

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Participación de Galectina-1 en la progresión tumoral.
Potencial mecanismo de evasión de la respuesta inmune
antitumoral y nuevo factor pro-angiogénico.

Autora: Lic. Natalia Rubinstein.

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

Director: Dr. Gabriel A. Rabinovich.

Laboratorio de Inmunogenética
Hospital de Clínicas "José de San Martín"
Facultad de Medicina
Universidad de Buenos Aires

2006

A mis papás

I Resumen en español.....	4
II Summary.....	6
III Introducción.....	8
IV Antecedentes.....	22
V CAPITULO 1: Galectina-1 un nuevo mediador en la evasión de la respuesta inmune anti-tumoral....	28
Células de melanoma murino expresan Galectina-1.....	29
Generación de células de melanoma sin Gal-1.....	29
Galectina-1 contribuye significativamente al ambiente inmunosupresor inducido por medios condicionados de células de melanoma.....	32
La inhibición génica de Gal-1 promueve el rechazo tumoral en un modelo in vivo.....	33
Células tumorales sin Gal-1 son eliminadas por células CD4+ y CD8+ positivas.....	35
La disminución de Gal-1 en el tumor permite la generación de una respuesta inmune polarizada hacia un fenotipo Th1.....	38
El boqueo de Gal-1 genera ratones resistentes a un re-desafío con tumores completos.....	40
VI CAPITULO 2: Galectina-1 promueve la generación de nuevos vasos in vivo.....	44
Galectina-1 recombinante produce angiogénesis in vivo en un modelo acelular.....	45
Sarcoma de Kaposi produce Gal-1.....	46
Generación del modelo in vivo: antisense de Gal-1.....	47
Comparación tasas de crecimiento in vitro.....	48
Inoculación de ratones nude: crecimiento in vivo.....	48
Evaluación histológica de los vasos generados.....	49
Regulación de la expresión de Gal-1 por variaciones en la concentración de oxígeno.....	51
Migración e invasión	53
VII Discusión.....	57
VIII Materiales y métodos.....	62
Capítulo 1.....	62
Capítulo 2.....	73
IX Anexo.....	76
X Abreviaturas.....	77
XI Trabajos Publicados.....	78
XIA Papers que surgieron de estas tesis.....	78
XIB Papers que surgieron durante el transcurso de esta tesis.....	78
Agradecimientos.....	80
XII Referencias (por orden alfabético).....	81

Participación de Galectina-1 en la progresión tumoral. Potencial mecanismo de evasión de la respuesta inmune antitumoral y nuevo factor pro-angiogénico.

I Resumen en español

Una de las mayores paradojas de la biología tumoral consiste en el crecimiento de tumores y establecimiento de metástasis a pesar de la existencia de circunstancias desfavorables tales como: el infiltrado de células del sistema inmune potencialmente capaces de reconocer antígenos tumorales, así como la ausencia de nutrientes o anoxia en espacios limitados. A los fines de explicar este fenómeno, investigadores demostraron que los tumores han generado múltiples estrategias para eludir el reconocimiento inmunológico (ESCAPE TUMORAL), generar nuevos vasos (ANGIOGÉNESIS) y regular la expresión de diversas moléculas de adhesión que le permiten migrar y establecerse en tejidos lejanos (METÁSTASIS).

La elevada complejidad que se despliega durante las diferentes etapas que participan en la progresión tumoral dificulta elucidar los mecanismos involucrados en la regulación de la agresividad tumoral, lo cual obstaculiza y limita la efectividad de estrategias de inmunoterapia y la generación de vacunas contra el cáncer: uno de los mayores desafíos de la ciencia aplicada a la medicina. El objetivo general de nuestro trabajo fue analizar la participación de Galectina-1 (Gal-1) en diversos eventos de la progresión tumoral: evasión del sistema inmune, angiogénesis y metástasis. Galectina-1 es una proteína perteneciente a la familia de las lectinas que posee la capacidad de unirse a azúcares específicos a través de su dominio de reconocimiento a carbohidratos (DRC) e inducir apoptosis de linfocitos T activados.

Con el fin de explorar la relevancia de Gal-1 durante una progresión tumoral exitosa se bloqueó su expresión a nivel génico a través de estrategias de silenciamiento de genes (construcciones antisentido) en líneas tumorales humanas y murinas. Estas células fueron utilizadas en ensayos *in vivo* e *in vitro* y se evaluó: tasa de crecimiento tumoral, regulación de la respuesta inmune anti-tumoral, generación de nuevos vasos sanguíneos y modulación de la migración e invasión. Esta estrategia nos permitió adjudicarle a Gal-1 un papel sumamente

importante en la generación de inmunoprivilegio y su colaboración en la movilidad celular y la generación de nuevos vasos sanguíneos.

Estos resultados nos permiten comprender la participación integral de Gal-1 en procesos de progresión tumoral pudiendo seleccionarla en un futuro como un buen blanco terapéutico.

Palabras Claves: galectina-1, apoptosis, evasión inmune, hipoxia, angiogénesis, progresión tumoral.

Participation of Galectin-1 in tumor progression. Potential mechanism of tumor immune evasion and novel proangiogenic mediator.

II Summary

One of the most important missing link in tumor biology is the fact that tumor cells are able to grow and to migrate under bad circumstances like the generation of a potential anti-tumoral immune response, poor oxygen availability and deficient nutrients supply. To analyze this, researchers have demonstrated that tumors generate multiple strategies to evade anti-tumoral immune response (TUMOR-IMMUNE ESCAPE), to generate new blood vessels (ANGIOGENESIS), and to regulate expression of adhesion molecules that allow them to migrate and to establish in another tissues (METASTASIS). Tumor progression includes highly and complex regulated steps that impair the effectiveness of immune attack and the generation of useful vaccines against cancer, one of the most important challenges in medicine. The major objective of our work was to analyze the role of Galectin-1 (Gal-1) in different steps of tumor progression: immune evasion, angiogenesis and metastasis. Galectin-1, a β -galactoside binding protein, has the potential to inhibit T cell effectors function by promoting growth arrest and apoptosis of activated T cells. To explore the role of Gal-1 during tumor progression we blockade Gal-1 expression by silencing-gene strategies (antisense construction) in human and murine cell lines. These cells were used in in vivo and in vitro assays to explore regulation of immune response, tumor growth rate, new vessels formation levels and modulation of invasion and migration. These strategies prompt us to suggest Gal-1 as a strong mediator in immune privileged generation as well as a potent angiogenesis and metastatic enhancer. More importantly, our data highlights a potential molecular target for manipulation of tumor progression with profound implications for cancer immunotherapy.

Key words: galectin-1, apoptosis, immune evasion, hypoxi, angiogenesis, tumor progression.

III Introducción

El sistema inmune ha evolucionado en forma tal de poder defendernos contra moléculas extrañas (patógenos y tumores) sin dañar componentes propios. M. Burnett introdujo en la década del '70 el concepto de la vigilancia inmunológica, basado, principalmente en el hecho de que los tumores inducen una respuesta inmune específica al expresar en membrana antígenos tumorales en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Estos antígenos pueden convertirse en blancos estratégicos de células T específicas contra tumores, debido a que no se expresan en la superficie de células normales o lo hacen en muy bajos niveles o en estadios tempranos de la diferenciación. Las células tumorales humanas también suelen expresar proteínas mutadas que pueden ser antigénicas. En realidad, muchos tumores se caracterizan por expresar un patrón anormal de proteínas, convirtiéndose en excelentes blancos para activar una respuesta inmune. La existencia de células tumorales apoptóticas asociadas al infiltrado linfocitario sugiere la inducción de muerte de células malignas por parte de células del sistema inmune (Wolfgan H y col., 1999).

Durante la última década se ha progresado en la identificación de antígenos asociados a tumores (AAT) reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTLs). Los CTLs son las principales células efectoras capaces de llevar a cabo una respuesta inmune específica anti-tumoral. También participan en el ataque anti-tumoral células no específicas, que juegan un papel esencial en la inmunidad innata, tales como células agresoras naturales (natural killers o NK) y macrófagos. La capacidad anti-tumoral de las células NK se halla modulada por citoquinas, incluidos los interferones, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-18 e IL-2. Por lo tanto su capacidad citotóxica depende, en gran medida, de la estimulación concurrente de células T y macrófagos, los cuales producen estas citoquinas. A diferencia de los CTLs, las células NK son fundamentales en la erradicación de aquellos tumores que expresan bajos niveles de CMH-I. El rol de los macrófagos en la inmunidad anti-tumoral también es muy importante, ya que estos poseen la capacidad de reconocer y matar células tumorales sin afectar células normales, a través de la liberación de enzimas lisosomales, metabolitos reactivos del oxígeno y citoquinas como TNF- α . Por lo tanto la destrucción de la célula tumoral, a través de la inducción de apoptosis es un proceso que involucra la activación de múltiples efectores de la artillería

inmunológica. Este proceso se denomina vigilancia inmunológica. Sin embargo, si estos mecanismos no son efectivos, el tumor logra evadir la respuesta inmune, se fortalece y adquiere la capacidad de invadir nuevos tejidos. Este proceso se denomina escape tumoral.

El crecimiento de tumores antigénicos, en ausencia de una destrucción efectiva mediada por células T, desafía y pone en peligro el desarrollo de estrategias efectivas de inmunoterapia, tales como la vacunación contra antígenos específicos de tumor. Surge entonces, el siguiente interrogante que ha sido objeto de intenso estudio por parte de biólogos celulares, moleculares e inmunólogos durante los últimos años:

¿ Por qué la mayoría de los tumores antigénicos evaden el reconocimiento inmunológico ?

Los tumores desarrollan cierta independencia de señales externas de crecimiento y se convierten en refractarios a la senescencia celular o a los agentes inductores de estímulos apoptóticos, perdiendo la capacidad de "inhibición por contacto" y pudiendo crecer descontroladamente. Asimismo, ciertos tumores han desarrollado múltiples mecanismos para escapar del reconocimiento inmunológico, mientras que otros han generado estrategias de "contra-ataque", y la mayoría utiliza una combinación de ambos (Igney and Krammer, 2002; Marincola et al., 2000). Recientemente se estableció que los tumores sólidos se comportan como "**sitios inmunológicamente privilegiados**", capaces de generar diversos mecanismos para evitar una respuesta inflamatoria. Hasta el momento los sitios descritos como inmunológicamente privilegiados son cerebro, testículo, próstata, placenta y ojo; y los mecanismos de privilegio postulados incluyen la presencia de barreras físicas como la barrera hematoencefálica y hematotesticular, o la generación de microambientes ricos en factores inmunosupresores solubles como prostaglandina E2 o citoquinas como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) e IL-10. Respecto a estrategias de "contra-ataque" inicialmente se creía que la molécula Fas ligando (Fas L ó CD95L), inductora de apoptosis, se expresaba exclusivamente en células del linaje mieloide/linfoide, incluyendo células T, NK, células B y fagocitos. Sin embargo, se demostró posteriormente que esta molécula también podría

expresarse en células no linfoides como tumores, a los cuales les conferiría un estado de privilegio inmunológico, permitiendo inducir apoptosis de linfocitos pro-inflamatorios infiltrantes (O’Connell y col, 1999). Sin embargo, recientes evidencias cuestionan la expresión de Fas ligando en melanoma y proponen la existencia de moléculas alternativas que le permiten al tumor inducir apoptosis de células T infiltrantes (Chappel y col., 1999).

Mecanismos de vigilancia inmunológica y escape tumoral en melanoma maligno

El melanoma, tumor resultante de la transformación maligna de melanocitos, es el cáncer de piel más agresivo, con una incidencia que se ha triplicado en los últimos cinco años. Se han identificado células T citotóxicas (CTLs) capaces de reconocer antígenos tumorales de diversa naturaleza tales como MAGE, p53, MUC-1 y p21ras, con potencialidad de eliminar este tipo de tumores (Lee P y col, 1999). Sin embargo, en un alto porcentaje de pacientes, células de melanoma se desprenden del tumor primario y escapan de la vigilancia inmunológica para invadir diversos tejidos y generar metástasis (Geertsen et al., 1999). Múltiples mecanismos se han postulado a los fines de explicar el fenómeno de escape inmunológico (Tabla I)

Tabla I mecanismos de escape

Estrategia	Mecanismo
Ignorancia	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de antígenos tumorales en órganos linfáticos. • Crecimiento tumoral en sitios inmunoprivilegiados. • Pérdida de moléculas de adhesión. • Presencia de barreras físicas compuestas por estroma.
Inhibición de la presentación antigénica	<ul style="list-style-type: none"> • Mutación o disminución de la expresión de genes CMH • Defectos en el procesamiento antigénico (deficiencia en TAP, tapasina)
Secreción de factores inmunosupresores	<ul style="list-style-type: none"> • Citoquinas (TGF-β, IL-10, etc) • Prostaglandinas (PGE2) • Quimioquinas (RANTES) • Enzimas (IDO)
Inducción de tolerancia	<ul style="list-style-type: none"> • Inducción de anergia por pérdida de moléculas coestimulatorias • Desviación inmunológica con polarización Th2

	<ul style="list-style-type: none"> • Células T regulatorias (generación de Tr1 CD4+)
Resistencia a las apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> • Expresión de moléculas anti-apoptóticas
Estrategias de contra-ataque	<ul style="list-style-type: none"> • Expresión de Fas L y otros ligandos de muerte (RCAS-1)

En este complejo escenario de mecanismos de escape, Morvillo y colaboradores en 1996 (Morvillo et al., 1996) demostraron la capacidad de células de melanoma de producir un factor inmunosupresor de 14 kDa capaz de inhibir la respuesta linfoproliferativa inducida por mitógenos y aloantígenos. Hasta el momento, la identidad de dicha proteína aún no ha sido determinada.

Galectinas: una nueva familia de proteínas involucradas en la regulación de la respuesta inmune

Galectina-1 (Gal-1), homodímero compuesto por subunidades de 14,5 kDa, pertenece a una familia de proteínas extremadamente conservadas a través de la evolución que participan en diversos eventos biológicos en virtud de su facultad de descifrar glicocódigos específicos en carbohidratos complejos situados en la membrana de diferentes tipos celulares ((Rabinovich, 2002 #33;Rabinovich, 2002 #32). Esta proteína ha sido identificada en diferentes tejidos y sitios inmunológicamente privilegiados tales como placenta, córnea, testículo, ovario y ciertos tipos de tumores (Dettin et al., 2003; Iglesias et al., 1998; Rabinovich et al., 2002b). Recientemente hemos demostrado que Gal-1 es capaz de suprimir la respuesta linfoproliferativa en forma específica y dependiente del dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) (Rabinovich et al., 1997). La investigación de los mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno supresor, reveló que Gal-1 es capaz de inducir apoptosis de células T activadas y timocitos inmaduros, a través de la interacción con el terminal disacarídico [Gal β 1-4 β NAcGlc] localizado en el receptor CD45RO (Perillo et al., 1995; Rabinovich, 2000; Rabinovich et al., 1998). De esta manera, Gal-1 participaría activamente en la generación de tolerancia central y periférica y en el mantenimiento de la homeostasis de la respuesta inmune en sitios inmunológicamente privilegiados.

Recientemente, logramos extrapolar estas observaciones a un modelo experimental *in vivo*, demostrando a través de estrategias de terapia génica y proteica que Gal-1 es capaz de suprimir la respuesta autoinmune e inflamatoria, a través de apoptosis de células T activadas involucradas en el proceso inflamatorio crónico (Rabinovich et al., 1999b). Demostramos además que Gal-1 en concentraciones inferiores al umbral apoptótico crítico, inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la adhesión de células T a componentes de la matriz extracelular, eventos fundamentales en fenómenos de vigilancia inmunológica (Rabinovich et al., 2002a)).

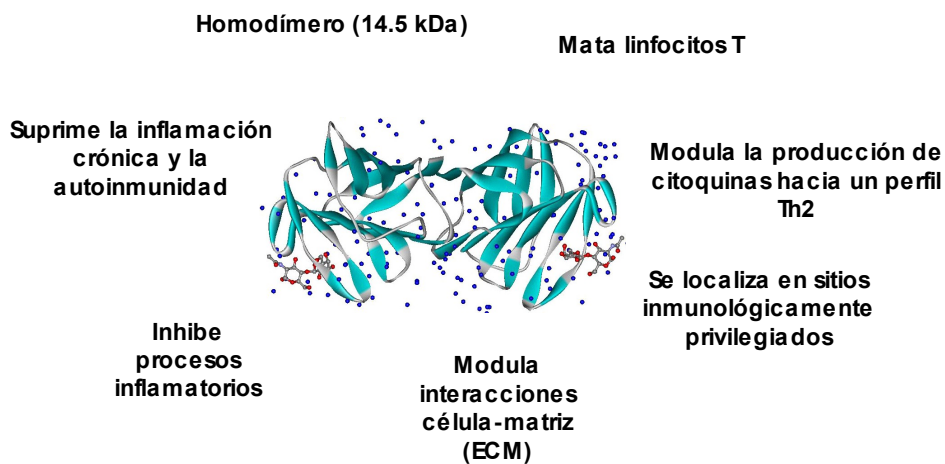


Figura 2: Propiedades bioquímicas e inmunológicas de Gal-1

El melanoma es el cáncer de piel más agresivo, incluso incurable en estados avanzados, pero existe amplias evidencias de pacientes vacunados o tratados que indican que este tumor es altamente antigénico y frecuentemente inmunogénico (Anichini et al., 2004).

INMUNOVIGILANCIA E INMUNOTERAPIA EN CÁNCER: UN DESAFÍO PARA LA INMUNOLOGÍA DEL NUEVO MILENIO

Uno de los grandes desafíos de la medicina de este nuevo milenio consiste en el diseño de estrategias de inmunoterapia activa que permitan erradicar tumores y controlar metástasis (Pardoll, 2002). Múltiples avances en los últimos años, tales como la identificación de antígenos tumorales específicos y la disponibilidad de metodologías para monitorear la frecuencia de células T citotóxicas específicas (Smyth et al., 2001), han demostrado que la inmunoterapia frente al cáncer, y en particular frente al melanoma, no está lejos de ser una realidad tangible.

Sin embargo, y a pesar de estos importantes avances, un alto porcentaje de estrategias de vacunación e inmunoterapia han fracasado en ensayos clínicos. Recientes evidencias indican que la mayoría de los tumores han generado durante su desarrollo múltiples estrategias para evadir o re-editar la respuesta inmune específica, promoviendo la existencia de un microambiente tumoral inmunosupresor (Dunn et al., 2002). En este sentido, el diseño de estrategias de inmunoterapia deberá contemplar en un futuro no sólo la potenciación de la respuesta inmune, sino además el bloqueo de dichos mecanismos de escape o contra-ataque tumoral.

MECANISMOS DE ESCAPE Y CONTRA-ATAQUE TUMORAL

Múltiples mecanismos han sido postulados para explicar el fenómeno de escape o evasión de la respuesta inmune antitumoral (Igney and Krammer, 2002). Estos mecanismos incluyen defectos en la maquinaria de procesamiento y presentación de péptidos antigénicos (Marincola et al., 2000), generación de mutantes de escape (Khong and Restifo, 2002) y liberación de factores inmunosupresores y pro-apoptóticos capaces de modular la supervivencia, activación y polarización de diferentes mecanismos efectores de la respuesta inmune antitumoral (Dunn et al., 2004). En este contexto, se ha postulado que la mayoría de los tumores se comportan como sitios inmunológicamente privilegiados, inhibiendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria (O'Connell y col, 2000).

Los mecanismos de evasión pueden ser pre-existentes o ser generados por el sistema inmune mismo a través de un mecanismo denominado "inmunoedición tumoral" (Dunn et al., 2004). La

inmunoedición es un proceso dinámico compuesto por tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Figura 3).

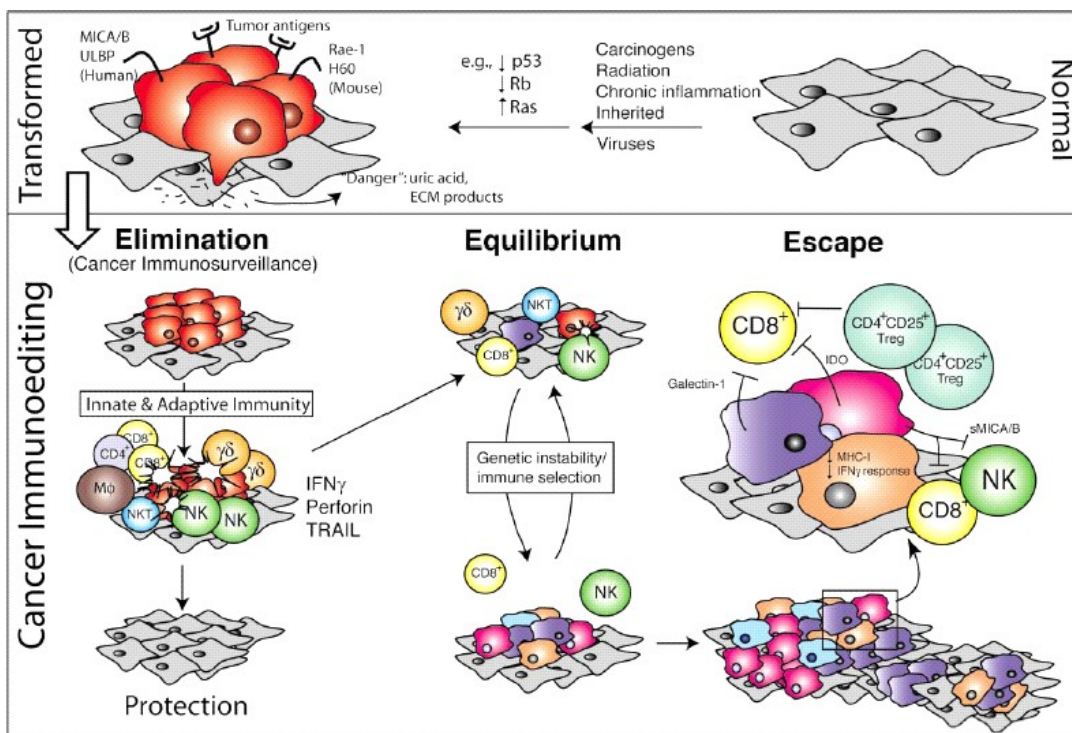


Figura 3: Las tres etapas del proceso de inmunoedición

La eliminación representa el concepto clásico de inmunovigilancia en donde células y moléculas de la respuesta inmune innata y adaptativa tratan de erradicar el tumor en desarrollo sin afectar al tejido sano circundante. Sin embargo, si este proceso no es exitoso, las células tumorales podrían alcanzar un estado de equilibrio donde podrían mantenerse en estado crónico o ser inmunológicamente “esculpidas” por células del sistema inmune que funcionarían como “editores” generando una población heterogénea de células tumorales. Algunas de estas variantes podrían evadir, finalmente, la respuesta inmune antitumoral por diversos mecanismos

de escape, fortaleciéndose y adquiriendo la capacidad de migrar e invadir nuevos tejidos (Dunn et al., 2004); Friedl y col., 2003). Estas evidencias reflejan que los tumores pueden ser “modelados” por el microambiente inmunológico que los rodea, generando a su vez supoblaciones tumorales más resistentes al ataque inmunológico que pueden evadir exitosamente la misma respuesta inmune que intenta destruirlos.

Uno de los principales mecanismos de contra-ataque identificados en los últimos años consiste en la expresión de FasL (CD95L) por parte de células tumorales, las cuales serían capaces de inducir la apoptosis de células inmunes que expresen el antígeno Fas (CD95) (O’Connel y col, 2000). Sin embargo, diversos estudios han cuestionado esta estrategia de contra-ataque, sugiriendo que la interacción Fas-FasL en el microambiente tumoral determina finalmente la generación de una respuesta pro-inflamatoria y antitumoral (Restifo, 2001).

Para reconciliar estos hallazgos, aparentemente contradictorios, se ha especulado que la generación de privilegio inmunológico en el microambiente tumoral se debería, no sólo a la expresión de FasL, sino a la presencia de diversos factores inmunosupresores y antiinflamatorios producidos por células tumorales o del estroma que actúan en forma colectiva para prevenir el desarrollo de una respuesta antitumoral efectora (O’Connel y col, 2001). Efectivamente, recientes estudios revelan la contribución de nuevos mediadores biológicos a estrategias de evasión y contra-ataque; entre ellos la expresión de la enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) (Uyttenhove et al., 2003) y de la molécula reguladora B7-H1 (Dong et al., 2002) por parte de células tumorales.

En su conjunto, estas evidencias sugieren que la identificación de nuevos mecanismos de escape tumoral y el bloqueo de señales inhibitorias en la interfase "TUMOR-SISTEMA INMUNE" son pilares básicos para el desarrollo de nuevas estrategias de inmunoterapia y vacunación.

GALECTINAS: PROTEÍNAS DE UNIÓN A CARBOHIDRATOS CON PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS

Las galectinas constituyen una familia de proteínas extremadamente conservadas a través de la evolución (Liu, 2000; Rabinovich, 1999). Durante los últimos años se ha involucrado a esta familia de lectinas en diversos procesos biológicos como reguladores de la homeostasis de la respuesta inmune (Rabinovich et al., 2000). Estas proteínas tienen la facultad de descifrar códigos glucídicos específicos en receptores situados en la superficie de diversos tipos celulares y en la matriz extracelular. A pesar de la similitud de secuencia y especificidad oligosacáridica, distintos miembros de la familia de galectinas poseen, aparentemente, efectos opuestos en la homeostasis del sistema inmune. Un ejemplo de este paradigma lo constituyen los efectos antagónicos entre galectina-1 (Gal-1) y galectina-3 (Gal-3). Mientras que Gal-3 se comporta como amplificador de la respuesta inflamatoria, Gal-1 regula negativamente el desarrollo de procesos inflamatorios. Independiente de sus funciones inmunomoduladoras se ha observado que Gal-1 participa en diferentes etapas de la cascada metastásica, sugiriendo un rol importante para esta proteína en la progresión y escape tumoral .

PROPIEDADES ANTI-INFLAMATORIAS E INMUNOSUPRESORAS DE GAL-1

Existen numerosas evidencias que adjudican a Gal-1 una función esencial en la homeostasis de la respuesta inmune e inflamatoria. Se ha demostrado que esta proteína inhibe la proliferación y expansión clonal de linfocitos T activados, mediante mecanismos que involucran bloqueo de la activación (Chung et al., 2000), arresto del ciclo celular (Blaser et al., 1998; Rabinovich et al., 1997) e inducción de apoptosis (Rabinovich et al., 1998). Gal-1 se expresa en sitios inmunológicamente privilegiados tales como placenta y testículo (Dettin et al., 2003; Iglesias et al., 1998; Rabinovich, 1999) y actúa sobre células T a través del reconocimiento específico de terminales oligosacáridicos (core 2-O-glicanos y N-glicanos) presentes en glucoproteínas de superficie como CD45, CD43 y CD7 (Pace y col, 1999).

Existe un gran número de enzimas (glucosiltransferasas) involucradas en la síntesis y elongación de core 2-O-glicanos y N-glicanos, cuyos niveles de expresión se hallan altamente regulados y que podrían influenciar la actividad pro-apoptótica e inmunosupresora de Gal-1 (Daniels et al., 2002; Lowe, 2001) (Figura 3). Efectivamente, se ha demostrado que la enzima

core 2-b-1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa (C2GnT), responsable de iniciar la ramificación de core 2 en O-glicanos, genera susceptibilidad a la apoptosis inducida por Gal-1 (Nguyen et al., 2001). Opuestamente se ha demostrado que la adición de ácido siálico en unión $\beta_2,6$ a CD45 por parte de la sialiltransferasa ST6Gal I previene la muerte celular inducida por esta proteína (Amano y col, 2003). De esta manera, la regulación temporal y espacial de la expresión y actividad de glucosiltransferasas podría modular la homeostasis de la respuesta inmune en condiciones fisiológicas y patológicas a través de la exposición de ligandos específicos para Gal-1.

Recientemente hemos demostrado, utilizando estrategias de terapia génica y proteica, que Gal-1 es capaz de suprimir la respuesta autoinmune e inflamatoria en modelos experimentales de artritis reumatoidea (Rabinovich y col, 1999a) y colitis autoinmune (Santucci et al., 2003) incrementando la susceptibilidad a la apoptosis de linfocitos T activados y polarizando la respuesta inflamatoria hacia un perfil TH2. Demostramos además que Gal-1 es capaz de regular la producción de óxido nítrico por macrófagos activados a través de la modulación de la actividad de las enzimas óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y arginasa y la producción de prostaglandinas (Correa y col, 2003; Rabinovich y col, 2000). El conjunto de estas evidencias experimentales sugiere que Gal-1 participaría activamente en el mantenimiento de la tolerancia y homeostasis inmunológica.

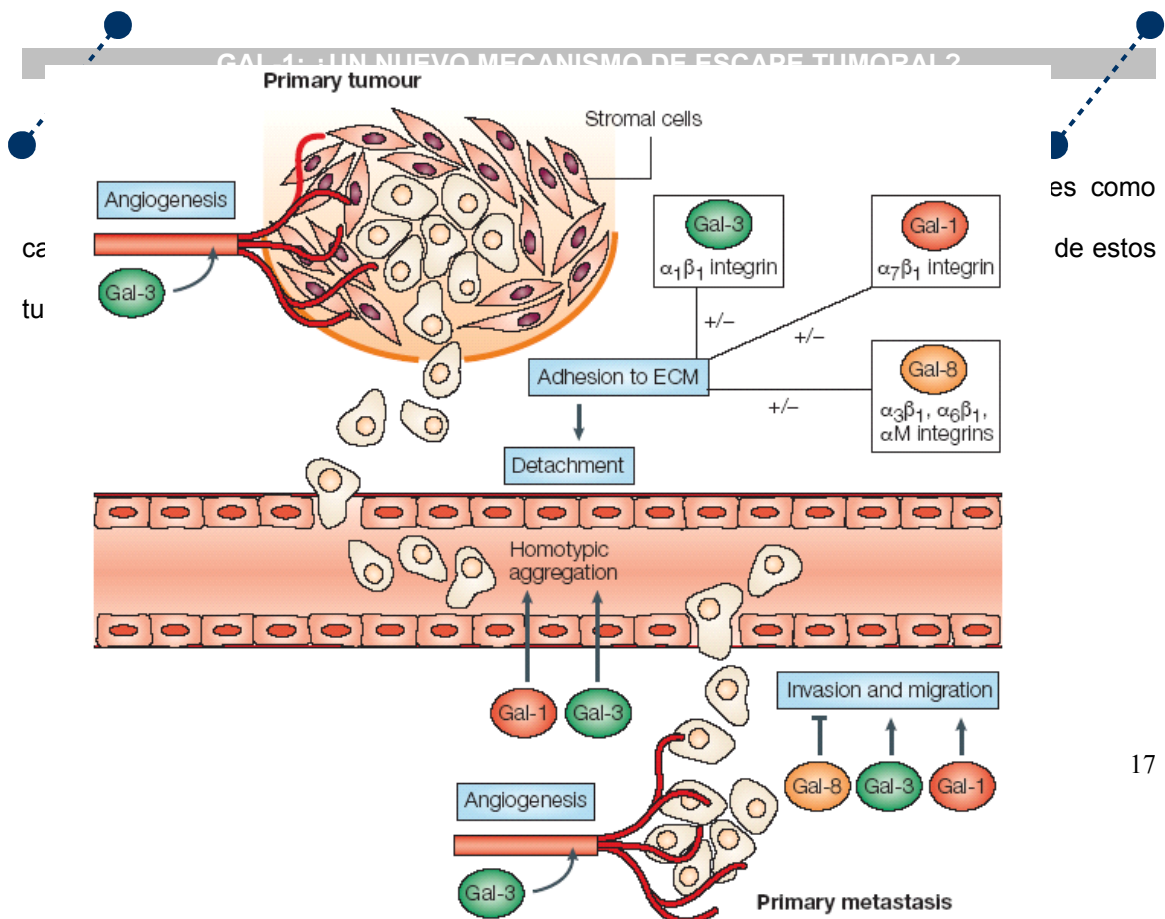


Figura 4: Galectinas y progresión tumoral.

PROGRESION TUMORAL: angiogénesis.

Para poder entender el crecimiento tumoral no podemos dejar de considerar los componentes del microambiente estromal como la vasculatura tumoral. Además de los cambios genéticos y epigenéticos que ocurren durante la transformación tumoral, se requieren otros pasos discretos que permiten la progresión y propagación tumoral: la inducción de la vasculatura tumoral denominado “**switch angiogénico**” (Berqers and Benjamin, 2003).

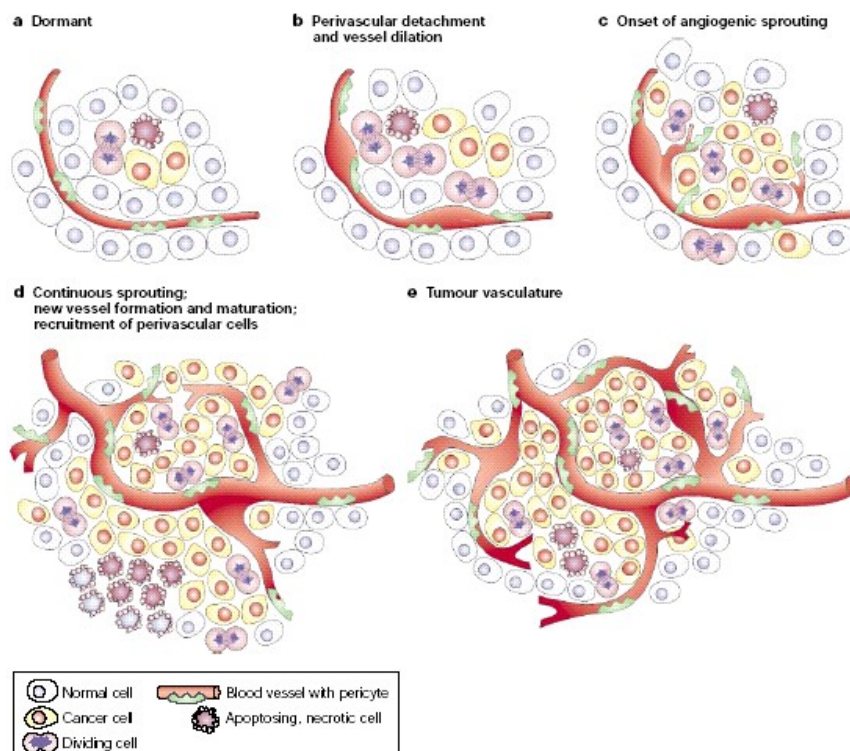


Figura 5: Clásico switch angiogénico

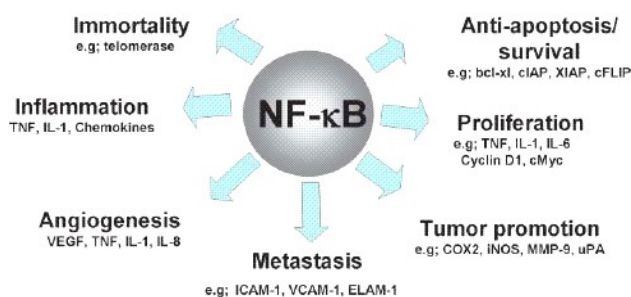
Al igual que en los tejidos normales, los tumores requieren suficiente provisión de oxígeno, metabolitos y un mecanismo efectivo de remoción de productos de desechos (Papetti and Herman, 2002). Estos requerimientos varían según el tipo de tumor e incluso va cambiando durante el curso de la progresión tumoral (Hlatky L, J Natl Cancer Inst, 94; 883-893; 2003). Pero ganar acceso al sistema vascular del huésped y generar sus propios vasos sanguíneos es un paso limitante en la progresión tumoral. La inducción del switch angiogénico, desde el bloqueo de la angiogénesis hasta su activación, depende de como se regule el balance de factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. La expresión de genes pro-angiogénicos se ve incrementada por estímulos fisiológicos tales como hipoxia, que resulta del aumento de la masa tumoral. Este cambio puede producirse en diferentes etapas de la progresión tumoral dependiendo del tipo de tumor y el microambiente en donde se este desarrollando. El hecho de que los tumores dependan del suministro de sangre ha inspirado a muchos investigadores en la búsqueda de mediadores anti-angiogénicos y en el diseño de estrategias que bloqueen estos mecanismos para el tratamiento contra el cáncer. Pero **¿cuál es la importancia del switch angiogénico durante la progresión del tumor y cómo es regulada?**

Durante la embriogénesis la vasculatura se forma de novo a partir de precursores de células endoteliales. Luego a partir de los vasos preexistentes se desarrollan ramificaciones, proceso denominado ANGIOGÉNESIS. Este proceso normal quiescente, donde le recambio de

vasos es casi inexistente, salvo casos como la menstruación o la reparación de heridas. Mientras que durante una angiogénesis patológica nos encontramos con un proceso siempre activo, vasos en constante crecimiento. De hecho los vasos tumorales son arquitectónicamente diferentes: irregulares, dilatados, complejos y usualmente poseen finales muertos. Generalmente la red vascular tumoral es porosa y hemorrágica, debido en parte a la ausencia o baja densidad de pericitos. El flujo sanguíneo suele ser irregular, lento y hasta fluctuante, generado capilares disfuncionales. En tejidos normales la densidad vascular está dinámicamente controlada por necesidades metabólicas en nutrientes y oxígeno. Por lo que las anormalidades funcionales y estructurales de los vasos tumorales reflejan la naturaleza patológica de su inducción. Entre los factores más estudiados que estimulan la angiogénesis se encuentra: el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), interleuquina-8 (IL-8), TGB- β , PD-EGF y angiopoietina-1 (ANG1).

Cabe destacar que el switch angiogénico también involucra la regulación negativa de la expresión de factores supresores de la angiogénesis como la trombospondina, angiostatina y endostatina, entre otros (Nyberg et al., 2005). En la actualidad se han desarrollado inhibidores de la angiogénesis considerando como blanco a la célula endotelial. Tomar como blanco células que promueven la progresión tumoral en vez de células tumorales es un desafío terapéutico relativamente nuevo en terapias oncológicas, y particularmente prometedor dado que estas células son relativamente estables genéticamente y por lo tanto son menos susceptibles a acumular mutaciones que les permitan desarrollar rápidamente resistencia a las drogas oncológicas (Kerbel and Folkman, 2002).

Para entender mejor la angiogénesis aberrante observada en los tejidos tumorales debemos explorar a los factores de transcripción que promueven la expresión de moléculas pro o anti-angiogénicas. Se han descripto varios factores que promueven este fenómeno, y entre los más relevantes nos encontramos con: el factor inducible por hipoxia- α (HIF- α) y el factor nuclear- κ B (NF- κ B). Ambos regulados por los niveles de presión de oxígeno tisular (Cummins and Taylor, 2005; Strieter, 2005).



HIPÓTESIS DE TRABAJO: La asociación entre la actividad inmunosupresora de Gal-1 y su expresión incrementada en tumores con alto potencial metastásico, sugirió que la secreción de esta proteína podría constituir un nuevo mecanismo de escape tumoral, favoreciendo el establecimiento de metástasis, a través de la eliminación por apoptosis de células T efectoras.

El desafío actual de nuestro trabajo es investigar la participación de Gal-1 como un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmune antitumoral y explorar las bases celulares y moleculares de esta nueva estrategia de "contra-ataque".

IV Antecedentes

A los fines de corroborar esta hipótesis, en primera instancia se procedió a investigar la expresión de Gal-1 en tres líneas celulares provenientes de melanoma humano (MEL-J y MEL-LES) previamente caracterizadas (Guerra et al., 1989; Kairiyama et al., 1995; Ledda et al., 1997). A través de ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal específico, se observaron altos niveles de Gal-1, en extractos proteicos totales o provenientes de medios condicionados generado por MEL-J y MEL-LES (**Figura I a y b, respectivamente**), y también en la superficie celular, mediante citometría de flujo (**Figura Ic**).

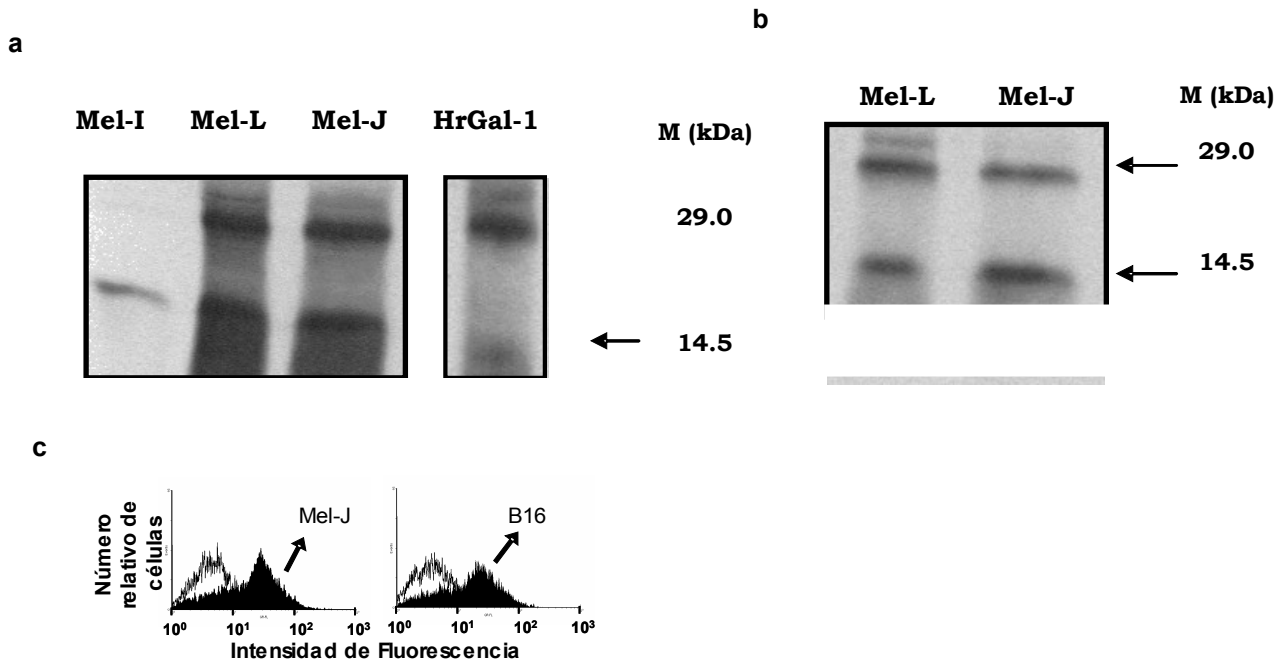


Figura I: (a y b) Presencia de Gal-1 en extractos proteicos de líneas celulares de melanoma. Utilizando la técnica de Western blot, se observan bandas de 14.5 y 29.0 kDa correspondientes al monómero y dímero de Gal-1 respectivamente. **(b)** Citometría de flujo: Porcentaje de células que expresan Gal-1 a nivel de la superficie celular. Citometría de flujo utilizando el anticuerpo policlonal anti-Gal-1 humana específico.

A los fines de confirmar su identidad, se procedió a la purificación, caracterización bioquímica y determinación de la secuencia aminoacídica de la proteína secretada por células de melanoma. Medios condicionados de MEL-J, MEL-LES y MEL-IAN fueron sometidos a una cromatografía de afinidad utilizando una columna de lactosil-Sepharosa, tal como se describió previamente. Para excluir la presencia de galectinas de mayor peso molecular, el eluido

cromatográfico fue sometido a una cromatografía de filtración molecular utilizando una columna Superosa 12 HR 10/30 (Pharmacia), adaptada a un sistema de FPLC. La secuencia aminoacídica se determinó luego de la digestión con tripsina y posterior separación de los péptidos por HPLC en fase reversa, de acuerdo al procedimiento previamente descrito (Rabinovich et al., 1999c). Se seleccionaron diversos péptidos incluido el DRC (criterio fundamental de identificación). El análisis en bancos de datos reveló un 98% de identidad entre Gal-1 secretada por melanoma y Gal-1 de placenta humana (**Figura II**).

Secuencia del DRC		Secuencia de Péptido A	
MEL-J Gal-1	DGGAWGTEQR	MEL-J Gal 1	FNAHDANTIVXN
Hr Gal-1	DGGAWGTEQR	Hr Gal-1	FNAHDANTIVCN
Secuencia de Péptido B		Secuencia del Péptido C	
MEL-J Gal-1	NLKPGECLR	MEL-J Gal-1	NLEAINY
Hr Gal-1	NLKPGECLR	Hr Gal-1	NLEAINY

Figura II: Secuencia aminoacídica de péptidos obtenidos por digestión triptica de Gal-1 purificada de medios condicionados generados por Mel-J. La comparación de secuencias reveló un 98% de homología con Gal-1 recombinante de placenta humana (Hr Gal-1).

A los fines de determinar si Gal-1 participa activamente en la inmunosupresión inducida por células de melanoma, se evaluó la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en respuesta a un mitógeno (PHA) y en presencia de: a) medio condicionado completo (MCC) de líneas de melanoma; b) MCC depletado de Gal-1 (utilizando el anticuerpo anti-Gal-1 o el inhibidor tiodigalactósido TDG). Se observó 62% y 55% de supresión de la respuesta proliferativa luego de cultivar CMSP en presencia de MCC correspondiente a MEL-J y MEL-LES, respectivamente (**Figura III**). El bloqueo de Gal-1 mediante su anticuerpo o TDG fue capaz de restaurar la respuesta linfoproliferativa en un 45% y 42%, respectivamente ($p=0.0373$ y $p=0.0482$; Ex vs MCC).

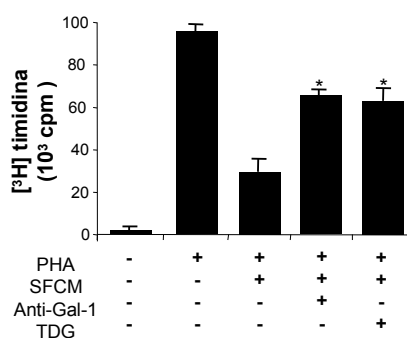


Figura III: Células mononucleares de sangre periférica fueron cultivadas durante 72 hs con PHA en presencia de los estímulos indicados en la figura y la proliferación celular fue evaluada por incorporación de timidina tritiada. Los datos representan la media (cpm \pm DS) de datos por triplicado (* $p < 0,001$ *t de Student* Vs SFCM)

A los fines de explorar el mecanismo molecular responsable de dicha inmunosupresión, se procedió a una estrategia experimental similar, incubando CMSP en presencia de: a) MCC, b) MCC con Gal-1 bloqueada en las diferentes líneas. Luego de 18 hs de cultivo las células fueron procesadas para estudiar apoptosis a través de ensayos de hipodiploidía y tinción con anexina-V. Como lo refleja la **Figura IV**, CMSP cultivadas en presencia de MCC de MEL-J y MEL-LES mostraron un incremento de 75,2 % y 72,6% de núcleos hipodiploides, mediante la tinción con ioduro de propidio. El agregado del disacárido específico TDG fue capaz de revertir este porcentaje de apoptosis a 28,0% y 26,2% respectivamente.

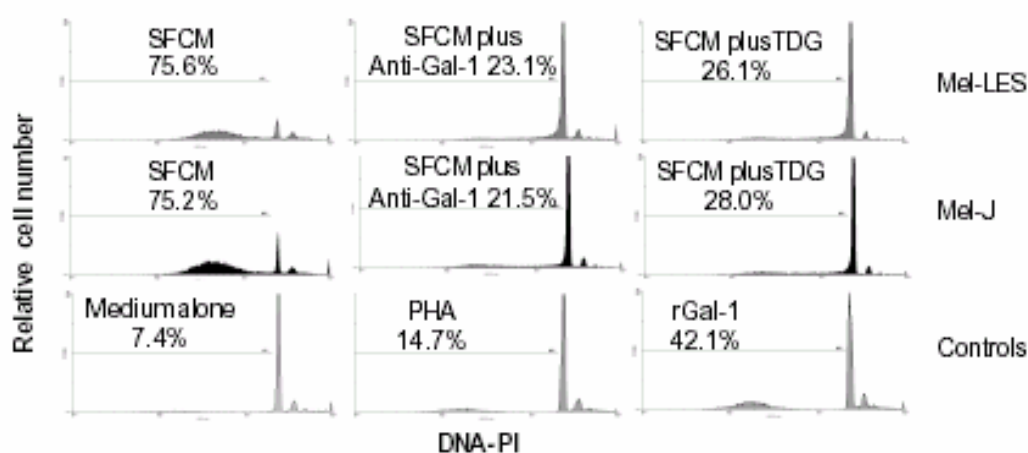


Figura IV: Determinación de hipodiploidía de CMSP por tinción de núcleos con ioduro de propidio. Gal-1: 4 μ g/ml de proteína recombinante. (Controles: CMSP incubadas con PHA como

único estímulo y CMSP sin estimular con PHA (Negativo) La figura describe un experimento representativo de tres.

Estos valores fueron similares a los obtenidos al incubar CMSP con Gal-1 recombinante (4 µg/ml). Los controles consistieron en CMSP incubada en ausencia de estímulos (7,1% de células apoptóticas) y en presencia de PHA (14,9% de células apoptóticas). Los valores de hipodiploidía observados fueron similares a aquellos obtenidos por tinción con anexina-V (marcador de apoptosis temprana) (**Figura V**).

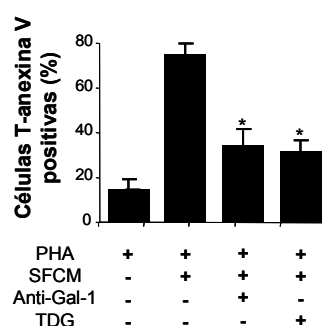
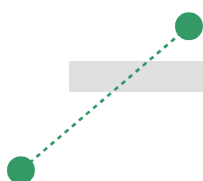
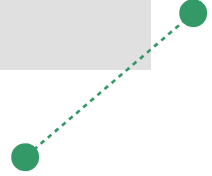


Figura V: Células mononucleares de sangre periférica fueron activadas con PHA por 72 hs y luego cultivadas por 18 hs con SFCM de Mel-J en ausencia o presencia del anticuerpo neutralizante anti-Gal-1 (10 µg/ml) o 30 mM de TDG. Los controles positivos para apoptosis fueron analizadas en paralelo incubando células T activadas con dosis crecientes de rGal-1. La apoptosis fue evaluada por marcación positiva usando FITC-anexina V y PE-anti-CD3 (* $p < 0,001$ *t de Student Vs SFCM*).

☞ **Este resultado permite concluir que Gal-1 contribuye significativamente a la actividad supresora desplegada por sobrenadantes de melanomas humanos.**



A partir de los antecedentes presentados surge la siguiente tesis que se plantea como **objetivo general** dilucidar la participación de Gal-1 en diferentes etapas de la progresión tumoral in vitro e in vivo, tales como: evasión de la respuesta inmune antitumoral, angiogénesis y metástasis.



CAPTÍTULO 1

GALECTINA-1 UN NUEVO MECANISMO DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL

Palabras claves: galectina-1, apoptosis, escape tumoral, inmunosupresión, inmunovigilancia y melanoma.

V CAPITULO 1: Galectina-1 un nuevo mediador en la evasión de la respuesta inmune anti-tumoral.

Una de las mayores paradojas de la biología tumoral consiste en entender como es posible el crecimiento de tumores antigénicos y establecimiento de metástasis a pesar de la existencia de una respuesta inmune potente (Pardoll, 2002; Smyth et al., 2001). Recientes avances hacia el mejoramiento del entendimiento de las interacciones entre la célula tumoral y el sistema inmune del hospedador ha permitido detectar que las células tumorales desarrollan múltiples estrategias para evadir el ataque del sistema inmune (Igney and Krammer, 2002; Marincola et al., 2000; Uyttenhove et al., 2003)Trapani 2002). Los mecanismos de evasión pueden ser inclusive preexistentes, comenzar a partir del surgimiento de nuevas células mutantes o ser generados durante acciones inmunológicas como edición tumoral de acuerdo a la nueva hipótesis propuesta “*cancer immunoediting*” (Dunn et al., 2002).

La actividad inmunosupresora de Galectina-1 (Gal-1) y su expresión incrementada en tumores con alto potencial metastásico, nos sugirieron la idea de que **la secreción de esta proteína podría constituir un nuevo mecanismo de escape tumoral, impidiendo el desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral efectiva favoreciendo una imponente progresión tumoral**. Previamente hemos demostrado mediante ensayos *in vitro*, utilizando estrategias bioquímicas e inmunológicas, que Gal-1 es uno de los principales factores inmunosupresores secretados por células de melanoma humano. Para explorar *in vivo* la capacidad de Gal-1 de contribuir a un ambiente inmunosupresor generado por células tumorales seleccionamos el modelo experimental de melanoma murino originado por la línea B16F0 (B16) en ratones singeneicos C57Bl/6 (B6).

El primer objetivo de la presente tesis doctoral fue investigar mediante una estrategia de terapia génica antisentido la posibilidad de que células tumorales secreten Gal-1 con el fin de debilitar la respuesta inmune antitumoral generada promoviendo una progresión tumoral exitosa.

Células de melanoma murino expresan Galectina-1

El primer paso consistió en evaluar la expresión y secreción de Gal-1 en extractos proteicos de células totales o de medios condicionados generados por la línea B16 en cultivo. Mediante ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal específico detectamos altos niveles de Gal-1 en esta línea (**Figura 1a**), tanto a nivel proteico total cómo en las proteínas secretadas (**Figura 1b**). Mediante la técnica de confocal pudimos detectar la presencia de Gal-1 principalmente en la zona perinuclear, así como también en citoplasma y membrana plasmática (**Figura 1c**).

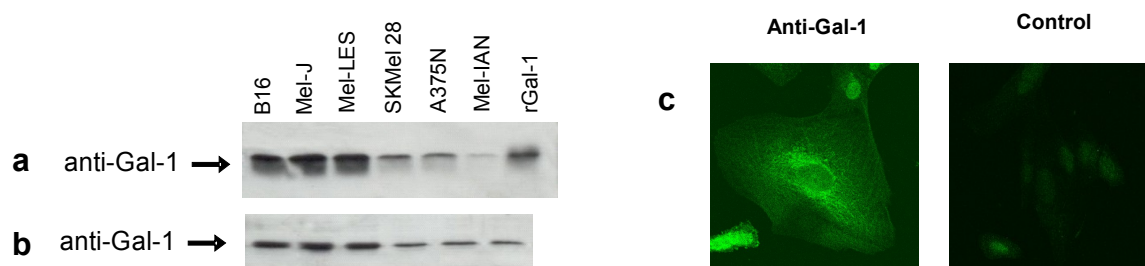


Figura 1: Expresión y secreción de Gal-1 en la línea de melanoma B16. (a y b) Ensayo de Western blot, en donde se sembraron 15 μ g de proteína en cada pocillo, Gal-1 (14.5 kD) fue reconocida por el anticuerpo policlonal específico y revelado por la técnica de quimioluminiscencia. **(c)** Inmunofluorescencia indirecta y microscopía de confocal de una célula de B16 (la barra de escala representa 70 μ m)

Para investigar la participación de Gal-1 en el escape tumoral, decidimos bloquear la expresión de esta proteína inmunosupresora y explorar la progresión tumoral en un modelo *in vivo*. Disminuir la expresión de Gal-1 bloqueando su mRNA a través de una estrategia antisentido nos permitió evaluar la relevancia de esta proteína en la interfase respuesta inmune-tumor. Para ello exploramos el crecimiento tumoral *in vivo* y la respuesta inmune generada durante la progresión tumoral frente a la ausencia de Gal-1 y del sistema inmune.

Generación de células de melanoma sin Gal-1

Con el objetivo de inhibir la expresión de Gal-1 *in vivo* desarrollamos una estrategia de terapia génica antisentido. A partir del vector pcDNA3.1 (Invitrogen) que contenía el cDNA completo de Gal-1 en su orientación sentido (Rabinovich et al., 1999b), subclonamos el cDNA en orientación antisentido dentro del vector pcDNA6 (Invitrogen). Para subclonar la secuencia de interés, cortamos el plásmidos con dos enzimas de restricción (BamH1 y EcoRV) que nos permitieron extraer la secuencia de cDNA completa y re-insertarla en el plásmido pcDNA6 en su orientación antisentido. Para analizar si la construcción era correcta transformamos bacterias competentes DH5 α y las crecimos en un medio selectivo (LB y ampicilina). Purificamos el vector utilizando preparaciones de ADN plasmídico a baja escala ("mini-prep") y procedimos a la digestión con las enzimas específicas. Analizamos posteriormente el producto de digestión en un gel de agarosa al 1% para comprobar los tamaños de los segmentos obtenidos según la orientación antisentido del inserto. En paralelo transformamos bacterias con el vector control, purificamos y llevamos a cabo el mismo protocolo. La **Figura 2** ilustra el vector antisentido pCDNA6-Lag-1 obtenido a partir del procedimiento de clonado y el gel de agarosa correspondiente demostrando los tamaños de vector e inserto. A través de la secuenciación del segmento deseado pudimos confirmar que la construcción era correcta y estaba completa (ver anexo 1).



Figura 2: (a) Mapa de pcDNA6 conteniendo la secuencia completa del cDNA de Gal-1 en su orientación antisentido. (b) Gel de agarosa, la flecha indica el inserto que demuestra la correcta orientación del inserto.

Una vez seleccionadas las bacterias resistentes a ampicilina que contenían el inserto antisentido (pcDNA6-Lag-1 ó pLag-1) o el vector control (pcDNA6 ó p6), las expandimos en medio LB y purificamos el plásmido a través de una preparación a mediana escala (Midi-prep). A continuación, transfectamos en forma estable células de melanoma B16/F0 con el vector pcDNA6 conteniendo el cDNA de Gal-1 en orientación antisentido (*pcDNA6-Lag-1*). Como control transfectamos B16 con el vector vacío (pcDNA6). Para ello utilizamos la técnica de transfección con liposomas combinando nuestras construcciones plasmídicas con el reactivo Lipofectamina® 2000 (Invitrogen). La obtención de células transfectadas se hizo por selección positiva utilizando la resistencia al antibiótico Blastidina (5 µg/ml) contenida en la construcción plasmídica.

A través de la técnica de Western blot evaluamos los niveles de expresión de Gal-1 en las células que fueron transfectadas con la construcción antisentido. Nuevamente preparamos extractos proteicos de extractos celulares totales o de los medios condicionados generados por las células en cultivo. Observamos una disminución sutil en la secreción de Gal-1 en aquellos sobrenadantes provenientes de células transfectadas con pCDNA6-Lag-1 respecto al control (**Figura 3**).

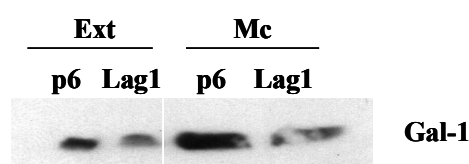


Figura 3: Western blot de extractos totales y proteínas extraídas de medios condicionados de células transfectadas con vector antisentido (pLag-1) o el control (p6).

La transfección con plásmidos y lipofectamina da lugar a una población heterogénea en donde algunas células pueden recibir mayor cantidad de plásmido que otras o la inserción de la construcción deseada puede ocurrir bajo promotores de distinta intensidad de transcripción. Para evitar falsas conclusiones debido a la presencia de compensación de efectos debida a diferentes concentraciones de expresión de nuestra proteína en los ensayos, decidimos generar poblaciones homogéneas a través de la técnica de dilución límite. Finalmente, a través

de ensayos de Western blot determinamos la presencia de 12 clones diferentes de células de melanoma transfectadas con pcDNA6-Lag-1 que expresaron y secretaron niveles marcadamente menores de Gal-1, respecto a células B16/F0 transfectadas con el vector control, pcDNA6 (**Figura 4**).

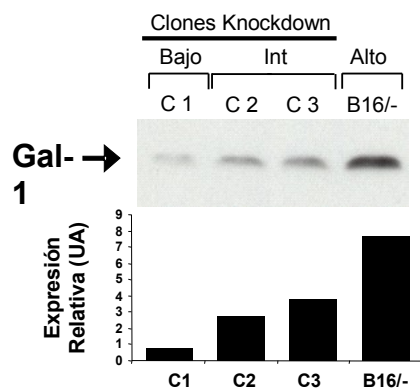


Figura 4: Western blot y análisis densitométrico de SFCM (15 μ g) de extractos proteicos provenientes de los clones knockdown pLag-1 y de B16/- utilizando un anticuerpo policlonal anti-Gal-1.

Galectina-1 contribuye significativamente al ambiente inmunosupresor inducido por medios condicionados de células de melanoma

Antes de inocular en ratones singéneos los clones de melanoma obtenidos, decidimos explorar *in vitro* si la capacidad inmunosupresora de estas células se veía reducida frente a la ausencia de Gal-1. Dado que la principal actividad de nuestra proteína de estudio es su capacidad de inducir apoptosis en linfocitos T activados, para evaluar el efecto de la disminución de Gal-1 a nivel funcional, células mononucleares de bazo (CMB) de ratón activados con Concanavalina A (5 μ g/ml) fueron cultivadas con los sobrenadantes generados en cultivo por las células transfectadas con ambas construcciones. Estos medios se obtuvieron a partir de cultivos semi-confluentes en medio DMEM sin suero durante 18 hs. Los niveles de apoptosis fueron analizados luego de la tinción de CMB con Anexina-V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC). La anexina-V posee la capacidad de unirse a residuos de fosfatidil-serina expuestos en la zona externa de la membrana plasmática desde etapas tempranas de la apoptosis. Luego de 18 hs pudimos observar una disminución significativa del

número de células apoptóticas (células anexina-V-FITC positivas) en linfocitos sometidos a la acción de medios condicionados provenientes de células B16 transfectadas con el vector antisentido Lag-1 (C1: 39%; C2: 36%; C3: 40%), respecto a linfocitos sometidos a la acción de medios condicionados provenientes del vector control (69%) (**Figura 5**).

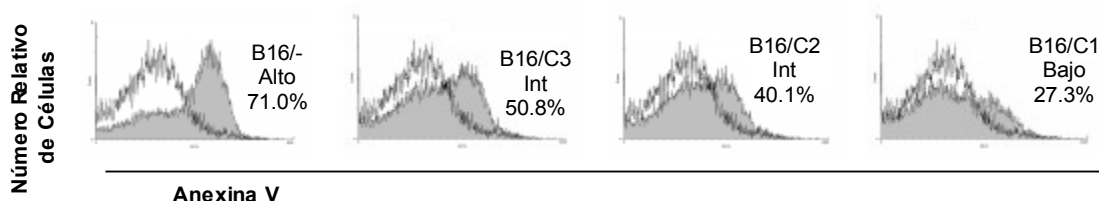


Figura 5: Esplenocitos de ratones C57/BL6 fueron activados con ConA por 72 hs y luego cultivadas durante 18 hs con SFCM colectados de células control B16/- o clones knockdown expresando bajas niveles (C1), intermedios (C2) o altos (C3) de Gal-1. En ensayo de apoptosis fue realizado por marcación doble con FITC-anexina V y PE-anti-CD3 Ac. Los histogramas muestran porcentajes de la proporción de células anexina V positivas y es representativo de tres experimentos independientes ($p < 0,01$ B16/C1 Vs B16/-; $p < 0,05$ B16/C2 ó B16/C3 vs B16/-, *test de t de Student*)

☛ **Estos resultados nos demuestran que tanto las células de melanoma murino como humano secretan Gal-1 funcionalmente activa, quien contribuye significativamente a la capacidad inmunosupresora y pro-apoptótica in vitro de las células tumorales.**

La inhibición génica de Gal-1 promueve el rechazo tumoral en un modelo in vivo

Con el objetivo de demostrar nuestra hipótesis *in vivo*, seleccionamos tres clones de B16 transfectadas con la construcción antisentido: uno de baja expresión (C1) y dos de expresión intermedia de Gal-1 (C2 y C3). Los clones Lag-1 (C1-3) y las células control (B16/-) fueron inoculadas (2×10^5 células/inóculo) en forma subcutánea en el flanco lateral de ratones singéneos de la cepa C57BL/6. Evaluamos el crecimiento tumoral día por medio, por un período equivalente a 45 días post-inoculación, utilizando un calibre automático. Las células transfectadas con el vector control crecieron rápidamente al igual que las células de melanoma no transfectadas y los ratones debieron ser sacrificados para evitar su sufrimiento entre los días

21 y 25 momento en el cual los tumores alcanzaron un diámetro cercano a los 2 cm³, conforme a lo establecido en las pautas bioéticas del trabajo con animales de experimentación. Sin embargo, los ratones inoculados con los clones de baja o intermedia expresión de Gal-1 mostraron una reducción significativa en la tasa de crecimiento tumoral. Especialmente el C1, 2 de 27 ratones generaron tumor palpable alrededor del día 34 posterior a la inoculación tumoral.

En resumen, observamos una marcada inhibición del crecimiento tumoral en aquellos grupos de animales que recibieron células transfectadas con el vector pcDNA6-Lag-1, respecto a ratones que recibieron células transfectadas con el vector pcDNA6 control. La reducción del crecimiento tumoral fue proporcional a los niveles de expresión de esta proteína por cada uno de los clones utilizados (**Figura 6a**). Los resultados presentados son representativos de tres experimentos.

La evaluación estadística de la tasa de crecimiento tumoral fue realizada con el test de Kaplan Mayer que nos permitió evaluar diferencias significativas entre grupos estableciendo como “ratón libre de tumor” cuando el volumen tumoral detectado era menor a 0.5 cm³ (**Figura 6b**).

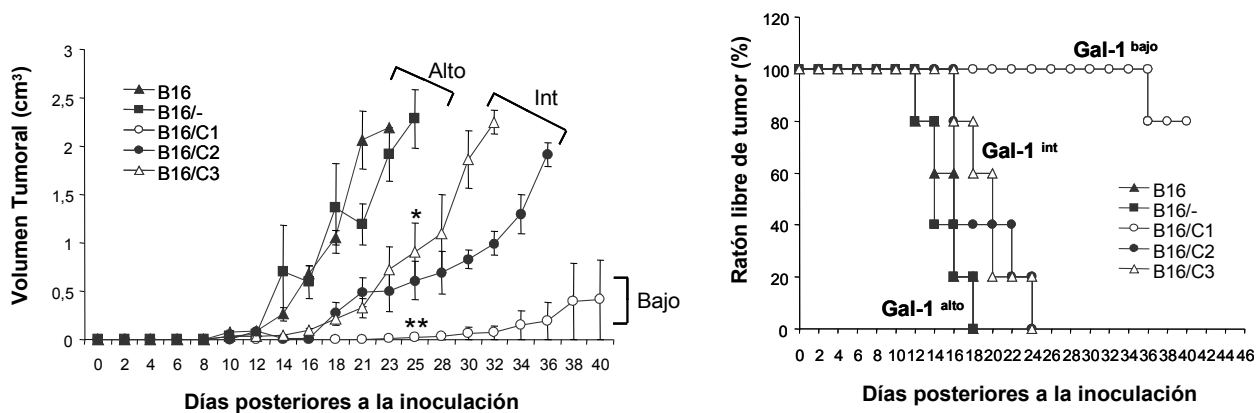


Figura 6: Ratones C57/BL6 fueron inoculados sc con 2×10^5 células de B16 (□), B16/- control (■), B16/C1 (○), B16/C2 (●) o B16/C3 (▽). **(a)** El crecimiento tumoral fue monitoreado cada dos días (** $p < 0,001$ B16/C1 vs B16/-; * $p < 0,01$ B16/C2 y C3 vs B16/- test *t de Student* 25 días después de la inoculación). Los datos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. **(b)** Análisis de Kaplan Meier de los ratones desafiados con B16/- o los transfectantes knockdown ($p < 0,001$ B16/C1 vs B16/-; $p < 0,05$ B16/C2 y C3 vs B16/-).

A los fines de investigar si el efecto anti-tumoral observado era debido a una inhibición de la tasa de crecimiento tumoral *in vitro*, se cultivaron en forma individual en placas de 24

pacillos los diferentes clones que recibieron el vector Lag-1 antisentido y células de melanoma que recibieron el vector control (1 ó 2 x 10⁴ células/ml). La tasa de proliferación de células tumorales *in vitro* fue evaluada a diferentes periodos de tiempo por un método colorimétrico (MTT). En la **Figura 7** podemos observar que tanto las células transfectadas con el vector control como aquellas transfectadas con la construcción antisentido crecen con la misma tasa antes o después de la fase logarítmica de crecimiento. Este resultado sugiere que la introducción del vector antisentido no afecta la tasa de crecimiento y proliferación de células de melanoma.

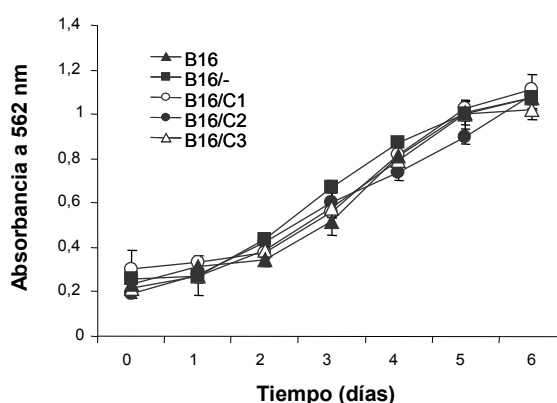


Figura 7: Crecimiento *in vitro* de las B16 parentales, control (B16/-) o transfectantes knockdown (B16/C1, C2 y C3) utilizando el test de MTT.

☞ ***Estos resultados demuestran que la ausencia de Gal-1 líneas malignas promueve el rechazo tumoral *in vivo*.***

Células tumorales sin Gal-1 son eliminadas por células CD4⁺ y CD8⁺ positivas.

Estos resultados demuestran que la inhibición génica de la expresión de Gal-1 genera tumores susceptibles en ratones inmunocompetentes e indica una correlación entre los niveles de expresión de Gal-1 y la agresividad tumoral. Por otro lado sugieren que la inhibición de Gal-1 en células de melanoma mediante estrategias antisentido resulta en un incremento del rechazo del tumor e incremento en la supervivencia de los animales inoculados. Si asociamos estos resultados con aquellas observaciones generadas *in vitro*, podríamos sugerir que Gal-1

es secretada por células de melanoma a los fines de inducir apoptosis de células T efectoras, eludiendo de esta manera la vigilancia inmunológica y favoreciendo el crecimiento y progresión del tumor.

Para investigar si células T efectoras eran capaces de infiltrar el tumor y promover su destrucción y a los fines de explorar el impacto del bloqueo de Gal-1 sobre la inducción de apoptosis local, realizamos análisis histopatológicos y TUNEL sobre cortes de tumor (B16/- y B16/C1) embebidos en parafina. Diez días posteriores al desafío la mayoría de las células mononucleares mostraron morfología apoptótica (4-7 células TUNEL positivas / por campo, 40X) en aquellos ratones inoculados con B16/-, en comparación con ratones inoculados con B16/C1 (0-1 células TUNEL positivas/ por campo) (**Figura 8**). Cabe destacar también que el bloqueo de Gal-1 condujo a la destrucción de las células tumorales, fenómeno que fue acompañado por una extensa liberación de melanina en los sitios de inyección de B16/C1, mientras que la integridad de los tumores B16/- se encontraba intacta. Estos resultados nos permiten asociar el bloqueo de Gal-1 con la destrucción del tumor, fenómeno que fue acompañado de un importante infiltrado mononuclear, sugiriendo de esta manera un incremento en las señales de activación y reclutamiento de células del sistema inmune en el microambiente tumoral.

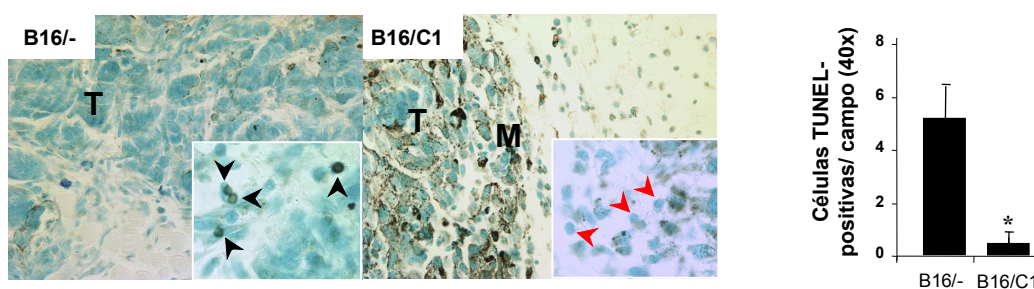


Figura 8: Determinación del infiltrado mononuclear peritumoral y análisis histopatológico de tumores en ratones inoculados con B16/- o B16/C1. Los niveles de apoptosis del infiltrado mononuclear fueron evaluados a través de la técnica de TUNEL en cortes histológicos. (Magnificación: 40X, insertos: 100X). Se analizó el número de células mononucleares apoptóticas (mean ± S.D.) por campo (40X) (*P<0.05 B16/C1 vs B16/-; χ^2). Los insertos muestran células apoptóticas (flecha negra) o viables (flechas rojas) en campos representativos.

Con el fin de asociar el rechazo tumoral observado a la generación de una respuesta inmune antitumoral potenciada y con el objetivo de identificar las subpoblaciones involucradas en el fenómeno de escape tumoral, desafiamos ratones inmunosuprimidos con el C1 y evaluamos su crecimiento frente a un sistema inmunodeficiente. Para ello generamos ratones deficientes en diferentes subpoblaciones celulares inmunes ($CD4^+$, $CD8^+$ y $NK1.1^+$) utilizando anticuerpos monoclonales específicos purificados a partir de ascitis generadas en ratones *nude*. Eliminamos *in vivo* las diferentes subpoblaciones inoculando los diferentes anticuerpos en ratones C57BL/6 en forma intraperitoneal (ip) a partir del día -2 de la inoculación tumoral, que se consideró día 0. Luego de inocular las células tumorales (2×10^5 células/100 μ l) continuamos aplicando anticuerpos ip. día por medio. Como control se inocularon ratones con IgG no relevante. Para evaluar la subpoblación responsable de la disminución de crecimiento observada frente a la ausencia de Gal-1 eliminamos por separado linfocitos T $CD4^+$, T $CD8^+$, $NK1.1^+$ o la combinación de linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+$.

En la **Figura 9a**, podemos observar que la eliminación de la subpoblación $CD4^+$ ó $CD8^+$ restituye parcialmente la capacidad de C1 de crecer. Notoriamente, la eliminación en simultáneo de ambas subpoblaciones ($CD4^+$ y $CD8^+$) restituye completamente la capacidad de C1 de crecer *in vivo* comparado con el tumor transfectado con el vector control. Por otro lado, frente a la eliminación de la subpoblación de células NK no se observa restitución del crecimiento tumoral al igual que en el grupo de ratones inoculados con el anticuerpo IgG control. Nuevamente, la evaluación estadística de la tasa de crecimiento tumoral fue realizada mediante el test de Kaplan Mayer, que nos permitió evaluar diferencias significativas entre grupos estableciendo como “ratón libre de tumor” cuando el volumen tumoral detectado era menor a 0.5 cm^3 (**Figura 9b**).

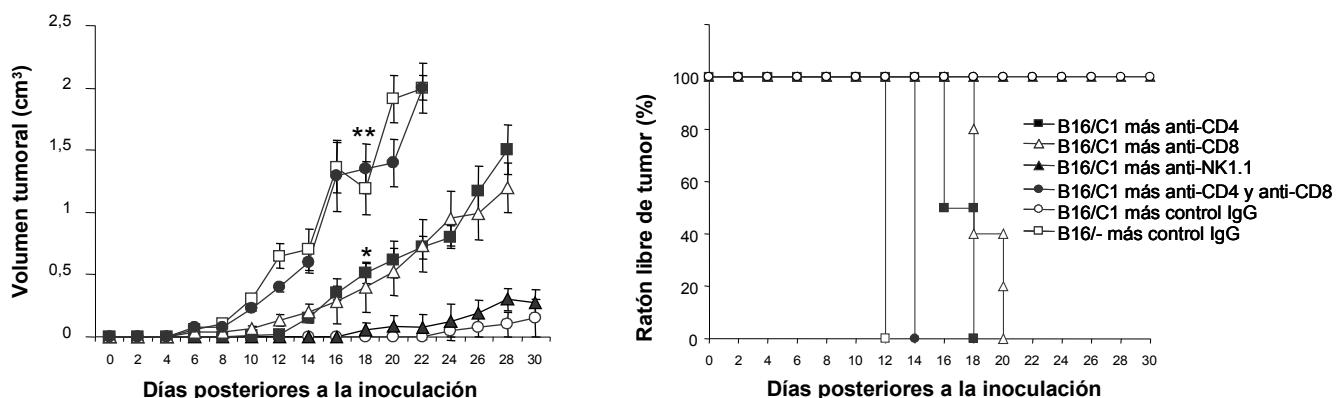


Figura 9: a y b, crecimiento tumoral de C1 luego de la depleción del sistema inmune con anticuerpos monoclonales. El rechazo tumoral inducido por el bloqueo de Gal-1 requiere la participación de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+. (A) La eliminación selectiva de subpoblaciones linfocitarias fue realizada a través de la utilización de anticuerpos monoclonales específicos para células CD4+ (■), CD8+ (△) y NK1.1. (□) (0.2 mg/ ratón) en los días -1, 1, 8, 15, y 22 con respecto a la inoculación de las células tumorales. Los ratones control recibieron la misma cantidad de IgG control (**P<0.001 eliminación de CD4 + CD8 vs B16/C1 control IgG, *P<0.01 eliminación de CD4 o CD8 vs B16/C1 IgG control; t de Student al día 18 post-inoculación); (B) Análisis de Kaplan-Meier de los ratones desafiados con B16/C1 en ratones tratados con anticuerpos monoclonales. (P<0.001 eliminación de CD4 y CD8 vs B16/C1 IgG control; P<0.05 eliminación de CD4 ó CD8 vs B16/C1 IgG control).

✿ ***La eliminación selectiva de estas poblaciones linfocitarias in vivo utilizando anticuerpos monoclonales específicos anti-CD4+ y anti-CD8+ confirmó la susceptibilidad de estas poblaciones a Gal-1 y su protagonismo como un nuevo mecanismo de escape tumoral.***

La disminución de Gal-1 en el tumor permite la generación de una respuesta inmune polarizada hacia un fenotipo Th1

El siguiente paso consistió en explorar más en detalle la identidad de la respuesta inmune generada frente al desafío tumoral. Las funciones inmunorregulatorias de Gal-1 y su capacidad para polarizar la respuesta inmune hacia un fenotipo Th2 nos impulsó a investigar si la resistencia al desafío tumoral inducida por la disminución de la expresión de Gal-1 podría estar asociada a un resurgimiento o a un aumento de la respuesta antitumoral de tipo Th1.

Para ello inoculamos en forma subcutánea (sc) ratones C57BL/6 con C1 ó B16/-, y al cabo de dos semanas extirpamos los ganglios linfáticos drenantes y distantes al tumor. Por disgregación mecánica extrajimos los linfocitos reclutados en los ganglios debido a la presencia de un estímulo tumoral y examinamos *ex vivo* la proliferación de células T específicas y la producción de citoquinas de tipo T1 y T2. La re-estimulación fue realizada *ex vivo* células B16/- previamente tratadas con mitomicina C. Como control de re-estimulación utilizamos otra línea singeneica no relacionada, el timoma murino EL-4.

Consistente con el rol previamente descrito para Gal-1 como un factor inmunosupresor, pudimos determinar que C1 fue más eficiente que B16/- en estimular una respuesta efectiva mediada por células T, cómo se ve reflejado en la **Figura 10a** dado por un aumento significativo en la proliferación de linfocitos. Cabe destacar que este fenómeno fue observado únicamente frente a la estimulación de células provenientes de los ganglios linfáticos drenantes de tumor, mientras que no pudimos detectar cambios significativos en la proliferación de linfocitos provenientes de los ganglios lejanos a la inoculación tumoral o cuando el estímulo *ex vivo* era mediado por EL-4. Esto estaría indicando el fortalecimiento de una respuesta inmune específica y localizada.

Para evaluar el perfil de citoquinas realizamos el mismo experimento. Pudimos observar que las células de ganglios provenientes de ratones inoculados con B16/- produjeron bajos niveles de IFN- γ (\cong 700 pg/ml), mientras que los niveles de IFN- γ generados por los ganglios de ratones inoculados con B16/C1 fueron significativamente mayores (>8000 pg/ml) (**Figura 10c**). Este efecto fue acompañado por un incremento en la proliferación linfocitaria específica y por la secreción de IL-2 por parte en ganglios drenantes provenientes de ratones inoculados con B16/C1 comparado con los niveles obtenidos por inoculación con B16/- (**Figura 10a y b, respectivamente**). No se encontraron diferencias en los niveles de las citoquinas IL-4 e IL-5, citoquinas de tipo T2 (**Figura 10d y e**). Por otro lado, no observamos modificaciones en los niveles de citoquinas liberadas o en los porcentajes de proliferación linfocitaria cuando las células de ganglio fueron re-estimuladas *ex vivo* con una línea singeneica perteneciente a un timoma murino (EL-4) (**Figura 10**), sugiriendo, nuevamente, que la respuesta anti-tumoral observada es específica para el melanoma B16.

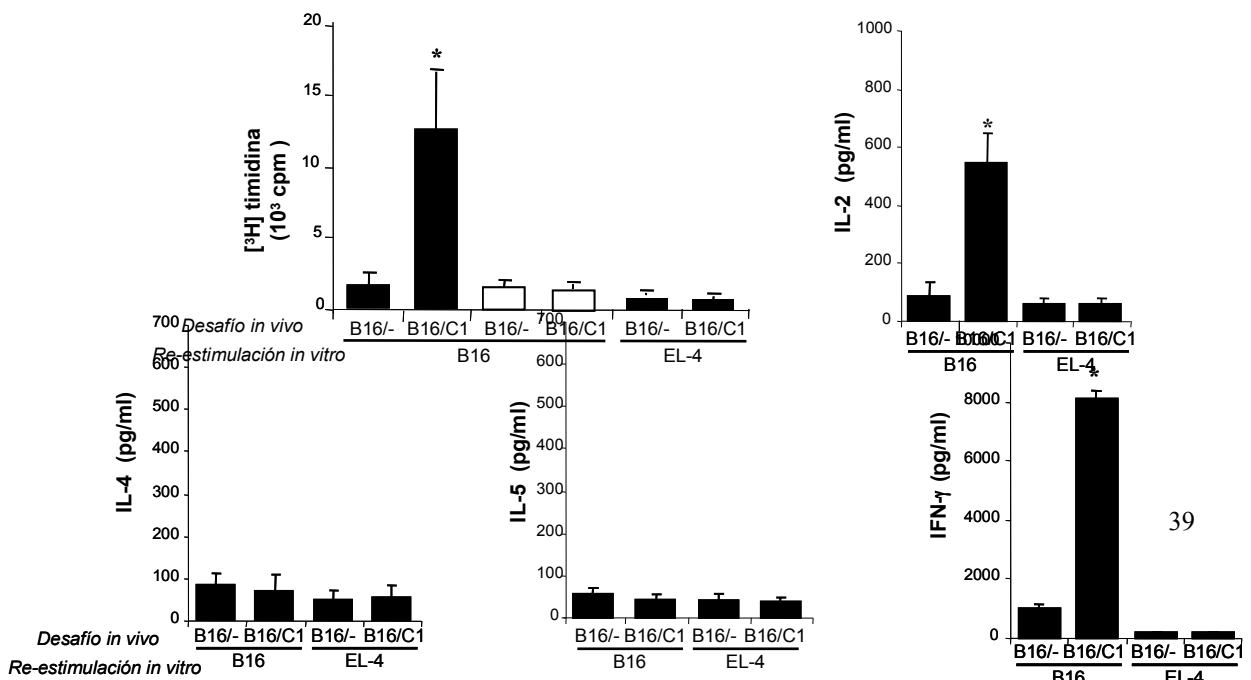


Figura 10: El bloqueo de Gal-1 *in vivo* permite la generación de una respuesta inmune anti-tumoral específica mediadas por citoquinas de tipo T1. Dos semanas posteriores al desafío tumoral (B16/C1 ó B16/-), se extirparon los ganglios drenantes (barras negras) o distales (barras blancas). Los linfocitos purificados de los ganglios fueron re-estimulados *ex vivo* con células B16 ó EL-4 tratadas con mitomicina C y luego analizados a los fines de evaluar: (A) proliferación de células T a través de incorporación de timidina tritiada y producción de citoquinas: (B) IFN- γ ; (C) IL-2, (D) IL-4, (E) IL-5 mediante ELISA. En (a) los resultados se expresan como cpm (media \pm D.S) (*P<0.001 B16/C1 vs B16/-). En (B-E) los resultados se expresan como media \pm D.S (*P<0.001 B16/C1 vs B16/-).

El boqueo de Gal-1 genera ratones resistentes a un re-desafío con tumores completos.

Para evaluar si la generación de una respuesta inmune T específica generada por C1 es suficiente para estimular una inmunidad protectora frente a desafíos subsecuentes con B16/-, re-estimulamos ratones, que habían previamente rechazado a C1, con B16/- 20 días después de la primera inoculación. En la **Figura 11** podemos observar que mientras que B16/- creció progresivamente en ratones vírgenes, si el mismo era inoculado en ratones previamente expuesto a C1 el crecimiento tumoral se vio significativamente demorado. Este resultado estaría poniendo de manifiesto la existencia de una respuesta inmune potenciada y de memoria capaz de retrasar el crecimiento de un tumor salvaje. Dado que el segundo inoculo luego de ser expuesto a C1, es un tumor capaz de sintetizar y secretar Gal-1, el hecho de que ese tumor finalmente puede crecer implica nuevamente la fuerte capacidad de Gal-1 de disuadir la respuesta inmune permitiendo la progresión tumoral.

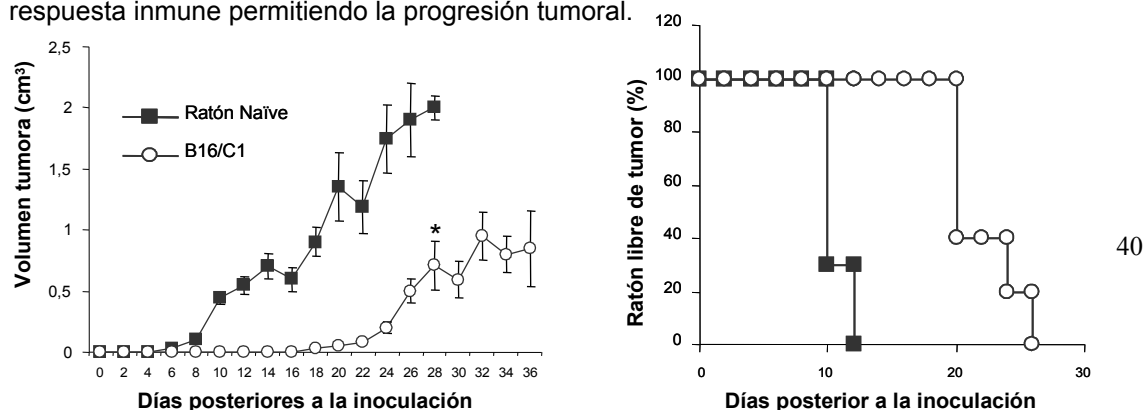


Figura 11: Ratones C57/BL, previamente inoculados con B16/C1 fueron desafiados en el flanco opuesto 20 días después del primer desafío tumoral con B16 salvaje (2×10^5). Ratones de la misma edad fueron desafiados en paralelo con el mismo número de células B16. El volumen tumoral fue evaluado cada dos días y los ratones fueron sacrificados cuando el tumor alcanzó 2 cm^3 . * $p < 0,001$ B16/C1 vs ratón virgen; test *t de student* al día 28 después de la segunda inoculación **(a)**; $p < 0,002$ B16/C1 vs ratón virgen; análisis de Kaplan Meier **(b)**.

TODOS ESTOS RESULTADOS DEMUESTRAN QUE UNA INHIBICIÓN SELECTIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GAL-1 EN CÉLULAS DE MELANOMA PUEDE PROMOVER Y POTENCIAR UNA RESPUESTA ESPECÍFICA T ANTITUMORAL EN RATONES SINGENEICOS, QUIENES FUERON LUEGO PARCIALMENTE RESISTENTES A UN NUEVO DESAFÍO CON B16/-.

Podemos concluir que la expresión de Gal-1 por células de melanoma constituye **un nuevo mecanismo de escape** de la respuesta inmune anti-tumoral, permitiéndole al tumor crecer e invadir otros tejidos. El presente estudio propone además un nuevo blanco terapéutico para estrategias de terapia génica antisentido.



CAPÍTULO 2

**Galectina-1 potencial regulador de la progresión tumoral:
angiogénesis, migración e invasión.**

Palabras claves: galectina-1, angiogénesis, hipoxia, migración, invasión, sarcoma y carcinoma.

VI CAPITULO 2: Galectina-1 promueve la generación de nuevos vasos *in vivo*

La **angiogénesis** es un proceso complejo que permite la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Está compuesto por múltiples pasos que involucran la degradación de membranas basales de células endoteliales, migración celular, proliferación, canalización, ramificación y maduración de nuevos vasos. Las células tumorales producen diversos factores que inducen la neoformación de vasos, que provee oxígeno y nutrientes requeridos por el tumor para movilizarse hacia otros tejidos, proceso conocido como metástasis, y crecer en ambientes hostiles.

En el capítulo anterior demostramos que **Galectina-1** (Gal-1), un miembro de la familia de las galectinas, contribuye significativamente al potencial inmunosupresor de células de melanoma inhibiendo la respuesta inflamatoria *in vivo* e induciendo apoptosis de células T activadas. Estos resultados sugieren que **la expresión de Gal-1 por células tumorales podría constituir un nuevo mecanismo de escape tumoral** (Rubinstein et al., 2004). Por otro lado, trabajos previos describen que medios condicionados generados por células de cáncer de próstata son capaces de inducir la expresión de Gal-1 en células endoteliales drenantes del tumor y que su sobreexpresión promueve la proliferación de las células de los vasos sanguíneos (Clausse et al., 1999). Por otro lado, varios trabajos correlacionan los niveles de Gal-1 con la capacidad metastásica de ciertos tumores (Danguy et al., 2002). A pesar de los datos encontrados en la literatura todavía no se ha determinado una asociación directa entre la presencia de Gal-1 y la modulación de los niveles de angiogénesis y metástasis tumoral.

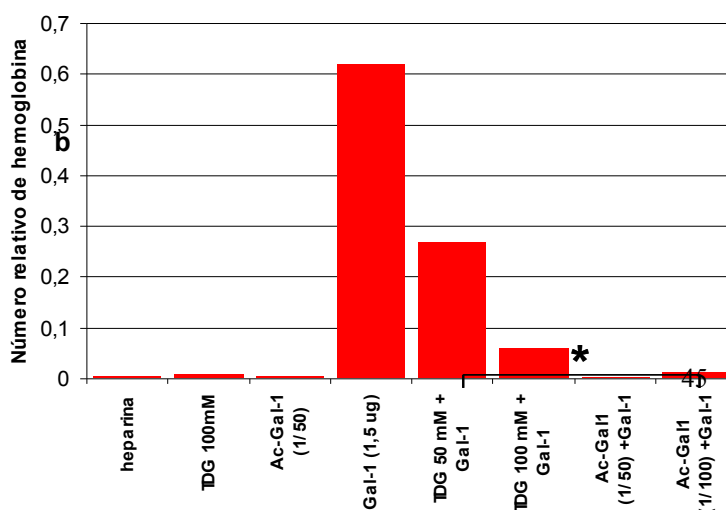
El sarcoma de Kaposi es un tumor de origen endotelial muy utilizado para evaluar drogas anti-angiogénicas debido a su gran capacidad de inducir la formación de nuevos vasos. Además seleccionamos una línea humana para poder realizar los experimentos *in vivo* en ratones nude, eliminando de esta manera la variable inmunológica que nos permitió evaluar la capacidad pro-angiogénica de Gal-1 independientemente de sus propiedades inmunorregulatorias. El sarcoma de mama MDA es altamente metastásico y se utiliza en ensayos de migración para determinar la relevancia de diferentes proteínas en la movilidad celular.

El objetivo particular de este capítulo fue analizar la participación de Gal-1 en diversos eventos de la progresión tumoral: angiogénesis y metástasis, en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Galectina-1 recombinante produce angiogénesis in vivo en un modelo acelular

Para explorar la participación de Gal-1 en procesos angiogénicos evaluamos su capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos a través de la utilización de la técnica de matrigel *in vivo* (Kleinman HK et al, Seminar in Cancer Biology, 2005; Kalluri R Nature reviews cancer, 2003, vol. 3: 422-433). El matrigel es un soporte inerte, soluble y estéril compuesto por extractos de las proteínas de la membrana basal, libre de células, derivadas del tumor EHS (en honor a su descubridor J. Engelbreth-Holm, Dinamarca), que forma un gel tridimensional a 37°C y sirve como base para ensayos de morfogénesis celular, diferenciación y crecimiento tumoral. Esta sustancia funciona entonces como soporte permitiendo el acceso de células y factores requeridos para la generación del fenotipo angiogénico. Este ensayo es uno de los más utilizado para evaluar angiogénesis porque es relativamente simple de realizar y es cuantitativo. Finalmente, para realizar el ensayo de angiogénesis *in vivo* acelular, inoculamos en forma sc en el muslo de ratones C57/Bl6 la preparación de Matrigel (300 μ l) conteniendo los siguientes tratamientos: Gal-1 recombinante y sus inhibidores (anticuerpo específico o tiodigalactósido, TDG) en las dosis mencionadas en la leyenda de la figura. La mezcla se prepara en hielo y una vez inyectado el matrigel se solidifica adquiriendo una consistencia de gel (*pellet*) al alcanzar la temperatura corporal del ratón. Luego de 5 días, los ratones fueron sacrificados y se extirparon los pellets para su posterior análisis. Observamos fenotípicamente la formación de vasos y la correlacionamos con el recuento de hemoglobina extraído de los mismos.

a



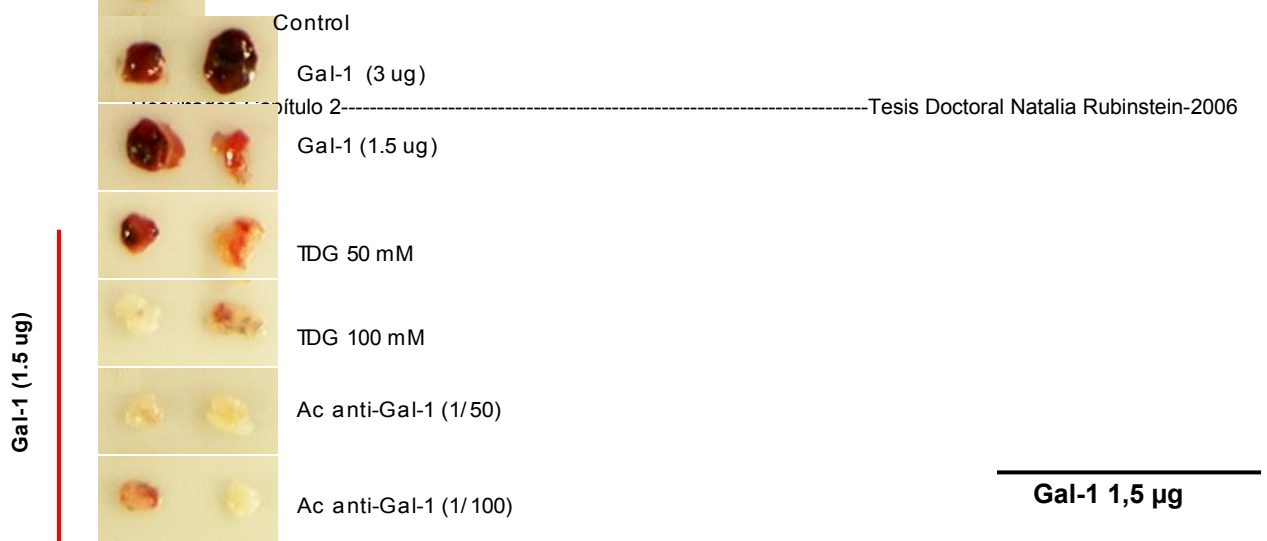


Figura 1: Galectina-1 induce la neoformación de vasos en un modelo acelular *in vivo*. **(a)** Fotos de *pellets* de matrigel conteniendo Gal-1 recombinante y los tratamientos mencionados en la figura. **(b)** Cuantificación de la hemoglobina contenida en los pellets de matrigel mencionados anteriormente. El gráfico de barras muestra el número relativo de hemoglobina normalizado obtenido como: **(mg pellet X DO)/100 mg pellet**. (* $p < 0.001$ Gal-1 Vs antagonistas, test *t-Student*).

☛ **Este resultado indica que Gal-1 es un nuevo factor proangiogénico en un modelo experimental acelular *in vivo*.**

Sarcoma de Kaposi produce Gal-1

Para evaluar la contribución de Gal-1 en la neoformación de vasos *in vivo* en un sistema celular elegimos el sarcoma de Kaposi, por ser un tumor altamente vascularizado. Como primer paso evaluamos la expresión y secreción de Gal-1 en extractos proteicos totales y proteínas extraídas de los medios condicionados generados por la línea KS-Imm en cultivo. En la **Figura 2** podemos observar altos niveles de expresión y secreción de nuestra proteína.

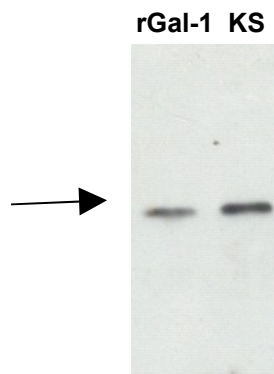


Figura 2: Western blot de Sarcoma de Kaposi. La línea celular KS-Imm expresa Gal-1.

Generación del modelo *in vivo*: antisense de Gal-1

Para evaluar la relevancia de Gal-1 en la alta neovascularización descrita para el Sarcoma de Kaposi decidimos disminuir su expresión en esta línea tumoral. Para ello, células KS fueron transfectadas en forma estable con la construcción antisentido pcDNA6/Lag-1, utilizando la Lipofectamina 2000 (Life-Technologies). Las células transfectadas fueron seleccionadas por presión selectiva con antibiótico específico (Basticidina, 3 µg/ml, Invitrogen). Como control se transfectaron células KS con el vector vacío (pcDNA6 ó WT). Los niveles de expresión de Gal-1 en extractos totales fueron evaluados mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. La transfección con plásmidos y lipofectamina da lugar a una población heterogénea en dónde algunas células pueden recibir mayor cantidad de plásmido que otras o la inserción de la construcción deseada pueden ocurrir bajo promotores de distinta intensidad de transcripción. Para evitar falsas conclusiones debido a la presencia de compensación de efectos debida a diferentes concentraciones de expresión de nuestra proteína en los ensayos, decidimos generar poblaciones homogéneas a través de la técnica de dilución límite. Finalmente, a través de ensayos de Western blot determinamos la presencia de 6 clones diferentes de células KS/lag-1 que expresaron niveles marcadamente menores de Gal-1, respecto a células KS/- transfectadas con el vector control (**Figura 3**).

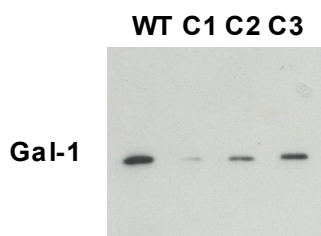


Figura 3: Los clones (C1, C2 y C3) de KS-Imm expresan niveles significativamente menores de Gal-1 comparado con KS salvaje (WT) utilizando un anticuerpo policlonal anti-Gal-1.

Comparación tasas de crecimiento *in vitro*

Previo a la evaluación del crecimiento tumoral *in vivo* de los clones obtenidos determinamos la tasa de crecimiento tumoral *in vitro*. Para ello, se cultivaron en forma individual en placas de 24 pocillos los diferentes clones que recibieron el vector Lag-1 antisentido y células de KS que recibieron el vector control ($1 \text{ ó } 2 \times 10^4$ células/ml). La tasa de proliferación de células tumorales *in vitro* fue evaluada a diferentes periodos de tiempo por un método colorimétrico (MTT). En la **Figura 4** podemos observar que tanto las células transfectadas con el vector control como aquellas transfectadas con la construcción antisentido crecen con la misma tasa antes o después de la fase logarítmica de crecimiento. Este resultado sugiere que la introducción del vector antisentido no afecta la tasa de crecimiento y proliferación de células de sarcoma de Kaposi.

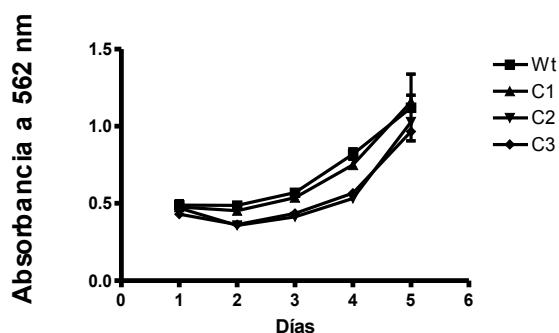


Figura 4: Crecimiento *in vitro* de las KS WT, control (B16/-) o transfectantes knockdown (KS/C1, C2 y C3) utilizando el test de MTT. La tasa de crecimiento no varía frente a la transfección de células tumorales con construcciones plasmídicas.

☛ Este resultado nos permite seguir adelante en la evaluación de la progresión tumoral y los niveles de angiogénesis luego de la inhibición de la expresión de Gal-1.

Inoculación de ratones nude: crecimiento *in vivo*

Para, finalmente, explorar la relevancia fisiológica de Gal-1 en la regulación de la angiogénesis inoculamos ratones nude con las células transfectadas (5×10^6) previamente preparadas en una mezcla de matrigel (10 mg/ml) en un volumen final de 250 μ l. Esta preparación se realiza a 4° C y una vez inoculado sc en el flanco lateral de los ratones nude el matrigel se gelifica conteniendo a las células tumorales, generando un soporte que permite la formación del tumor xenogéneo en forma más eficiente. Los animales son mantenidos en el bioterio libres de patógenos y el crecimiento tumoral es monitoreado día por medio midiendo el diámetro menor y mayor del tumor con un calibre automático. En la **Figura 5** podemos observar que el tumor conteniendo la secuencia antisentido de Gal-1 crece significativamente menos que el KS transfectado con la construcción control.

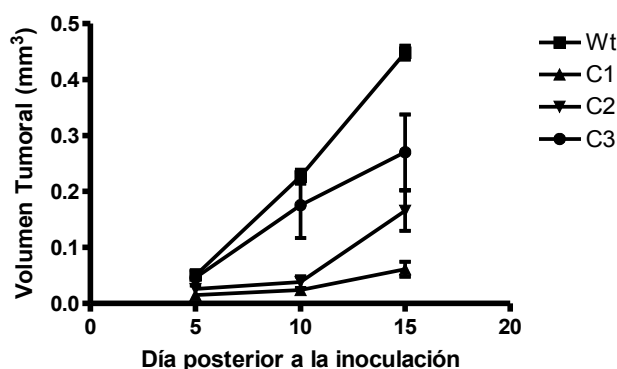


Figura 5: Ratones C57/BL6 fueron inoculados sc con 2×10^5 células de KS WT (■), KS/C1 (□), B16/C2 (△) ó B16/C3 (●). El crecimiento tumoral fue monitoreado cada cinco días. (WT Vs C1, $p < 0.0001$; WT Vs C2 y C3 $p < 0.005$; *t student*; $n = 8$ ratones por grupo).

☛ **La disminución del crecimiento tumoral in vivo debido a la ausencia de Gal-1 nos indica un requerimiento significativo de esta proteína para una progresión tumoral exitosa.**

Evaluación histológica de los vasos generados.

Luego de 15 días los ratones son sacrificados y se remueve el tumor para su posterior análisis. Brevemente, los tumores se fijan en paraformaldehído al 10 % durante toda la noche,

luego son incluidos en parafina y finalmente cortados con un micrótopo para su evaluación histológica. Para ello realizamos tinciones inespecíficas con eosina/hematoxilina (**Figura 6**). Este ensayo nos permite observar una disminución en la generación de vasos en el tumor KS/as comparado con el tumor WT.

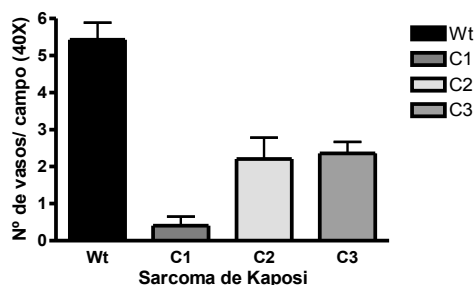
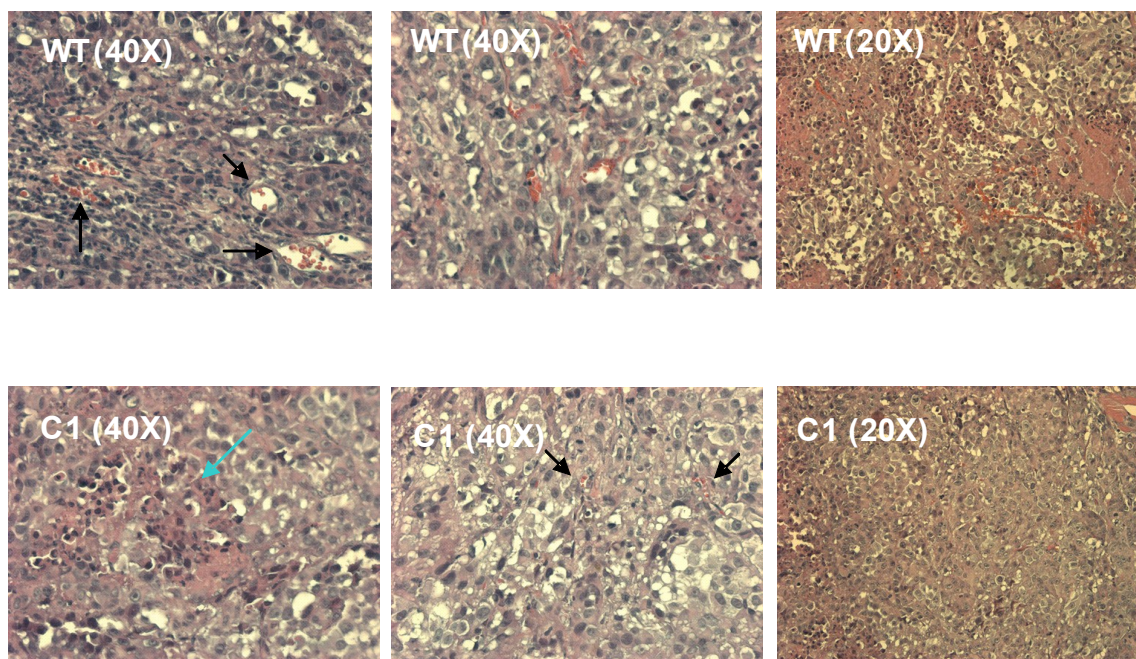


Figura 6: Tinción con eosina y hematoxilina y posterior recuento de vasos por campo (40X). Las flechas negras indican vasos sanguíneos y las flechas azules señalan zonas necróticas. Wt Vs C1, $p < 0.0001$; Wt Vs C2 y C3 $p < 0.005$; t student.

☛ **Estos resultados indican la relevancia fisiológica de Gal-1 en la neoformación de vasos en un modelo tumoral in vivo.**

Regulación de la expresión de Gal-1 por variaciones en la concentración de oxígeno

Como mencionamos anteriormente la angiogénesis es promovida por las células tumorales frente a una situación de estrés como la falta de nutrientes y oxígeno. La hipoxia se considera de los principales fenómenos iniciadores de la neoformación de vasos (BUSCAR REFERENCIA). Por ejemplo, ha descrito la activación de factores de transcripción, tales como HIF- α o NF- κ B, que modulan la expresión de proteínas pro-angiogénicas frente a un estado de hipoxia (Cummings EP et al, Eur J Physiol (2005) 450: 363–371). Dado que Gal-1 es capaz de modular la angiogénesis in vivo decidimos evaluar los mecanismos que promueven la expresión de esta proteína en el sarcoma de Kaposi. Para ello evaluamos la modulación de Gal-1 frente a un estado de hipoxia a distintas dosis de oxígeno y tiempos de exposición.

Las células de KS (5×10^4) fueron cultivadas en placa de 24 pocillos en medio DMEM completo. Al día siguiente las placas se colocan en la cámara de hipoxia. Como se observa en la **Figura 8** la expresión de Gal-1 es regulada positivamente frente a un estado de hipoxia, a menores concentraciones de oxígeno mayor producción de Gal-1. Para evaluar si el aumento observado se debe a una mayor expresión de Gal-1 o a una menor liberación al medio extracelular decidimos evaluar los medios condicionados durante las mismas condiciones.

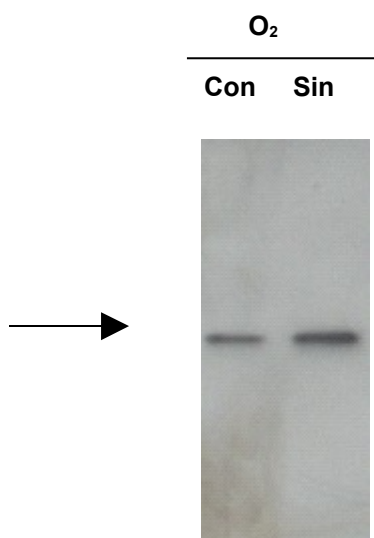


Figura 8: (a) Western blot de extractos proteicos totales.

☞ **Este resultado indica un posible mecanismo de regulación de la expresión de Gal-1 frente a una situación de estrés como la falta de oxígeno.**

Para evaluar posibles mecanismos que regulen el aumento de Gal-1 frente a la disminución de oxígeno, buscamos zonas posibles de unión a distintos factores de transcripción activados durante la inducción de hipoxia. Encontramos sitios de para NF- κ B (Tesina de licenciatura Marta Toscano, 2001), que ha sido descrito como un potente regulador de genes durante estado de hipoxia (BUSCAR CITA). Para evaluar su potencial participación en la regulación de Gal-1 frente a hipoxia realizamos el mismo experimento explicado anteriormente agregando al medio de cultivo un inhibidor de I κ B α . Evaluamos la modulación de los niveles de Gal-1 en extractos proteicos totales. En la **figura 9** podemos observar que el inhibidor disminuye la sobre-expresión observada anteriormente frente a la disminución de la concentración de oxígeno.

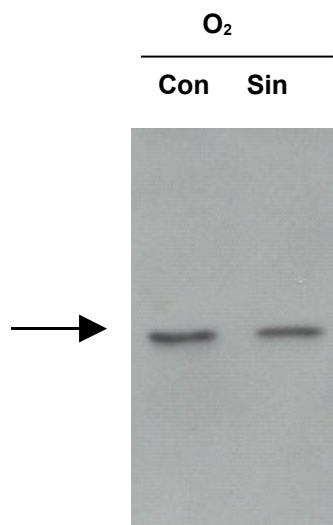


Figura 9: hipoxia nfkb y gal1

El siguiente punto fue evaluar si los niveles de Gal-1 dependían de la concentración de oxígeno intra-tumoral y una vez alcanzada la presión de oxígeno requerida para oxigenar el tumor, los niveles de expresión de Gal-1 bajan a niveles de normoxia. Para ello realizamos el mismo experimento pero luego de las 24 o 48 hs de hipoxia las incubamos en normoxia por 6 hs más. Nuevamente, la regulación de Gal-1 se evaluó en extractos proteicos de proteínas

totales. En la Figura 10 podemos observar que los niveles de Gal-1 luego de la incubación en normoxia vuelven a niveles basales.

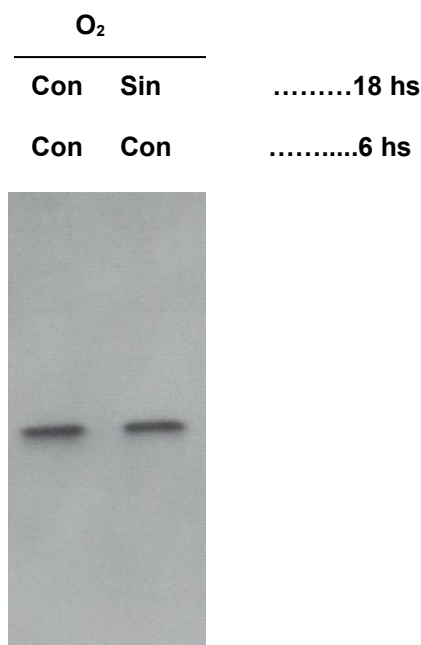


Figura 10: Western de Gal-1 luego de hipoxia normoxia.

Estos resultados estarían indicando que la célula tumoral secreta Gal-1 frente a una situación de hipoxia, inducida por una activación de NF κ B, modulado positivamente la neoformación de vasos. Por otro lado una vez que la célula alcanza un estado de normoxia regula los niveles de Gal-1 a un estado basal.

Migración e invasión

Por último, decidimos investigar la participación de Gal-1 en otros eventos de la progresión tumoral: **invasión y migración**. Para ello seleccionamos dos líneas tumorales humanas: sarcoma de Kaposi (KS, previamente descrito) y el carcinoma mamario (MDA-345) altamente invasiva y metastásica, respectivamente.

Para ello utilizamos el siguiente material: KS/AS silenciada con pcDNA6/Lag-1 (previamente descrito) y la línea de carcinoma mamaria: MDA/AS silenciada con oligo III/48hs

(RNA interferencia). Como células control utilizamos: KS/WT y MDA/WT. Comportamiento de las mismas en ensayos de migración e invasión *in vitro* mediante cámaras modificadas de matrigel (Albini et al., 1988). A través de ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal específico analizamos la presencia de Gal-1 en extractos totales de las líneas tumorales. Ambas líneas mostraron altos niveles de Gal-1 (10µg de proteínas totales) comparado con los niveles observados en una línea de carcinoma mamario (MCF-7: levemente metastásica).

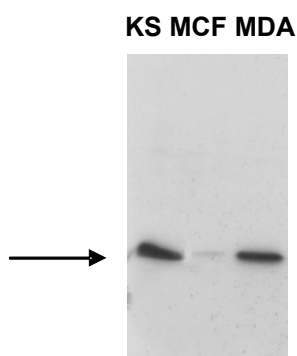
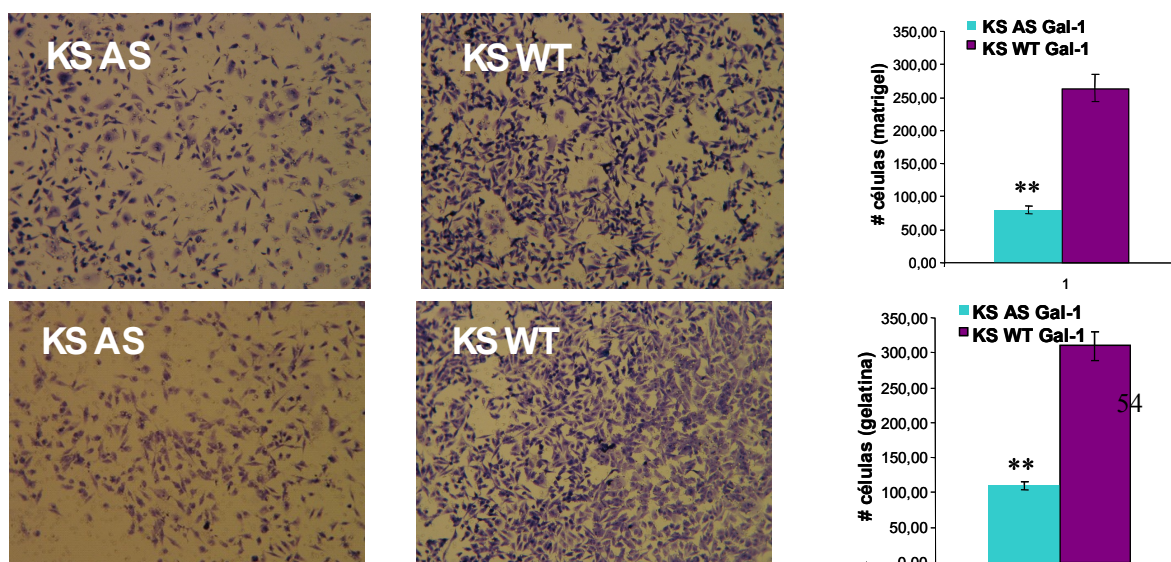


Figura 11: Evaluación de la expresión de Gal-1 en extractos proteicos totales de KS, MDA y MCF-7 mediante Western blot.

Los ensayos de **invasión** fueron realizados en cámaras conteniendo matrigel (12µg) y los de **migración** fueron realizados en soportes adecuados para cada línea (colágeno IV (5µg) para MDA y gelatina (1.5%, PBS1X) para KS). El matrigel está constituido por componentes de la membrana basal (colágeno IV, laminina, proteoglicanos, etc), es extraído de tumor EHS (mantenido en ratones singeneicos C57Bl). Además, se utilizaron soportes de papel de filtro millipore (8 µm de poro para KS y 12µm para MDA). Las células transfectadas (1.10⁵ - 3.10⁵) son sembradas en los soportes correspondientes con un quimioattractante (medios condicionados de 3T3NIH) durante 5-6 hs a 37°C.



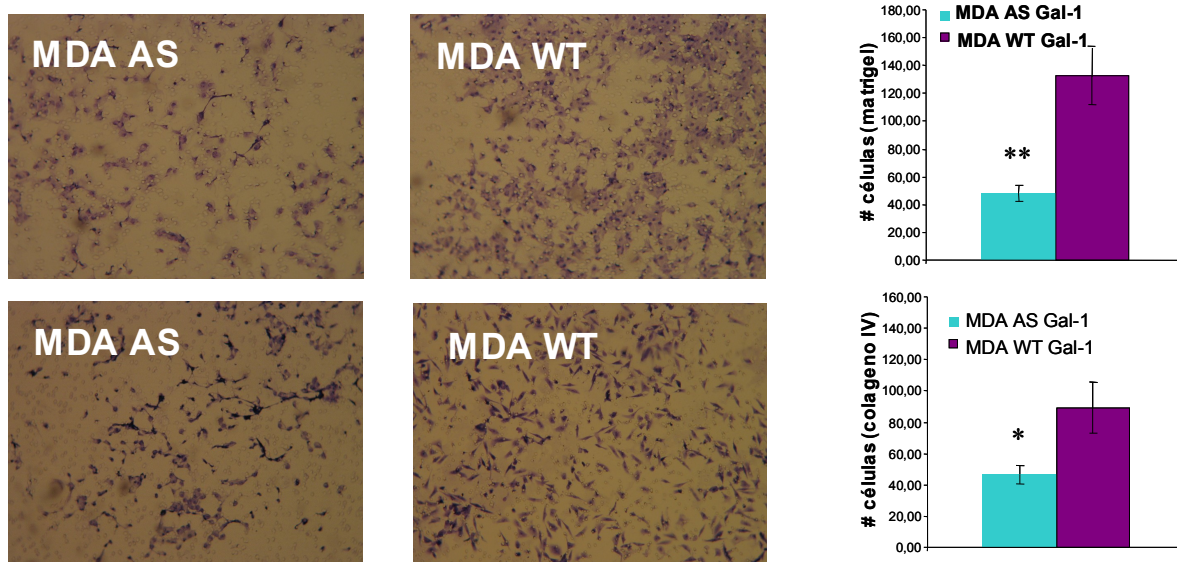
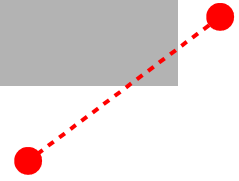


Figura 12: Ensayos de migración e invasión en cámara Boyden y papel de filtro. Fotos digitales obtenidas al microscopio óptico (40X) utilizadas para la cuantificación de las células que atravesaron el papel de filtro a doble ciego y en cinco campos al azar. Los niveles de migración e invasión de KS/Gal-1AS y MDA/Gal-1AS disminuyeron significativamente al disminuir la expresión de Gal-1 (** $p < 0.005$ AS vs WT; * $p < 0.05$ AS vs WT, t-Student).

☞ **Esta figura nos permite considerar a Gal-1 como un factor importante en la movilidad celular tumoral, tanto a nivel invasivo como a nivel migratorio.**



ESTOS RESULTADOS INDICAN LA CAPACIDAD DE GAL-1 DE PROMOVER LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL FRENTE A UNA SITUACIÓN DE HIPOXIA MODULADO POR EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF κ B.



VII Discusión

En este trabajo demostramos que los tumores pueden superar el ataque de los linfocitos T efectores a través de mecanismos dependientes de Gal-1. Mediante la combinación de experimentos in vivo e in vitro utilizando líneas tumorales transfectadas con construcciones silenciadoras, establecimos un link entre la inmunoregulación mediada por Gal-1 y su contribución al inmunoprivilegio tumoral. El bloqueo específico de los efectos de Gal-1 dentro del tejido tumoral generó una masa tumoral reducida e incrementó el rechazo tumoral, estimulando la generación de una potente respuesta inmune T antitumoral en ratones singéneos.

Durante los últimos años hubo un gran incremento en la importancia del impacto sobre la glicosilación diferencial de linfocitos T en la modulación de las respuestas inmunes (Daniels et al., 2002; Feizi, 2000). A través de la interacción de ligandos de poli-N-acetilglucosaminas, creados por glicosiltransferasas específicas (Lowe, 2001; Nguyen et al., 2001), Gal-1 modula la homeostasis de linfocitos T induciendo apoptosis en estas células (Rabinovich et al., 1999b), bloqueando la activación de células T (Chung et al., 2000), inhibiendo la secreción de citoquinas proinflamatorias (Rabinovich et al., 1999a), y favoreciendo el recambio de linfocitos T activados (Dias-Baruffi et al., 2003). Además, la estimulación de una respuesta antitumoral efectiva seguida a la disminución de la expresión de Gal-1 podría ser atribuida a varios mecanismos. Mientras este efecto podría ser considerado una consecuencia de la remoción de una señal inhibitoria involucrada en la muerte de células T, también podría ser el resultado de la activación de un gran número de células T vírgenes debido a la disminución de los niveles de activación. En este contexto, el bloqueo de Gal-1 podría incrementar tanto la supervivencia como la frecuencia de linfocitos T helper y citotóxicos, quienes podrían actuar en forma orquestada durante la respuesta anti-tumoral. De acuerdo a esto, los experimentos en donde eliminamos células inmunes revelan los requerimientos, tanto de células T CD4⁺ como de CD8⁺, para promover el rechazo tumoral en nuestro modelo, sugiriendo que ambas subpoblaciones celulares podrían ser responsables del gran incremento de la secreción de INF- γ seguida al bloqueo específico de la síntesis de Gal-1 en los tumores. Aunque las células T CD8⁺ son citotóxicas efectoras en el melanoma, se ha demostrado que los T CD4⁺ pueden

mediar una respuesta inmune con funciones efectoras independientes de los T CD8⁺ (Hung et al., 1998). Es interesante resaltar que las células NK no fueron requeridas en nuestro modelo en la promoción del rechazo tumoral. Sin embargo la producción de IFN- γ mediada por células NK fue un factor crítico en el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral luego de diferentes estímulos, incluyendo la sobre-expresión de CD70 (Kelly et al., 2002) o ligandos como NKG2D (Diefenbach et al., 2001). Entonces, la combinación de diferentes estrategias, estimulando tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (Duguay et al., 2002) pero también utilizando como blanco cascadas regulatorias negativas (Pardoll, 2003), serían necesarias para proveer una protección inmune completa y permitir una amplificación selectiva de la respuesta inmune para obtener una inmunoterapia contra el cáncer efectiva.

Un mecanismo alternativo que promueva la respuesta inmune antitumoral luego de la eliminación de los efectos inhibitorios de Gal-1 podría ser el resurgimiento una respuesta inmune específica Th1 previamente reprimida, tal como se refleja en el gran incremento de la producción de IFN- γ mediado por los linfocitos extraídos de los ganglios linfáticos provenientes de los ratones inoculados con los clones transfectados con la construcción antisentido para Gal-1. Esta observación fortalece la hipótesis en donde una respuesta mediada por IFN- γ es crítica para prevenir la formación de un tumor y modular la inmunogenicidad tumoral (Hu et al., 1998; Shankaran et al., 2001), y podría contrarrestar la pérdida gradual de la población Th1 observada durante la progresión tumoral (Ghosh et al., 1995). Interesantemente, nosotros hemos demostrado previamente que Gal-1 recombinante o su expresión genética suprime la respuesta inflamatoria mediada por Th1 en un modelo experimental de artritis reumatoidea inducida por colágeno o un modelo de colitis inducido por TNBS (Rabinovich et al., 1999b; Santucci et al., 2003). En estos modelos, la administración de Gal-1 dio como resultado la eliminación selectiva de células T activadas específicamente por el antígeno y en una polarización hacia un perfil Th2 que generó un estado de remisión en la evolución de la enfermedad inflamatoria.

Dado que Gal-1 fue efectiva en inducir apoptosis de células T efectoras durante el desarrollo de enfermedades autoinmunes, podría ser posible que el bloqueo de este proceso inhibitorio pudiera permitir el reclutamiento y la activación de linfocitos T autorreactivos de baja afinidad que podrían haber escapado de la inducción de tolerancia. Aunque nosotros no hemos

encontrado señales de reactividad tejido específica en nuestro modelo, sería conveniente realizar un seguimiento a largo plazo para poder investigar si los ratones que han rechazado el tumor transfectado con la secuencia antisentido desarrollarán señales de depigmentación autoinmune, tal como describen otros en estrategias de inmunoterapia (Ramirez-Montagut et al., 2003).

Los datos presentados aquí demuestran que células de melanoma podrían tomar ventaja de la expresión de Gal-1 para inducir apoptosis en linfocitos T efectores específicos contra el tumor y que este mecanismo podría contribuir a desviar el balance hacia un microambiente inmunosupresor de tumor. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que mecanismos alternativos dependientes de Gal-1 podrían contribuir también a la progresión tumoral, como vimos después en la inducción de angiogénesis. De acuerdo con estos hechos, estudios previos muestran que Gal-1 podría afectar agregaciones celulares homotípicas (Tinari et al., 2001), adhesión (van den Brule et al., 1995), migración (Camby et al., 2001) y proliferación tumoral (Kopitz et al., 2001) *in vitro*. Además, se sabe que los tumores humanos expresan un patrón de expresión complejo de galectinas (Lahm et al., 2001), se requieren futuros estudios para dilucidar las propiedades inmunorregulatorias de otros miembros de la familia de las galectinas (Fukumori et al., 2003) y su contribución al privilegio inmune tumoral.

La hipótesis de contra-ataque tumoral sugiere que los tumores liberan señales de muerte a células efectoras sensibles a Fas, convirtiendo al tumor en un sitio inmunológicamente privilegiado (O'Connell et al., 2001). Aunque este modelo no ha sido aceptado universalmente, estudios recientes destacan la contribución de nuevas moléculas asociadas a la evasión inmune del tumor, incluyendo B7-H1 (Dong et al., 2002), y la enzima indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) (Friberg et al., 2002; Uyttenhove et al., 2003). Además otras evidencias indican que el bloqueo de diferentes señales tales como CTLA-4 (Phan et al., 2003), STAT-3 (Cheng et al., 2003) o TGF- β (Gorelik and Flavell, 2001) podrían ser efectivos solos o combinados con otras estrategias de inmunoterapia para romper la tolerancia inmunológica y promover la regresión tumoral (Boon and Van den Eynde, 2003).

Nuestros resultados proveen evidencia tanto *in vitro* como *in vivo* mostrando que Gal-1 contribuye al inmunoprivilegio en tumores modulando la supervivencia y/o la polarización de células T efectoras, generando un link entre las propiedades inmunorregulatorias de esta

proteína y su contribución a la progresión tumoral. Mas importante aún, nuestros datos resaltan un nuevo blanco molecular par ala manipulación de la tolerancia y apoptosis de células T efectoras con importantes implicancias para la inmunoterapia en cáncer.

Quedan aun muchos interrogantes por responder que se generan a partir de toda la bibliografía.

Hay inmunogenicidad tumoral. Hay respuesta inmune anti tumoral. Pero no es eficiente.

¿Debería serlo? ¿Debería existir una respuesta?

Por otro lado esta tesis nos ha permitido explorar a Gal-1 en otras etapas de la progresión tumoral, es alli en donde nos encotramos con una proteína promotora de la angiogénesis inducida por un estado de hipoxia reguladaza por NF κ b.

PERSPECTIVAS

Muchas evidencias indican que un sistema inmune saludable es necesario para el control de enfermedades malignas y que la inmunosupresión asociada al cáncer contribuye al éxito de su progresión. Los tumores han desarrollado diversas estrategias para evadir el sistema inmune del hospedador, y se han descrito varios mecanismos celulares y moleculares responsables de la evasión tumoral. Incluso, algunos de estos mecanismos tienen como blanco células del sistema inmune anti-tumoral. La disfunción y apoptosis de estas células genera un desbalance inmunológico que no puede ser corregido, aún, por inmunoterapia, que tienen como principal objetivo activar la respuesta inmune anti-tumoral. Revertir esta disfunción normalizando la homeostasis inmunológica del paciente es uno de los objetivos claves de terapias futuras. En la actualidad se están diseñando diversas estrategias terapéuticas con el objetivo de corregir esta disminución funcional, generando estimulación in vivo, transfiriendo

células T capaces de expandirse in vivo proveer al paciente una repoblación de células efectoras protectoras. Lograr una mayor supervivencia de estas células y desarrollar una memoria a largo plazo en los pacientes con células malignas es necesario para el mejoramiento de los beneficios clínicos de inmunoterapia contra el cáncer. Para ello es evidente la necesidad de generar protocolos que debiliten el contra-ataque tumoral, disminuyendo o bloqueando la acción de factores anti-inflamatorios, inmunosupresores y pro-angiogénicos. De esta manera el aporte de la ciencia básica en el descubrimiento de nuevos mediadores promotores de la progresión tumoral es una pieza fundamental.

VIII Materiales y métodos

Capítulo 1

Producción de Gal-1 recombinante y del anticuerpo policlonal anti-Gal-1

La Gal-1 recombinante humana se obtuvo de acuerdo al procedimiento descrito por Hirabayashi y colaboradores. Brevemente el plásmido de expresión pH14Gal se utilizó para transformar cepas SCS1 y Y1090 de *E. coli*. La proteína se purificó por cromatografía de afinidad en una columna de lactosil sefarosa. La actividad biológica se determinó por ensayos de hemaglutinación y el contenido de LPS en la muestra se determinó a través de un método colorimétrico para la detección de endotoxinas (Pyrodict, Seikagaku, Tokio). El anticuerpo policlonal de conejo anti-Gal-1 se obtuvo de acuerdo procedimiento previamente descrito por Rabinovich y colaboradores [buscar cita].

Células tumorales

La línea de melanoma murina B16F0 fue obtenida por ATCC y el timoma EL-4 fue dado por el Dr. Milstein. Ambas líneas son singeneicas a ratones C57BL/6 y se mantienen en cultivo con medio DMEM (Gibco), 10% suero fetal bovino decplementado (Gibco), 2mM de glutamina, en estufa a 37° C y a una atmósfera de 5% CO₂.

Extracción de proteínas totales

Las CMSP (2x10⁶) se resuspendieron en 50 µl buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10mM EDTA y NP-40 1%) conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma). El lisado se incubó en hielo durante una hora y luego se centrifugó a 12000 r.p.m. El sobrenadante obtenido representa el extracto proteico total.

Ensayos de Inmunotransferencia o Western blot

- *Determinación de la concentración de proteínas en extractos celulares:* La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el Kit Micro BCA (Pierce/Endogen,

Rockford, IL). La solución micro BSA se preparó en base a tres soluciones. La solución A se utilizó en la relación 25 en 50, la solución B en la relación 24 en 50 y solución C en la relación 1 en 50. Luego, en una placa de 96 reservorios, se colocaron 100 µl de solución micro BSA y 100 µl de extracto proteico, diluido en H₂O destilada. Posteriormente, la placa se incubó durante 18 h. a temperatura ambiente ó 3 h. a 37° C. La concentración de proteínas se determinó a partir de la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro (Labysystems Multiskan), y la extrapolación de la misma en una curva estándar de BSA (0,5-100 µg/ml)

- *Preparación de las muestras:* Una vez determinada la concentración de proteínas, se procedió a la preparación de las muestras. Se tomaron 10 µg, para detectar Gal-1 en extractos totales ó 5 µg para detectar Gal-1 en proteínas provenientes de medios condicionados. Luego se agregó un volumen equivalente de buffer de siembra 2X (Bio-Rad, Hercules, CA) y se incubó 3 min. a 100 ° C.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y disociantes (SDS-PAGE): Se prepararon geles de poliacrilamida al 15% de 1,5 mm de espesor. Luego de la siembra de las muestras, la corrida electroforética fue llevada a cabo en una cuba de electroforesis (Mini Protean II, Bio-Rad) a 150 V constante, en buffer de electroforesis (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glicina; 0,1% SDS) durante 1 h.

Preparación de geles:

Gel de poliacrilamida al 15 % (gel de resolución): 2,3 ml de agua destilada; 2,5 ml de buffer (1,5M Tris-HCl pH: 8,6); 5 ml de acrilamida 30%/bisacrilamida 0,8%; 10 µl de TEMED; 100 µl de SDS 10% y 70 µl de persulfato de amonio 10%.

Gel de poliacrilamida concentrador: 3 ml de agua destilada; 1,25 ml de buffer (0,5M Tris-HCl pH: 6,8); 650 ml de acrilamida 30%/bisacrilamida 0,8%; 10 µl de TEMED; 50 µl de SDS 10% y 50 µl de persulfato de amonio.

- *Transferencia a membranas de nitrocelulosa:* Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron utilizando un equipo Mini trans blot (Bio-Rad) a una membrana PVDF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Este dispositivo permite transferir las proteínas cargadas negativamente, mediante una corriente eléctrica, desde el gel hacia la membrana. Para ello se utilizó buffer de transferencia (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glicina; 0,1% SDS; 20% metanol) y

la misma se realizó a 200 mA durante 40 min. Luego, las membranas se incubaron con buffer de bloqueo (0,15 M NaCl; 50 mM Tris; 0,1% Tween-20 y 5% leche descremada) durante 18 h. a 4° C.

▪ *Ensayo inmunoquímico:* Las membranas, previamente bloqueadas, se lavaron con buffer T.TBS (0,15 M NaCl, 50 mM Tris, 0,1% Tween-20) y posteriormente se incubaron 1 h, a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal de conejo diluido 1:5000 (para detectar Gal-1) en T.TBS. Luego las membranas se lavaron nuevamente con buffer T.TBS y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Bio Rad, Richmond, CA) diluido 1:3000 en T.TBS. El revelado se realizó con el Kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences). Anticuerpo utilizado: anticuerpo policlonal de conejo anti-Gal-1.

Ensayo de confocal para determinar in situ la presencia de Gal-1:

Las células de melanoma (2×10^4) fueron cultivadas en cubreobjetos circulares de vidrio dentro de placas de 24 pocillos con DMEM completo toda la noche para permitir que se adhieran al vidrio. Al cabo de ese tiempo fueron lavadas con PBS 1x varias veces y fijadas en paraformaldehído (4%) durante 10 min en hielo. Luego fueron permeabilizadas con PBS conteniendo 0,2% de Triton X-100 y posteriormente marcadas con el anticuerpo policlonal específico hecho en conejo anti-Gal-1 (dilución 1:500) (o un anticuerpo inespecífico IgG como control) durante 30 min en hielo. A continuación fueron incubadas con el anticuerpo secundario hecho en burro anti-conejo Cy2 (Jackson). Las imágenes del estudio en confocal fueron adquiridas utilizando el microscopio Zeiss LSM 510 (Jena) con un objetivo Capocromático 63x/1.2 W. El tamaño de las imágenes fue determinado como 1024 pixels con 8 pixels bits de profundidad.

Generación de tumores con baja expresión de Gal-1:

▪ *Construcción del plásmido conteniendo la secuencia antisentido de Gal-1:* La secuencia completa del cDNA murino de Gal-1 (495 pb) fue obtenida del IMAGE Consortium (MRC, Cambridge). Esta secuencia fue obtenida del pcDNA3.1 (Invitrogen) previamente utilizado en (Rabinovich et al., 1999b) cortando con las enzimas de restricción: BamH1 y EcoRV

(Invitrogen) y subclonado en su orientación antisentido dentro de la construcción pcDNA6 (Invitrogen) bajo el promotor del citomegalovirus.

- *Generación de bacterias competentes:* se inoculan 5 ml de LB sin antibióticos con bacterias DH5 α y se las incuba a 37°C toda la noche con agitación. Se inoculan 100 ml de medio LB precalentado con 1 ml del cultivo preparado previamente y se incuban a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica OD₅₅₀ = 0.5 (alrededor de 2 a 3 hs). Se enfría el cultivo en hielo o agua por 10 min. con agitación. Centrifugar en tubos de 50 ml por 10 min a 3000 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 8 ml de CaCl₂ frío (100 mM), incubarlo en hielo durante 30 min. Centrifugar por 10 min a 3000 rpm y resuspender las células en 4 ml de CaCl₂ frío + 15% (v/v) glicerol. Incubar en hielo durante 2 hs. Alicuotar la suspensión celular en tubos eppendorf (100 μ l). Conservar a -70°C.
- *Transformación de bacterias competentes:* Descongelar un eppendorf del stock EN HIELO. Preparar la solución de transfección (100 μ l) [10 μ l TMC 10x (100mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 100 mM CaCl₂) y DNA, 0.3 - 100 ng, agua hasta completar 50 μ l]. Agregar 50 μ l de células competentes en la solución y mezclar con pipeta. Incubar por 15 minutos en hielo. Luego calentar las células incubándolas por 1 min y medio a 42° C sin agitar. Al cabo de ese tiempo incubar 10 min a temperatura ambiente. Agregar 900 μ l de medio LB (para 1 litro: 10g de tristona, 5g de extracto de levadura, 5g de NaCl y 1ml de NaOH (1N)) y agitar por 1 h a 37 °C. Centrifugar 3 min a 3000 rpm. Resuspender el pellet en 100 μ l de medio LB y plaquear en placas con agar y antibiótico ampicilina (CONCENTRACIÓN). Incubar toda la noche a 37 °C.
- *Purificación del plásmido mediante mini-prep:* inocular 5 ml de LB estéril con una colonia sola. Crecer hasta saturación durante toda la noche. Centrifugar 1,5 ml de células durante 20 segundos en una microcentrifuga a máxima velocidad. Remover el sobrenadante. Resuspender el pellet en 200 μ l de GTE utilizando un vortex y dejar durante 5 min a temperatura ambiente. Agregar 300 μ l de NaOH/SDS, mezclar por inversión del tubo e incubar 5 min en hielo. Agregar 300 μ l de solución de acetato de potasio y vortexear durante 2 min. Nuevamente dejar en hielo por 5 min. Centrifugar durante 3 min a velocidad máxima para eliminar el debris y ADN cromosómico. Transferir el sobrenadante a un tubo fresco y agregar 2,5 μ l de RNAsa (10 mg/ml). Incubar durante 30 min a 37°C. Agregar 400 μ l de CHCl₃, vortexear y centrifugar 6 min a máxima velocidad. Pasar la fase superior a un tubo limpio. Agregar 700 μ l de isopropanol

(100%) e incubar 5 min en hielo. Centrifugar durante 10 min a máxima velocidad. Descartar el sobrenadante y agregar 400 µl de etanol (70%). Centrifugar a máxima velocidad durante 10 min. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet por 5 min. Resuspender el pellet seco en 30 µl de agua MilliQ.

Recetas de las preparaciones:

- GTE: 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, autoclavar y guardar a 4 °C.

- Solución NaOH/SDS: 0.2 N NaOH, 1% SDS, preparar inmediatamente antes de usar.

- Solución de Acetato de Sodio: 29.5 ml ácido acético glacial, lentejas de KOH hasta pH 4.8, completar con H₂O hasta 100 ml. Guardar a temperatura ambiente sin autoclavar.

▪ *Secuenciación del inserto para controla su orientación correcta:* purificamos el plásmido obtenido luego de la mini-prep corriendo una alícuota de la preparación en un gel de agarosa y lo purificamos por SARASA. Para controlar que el plásmido contenga la secuencia correcta y en la orientación correcta realizamos dos estrategias: secuenciamos el inserto y lo cortamos con enzimas de restricción. COMPLETAR

▪ Purificación del plásmido mediante Maxi-prep: Inocular 5 ml de LB estéril con una sola colonia de bacterias y crecer a saturación durante toda la noche. Agregar los 5 ml de cultivo bacteriano a 500 ml de LB en una botella de un litro durante toda la noche. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 min. Resuspender el pellet vortexeando en 7 ml de solución GTE, dejar 5 min a temperatura ambiente. Agregar 14 ml de solución NaOH/SDS, mezclar por inversión del tubo e incubar en hielo por 5 min. Agregar 7 ml de solución de acetato de potasio y mezclar nuevamente por inversión. Incubar durante 30 min a -20°C. Centrifugar 30 min a 13000 rpm para eliminar debris celular y ADN cromosómico. Descartar el pellet y agregar 0,6 volúmenes de isopropanol, incubar durante 30 min a -20°C. Centrifugar 10 min a 3000 rpm y lavar el pellet con etanol frío (-20°C, 70%). Centrifugar nuevamente 10 min a 3000 rpm, descartar el sobrenadante y dejar secar. Resuspender el pellet en 10 ml de buffer TE. Agregar 1,14 g CsCl₂/ml de buffer TE más 250 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Ultracentrifugar a 20°C 50K toda la noche. YO COMO LO HICE??? Agregar 2.5 volúmenes de EtOH a -20°C e incubar durante 25 min, centrifugar 10 min a 3000 rpm y lavar el pellet una vez con EtOH 70, Let the pellet get dried and resuspend it in 400 ul TE buffer

Recetas de las preparaciones:

- Buffer TE: 10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 7.5 ó 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0.

- *Transfección de células B16*: células B16 de melanoma murino fueron transfectadas con pcDNA6 (p6: vector vacío) ó pcDNA6-Lag1 (p6Lag-1: vector conteniendo la secuencia antisentido de Gal-1) usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para ello se cultivaron células en una placa de 24 pocillos y se dejaron crecer hasta que alcanzaron semiconfluencia. La transfección se realizó con 1,5-3 µg de plásmido (p6 y p6Lag1, respectivamente) siguiendo el protocolo recomendado por la compañía para el producto. Para seleccionar las células transfectadas se utilizó el antibiótico Blastidina (5 µg/ml) (Invitrogen).
- *Generación de clones por dilución límite*: se prepararon 4,6 ml de células en una concentración de 50 células/ml. Se colocaron 100 µl de la suspensión celular en las primeras tres filas de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se agregaron 4 ml de medio a la suspensión celular y se colocaron 100 µl de la preparación en las 3 filas siguientes. Finalmente, se agregaron 1,4 ml de medio a la suspensión y se completó la placa. Para este ensayo se utilizó medio DEMEM completo (10% SFB, 2mM glutamina) con Blastidina (5µg/ml). Se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo plano para evitar la aglutinación de células que puedan confundirse con la generación de un clon.
- *PONER MAPA DE PCDNA6 Y SECUENCIA DE GAL-1 ANTISENSE*

Cultivos celulares para ensayos de apoptosis.

- *Preparación de cultivos de células mononucleares*: A partir de bazo de ratón se obtuvieron células mononucleares por disgregación mecánica usando los protocolos estándar.
- *Preparación de medios condicionados tumorales*: los medios condicionados se generaron a partir de cultivos semiconfluentes de células B16 transfectadas (70% de la placa) cultivadas con medio fresco DEMEN (GIBCO) y glutamina (2mM) pero sin suero durante 18 hs a 37° C y en una atmósfera de 5% CO₂.
- *Ensayo de apoptosis*: se activaron 5x10⁵ células/ml con Con A (5 µg/ml) durante 72 hs y luego se cultivaron en presencia o ausencia de diluciones óptimas (1:2) de los medios condicionados tumorales a 37° C a una atmósfera de 5% CO₂ durante 18 hs. Al cabo de este tiempo, se recolectaron las células y se procesaron para la determinación del contenido células apoptóticas evaluadas por la técnica de Anexina-V (BD, Pharmingen). Brevemente, se

recolectan las células de cultivo, se lavan 2 veces con solución fisiológica (centrifugando 5 minutos a 2000 rpm cada vez), se resuspenden en buffer Anexina con el reactivo (FITC) y se incuban en hielo y oscuridad durante 10 min. Al cabo de ese tiempo los niveles de apoptosis se analizan por citometría de flujo y los histogramas se analizan mediante el software WinMDI.

Ratones:

Para nuestro estudio se utilizaron ratones hembra C57BL/6 de entre 8 a 10 semanas de vida. Para la generación de ascitis se utilizaron ratones atímicos (*nude*) de 8 a 10 semanas. Estos animales fueron mantenidos en el bioterio de la Fundación Leloir, siguiendo las reglas del comité de ética.

Desafío tumoral *in vivo*:

Las células de melanoma transfectadas (2×10^5 células/ 100 μ l PBS) fueron inyectadas en forma subcutánea en el flanco derecho del ratón. Los ratones fueron desafiados con B16/- (n: 21, 7 ratones por experimento) o los diferentes clones B16/C1, C2 y C3 (n: 27, 9 ratones por experimento). Los clones utilizados para el desafío fueron seleccionados considerando los diferentes niveles de expresión de Gal-1. El crecimiento tumoral fue monitoreado cada dos días midiendo los diámetros perpendiculares con un calibre métrico. El volumen tumoral fue estimado a través de la siguiente fórmula ($d^2 \times D \times 0,5$), en donde d es el diámetro menor y D el mayor. Por razones éticas los animales fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron un volumen cercano a 2 cm^3 . Los ratones que contenían un volumen tumoral menor a 0,5 cm^3 fueron considerados como ratones libres de tumor en el análisis estadístico de Kaplan Meier. Para los experimentos de re-desafío, se tomaron grupos de 5 ratones que no habían generado tumor luego de ser inoculados con C1 (20 días después de la primera inoculación) y fueron inoculados con el flanco opuesto con B16 salvaje. Ratones vírgenes de la misma edad fueron utilizados como control.

Ensayo de proliferación:

El crecimiento de las células tumorales fue monitoreado también *in vitro* utilizando el test colorimétrico MTT. Brevemente, células transfectadas con la construcción antisentido o el

vector control en etapa de crecimiento exponencial fueron lavadas con PBS 1x e incubadas durante 24 hs con DMEM sin suero para sincronizar el crecimiento. Luego se cultivan 103 células/pocillo en placa de 96 pocillos de fondo en U con medio DMEM completo. La proliferación celular fue determinada en intervalos de 24 hs reemplazando el medio de cultivo con 0,1 ml de la solución de MTT (Sigma). Luego de 2 hs a 37°C se agrega al pocillo 0,2 ml de solución bloqueante (90% isopropanol, 20% DMSO, 4% Tween 20). Finalmente se mide la absorbancia a 562 nm.

Evaluación histopatológica de los cortes de tumor:

- *Ensayo de TUNEL:* Los ratones fueron inoculados sc con 2×10^5 células de B16/- o C1, diez días después se extrajeron los tumores o el tejido correspondiente a la zona de inoculación, respectivamente. El tejido removido fue fijado en paraformaldehído (5%), embebido en parafina (FALTA PROTOCOLO) y procesado para su evaluación histopatológica. Los niveles de apoptosis fueron analizados mediante la técnica de TUNEL (Intergen) siguiendo las instrucciones indicadas para el producto. Esta técnica permite evaluar *in situ* el nivel de muerte celular presente en un tejido en un determinado momento. Para ello se utilizan anticuerpos anti-dioxigenina que reconoce las células muertas a través de la ruptura de su ADN nuclear.
- *Tinción con eosina y hematoxilina:* Se tomaron muestras de tejido representativas para cada tratamiento y se tiñeron con eosina y hematoxilina para determinar la presencia de infiltrado inmunológico a través de la observación del fenotipo celular. Para ello se desparafinaron los tejidos sumergiendo el preparado en xileno 2 veces durante 15 min, en EtOH (100%) 2 veces durante 5 min, en EtOH (96%) 2 veces durante 5 min, en EtOH (50%) 2 veces durante 5 min, en agua 2 veces durante 5 min y se enjuaga finalmente PBS. Se sumergen los preparados en hematoxilina, y se observan al microscopio hasta que se tiñan los núcleos (3-15 min, dependiendo del reactivo). Luego se colocan los cortes en agua corriente y se le coloca la eosina unos minutos. Se procede a la deshidratación nuevamente con alcohol 70%, 96%, 100% y por último xilol. Se dejan 5 min en cada solución. Finalmente se colocan unas gotas de bálsamo de Canadá, el cubre objetos y se deja toda la noche a TA para que solidifique.

- *Evaluación:* los estudios cualitativos y cuantitativos de ambas marcaciones fueron realizados a doble ciego por un patólogo en 5 o más muestras de diferentes ratones. Se evaluó el número de células mononucleares TUNEL-positivas por campo a 40X de aumento en microscopio óptico.

Depleción *in vivo* de la población linfocitaria:

Las subpoblaciones linfocitarias T CD4⁺, T CD8⁺ y NK1.1⁺ fueron eliminadas *in vivo* mediante la inoculación de anticuerpos monoclonales específicos.

- *Preparación de anticuerpos monoclonales:*
 - ✓ Ratonos nude: utilizamos ratones nude de 6 a 8 semanas, mantenidos en el bioterio del Insituto Leloir en forma libre de patógenos. Estos ratones fueron inoculados ip 2 semanas antes con 300 µl de Pristane (2,6,10,14-tetrametilpentadecano, Aldrich) para evitar la formación de tumores sólidos, promoviendo la generación del líquido ascítico que contiene los anticuerpos en solución.
 - ✓ Preparación de hibridomas: seleccionamos los hibridomas YTS 191.1 (ATCC) para CD4⁺, YTS 169.4 (ATCC) para CD8⁺ y 4D11 (ATCC) para NK1.1⁺. Fueron mantenidos en cultivo en medio RPMI (10% SFB, placa de cultivo 175 cm²) y posteriormente inoculados (ip, 1,5x10⁶/100µl) en ratones *nude* cuando el cultivo alcanzó un 90-100% de viabilidad en fase logarítmica de crecimiento. La viabilidad celular fue determinada utilizando el colorante vital de exclusión Trypan Blue. Inicialmente, es conveniente descongelar el hibridoma en 20% de suero fetal bovino.
 - ✓ Recolección de ascitis: a medida que se genera la ascitis (aproximadamente 15 días después) se va recuperando el líquido ascítico y se mantiene a -20°C hasta recolectar 10 ml provenientes de 7-8 ratones. La recolección se realiza en forma manual inmovilizando suavemente al ratón logrando que su abdomen quede estirado. Luego se inserta una jeringa (Terumo 1ml) en la cavidad abdominal, con el ratón cabeza abajo evitando así dañar algún órgano, y se extrae el líquido hasta que se interrumpa el flujo de salida. La recolección puede realizarse con una frecuencia de 2 a 3 días, dependiendo del hibridoma y del ratón, permitiendo la acumulación del líquido y una mayor concentración de los anticuerpos. Es importante controlar que los ratones no se deshidraten.

- ✓ Purificación de anticuerpos: una vez recolectada la ascitis procedemos a la purificación de los anticuerpos eliminando impurezas como grasas y otras proteínas que puedan interferir. Como primer paso se precipitan los anticuerpos con una solución saturada de sulfato de amonio saturado (disolver en agitador térmico 450 g de sulfato de amonio en 500 ml de agua, llevar a pH 7,5 con hidróxido de amonio). Para ello se agregan lentamente, por goteo y agitación en hielo, 10 ml de sulfato a 10 ml de ascitis. Se deja reposar durante 2 hs a TA. Centrifugar en tubos de 50 ml a 2000 rpm por 10 min a 4°C. Se descarta el sobrenadante (que debería ser límpido) y se recupera el precipitado, allí están los anticuerpos y otras proteínas contaminantes como la albúmina. Para eliminar las impurezas se realiza un paso más de purificación mediante la utilización de una columna de intercambio aniónico, DEAE-SEPHACEL (Diethylaminoethyl Sephacel, 10 ml, Weat bead size: 40-160 μ , capacity: 100-140 μ eq/ml/volume; SIGMA). Previamente, se agregan 3-4 ml de NaPO₄ (pH 8, 40 mM) para equilibrar la solución de proteínas precipitadas con la columna. Centrifugar y dejar reposar en hielo hasta que se disuelva el precipitado (sin hacer espuma). Luego se dializa la solución con agitación suave cuarto frío (4 cambios de 500 ml de NaPO₄ pH 8, 40 mM) removiendo los restos de sulfato de amonio. El volumen incrementa 2 veces. En paralelo se equilibra la columna de intercambio con 200 ml de NaPO₄ pH 8, 40 mM a TA (en frío cristaliza). Luego pasar el material dializado por la columna y colectar fracciones de 2-3 ml, la albúmina debería quedar retenida en la columna. Medir la concentración de proteína por absorbancia a 280 nm. Se concentra el anticuerpo a 2 ml centrifugando a 3000 g en *centriprep* YM10 (10000 NMWL, Centricom). Finalmente se calcula la concentración como: (DO/1,2 mg/ ml)
- *Eliminación de las subpoblaciones linfocitarias in vivo*: los anticuerpos (0.2 mg/ 300 μ l/inóculo) purificados fueron inoculados ip en ratones C57/BL6 los días -1, 1, 8, 15 y 22, considerando día 0 al día de la inoculación de las células tumorales (Diefenbach et al., 2001). Los ratones control fueron inoculados con IgG inespecífica siguiendo el mismo protocolo. La eliminación de las subpoblaciones fue confirmada en los nódulos linfáticos y células de bazo 7 días después del desafío tumoral mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para cada subpoblación. En general menos del 1,7 % de la población celular eliminada pudo ser detectada, comparado con el grupo de ratones inoculados con el anticuerpo control.

- *Evaluación de la progresión tumoral:* se repitió el protocolo de inoculación, medición y análisis mencionado anteriormente en el desafío tumoral *in vivo*.

Análisis *ex vivo* de los niveles de proliferación y secreción de citoquinas de linfocitos T:

Se purificaron células mononucleares de ganglios linfáticos drenantes o lejanos al sitio de inoculación tumoral mediante disgregación mecánica de los mismos. Estos ganglios fueron extraídos dos semanas después de la inoculación tumoral. Los linfocitos purificados se utilizaron para los siguientes ensayos:

- *Ensayo de proliferación linfocitaria:* se co-cultivaron 1×10^5 células T con 1×10^5 células tumorales B16/- ó EL-4, mitominizadas, en 200 μ l de medio RPMI (10% SFB, 2mM glutamina) en microplacas de 96 posillos fondo plano. Los cultivos se incubaron en estufa a 37° C y una atmósfera de 5% CO₂. Luego de 5 días se agregó 1 μ Ci de [³H]-Timidina (LifeSciences, Boston, MA) (50 Ci/mmol de actividad específica) por posillo durante 18 h. Al cabo de ese tiempo, se recuperan las células en un cosechador semiautomático, durante este proceso el ADN de cada cultivo es recuperado en un papel de filtro y posteriormente embebido en un tubo con 1 ml de tolueno. Finalmente se determinó la incorporación de timidina en un contador beta de centelleo líquido (Packard Instruments).
- *Evaluación de citoquinas:* siguiendo el protocolo experimental anterior, al cabo de 72 hs se recolectaron los medios condicionados generados por las células mononucleares re-estimuladas *in vitro*. Los niveles de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ fueron cuantificados en los sobrenadantes de cultivo utilizando kits de ELISA de captura específicos para cada citoquina (PharMingen) siguiendo las instrucciones recomendadas por el proveedor.
- *Mitominización de células tumorales:* las células tumorales fueron cultivadas un día antes del experimento para permitir que se adhieran a la placa. Unas horas antes del ensayo de proliferación y evaluación de citoquinas fueron mitominizadas (mitomicina, 25 μ g/ml) durante 20 min a 37°C, 5% CO₂. Luego, las células fueron lavadas exhaustivamente con solución fisiológica para evitar que la mitomicina inactive las células mononucleares. Este tratamiento permite utilizar células tumorales como estimuladoras antigénicas evitando la liberación de factores tumorales que puedan afectar la correcta evaluación de los linfocitos T purificados.

Análisis estadístico realizado:

Para el análisis estadístico de los resultados se realizaron *test t de Student*, utilizando el programa GraphPad InStat 3.05.

Capítulo 2**Ratones:**

Para los ensayos de angiogénesis con Matrigel se utilizaron ratones hembra C57BL/6 de entre 8 a 10 semanas de vida. Estos animales fueron mantenidos en el bioterio del *Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro* (IST, Génova, Italia) siguiendo las reglas del comité de ética. Para los ensayos de crecimiento tumoral se utilizaron ratones atímicos (*nude*) mantenidos en la facultad de medicina de la UBA siguiendo las reglas del comité de ética.

Líneas celulares:

La línea tumoral KS-Imm fue derivada de un paciente no-HIV e inmortalizada sin signos de senescencia desde de más de 120 pasajes in vitro. Esta línea comparte marcadores comunes y comportamiento biológico con las células KS típicas con forma ahusada (Albini et al., 1997).

Matrigel:

El matrigel es un soporte inerte, soluble y estéril compuesto por extractos de las proteínas de la membrana basal libre de células derivadas del tumor EHS. El matrigel es inyectado en el ratón a 4°C, y se solidifica adquiriendo una consistencia de gel (*pellet*) al alcanzar la temperatura corporal del ratón (37°C). El matrigel en nuestros ensayos fue generado en el *Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro*, IST, Génova, Italia. Se conserva a -20°C, usualmente a una concentración de 10-15 mg/ml, se descongela durante toda la noche a 4°C y melifica a 24-37°C en 30 min. Una vez gelificado no puede re-disolverse. Esta es un material muy útil dado que una vez colocadas las células sobre el matrigel estas se asocian usualmente en tres dimensiones formando estructuras similares a las que generarían en su tejido de origen (Kleinman HK and Martin GR, 2005).

Para ensayo de angiogénesis acelular *in vivo*:

Se realizaron implantes de matrigel conteniendo Gal-1 recombinante (1,5-3 μ g) en ratones C57/BL6. Brevemente, se prepara la solución de matrigel con la proteína siempre en hielo, se inyecta en el franco lateral del ratón con jeringas de tuberculina previamente enfriadas (toda la noche a -20°C). Luego de 5 ó 6 días se extirpa el pellet de matrigel y se evalúa fenotípicamente el nivel de hemorragia por observación y se mide el contenido de hemoglobina.

- *Evaluación de los niveles de hemoglobina en los pellets de Matrigel:* Para evaluar los niveles de hemoglobina generados durante el tratamiento se realiza el siguiente procedimiento: se pesaron los *pellets* y se disgregan en agua utilizando un bisturí. Se incubaron 10 min a temperatura ambiente, se centrifuga a máxima velocidad durante 2 min. Se tomó el sobrenadante y el contenido de hemoglobina se evaluó mediante el kit Drabkin (Sigma) midiendo la absorbancia (DO) a 540 nm. El número relativo de hemoglobina se calculó normalizando el valor de absorbancia obtenido como: (mg pellet X DO)/100mg pellet.

Formación de la lesión KS-símil utilizando la línea KS-Imm en ratones nude:

Para este ensayo se utilizaron ratones nu/nu saludables de 10 semanas mantenido en condiciones libres de patógeno en el bioterio de la FMED, UBA. Brevemente, las células tumorales KS y KS/AS fueron inoculadas en ratones *nude* (5×10^6 células/300 μ l medio conteniendo 150 μ l de matrigel). Se utilizó matrigel para inocular las líneas tumorales humanas para favorecer el crecimiento tumoral en un sistema xenogéneo (Fridman R et al, J Natl Cancer Inst 1991, 83: 769-74). Luego de 15 días los tumores son extraídos, fijados y embebidos en parafina para su posterior análisis.

Ensayo de hipoxia:

Se cultivaron 5×10^4 células de KS WT en placas de 24 pocillos con medio DMEM completo (2mM glutamina, 10 % SFB). Al día siguiente se las coloca en la cámara de hipoxia a 3% ó 0,1% de O_2 . Estas concentraciones se obtienen generando una atmósfera hipóxica en una cámara de acrílico hermética (Ruskin Technologies, Guiseley, UK) en donde la mezcla de

gases esta compuesta por 95% N₂, 5% CO₂, 0,1 ó 3% O₂; con humedad relativa a 37°C. (Pedir a Diego como lo escribió en su tesis). La placa control fue incubada en estufa a 37°C y 5% CO₂ en los mismos períodos de tiempo. Se trabajó con 24 y 48 hs. La expresión de Gal-1 fue evaluada en extractos proteicos totales o proteínas extraídas de los medios condicionados generados en las mismas condiciones, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente.

Para evaluar la relevancia del factor de transcripción NF-κB en el aumento de expresión e Gal-1 frente a hipoxia se bloqueo la translocación al mismo utilizando Sulfasalacina.

Ensayo de migración e invasión:

Se utilizó un ensayo rápido y simple para medir cuantitativamente invasión y migración tumoral a través de matrigel. Este matrigel fue desarrollado por la Dra. Adriana Albini (IST, Génova, Italia). El matrigel se coloca un papel de filtro con pipeta fría (evitando su solidificación) sobre cámaras de Boyden. Debajo del filtro se coloca una solución quicio-attractante y sobre el filtro las células tumorales. Se incuba en estufa a 37°C, 5% CO₂ durante 4-6 horas. Luego se desarma la cámara, se extrae el papel de filtro, se lava y se fijan y tiñen las células con *colorante vital*. Finalmente, se cuentan seleccionando campos al azar las células que atravesaron el matrigel utilizando un microscopio óptico.

IX Anexo

X Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

B16/-: célula de melanoma B16 transfectada con el vector pcDNA6 vacío

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

EtOH: etanol

Ip: intraperitoneal

Min: minutos

PBS: solución fisiológica

Sc: subcutáneo

SFB: suero fetal bovino

TDG: tiodigalactósido

TA: temperatura ambiente

SFCM: serum free conditioned medium

XI Trabajos Publicados

XI.A Papers que surgieron de estas tesis

☛ Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N. W., Toscano, M. A., Ilarregui, J. M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O. L. & Rabinovich, G. A. 2004 Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 5, 241-51.

☛ Rubinstein N, Paleari L, Toscano M, Ilarregui J, Campagna L, Albini A and Rabinovich G. Galectin-1 induces angiogenesis in vivo. *Manuscrito en preparación*.

XI.B Papers que surgieron durante el transcurso de esta tesis

☛ Rabinovich GA, Rubinstein N, Matar P, Rozados V, Gervasoni S, Fainboim L, Scharovsky GO. The antimetastatic effect of a single low doses of cyclophosphamide involves modulation of Galectin-1 and Bcl-2 expression. *Cancer Immunology Immunotherapy*; 2002, 50: 587-603

☛ L Dettin, N Rubinstein, A Aoki, G Rabinovich, C Maldonado. Regulated expression and ultraestructural localization of galectin-1 (a pro-apoptotic β -galactoside-binding lectin), during spermatogenesis in rat testis. *Biology of Reproduction*. 2003; 68: 51-9

☛ L Santucci, S Fiorucci, N Rubinstein, A Mencarelli, B Federici, G Rabinovich, A Morelli. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology*. 2003; 24:1381-94

☛ Rabinovich GA, Rubinstein N, Matar P, Rozados V, Gervasoni S, Scharovsky GO. The antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide involves modulation of galectin-1 and Bcl-2 expression. *Cancer Immunol Immunother*. 2002 Jan;50(11):597-603

☛ Rabinovich GA, Ramhorst RE, Rubinstein N, Corigliano A, Daroqui MC, Kier-Joffe EB, Fainboim L. Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. *Cell Death Differ*. 2002 Jun;9(6):661-70.

Agradecimientos

A mis viejos por todo.

A Gabriel por un trabajo de tesis sólido y completo. Especialmente por prepararme a defender mis ideas “a capa y espada” y a investigar con pasión.

A March, Yoni y Gertru por ser los mejores compañeros de laburo y aventuras que pude tener.

A los del 107 de Campomar por enseñarme tantas cosas. Especialmente a Marianete, Fede y Andre.

A Osvaldo Podhajcer por hacerme un lugar.

A la familia por estar siempre. Especialmente a las abuelas y a Carlitos.

A Leti por ser mi hermana elegida.

A mis amigos de aquí y de allá por tanto tanto tanto tanto tanto soporte espiritual.

A los amigos del Lab Satz y del viejo por tantas cosas que mejor no digo porque ellos siguen ahí. Especialmente a Rochy, Mer, Aspid, Leo, Pau, Vir y Guille.

A Juli por compartir conmigo su familia.

A los que quedaron en el camino pero aportaron su ladrillo.

A CONICET por el soporte económico. INVESTIGAR ES TRABAJAR.

A todos las organizaciones que aportaron económicamente para poder desarrollar ideas y experimentos. Especialmente a Sales.

A R por tanto amor comprimido y especialmente por llenar mi vida de risa.

XII Referencias (por orden alfabético)

- Albini, A. et al., 1988. Invasive activity and chemotactic response to growth factors by Kaposi's sarcoma cells. *J Cell Biochem*, 36(4): 369-76.
- Albini, A. et al., 1997. The beta-core fragment of human chorionic gonadotrophin inhibits growth of Kaposi's sarcoma-derived cells and a new immortalized Kaposi's sarcoma cell line. *Aids*, 11(6): 713-21.
- Anichini, A., Vegetti, C. and Mortarini, R., 2004. The paradox of T-cell-mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma. *Cancer Immunol Immunother*, 53(10): 855-64.
- Bergers, G. and Benjamin, L.E., 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3(6): 401-10.
- Blaser, C. et al., 1998. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol*, 28(8): 2311-9.
- Boon, T. and Van den Eynde, B., 2003. Tumour immunology. *Curr Opin Immunol*, 15(2): 129-30.
- Camby, I. et al., 2001. Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathol*, 11(1): 12-26.
- Cheng, F. et al., 2003. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity*, 19(3): 425-36.
- Chung, C.D., Patel, V.P., Moran, M., Lewis, L.A. and Miceli, M.C., 2000. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol*, 165(7): 3722-9.
- Clausse, N., van den Brule, F., Waltregny, D., Garnier, F. and Castronovo, V., 1999. Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. *Angiogenesis*, 3(4): 317-25.
- Cummins, E.P. and Taylor, C.T., 2005. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch*, 450(6): 363-71.

- Danguy, A., Camby, I. and Kiss, R., 2002. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1572(2-3): 285-93.
- Daniels, M.A., Hogquist, K.A. and Jameson, S.C., 2002. Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat Immunol*, 3(10): 903-10.
- Dettin, L., Rubinstein, N., Aoki, A., Rabinovich, G.A. and Maldonado, C.A., 2003. Regulated expression and ultrastructural localization of galectin-1, a proapoptotic beta-galactoside-binding lectin, during spermatogenesis in rat testis. *Biol Reprod*, 68(1): 51-9.
- Dias-Baruffi, M. et al., 2003. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. *J Biol Chem*, 278(42): 41282-93.
- Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M. and Raulet, D.H., 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*, 413(6852): 165-71.
- Dong, H. et al., 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*, 8(8): 793-800.
- Duguay, D. et al., 2002. In vivo interferon regulatory factor 3 tumor suppressor activity in B16 melanoma tumors. *Cancer Res*, 62(18): 5148-52.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. and Schreiber, R.D., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3(11): 991-8.
- Dunn, G.P., Old, L.J. and Schreiber, R.D., 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2): 137-48.
- Feizi, T., 2000. Progress in deciphering the information content of the 'glycome'--a crescendo in the closing years of the millennium. *Glycoconj J*, 17(7-9): 553-65.
- Friberg, M. et al., 2002. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer*, 101(2): 151-5.
- Fukumori, T. et al., 2003. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res*, 63(23): 8302-11.
- Geertsen, R., Hofbauer, G., Kamarashev, J., Yue, F.Y. and Dummer, R., 1999. Immune escape mechanisms in malignant melanoma. *Int J Mol Med*, 3(1): 49-57.
- Ghosh, P. et al., 1995. Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *J Natl Cancer Inst*, 87(19): 1478-83.

- Gorelik, L. and Flavell, R.A., 2001. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med*, 7(10): 1118-22.
- Guerra, L., Mordoh, J., Slavutsky, I., Larripa, I. and Medrano, E.E., 1989. Characterization of IIB-MEL-J: a new and highly heterogenous human melanoma cell line. *Pigment Cell Res*, 2(6): 504-9.
- Hu, H.M., Urba, W.J. and Fox, B.A., 1998. Gene-modified tumor vaccine with therapeutic potential shifts tumor-specific T cell response from a type 2 to a type 1 cytokine profile. *J Immunol*, 161(6): 3033-41.
- Hung, K. et al., 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*, 188(12): 2357-68.
- Iglesias, M.M., Rabinovich, G.A., Ivanovic, V., Sotomayor, C. and Wolfenstein-Todel, C., 1998. Galectin-1 from ovine placenta--amino-acid sequence, physicochemical properties and implications in T-cell death. *Eur J Biochem*, 252(3): 400-7.
- Igney, F.H. and Krammer, P.H., 2002. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol*, 71(6): 907-20.
- Kairiyama, C. et al., 1995. Biologic, immunocytochemical, and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN. *Pigment Cell Res*, 8(3): 121-31.
- Kelly, J.M. et al., 2002. Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat Immunol*, 3(1): 83-90.
- Kerbel, R. and Folkman, J., 2002. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 2(10): 727-39.
- Khong, H.T. and Restifo, N.P., 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*, 3(11): 999-1005.
- Kopitz, J. et al., 2001. Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. *J Biol Chem*, 276(38): 35917-23.

- Lahm, H. et al., 2001. Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *J Cancer Res Clin Oncol*, 127(6): 375-86.
- Ledda, M.F. et al., 1997. Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med*, 3(2): 171-6.
- Liu, F.T., 2000. Galectins: a new family of regulators of inflammation. *Clin Immunol*, 97(2): 79-88.
- Lowe, J.B., 2001. Glycosylation, immunity, and autoimmunity. *Cell*, 104(6): 809-12.
- Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J. and Ferrone, S., 2000. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*, 74: 181-273.
- Morvillo, V., Bover, L. and Mordoh, J., 1996. Identification and characterization of a 14 kDa immunosuppressive protein derived from IIB-MEL-J, a human melanoma cell line. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 42(5): 779-95.
- Nguyen, J.T. et al., 2001. CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J Immunol*, 167(10): 5697-707.
- Nyberg, P., Xie, L. and Kalluri, R., 2005. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res*, 65(10): 3967-79.
- O'Connell, J., Houston, A., Bennett, M.W., O'Sullivan, G.C. and Shanahan, F., 2001. Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma. *Nat Med*, 7(3): 271-4.
- Papetti, M. and Herman, I.M., 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(5): C947-70.
- Pardoll, D., 2003. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*, 21: 807-39.
- Pardoll, D.M., 2002. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2(4): 227-38.
- Perillo, N.L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J. and Baum, L.G., 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378(6558): 736-9.

- Phan, G.Q. et al., 2003. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14): 8372-7.
- Rabinovich, G.A., 1999. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ*, 6(8): 711-21.
- Rabinovich, G.A., 2000. Apoptosis as a target for gene therapy in rheumatoid arthritis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95 Suppl 1: 225-33.
- Rabinovich, G.A. et al., 1999a. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology*, 97(1): 100-6.
- Rabinovich, G.A. et al., 1999b. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med*, 190(3): 385-98.
- Rabinovich, G.A. et al., 1998. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol*, 160(10): 4831-40.
- Rabinovich, G.A. et al., 1997. Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-I, a beta-galactoside-binding lectin. *J Biochem (Tokyo)*, 122(2): 365-73.
- Rabinovich, G.A., Riera, C.M. and Iribarren, P., 1999c. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor protects dendritic cells from liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate-induced apoptosis through a Bcl-2-mediated pathway. *Eur J Immunol*, 29(2): 563-70.
- Rabinovich, G.A., Rubinstein, N. and Fainboim, L., 2002a. Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *J Leukoc Biol*, 71(5): 741-52.
- Rabinovich, G.A. et al., 2002b. The antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide involves modulation of galectin-1 and Bcl-2 expression. *Cancer Immunol Immunother*, 50(11): 597-603.
- Rabinovich, G.A., Sotomayor, C.E., Riera, C.M., Bianco, I. and Correa, S.G., 2000. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol*, 30(5): 1331-9.

- Ramirez-Montagut, T., Turk, M.J., Wolchok, J.D., Guevara-Patino, J.A. and Houghton, A.N., 2003. Immunity to melanoma: unraveling the relation of tumor immunity and autoimmunity. *Oncogene*, 22(20): 3180-7.
- Restifo, N.P., 2001. Countering the 'counterattack' hypothesis. *Nat Med*, 7(3): 259.
- Rubinstein, N. et al., 2004. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*, 5(3): 241-51.
- Santucci, L. et al., 2003. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology*, 124(5): 1381-94.
- Shankaran, V. et al., 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832): 1107-11.
- Smyth, M.J., Godfrey, D.I. and Trapani, J.A., 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2(4): 293-9.
- Strieter, R.M., 2005. Masters of angiogenesis. *Nat Med*, 11(9): 925-7.
- Tinari, N. et al., 2001. Glycoprotein 90K/MAC-2BP interacts with galectin-1 and mediates galectin-1-induced cell aggregation. *Int J Cancer*, 91(2): 167-72.
- Uyttenhove, C. et al., 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*, 9(10): 1269-74.
- van den Brule, F.A. et al., 1995. Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin. *Biochem Biophys Res Commun*, 209(2): 760-7.