

# Informe final publicable de proyecto

## Papel del antígeno Tn en el crecimiento tumoral, desarrollo de metástasis, inmunoregulación del microambiente tumoral y en la resistencia a quimioterapia.

**Código de proyecto ANII: FCE\_3\_2020\_1\_162798**

Fecha de cierre de proyecto: 01/09/2023

**FESTARI CHIARLONE, María Florencia** (Responsable Técnico - Científico)

**DA COSTA, Valeria** (Investigador)

**FREIRE GARD, Teresa Inés** (Investigador)

**LANDEIRA ESCAMES, Mercedes** (Investigador)

**RODRIGUEZ ZRAQUIA, Santiago Antonio** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \\  
FACULTAD DE MEDICINA. FUNDACIÓN MANUEL PEREZ

## Resumen del proyecto

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) se caracteriza por una progresión metastásica y un peor pronóstico. Aunque es inicialmente sensible a la quimioterapia, muchos pacientes rápidamente desarrollan resistencia. Este proyecto profundiza en el papel que cumple el antígeno Tn, un O-glicano truncado comúnmente asociado a cáncer, en la biología del CMTN. Con este fin, utilizamos un modelo pre-clínico ortotópico Tn+ de CMTN metastásico murino generado por nuestro grupo. Encontramos que tanto los tumores como los ganglios drenantes de los ratones que fueron inoculados con células 4T1 Tn+ presentaron una mayor frecuencia de linfocitos T CD4+ FoxP3+ mientras que los esplenocitos expresaron mayores niveles de IL-10, en relación a los ratones con tumores 4T1 wt. Como el antígeno Tn se ha vinculado con la resistencia a la quimioterapia, estudiamos también la respuesta a diferentes drogas en nuestro modelo experimental. A pesar de que en los ensayos in vitro encontramos diferencias en cuanto a las respuestas con algunas drogas, este comportamiento no se reprodujo en los ensayos in vivo. A su vez, este proyecto también estudió el papel del antígeno Tn en la acción pro-tumoral de la O-glicoproteína Neuropilin-2 (Nrp2). Para ello abolimos la expresión de la misma en las células 4T1 Tn+ mediante la tecnología Crispr/Cas9 y encontramos que tanto el crecimiento tumoral como el desarrollo de metástasis pulmonares se ven inhibidos. En cuanto a la respuesta inmune sistémica generada contra el clon Tn+Nrp2-, observamos que hay una mayor cantidad de linfocitos T CD4+ y CD8+ productores de IL-10 en los bazo de los ratones inoculados con este clon respecto a los inoculados con el clon Tn+. Estos resultados sugieren que en células de CMTN murino que expresan Tn, el Nrp2 cumple un rol esencial en la progresión tumoral, que puede estar vinculado con mecanismos inmunosupresores.

**Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Inmunología / Inmunología/Glicobiología tumoral**

**Palabras clave: cáncer de mama / antígeno Tn / Neuropilin-2 /**

### **Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.**

En el ámbito de la salud mundial, el cáncer se encuentra entre las enfermedades de mayor impacto. Es la segunda causa de muerte en el mundo y se estima que en el 2018 ocasionó 9.6 millones de defunciones (<https://www.who.int/cancer/>). En particular, el cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres (<https://www.who.int/cancer/>). El CMTN se caracteriza por una progresión metastásica y un mal pronóstico y se identifica por la ausencia del receptor de estrógenos, de progesterona y Her2, que son la base de las hormonoterapias y las terapias dirigidas para los otros subtipos de cáncer de mama. El CMTN representa hasta un 15-20% de todos los casos de cáncer de mama y aún no existen terapias dirigidas aprobadas para su tratamiento. Los pacientes con CMTN presentan una sobrevida global más corta comparada con los pacientes con otros subtipos de cáncer de mama(1-2).

Las células tumorales presentan cambios fenotípicos o moléculas características que las distinguen de las células normales. Algunas de estas moléculas son carbohidratos, que se forman por varios cambios a nivel de las vías de glicosilación de las proteínas en estas células. Además de representar marcadores tumorales, estos motivos glucídicos tienen implicancias funcionales ya que potencian la progresión tumoral, la diseminación y la metástasis(3). En particular, el antígeno Tn (GalNAc-O-Thr/Ser) se ha encontrado en la mayoría de los tumores epiteliales pero no se encuentra en los tejidos normales(4-5). Por tanto, constituye una herramienta muy poderosa como marcador tumoral, tanto para el diagnóstico clínico como para el seguimiento de los tumores(3, 6). Diferentes estudios in vitro han sugerido que el antígeno Tn puede contribuir a la adhesión o la invasión de las células tumorales, y como consecuencia, participa en el proceso de metástasis(7-8). Sin embargo, aún no se conocen en detalle los mecanismos que explican estos sucesos. Su elucidación a nivel celular y molecular es crucial para el desarrollo de nuevas y eficientes terapias anti-tumorales. Además de las funciones mencionadas, los antígenos carbohidratos asociados a tumor pueden modular el fenotipo maligno de las células tumorales o suprimir la inmunidad anti-tumoral(7). Estudios recientes sugieren un papel crucial del antígeno Tn en el crecimiento tumoral, aunque para ello se utilizaron modelos experimentales tumorales de xenotransplante, con limitaciones en el estudio del sistema inmune y en la generación de metástasis(8-9). Por dicho motivo, poco se conoce sobre la función específica del antígeno Tn en lo que respecta a la modulación del sistema inmune durante el proceso metastásico.

Para dilucidar el papel del antígeno Tn en el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis, así como para estudiar la respuesta inmune anti-tumoral es necesario contar con modelos ortotópicos singénicos experimentales animales que mimeticen la situación clínica. Esto es fundamental, ya que Tn no está expresado en líneas tumorales murinas. Nuestro grupo

de investigación desarrolló un modelo ortotópico de CMTN metastásico utilizando la línea celular murina 4T1 (10-11). Modificamos genéticamente esta línea celular utilizando la tecnología Crispr/Cas9 de forma tal de mutar a la chaperona Cosmc, la cual es esencial para la actividad de la enzima core 1 sintasa que elonga al antígeno Tn. Como resultado todos los O-glicanos quedan como antígeno Tn (4T1 Tn+). También seleccionamos un clon celular que pasó por todo el proceso de transformación pero no incorporó mutaciones en Cosmc y por ende no expresa Tn (4T1 Tn-). Encontramos que la línea celular Tn+ genera tumores significativamente más grandes que la línea celular Tn- y la línea parental, y los ratones presentaron una menor supervivencia (11). Para evaluar la capacidad metastásica in vivo, removimos quirúrgicamente el tumor primario y analizamos la supervivencia por disfunción respiratoria debido a la presencia de metástasis pulmonares, realizando autopsias luego del fallecimiento de cada ratón. Los ratones inoculados con las células 4T1 Tn+ presentaron una supervivencia significativamente menor que los inoculados con las células 4T1 Tn- o 4T1 wt (11).

En este trabajo nos propusimos abordar el estudio del sistema inmune en el microambiente tumoral y metastásico para poder dilucidar el rol que tiene la expresión de Tn en la inmunomodulación en nuestro modelo de CMTN. Para ello analizamos los leucocitos presentes en tumores mamarios, ganglios drenantes, bazo y pulmones con metástasis a través de diversos ensayos, que incluyen proliferación celular, determinación de citoquinas por ELISA y el análisis de leucocitos productores de citoquinas reguladoras por citometría de flujo. Esperábamos encontrar infiltrados linfocitarios asociados a un fenotipo T regulador, es decir linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresen las citoquinas inmunoregulatoras IL-10 o TGF-beta o el factor de transcripción FoxP3 presente en algunos tipos de linfocitos T reguladores. Para poder asociar la expresión de Tn con la progresión metastásica y con la expresión de moléculas reguladoras como FoxP3, MGL2 e IL-10 en el cáncer de mama humano, también analizamos muestras tumorales y de metástasis adquiridas comercialmente en formato de microarrays tisulares y realizamos inmunohistoquímicas para detectar estos tres marcadores y poder realizar correlaciones estadísticas. El resultado esperado en este caso es una correlación entre la expresión de Tn con el estadio tumoral y la metástasis así como la correlación entre la expresión de Tn y la de las moléculas inmunoregulatoras mencionadas.

El mayor obstáculo para el tratamiento exitoso del CMTN es la resistencia a la quimioterapia citotóxica, el principal tratamiento en este tipo de enfermedad. A pesar de ser altamente sensible a la quimioterapia, la tasa de supervivencia global de los pacientes con CMTN permanece baja debido al hecho de que numerosos pacientes desarrollan eventualmente resistencia secundaria, lo que puede resultar en la muerte(12-13). De hecho, se ha documentado la resistencia a la muerte inducida por gemcitabina(14), doxorubicina(15), o paclitaxel(16) en el CMTN. Se han asociado diferentes mecanismos moleculares a la resistencia a las drogas quimioterapéuticas. Por ejemplo, las células madre tumorales y la EMT inducen la resistencia a drogas en múltiples tumores(12-13). Además, la hipoxia y los bajos niveles de especies reactivas del oxígeno en las células tumorales promueven una mayor capacidad de supervivencia lo que resulta en resistencia a la radioterapia y quimioterapia(17-18). Interesantemente, la O-glicosilación aberrante en las células tumorales, que lleva a la acumulación del antígeno Tn, también promueve la quimioresistencia(19). Asimismo, también se asocia la sobre-expresión de glicosiltransferasas que median la síntesis del antígeno Tn (GALNT3/GALNT6) con la quimioresistencia en el cáncer de colon y ovario(19-20). Incluso se ha asociado la sobre-expresión de mucinas que expresan Tn con la resistencia a la apoptosis y a la quimioterapia(21). En este trabajo nos propusimos relacionar la expresión del antígeno Tn con la quimioresistencia o la sensibilidad a diferentes drogas quimioterápicas en nuestro modelo experimental de CMTN. Esperábamos que la expresión de Tn estuviera relacionada con una mayor resistencia a la acción mediada por las drogas quimioterapéuticas y por tanto que la línea celular 4T1 Tn+ sea la que presente mayor quimioresistencia tanto in vitro como in vivo.

En colaboración con el Dr. Andrés Iriarte, realizamos un ensayo preliminar de RNAseq con análisis bioinformático que compara las líneas celulares 4T1 Tn+ y wt de forma de poder determinar la expresión diferencial de genes en estas líneas (Festari et al., manuscrito en preparación). Este ensayo reveló que la línea 4T1 Tn+ sobre-expresa genes que participan y promueven la transición epitelio-mesenquimal y participan en el proceso metastásico. Dentro de estos genes encontramos a la neuropilina-2 (Nrp2) que es un co-receptor multifuncional de las semaforinas y diferentes factores de crecimiento que participan en el desarrollo del sistema linfático(22), entre otros procesos. Nrp2 también se expresa en una amplia variedad de tumores epiteliales humanos, como el cáncer de mama(23), asociándose con tumores de alto grado y un peor pronóstico y menor supervivencia(24-25). Diferentes estudios demostraron que la expresión forzada de Nrp2 incrementa el crecimiento tumoral, mientras que el silenciamiento o bloqueo de Nrp2 previene la formación de tumores, o reduce el crecimiento tumoral e incrementa la apoptosis(26-27), lo que relaciona a Nrp2 con el comportamiento agresivo en el cáncer(24-25). Además, Nrp2 puede potenciar la angiogénesis (28-31) y el proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT) en donde ocurren la disrupción de la adhesión célula-célula y de la polaridad celular, la remodelación del citoesqueleto y cambios en la adhesión célula-matriz extracelular(32), lo que se asocia con una mejor capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales. Por último, Nrp2

puede también ser de importancia para el sistema inmune y mediar una inmunosupresión(33-35). Considerando las funciones que cumple Nrp2 en la biología tumoral, su inhibición/bloqueo podría constituir una estrategia terapéutica contra el cáncer(25-26, 36-37). Interesantemente, Nrp2 puede estar O-glicosilada, lo que influencia su actividad biológica(38-39). Nrp2 posee diferentes sitios de O-glicosilación en los sitios de unión del ligando. La glicosilación aberrante (como la expresión de O-glicanos truncados como el antígeno Tn) podría incrementar la interacción de Nrp2 con sus ligandos y promover así efectos pro-tumorales. Para evaluar como el antígeno Tn puede favorecer la función de Nrp2 en cáncer, inhibimos la expresión de Nrp2 en las células 4T1 Tn+ y evaluamos la capacidad de estas células de inducir tumores mamarios y metástasis pulmonares y de favorecer un sistema inmune más permisivo para el crecimiento del tumor. Esperábamos que el crecimiento tumoral y la generación de metástasis fuera menor en la línea 4T1 Tn+ Nrp2- respecto a la línea Tn+. Respecto al análisis de la respuesta inmune generada contra estas células, esperamos encontrar menor cantidad de leucocitos reguladores que expresen citoquinas anti-inflamatorias en la línea 4T1 Tn+ Nrp2- respecto a la línea Tn+.

## Metodología/Diseño del estudio

1. Análisis inmunológico del microambiente tumoral en el tumor primario y en las metástasis in vivo a partir de las diferentes líneas celulares generadas y en muestras clínicas provenientes de pacientes, de forma de evaluar si el antígeno Tn tiene relación con la expresión de moléculas inmunoregulatoras que puedan favorecer el crecimiento y la diseminación de las células tumorales.

Primeramente investigamos si la mayor agresividad tumoral, evidenciada a través del crecimiento acelerado y mayor número de metástasis pulmonares de ratones inoculados con las células 4T1 Tn+ respecto a los inoculados con las células wt (11) se asocia con la presencia de linfocitos T reguladores y otras células con propiedades inmunomoduladoras y con la expresión de citoquinas inmunoregulatoras (TGF-beta, IL-10). Para el análisis de poblaciones celulares realizamos citometría de flujo con anticuerpos específicos y la expresión de citoquinas fue estudiada por citometría de flujo intracelular y ELISA. Los estudios fueron realizados en el microambiente del tumor primario, en los ganglios drenantes, en el bazo y en leucocitos provenientes de pulmones metastatizados provenientes de ratones inoculados con las células 4T1 Tn+, wt o Tn-. Para estos ensayos 70000 células tumorales 4T1 Tn+, wt o Tn- fueron resuspendidas en 50 µl de PBS y fueron inoculadas en la cuarta mama derecha de ratones hembra BALB/c, los cuales fueron sacrificados en el día 28 post-inoculación y se les extrajo el tumor, los pulmones, los ganglios drenantes y el bazo para realizar los diferentes análisis. Al menos 8 ratones fueron utilizados por grupo. También analizamos la capacidad de las células tumorales de producir especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS/RNS) por citometría de flujo. Para ello utilizamos la sonda DCFDA, una sonda fluorogénica que se oxida para formar 2',7'-diclorofluoresceína, permitiendo así su análisis por citometría de flujo.

Para poder realizar un análisis que correlacione la expresión de Tn con diferentes parámetros clínico-patológicos y con la expresión de moléculas inmunoregulatoras a nivel tumoral en un modelo clínico realizamos inmunohistoquímicas de muestras de pacientes con cáncer de mama (tanto del tumor primario como de las metástasis) obtenidas comercialmente en el formato de microarrays tisulares (Biomax, BRM961). Para ello utilizamos la lectina Vicia villosa (VV, reconoce Tn) y anticuerpos anti-FoxP3 y -MGL2 humanos. También probamos un anticuerpo anti-IL-10 pero no obtuvimos marcación ni variando la concentración ni realizando recuperación antigénica con pH ácido o básico. Hemos adquirido otro anticuerpo anti-IL-10 humana que es recomendado para uso en inmunohistoquímica (LS-B7432, LSBio) y estamos realizando titulaciones para poder completar el estudio. Para la marcación con VV, se tuvo en cuenta la intensidad de marcación (0-3) y el porcentaje del tejido marcado (0-100%) y por lo tanto el score final es la multiplicación de ambos valores (0-300). En el caso de la marcación con los anticuerpos anti-FoxP3 y anti-MGL2, debido a que la marcación fue muy tenue y muy pocos cortes presentaron marcación, solo las catalogamos como positivos o negativos (score 0 o 1).

2. Análisis de la resistencia a diferentes drogas quimioterápicas de tumores 4T1 Tn+ y wt

Primero evaluamos la sensibilidad in vitro de las líneas celulares 4T1 Tn+ y wt, incubándolas con diferentes drogas quimioterapéuticas y evaluando luego la viabilidad por el ensayo de MTT. Las drogas evaluadas fueron 5-fluoracilo, paclitaxel, cisplatino y gemcitabina a diferentes concentraciones. Luego, evaluamos el tratamiento con las drogas que mostraron mejor respuesta in vitro (paclitaxel y gemcitabina) en ratones con tumores de mama generados al inyectarles las líneas tumorales Tn+ y wt.

3. Evaluación del papel de Nrp2 glicosilado con Tn en la tumorigenicidad y la capacidad metastásica in vivo de las células de cáncer de mama.

a) Obtención de células tumorales 4T1 Tn+ Nrp2 knockout

Para poder analizar el papel de Nrp2 en la metástasis del cáncer de mama generamos la línea celular 4T1 Tn+ Nrp2- (línea tumoral Tn+ carente de Nrp2), utilizando la tecnología Crispr/Cas9. Los clones celulares se obtuvieron por "Single Cell Deposition" de las células GFP+ utilizando un "cell sorter".

b) Evaluación in vivo de la capacidad tumorigénica y metastásica.

70000 células tumorales 4T1 Tn+, wt y Tn+ Nrp2- fueron resuspendidas en 50 µl de PBS y fueron inoculadas en la cuarta mama derecha de ratones hembra BALB/c. El crecimiento tumoral se midió regularmente con un calibre. Las micrometástasis pulmonares fueron cuantificadas en ratones sacrificados en el día 41 luego de la implantación de las células tumorales. Para ello realizamos un ensayo clonogénico estándar teniendo en cuenta su resistencia inherente al tratamiento con 6-tioguanina(10).

4. Evaluación de la respuesta inmune anti-tumoral en ratones con tumores 4T1 Tn+, Tn+ Nrp2- y wt

Evaluamos la presencia de células inmunes con capacidad inmunoregulatoria de forma similar a lo descrito en el punto 1) en los bazoos provenientes de los ratones inoculados con las células tumorales 4T1 Tn+, Tn+ Nrp2-, y wt. También evaluamos la producción de citoquinas por los esplenocitos tanto por citometría de flujo como por ELISA (posterior a la inducción de proliferación celular in vitro) con anticuerpos específicos.

## Resultados, análisis y discusión

Actividad 1. Evaluación de las poblaciones inmunes en el microambiente del tumor primario y las metástasis pulmonares generados por las células 4T1 Tn+, 4T1 Tn- y 4T1 wt.

A pesar de que no observamos cambios en la frecuencia de células CD45+ que infiltran los tumores provenientes de las células wt, Tn+ y Tn-, encontramos una mayor proporción de células CD11c+ F4/80+ en los tumores Tn+ comparados con los wt y Tn- (Figura 1A). Por otro lado, observamos una mayor frecuencia de células CD11b+ MHCII- y CD11b+ MHCII+ en los tumores Tn+ que en los tumores wt y Tn-, aunque esta diferencia sólo fue significativa para el segundo tipo de células (Figura 1B, gate y gráfica a y b, respectivamente). Por último, encontramos una reducción en la frecuencia de células CD11b- MHCII+ (células presentadoras de antígenos linfoides, como las células B) en los tumores Tn+ respecto a los wt y Tn-. Exploramos la expresión de Ly6G y Ly6C en estas células de forma de establecer si existe una diferencia en el reclutamiento de potenciales células mieloides supresoras en los tumores. La mayoría de las células CD11b+ MHCII+ expresaban altos niveles de Ly6G y bajos niveles de Ly6C (Figura 1C, gráfica a), mientras que no hay diferencia en la expresión de Ly6G y Ly6C en las células CD11b+ MHCII+ (Figura 1C, gráfica b) o en las células CD11b- MHCII+ (Figura 1C, gráfica c). Sin embargo, los tumores Tn- presentaron una menor frecuencia de estas células comparados con los tumores wt y Tn+. Estos resultados indican que la presencia del antígeno Tn se acompaña de una mayor frecuencia de células CD11c+ F4/80+ cells, que pueden corresponder a células presentadoras de antígenos.

Por otro lado, el análisis de los linfocitos T en el microambiente tumoral reveló una reducción en los linfocitos T CD3+ en los tumores Tn+ comparados con los wt o Tn-, aunque esta diferencia no fue significativa (Figura 2A). Sin embargo, cuando analizamos los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Figura 2B y C, gráficas b y c, respectivamente), se observa una menor frecuencia de estas células en los tumores Tn+ que en los wt y Tn-. Además, los linfocitos T CD4+ de los tumores Tn+ expresan mayores niveles de FoxP3 que los derivados de los tumores wt y Tn- (Figura 2C, gráfica d, izquierda). Los linfocitos T CD8+ de todos los tumores expresan niveles similares de FoxP3 (Figura 2C, gráfica d, derecha). Los ganglios drenantes de los tumores Tn+ y wt presentaron menor frecuencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ respecto a los tumores Tn- (Figura 2D, gráfica b y c, respectivamente). Sin embargo, se observó una mayor expresión de FoxP3 en los linfocitos T CD4+ provenientes de los ganglio de los tumores Tn+ respecto a los de los ganglios de los de los tumores wt y Tn- (Figura 2D, gráfica d), reflejando características similares a las células reclutadas a los tumores Tn+. En conclusión, estos resultados demuestran que el antígeno Tn induce un reclutamiento de linfocitos T CD4+ que expresan FoxP3 tanto en los tumores como en los ganglios drenantes respectivos de los ratones inoculados con las células 4T1. Para caracterizar la respuesta inmune tanto sistémica

como en los órganos metastásicos, primero estudiamos la capacidad de los esplenocitos derivados de los ratones con tumores de producir diferentes citoquinas luego de la estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Los esplenocitos derivados de los ratones con tumores Tn+ produjeron menores niveles de INF $\gamma$  y mayores niveles de IL-10 e IL-17 que los de los ratones con tumores wt (Figura 3A y B). Se observa un patrón similar cuando se comparan los esplenocitos de los ratones con tumores Tn+ con los Tn-, aunque en este caso, los derivados de ratones con tumores Tn- produjeron niveles solo un poco menores de INF $\gamma$  que los de los ratones con tumores Tn+ (Figuras 3A y B). Cabe destacar que los esplenocitos estimulados de todos los ratones con tumores expresaron menores niveles de INF $\gamma$  que los derivados de los ratones naive. Sin embargo, solo los esplenocitos estimulados de los ratones con tumores Tn+ expresaron mayores niveles de IL-10 e IL-17 que los ratones naive. También analizamos la producción de IFN $\gamma$ , IL-10 e IL-17 en los pulmones derivados de los ratones con tumor. Para ello utilizamos el sobrenadante de los pulmones disgregados. Observamos una mayor expresión de IL-10 en los pulmones derivados de los ratones con tumores Tn+ que los derivados de ratones naive, mientras que no se observan diferencias en los niveles de IL-10 producidos en los ratones con tumores wt y Tn- (Figura 3C y D). Estos resultados indican que la presencia del antígeno Tn está relacionada con un incremento en los niveles de IL-10 producida por el bazo y los pulmones en los ratones con tumor.

Tanto la línea Tn+ (Figura 4A) como los tumores Tn+ (Figura 4B) producen mayores niveles de ROS/RNS que las líneas celulares wt y Tn-. Ya que las ROS y las RNS pueden inhibir la proliferación de los linfocitos T, y considerando que los esplenocitos de los ratones con tumores Tn+ no eran capaces de producir INF $\gamma$  luego de la estimulación CD3/CD28 (Figura 3A), nos preguntamos si la producción de ROS por las células Tn+ puede inhibir la producción de INF $\gamma$  por esplenocitos naive estimulados. Para poder responder esto, esplenocitos naive estimulados con CD3/CD28 se incubaron con sobrenadante de tumores Tn+, Tn- y wt, en presencia o ausencia de NAC, un scavenger de ROS. Los sobrenadantes de los 3 tipos de tumores abolían completamente la producción de INF $\gamma$  por los esplenocitos estimulados. Sin embargo, la presencia de NAC en el cultivo llevó a un incremento significativo en la producción de INF $\gamma$  en presencia de los sobrenadantes de los tumores wt y Tn- pero no de los Tn+ (Figura 4C). Cabe destacar que no se encontraron niveles detectables de IL-10 en el medio de cultivo de los esplenocitos. Todos estos resultados sugieren que las células Tn+ producen mayores niveles de ROS/RNS y que el ROS derivado de los tumores Tn+ no está implicado en la supresión de la producción de INF $\gamma$  por los esplenocitos estimulados.

#### Actividad 2- Generación de líneas celulares 4T1 Tn+ Nrp2-

Hemos generado, utilizando la tecnología Crispr/Cas9 y partiendo de la línea celular 4T1 Tn+, 5 clones que pudieron haber incorporado mutaciones en el gen Nrp2. De los 5 clones, solo uno (A8) demostró una reducción significativa en la expresión de Nrp2, según análisis por Western blot (Figura 5). Aún resta caracterizar la mutación incorporada en el gen por secuenciado (secuenciación en proceso).

#### Actividad 3- Estudio de la correlación entre la expresión del antígeno Tn y otras moléculas inmunomoduladoras en muestras clínicas de cáncer de mama y metástasis correspondientes

Luego de titular los anticuerpos y poner a punto las inmunohistoquímicas, realizamos la marcación con la lectina VV y los anticuerpos anti-FOXP3 y anti-MGL2 de un microarray tisular que contiene muestras de cáncer de mama del tumor primario, metástasis (en ganglios) y tejido mamario adyacente normal (US Biomax, Inc.) proveniente de 48 pacientes diferentes.

La mayoría de los tumores, metástasis y mama normal presentaron marcación con VV (Figura 6) aunque encontramos una marcación significativamente más intensa en el caso de las metástasis (Figura 6A) comparando con el tejido normal. Los tumores primarios presentaron mayor marcación que el tejido normal aunque esa diferencia no fue significativa. Para el caso de FoxP3 y MGL2, ambas moléculas con un rol inmunomodulador y protumoral, solo unos pocos casos fueron positivos, y no pudimos encontrar una correlación con la expresión de Tn. Debemos ampliar el número de muestras e incluir a la IL-10 en este análisis, dado los resultados que obtuvimos en la actividad 1.

#### Actividad 4- Analizar la sensibilidad/resistencia a diferentes drogas de las diferentes líneas celulares generadas

##### a. Ensayo in vitro:

Primero se realizaron experimentos iniciales con la línea celular 4T1 wt que nos permitieron determinar la densidad celular, las concentraciones de las drogas y los tiempos de incubación apropiados. Luego se midió y comparó la quimiosensibilidad de

las 3 líneas celulares para cada una de las drogas seleccionadas. Así, pudimos generar curvas dosis-respuesta para las 3 líneas en estudio con las 4 drogas seleccionadas (Figura 7). Como se aprecia en la Figura 7, las mayores diferencias entre la respuesta de las células 4T1 wt y Tn+ se observan al tratarlas con las drogas Paclitaxel y Gemcitabina. En ambos casos se observa que la viabilidad de la línea wt desciende considerablemente más que la de la línea Tn+ a determinadas concentraciones de dichas drogas.

#### b. Ensayos in vivo:

Inicialmente solo realizamos estos ensayos con Paclitaxel y Gemcitabina que son las drogas que evidenciaron un efecto diferencial in vitro, dado el alto costo que poseen estas drogas. Como podemos ver en la Figura 8, los resultados in vivo no se corresponden con lo que obtuvimos in vitro. En este caso, no parece haber diferencia entre los tumores generados por ambas líneas celulares en cuanto a la respuesta al tratamiento. A futuro quisiéramos probar otras concentraciones de drogas.

#### Actividad 5- Análisis del papel de Nrp2-Tn en el crecimiento tumoral y la metástasis

Aunque las células 4T1 wt crecieron más de lo reportado previamente (el clon Tn+ normalmente crece mucho más rápido que las wt in vivo), los tumores generados con el clon Tn+Nrp2- fueron mucho más pequeños que los generados por la línea Tn+ (Figura 9A), un efecto que se mantuvo cuando se analizó el peso tumoral luego del sacrificio (Figura 9B).

Como se observa en la Figura 9C, los ratones con tumores derivados de la línea 4T1 Tn+ Nrp2- no desarrollaron micrometástasis al igual que los pulmones derivados de los ratones naive. Por tanto, podemos decir que la línea 4T1 Tn+ Nrp2- presenta una reducción del crecimiento tumoral y una menor capacidad metastásica que la línea 4T1 Tn+. Para determinar si estos efectos son mediados o potenciados por la expresión del antígeno Tn sobre esta molécula, es de nuestro interés poder también inhibir la expresión de Nrp2 en las células 4T1 wt (con O-glicosilación normal) para poder repetir estos ensayos.

#### Actividad 6- Evaluación de la respuesta inmune anti-tumoral en ratones inyectados con las células Tn+/Nrp2+ (4T1 Tn+), Tn+/Nrp2- (A8) y Tn-/Nrp2+ (wt).

Se observa un mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ y T CD8+ en los bazo de los ratones inoculados con el clon A8, con un nivel similar al obtenido con los ratones naive (Figura 10A y B). Además, los linfocitos T CD4+ y CD8+ de los tumores A8 expresan mayores niveles de IL-10 pero no de FoxP3 que los derivados de los tumores wt y Tn+ (Figura 10C-F). No observamos diferencias en los niveles de IL-4, INF- $\gamma$  o IL-17 expresados por los linfocitos T CD4+ (Figura 10G-I).

Además, los esplenocitos derivados de los ratones con tumores Tn+ Nrp2- (A8) produjeron menores niveles de IL-17 que los ratones con tumores Tn+ cuando fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 y -CD28, aunque no se observan cambios significativos ni en la producción de INF- $\gamma$  ni de IL-10 (Figura 11).

En suma, se podría sugerir que Nrp2 en las células Tn+ está vinculado con una reducción en el infiltrado linfocitario a nivel del bazo de los ratones inoculados con dichas células y que además parece haber una relación con la expresión de IL-10 y de IL-17, aunque los resultados vinculados con las citoquinas deben repetirse ya que los niveles de IL-10 e IL-17 de las células Tn+ fueron muchos menores que los que observamos en la actividad 1 en relación a los ratones naive.

### Conclusiones y recomendaciones

Del presente trabajo podemos concluir que la expresión de Tn en nuestro modelo experimental de cáncer de mama metastásico induce tanto el crecimiento del tumor primario como la metástasis pulmonar así como también la generación de una respuesta inmunosupresora. En este sentido, el bloqueo del antígeno Tn podría constituir una estrategia terapéutica innovadora que inhiba las metástasis derivadas del CMTN.

A pesar de que se ha reportado que la expresión de Tn está vinculada con mecanismos de quimiorresistencia, esto no fue lo que observamos en nuestro modelo. Sería interesante continuar estudiando este fenómeno variando las dosis de las drogas.

En cuanto al papel que cumple Nrp2 O-glicosilado con Tn en nuestro modelo, podemos decir que la ausencia del mismo en las células 4T1 Tn+ afecta el desarrollo y progresión tumoral, inhibiendo su crecimiento y evitando el desarrollo de metástasis. Este fenómeno podría estar mediado por un fenómeno inmunomediado dado que observamos un mayor infiltrado linfocitario en

los bazo de los ratones que fueron inoculados con las células Tn+ carentes de Nrp2. Aunque también encontramos diferencias a nivel de las citoquinas que expresan los esplenocitos inoculados con las células carentes de Nrp2, estos resultados deben repetirse por inconsistencias con resultados anteriores. Todos estos hallazgos nos motivan a seguir profundizando en el rol del Nrp2 en el CMTN y en cómo Tn puede modular su actividad. Para ello continuaremos este estudio a través de la tesis de Doctorado de la MSc. Mercedes Landeira la cual se titula: "Estudio de la O-glicosilación aberrante en la función de la Neuropilin-2 en el cáncer de mama". Los resultados aquí presentados sugieren que Nrp2 puede ser un blanco terapéutico prometedor contra el CMTN. El uso de estrategias terapéuticas que bloqueen Nrp2 en conjunto con una terapia contra el antígeno Tn podría mejorar los tratamientos existentes y podría proveer una oportunidad única para evitar la capacidad que tienen los tumores de CMTN de crecer y metastatizar.

## Referencias bibliográficas

1. Park SY, et al. Targeting Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019 Jul 9;11(7).
2. Giuli MV, et al. Notch Signaling Activation as a Hallmark for Triple-Negative Breast Cancer Subtype. *J Oncol* 2019 Jul 11;2019:8707053.
3. Freire T and Osinaga E. The Sweet Side of Tumor Immunotherapy. *Immunotherapy* 2012 Jul;4(7):719-34.
4. Fu C, et al. Tumor-associated Antigens: Tn Antigen, sTn Antigen, and T Antigen. *HLA* 2016 Dec;88(6):275-286.
5. Chia J, et al. Short O-GalNAc Glycans: Regulation and Role in Tumor Development and Clinical Perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 2016. 1860(8): p. 1623-39.
6. Freire T, et al. Carbohydrate Antigens: Synthesis Aspects and Immunological Applications in Cancer. *Mini Rev Med Chem* 2006 Dec;6(12):1357-73.
7. Kolbl AC, et al. The Role of TF- And Tn-antigens in Breast Cancer Metastasis. *Histol Histopathol*, 2016. 31(6): p. 613-21.
8. Liu Z, et al. Tn Antigen Promotes Human Colorectal Cancer Metastasis via H-Ras Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition Activation. *J Cell Mol Med*. 2019 Mar;23(3):2083-2092.
9. Jiang Y, et al. Aberrant O-glycosylation Contributes to Tumorigenesis in Human Colorectal Cancer. *J Cell Mol Med*. 2018 Oct;22(10):4875-4885.
10. Kramer MG, et al. Neoadjuvant administration of Semliki Forest virus expressing interleukin-12 combined with attenuated *Salmonella* eradicates breast cancer metastasis and achieves long-term survival in immunocompetent mice. *BMC Cancer* 2015 Sep 7;15:620.
11. Festari MF, et al. The tumor-associated Tn antigen fosters lung metastasis and recruitment of regulatory T cells in triple negative breast cancer. *Glycobiology*. 2022 Apr 21;32(5):366-379.
12. Samanta D, et al. Hypoxia-inducible Factors Are Required for Chemotherapy Resistance of Breast Cancer Stem Cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:E5429–E5438.
13. Lee KL, et al. Triple-Negative Breast Cancer: Current Understanding and Future Therapeutic Breakthrough Targeting Cancer Stemness. *Cancers* 2019, 11(9), 1334
14. Wang G, et al. Loss of miR-873 Contributes to Gemcitabine Resistance in Triple-Negative Breast Cancer via Targeting ZEB1. *Oncol Lett*. 2019 Oct; 18(4): 3837–3844
15. Loi S, et al. CD73 Promotes Anthracycline Resistance and Poor Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 11091–11096
16. O'Reilly EA, et al. The Fate of Chemoresistance in Triple Negative Breast Cancer (TNBC). *BBA Clin* 2015 Mar 12;3:257-75
17. Schito L, et al. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer* 2016, 2, 758–770.
18. Michiels C. Physiological and Pathological Responses to Hypoxia. *Am. J. Pathol.* 2004, 164, 1875–1882
19. Liu B, et al. LINC01296/miR-26a/GALNT3 Axis Contributes to Colorectal Cancer Progression by Regulating O-glycosylated MUC1 via PI3K/AKT Pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Dec 14;37(1):316.
20. Lin TC, et al. GALNT6 Expression Enhances Aggressive Phenotypes of Ovarian Cancer Cells by Regulating EGFR Activity. *Oncotarget*. 2017 Jun 27;8(26):42588-42601
21. Reynolds IS, et al. Mucin Glycoproteins Block Apoptosis; Promote Invasion, Proliferation, and Migration; And Cause Chemoresistance Through Diverse Pathways in Epithelial Cancers. *Cancer Metastasis Rev*. 2019 Jun;38(1-2):237-257.
22. Guo, HF and Vander Kooi CW. Neuropilin Functions as an Essential Cell Surface Receptor. *J Biol Chem*, 2015. 290(49): p. 29120-6.
23. Prud'homme GJ and Glinka Y. Neuropilins Are Multifunctional Coreceptors Involved in Tumor Initiation, Growth, Metastasis and Immunity. *Oncotarget*, 2012. 3(9): p. 921-39
24. Seifi-Alan M, et al. Neuropilin-1 Expression Is Associated With Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Tissues. *Cancer Manag Res*, 2018. 10: p. 1969-1974.
25. Naik A, et al. Neuropilin-1 Associated Molecules in the Blood Distinguish Poor Prognosis Breast Cancer: A Cross-Sectional Study. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 3301.
26. Caunt M, et al. Blocking neuropilin-2 Function Inhibits Tumor Cell Metastasis. *Cancer Cell*, 2008. 13(4): p. 331-42.
27. Ji T, et al. Neuropilin-2 Expression Is Inhibited by Secreted Wnt Antagonists and Its Down-Regulation Is Associated With Reduced Tumor Growth and Metastasis in Osteosarcoma. *Mol Cancer*. 2015 Apr 17;14:86.
28. Sarabipour S and Mac Gabhann F. VEGF-A121a Binding to Neuropilins - A Concept Revisited. *Cell Adh Migr*, 2018. 12(3): p. 204-214.

29. Perrot-Applanat M. and Di Benedetto M. Autocrine Functions of VEGF in Breast Tumor Cells: Adhesion, Survival, Migration and Invasion. *Cell Adh Migr*, 2012. 6(6): p.547-53.
30. Wang J, et al. NRP-2 in Tumor Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis. *Cancer Lett*. 2018;418:176-184.
31. Niland S, et al. Neuropilins in the Context of Tumor Vasculature. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 1;20(3). pii: E639.
32. Soundararajan R, et al. Targeting the Interplay Between Epithelial-to-Mesenchymal-Transition and the Immune System for Effective Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2019 May 24;11(5). pii: E714
33. Rey-Gallardo A, et al. Polysialic Acid Is Required for neuropilin-2a/b-mediated Control of CCL21-driven Chemotaxis of Mature Dendritic Cells and for Their Migration in Vivo. *Glycobiology*. 2011 May;21(5):655-62.
34. Rey-Gallardo A, et al. Polysialylated neuropilin-2 Enhances Human Dendritic Cell Migration Through the Basic C-terminal Region of CCL21. *Glycobiology*. 2010 Sep;20(9):1139-46.
35. Roy S. et al. Macrophage-Derived Neuropilin-2 Exhibits Novel Tumor-Promoting Functions. *Cancer Res*, 2018. 78(19): p. 5600-5617.
36. Napolitano, V. and Tamagnone L. Neuropilins Controlling Cancer Therapy Responsiveness. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(8).
37. German AE, et al. Paxillin Controls Endothelial Cell Migration and Tumor Angiogenesis by Altering Neuropilin 2 Expression. *J Cell Sci*, 2014. 127(Pt 8): p. 1672-83
38. Wu MH, et al. Glycosylation-dependent galectin-1/neuropilin-1 Interactions Promote Liver Fibrosis Through Activation of TGF- $\beta$ 1 And PDGF-like Signals in Hepatic Stellate Cells. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 11006.
39. Windwarder M, et al. Detailed Characterization of the O-linked Glycosylation of the neuropilin-1 c/MAM-domain. *Glycoconj J*, 2016. 33(3): p. 387-97.

## Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)