumores Tn⁺ tratados con oxamato reducen su volumen respecto al control, mientras que en los tumores WT este efecto no se ve.

Para investigar si el tratamiento con oxamato modula la expresión de PD-L1 en células tumorales *in vivo*, se realizó citometría de flujo en células CD45⁻ aisladas de los tumores. En la Figura 20D se observa que no hubo diferencias en la expresión de PD-L1 entre los animales tratados y no tratados en ninguno de los dos fenotipos celulares. Sin embargo, tal como se observó en experimentos previos, los tumores Tn⁺ presentaron niveles basales más altos de PD-L1 que los tumores WT, independientemente del tratamiento.

Para analizar si el patrón de O-glicanos *in vivo* se modifica con el tratamiento con oxamato se analizó la reactividad de la lectina DBA en células CD45⁻ proveniente de los tumores. Los tumores derivados de células Tn⁺ tratados con oxamato mostraron un aumento significativo en la señal de DBA, mientras que los tumores WT no exhibieron cambios tras el tratamiento (Figura 20E). Este resultado sugiere que la inhibición de LDH modula la exposición de glicanos de tipo Tn específicamente en el fenotipo Tn⁺ también en el contexto *in vivo*.

Finalmente, en la Figura 20F se cuantificó la concentración de lactato en suero. Se observa que en los sueros derivados de células Tn⁺ tratados con oxamato se produjo una reducción significativa del lactato sérico, por lo tanto, los cambios inducidos por el inhibidor a nivel tumoral afectaron de manera detectable los niveles sistémicos de lactato en las condiciones analizadas.

En conjunto, estos resultados indicarían que el tratamiento con oxamato ejerce un efecto moderado sobre el crecimiento tumoral únicamente en tumores Tn⁺, pero que no modifica la expresión tumoral de PD-L1 de forma significativa.

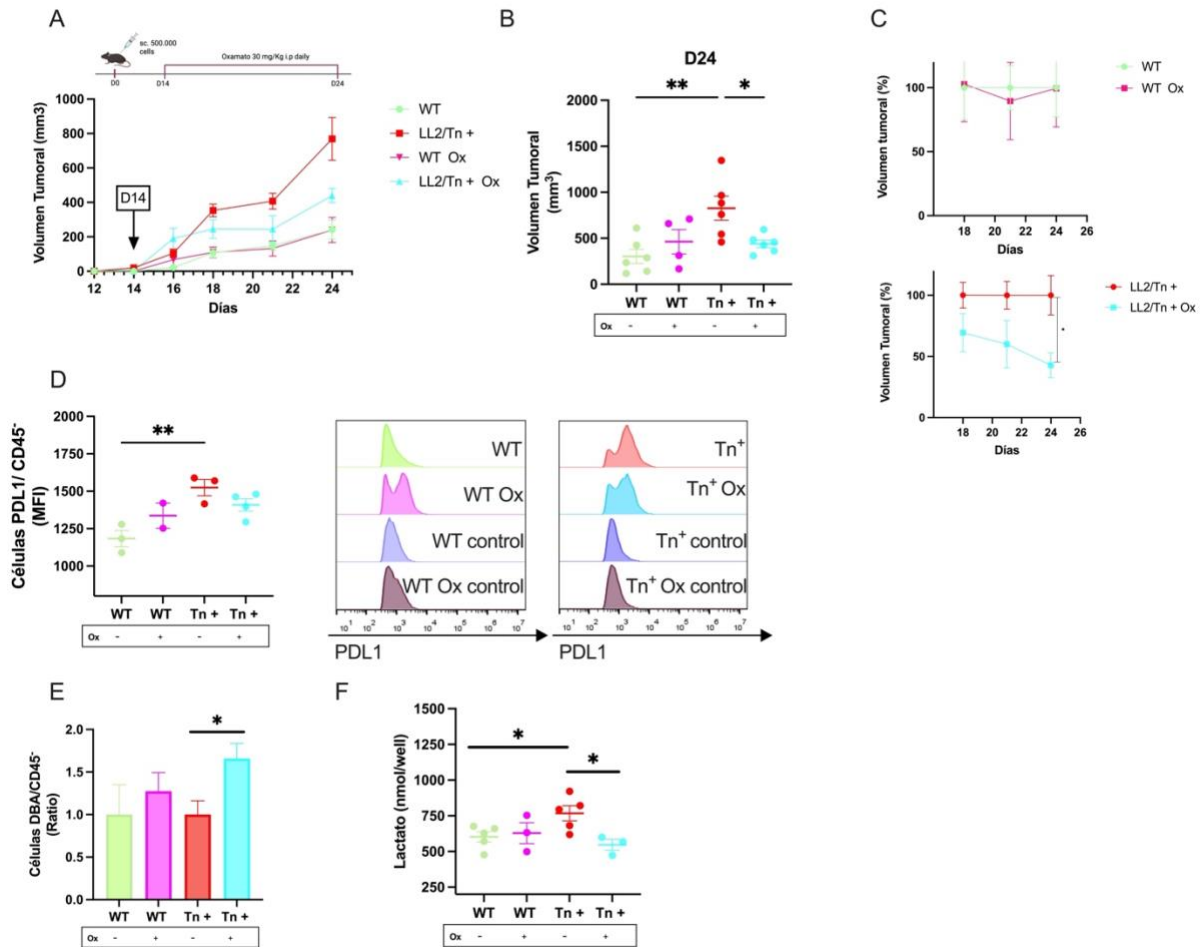


Figura 20. Efecto del tratamiento *in vivo* con oxamato en el crecimiento tumoral

Esquema de tratamiento con oxamato se administró por vía intraperitoneal desde el día 14 post-inoculación hasta el día 24, a una dosis diaria de 30 mg/kg. A los controles se les administró PBS en volúmenes equivalentes. (A) Crecimiento tumoral de los grupos WT/control (PBS), WT/oxamato, Tn⁺/control y Tn⁺/oxamato. (B) porcentaje de volumen tumoral en WT/oxamato y Tn⁺/oxamato respecto a su control. (C) Volumen tumoral al día 24 para los diferentes grupos. Reconocimiento de PDL1 (D) y DBA (E) por citometría de flujo en células tumorales CD45⁺: WT/control (PBS), WT/oxamato, Tn⁺/control y Tn⁺/oxamato, con histogramas respectivos. (F) Concentración de lactato en suero de ratones WT/control (PBS), WT/oxamato, Tn⁺/control y Tn⁺/oxamato medida mediante kit colorimétrico. Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante un ANOVA de una vía (ordinary one-way ANOVA) o test t no pareado de dos colas. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

Efecto del tratamiento anti-PD-L1 en tumores WT y Tn⁺

A continuación, se evaluó la respuesta terapéutica al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-L1 en un modelo *in vivo* utilizando ratones C57BL/6 inoculados con 5×10^5 células tumorales WT o Tn⁺. A diferencia del experimento previo con oxamato, en este caso el tratamiento inmunoterapéutico se inició antes de la detección de los tumores, comenzando en el día 9 post-inoculación. Las dosis de anti-PD-L1 se administraron en los días 9, 15, 19, 22 y 25, y los tumores fueron procesados en el día 30. Los tamaños de los grupos experimentales fueron: WT/control (n=2), WT/anti-PD-L1 (n=4), Tn⁺/control (n=2) y Tn⁺/anti-PD-L1 (n=3).

En la Figura 21A se muestra el crecimiento tumoral expresado como el cociente respecto al volumen en animales no tratados. En los tumores WT, el tratamiento con anti-PD-L1 produjo una disminución evidente en la progresión tumoral durante el período experimental. De manera similar, los tumores derivados de células Tn⁺ también mostraron un crecimiento reducido en los animales tratados. En ambos casos, el tratamiento con anti-PD-L1 logró inhibir el crecimiento tumoral en relación a los grupos control, aunque el efecto fue más marcado en los tumores Tn⁺ (Figura 21A).

La Figura 21B presenta el volumen tumoral absoluto al día 21. Los datos confirman la tendencia observada en los gráficos de crecimiento: en ambos fenotipos, el tratamiento con anti-PD-L1 redujo significativamente el volumen tumoral en comparación con sus respectivos controles. Esta reducción fue especialmente notable en los tumores Tn⁺, donde el tratamiento mostró una eficacia superior.

Seguidamente, se evaluó la respuesta inmunológica sistémica mediante la cuantificación de interferón gamma (IFN- γ) en sobrenadantes de esplenocitos estimulados *ex vivo* con anti-CD3 y anti-CD28. Los esplenocitos provenientes de ratones con tumores WT tratados con anti-PD-L1 mostraron un aumento significativo en la producción de IFN- γ en comparación con el grupo control (Figura 21C). En contraste, los esplenocitos de ratones portadores de tumores Tn⁺ no mostraron un incremento en la producción de IFN- γ tras el tratamiento. Además, los animales con tumores WT presentaron mayores niveles basales de

IFN- γ que los portadores de tumores Tn⁺ en el grupo control, lo que sugiere diferencias intrínsecas en la capacidad de activación inmunitaria entre ambos contextos tumorales.

Finalmente, en la Figura 21D se presenta la concentración de lactato sérico. No se observaron diferencias significativas entre el tratamiento o no tratamiento con anti-PD-L1, para ambas líneas, lo cual indica que el mismo no generó alteraciones detectables a nivel de lactato circulante.

En conjunto, estos resultados indicarían que el tratamiento con anti-PD-L1 reduce el crecimiento tumoral tanto en tumores WT como en tumores Tn⁺, con un efecto particularmente marcado en estos últimos. Sin embargo, la respuesta inmunitaria sistémica, medida por la producción de IFN- γ , se activa principalmente en animales con tumores WT, mientras que los tumores Tn⁺ muestran una respuesta más limitada a nivel de esplenocitos.

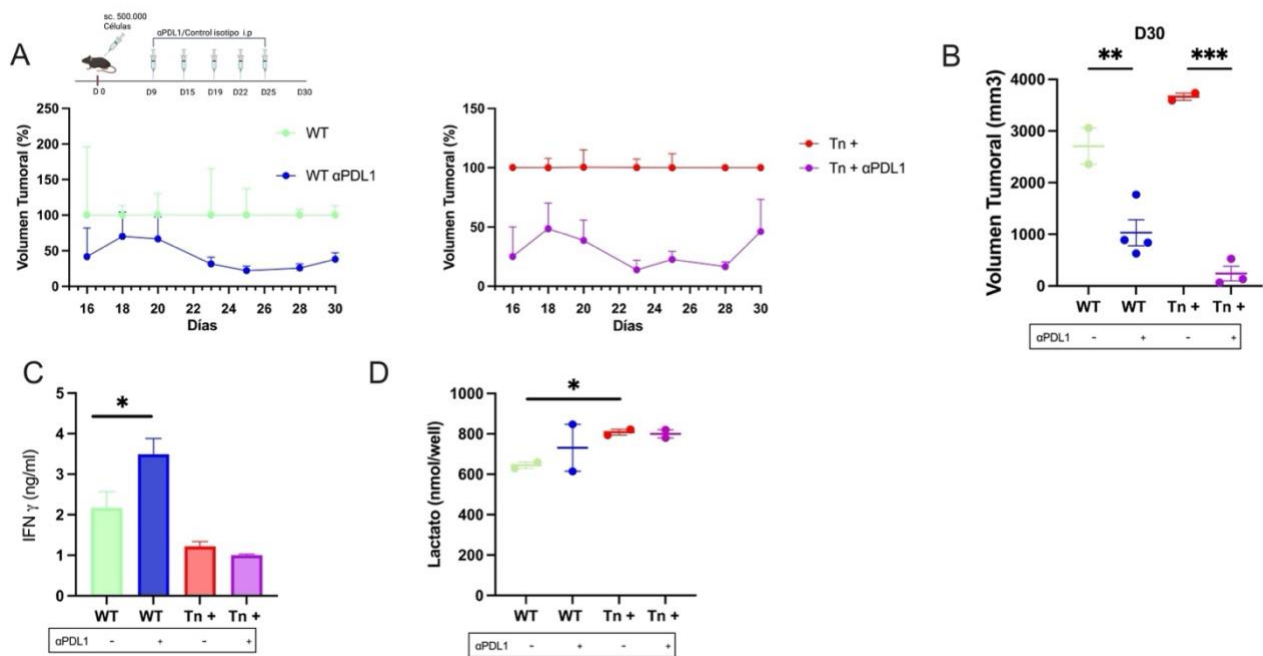


Figura 21. Efecto del tratamiento *in vivo* con inmunoterapia anti-PD-L1 en el crecimiento tumoral.

Esquema de tratamiento con α PD-L1, se administró por vía intraperitoneal desde el día 9 hasta el día 25, a una dosis total de 2 μ g/g de peso corporal (dividido en 5 inyecciones), a los controles se les administro control de isotipo en volúmenes equivalentes. El sacrificio se hizo al día 30. (A) Porcentaje de volumen tumoral en WT/ α PD-L1y Tn⁺/ α PD-L1 respecto a su control. (B) Volumen tumoral al día 30 para los diferentes grupos. (C) IFN γ producido por esplenocitos de ratones WT/ α PD-L1 y Tn⁺/ α PD-L1 y sus controles, medida mediante ELISA. (D) Concentración de lactato en suero de ratones WT/control, WT/ α PD-L1, Tn⁺/control y Tn⁺/ α PD-L1 medida mediante kit colorimétrico. Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante un ANOVA de una vía (ordinary one-way ANOVA) o test *no pareado de dos colas*. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Discusión y perspectivas

El antígeno Tn como marcador tumoral y modulador del microambiente tumoral

El antígeno Tn es una de las estructuras glicosiladas más características del cáncer, encontrándose expresado en más del 90% de los adenocarcinomas humanos (29). Este antígeno participa en procesos de adhesión, migración y proliferación celular, y su presencia se ha asociado con un fenotipo tumoral más agresivo en diversos tipos de cáncer (29,124). Además, contribuye a la inmunorregulación del MAT y favorece la angiogénesis y la metástasis (17,124).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las células Tn⁺, utilizadas en el presente trabajo, presentan un crecimiento tumoral acelerado, una mayor angiogénesis y un infiltrado inmunológico caracterizado por la presencia de células MGL2⁺ y linfocitos T que expresan IL-10 (17). Sin embargo, el metabolismo de las células Tn⁺ no había sido explorado hasta el momento. Esta tesis aporta un nuevo aspecto diferencial de nuestro modelo, mostrando que las células Tn⁺ se caracterizan por un metabolismo exacerbado.

Reprogramación metabólica de las células Tn⁺: más allá del efecto Warburg clásico

El metabolismo de las células Tn⁺ se aparta del paradigma clásico del efecto Warburg, aunque comparte algunos de sus elementos fundamentales. Tradicionalmente, el efecto Warburg describe células tumorales que, aun en presencia de oxígeno, prefieren metabolizar la glucosa por vías fermentativas, generando grandes cantidades de lactato y relegando el metabolismo mitocondrial (100,125). En nuestras células Tn⁺ observamos un comportamiento similar: presentan un flujo glucolítico aumentado y producen cantidades elevadas de lactato. Sin embargo, a diferencia de lo esperado bajo un efecto Warburg “estricto”, las células Tn⁺

mantienen un ciclo de Krebs funcional y exhiben un consumo de oxígeno aumentado, acompañado de mayor actividad mitocondrial y niveles de ROS. Este fenotipo metabólico híbrido ha sido reportado en otros modelos tumorales (126–128); no obstante, hasta el momento nunca se había asociado a la O-glicosilación aberrante con una exacerbación de este comportamiento metabólico, lo que posiciona a la glicosilación truncada como un modulador previamente no reconocido de la plasticidad metabólica tumoral.

Un estudio demostró que las micrometástasis dependen de programas metabólicos distintos a los del tumor primario utilizando el modelo PDX HCI-001 (xenoinjerto derivado de paciente con cáncer de mama) (129). Si bien tanto el tumor primario como las micrometástasis presentan heterogeneidad transcripcional, estas últimas activan un programa metabólico conservado asociado a mal pronóstico, caracterizado por un aumento de la fosforilación oxidativa mitocondrial, mientras que las células del tumor primario muestran una mayor dependencia de la glucólisis (129). De manera concordante, la inhibición farmacológica de la OXPHOS reduce significativamente la siembra metastásica, destacando a la respiración mitocondrial como un determinante funcional clave de la colonización metastásica y como un blanco terapéutico potencialmente relevante (129). Además, las células tumorales circulantes (CTCs) derivadas de la lineal celular 4T1 (de cáncer de mama triple negativo murino) presentan una respiración mitocondrial y una biogénesis mitocondrial significativamente mayores en comparación tanto con los tumores primarios como con las metástasis pulmonares (130). Cabe destacar que no se observa una disminución de la actividad glucolítica en estas CTCs 4T1, lo que indica la coexistencia de OXPHOS y glucólisis (130).

Los tumores malignos se caracterizan por presentar niveles basales elevados de ROS y una capacidad antioxidante limitada, como consecuencia de su alta tasa proliferativa y de su metabolismo reprogramado (126). Esta vulnerabilidad en la homeostasis redox genera una ventana molecular que puede ser explotada terapéuticamente (126). En este contexto, desarrollos recientes se han orientado a la inducción selectiva de ROS dentro del tumor (126). Por ejemplo, el aldehído cinámico (cinamaldehído) y polímeros basados en PEG, liberan iones cobre de manera preferencial en microambientes tumorales ricos en ROS, desencadenando

muerte celular por cobre y muerte celular inmunogénica (126). En el marco de nuestro modelo, el fenotipo Tn⁺, caracterizado por una mayor producción de ROS, podría ser particularmente susceptible a este tipo de estrategias, reforzando la idea de que el estado redox exacerbado asociado a la glicosilación aberrante no solo contribuye a la progresión tumoral, sino que también podría representar una vulnerabilidad terapéutica específica (126).

Por otro lado, los niveles elevados de ROS pueden favorecer la progresión tumoral al promover la expansión y/o activación de poblaciones inmunes con funciones pro-tumorales, incluyendo MDSCs, TAMs y Tregs (131). Asimismo, concentraciones elevadas de ROS inhiben las respuestas efectoras de las células T al suprimir la formación adecuada del complejo TCR–MHC, favoreciendo la evasión de la respuesta inmune (131). En este contexto, las Ros mitocondriales (mtROS) son utilizadas tanto por las células cancerosas como por células inmunes inmunosupresoras para establecer un estado de tolerancia inmune frente al tumor, contribuyendo así a la persistencia y progresión tumoral (131). Sumado a esto, la mayor producción sistémica de lactato por parte de los tumores Tn⁺ podría estar polarizando aún más el fenotipo Treg (102) documentado anteriormente por nuestro equipo de trabajo (17).

Nuestros resultados de expresión génica apoyan este modelo: las células Tn⁺ muestran una regulación diferencial de múltiples componentes del complejo PDH (PDHA, PDHX), así como de enzimas clave del ciclo de Krebs (IDH3 α , DLST). Estos hallazgos indican que, si bien las células Tn⁺ desvían la glucosa principalmente hacia la fermentación láctica (menor actividad enzima PDH), sostienen un TCA hiperactivo (aumento expresión de IDH3 α y DLST) recurriendo probablemente a combustibles alternativos, como glutamina u otros aminoácidos, ácidos grasos, para mantener la respiración mitocondrial y la producción de intermediarios biosintéticos.

La actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDHc) constituye un nodo central en la regulación del destino metabólico del piruvato (132). El PDHc, localizado en la mitocondria, cataliza la conversión irreversible del piruvato, producto final de la glucólisis, en acetil-CoA, permitiendo su ingreso al ciclo de Krebs y favoreciendo la producción de energía

en condiciones aeróbicas (132). El PDHc está compuesto por cuatro subcomplejos: la piruvato deshidrogenasa (E1), la dihidrolipoamida acetiltransferasa (E2), la dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3) y la proteína de unión a E3 (E3BP o PDHX) (132). Alteraciones en cualquiera de estos componentes, como ocurre en deficiencias primarias del PDHc, conducen a un desvío del piruvato hacia la producción de lactato y a una reducción de la respiración mitocondrial (132). Se conocen seis genes asociados a la deficiencia primaria del complejo PDHc: PDHA, PDHB, PDHX, DLAT, DLD y PDP1, siendo PDHA el más frecuente, ya que representa hasta el 90 % de todas las mutaciones conocidas (132).

La disminución en la actividad PDHc se ha asociado a un fenotipo más agresivo en cáncer (133). La inhibición del PDHc conserva el piruvato para el reciclado de NAD⁺ mediante la LDH, para la anaplerosis a través de la piruvato carboxilasa y para la transaminación catalizada por la alanina aminotransferasa, lo que hipotéticamente potencia la capacidad proliferativa de las células (128).

La familia de quinasas de la piruvato deshidrogenasa (PDK1–PDK4), localizadas en la matriz mitocondrial, regulan la actividad del PDHc (128). Estas enzimas fosforilan residuos de serina Ser293 (sitio 1), Ser300 (sitio 2) y Ser232 (sitio 3) en la subunidad E1 α (PDHA) de PDH, lo que conduce a la inactivación del PDHc (128). La sobreexpresión de dichas enzimas está aumentada en el cáncer (134). Existe evidencia de que las ROS mitocondriales pueden modular la actividad de las PDK, aunque este efecto puede ser dependiente del contexto celular (128). El inhibidor pan-PDK (DCA) redujo de manera efectiva la proliferación de células cancerosas mediante la inducción de ROS y la posterior apoptosis, lo que ha impulsado un aumento significativo de estudios sobre el uso de inhibidores de PDK en la clínica (135). Sería interesante evaluar la actividad de dicha enzima en nuestro modelo tumoral Tn⁺ y también evaluar ROS en tumores.

IDH3 cataliza la conversión irreversible de isocitrato a α -cetoglutarato (α -KG), uno de los pasos limitantes de la velocidad del ciclo del TCA, y actúa como parte del sistema respiratorio mitocondrial (136). Esta enzima está compuesta por múltiples subunidades: α , β y γ (136). En mamíferos, IDH3 está formada por subunidades $\alpha\beta$ y $\alpha\gamma$, que en conjunto

constituyen un heterotetrámero $\alpha_2\beta\gamma$ (136). La subunidad α es la catalítica, la subunidad β cumple una función estructural, y la subunidad γ desempeña un rol regulador al activar el holoenzima (136). Un estudio demostró que la alta expresión de las tres subunidades de IDH3 en cáncer de vejiga, colon, esófago, pulmón, próstata y estómago se asocia con un mal pronóstico clínico (136).

El complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDHC) está constituido por tres subunidades: E1k, E2k y E3 (137). El núcleo del complejo está formado por múltiples proteínas E2k (gen DLST), rodeadas por las subunidades E1k (gen OGDH) y E3 (gen DLD), organizadas en una estructura octaédrica (137). Este complejo cataliza la conversión de KG en succinil-CoA (137). En mamíferos, se han reportado distintas proporciones entre subunidades (E1k:E2k:E3), incluyendo 1:1:1,5, 1:1,2:1,4 y 1:1:0,5, lo que sugiere una variabilidad en la organización supramolecular del complejo (137).

Por otro lado, la alta expresión de DLST, se asocia con una menor supervivencia global y una menor supervivencia libre de recurrencia en pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC) (121). Además, DLST promueve la agresividad del neuroblastoma (138).

Otro hallazgo relevante en nuestro estudio fue la menor expresión de la enzima IDH1 en las células Tn⁺. Xiaodan et al. demostraron que, en fibroblastos, la disminución de IDH1 potencia la señalización de Smad activada por TGF- β 1 (139). El aumento de la vía TGF- β 1 en los fibroblastos asociados a cáncer (CAF) promovió la migración celular, invasión y transición epitelio-mesénquima (EMT) (138).

En un modelo de ratones con tumores xenoinjertados, los fibroblastos deficientes en IDH1 aceleraron el crecimiento tumoral en un grado comparable al de los CAF, reforzando el papel pro-tumoral de esta regulación metabólica (139). Sumado a esto, Xiangyang et al identificaron que la expresión de IDH1 estaba disminuida en células humanas de cáncer de hígado en comparación con células hepáticas normales (141).

Al expresar menos IDH1, los fibroblastos aumentan la α -KG intracelular, probablemente derivado de una mayor actividad de la vía metabólica de la glutamina(139). Sería interesante evaluar la concentración de α -KG en nuestras líneas celulares Tn⁺ para explorar si se reproduce este fenómeno. El α -KG cumple funciones centrales en la regulación epigenética (142). Este metabolito actúa como sustrato de diversas enzimas responsables de la desmetilación del histonas (142). En este contexto, la disponibilidad intracelular de α -KG, impacta directamente sobre la expresión génica (142). En el sistema inmune, particularmente en macrófagos, el α -KG también desempeña un rol funcional relevante al modular su estado de activación (142). En macrófagos activados por IL-4 una mayor producción de α -KG favorece la adquisición de un fenotipo antiinflamatorio (142). A nivel molecular, el α -KG suprime la activación de IKK β , un paso clave para la señalización proinflamatoria mediada por NF- κ B (142).

En conjunto, nuestros resultados permiten plantear la hipótesis de que en las células Tn⁺ podría producirse una acumulación de α -KG como consecuencia de la disminución de la expresión de IDH1. Este aumento de α -KG podría tener consecuencias funcionales relevantes tanto a nivel epigenético como inmunológico, favoreciendo perfiles antiinflamatorios y tolerogénicos en el microambiente tumoral. En este sentido, sería particularmente interesante explorar la expresión de IDH1 y la activación de la vía TGF- β 1 en los tumores totales o fibroblastos asociados a tumores Tn⁺. Sumado a esto, la mayor producción sistémica de lactato por parte de los tumores Tn⁺ podría estar polarizando aún más el fenotipo Treg (102)

Entre las funciones recientemente descritas del lactato se destaca su capacidad de inducir la lactilación de proteínas, un mecanismo involucrado en la regulación de la expresión génica (105,106). Este proceso implica la adición de grupos lactilo a residuos de lisina en las colas N-terminales de las histonas, actuando como una modificación epigenética que estimula directamente la transcripción génica (105,106). En este contexto, el incremento en la producción sistémica de lactato observado en los tumores Tn⁺ podría contribuir a la activación de esta vía epigenética. En futuras investigaciones, resultaría de interés analizar la expresión

de genes metabólicos en muestras tumorales para determinar si estas alteraciones se reproducen in vivo y se correlacionan con los resultados obtenidos in vitro.

La respuesta celular a la hipoxia está regulada por los Factores Inducibles por Hipoxia (HIFs), una familia de factores de transcripción que coordinan los mecanismos de adaptación a condiciones de bajo oxígeno (143). Los HIFs promueven la transcripción de numerosos genes implicados en la progresión tumoral, incluidos aquellos relacionados con la proliferación, angiogénesis, metástasis y resistencia a fármacos (143). HIF-1 es un heterodímero compuesto por una subunidad alfa inducible por hipoxia y una subunidad beta expresada de manera constitutiva, HIF-1 β . Hasta la fecha, se han descrito tres isoformas alfa: HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α , todas las cuales se unen a HIF-1 β , siendo las dos primeras las más caracterizadas (144). En condiciones de hipoxia, HIF-1 α o HIF-2 α forman heterodímeros con HIF-1 β y se unen a motivos de ADN presentes en los promotores de sus genes diana, conocidos como elementos de respuesta a hipoxia (HREs) (144).

Aunque HIF-1 α y HIF-2 α están estrechamente relacionados y activan la expresión génica dependiente de HRE, ambas subunidades difieren en sus dominios de transactivación, lo que sugiere que pueden tener genes diana únicos y requerir cofactores transcripcionales distintos (145). HIF-1 α se expresa de manera ubicua, mientras que la expresión de HIF-2 α está restringida al endotelio, riñón, pulmón, corazón e intestino delgado (145). Blancher et al. demostraron que HIF-1 α regula un amplio espectro de genes inducibles por hipoxia, mientras que HIF-2 α inhibe el crecimiento celular (146).

Al evaluar estas dos isoformas en seis líneas celulares humanas de cáncer de mama, HIF-1 α se detectó en todas ellas, mientras que HIF-2 α se expresó en niveles bajos o estuvo ausente en las líneas más agresivas (146). Interesantemente, HIF-1 α , pero no HIF-2 α , es responsable de la regulación de la transcripción de genes que codifican enzimas involucradas en la vía glucolítica (147), además inhibe a la PDH al activar a la PDK1 (148). Además la acumulación de ROS favorece la transcripción de HIF-1 α (149). Por otro lado, se observó una correlación negativa entre HIF-2 y los niveles de O-GlcNAcilación (150), mientras que la hiper-O-GlcNAcilación regula la reprogramación metabólica y la señalización de estrés de

supervivencia en células cancerosas principalmente a través de la regulación de HIF-1 α (151). En nuestro modelo Tn⁺ vimos una mayor expresión por RTqPCR de HIF1 α y menor HIF-2 α , además de una O-GlcNAcilación mayor, lo que concuerda con la bibliografía.

La LDH es una enzima tetramérica compuesta por dos tipos de subunidades, LDH-A y LDH-B, codificadas por genes independientes (152). En el músculo y el hígado, la mayor parte de la LDH está formada por cuatro subunidades LDH-A y cataliza preferentemente la reducción de piruvato a lactato (152). Por el contrario, en el corazón y el cerebro predomina la isoforma compuesta por cuatro subunidades LDH-B, que cataliza principalmente la oxidación de lactato a piruvato (152). Algunos tejidos presentan heterodímeros LDHB-LDH-A (152). La sobreexpresión de ambas isoformas se ha asociado con la progresión tumoral (152–156).

En nuestro estudio se observó que las células Tn⁺ presentan una menor expresión de LDH-B en comparación con las WT, mientras que la expresión de LDH-A se mantiene sin cambios. Estos resultados pueden interpretarse teniendo en cuenta que se trata de dos líneas tumorales. Por lo tanto, sería particularmente interesante evaluar la expresión de estas enzimas en células normales en el mismo contexto. A pesar de que se ha descrito que la sobreexpresión de LDH-B favorece el crecimiento tumoral (153), la menor expresión de esta isoforma en nuestro modelo podría contribuir a explicar la mayor acumulación de lactato observada en los tumores Tn⁺. Dado que el aumento de lactato extracelular se evidenció de forma marcada en los modelos *in vivo*, sería relevante analizar la expresión de LDH-A y LDH-B también en muestras de tumores.

En este contexto, podría interpretarse que las células Tn⁺ “evitan” destinar la glucosa a la vía oxidativa no por un defecto, sino por una preferencia estratégica: canalizarla hacia la producción de lactato, metabolito que no solo sostiene el microambiente ácido y pro-tumoral, sino que además modula la función inmune y promueve fenotipos de escape inmunológico. Además, podemos pensar que la mayor producción de ROS y la hiper O-GlcNAcilación en las células Tn⁺ podría estar incrementando la expresión del factor de transcripción HIF1 α , lo que lleva a una disminución de la entrada de piruvato a el TCA, favoreciendo la síntesis de lactato y perpetuando este metabolismo exacerbado.

En conjunto, estos datos apoyan un modelo en el cual las células Tn⁺ exhiben un metabolismo no Warburgiano clásico, sino un metabolismo reprogramado y flexible, caracterizado por alta fermentación, respiración mitocondrial activa y una marcada redistribución del uso de la glucosa hacia rutas que favorecen su crecimiento y su capacidad de escape inmune.

Regulación metabólica y redox de la expresión de PD-L1 en células Tn⁺

Observamos que las células Tn⁺ presentan una mayor detección de PD-L1 en células tumorales, tanto *in vitro* como *in vivo*, evaluada por citometría de flujo, así como una mayor expresión de PD-L1 a nivel transcripcional *in vitro*, determinada por RT-qPCR. Se ha reportado que el aumento de lactato en el MAT favorece el crecimiento tumoral y la evasión inmunológica al incrementar la expresión membranaria de PD-L1, una molécula clave en los mecanismos de inmunorregulación (66). Asimismo, estudios previos han demostrado que, en cáncer de mama triple negativo, el lactato puede alterar la glicosilación de PD-L1, modulando su estabilidad y detección (90).

Modulación metabólica mediante inhibición de LDH y efectos sobre PD-L1

Diversos estudios han demostrado que la modulación del metabolismo tumoral mediante la inhibición de la lactato deshidrogenasa impacta directamente en la biología del tumor. A nivel molecular, el oxamato reduce la expresión y fosforilación de factores clave involucrados en la reparación del ADN, induce apoptosis y promueve la senescencia celular. Asimismo, disminuye la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR), reduce marcadores asociados a células madre tumorales y modula la expresión de marcadores de la transición epitelio-mesénquima (EMT) (157).

En este contexto, la inhibición de LDH también se ha asociado con una mejora en la respuesta inmune antitumoral. Además, para probar la sinergia con la inmunoterapia, se utilizó un modelo murino de melanoma B16-F10 deficiente en LDH-A, en conjunto con el tratamiento con anticuerpos anti-PD-1, lo que indujo una respuesta antitumoral superior en comparación con tumores que conservaban la expresión de esta enzima (158). Este efecto se correlacionó con un aumento en la infiltración de células NK y linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, acompañado de una mayor producción de IFN- γ y granzima B (158).

En concordancia con estos hallazgos, se ha demostrado que el tratamiento combinado con oxamato y la inmunoterapia anti-PD-1 es más efectivo para reducir el crecimiento tumoral que cada tratamiento por separado, y además potencia la eficacia de pembrolizumab en un modelo de ratones humanizados (Hu-PBMC-CDX) (104).

Sin embargo, hasta el momento no existían reportes que evaluaran el impacto de la inhibición de LDH mediante oxamato sobre la expresión de PD-L1 en células tumorales, ni cómo esta regulación podía verse modificada en un contexto de glicosilación aberrante.

En este trabajo observamos que la detección de PD-L1 aumenta al utilizar oxamato *in vitro*, fenómeno que también se observó con otros inhibidores metabólicos. Además, el tratamiento con oxamato redujo la actividad mitocondrial y expresión de HIF-1 α , lo que sugiere que esta droga es capaz de revertir parcialmente el metabolismo exacerbado que caracteriza a las células Tn⁺. El oxamato conduce a la acumulación de piruvato, a una disminución en la regeneración de NAD⁺ y a la consiguiente limitación del flujo glicolítico (159).

Nuestros resultados fueron alineados con los de Gisbergen et al., quienes demostraron que la disminución de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) conduce a una menor estabilización de HIF-1 α y de sus genes diana, incluyendo la anhidrasa carbónica IX (CAIX) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (131). Rotenona y antimicina A, que actúan sobre los complejos I y III de la cadena respiratoria, inducen un aumento de las ROS mitocondriales, un desequilibrio redox y alteraciones en la relación NAD⁺/NADH (160,161). En contraste,

oligomicina reduce principalmente los niveles de ATP, generando una firma de ROS diferente (160,161). Estas perturbaciones bioquímicas divergentes dieron lugar a patrones diferenciales de reconocimiento por lectinas en células WT y Tn⁺, enfatizando que el sitio de inhibición mitocondrial determina qué etapas de la biosíntesis de glicanos resultan más afectadas.

El aumento en la detección de PD-L1 en respuesta a los tres inhibidores sugiere que el estrés mitocondrial potencia de manera general la expresión o estabilización de PD-L1, aunque los mecanismos subyacentes pueden diferir, abarcando desde respuestas transcripcionales al estrés hasta cambios en el procesamiento de glicanos que alteran la detectabilidad de PD-L1 por anticuerpos (60). De manera relevante, el reconocimiento diferencial de glicanos por parte de lectinas entre las líneas celulares indican que el perfil de glicosilación de las células Tn⁺ es particularmente sensible a la disfunción mitocondrial, probablemente debido a sus defectos preexistentes en la elongación de O-glicanos.

Un resultado inesperado fue el aumento en la unión de la lectina VVL en ambas líneas celulares tras el tratamiento con oxamato. Esto se puede explicar ya que la inhibición de la producción de lactato podría estar disminuyendo el flujo de carbono de la glicólisis, lo que conduce al agotamiento de precursores de la vía HBP y, en consecuencia, al bloqueo o al procesamiento alterado de N- y O-glicanos. Esta perturbación metabólica podría favorecer la exposición de residuos de GalNAc (antígeno Tn) y GlcNAc en células que ya presentan defectos en la elongación de O-glicanos, como las Tn⁺, mientras que las células WT son reconocidas por lectinas de forma diferente, consistente con capacidades basales de glicosilación diferentes. En este contexto, las alteraciones en los glicanos inducidas por el tratamiento metabólico podrían modificar el estado de glicosilación de proteínas de superficie y, por ende, su estabilidad y detectabilidad, incluyendo moduladores inmunes clave como PD-L1.

Este hallazgo indica una mayor exposición del antígeno Tn en superficie y plantea la posibilidad de que, en un contexto *in vivo*, la inhibición de la LDH pueda incluso exacerbar ciertos rasgos pro-tumorales asociados a la glicosilación aberrante, por ejemplo, a través de interacciones MGL2–células dendríticas y la inducción de programas tolerogénicos de DC/Treg (17).

Dicho fenómeno no fue evidenciado en nuestro modelo *in vivo*, por el contrario, en las células Tn⁺ el tratamiento con oxamato reduce el volumen tumoral, igualándolo al crecimiento observado en los tumores WT. Este efecto diferencial sugiere que las células Tn⁺ dependen en mayor medida de la vía fermentativa mediada por LDH-A para sostener su fenotipo metabólico e inmunomodulador, y que la inhibición de esta vía puede representar una vulnerabilidad específica del fenotipo Tn⁺. Otra posible explicación para este fenómeno es que las células Tn⁺ ya exhiben en su superficie el antígeno Tn de manera constitutiva, por lo que el tratamiento con oxamato no incrementa sustancialmente un riesgo adicional asociado a su mayor exposición, riesgo que sí podría ser relevante en las células WT. En este contexto, en el balance entre riesgo (potencial aumento de la expresión del antígeno Tn) y beneficio (inhibición efectiva de LDH y reducción del metabolismo exacerbado), el beneficio terapéutico predomina únicamente en las células que ya expresaban Tn⁺. Esto podría explicar por qué la inhibición de LDH resulta antitumoral en el fenotipo Tn⁺, pero no en las células WT, donde el aumento de exposición del antígeno Tn podría incluso favorecer propiedades pro-tumorales. Se pone en evidencia la necesidad de caracterizar el tumor del punto de vista fisiológico para determinar la efectividad del tratamiento, y de evaluar el mismo en un modelo metastásico.

Otro aspecto a tener en cuenta es el aumento en la señal de la lectina DBA en el modelo *in vivo*. En los tumores derivados de células Tn⁺ se observó un aumento significativo en la unión de esta lectina tras el tratamiento con el inhibidor, mientras que en los tumores WT no se vieron diferencias significativas. Estos resultados sugieren una mayor susceptibilidad del fenotipo Tn⁺ a esta droga. De todas formas, el reconocimiento de esta lectina *in vitro* por el WT/Ox no aumento. Sería interesante evaluar el glicofenotipo de los tumores WT y Tn⁺ sometidos al tratamiento con dicho inhibidor *in vivo* para poder reforzar esta hipótesis.

Resulta interesante destacar que en nuestro estudio *in vivo* no se reprodujo la capacidad del oxamato de aumentar la detección de PD-L1 en células tumorales, fenómeno que sí se observó claramente en los ensayos *in vitro*. Por el contrario, en los tumores derivados de células Tn⁺ se evidenció incluso una tendencia a la disminución de la detección de PD-L1. Este hallazgo podría explicarse considerando que, en los experimentos *in vivo*, el oxamato se

administró de manera prolongada durante 10 días, mientras que en los ensayos *in vitro* el tratamiento fue de tan solo 24 horas. Además, observamos que el oxamato disminuye la expresión del ARNm de PD-L1 en condiciones *in vitro*, lo que permite plantear la hipótesis de que, a largo plazo, la regulación transcripcional termine predominando sobre los cambios en glicosilación, conduciendo a una reducción neta de la expresión de PD-L1 en el entorno tumoral. Por otra parte, para obtener conclusiones más robustas sería necesario repetir el experimento *in vivo* con un tamaño muestral mayor, lo que permitiría reforzar esta hipótesis y evaluar con mayor precisión la dinámica temporal de la regulación de PD-L1 bajo tratamiento con oxamato.

Ya se ha reportado que la N-glicosilación de PD-L1 afecta su detección por inmunohistoquímica (IHQ) en biopsias de pacientes (60). En este trabajo demostramos que este fenómeno también es reproducible mediante citometría de flujo. Esto plantea la interrogante de si la mayor detección de PD-L1 en la membrana de las células Tn⁺ en comparación a la célula WT refleja una verdadera mayor expresión o, en cambio, una mayor accesibilidad del anticuerpo debido a las alteraciones de N-glicosilación presentes en estas células.

Interpretamos que las células Tn⁺ presentan una mayor expresión proteica de PD-L1. Esta conclusión se sustenta en que el incremento relativo de la señal detectada por citometría de flujo luego de la desglicosilación con PNGasa fue similar en ambas líneas celulares, lo que indica que el grado de enmascaramiento de los epítomos por N-glicanos es comparable entre ellas. En consecuencia, las diferencias observadas en la señal basal reflejarían cambios reales en los niveles de PD-L1. En concordancia con esta interpretación, los análisis por RT-qPCR mostraron un aumento en la expresión de su ARN mensajero.

En el caso particular del oxamato, podemos plantear la misma interrogante que para PD-L1 en células Tn⁺: ¿la mayor señal detectada por FACS refleja una mayor expresión de la proteína o una alteración en su glicosilación que incrementa la afinidad del anticuerpo?

En este escenario, los resultados obtenidos por RT-qPCR sugieren que el efecto del oxamato se orienta más hacia una mayor afinidad del anticuerpo por la proteína que hacia un aumento en su expresión. Si bien en los análisis por western blot de células tratadas con oxamato no se observó una banda correspondiente a PD-L1 deglicosilado, este hallazgo puede explicarse porque no sabemos si las modificaciones en los N-glicanos que podrían estar favoreciendo una mayor detección por FACS en este contexto, son lo suficientemente profundas como para alterar de manera detectable el peso molecular de la proteína. Es posible que se trate de cambios sutiles en la estructura de los glicanos, capaces de modificar la accesibilidad del epítipo reconocido por el anticuerpo, pero insuficientes para generar un corrimiento evidente en la migración de PD-L1 en geles de SDS-PAGE.

Otro aspecto novedoso de este trabajo es la forma en que los distintos inhibidores metabólicos modifican el perfil de glicanos de superficie de las células tumorales, lo cual constituye una medida indirecta del estado de glicosilación celular.

No resulta sorprendente que la inhibición *in vivo* de PD-L1 en los tumores Tn⁺ haya sido más efectiva que en los tumores WT, dado que estas células exhiben una mayor expresión de dicha proteína. Sin embargo, resulta especialmente interesante preguntarnos si este fenómeno se explica únicamente por un incremento en la cantidad total de PD-L1, o si también podría atribuirse a alteraciones en la glicosilación de la proteína que aumenten la accesibilidad o afinidad del anticuerpo terapéutico. Dado que la glicosilación, particularmente la N-glicosilación, modula tanto la estabilidad como el reconocimiento de PD-L1 por anticuerpos, es plausible que el fenotipo Tn⁺, caracterizado por un patrón N-glicosídico alterado, favorezca una mayor susceptibilidad a la inmunoterapia anti-PD-L1. Este aspecto abre una interrogante de gran interés, ya que sugiere que no solo la cantidad, sino también la glicosilación de PD-L1 podría determinar una mayor eficacia terapéutica de la inmunoterapia anti PDL1 en tumores con glicosilación aberrante. Sería de gran valor continuar caracterizando el estado de N glicosilación de la proteína PDL1 en nuestra línea tumoral. En este punto resulta interesante resaltar que el clon del anticuerpo anti-PDL1 utilizado en el experimento *in vivo* con

inmunoterapia anti-PDL1 es el mismo que utilizamos en los experimentos por FACS en este trabajo.

Un interrogante central que emerge de este trabajo es la dirección de causalidad entre la glicosilación aberrante y el metabolismo exacerbado observado en las células Tn⁺. Nuestros resultados sugieren que ambos fenómenos se retroalimentan. Por un lado, la expresión del antígeno Tn se asocia con un aumento de la O-GlcNAcilación intracelular, una mayor expresión de HIF-1 α , un incremento en las ROS y la actividad mitocondrial, un mayor consumo de oxígeno y una mayor acidificación extracelular. Esto sugiere que la glicosilación aberrante puede potenciar la reprogramación metabólica.

Sin embargo, los cambios en el metabolismo celular inducidos por los inhibidores metabólicos también demostraron ser capaces de modular la glicosilación en nuestras líneas celulares. En este contexto, está ampliamente descrito que las células tumorales pueden presentar glicosilación aberrante debido a múltiples factores, incluyendo la expresión anómala de glicosiltransferasas y de hidrolasas, modificaciones en la cadena peptídica o en el esqueleto del glicano, así como variaciones en la disponibilidad de sustratos y de donantes de azúcares (162). No obstante, alteraciones metabólicas nunca habían sido asociadas previamente a la expresión del antígeno Tn, lo que convierte a nuestros hallazgos en un aporte novedoso.

En este escenario, resulta difícil establecer una relación estrictamente unidireccional: es probable que el metabolismo exacerbado contribuya como desencadenante inicial al modificar la disponibilidad de sustratos necesarios para la glicosilación, promoviendo así alteraciones en los patrones de glicosilación celular. De este modo, metabolismo exacerbado y glicosilación forman un circuito que podría sostener y amplificar el fenotipo Tn⁺ y sus consecuencias biológicas. En conjunto, nuestros resultados permiten proponer que la expresión del antígeno Tn no solo remodela la superficie celular, sino que reconfigura profundamente el metabolismo tumoral.

Perspectivas

Como proyección natural de este trabajo, nos planteamos evaluar la eficiencia terapéutica del tratamiento combinado anti-PD-L1 y oxamato en el modelo de glicosilación aberrante, con el objetivo de determinar si la inhibición metabólica de la vía fermentativa potencia la respuesta a la inmunoterapia en tumores con expresión del antígeno Tn. Este abordaje permitiría explorar posibles efectos sinérgicos entre la modulación metabólica y el bloqueo de puntos de control inmunitario, así como definir si el fenotipo Tn⁺ constituye un contexto particularmente sensible a estrategias combinadas.

Asimismo, sería relevante validar los hallazgos obtenidos en este estudio en otros modelos tumorales con glicosilación aberrante, incluyendo líneas celulares murinas y humanas, a fin de establecer la robustez y generalización del vínculo entre glicosilación truncada, metabolismo exacerbado y respuesta inmunológica. Esta validación permitiría evaluar la aplicabilidad de nuestros resultados a distintos tipos tumorales y reforzar el valor del antígeno Tn como biomarcador funcional.

Desde el punto de vista mecanístico, resulta de especial interés evaluar la actividad enzimática de las enzimas metabólicas identificadas como diferencialmente expresadas, así como cuantificar la concentración de sus metabolitos asociados, con el fin de confirmar si los cambios observados a nivel de expresión génica se traducen en alteraciones funcionales del flujo metabólico. En particular, la medición de metabolitos clave permitiría profundizar en la comprensión del estado metabólico de las células Tn⁺.

Como perspectiva metodológica adicional, resultan fundamentales los cambios en glicosilación inducidos por los inhibidores metabólicos observados en este trabajo. Dado que las alteraciones en el perfil de glicanos fueron evaluadas principalmente mediante el reconocimiento por lectinas por citometría de flujo, será necesario validar estos hallazgos utilizando técnicas más robustas y específicas, que permitan caracterizar en profundidad la estructura de los glicanos. En este sentido, la aplicación de enfoques de glicómica basada en espectrometría de masas permitiría analizar de forma global los N-glicanos y O-glicanos,

evaluando cambios en su composición, grado de elongación, ramificación y sialilación. Asimismo, estudios de glicoproteómica posibilitarían identificar proteínas específicas cuya glicosilación se vea alterada, tanto en el modelo Tn⁺⁺ como al utilizar inhibidores metabólicos, así como los sitios de modificación, lo cual resulta particularmente relevante para proteínas de superficie implicadas en la inmunorregulación, como PD-L1.

Finalmente, una línea futura de investigación será analizar en detalle las reacciones anapleróticas del ciclo del TCA, evaluando la contribución de sustratos alternativos, como glutamina, aminoácidos u ácidos grasos, al sostenimiento de la actividad mitocondrial observada en las células Tn⁺. Estos estudios permitirán esclarecer los mecanismos que sustentan el fenotipo metabólico híbrido característico de este modelo y podrían identificar nuevas vulnerabilidades metabólicas con potencial impacto terapéutico.

En conjunto, la extensión de estos abordajes a modelos experimentales más complejos, como tumoroides u organoides derivados de pacientes, permitiría aproximarse de manera más fiel a la heterogeneidad metabólica, celular y espacial propia de los tumores, fortaleciendo la relevancia traslacional de los resultados obtenidos.

Anexo

Anexo 1 Tabla primers utilizados para RT-qPCR

GEN	Primer F	Primer R	Tm F (°C)	Tm R (°C)	Tm (°C)	Programa utilizado	REF
<i>mHif1a</i>	GGTTCAGCAGACCCAGTTA	AGGCTCCTTGGATGAGC TTT	62.6	61.1	60	Corto	(163)
<i>mHif2a</i>	GAGGAAGGAGAAATCCCGTGA	CTGATGGCCAGGCGCATGATG	62.9	66.1	60	Corto	(163)
<i>mLdhb</i>	AGTCTCCCGTGCATCCTCAA	AGGGTGTCCGCACTTCTCT	63.9	66.7	60	Corto	(164)
<i>mLdha</i>	TGTGGCAGACTTGGCTGAGA	CTGAGGAAGACATCCTCATTGATTC	63.8	60.1	60	Corto	(164)
<i>mOGT</i>	CTGTACCCTTGACCCAAAT	ACGAAGATAAGCTGCCACAG	60.8	58.6	60	Corto	(165)
<i>mPgl1</i>	GCTATCTTGGGAGGCGCTAA	AAAGGCCATTCCACCACCAA	61.3	63.0	60	Corto	(166)
<i>mGLUT 1</i>	GCCTGAGACCAGTTGGAAGCAC	CTGCTTAGGTAAAGTTACAGGAG	65.8	56.5	60	Corto	(167)
<i>mHK</i>	CACTGGGTAAGGCTCAA	CGGAGTTGTTCTGCTTTGGA	58.8	60.4	60	Corto	(167)
<i>mPFK1</i>	CAGATCAGTGCCAAACATAACCAA	CGGGATGCAGAGCTCATCA	59.3	62.3	60	Corto	(168)
<i>mPDL1</i>	GCTCCAAAGGACTTGTACGTG	TGATCTGAAGGGCAGCATTTTC	58.0	64.8	60	Corto	(169)
<i>mCmyc</i>	GCGTTGGAACCCCGACAG	CTTCCAGATATCCTCACTGGGC	60.6	59.8	60	Corto	(170)
<i>mGfpt1</i>	GCCAACGCCTGCAAAATCC	CCAACGGGTATGAGCTATTCC	65.3	62.8	60	Corto	(171)
<i>mGfpt2</i>	ATGTGCGGAATCTTTCCTAC	AGACCCCTGATAAGGGTTTCG	62.4	60.3	60	Corto	(171)
<i>mPgm2</i>	CCGCTTCTACATGACCGAGG	GATGATGCAAGATACGGCAGG	59.2	62.6	60	Corto	(171)
<i>mPgm1</i>	CAGAACCCTTTAACCTCTGAGTC	CGAGAAATCCCTGCTCCATAG	62.5	60.3	60	Corto	(171)
<i>mGnpat1</i>	TCGTTAGTGACGAGTGCAGAG	TTTGTGGTAGACATTCAAGGGTG	60.3	63.0	60	Corto	(171)
<i>mBactin</i>	GCTTCTTTCAGCTCCTTCGT	CGTCATCCATGGCGAACTG	66.8	65.6	65	Corto	(172)
<i>mIldh1</i>	GTGGGCGTCAAGTGTGCTA	CCACCCAGAATGTTTCGGATG	62.2	62.1	62	Corto	(173)
<i>mIldh3</i>	TGGGTGTCCAAGGTCTCTC	CTCCCACTGAATAGGTGCTTTG	63.4	60.6	62	Largo	(173)
<i>mOGDC</i>	CAGCTCGTGTCTGAGTACG	AATGATGCACTGTGCCATGT	61.8	58.2	62	Corto	(174)
<i>mDlst</i>	GGAAGTCCCTCTAGGGAGA	GACGCTACCACTGTTAATGACC	65.2	59.9	62	Largo	(173)
<i>mPdha</i>	TGTATCCCGGTGTTGGC	GCCGATGAAGGTCACATTTCTTAAT	63	59.1	62	Largo	(175)
<i>mPdhb</i>	GTGAGTGCTGGAGACTCGTT	AGCACCTTCTCAACCACTAT	61.6	60.3	62	Corto	(175)
<i>mPd hx</i>	ACGAGATCTGGTCAAAGATGACA	GGTGACATTAACCCAGGCA	60.1	63.3	62	Corto	(175)
<i>mATPsin</i>	ATCCACACACAAAAGGACGA	GGAAGTGGGCAAGTGAGCTT	61.7	62.8	62	Corto	*
<i>mGlul</i>	AGGACTGCGCTGCAAGAC	CCATCAAAGTCCCACTCAGGT	62.2	60.1	62	Corto	*

* Los primers utilizados para la amplificación de mATPsin y mGlul fueron diseñados específicamente para este estudio utilizando herramientas bioinformáticas (NCBI Primer-Blast).

Bibliografía

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>, accessed [18.12.2025].
2. Alonso R, Piñeros M, Laversanne M, Musetti C, Garau M, Barrios E, et al. Lung cancer incidence trends in Uruguay 1990–2014: An age-period-cohort analysis. *Cancer Epidemiology*. agosto de 2018;55:17-22.
3. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol*. 28 de agosto de 2017;7:193.
4. Cátedra de Oncología Clínica Servicio de Oncología Clínica, Hospital de, Clínicas Facultad de, Medicina Universidad de, la República. PAUTAS DE ONCOLOGIA MÉDICA PARA EL DIAGNOSTICO, TRATAMIENTO SISTEMICO Y SEGUIMIENTO [Internet]. Montevideo, Uruguay; 71-112 p. Disponible en: <https://www.oncologiamedica.hc.edu.uy/wp-content/uploads/2023/02/PAUTAS-DE-ONCOLOGIA-MEDICA-2022.pdf>
5. Lung Cancer Survival Rates | 5-Year Survival Rates for Lung Cancer [Internet]. [citado 18 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>
6. Festari MF, Da Costa V, García I, Eugenia Cedrés M, Freire T. Sour Consequences of Aberrant Glycosylation in Cancer Development. En: Rezaei N, editor. *Pathophysiology of Cancer: An Interdisciplinary Approach* [Internet]. Cham: Springer Nature Switzerland; 2024 [citado 18 de diciembre de 2025]. p. 341-75. (Interdisciplinary Cancer Research; vol. 22). Disponible en: https://link.springer.com/10.1007/16833_2024_371
7. Akella NM, Ciraku L, Reginato MJ. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC Biol*. diciembre de 2019;17(1):52.
8. Freire-de-Lima L. Sweet and Sour: The Impact of Differential Glycosylation in Cancer Cells Undergoing Epithelial–Mesenchymal Transition. *Front Oncol* [Internet]. 25 de marzo de 2014 [citado 18 de diciembre de 2025];4. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00059/abstract>
9. Stowell SR, Ju T, Cummings RD. Protein Glycosylation in Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 24 de enero de 2015;10(1):473-510.
10. Wandall HH, Nielsen MAI, King-Smith S, De Haan N, Bagdonaite I. Global functions of O-glycosylation: promises and challenges in O-glycobiology. *The FEBS Journal*. diciembre de 2021;288(24):7183-212.

11. Thompson N, Wakarchuk W. O-glycosylation and its role in therapeutic proteins. *Bioscience Reports*. 28 de octubre de 2022;42(10):BSR20220094.
12. Vasconcelos-dos-Santos A, Oliveira IA, Lucena MC, Mantuano NR, Whelan SA, Dias WB, et al. Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for Developing of Drugs Against Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 25 de junio de 2015 [citado 18 de diciembre de 2025];5. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2015.00138/abstract>
13. Wang Y, Ju T, Ding X, Xia B, Wang W, Xia L, et al. Cosmc is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 18 de mayo de 2010;107(20):9228-33.
14. Gao Y, Luan X, Melamed J, Brockhausen I. Role of Glycans on Key Cell Surface Receptors That Regulate Cell Proliferation and Cell Death. *Cells*. 19 de mayo de 2021;10(5):1252.
15. Gupta R, Leon F, Rauth S, Batra SK, Ponnusamy MP. A Systematic Review on the Implications of O-linked Glycan Branching and Truncating Enzymes on Cancer Progression and Metastasis. *Cells*. 14 de febrero de 2020;9(2):446.
16. Cervoni GE, Cheng JJ, Stackhouse KA, Heimbürg-Molinario J, Cummings RD. O-glycan recognition and function in mice and human cancers. *Biochemical Journal*. 30 de abril de 2020;477(8):1541-64.
17. Da Costa V, Van Vliet SJ, Carasi P, Frigerio S, García PA, Croci DO, et al. The Tn⁺antigen promotes lung tumor growth by fostering immunosuppression and angiogenesis via interaction with Macrophage Galactose-type lectin 2 (MGL2). *Cancer Letters*. octubre de 2021;518:72-81.
18. Kaur S, Kumar S, Momi N, Sasson AR, Batra SK. Mucins in pancreatic cancer and its microenvironment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. octubre de 2013;10(10):607-20.
19. Liu Z, Liu J, Dong X, Hu X, Jiang Y, Li L, et al. Tn⁺antigen promotes human colorectal cancer metastasis via H-Ras mediated epithelial-mesenchymal transition activation. *J Cellular Molecular Medi*. marzo de 2019;23(3):2083-92.
20. Schultz MJ, Swindall AF, Bellis SL. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer Metastasis Rev*. diciembre de 2012;31(3-4):501-18.
21. Thomas D, Sagar S, Caffrey T, Grandgenett PM, Radhakrishnan P. Truncated O-glycans promote epithelial-to-mesenchymal transition and stemness properties of pancreatic cancer cells. *J Cellular Molecular Medi*. octubre de 2019;23(10):6885-96.
22. Hussain MRM, Hoessli DC, Fang M. *N*-acetylgalactosaminyltransferases in cancer. *Oncotarget*. 16 de agosto de 2016;7(33):54067-81.

23. Hugonnet M, Singh P, Haas Q, von Gunten S. The Distinct Roles of Sialyltransferases in Cancer Biology and Onco-Immunology. *Front Immunol.* 2021;12:799861.
24. Gill DJ, Tham KM, Chia J, Wang SC, Steentoft C, Clausen H, et al. Initiation of GalNAc-type O-glycosylation in the endoplasmic reticulum promotes cancer cell invasiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 20 de agosto de 2013 [citado 18 de diciembre de 2025];110(34). Disponible en: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1305269110>
25. Nguyen AT, Chia J, Ros M, Hui KM, Saltel F, Bard F. Organelle Specific O-Glycosylation Drives MMP14 Activation, Tumor Growth, and Metastasis. *Cancer Cell.* noviembre de 2017;32(5):639-653.e6.
26. Kellokumpu S. Golgi pH, Ion and Redox Homeostasis: How Much Do They Really Matter? *Front Cell Dev Biol.* 11 de junio de 2019;7:93.
27. Radhakrishnan P, Dabelsteen S, Madsen FB, Francavilla C, Kopp KL, Steentoft C, et al. Immature truncated O-glycophenotype of cancer directly induces oncogenic features. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 30 de septiembre de 2014 [citado 18 de diciembre de 2025];111(39). Disponible en: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1406619111>
28. Sun X, Ju T, Cummings RD. Differential expression of Cosmc, T-synthase and mucins in Tn-positive colorectal cancers. *BMC Cancer.* diciembre de 2018;18(1):827.
29. Ju T, Otto VI, Cummings RD. The Tn⁺Antigen—Structural Simplicity and Biological Complexity. *Angew Chem Int Ed.* 18 de febrero de 2011;50(8):1770-91.
30. Schjoldager KT, BG, Vakhrushev SY, Kong Y, Steentoft C, Nudelman AS, Pedersen NB, et al. Probing isoform-specific functions of polypeptide GalNAc-transferases using zinc finger nuclease glycoengineered SimpleCells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 19 de junio de 2012;109(25):9893-8.
31. Chang YH, Weng CL, Lin KI. O-GlcNAcylation and its role in the immune system. *J Biomed Sci.* 29 de abril de 2020;27(1):57.
32. Van Der Laarse SAM, Leney AC, Heck AJR. Crosstalk between phosphorylation and O-GlcNAcylation: friend or foe. *The FEBS Journal.* septiembre de 2018;285(17):3152-67.
33. Hardivillé S, Hart GW. Nutrient Regulation of Signaling, Transcription, and Cell Physiology by O-GlcNAcylation. *Cell Metabolism.* agosto de 2014;20(2):208-13.
34. Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* julio de 2017;18(7):452-65.

35. Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease. *Annu Rev Biochem.* 7 de julio de 2011;80(1):825-58.
36. Lee JB, Pyo KH, Kim HR. Role and Function of O-GlcNAcylation in Cancer. *Cancers.* 26 de octubre de 2021;13(21):5365.
37. Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, et al. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene.* 13 de mayo de 2010;29(19):2831-42.
38. Gu Y, Mi W, Ge Y, Liu H, Fan Q, Han C, et al. GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 1 de agosto de 2010;70(15):6344-51.
39. Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR, Shahriari KS, Vosseller K, Reginato MJ. Critical role of O-Linked β -N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *J Biol Chem.* 30 de marzo de 2012;287(14):11070-81.
40. Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta.* abril de 2011;1812(4):514-9.
41. Yehezkel G, Cohen L, Kliger A, Manor E, Khalaila I. O-linked β -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) in primary and metastatic colorectal cancer clones and effect of N-acetyl- β -D-glucosaminidase silencing on cell phenotype and transcriptome. *J Biol Chem.* 17 de agosto de 2012;287(34):28755-69.
42. Zhu Q, Zhou L, Yang Z, Lai M, Xie H, Wu L, et al. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med Oncol.* junio de 2012;29(2):985-93.
43. Hanover JA, Chen W, Bond MR. O-GlcNAc in cancer: An Oncometabolism-fueled vicious cycle. *J Bioenerg Biomembr.* junio de 2018;50(3):155-73.
44. Lin X, Kang K, Chen P, Zeng Z, Li G, Xiong W, et al. Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers. *Molecular Cancer.* 18 de mayo de 2024;23(1):108.
45. Patsoukis N, Wang Q, Strauss L, Boussiotis VA. Revisiting the PD-1 pathway. *Sci Adv.* 18 de septiembre de 2020;6(38):eabd2712.
46. Manjili MH, Butler SE. Role of Tregs in Cancer Dormancy or Recurrence. *Immunological Investigations.* 16 de noviembre de 2016;45(8):759-66.
47. Nishimura CD, Pulanco MC, Cui W, Lu L, Zang X. PD-L1 and B7-1 Cis-Interaction: New Mechanisms in Immune Checkpoints and Immunotherapies. *Trends in Molecular Medicine.* marzo de 2021;27(3):207-19.

48. Jazieh AR, Onal HC, Tan DSW, Soo RA, Prabhaskar K, Kumar A, et al. Real-World Treatment Patterns and Clinical Outcomes in Patients With Stage III NSCLC: Results of KINDLE, a Multicountry Observational Study. *Journal of Thoracic Oncology*. octubre de 2021;16(10):1733-44.
49. Yuan M, Huang LL, Chen JH, Wu J, Xu Q. The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2019;4:61.
50. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs [Internet]. [citado 18 de diciembre de 2025]. Disponible en:
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=125514>
51. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs [Internet]. [citado 18 de diciembre de 2025]. Disponible en:
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=761034>
52. Zhang X, DeClue RW, Herms L, Yang M, Pawar V, Masters ET, et al. Real-world treatment patterns and outcomes in PD-L1-positive non-small cell lung cancer. *Immunotherapy*. diciembre de 2021;13(18):1521-33.
53. Lester J, Escrivu C, Khan S, Hudson E, Mansy T, Conn A, et al. Retrospective analysis of real-world treatment patterns and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer starting first-line systemic therapy in the United Kingdom. *BMC Cancer*. diciembre de 2021;21(1):515.
54. Nadler E, Arondekar B, Aguilar KM, Zhou J, Chang J, Zhang X, et al. Treatment patterns and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer initiating first-line treatment in the US community oncology setting: a real-world retrospective observational study. *J Cancer Res Clin Oncol*. marzo de 2021;147(3):671-90.
55. Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. mayo de 2019;393(10183):1819-30.
56. Johnson ML, Cho BC, Luft A, Alatorre-Alexander J, Geater SL, Laktionov K, et al. Durvalumab With or Without Tremelimumab in Combination With Chemotherapy as First-Line Therapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: The Phase III POSEIDON Study. *JCO*. 20 de febrero de 2023;41(6):1213-27.
57. Felip E, Altorki N, Zhou C, Csőszi T, Vynnychenko I, Goloborodko O, et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. octubre de 2021;398(10308):1344-57.

58. Shukuya T, Carbone DP. Predictive Markers for the Efficacy of Anti-PD-1/PD-L1 Antibodies in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. julio de 2016;11(7):976-88.
59. Bernichon E, Tissot C, Bayle-Bleuez S, Rivoirard R, Bouleftour W, Forest F, et al. Predictive resistance factors in lung cancer patients treated with Nivolumab. Retrospective study. *Bulletin du Cancer*. marzo de 2021;108(3):250-65.
60. Wang YN, Lee HH, Hsu JL, Yu D, Hung MC. The impact of PD-L1 N-linked glycosylation on cancer therapy and clinical diagnosis. *J Biomed Sci*. diciembre de 2020;27(1):77.
61. Cha JH, Yang WH, Xia W, Wei Y, Chan LC, Lim SO, et al. Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Molecular Cell*. agosto de 2018;71(4):606-620.e7.
62. Li C, Yao H, Wang H, Fang JY, Xu J. Repurposing screen identifies Amlodipine as an inducer of PD-L1 degradation and antitumor immunity. *Oncogene*. 11 de febrero de 2021;40(6):1128-46.
63. Rossi A, Filetti M, Taurelli Salimbeni B, Piras M, Rizzo F, Giusti R, et al. Statins and immunotherapy: Togetherness makes strength The potential effect of statins on immunotherapy for NSCLC. *Cancer Reports [Internet]*. agosto de 2021 [citado 18 de mayo de 2023];4(4). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cnr2.1368>
64. Wang Q, Cao Y, Shen L, Xiao T, Cao R, Wei S, et al. Regulation of PD-L1 through direct binding of cholesterol to CRAC motifs. *Sci Adv*. 26 de agosto de 2022;8(34):eabq4722.
65. Cusato J, Genova C, Tomasello C, Carrega P, Ottonello S, Pietra G, et al. Influence of Vitamin D in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Nivolumab. *Cancers*. 21 de enero de 2019;11(1):125.
66. Feng J, Yang H, Zhang Y, Wei H, Zhu Z, Zhu B, et al. Tumor cell-derived lactate induces TAZ-dependent upregulation of PD-L1 through GPR81 in human lung cancer cells. *Oncogene*. 19 de octubre de 2017;36(42):5829-39.
67. Baruch EN, Youngster I, Ben-Betzalel G, Ortenberg R, Lahat A, Katz L, et al. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science*. 5 de febrero de 2021;371(6529):602-9.
68. Nagasaka M, Sexton R, Alhasan R, Rahman S, Azmi AS, Sukari A. Gut microbiome and response to checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer-A review. *Crit Rev Oncol Hematol*. enero de 2020;145:102841.

69. McCulloch JA, Davar D, Rodrigues RR, Badger JH, Fang JR, Cole AM, et al. Intestinal microbiota signatures of clinical response and immune-related adverse events in melanoma patients treated with anti-PD-1. *Nat Med.* marzo de 2022;28(3):545-56.
70. Zhao Y, Liu Y, Li S, Peng Z, Liu X, Chen J, et al. Role of lung and gut microbiota on lung cancer pathogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.* agosto de 2021;147(8):2177-86.
71. Spencer CN, McQuade JL, Gopalakrishnan V, McCulloch JA, Vetzou M, Cogdill AP, et al. Dietary fiber and probiotics influence the gut microbiome and melanoma immunotherapy response. *Science.* 24 de diciembre de 2021;374(6575):1632-40.
72. Pronost M, Dufлот I, Motte A. Le microbiote intestinal: Un acteur de la réponse aux immunothérapies dans le cancer pulmonaire ? *Med Sci (Paris).* noviembre de 2022;38(11):963-5.
73. Derosa L, Hellmann MD, Spaziano M, Halpenny D, Fidelle M, Rizvi H, et al. Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology.* junio de 2018;29(6):1437-44.
74. Chalabi M, Cardona A, Nagarkar DR, Dhawahir Scala A, Gandara DR, Rittmeyer A, et al. Efficacy of chemotherapy and atezolizumab in patients with non-small-cell lung cancer receiving antibiotics and proton pump inhibitors: pooled post hoc analyses of the OAK and POPLAR trials. *Annals of Oncology.* abril de 2020;31(4):525-31.
75. Mezquita L, Auclin E, Ferrara R, Charrier M, Remon J, Planchard D, et al. Association of the Lung Immune Prognostic Index With Immune Checkpoint Inhibitor Outcomes in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 1 de marzo de 2018;4(3):351.
76. Banna GL, Signorelli D, Metro G, Galetta D, De Toma A, Cantale O, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in combination with PD-L1 or lactate dehydrogenase as biomarkers for high PD-L1 non-small cell lung cancer treated with first-line pembrolizumab. *Transl Lung Cancer Res.* agosto de 2020;9(4):1533-42.
77. Lee TA, Tsai EY, Liu SH, Chou WC, Hsu Hung SD, Chang CY, et al. Regulation of PD-L1 glycosylation and advances in cancer immunotherapy. *Cancer Letters.* marzo de 2025;612:217498.
78. Erlichman N, Meshel T, Baram T, Abu Raiya A, Horvitz T, Ben-Yaakov H, et al. The Cell-Autonomous Pro-Metastatic Activities of PD-L1 in Breast Cancer Are Regulated by N-Linked Glycosylation-Dependent Activation of STAT3 and STAT1. *Cells.* 23 de septiembre de 2023;12(19):2338.

79. Li CW, Lim SO, Chung EM, Kim YS, Park AH, Yao J, et al. Eradication of Triple-Negative Breast Cancer Cells by Targeting Glycosylated PD-L1. *Cancer Cell*. febrero de 2018;33(2):187-201.e10.
80. Lin S, Cao Y, Zhu K, Yang C, Zhu X, Zhang H, et al. Identification of a Novel Prognostic Signature Based on N-Linked Glycosylation and Its Correlation with Immunotherapy Response in Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma*. 2023;10:1749-65.
81. Chen W, Saxton B, Tessema M, Belinsky SA. Inhibition of GFAT1 in lung cancer cells destabilizes PD-L1 protein. *Carcinogenesis*. 5 de octubre de 2021;42(9):1171-8.
82. Zhou L, Chai F, He Y, Zhou Z, Guo S, Li P, et al. Homodimerized cytoplasmic domain of PD-L1 regulates its complex glycosylation in living cells. *Commun Biol*. 30 de agosto de 2022;5(1):1-12.
83. Ren X, Cheng Z, He J, Yao X, Liu Y, Cai K, et al. Inhibition of glycolysis-driven immunosuppression with a nano-assembly enhances response to immune checkpoint blockade therapy in triple negative breast cancer. *Nat Commun*. 2 de noviembre de 2023;14(1):7021.
84. Zhu L, Xu Y, Wei X, Lin H, Huang M, Lin B, et al. Coupling Aptamer-based Protein Tagging with Metabolic Glycan Labeling for In Situ Visualization and Biological Function Study of Exosomal Protein-Specific Glycosylation. *Angew Chem Int Ed*. 9 de agosto de 2021;60(33):18111-5.
85. Liu X, Zhang Y, Han Y, Lu W, Yang J, Tian J, et al. Overexpression of GLT1D1 induces immunosuppression through glycosylation of PD-L1 and predicts poor prognosis in B-cell lymphoma. *Mol Oncol*. mayo de 2020;14(5):1028-44.
86. Shi S, Gu S, Han T, Zhang W, Huang L, Li Z, et al. Inhibition of MAN2A1 Enhances the Immune Response to Anti-PD-L1 in Human Tumors. *Clinical Cancer Research*. 15 de noviembre de 2020;26(22):5990-6002.
87. Silva MC, Fernandes Â, Oliveira M, Resende C, Correia A, de-Freitas-Junior JC, et al. Glycans as Immune Checkpoints: Removal of Branched N-glycans Enhances Immune Recognition Preventing Cancer Progression. *Cancer Immunology Research*. 1 de noviembre de 2020;8(11):1407-25.
88. Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology*. enero de 2017;27(1):3-49.
89. Feng C, Zhang L, Chang X, Qin D, Zhang T. Regulation of post-translational modification of PD-L1 and advances in tumor immunotherapy. *Front Immunol*. 24 de julio de 2023;14:1230135.

90. Duan X, Xie Y, Yu J, Hu X, Liu Z, Li N, et al. MCT4/Lactate Promotes PD-L1 Glycosylation in Triple-Negative Breast Cancer Cells. Muthu M, editor. *Journal of Oncology*. 26 de septiembre de 2022;2022:1-15.
91. Zhu Q, Wang H, Chai S, Xu L, Lin B, Yi W, et al. O-GlcNAcylation promotes tumor immune evasion by inhibiting PD-L1 lysosomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 de marzo de 2023;120(13):e2216796120.
92. Manni M, Läubli H. Targeting glyco-immune checkpoints for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*. agosto de 2021;21(8):1063-71.
93. Chen D, Tan S, Zhang H, Wang H, He W, Shi R, et al. The FG Loop of PD-1 Serves as a “Hotspot” for Therapeutic Monoclonal Antibodies in Tumor Immune Checkpoint Therapy. *iScience*. abril de 2019;14:113-24.
94. Liu K, Tan S, Jin W, Guan J, Wang Q, Sun H, et al. N-glycosylation of PD-1 promotes binding of camrelizumab. *EMBO Rep*. 3 de diciembre de 2020;21(12):e51444.
95. Duan Z, Shi R, Gao B, Cai J. N-linked glycosylation of PD-L1/PD-1: an emerging target for cancer diagnosis and treatment. *J Transl Med*. 30 de julio de 2024;22(1):705.
96. L N David, M C Michael. *Principios de Bioquímica de Lehninger*. Artmed Editora; 2022. 3635 p.
97. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine*. abril de 2013;34(2-3):121-38.
98. Nakanishi Y, Iwai M, Hirotsu Y, Kato R, Tanino T, Nishimaki-watanabe H, et al. Correlations between class I glucose transporter expression patterns and clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Thoracic Cancer*. septiembre de 2023;14(27):2761-9.
99. Jang HJ, Min HY, Kang YP, Boo HJ, Kim J, Ahn JH, et al. Tobacco-induced hyperglycemia promotes lung cancer progression via cancer cell-macrophage interaction through paracrine IGF2/IR/NPM1-driven PD-L1 expression. *Nat Commun*. 8 de junio de 2024;15(1):4909.
100. Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *Int J Radiat Biol*. julio de 2019;95(7):912-9.
101. Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J Physiol*. marzo de 2021;599(6):1745-57.
102. Ippolito L, Morandi A, Giannoni E, Chiarugi P. Lactate: A Metabolic Driver in the Tumour Landscape. *Trends Biochem Sci*. febrero de 2019;44(2):153-66.

103. Xie H, Hanai JI, Ren JG, Kats L, Burgess K, Bhargava P, et al. Targeting lactate dehydrogenase--a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. *Cell Metab.* 6 de mayo de 2014;19(5):795-809.
104. Qiao T. Inhibition of LDH-A by Oxamate Enhances the Efficacy of Anti-PD-1 Treatment in an NSCLC Humanized Mouse Model. *Frontiers in Oncology.* 2021;11.
105. Chen L, Huang L, Gu Y, Cang W, Sun P, Xiang Y. Lactate-Lactylation Hands between Metabolic Reprogramming and Immunosuppression. *International Journal of Molecular Sciences.* enero de 2022;23(19):11943.
106. Lv X, Lv Y, Dai X. Lactate, histone lactylation and cancer hallmarks. *Expert Rev Mol Med.* 2023;25:e7.
107. Cohen IJ, Pareja F, Socci ND, Shen R, Doane AS, Schwartz J, et al. Increased tumor glycolysis is associated with decreased immune infiltration across human solid tumors. *Front Immunol.* 2022;13:880959.
108. Wen H, Zhang P, Zhao J, Liu Y, Wan L, Li H, et al. Metabolic alterations driven by LDHA in CD8 + T cells promote immune evasion and therapy resistance in NSCLC. *Sci Rep.* 8 de julio de 2025;15(1):24440.
109. Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer.* septiembre de 2015;15(9):540-55.
110. Peixoto A, Relvas-Santos M, Azevedo R, Santos LL, Ferreira JA. Protein Glycosylation and Tumor Microenvironment Alterations Driving Cancer Hallmarks. *Front Oncol.* 2019;9:380.
111. Vasconcelos-Dos-Santos A, Loponte HFBR, Mantuano NR, Oliveira IA, de Paula IF, Teixeira LK, et al. Hyperglycemia exacerbates colon cancer malignancy through hexosamine biosynthetic pathway. *Oncogenesis.* 20 de marzo de 2017;6(3):e306.
112. Yi W, Clark PM, Mason DE, Keenan MC, Hill C, Goddard WA, et al. Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science.* 24 de agosto de 2012;337(6097):975-80.
113. Anderson NM, Mucka P, Kern JG, Feng H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell.* febrero de 2018;9(2):216-37.
114. Migita T, Narita T, Nomura K, Miyagi E, Inazuka F, Matsuura M, et al. ATP citrate lyase: activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 15 de octubre de 2008;68(20):8547-54.
115. May JL, Kouri FM, Hurley LA, Liu J, Tommasini-Ghelfi S, Ji Y, et al. IDH3 α regulates one-carbon metabolism in glioblastoma. *Sci Adv.* enero de 2019;5(1):eaat0456.

116. Zeng L, Morinibu A, Kobayashi M, Zhu Y, Wang X, Goto Y, et al. Aberrant IDH3 α expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. *Oncogene*. septiembre de 2015;34(36):4758-66.
117. Fedorova MS, Kudryavtseva AV, Lakunina VA, Snezhkina AV, Volchenko NN, Slavnova EN, et al. Downregulation of OGDHL expression is associated with promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Mol Biol*. julio de 2015;49(4):608-17.
118. Hoque MO, Kim MS, Ostrow KL, Liu J, Wisman GBA, Park HL, et al. Genome-wide promoter analysis uncovers portions of the cancer methylome. *Cancer Res*. 15 de abril de 2008;68(8):2661-70.
119. Ostrow KL, Park HL, Hoque MO, Kim MS, Liu J, Argani P, et al. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced genes in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 15 de febrero de 2009;15(4):1184-91.
120. Ma H, Ge Y, Li Y, Wang T, Chen W. Construction of a prognostic model based on cuproptosis-related genes and exploration of the value of DLAT and DLST in the metastasis for non-small cell lung cancer. *Medicine*. 6 de diciembre de 2024;103(49):e40727.
121. Shen N, Korm S, Karantanos T, Li D, Zhang X, Ritou E, et al. DLST-dependence dictates metabolic heterogeneity in TCA-cycle usage among triple-negative breast cancer. *Commun Biol*. 16 de noviembre de 2021;4(1):1-11.
122. Da Costa Escaron V. Rol angiogénico e inmunomodulador del antígeno Tn⁺durante el crecimiento tumoral. 2020 [citado 22 de agosto de 2024]; Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/27668>
123. Ruan Y. O-GlcNAcylation and Cell Metabolism. En: Yi W, editor. *Chemistry and Biology of O-GlcNAcylation* [Internet]. Singapore: Springer Nature Singapore; 2024 [citado 14 de mayo de 2025]. p. 71-87. Disponible en: https://link.springer.com/10.1007/978-981-97-4864-8_3
124. Da Costa V, Freire T. Advances in the Immunomodulatory Properties of Glycoantigens in Cancer. *Cancers*. 7 de abril de 2022;14(8):1854.
125. Fendt SM. 100 years of the Warburg effect: A cancer metabolism endeavor. *Cell*. julio de 2024;187(15):3824-8.
126. Du H, Xu T, Yu S, Wu S, Zhang J. Mitochondrial metabolism and cancer therapeutic innovation. *Sig Transduct Target Ther*. 4 de agosto de 2025;10(1):245.
127. Jia D, Lu M, Jung KH, Park JH, Yu L, Onuchic JN, et al. Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 26 de febrero de 2019;116(9):3909-18.

128. Woolbright BL, Rajendran G, Harris RA, Taylor JA. Metabolic Flexibility in Cancer: Targeting the Pyruvate Dehydrogenase Kinase:Pyruvate Dehydrogenase Axis. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1 de octubre de 2019;18(10):1673-81.
129. Davis RT, Blake K, Ma D, Gabra MBI, Hernandez GA, Phung AT, et al. Transcriptional diversity and bioenergetic shift in human breast cancer metastasis revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Cell Biol*. marzo de 2020;22(3):310-20.
130. LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, et al. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol*. octubre de 2014;16(10):992-1003, 1-15.
131. Kuo CL, Ponneri Babuharisankar A, Lin YC, Lien HW, Lo YK, Chou HY, et al. Mitochondrial oxidative stress in the tumor microenvironment and cancer immunoescape: foe or friend? *J Biomed Sci*. 26 de septiembre de 2022;29(1):74.
132. Savvidou A, Ivarsson L, Naess K, Eklund EA, Lundgren J, Dahlin M, et al. Novel imaging findings in pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) deficiency—Results from a nationwide population-based study. *J of Inher Metab Disea*. marzo de 2022;45(2):248-63.
133. Tsai HY, Chen MH, Yun J, Lai LA, Valentine JF, Bronner MP, et al. Restricting metabolic plasticity enhances stress adaptation through the modulation of PDH and HIF1A in TRAP1-depleted colon cancer. *Cancer Letters*. noviembre de 2025;632:217977.
134. Atas E, Oberhuber M, Kenner L. The Implications of PDK1–4 on Tumor Energy Metabolism, Aggressiveness and Therapy Resistance. *Front Oncol*. 15 de diciembre de 2020;10:583217.
135. Škorja Milić N, Dolinar K, Miš K, Matkovič U, Bizjak M, Pavlin M, et al. Suppression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase by Dichloroacetate in Cancer and Skeletal Muscle Cells Is Isoform Specific and Partially Independent of HIF-1 α . *IJMS*. 10 de agosto de 2021;22(16):8610.
136. Bulut Atalay E. Isocitrate Dehydrogenase: Three Subunits in Different Cancer Types— Changes in Gene Expression, Mutation Status, and Cancer Progression. *Cumhuriyet Science Journal*. 25 de marzo de 2025;46(1):13-21.
137. Hansen GE, Gibson GE. The α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex as a Hub of Plasticity in Neurodegeneration and Regeneration. *IJMS*. 17 de octubre de 2022;23(20):12403.
138. Anderson NM, Qin X, Finan JM, Lam A, Athoe J, Missiaen R, et al. Metabolic Enzyme DLST Promotes Tumor Aggression and Reveals a Vulnerability to OXPHOS Inhibition in High-Risk Neuroblastoma. *Cancer Research*. 1 de septiembre de 2021;81(17):4417-30.

139. Hou X, Zhang J, Wang Y, Xiong W, Mi J. TGFBR-IDH1-Cav1 axis promotes TGF- β signalling in cancer-associated fibroblast. *Oncotarget*. 13 de octubre de 2017;8(48):83962-74.
140. Ping Q, Wang C, Cheng X, Zhong Y, Yan R, Yang M, et al. TGF- β 1 dominates stromal fibroblast-mediated EMT via the FAP/VCAN axis in bladder cancer cells. *J Transl Med*. 17 de julio de 2023;21(1):475.
141. Zhou X, Wu D, Zhu L, Li R, Yu H, Li W. Withaferin A Inhibits Liver Cancer Tumorigenesis by Suppressing Aerobic Glycolysis through the p53/IDH1/HIF-1 α Signaling Axis. *CCDT*. mayo de 2024;24(5):534-45.
142. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*. 3 de enero de 2020;11(1):102.
143. Lee SH, Golinska M, Griffiths JR. HIF-1-Independent Mechanisms Regulating Metabolic Adaptation in Hypoxic Cancer Cells. *Cells*. 9 de septiembre de 2021;10(9):2371.
144. Hypoxia-inducible factor 1 signalling, metabolism and its therapeutic potential in cardiovascular disease - ScienceDirect [Internet]. [citado 18 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://www-sciencedirect-com.proxy.timbo.org.uy/science/article/pii/S0925443918303594?via%3Dihub>
145. Loboda A, Jozkowiec A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 Transcription Factors - Similar but Not Identical. *Molecules and Cells*. mayo de 2010;29(5):435-42.
146. Blancher C, Moore JW, Talks KL, Houlbrook S, Harris AL. Relationship of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α Expression to Vascular Endothelial Growth Factor Induction and Hypoxia Survival in Human Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Res*. 1 de diciembre de 2000;60(24):7106-13.
147. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*. diciembre de 2003;23(24):9361-74.
148. Kim J whan, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*. 1 de marzo de 2006;3(3):177-85.
149. Shi Y, Gilkes DM. HIF-1 and HIF-2 in cancer: structure, regulation, and therapeutic prospects. *Cell Mol Life Sci*. 18 de enero de 2025;82(1):44.
150. Kozal KA, Jarosiewicz M, Szustka AE, Mądrecki M, Jankowski M, Józwiak PJ, Krześlak A. HIF-O-GlcnaC Axis - Implications for Breast Cancer Metastasis. *Cell Physiol Biochem*. 2025 Jun 23;59(3):404-418. doi: 10.33594/000000782. PMID: 40598910.

151. Ferrer CM, Lynch TP, Sodi VL, Falcone JN, Schwab LP, Peacock DL, et al. O-GlcNAcylation Regulates Cancer Metabolism and Survival Stress Signaling via Regulation of the HIF-1 Pathway. *Molecular Cell*. 5 de junio de 2014;54(5):820-31.
152. Cheng A, Zhang P, Wang B, Yang D, Duan X, Jiang Y, et al. Aurora-A mediated phosphorylation of LDHB promotes glycolysis and tumor progression by relieving the substrate-inhibition effect. *Nat Commun*. 5 de diciembre de 2019;10(1):5566.
153. McClelland ML, Adler AS, Deming L, Cosino E, Lee L, Blackwood EM, et al. Lactate Dehydrogenase B Is Required for the Growth of KRAS-Dependent Lung Adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 14 de febrero de 2013;19(4):773-84.
154. Hou X, Ouyang J, Tang L, Wu P, Deng X, Yan Q, et al. KCNK1 promotes proliferation and metastasis of breast cancer cells by activating lactate dehydrogenase A (LDHA) and up-regulating H3K18 lactylation. *PLoS Biol*. junio de 2024;22(6):e3002666.
155. Wu C, Zheng C, Chen S, He Z, Hua H, Sun C, et al. FOXQ1 promotes pancreatic cancer cell proliferation, tumor stemness, invasion and metastasis through regulation of LDHA-mediated aerobic glycolysis. *Cell Death Dis*. 24 de octubre de 2023;14(10):699.
156. Sharma D, Singh M, Rani R. Role of LDH in tumor glycolysis: Regulation of LDHA by small molecules for cancer therapeutics. *Semin Cancer Biol*. diciembre de 2022;87:184-95.
157. Hashimoto T, Ushikubo G, Arao N, Hatabi K, Tsubota K, Hosoi Y. Oxamate, an LDHA Inhibitor, Inhibits Stemness, Including EMT and High DNA Repair Ability, Induces Senescence, and Exhibits Radiosensitizing Effects in Glioblastoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. enero de 2025;26(12):5710.
158. Daneshmandi, S., Wegiel, B., & Seth, P. (2019). Blockade of Lactate Dehydrogenase-A (LDH-A) Improves Efficacy of Anti-Programmed Cell Death-1 (PD-1) Therapy in Melanoma. *Cancers*, 11(4), 450. <https://doi.org/10.3390/cancers11040450>
159. Lu QY, Zhang L, Yee JK, Go VLW, Lee WN. Metabolic Consequences of LDHA inhibition by Epigallocatechin Gallate and Oxamate in MIA PaCa-2 Pancreatic Cancer Cells. *Metabolomics*. febrero de 2015;11(1):71-80.
160. Liu Y, Schubert DR. The specificity of neuroprotection by antioxidants. *J Biomed Sci*. 5 de noviembre de 2009;16(1):98.
161. Chen H, Tian J, Guo L, Du H. Caspase inhibition rescues F1Fo ATP synthase dysfunction-mediated dendritic spine elimination. *Sci Rep*. 16 de octubre de 2020;10(1):17589.

162. Rosa-Fernandes L, Oba-Shinjo SM, Macedo-da-Silva J, Marie SKN, Palmisano G. Aberrant Protein Glycosylation in Brain Cancers, with Emphasis on Glioblastoma. *Adv Exp Med Biol.* 2022;1382:39-70.
163. Hoefflin R, Harlander S, Schäfer S, Metzger P, Kuo F, Schönenberger D, et al. HIF-1 α and HIF-2 α differently regulate tumour development and inflammation of clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nat Commun.* 17 de agosto de 2020;11(1):4111.
164. Liang X, Liu L, Fu T, Zhou Q, Zhou D, Xiao L, et al. Exercise Inducible Lactate Dehydrogenase B Regulates Mitochondrial Function in Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry.* diciembre de 2016;291(49):25306-18.
165. Zuliani I, Lanzillotta C, Tramutola A, Francioso A, Pagnotta S, Barone E, et al. The Dysregulation of OGT/OGA Cycle Mediates Tau and APP Neuropathology in Down Syndrome. *Neurotherapeutics.* enero de 2021;18(1):340-63.
166. Muha V, Authier F, Szoke-Kovacs Z, Johnson S, Gallagher J, McNeilly A, et al. Loss of O-GlcNAcase catalytic activity leads to defects in mouse embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry.* enero de 2021;296:100439.
167. Chehtane M, Khaled AR. Interleukin-7 mediates glucose utilization in lymphocytes through transcriptional regulation of the hexokinase II gene. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* junio de 2010;298(6):C1560-71.
168. Richard AMT, Webb DL, Goodman JM, Schultz V, Flanagan JN, Getty-Kaushik L, et al. Tissue-dependent loss of phosphofructokinase-M in mice with interrupted activity of the distal promoter: impairment in insulin secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* septiembre de 2007;293(3):E794-801.
169. Xu Y ping, Lv L, Liu Y, Smith MD, Li WC, Tan X ming, et al. Tumor suppressor TET2 promotes cancer immunity and immunotherapy efficacy. *Journal of Clinical Investigation.* 4 de septiembre de 2019;129(10):4316-31.
170. Loftus RM. Amino acid-dependent cMyc expression is essential for NK cell metabolic and functional responses in mice. *NATURE COMMUNICATIONS.* 2018;
171. Taparra K, Wang H, Malek R, Lafargue A, Barbhuiya MA, Wang X, et al. O-GlcNAcylation is required for mutant KRAS-induced lung tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation.* 2018;128(11).
172. Chen Y, Cai GH, Xia B, Wang X, Zhang CC, Xie BC, et al. Mitochondrial aconitase controls adipogenesis through mediation of cellular ATP production. *The FASEB Journal.* 2020;34(5):6688-702.

173. Hu M, Yang J, Xu Y, Liu J. [Retracted] MDH1 and MDH2 Promote Cell Viability of Primary AT2 Cells by Increasing Glucose Uptake. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2022;2022(1):2023500.
174. Sumi K, Hatanaka Y, Takahashi R, Wada N, Ono C, Sakamoto Y, et al. Citrate Synthase Insufficiency Leads to Specific Metabolic Adaptations in the Heart and Skeletal Muscles Upon Low-Carbohydrate Diet Feeding in Mice. *Front Nutr* [Internet]. 7 de julio de 2022 [citado 18 de diciembre de 2025];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2022.925908/full>
175. Matsuoka K, Bakiri L, Bilban M, Toegel S, Haschemi A, Yuan H, et al. Metabolic rewiring controlled by c-Fos governs cartilage integrity in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. septiembre de 2023;82(9):1227-39.