



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

“Estudio del impacto de la modulación de galectina-1 endógena en la inducción de la tolerancia inmunológica en cáncer de próstata y desarrollo de una estrategia original de inmunoterapia”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Mg. Enrique Sebastián Corapi

Director de tesis: Dr. Diego José Läderach.
Consejera de estudios: Dra. Verónica García.

Fecha de defensa: 4 de marzo 2020,
Buenos Aires,
Argentina

“ESTUDIO DEL IMPACTO DE LA MODULACIÓN DE GALECTINA-1 ENDÓGENA EN LA INDUCCIÓN DE LA TOLERANCIA INMUNOLÓGICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA Y DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA ORIGINAL DE INMUNOTERAPIA”.

RESUMEN

La identificación de nuevas terapias eficaces para el tratamiento del cáncer de próstata (CaP) requiere una mejor comprensión de las múltiples interacciones moleculares entre las células tumorales y su microambiente asociado. En este contexto, la galectina-1 (Gal-1) es una molécula clave en la determinación del microambiente asociado al carcinoma prostático; por lo tanto, resulta esencial poder entender los procesos moleculares en los que esta proteína está involucrada. La mayoría de los estudios previos encontrados en la literatura se han centrado en las propiedades de remodelación microambiental de la Gal-1 secretada por el tumor, ejercida a través de sus interacciones con los glico-receptores en la membrana celular y la matriz extracelular. Esta tesis muestra aspectos originales de esta lectina centrándose en el papel de la Gal-1 endógena de los linfocitos en el control la respuesta inmune en un contexto de CaP. Usando un modelo murino preclínico de CaP *in vitro*, nuestros resultados logran demostrar que la Gal-1 endógena de los linfocitos modula su tasa de proliferación y función citotóxica, mismo en condiciones de alta concentración extracelular de Gal-1, la cual es principalmente secretada por las células tumorales. En tales condiciones, la ausencia de Gal-1 en los linfocitos T potencia la respuesta inmune antitumoral. Un estudio más detallado demostró que la Gal-1 endógena en los linfocitos T CD4+, pero principalmente en las células T CD8+, actúa como un regulador negativo de la inmunidad antitumoral. El desafío tumoral *in vivo* luego de una transferencia adoptiva de linfocitos salvajes o carentes de Gal-1 a ratones Nude, mostró que cuando esta lectina está ausente en los linfocitos transferidos se produce un retraso en la cinética de aparición y una menor tasa de duplicación de los tumores. En resumen, se demostró que los tumores de próstata requieren de Gal-1 en los linfocitos para evadir las respuestas inmunes, por lo que a partir de este conocimiento básico, nos propusimos desarrollar un método para regular negativamente la expresión intrínseca de esta galectina específicamente en los linfocitos T. Bajo las premisas que debe ser de utilización simple, con reproducibilidad biológica, aplicable tanto a situaciones *in vitro* como *in vivo*, específico para el blanco celular de interés (en nuestro caso los linfocitos T CD8+) y aplicable a sistemas murinos como humanos para mejorar su carácter traslacional, desarrollamos una herramienta molecular. Consiste en un ARN quimérico que acopla un shRNA específico contra Gal-1 (que es capaz de regular negativamente la expresión de esta lectina en un 90%, tanto en células murinas como humanas), a un aptámero 4-1BB capaz de interactuar de manera específica con linfocitos T CD8+ activados. El análisis de las propiedades funcionales en los linfocitos T CD8+ tanto *in vivo* como *in vitro* arrojó resultados análogos a los obtenidos en el modelo de ratones deficientes, sentando las bases para una potencial inmunoterapia original en CaP.

"STUDY OF THE IMPACT OF ENDOGENOUS GALECTIN-1 MODULATION IN THE INDUCTION OF IMMUNOLOGICAL TOLERANCE IN PROSTATE CANCER AND DEVELOPMENT OF AN ORIGINAL IMMUNOTHERAPY STRATEGY".

ABSTRACT

The identification of effective new therapies for prostate cancer (PCa) requires a better understanding of the multiple molecular interactions between tumor cells and their associated microenvironment. In this context, galectin-1 (Gal-1) is a key molecule in the determination of the prostatic carcinoma microenvironment; therefore, it is essential to understand all the molecular processes in which this protein is involved. Most of the previous studies found in the literature have focused on the microenvironment remodeling properties of tumor-secreted Gal-1, through its interactions with the glyco-receptors at the cell membrane and the extracellular matrix. This thesis shows original aspects of the lectin by focusing on the role of lymphocyte endogenous Gal-1 in controlling anti-prostate tumor immunity. Using a murine preclinical model of prostate cancer, our results demonstrate that endogenous Gal-1 in lymphocytes modulates their proliferative rate and cytotoxic function in conditions of high extracellular Gal-1 concentration, mainly secreted by the tumor cells. In such conditions, the absence of Gal-1 in T lymphocytes potentiates anti-tumor immune responses. Further studies demonstrated that endogenous Gal-1 in CD4+, but mainly in CD8+ T cells, acts as a negative regulator of anti-tumor immunity. The *in vivo* tumor challenge after an adoptive transfer of wild type or Gal-1 lacking lymphocytes into Nude mice, showed that when this lectin is absent in the transferred lymphocytes, there is a delay in the kinetics of appearance and a lower duplication rate of the tumors. In summary, it was shown that prostate tumors require Gal-1 in the lymphocytes to evade immune responses, based on this basic knowledge; we develop a method to negatively regulate the intrinsic expression of this galectin specifically in T lymphocytes. This method should be simple to use, with biological reproducibility, applicable in both *in vitro* and *in vivo* situations, specific for the target cell of interest (in our case the CD8+ T lymphocytes) and applicable to murine systems and humans to improve its translational character. Accordingly developed an RNA 4-1BB shGal-1 (Apt 4-1BB/shGal-1) aptameric chimera, using a specific shRNA against Gal-1 which is capable of downregulating the expression of this lectin by 90%, both in murine and human cells, coupled to an 4-1BB aptamer capable of interacting specifically with activated CD8+ T lymphocytes. The analysis of functional properties in CD8+ T lymphocytes both *in vivo* and *in vitro* yielded results analogous to those obtained in the KO model, laying the groundwork for an original potential immunotherapy in PCa.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados de la siguiente tesis han sido publicados en:

Corapi E, Carrizo G, Compagno D, Laderach D. Endogenous Galectin-1 in T Lymphocytes Regulates Anti-prostate Cancer Immunity. *Front Immunol.* 2018;9.

doi:10.3389/fimmu.2018.02190

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, que me permitió recibir una educación de excelencia, pública y gratuita.

A la UBA, el CONICET y la Biothera foundation por haber proporcionado las becas que me permitieron dedicarme al desarrollo de la presente tesis.

A la ANPCyT, el CONICET, la UBA y la WWCR que proporcionaron los fondos necesarios para el desarrollo de nuestro trabajo como así también la posibilidad de viajar a centros de investigación en el exterior.

Al departamento de Química Biológica de la FCEyN, por brindar el espacio, infraestructura y equipamiento necesario para poder desarrollar nuestro trabajo diario.

A Diego, mi director de tesis, por haberme guiado y acompañado durante todos estos años en el duro camino de hacer ciencia. Fue muy desafiante y complejo, pero llegamos a resultados de los que puedo estar orgulloso.

A Daniel, co-director de nuestro laboratorio, por su predisposición incondicional para resolver dudas y necesidades en cualquier momento, como así también su aporte invaluable en la interpretación de resultados y observaciones.

A mis compañeros de laboratorio (Carli, Caro, Dani, Yami, Yor,) y en especial a Nacho y Gustavo, por ayudarme en este sinuoso camino de hacer ciencia. Por estar ahí para todo lo que se precise independientemente del día y el horario.

A mis profesores, todos ellos, por haberme ensañado no solamente en lo académico, sino también en lo personal, haciendo que pueda comprender mucho más de lo que jamás hubiera pensado. Espero poder aplicar y transmitir el conocimiento que me legaron, aunque sea una parte.

A P. Vázquez y V. Pastor por haberme ayudado en mis comienzos, hacerme sentir bienvenido cada vez que fui a sus laboratorios y ayudarme siempre que necesité...muchas, pero muchas gracias.

A mis compañeros de Qb con quienes compartí ideas, lugar de trabajo y experiencias que hicieron de mi paso por el departamento algo memorable.

A todos los investigadores que me permitieron hacer uso de sus laboratorios en cualquier momento o medida. Especialmente a Ale G., Martin M., Eduardo C., Paula P., Silvia R. y María del Carmen Ríos.

A todo el personal de apoyo a la investigación que colaboró con mi trabajo diario, técnicos, profesionales y personal de maestría en especial a Flor y a Fran. A Guillermo Piassa, quien se quedó hasta altas horas de la noche pasándonos tubos en el citómetro sin importar cuantas horas llevábamos de atraso.

Un apartado en estos agradecimientos también debe ser exclusivo para M. Fea y S. Sabatini indispensable en tantos momentos durante estos años donde las fuerzas flaqueaban, a sus oídos para escuchar, sus chistes para levantar y su amistad incondicional.

A mis compañeros de ayudantía, con quienes pude compartir el placer de hacer docencia.

A mis compañeros de extensión de Ciencia a Mano, Poper Stand up científico y Ciencia Recreativa con quienes nos hicimos tiempo para llevar la ciencia y alegría a todo lugar donde nos fue posible, gracias por estar ahí apoyando con la idea de que el conocimiento que no se comparte es conocimiento perdido.

A mis padres y familia, por haberme ayudado en todo momento con lo que necesite, soportar que tantas veces los haya reemplazado por el laboratorio durante el fin de semana. Y por mostrarme que con esfuerzo se consigue lo que se desea.

A mis hermanos de sangre José y Luis y aquellos que la vida me regalo, por bancarme en todas y estar ahí siempre que preciso, con el mate servido y un abrazo sincero.

A Mimi quien debería ser co-autora de este manuscrito, porque doctorarme es tan merito mío como suyo, por ayudarme a capear todas las tempestades de la vida y estar ahí siendo el puerto seguro al cual llegar.

Por último, quiero agradecer a quienes dedico esta tesis y todo el esfuerzo invertido...a mis bisabuelos quienes a pesar de todas las limitaciones supieron inculcar el valor del coraje, el estudio y el esfuerzo que hizo que tres generaciones más tarde, uno de nosotros este optando por el título máximo que puede ofrecer una universidad.

Esta tesis está dedicada a mis bisabuelos,

Abreviaturas

ABREVIATURAS

- ABRIM: ganglios linfáticos axilares, braquiales, inguinales y mesentéricos.
- ACK: *buffer* Amonio-Cloruro-Potasio; utilizado para la lisis de eritrocitos.
- ADCC: citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos.
- ADN: ácido desoxiribonucleico.
- ADNc: ADN copia obtenido por retrotranscripción a partir del ARN.
- AEPS: espacio extraprostático anterior.
- AEPS: espacio extraprostático anterior.
- AFM: microscopía de fuerza atómica.
- AFMS: estroma fibromuscular anterior de la próstata.
- AIET: terapia de mejora inmunológica autóloga.
- Alexa 488: fluróforo ampliamente utilizado en citometría de flujo, con características similares.
- APC: alofocianina; fluróforo ampliamente utilizado en citometría de flujo.
- Apt-shGal-1: aptámero de RNA acoplado a shRNA contra Gal-1.
- Apt-shSCRBL: aptámero de RNA acoplado a shRNA aleatorio.
- ARN: ácido ribonucleico.
- ARNi: ARN interferentes.
- ARNm: ARN mensajero.
- ATCC: colección de tipos celulares americana; *american type culture collection*.
- ATP: adenosina trifosfato.
- BCR: receptor de células B.
- BPH: hiperplasia prostática benigna; *benign prostatic hyperplasia*.
- C57BL/6: cepa endogámica de ratón de laboratorio.
- CaP: cáncer de próstata.
- CAR: receptor de antígenos quimérico.
- CD: células dendríticas.
- CD#: clúster de diferenciación número.
- CE: electroforesis capilar.
- CFSE: carboxifluoresceín N-succinimidil éster; reactivo utilizado para detectar división celular.
- CPA: células presentadoras de antígeno.
- CRD: dominios de reconocimientos de carbohidratos.
- CRPC: cáncer de próstata resistente a la castración; *castration-resistant prostate cancer*.
- CSC: células madre cancerosas; *cancer stem cells*.
- CTL: linfocito T citotóxico (inmunofenotipo CD3+CD8+).
- CTLA-4: antígeno 4 del linfocito T citotóxico.

CZ: zona central de la próstata.
D10: medio DMEM suplementado con 10% SFB, antibióticos e insulina.
DAMP: patrones moleculares asociado al daño.
dc: doble cadena.
DMEM: medio de cultivo celular; Dulbecco's modified eagle medium.
DMSO: dimetilsulfóxido; criopreservante celular.
dNTPs: desoxinucleótido tri-fosfato.
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; agente quelante de iones.
EJD: conducto eyaculatorio.
FACS: selección celular activada por fluorescencia.
FITC Fluoresceína isotiocianato; fluróforo ampliamente utilizado en citometría de flujo.
Gal-: Galectina.
Gals: galectinas.
HG-PIN: neoplasia intraepitelial prostática de alto grado.
HSC: célula madre hematopoyética multipotente.
IF: Inmunofluorescencia.
Ig: inmunoglobulina.
IHQ: inmunohistoquímica.
IL: interleuquina.
IR: receptor de insulina.
iTreg: linfocitos T regulatorios inducibles.
KO: deficiente en un gen o proteína (knock out).
Li: linfocito.
mAb: anticuerpos monoclonales.
MEC: matriz extracelular.
MFI: intensidad de fluorescencia media; *mean fluorescence intensity*.
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.
NK: células asesinas naturales.
nTregs: linfocitos T regulatorios naturales.
Nude: ratones atímicos inmunodeficientes.
ON: durante la noche; *overnight*
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos; *pathogen-associated molecules*.
PBS: buffer fosfato salino.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa; *polymerase chain reaction*.
PE: ficoeritrina; fluróforo ampliamente utilizado en citometría de flujo.
PerCP: proteína clorofila peridina; fluróforo ampliamente utilizado en citometría de flujo.
PFA: para-formaldehído.

PI: yoduro de propidio; *propidium iodide*.

PIN: neoplasia intraepitelial prostática.

PRR: receptores de reconocimiento de patrones; *pathogen recognition receptor*

PSA: antígeno prostático específico; *prostatic-specific antigen*.

PZ: zona periférica de la próstata.

R10: medio RPMI suplementado con 10% SFB y antibióticos.

RA: receptor de andrógenos.

RPMI 1640: medio de cultivo celular; Rosewell Park Memorial Institute 1640.

RT-qPCR: retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, en tiempo real.

sc: Vía subcutánea de administración de sustancias.

sc: simple cadena.

SELEX: evolución sistemática de los ligandos mediante enriquecimiento exponencial.

SFB: Suero fetal bobino.

SPR: resonancia de plasmón de superficie biacore.

STUI: síntomas del tracto urinario inferior.

TAE Buffer Tris-Acetato-EDTA; utilizado en electroforesis en geles de agarosa.

T-C1: TRAMP-C1, línea celular de cáncer de próstata murino derivada de un tumor; *TRansgenic Adenocarcinoma*.

TCR: receptor de las células T.

TDA: terapias de deprivación androgénica.

TGF- β : factor de crecimiento tumoral β .

Th: células T auxiliares.

TIL: linfocitos infiltrantes de tumores.

TILs : linfocitos infiltrantes al tumor; *tumor-infiltrating lymphocytes*.

TNF-R: receptores miembros de la familia de factores de necrosis tumoral.

Treg: linfocitos T regulatorios.

TZ: zona de transición de la próstata.

Valor *P*: valor de significancia estadística de un resultado.

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial.

WB: Western Blot.

WT: hace referencia a la condición "salvaje" de un ratón; *wild type*.

ZP: Zona periférica de la próstata.

β -MET: β -mercaptoetanol.

Índice

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
PUBLICACIONES	4
ABREVIATURAS	11
INDICE	15
INTRODUCCIÓN	19
CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE EL SISTEMA INMUNOLÓGICO	19
<i>Generalidades</i>	19
LINFOCITOS T	22
<i>Diferenciación</i>	22
<i>Presentación antigénica</i>	22
<i>Activación y función de células T</i>	23
<i>Tolerancia de células T</i>	27
CÁNCER DE PRÓSTATA	30
<i>La próstata: Anatomía, histología y patología</i>	30
<i>Patologías prostáticas</i>	32
<i>Epidemiología</i>	35
<i>Progresión de la enfermedad y síntomas</i>	36
<i>Tratamientos</i>	37
INMUNOTERAPIA	39
CÁNCER Y GLICOBIOLOGÍA	41
<i>Galectinas, generalidades</i>	41
<i>Galectinas y Cáncer</i>	45
APTÁMEROS	47
<i>Generalidades</i>	47
<i>Aptámeros en la clínica</i>	51
<i>Aptámeros como herramienta terapéutica</i>	52
<i>Aptámero ARN contra 4-1bb</i>	54
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	56
MATERIALES Y MÉTODOS	58
MATERIALES	58

<i>Ratones</i>	58
<i>Líneas celulares</i>	59
<i>Anticuerpos utilizados</i>	60
<i>Plásmidos</i>	60
<i>Secuencias</i>	61
MÉTODOS.....	62
<i>Mantenimiento de células en cultivo</i>	62
OBTENCIÓN DE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE.....	63
<i>Células presentadoras de Antígenos (CPA)</i>	63
<i>Células linfoides</i>	63
<i>Enriquecimiento celular por FACS</i>	64
<i>Ensayos de proliferación linfocitaria in vitro por dilución de CFSE</i>	65
<i>Ensayos in vitro de degranulación por movilización de CD107a</i>	66
<i>Ensayo de determinación de apoptosis por marcación con Anexina V</i>	66
<i>Ensayos de transwell</i>	67
<i>Análisis por citometría de flujo</i>	68
<i>Preparación de lisados celulares</i>	68
<i>Células dendríticas autólogas derivadas de médula ósea</i>	69
<i>Transferencia adoptiva y desafío tumoral in vivo</i>	69
<i>Cálculo del volumen y tasa de duplicación tumoral</i>	70
<i>Procesamiento histológico de los tumores primarios y ganglios linfáticos</i>	71
<i>Coloración topográfica de los cortes histológicos de tumores y ganglios linfoides</i>	71
<i>Inmunohistoquímica</i>	71
<i>Síntesis de aptámeros</i>	72
<i>Tratamiento de datos y análisis estadístico</i>	73
RESULTADOS: CAPÍTULO I	76
LA GAL-1 ENDÓGENA REGULA NEGATIVAMENTE LA PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS LINFOCITOS T EN UN CONTEXTO TUMORAL.....	77
LA GAL-1 ENDÓGENA MODULA LA FUNCIÓN LINFOCITARIA INDEPENDIENTEMENTE DE FACTORES EXÓGENOS.....	83
LA GAL-1 REGULA NEGATIVAMENTE LA INMUNIDAD <i>IN VIVO</i>	84
MECANISMOS CELULARES INVOLUCRADOS EN LA MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES MEDIADOS POR LA GAL-1 ENDÓGENA LINFOCITARIA.....	88
ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS CELULAS T CD8+CD28-CD122+.....	91
RESULTADOS: CAPÍTULO II	94
DESARROLLO DE UN MÉTODO SIMPLE DE SILENCIAMIENTO EFICAZ Y SELECTIVO DE LA GAL-1 INTRÍNSECA EN LOS LINFOCITOS T CD8+.....	95

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL SILENCIAMIENTO DE LA GAL-1 INTRÍNSECA EN LOS LINFOCITOS T CD8+ (<i>IN VITRO</i>)	97
EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE LA GAL-1 INTRÍNSECA EN LOS LINFOCITOS T CD8+ EN UN MODELO TUMORAL <i>IN VIVO</i>	99
OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DEL SILENCIAMIENTO DE LA GAL-1 INTRÍNSECA EN LOS LINFOCITOS T CD8+ PARA SISTEMAS <i>IN VIVO</i>	102
DISCUSIÓN	106
I. GALECTINA-1.....	106
II. APTÁMEROS	109
CONCLUSIÓN	112
GENERAL.....	112
RESULTADOS SUPLEMENTARIOS	116
EFFECTO DE LOS LINFOCITOS SALVAJES CD45.1+ EN LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS CD8+ SALVAJES O LGALS1 -/-	116
CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE 4-1BB EN LINFOCITOS ACTIVADOS.....	117
BIBLIOGRAFÍA	119

Introducción

INTRODUCCIÓN

Esta tesis propone conceptos novedosos sobre la biología inmunitaria, que generan un enfoque interesante para la implementación de éstos en una potencial nueva inmunoterapia para el tratamiento del cáncer de próstata. En consecuencia, la introducción desarrollará primero la teoría inmunitaria requerida para una comprensión precisa del problema. En segundo lugar, se describirán las características de la enfermedad humana y su relación con las proteínas de interés (Galectinas). En tercer lugar, se abordarán los conocimientos actuales sobre inmunoterapias y las nuevas moléculas asociadas a este campo. Para finalizar, se definirán los objetivos propuestos en el proyecto, subrayando los aspectos novedosos en referencia al estado actual en el campo de investigación y de aplicación.

CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

GENERALIDADES

Nuestro cuerpo está constantemente expuesto a millones de posibles agentes causantes de enfermedades. Entre estos agentes podemos encontrar patógenos, como bacterias, hongos, parásitos, virus e incluso nuestras propias células que, ante un estímulo exógeno o intrínseco pueden cambiar su comportamiento y convertirse en células tumorales. Sin embargo, nos enfermamos con una frecuencia relativamente baja y esto se debe a que el sistema inmunológico está constantemente monitoreando y protegiéndonos contra estos agentes nocivos, eliminándolos antes de que se repliquen lo suficiente como para causar algún síntoma. Los conceptos desarrollados en los siguientes capítulos están inspirados en el libro de inmunología de Fainboim¹ y en mi tesis para la obtención del título de Magister.

El cuerpo humano tiene barreras físicas y químicas para prevenir que tanto microorganismos como toxinas patogénicas entren al organismo y causen enfermedades. Por ejemplo: las uniones estrechas entre las células de nuestra piel, el estrato córneo, el pH ácido del estómago y el mucus que recubre las superficies mucosas. También tenemos una flora normal de microorganismos involucrada en la protección de todas las superficies de nuestro cuerpo.

A pesar de tener estas barreras, en ciertas circunstancias, los patógenos pueden evitarlas e infectarnos. Ante tal situación, una segunda línea de defensa, nuestro sistema inmune, y en particular la inmunidad innata, entra en acción. Este sistema consta de células con gran capacidad fagocítica como los macrófagos y neutrófilos, células asesinas naturales (células NK) y moléculas del sistema del complemento. La

inmunidad innata reconoce una amplia gama de pequeños motivos moleculares conservados en patógenos (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, PAMPs) y ausentes en nuestro cuerpo. Estos PAMPs son especialmente reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), presentes en la superficie de las células inmunes innatas.

La respuesta inmune innata también coordina la respuesta inflamatoria no infecciosa, mediante el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociado al Daño (DAMP), moléculas también conocidas como Patrones Moleculares Asociados al Peligro. Los DAMP varían mucho según el tipo de célula (epitelial o mesenquimal) y el tipo de lesión. Los DAMP incluyen proteínas tanto intracelulares, tales como proteínas de choque térmico y proteínas derivadas de la matriz extracelular. Los ejemplos de DAMP no proteicos incluyen al ATP y al ADN. Por lo tanto, el sistema inmunitario innato es capaz de distinguir entre lo propio y sano, de lo que no lo es y debe ser eliminado.

Muy a menudo, la respuesta inmune innata es suficiente para eliminar el patógeno o el daño y restablecer la homeostasis del cuerpo. Sin embargo, a veces la noxa persiste, por lo que acciones inmunitarias de carácter complementario y cinética de acción más lenta cobran especial importancia. En este contexto, la inmunidad adaptativa es ejercida por otros tipos de células, los linfocitos T y B que reconocen pequeñas porciones de moléculas extrañas (epítopes), también conocidas como determinantes antigénicos. Dichos epítopes son reconocidos por los linfocitos T y B a través del receptor de células T (TCR) o el receptor de células B (BCR), respectivamente. Cada clon de linfocitos utiliza, en teoría, un único tipo de receptor, que posee una especificidad definida.

La respuesta inmune adaptativa se activa simultáneamente con la respuesta innata, pero sus efectos se retrasan debido a la complejidad de la expansión, la ganancia de función y los procesos de contracción de los linfocitos (Figura 1). Las características claves de la respuesta adaptativa son la alta especificidad de la respuesta y la capacidad de generar un estado que asegura una respuesta muy rápida ante un nuevo estímulo con el mismo agente (fenómeno llamado memoria inmunológica).

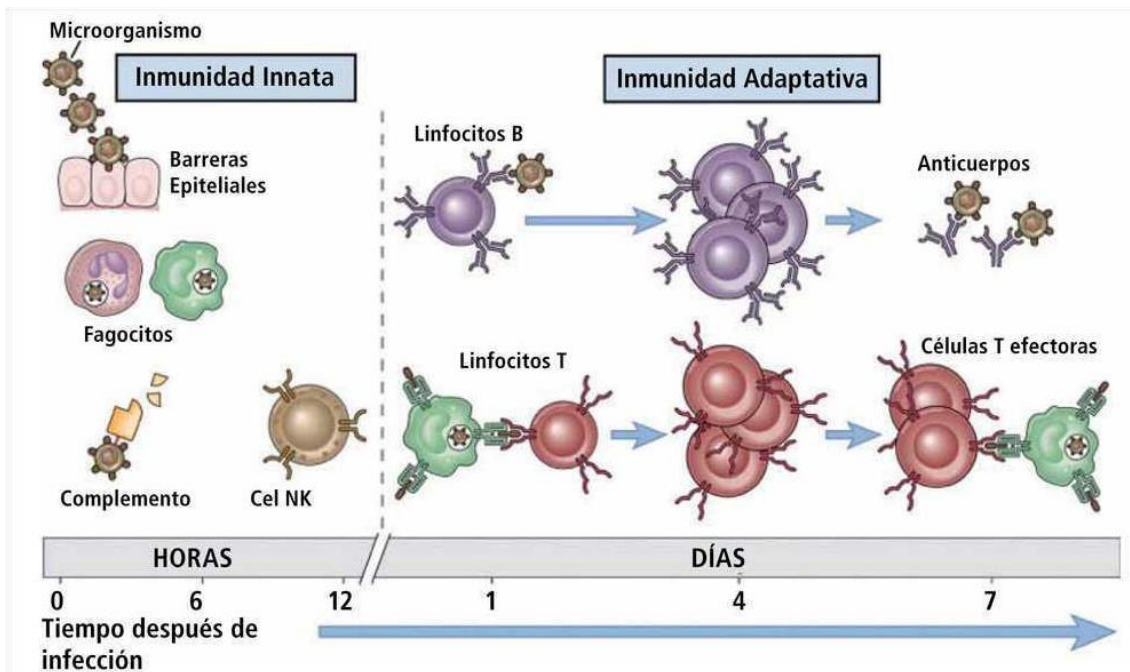


FIGURA 1: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADAPTATIVA. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA².

Si bien a fines prácticos se analizan los dos tipos de respuestas por separado, lo cierto es que están en un diálogo constante y muchas veces los límites entre ambas se tornan imprecisos. La respuesta innata juega un papel fundamental en dirigir las respuestas adaptativas hacia diferentes perfiles según el tipo de amenaza que afecta al organismo. En particular, las células dendríticas (CD) desempeñan un papel clave en este diálogo. Decodifican la información obtenida por las señales del sistema inmune innato y generan un tipo específico de respuesta adaptativa. A su vez, la inmunidad adaptativa a menudo utiliza a la inmunidad innata para ejercer sus acciones. Un ejemplo es el caso de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, que es ejercida por células efectoras de inmunidad innata y la vía clásica de activación del sistema del complemento.

Se distinguen dos tipos de respuesta en la inmunidad adaptativa:

- Inmunidad humoral, ejercida por la acción de los anticuerpos, en respuesta a patógenos y toxinas extracelulares. Son producidos por las células B con la cooperación de los linfocitos T.

Los anticuerpos reconocen y se unen a diferentes epítopos expuestos en los patógenos o toxinas. Los patógenos o toxinas así recubiertas pierden la capacidad de dañar el cuerpo y son reconocidos y destruidos fácilmente por el sistema del complemento o por otras células del sistema inmunológico (citotoxicidad mediada por células

dependientes de anticuerpos (ADCC)).

- La inmunidad celular depende de las interacciones directas entre los linfocitos T y las células que expresan el antígeno reconocido por dichas células T. Esta tesis se basó en el marco de este tipo de inmunidad proponiéndose alternativas teóricas que complementen el conocimiento actual.

LINFOCITOS T

DIFERENCIACIÓN

Los linfocitos T se generan a partir de una célula madre hematopoyética multipotente (HSC) ubicada en la médula ósea. HSC genera un progenitor linfoide común (de linaje restringido) que migra al timo para completar la diferenciación a células T. Si bien resulta un campo muy interesante los pasos de ontogenia que generan el repertorio completo de receptores, estos se encuentran fuera del alcance de esta tesis y no serán desarrollados. Cabe destacar que, como resultado de estos procesos, dos subpoblaciones principales de linfocitos T que expresan el co-receptor CD4 o CD8 entran en el torrente sanguíneo, desde el cual migran a los órganos linfoides periféricos como células vírgenes. Son éstos linfocitos los que continuamente recirculan de la sangre a los órganos inmunes secundarios en una migración que implica la participación de varias moléculas de adhesión celular. Una vez presentes en los órganos inmunes secundarios, los linfocitos vírgenes pueden activarse tras la presentación de su epítipo específico por las células presentadoras de antígeno (CPA).

PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA

Los linfocitos T no reconocen antígenos en su conformación natural, sino que se han especializado para un reconocimiento de pequeños péptidos. En este contexto, las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por su sigla en inglés) clase I y clase II desempeñan un papel esencial en la presentación de estos péptidos a los linfocitos T: las proteínas MHC de clase I están involucradas en la activación de los linfocitos T citotóxicos CD8+ y las proteínas MHC de la clase II en la activación de las células T CD4+. Si bien la expresión de proteínas de clase I se produce en casi todas las células de vertebrados, la expresión de proteínas de clase II se limita a los tipos de células que interactúan con las células T auxiliares (TH), como las células dendríticas (CD), los macrófagos y los linfocitos B. Estas células son capaces de procesar antígenos y presentar péptidos derivados de esos antígenos en el contexto de MHC de clase II y se denominan células presentadoras de antígenos. Ambas clases de proteínas MHC tienen un surco que une pequeños péptidos derivados de los antígenos que fueron degradados

dentro de la célula. Mientras que las proteínas MHC de clase I se unen a los fragmentos producidos en el citosol por el proteasoma, las de clase II se unen a los fragmentos generados en los compartimentos endocíticos. Los complejos de MHC-péptido se ensamblan dentro de la célula y luego se transportan a la membrana plasmática.

Como se mencionó anteriormente, los linfocitos T expresan en su superficie un receptor dimérico (TCR, del inglés receptor de la célula T), el que se genera mediante reordenamientos de numerosos segmentos de genes durante el desarrollo tímico de estas células. Solo uno de cada 10^5 o 10^6 es capaz de reconocer un antígeno específico, por lo tanto, la posibilidad de encuentro entre un linfocito y su epítipo específico es muy pequeña. Mismo si un linfocito se encontrara con su antígeno específico, esta única célula no sería suficiente para enfrentar millones de microorganismos o células disfuncionales. La evolución pudo resolver este problema restringiendo la presentación de antígenos a los órganos linfoides, sitios anatómicos donde se drenan todos los antígenos que eluden las barreras primarias y secundarias. Allí, una vez que un linfocito clonotípico reconoce su antígeno se activará en un proceso que será detallado a continuación y sufrirá un proceso de expansión clonal que generará una gran progenie capaz de enfrentar a la noxa.

ACTIVACIÓN Y FUNCIÓN DE CÉLULAS T

La activación de las células T se limita principalmente a los ganglios linfáticos y al bazo, es allí donde estas células interactúan con las CPA que exhiben en su membrana los complejos MHC-péptido junto a otra serie de moléculas accesorias adicionales. Dada la importancia biológica de los procesos que se desarrollan luego de la activación linfocitaria resulta evidente la necesidad de que la misma sea altamente controlada y coordinada. En la actualidad el modelo que implica tres señales para desencadenamiento de la activación es el más aceptado e involucra:

Señal 1: el reconocimiento de los péptidos por parte del TCR, únicamente cuando los mismos son presentados en el contexto de moléculas MHC en la superficie de una célula. El resultado de dicha interacción es modulado finamente por las regiones conservadas de las proteínas MHC y la unión al co-receptor CD4 o CD8. Dicho reconocimiento resulta en una agrupación/ oligomerización de receptores y co-receptores, que permiten a las quinasas intracelulares asociadas al TCR (CD3 y CD4 o CD8) activarse mutuamente a través de la fosforilación por parte de la fosfatasa CD45. Como resultado, las principales vías intracelulares de las células T se ven activadas, aunque...

Señal 2: la unión del TCR y su co-receptor no genera, por sí sola, la estimulación suficiente para inducir a las células T vírgenes a proliferar y diferenciarse en células efectoras. Una activación completa requiere de una segunda señal coestimuladora. Tradicionalmente se admitía que debía ser administrada por la misma CPA en la cual la señal 1 fue reconocida por las células T, actualmente hay autores que demuestran que no necesariamente tiene que ser la misma CPA pudiendo ser otra (revisado en ³). Las señales 2 mejor caracterizadas son las provenientes de las moléculas B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86). CD28 es el principal receptor para las moléculas B7 en la célula T naive, su interacción coestimula el crecimiento de la célula T. Una vez que las células T se activan, hay un receptor adicional para B7 llamado CTLA-4; que une a B7 con más afinidad que CD28, pero al contrario de lo que pasa con CD28, esta interacción gatilla una señal inhibitoria a las células T activadas. Este tipo de activación inmune está influenciada por varios receptores miembros de la familia de factores de necrosis tumoral (TNF-R), en este contexto, quisiera destacar a la molécula 4-1BB (CD127), que forma parte de esta familia y cuya señalización posee un rol importante en la correcta activación de los linfocitos T CD8+ ⁴. La señal 2 es necesaria para la producción de la citoquina más importante requerida para la proliferación de células T, interleuquina 2 (IL-2). De hecho, la coestimulación induce varios factores de transcripción (incluido el Factor de Activación Nuclear en las células T -NF-AT-) que se unen a la región promotora del gen IL-2, induciendo su transcripción y estabilizando el ARNm de IL-2.

Señal 3: está dada por el perfil de citoquinas, estas son un factor fundamental a la hora de modular la fuerza y el tipo de activación inmune (como se explica a continuación).

Las CD son las células más potentes en la presentación de antígenos, esenciales para la activación de linfocitos T vírgenes. La CD fagocita patógenos y células infectadas en diferentes partes del cuerpo, lo que desencadena su maduración y la expresión de moléculas coestimuladoras. Luego migran a los ganglios linfáticos donde activan los linfocitos T. Allí y después de su activación, los linfocitos experimentan una proliferación clonal, puesto que las células resultantes se originan a partir de un linfocito común y por lo tanto comparten el mismo tipo de TCR.

Pero la activación de las células T es más compleja de lo que inicialmente se creía: cuando un linfocito T reconoce un complejo MHC-péptido en una célula dendrítica que no expresa (o expresa niveles bajos) de moléculas coestimuladoras, este linfocito se volverá anérgico (incapaz de seguir siendo estimulado) y morirá por apoptosis.

Además de la activación, las células CD4+ se diferencian en distintos perfiles celulares que dan como resultado diferentes tipos de respuestas inmunitarias. La diferenciación de cada perfil depende de las citoquinas secretadas por la célula

dendrítica como se mencionó anteriormente (señal 3). Pero este perfil de citoquinas depende, a su vez, del contexto en el que DC incorporó los antígenos. Como consecuencia, las células T CD4⁺ se diferencian en dos subtipos principales de células conocidas como Th1 y Th2, cada una de ellas con funciones particulares.

Las células Th1 están relacionadas con la defensa contra las bacterias intracelulares, los protozoos y una respuesta anti-tumoral óptima. La diferenciación de estas células es favorecida por IL-2 y su citocina efectora es IFN- γ . Las principales células blanco de la inmunidad mediada por Th1 son macrófagos, células T CD8⁺, células B (IgG) y a través de IFN- γ , otras células T CD4⁺.

Por otro lado, las células Th2 son los efectores de inmunidad contra parásitos extracelulares, incluidos los helmintos. La diferenciación de estas células está favorecida por la IL-4 y sus citocinas efectoras son IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Las principales células diana son los eosinófilos, basófilos y mastocitos, así como las células B, que se diferenciarán de los plasmoblastos productores de anticuerpos.

Además de Th1 y Th2, otros subtipos se han descrito, entre ellos:

- Las células Th17 se diferencian en presencia de TGF- β , IL-6, IL-21 e IL-23 y desempeñan un papel en la autoinmunidad, inflamación, cáncer e infecciones a través de la producción de la citocina efectora IL17.
- Las células Th9 producen IL9; Ellos están involucrados en la defensa contra las infecciones por helmintos.
- Las células Thf que permiten que las células B se conviertan en plasmoblastos, esta interacción ocurre en los centros germinales.
- Células Th22 que cooperan en las reacciones antibacterianas y antifúngicas en la piel.
- Células TH $\alpha\beta$ cuya diferenciación se desencadena por IFN alfa / beta o IL-10. Su efector clave es la citocina IL-10. Sus principales células efectoras son las células NK, así como las células T CD8⁺, las células B IgG y las células T CD4 IL-10. El papel principal de estas células es proporcionar inmunidad contra los virus.

La plasticidad y complejidad de las subpoblaciones T cooperadoras probablemente aumentarán en un futuro cercano debido a nuestro deseo de comprender mejor las diferentes funciones de los linfocitos.

La activación de las células T CD8⁺ es un poco más compleja en comparación con los linfocitos CD4⁺. Al ser células efectoras, su acción debe ser aún más controlada, por lo que requieren una mayor cantidad de moléculas coestimuladoras para activarse. Esto se logra mediante la interacción simultánea entre los CD, linfocitos auxiliares CD4⁺ activados y la célula T CD8⁺. Como se discutió anteriormente, las células T CD8⁺

reconocen los epítopes presentados en el contexto del MHC tipo I. La presentación de antígenos derivados de forma exógena, no hematopoyética, en el contexto de la clase I de MHC fue, en el pasado, un misterio. Hoy en día, sabemos que las células dendríticas tienen la propiedad única de realizar una presentación cruzada, que es la capacidad de presentar antígenos de origen endocítico en un contexto de MHC tipo I.

Evidencias experimentales sugieren un modelo en el que las CD presentan a las células CD4+ T auxiliares (TH) a través del MHC de clase II. Las células CD4+ TH activadas producen interleucina-2 y licencian a la CPA para la presentación cruzada, proceso en el que las interacciones CD40 ligando (CD40L)-CD40 posee un papel importante. Las CPA licenciadas regulan positivamente la expresión de moléculas coestimuladoras (CD70, CD80 y CD86) y negativamente aquellas inhibitorias, para luego presentar de manera cruzada a los linfocitos T citotóxicos CD8+ a través de moléculas de clase I. Estos linfocitos CD8+ activados entran en ciclo celular, su apoptosis es inhibida y, en una instancia posterior, son capaces de exhibir propiedades efectoras.

Desde un punto de vista funcional, los linfocitos CD8+ o las células T citotóxicas matan directamente las células infectadas o tumorales de dos maneras diferentes:

La secreción de citotoxinas (perforina, granzimas) que se almacenan en gránulos líticos especializados que son liberados bajo estímulos específicos regulados de manera muy estricta. Las perforinas, una vez liberadas de los gránulos, polimerizan formando estructuras que permiten generar poros transmembrana en la célula diana, mientras que las granzimas, que son serinproteasas, penetran en la célula diana y desencadenan vías intrínsecas de muerte celular.

Un segundo sistema efector (la vía no secretora) se desarrolla a través de la interacción del ligando FAS (FasL; Apo1L; CD95L) en la membrana de las células T activadas con Fas (Apo1; CD95) en las células diana (células infectadas o cancerosas). Esta interacción induce la activación de la cascada de caspasas, eventos que culminan en la apoptosis de la célula blanco.

En conclusión, se requieren múltiples interacciones moleculares entre diferentes tipos celulares para lograr una óptima activación linfocitaria y así poder mantener la homeostasis en nuestro cuerpo. Estos procesos traen aparejados la generación al azar de un gran repertorio de células T requeridos para la identificación y eliminación de una amplia variedad de noxas, dando lugar al riesgo potencial de desarrollo de poblaciones reactivas contra antígenos propios que generarían procesos de autoinmunidad.

TOLERANCIA DE CÉLULAS T

En este contexto, para contrarrestar este potencial riesgo, existen varios mecanismos conocidos bajo el nombre de tolerancia inmunológica que regulan negativamente la intensidad de la respuesta. La tolerancia inmunológica es un proceso activo definido como la falla de los linfocitos para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno particular. Estos mecanismos se pueden lograr en los órganos inmunes tanto centrales como periféricos definiendo así el tipo de tolerancia.

Tolerancia central: durante la ontogenia de las células T convencionales, los linfocitos inmaduros siguen dos procesos principales en los que se limita su activación a condiciones de restricción de MHC y tienen como resultado interacciones TCR / péptido / MHC de afinidad moderada. Como parte de este proceso en la corteza tímica, se eliminan aquellos precursores T que no muestran suficiente afinidad para el reconocimiento de péptidos, mientras que aquellos que reconocen al MHC con afinidad moderada sobreviven (selección positiva). En la médula tímica, se lleva a cabo un segundo proceso de selección (selección negativa) donde se eliminan aquellos linfocitos que reaccionan con alta afinidad contra péptidos endógenos. Como consecuencia, los linfocitos maduros migran a la periferia y son capaces de reconocer los péptidos de manera restringida por el MHC y con una afinidad moderada.

Tolerancia periférica: aunque los procesos de selección central tienen un fuerte impacto en la remodelación del repertorio de células T, existen linfocitos T autorreactivos que escapan a esta selección y pueden ser encontrados en la periferia donde su accionar será contenido por los mecanismos de tolerancia periférica. Uno de ellos fue mencionado precedentemente y se refiere a un estado de parálisis o anergia generada a partir de una “subactivación” derivada de un incompleto conjunto de señales coestimuladoras involucradas en el proceso de activación linfocitaria. Otro mecanismo fundamental de tolerancia periférica involucra la participación de las células T regulatorias (Treg). En el timo no solo se originan las células CD4+ y CD8+ que adquirirán un carácter efector en periferia, sino que también se diferencian otras células T con un perfil regulador inmunitario, las denominadas células T reguladoras naturales (nTreg) con un fenotipo CD4+ CD25+ FOXP3+ y otras, no tan abordadas por la bibliografía, enmarcadas en el fenotipo CD8+. Estas células migran hacia la periferia, donde son capaces de reconocer péptidos propios e inducen la señalización mediada por el TCR con una alta intensidad y son responsables de suprimir las potenciales respuestas autoreactivas y finalizar aquellas contra antígenos extraños. Muchas enfermedades autoinmunes e inflamatorias están asociadas con disfunción en estas células. Además de las Treg naturales (nTregs) que se originan directamente en el timo, otras Treg pueden generarse a partir de linfocitos T convencionales en presencia de

un contexto de citoquinas particular, son las llamadas Tregs inducibles (iTreg)⁵. Así, la población de Tregs es heterogénea tanto desde un punto de vista de procesos de diferenciación como de mecanismos funcionales que utilizan para suprimir las respuestas. Por un lado, la estimulación *in vivo* o *in vitro* de células CD4⁺ con factor de crecimiento transformante β (TGF- β) induce la generación de células Th3, que tienen un papel importante en varias enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus⁶. Por otro lado, la estimulación de células T CD4⁺ con IL-10 induce células Tr1 caracterizadas por ser productoras de elevados niveles de IL-10 y poseer un elevado nivel supresor. Pero las Treg más estudiadas se enmarcan dentro del fenotipo CD4⁺ CD25⁺FOXP3⁺, aunque la capacidad unívoca de estos marcadores para definir con precisión las Treg aún está en discusión.

- Desde un punto de vista funcional, estas células actúan a través de cuatro mecanismos principales:
- Producción de citoquinas inhibitorias tales como IL-10 y TGF- β ⁷.
- Citólisis directa a través de la acción de granzimas y perforinas, con el requerimiento de interacciones célula a célula⁸.
- Interrupción metabólica: basadas en dos capacidades de los Treg:
- la de capturar ávidamente la IL-2, y así reducir la biodisponibilidad de esta citoquina para las células T convencionales y
- la de expresar las ectonucleotidasas CD39 y CD73, enzimas que catalizan la degradación de ATP y la liberación de adenosina. La adenosina es un potente inhibidor de las funciones efectoras y promueve la inducción de iTregs⁹.
- Un efecto directo sobre las células dendríticas, donde la interacción Treg-CD causa una disminución del potencial coestimulador en las CD. Sumado a esto, las interacciones de estos dos tipos de células a través de CTLA-4 / B7 inducen la producción de indoleamina 2,3-dioxigenasa, una enzima que cataliza la degradación del triptófano y la generación de metabolitos pro-apoptóticos, que inducen la muerte de las CD¹⁰.

Como mencionado anteriormente, también existe en periferia una población reguladora enmarcada en el fenotipo CD8⁺ (CD8⁺ Treg). Estas células poseen una alta heterogeneidad y pueden subclasificarse en células que tienen especificidad de antígeno (necesitan estimulación a través del TCR para desarrollar su carácter supresor) y aquellas que muestran su función inmunorreguladora de manera antígeno independiente. Una subpoblación natural fue descrita originalmente a principios de la década de 1970 por Gershon et al. ¹¹, donde se muestra que estas células supresoras CD8⁺ expresan marcadores de la superficie celular característicos de las células T activadas, incluidos el CD122, CD25 y CD45RClow, por lo que hoy en día a menudo se

denominan CD8⁺ CD45RClow CD25⁺ CD122⁺ Tregs¹²⁻¹⁵. Se ha acumulado evidencia que muestra que estas células T CD8⁺ especializadas son actores clave en los trastornos autoinmunes, trasplantes, cáncer, alergias y enfermedades infecciosas^{13,14,16,17}. Principalmente ejercen sus funciones a través de la secreción de Interleuquina-10 (IL-10) y suprimen de manera efectiva la producción de interferón- γ (IFN- γ) tanto de células CD8⁺ como de CD4⁺ ¹⁷, después del reconocimiento de las células blanco en un proceso que involucra las interacciones CD80 / CD86 – CD28¹⁸. Shi Zhe y colaboradores ¹⁹ han descrito un homólogo humano de estas células regulatorias, por lo que en la actualidad son candidatas interesantes para futuros enfoques inmunoterapéuticos.

CÁNCER DE PRÓSTATA

LA PRÓSTATA: ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y PATOLOGÍA

La próstata es una glándula del sistema reproductor masculino. Se encuentra enfrente del recto y justo debajo de la vejiga. Tiene aproximadamente el tamaño de una castaña y tiene una forma cónica (Figura 2). La próstata consiste en una base, un vértice, una cara anterior, una posterior y dos superficies laterales de aproximadamente 4 cm de ancho y 3 cm de espesor. La próstata comienza a desarrollarse durante la vida embrionaria de los brotes epiteliales en el seno urogenital, pero su mayor crecimiento se produce durante la pubertad, alimentada por los andrógenos (testosterona en particular) que son secretados principalmente por las células de Leydig en los testículos²⁰

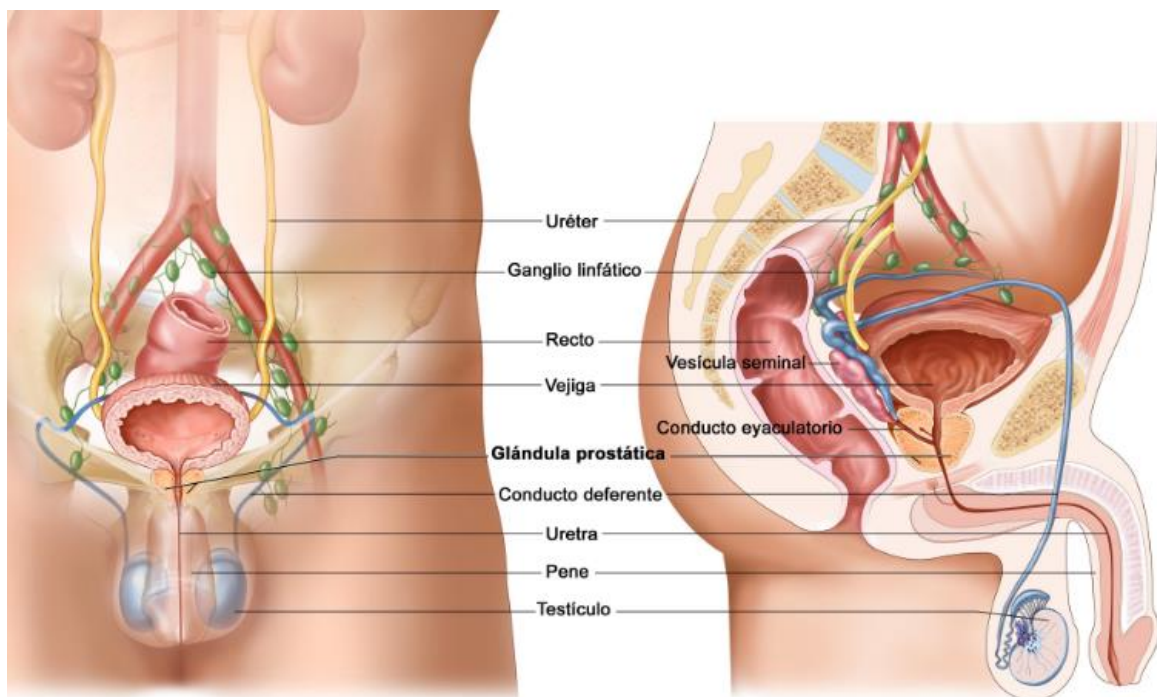


FIGURA 2: LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LA PRÓSTATA
ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL SISTEMA REPRODUCTOR
MASCULINO (NATIONAL CANCER INSTITUTE, USA).

La próstata se puede dividir en 4 regiones biológicamente distintas (Figura 4):

- Zona periférica (ZP): la porción subcapsular de la cara posterior de la glándula prostática que rodea la uretra distal y comprende hasta el 70% de la glándula

prostática normal en hombres jóvenes. Más del 70% de los cánceres de próstata se originan en esta porción de la glándula.

- La zona central (CZ): esta zona constituye aproximadamente el 25% de la glándula prostática normal y rodea los conductos eyaculatorios. Los tumores de la zona central representan más del 25% de todos los cánceres de próstata.
- La zona de transición (TZ): esta zona es responsable del 5% del volumen de la próstata y rara vez se asocia con carcinoma. La zona de transición rodea la uretra proximal y es la región de la glándula prostática que crece durante la vida masculina. Está involucrado en el agrandamiento prostático benigno.
- La zona fibro-muscular anterior : esta zona representa aproximadamente el 5% del peso prostático, generalmente carece de componentes glandulares y está compuesta únicamente de tejido muscular y fibroso²¹.

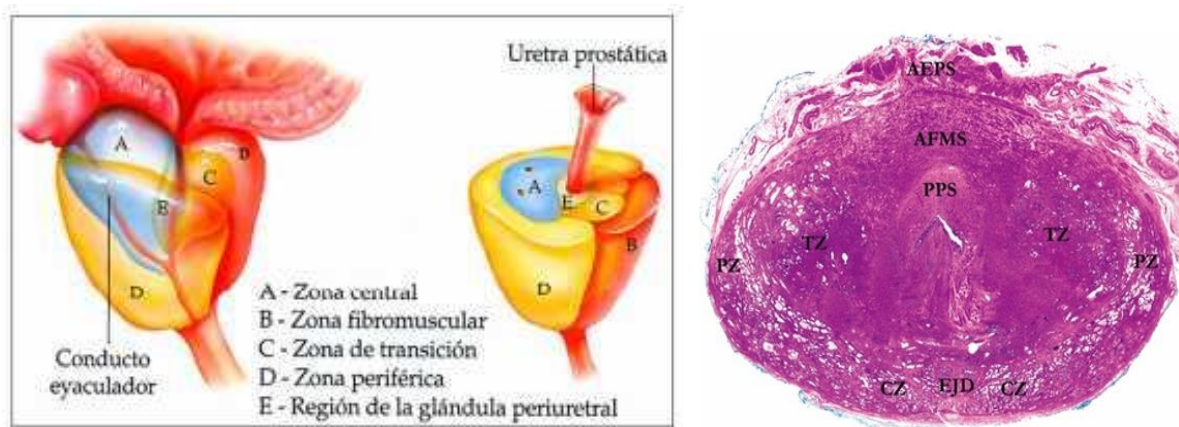


FIGURA 3: LA PRÓSTATA EN EL ADULTO A) ESQUEMA DE LA PRÓSTATA NORMAL ADULTA [28] B) SECCIÓN DE BASE DE LA PRÓSTATA CON TINCIÓN DE HEMATOXILINA EOSINA. EL ESFÍNTER PREPROSTÁTICO (PPS) ES EVIDENTE COMO UN ÁREA PÁLIDA QUE RODEA LA URETRA PROXIMAL. LA ZONA DE TRANSICIÓN (TZ) MUESTRA PEQUEÑOS ACINOS ABORTIVOS, Y ESTÁ CUBIERTA ANTERIORMENTE POR UN VASTO ESTROMA FIBROMUSCULAR ANTERIOR (AFMS) QUE SE FUSIONA CON HACES DE MÚSCULOS LISOS EN EL ESPACIO EXTRAPROSTÁTICO ANTERIOR (AEPS). POSTERIORMENTE, LA ZONA CENTRAL EXPANSIVA (CZ) RODEA EL COMPLEJO DEL CONDUCTO EYACULATORIO (EJD), Y ALGUNA ZONA PERIFÉRICA (PZ) SIGUE APARECIENDO LATERALMENTE.²²

Las células epiteliales de la próstata, las vesículas seminales y la uretra bulbar, son responsables de la producción de líquido seminal, un líquido ligeramente alcalino rico en iones y azúcares. La próstata proporciona el 30% del plasma seminal, lo que promueve la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides. El fluido prostático es ligeramente ácido (pH 6.4) y contiene espermina (que favorece la motilidad de los espermatozoides), espermidina, prostataglandinas (necesarias para la estimulación del útero), zinc (que afecta el metabolismo de la testosterona de la próstata), ácido cítrico (como tampón), inmunoglobulinas, fosfatasa y proteasas (que generan la licuefacción del semen). En este sentido, un componente crítico sintetizado por la próstata es el antígeno prostático específico (PSA). Esta es una glucoproteína con actividad de serin-proteasa que disuelve los coágulos seminales permitiendo la motilidad normal de los espermatozoides ²³. Durante la eyaculación, el músculo liso se contrae y conduce a la expulsión de este contenido glandular.

PATOLOGÍAS PROSTÁTICAS

Se han descrito tres tipos de trastornos que afectan la glándula prostática: inflamación o infección (prostatitis), agrandamiento (hiperplasia prostática benigna, HPB) y cáncer.

DESÓRDENES SIN TRANSFORMACIÓN CELULAR

La prostatitis es un término clínico utilizado para describir un amplio espectro de trastornos que van desde la infección bacteriana hasta los síndromes de dolor crónico. No son condiciones contagiosas por lo que generalmente no se propagan a través del contacto sexual:

- Prostatitis bacteriana aguda: es la menos frecuente pero más fácil de diagnosticar y tratar. Es causada por bacterias y aparece repentinamente con escalofríos, fiebre, dolor en la zona lumbar y/o genital, ardor o dolor al orinar. Las observaciones de laboratorio incluyen un exceso de glóbulos blancos y bacterias en la orina.
- Prostatitis crónica (no bacteriana) (síndrome de dolor pélvico crónico): es el tipo más común, pero menos comprendido de prostatitis. Se encuentra en hombres de cualquier edad, los síntomas desaparecen y luego regresan sin previo aviso y pueden ser inflamatorios o no inflamatorios. En la forma inflamatoria, la orina, el semen y otros líquidos de la próstata no muestran evidencia de un organismo infeccioso conocido, pero contienen los leucocitos inflamatorios. En la forma no inflamatoria, no hay evidencia de inflamación, incluidas las células del sistema inmune.

- Prostatitis inflamatoria asintomática: no hay síntomas, pero el paciente tiene células que combaten las infecciones en el semen. A menudo se encuentra cuando un médico está buscando causas de infertilidad o está realizando pruebas para detectar el cáncer de próstata.

La HPB es el segundo problema común que puede ocurrir en la próstata. La HPB es una enfermedad multifactorial que involucra factores ambientales, endocrinos y genéticos, caracterizada por un agrandamiento de la zona de transición de la próstata que causa presión en la uretra, lo que puede ocasionar problemas urinarios que desencadenan los llamados síntomas del tracto urinario inferior (STUI). Los síntomas característicos de un agrandamiento de la próstata son: micción frecuente, un flujo de orina débil, roturas en el flujo de orina y goteo. A medida que avanza la enfermedad, puede provocar infecciones de vejiga, vejiga o riñón débiles, bloqueo completo del flujo de orina e insuficiencia renal. Es una condición neoplásica benigna de la próstata asociada a la edad: muestra una prevalencia del 20% a los 40 años y del 70% a los 60 años^{23,24}.

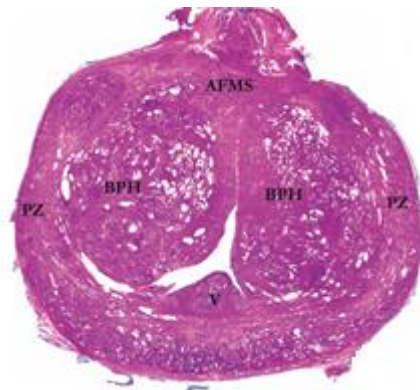


FIGURA 4: CORTE HITOLÓGICO DE LA PRÓSTATA.SECCIÓN DE LA PRÓSTATA MEDIA A NIVEL DEL VERUMONTANUM (V) EN UNA GLÁNDULA CON HIPERTROFIA PROSTÁTICA BENIGNA EXTENSA (BPH). LOS “CUERNOS” ANTEROLATERALES DE LA PZ ESTÁN COMPRIMIDOS LATERALMENTE POR EL TEJIDO TZ EXPANDIDO, Y EL ESTROMA FIBROMUSCULAR ANTERIOR (AFMS) DISMINUYE EN EXTENSIÓN.²²

Sitio de Cáncer	Nº de casos (% de todos los sitios)	Nº de muertes (% de todos los sitios)
Pulmón	2,093,876 (11.6)	1,761,007 (18.4)
Mama	2,088,849 (11.6)	626,679 (6.6)
Próstata	1,276,106 (7.1)	358,989 (3.8)
Colon	1,096,601 (6.1)	551,269 (5.8)
De piel no melanoma	1,042,056 (5.8)	65,155 (0.7)
Estomago	1,033,701 (5.7)	782,685 (8.2)
Hígado	841,080 (4.7)	781,631 (8.2)
Recto	704,376 (3.9)	310,394 (3.2)
Esófago	572,034 (3.2)	508,585 (5.3)
Cérvix útero	569,847 (3.2)	311,365 (3.3)
Tiroides	567,233 (3.1)	41,071 (0.4)
Vejiga	549,393 (3.0)	199,922 (2.1)
Non-Hodgkin linfoma	509,590 (2.8)	248,724 (2.6)
Páncreas	458,918 (2.5)	432,242 (4.5)
Leucemia	437,033 (2.4)	309,006 (3.2)
Riñón	403,262 (2.2)	175,098 (1.8)
Útero	382,069 (2.1)	89,929 (0.9)
Labio, cavidad oral	354,864 (2.0)	177,384 (1.9)
Cerebro y sistema nervioso	296,851 (1.6)	241,037 (2.5)
Ovario	295,414 (1.6)	184,799 (1.9)
Melanoma	287,723 (1.6)	60,712 (0.6)
Vesícula biliar	219,420 (1.2)	165,087 (1.7)
Laringe	177,422 (1.0)	94,771 (1.0)
Mieloma múltiple	159,985 (0.9)	106,105 (1.1)
Nasofaringe	129,079 (0.7)	72,987 (0.8)
La orofaringe	92,887 (0.5)	51,005 (0.5)
Hipofaringe	80,608 (0.4)	34,984 (0.4)
linfoma de Hodgkin	79,990 (0.4)	26,167 (0.3)
Testículo	71,105 (0.4)	9,507 (0.1)
Glándulas salivales	52,799 (0.3)	22,176 (0.2)
Ano	48,541 (0.3)	19,129 (0.2)
Vulva	44,235 (0.2)	15,222 (0.2)
sarcoma de Kaposi	41,799 (0.2)	19,902 (0.2)
Pene	34,475 (0.2)	15,138 (0.2)
Mesotelioma	30,443 (0.2)	25,576 (0.3)
Vagina	17,600 (0.1)	8,062 (0.1)
Todos los sitios excluyendo la piel	17,036,901	9,489,872

TABLA 1: SITIOS DE CANCER, NÚMERO DE INCIDENCIA Y MORTALIDAD. IARC ALCANCE MUNDIAL 2018²⁷

DESÓRDENES CON TRANSFORMACIÓN CELULAR: CÁNCER DE PRÓSTATA

La etiología del cáncer de próstata (CaP) es incierta. Como otras neoplasias malignas, se cree que es el resultado de una combinación de factores de riesgo, ambientales y predisposición genética. Los factores de riesgo más importantes son: edad, raza, antecedentes familiares, ciertas infecciones, inflamación local y dieta^{25,26}.

EPIDEMIOLOGIA

Se estima que habrá casi 1.3 millones de nuevos casos de cáncer de próstata y 359,000 muertes asociadas en todo el mundo en 2020, clasificándose como el segundo cáncer más frecuente y la quinta causa de muerte por cáncer en los hombres (Tabla 1). Es el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia entre los hombres en más de la mitad (105 de 185) de los países del mundo (Fig. 6A)

Las tasas de incidencia de CaP aumentaron en casi todos los países, mientras que las tasas de mortalidad aumentaron principalmente en los países con menos recursos^{27,28,29}.

En Argentina el CaP posee el segundo puesto en incidencia luego del de pulmón, con una ocurrencia de más de 11.000 casos anuales, que representan el 29.3% de todos los tumores malignos en varones y 7% de la totalidad de cánceres registrados en el país.

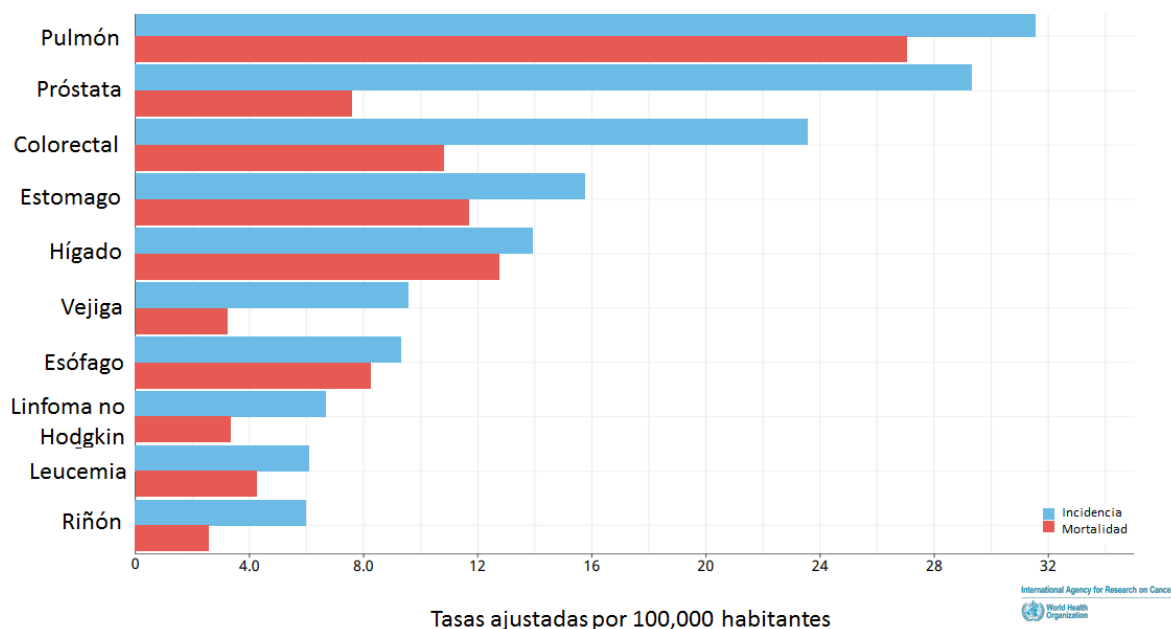


FIGURA 5: INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE CÁNCERES EN VARONES DE ARGENTINA. TASAS AJUSTADAS POR EDAD SEGÚN POBLACIÓN MUNDIAL POR 100.000 HABITANTES. ESTIMADAS DE LA IARC PARA ARGENTINA 2018²⁷.

El CaP es la única condición maligna de la próstata, el 75% se produce en la zona periférica de la glándula, mientras que el 25% restante se produce en la zona central y en la zona de transición. Dado que se origina en una glándula, se clasifica como adenocarcinoma. La neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HG-PIN) es la única lesión precursora de CaP aceptable. HG-PIN muestra muchas características genéticas y morfológicas similares a las del adenocarcinoma, pero carece de capacidad invasiva³⁰. Se caracteriza por células estratificadas, cromatina aumentada, nucléolos agrandados y fragmentación en la membrana basal y la capa celular.

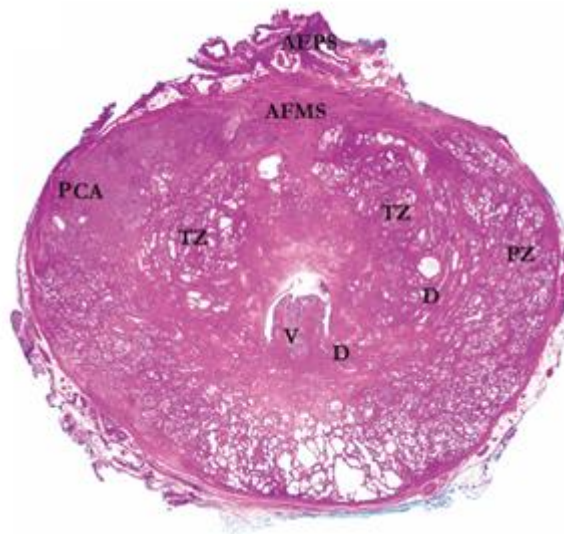


FIGURA 6: CORTE HISTOLÓGICO DE LA PRÓSTATA. SECCIÓN LA PRÓSTATA MEDIA A NIVEL DEL VERUMONTANUM (V). LA ZONA DE TRANSICIÓN BILOBULADA (TZ) SURGE DE LOS CONDUCTOS ALARGADOS (D) QUE DISCURREN EN SENTIDO ANTEROMEDIAL. LA ZONA PERIFÉRICA (PZ) AÚN OCUPA LAS PORCIONES POSTERIORES, LATERAL Y ANTEROLATERAL DE LA GLÁNDULA, Y SE OBSERVA UN TUMOR (PCA) EN LA PZ ANTERIOR DERECHA. EN LA PRÓSTATA MEDIA, EL ESTROMA FIBROMUSCULAR ANTERIOR (AFMS) ESTÁ MUY CONDENSADO Y EL ESPACIO EXTRAPROSTÁTICO ANTERIOR (AEPS) CONSERVA EN GRAN PARTE SU CONSISTENCIA APICAL. ADAPTADO DE ²².

PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD Y SÍNTOMAS

El CaP es una enfermedad progresiva relativamente lenta. Al principio, generalmente es asintomático, el tumor está confinado dentro de la cápsula de la próstata y depende de los andrógenos para mantenerse y desarrollarse. La asociación de tratamientos quirúrgicos, radiológicos y la ablación androgénica son eficaces contra los tumores de próstata en etapas tempranas cuando estos son localizados ³¹. Sin

embargo, durante el transcurso de la enfermedad se seleccionan variantes más agresivas (en particular en el CaP se vuelven insensibles a las terapias de base hormonal) (Figura 8).

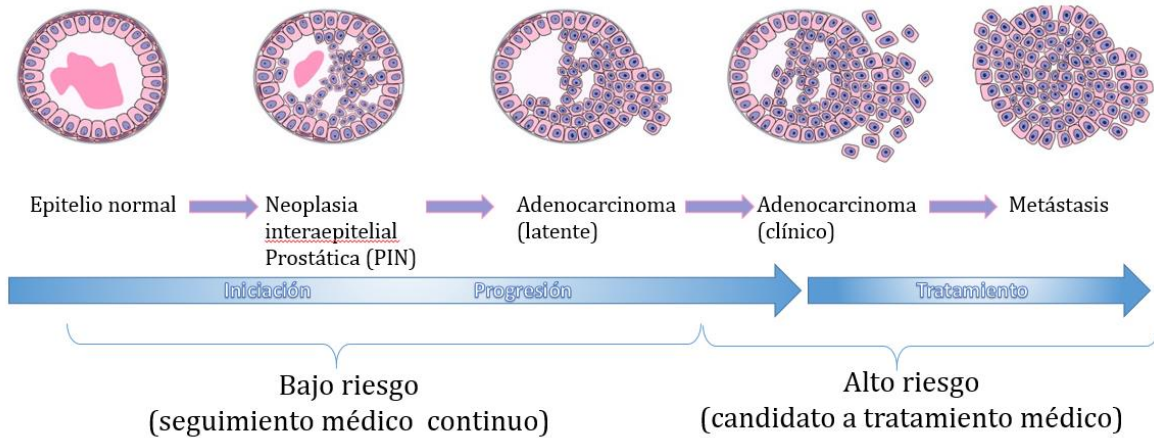


FIGURA 7: DESARROLLO DEL CAP. ESTADIOS DEL CAP ASOCIADOS CON FACTORES DE RIESGO, ADAPTADO DE ¹⁵.

Durante la progresión de la enfermedad, la glándula se inflama significativamente, generando un tejido neoplásico granular firme. Una vez que se establece el CaP, se agregan a los síntomas de BHP, la sensación de ardor durante la micción o eyaculación, sangre en la orina o el semen, dolor incesante o rigidez profunda en la pelvis, espalda baja, costillas o muslos superiores, dolor artrítico en los huesos, pérdida de peso, fatiga y náuseas.

La diseminación cancerosa involucra el sistema circulatorio y linfático. La diseminación local se dirige con frecuencia a las vesículas seminales y a la vejiga, mientras que sistémicamente el CaP produce metástasis principalmente en el esqueleto axial, pero algunas lesiones son ampliamente diseminadas en los pulmones y el hígado.

TRATAMIENTOS

La cirugía y la radiación de haz externo o los implantes de semillas radiactivas se utilizan para tratar la enfermedad en estadios localizados y tempranos³². La terapia de ablación androgénica, la quimioterapia y las radiaciones ionizantes se utilizan en los casos en que la enfermedad regresa después de la cirugía inicial o en estadios metastásicos. La terapia hormonal puede controlar el cáncer de próstata durante períodos prolongados y en muchos casos ayuda a reducir el tamaño del tumor, pero a menudo los tumores se vuelven insensibles a los andrógenos, lo que lleva a una recaída dentro de los primeros 2 años posteriores al tratamiento ³³. Al respecto, múltiples son

las modificaciones implicadas en la reactivación del receptor de andrógenos (RA) después de la ablación hormonal, entre las que se incluyen: amplificación y mutaciones de los genes que le dan origen, niveles aumentados de su ARNm y las propias proteínas del receptor. De manera concomitante se vio alterada la expresión de los co-reguladores asociados generando nuevas variantes de ensamble e interacción entre varias vías de señalización intracelular ³⁴⁻³⁶. Las etapas clínicas del cáncer de próstata y las intervenciones terapéuticas actuales se resumen en la Figura 8.

En los últimos años, la inmunoterapia se ha propuesto como una opción terapéutica prometedora para el cáncer, siendo su objetivo principal la inducción de una eficaz activación de linfocitos T citotóxicos capaz de eliminar las células transformadas³⁷³⁸ , tanto es así que el galardón nobel en fisiología del año 2018 fue entregado a Tasuku Honjo y Allison por sus descubrimientos en esta disciplina ³⁹.

Sin embargo, la traducción de esta base teórica hacia una terapia eficaz para el cáncer está limitada por la gran cantidad de mecanismos moleculares activados por los tumores que transforman en ineficientes las respuestas inmunes generadas ³⁸.

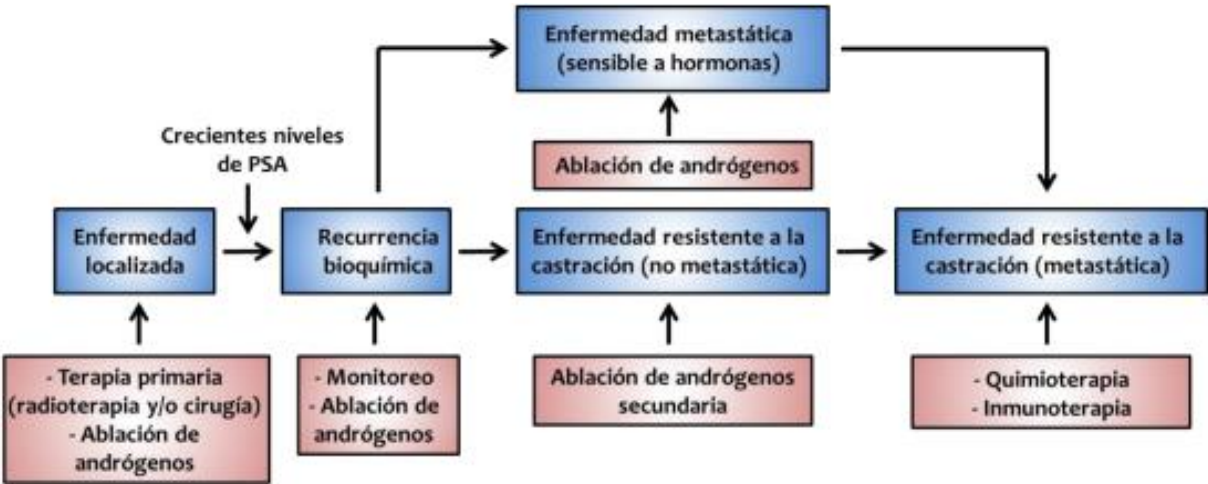


FIGURA 8: ESTADIOS CLÍNICOS DEL CAP Y TRATAMIENTOS ACTUALES DISPONIBLES 37.

INMUNOTERAPIA

La inmunoterapia se define como una terapia biológica donde el tratamiento tiene como objetivo aumentar o suprimir las defensas naturales del cuerpo. Aquellas orientadas a atenuar el sistema inmunitario tienen como finalidad o bien el tratamiento de las enfermedades autoinmunes o bien están orientadas a reducir el rechazo de células u órganos trasplantados. Las inmunoterapias de refuerzo, por el contrario, intentan estimular el sistema inmunológico con el fin de optimizar la eliminación del patógeno o el rechazo tumoral. Los principales tipos de inmunoterapia que se están probando para tratar el cáncer se incluyen dentro de las terapias inmunoestimulantes y pueden clasificarse como:

A) Inmunoterapia antígeno dirigida: este enfoque plantea una vacunación contra el cáncer, donde principal objetivo es "mostrar" un antígeno o un conjunto de ellos al sistema inmunitario en condiciones controladas. Esto generaría una respuesta inmunitaria efectiva contra ese antígeno con la generación subsiguiente de células de memoria y efectos secundarios mínimos. En una exposición posterior a dicho antígeno las células de memoria responderían rápidamente para evitar la progresión de la enfermedad. Este enfoque presenta diversas variantes:

**La terapia de mejora inmunológica autóloga (AIET),* una terapia en la que las propias CD derivadas de sangre periférica del paciente, los linfocitos T citotóxicos y otras células inmunitarias relevantes se expanden *in vitro* y luego se reinfunden para combatir el cáncer.

**Las terapias basadas en el uso de Células Dendríticas:* las CD se recolectan del paciente y luego se pulsan con formulaciones antigénicas o bien se transfectan con un vector viral que codifica un antígeno exclusivamente tumoral. Luego se retransfunden al paciente y son éstas células activadas las que presentan los antígenos tumorales a los linfocitos efectores que inician una respuesta citotóxica⁴⁰. La única inmunoterapia aprobada por la FDA (agencia de administración de alimentos y medicamentos en EEUU) contra el cáncer de próstata, el Sipuleucel-T, es un claro ejemplo de este tipo de enfoque ⁴¹.

**Transferencia adoptiva de células T:* dentro de este tipo de terapia podemos discernir dos grandes grupos: aquellas donde linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), que se presumen reactivos contra el tumor, se extraen de las muestras de tumores del paciente, se expanden *in vitro*, tratándolos con IL-2 y anti-CD3, para que una vez activados sean vueltos a inyectar en el paciente. Normalmente se co-trasfunden junto a IL-2 para aumentar aún más su actividad anticancerígena ^{42,43}. O bien la Terapia con células CAR-T, tratamiento en el cual las células T de un paciente son modificadas en el

laboratorio para que su TCR reconozca epítopes presentes en las células tumorales y luego reinfundidas en el paciente. Brevemente, se extraen linfocitos T del paciente, y se les introduce el gen para un receptor de antígeno quimérico (CAR por su sigla en inglés). Los clones positivos para la inserción expresarán este nuevo receptor quimérico específico contra epítopes tumorales. Posteriormente estos clones onco-reactivos son expandidos *in vitro* y re infundidos al paciente (revisado por⁴⁴).

B) Inmunoterapias destinadas a eludir circuitos regulatorios negativos de las respuestas inmunitarias (check-points inmunológicos). En este campo, los anticuerpos monoclonales (mAb) son una herramienta con gran proyección debido a su capacidad de bloquear o activar receptores regulatorios presentes fundamentalmente en las superficies celulares con gran especificidad, por lo que se plantea su funcionalidad en varios tipos de cánceres. En la actualidad hay varios ensayos clínicos en los que se utilizan anticuerpos monoclonales contra PD-1 y CTLA-4 como nivolumab e ipilimumab en pacientes con cáncer con resultados parciales pero alentadores ⁴⁵⁻⁴⁸.

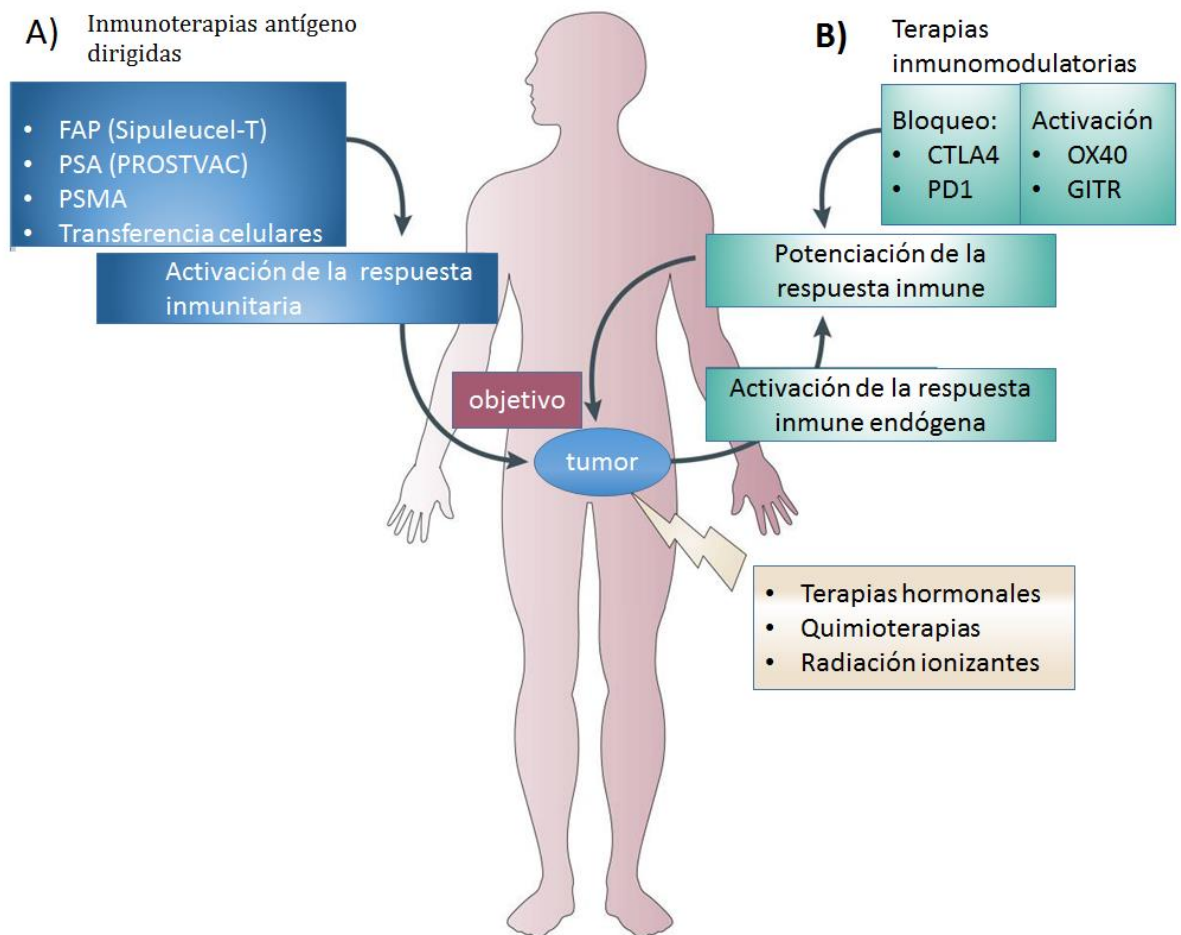


FIGURA 9: ESQUEMA DE INMUNOTERAPIAS PARA CÁNCER DE PRÓSTATA ADAPTADO DE ⁴⁹.

Otras alternativas que están siendo probadas actualmente son las herramientas moleculares (un ejemplo de estas son los aptámeros y serán tratados con detalle más adelante). Estas formas alternativas tienen como finalidad administrar toxinas, radioactivos o, más recientemente, pequeños ARN interferentes (ARNi) que pueden ser dirigidas a células del sistema inmune o bien al tumor. Cualquiera que sea el método de inmunoterapia evaluado, se debe tener en cuenta que el cáncer se genera a partir de células propias, por lo que se debe tener especial cuidado de evitar la generación de reacciones autoinmunes. Esto frecuentemente representa un efecto secundario para este tipo de terapias, aunque muchas veces la relación efectos secundarios /patología resulta conveniente para el paciente.

Si bien, como hemos descrito, muchos son los abordajes para el tratamiento del cáncer, la identificación de nuevas terapias efectivas para el cáncer de próstata (PCa) requiere una mejor comprensión de las múltiples interacciones moleculares entre las células tumorales y su estroma asociado. En este contexto, la Galectina-1 (Gal-1) desempeña un papel importante en la determinación de las propiedades del microambiente del carcinoma prostático. En particular, previamente hemos descrito que galectina-1 (Gal-1) es la lectina de más abundante expresión en las células tumorales prostáticas y la única que se asocia positivamente con la progresión en el cáncer de próstata ⁵⁰.

CÁNCER Y GLICOBIOLOGÍA

GALECTINAS, GENERALIDADES

Los glicanos se encuentran de manera natural en las células de los mamíferos y se exhiben de manera ubicua como parte de las glicoproteínas y los glicolípidos (Figura 10). El patrón de expresión de los glicanos constituye el glicoma celular. Contrariamente a las creencias comunes, el glicoma no es una mera "decoración" de las células, sino que está finamente regulado por las glicosiltransferasas y las glicosidasas y se altera en respuesta a diferentes estímulos. Por lo tanto, diferentes tipos de células y tejidos en distintos procesos fisiológicos / patológicos pueden diferenciarse por su estado de glicosilación.

Las lectinas, proteínas endógenas de unión a glicanos, son responsables de la decodificación biológica de la información del glicoma. La interacción de las lectinas con las macromoléculas presentes en la membrana celular o la matriz extracelular (MEC) desencadenan diferentes cascadas de señalización con la consiguiente respuesta biológica ⁵¹. Se pueden distinguir tres grupos principales de lectinas: i) lectinas de tipo C, que se unen a glicanos diferentes solo en presencia de Ca^{2+} ; ii) Lectinas tipo 1 o Siglecs, receptores de membrana de la superfamilia de inmunoglobulinas que muestran

propiedades de unión al ácido siálico; y iii) lectinas tipo S o galectinas.

Las galectinas (Gals) son un grupo de proteínas altamente conservadas ⁵² que se expresan diferencialmente en varios tipos de células y tejidos y provocan una función celular particular al unirse al glicocalix celular o bien por funciones no lectínicas interaccionando con las proteínas o ácidos nucleicos intracelulares.

Galectinas prototipo	
Gal-1	Músculo esquelético y cardíaco
	Neuronas sensoriales y motoras
	Células T, dendríticas y regulatorias
	Hepatocitos, riñón y placenta
	Tumor y estroma asociado
Gal-2	Tracto gastrointestinal, hepatomas
Gal-5	Eritrocitos
Gal-7	Queratinocitos y carcinomas de epitelio estratificado
Gal-10	Eosinófilos, basófilos células T regulatorias
Gal-11	Tracto gastrointestinal, hepatomas
Gal-13	Placenta, bazo, riñón, vejiga y células tumorales
Gal-14	Eosinófilos, fluido bronqueoalveolar, testículos, hígado y placenta
Gal-15	Endometrio, blastocitos
Galectina quimera	
Gal-3	Macrófagos, basófilos, mastocitos
	Células T activadas y epiteliales
	Fibroblastos, cerebro, corazón, páncreas y tumores
Galectinas en Tándem	
Gal-4	Epitelios intestinales y orales
Gal-6	Intestino delgado y colon
Gal-8	Numerosos tejidos y tumores
Gal-9	Eosinófilos, timo , placenta, intestino delgado, colon, hígado, riñón y páncreas
Gal-2	Adipocitos

TABLA 2: EXPRESION DE GALECTINAS EN CELULAS Y TEJIDOS
(ADAPTADO DE ⁵³).

El rol de varios miembros de esta familia en diferentes procesos fisiológicos y patológicos (incluido el cáncer) despertó un interés de la comunidad científica llevando a mejorar nuestro conocimiento sobre sus funciones. Las galectinas poseen una región de 135 aminoácidos altamente conservada desde invertebrados hasta mamíferos. Esta región llamada dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) es responsable de su unión a β -galactósidos ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3,4\text{GlcNAc}$) independientemente de la presencia de cationes divalentes. Aunque hay algunas excepciones: como la Gal-10 que se une a los azúcares relacionados a manosa con mayor afinidad que los β -galactósidos y la Gal-11 que directamente no tiene actividad de lectina descrita hasta el momento. En general, las galectinas son proteínas secretadas, solubles, y se localizan no solo en el espacio extracelular sino también en el citoplasma, el núcleo y la superficie celular.

Las galectinas se clasifican en tres grupos según su estructura y propiedades de polimerización⁵⁴⁻⁵⁷:

- A) Galectinas prototipo que se pueden encontrar como monómeros u homodímeros (a menudo en equilibrio entre las distintas formas) y poseen un solo tipo de CRD. Los miembros de esta familia son Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 y -15.
- B) Las galectinas de repetición en tándem que se caracterizan por tener dos CRD no idénticos unidos por un péptido corto, las Gals incluidas en este grupo son Gal-4, -6, -8, -9 y -12.
- C) Galectina quimera cuyo único integrante es Gal-3 que posee un solo CRD y un extremo N-terminal rico extendido en prolina y glicina, lo que promueve la oligomerización de esta lectina.

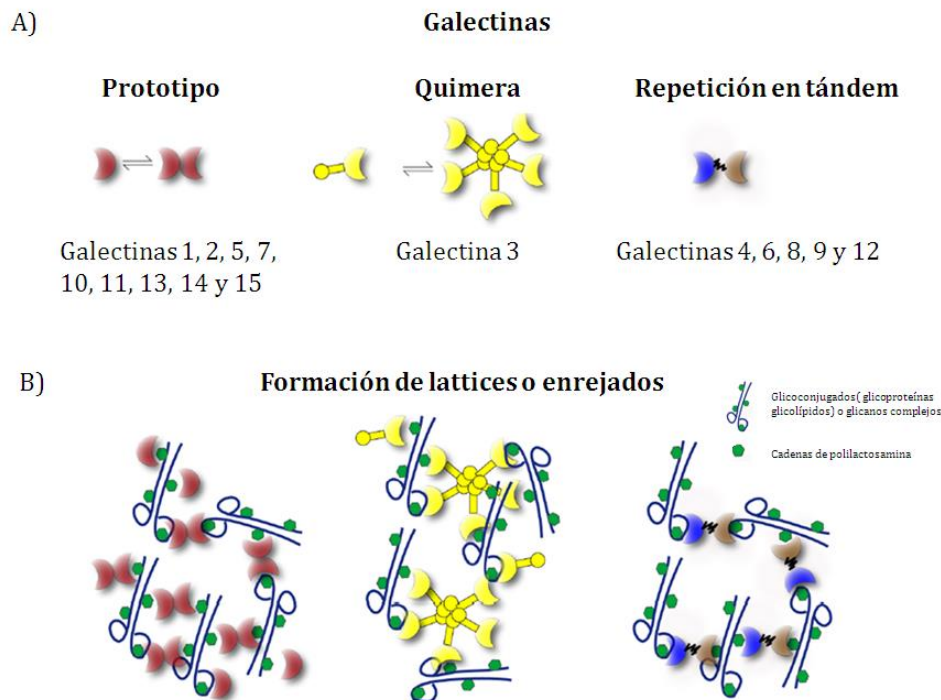


FIGURA 10: ESQUEMAS REPRESENTATIVOS DE LAS GALECTINAS. A) GALECTINAS SEGÚN SU ESTRUCTURA. B) LAS GALECTINAS TIENE LA CAPACIDAD DE INTERACCIONAR CON LOS GLICOCONJUGADOS DE LA SUPERFICIE CELULAR DANDO LUGAR A LA FORMACIÓN DE ENREJADOS O LATTICES PARA ASÍ DESENCADENAR DIVERSAS CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN. (ADAPTADO DE⁵³)

Las funciones extracelulares de las galectinas son las mejores estudiadas y están estrechamente asociadas con su capacidad para oligomerizar y formar complejos supramoleculares (a menudo denominados “lattice” o enrejados) en la superficie celular. Estos pueden asociar células similares o diferentes, o bien células con proteínas de la MEC. Se ha demostrado que las interacciones galectina-glicano pueden desencadenar cascadas de señalización que modulan la diferenciación, la proliferación, la supervivencia y la migración celular ⁵⁸. En menor medida, pero con gran relevancia funcional, hay informes que describen efectos adicionales debido a su interacción con proteínas nucleares y citoplásmicas y que tienen un impacto en el *splicing* del ARN, la regulación del crecimiento celular, la apoptosis y la regulación de la progresión del ciclo celular. Estas funciones intracelulares no lectínicas, no dependen de la formación de enrejados y son independientes de la interacción con glicanos⁵⁹. En suma, las galectinas poseen un rol fundamental en el control del comportamiento celular, el que involucra tanto a interacciones extracelulares e intracelulares ⁶⁰.

Los procesos oncogénicos y metastásicos están asociados con una remodelación dramática de los glicanos expresados en la superficie celular del microambiente tumoral (el tumor en sí y el estroma asociado)^{60,61}. Las diferencias en los patrones de glicosilación son producto de cambios genéticos y epigenéticos en las células que afectan la actividad de las glicosiltransferasas, glicosidasas y chaperonas. Esta expresión anormal modifica la vida media de los receptores de membrana, afectando a varias vías de señalización y, por lo tanto, al desarrollo tumoral ⁶². Liu et al. pusieron en evidencia que estos cambios pueden correlacionarse con la agresividad del tumor y la adquisición de un fenotipo metastásico⁶⁰. En efecto, se ha demostrado que las galectinas no solo desempeñan un papel importante al censar los cambios en la glicosilación, sino que al generar una respuesta diferente a la normal aportan a la transformación celular, la modulación del ciclo celular, la regulación de la supervivencia y la apoptosis ⁶⁰. La progresión de un tumor primario a metástasis es un proceso complejo que involucra las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, invasión, migración y angiogénesis. Se han asociado muchas galectinas con tales procesos, como Gal-1, Gal-3 y Gal-8, por sus interacciones con las integrinas y otras moléculas de la superficie celular ⁵⁸. En particular, se ha sugerido que Gal-3 es uno de los principales reguladores de la motilidad celular a través del remodelado del citoesqueleto y promotor de la angiogénesis al favorecer la migración de las células endoteliales⁶³. Esta situación se ha observado en varios modelos experimentales de cáncer, como el melanoma, el linfoma de Hodgkin, el carcinoma de pulmón, el neuroblastoma y el cáncer de mama ^{64,65}.

Además, se ha demostrado que los cambios en el patrón de glicosilación por parte de las células tumorales determinan los aspectos cualitativos y cuantitativos de la respuesta inmunitaria antitumoral⁶⁶. En efecto, el rol de las galectinas como importantes reguladores de la inflamación antitumoral es ampliamente aceptado⁶⁷, Gal-2, -3 y -9 son capaces de inducir la apoptosis de las células T, por lo que se postulan como moléculas con un gran impacto en los sistemas de escape inmunitario activados por los tumores ⁵¹. Dado que este trabajo de tesis se focaliza en Gal-1, la misma será analizada en detalle en el párrafo siguiente.

GALECTINA-1

Hay varios mecanismos moleculares que describen a Gal-1 como un promotor de microambiente tolerogénico en tumores por su acción mayoritariamente extracelular, vinculándola con un rol fundamental en la angiogénesis, adhesión

endotelial, proliferación celular, adhesión homotípica e interacciones con la MEC (revisado en ⁵¹).

Adicionalmente a esos efectos, Gal-1 es una gran remodeladora del microambiente inmunitario asociado a los tumores. Como hemos destacado en la sección previa referida a las respuestas inmunitarias, la interrelación entre las CPA, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ resulta crucial para una eficaz respuesta inmunitaria. Por lo tanto, analizar las funciones en la que interviene Gal-1 en estas poblaciones celulares resulta de gran interés para entender acabadamente estos procesos. En particular, al analizar su rol sobre la células presentadoras de antígenos tanto por su accionar extra como intracelular se encuentra una dicotomía, mientras algunos autores ponderan su capacidad para inducir células dendríticas con perfiles tolerogénicos ^{68,69}, otros pudieron demostrar exactamente lo contrario ^{70,71}. Un mayor consenso es encontrado respecto de su rol inmunomodulador en las poblaciones de células T activadas, donde la inducción de la apoptosis es el efecto principal^{66,72-78}, siendo el mismo responsable en parte de la ineficiencia de la respuesta inmune antitumoral⁶⁶. Gal-1 también modula la función de las células T reguladoras convencionales (CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺), que son potentes supresoras de las respuestas inmunitarias. Estas células expresan abundantes niveles de Gal-1 y la neutralización extracelular de esta lectina es suficiente para abolir su función supresora ^{79,80}.

Muchas de estas acciones biológicas descritas para Gal-1 se inhiben mediante el uso de anticuerpos bloqueadores o la adición exógena de inhibidores de sacáridos ^{68,79}. Estos hallazgos sugieren que tales funciones de Gal-1 y las vías que se activan posteriormente dependen de la interacción directa de la lectina con los glico-conjugados (glicanos unidos a proteínas o lípidos) en la membrana plasmática o en la matriz extracelular.

Aunque se sabe mucho acerca de Gal-1 en estos procesos biológicos fundamentalmente extracelulares, poco se conoce sobre sus funciones endógenas. En particular, se encontró que Gal-1 participa de la maquinaria de *splicing*, lo que sugiere funciones adicionales para esta lectina ⁸¹⁻⁸³. Se han descrito otras interacciones no canónicas para Gal-1, como las interacciones con proteínas mitocondriales y citoplásmicas (revisadas en ⁵³).

APTÁMEROS

GENERALIDADES

Ellington acuñó el término "aptámero", derivado de la combinación de la palabra latina *aptus* ("ajustar") y la palabra griega *meros* ("parte"), por lo que los aptámeros son justamente esto, una parte que ajusta a otra, cuáles son estas partes? Por un lado, moléculas cortas de ADN o ARN de una sola hebra (ss) que se seleccionan para unirse de manera específica a la segunda parte, un ligando definido. Esta capacidad de unirse a un ligando específico con alta afinidad, hace que a los aptámeros se los conozca también bajo el nombre de anticuerpos sintéticos o anticuerpos químicos.

En 1990 y de manera independiente, varios grupos consiguieron aislar los primeros aptámeros de ARN de alta afinidad a partir de una biblioteca de secuencias aleatorias mediante un procedimiento *in vitro* ⁸⁴⁻⁸⁶. Dicha biblioteca contiene secuencias individuales aleatorias que pueden probarse simultáneamente en un único ensayo. Las secuencias candidatas se someten a ciclos iterativos de selección para aumentar la proporción de las especies de alta afinidad, hasta que finalmente éstas dominan en la biblioteca; a este procedimiento se denominó "evolución sistemática de los ligandos mediante enriquecimiento exponencial" (SELEX).

"EVOLUCIÓN SISTEMÁTICA DE LOS LIGANDOS MEDIANTE ENRIQUECIMIENTO EXPONENCIAL" (SELEX).

Si analizamos con un poco más de detalle podemos ver que un ciclo de selección comienza típicamente con una biblioteca combinatoria de ADNss (simple cadena) o ARN que contiene una región aleatoria de 20 - 60 nt flanqueada por regiones de cebador (*primer*) fijas en los extremos 5' y 3' (ver Figura 11). Una biblioteca inicial, sin selección, consta normalmente en el orden de mil secuencias aleatorias únicas (1-2 nmol de biblioteca), que pueden proporcionar suficiente diversidad estructural para identificar un número apropiado de secuencias que se unan con alta afinidad al ligando de interés. Después de los ciclos de selección iterativos que consisten en pasos de unión, partición, recuperación y re-amplificación, las secuencias de mayor afinidad por el ligando (aptámeros) se enriquecen y dominan la población de la biblioteca. El producto final es sensible al entorno de selección, que es una combinación de condiciones experimentales (por ejemplo, relación de biblioteca a objetivo, componentes del tampón, fuerza iónica, pH, temperatura / tiempo de unión) y propiedades inherentes al objetivo (por ejemplo, pI, carga, propiedades hidrofílicas /

hidrofóbicas, etc.). Juntas, estas variables contribuyen a la rigurosidad de la selección específica, afectando en consecuencia la afinidad y la función de los aptámeros enriquecidos.

Hay algunas diferencias entre la selección de aptámeros de ARN y ADN. En el caso del SELEX ADN, las secuencias de la biblioteca se incuban con el ligando y aquellas unidas se recuperan mediante amplificación por PCR. En estos casos, la biblioteca de ADN(dc) resultante se somete a separación de cadenas para producir una nueva biblioteca de ADN(sc) para el siguiente ciclo de selección. Por el contrario, el SELEX ARN generalmente involucra una etapa de transcripción *in vitro*. En efecto, primero las secuencias ARN seleccionadas son sometidas a una transcripción reversa, obteniéndose su ADN complementario, las que son posteriormente amplificadas por PCR. Estos amplicones serán utilizados seguidamente para la transcripción *in vitro* y así obtener grandes cantidades de ARN aptámero. Los aptámeros de ADN y ARN son funcionalmente similares, pero cada uno tiene sus propios beneficios. Los aptámeros de ADN son inherentemente más estables y los costos de fabricación son más bajos. Los aptámeros de ARN típicamente tienen conformaciones tridimensionales más diversas lo que aumentan la afinidad y especificidad de unión⁸⁷.

La tecnología de SELEX puede aplicarse a diversos objetivos dependiendo de la función que se quiera para los aptámeros, para ello pueden utilizarse proteínas purificadas, células enteras o más recientemente modelos *in vivo*. En un procedimiento SELEX basado en proteínas purificadas⁸⁸ (Figura 11), primeramente la biblioteca de ARN se incuba con la proteína diana, luego las especies unidas se aíslan de las secuencias no unidas a través de varias estrategias de partición, acto seguido las secuencias unidas a la diana se recuperan y por último se someten a re-amplificación (transcripción reversa, PCR y transcripción *in vitro*). Así se obtiene una nueva biblioteca de ARN sobre la que se realiza el siguiente ciclo de selección. A través de las rondas iterativas de selección, los aptámeros específicos se enriquecen e identifican mediante análisis de secuenciación. Estas secuencias pueden ser clonadas en vectores que permitan la transcripción *in vitro* (para el caso de los aptámeros ARN) o que permitan la amplificación por PCR (en el caso de los aptámeros ADN) asociados a métodos de separación de hebras para obtener ADNss.

El SELEX basado en células completas ofrece una alternativa razonable para superar algunas de las limitaciones del SELEX basado en proteínas purificadas. No solo el investigador se independiza de la necesidad de tener la proteína purificada, sino que permite la identificación de aptámeros específicos que son capaces de unirse selectivamente a la proteína diana en su conformación nativa o patrón de glicosilación extracelular original, e incluso internalizarse en las células dianas⁸⁹⁻⁹³. En este procedimiento, es común utilizar dos poblaciones celulares a fin de acotar por selección

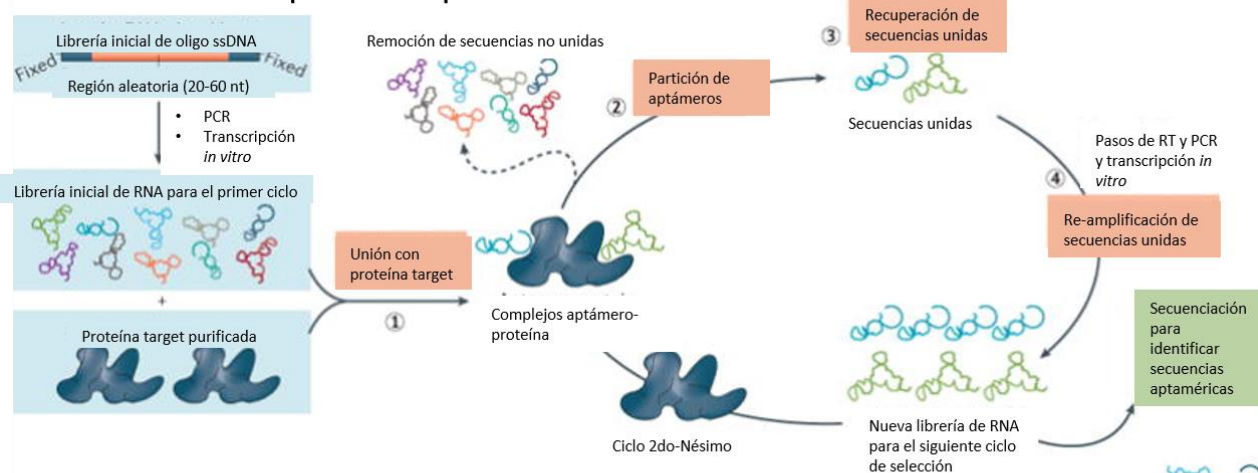
negativa una gran cantidad de especies que no son de interés, para ello se incubaba con una población celular que no expresa la molécula diana, para luego incubarla con una población celular que sí lo hace (selección positiva). En particular, se puede aplicar a proteínas dianas no caracterizadas, para las cuales no hay un conocimiento previo de sus propiedades y características estructurales^{94,95}. Esta ventaja permite explotar el SELEX basado en células completas como una herramienta prometedora para el descubrimiento de biomarcadores⁹⁶.

Como los aptámeros seleccionados *in vitro* no necesariamente funcionan *in vivo*^{97,98}, se desarrolló un procedimiento SELEX basado en animales vivos para generar aptámeros que penetren en los tejidos en condiciones fisiológicas. Los investigadores administran la biblioteca de ARN por vía intravenosa (IV) al animal, extraen el tejido u órgano de interés patológico y extraen las secuencias unidas. Las secuencias de ARN recuperadas se vuelven a amplificar para crear una nueva biblioteca de ARN para el siguiente ciclo de selección. Esta técnica se ha utilizado para identificar aptámeros de ARN (modificados con 2'-fluoropirimidina) en un modelo animal de metástasis del cáncer colorectal intrahepático⁸⁹.

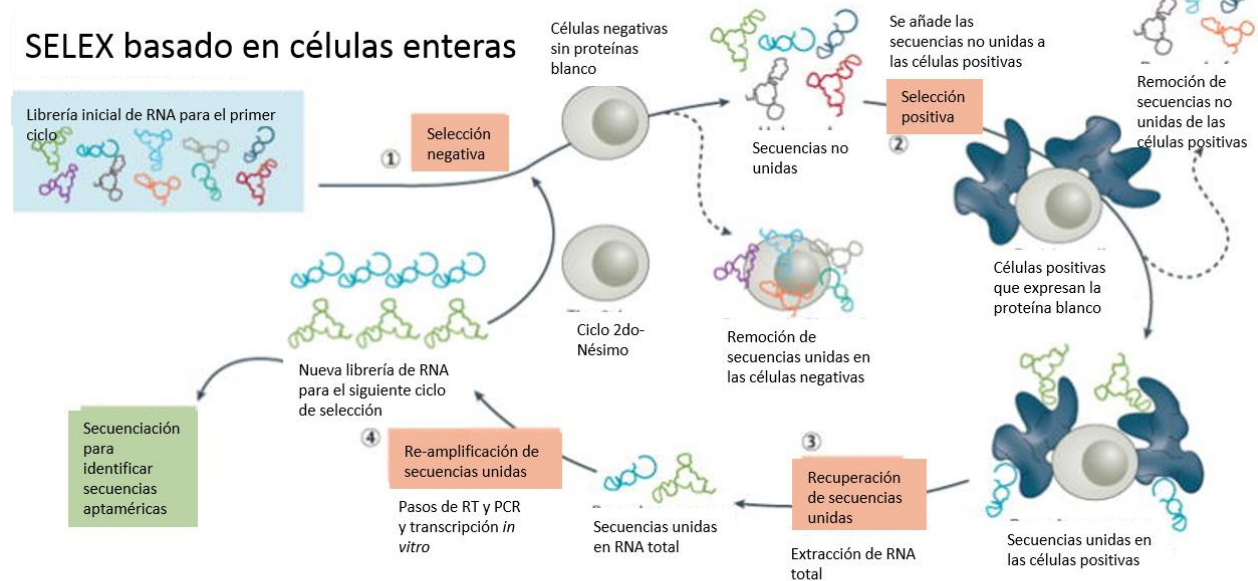
Aunque el SELEX basado en proteínas puede aplicarse a proteínas purificadas, proteínas en la superficie de células completas o incluso proteínas dentro de animales vivos, no es aplicable para proteínas desconocidas, proteínas insolubles o proteínas que solo funcionan en la conformación nativa o en un complejo multiproteico⁹⁹. En algunos casos, los aptámeros generados a través de SELEX basado en proteínas purificadas no reconocen la proteína objetivo en la superficie celular^{89,100}, por lo que el perfeccionamiento en las técnicas de búsqueda y selección se tornaron una necesidad.

Si bien el SELEX tradicional generó grandes cantidades de aptámeros efectivos, en la actualidad se avanzó hacia procesos de selección de aptámeros más potentes y efectivos^{101,102}, como la introducción de un SELEX negativo elimina secuencias no específicas que se unen a los componentes ambientales, o un contra-SELEX que excluye las secuencias que reconocen otros ligandos mediante el uso de objetivos análogos, aumentando la selectividad de los aptámeros^{103,104}. Además, las tecnologías de partición especializadas, por ejemplo, electroforesis capilar (CE)¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, microscopía de fuerza atómica (AFM)^{108,109}, citometría de flujo^{110,111}, microfluídica^{112,113} y resonancia de plasmón de superficie biacore (SPR)¹¹⁴, se han adoptado con éxito en el procedimiento clásico SELEX para acelerar la identificación de aptámeros de alta afinidad.

SELEX basado en proteínas purificadas



SELEX basado en células enteras



SELEX *in vivo*

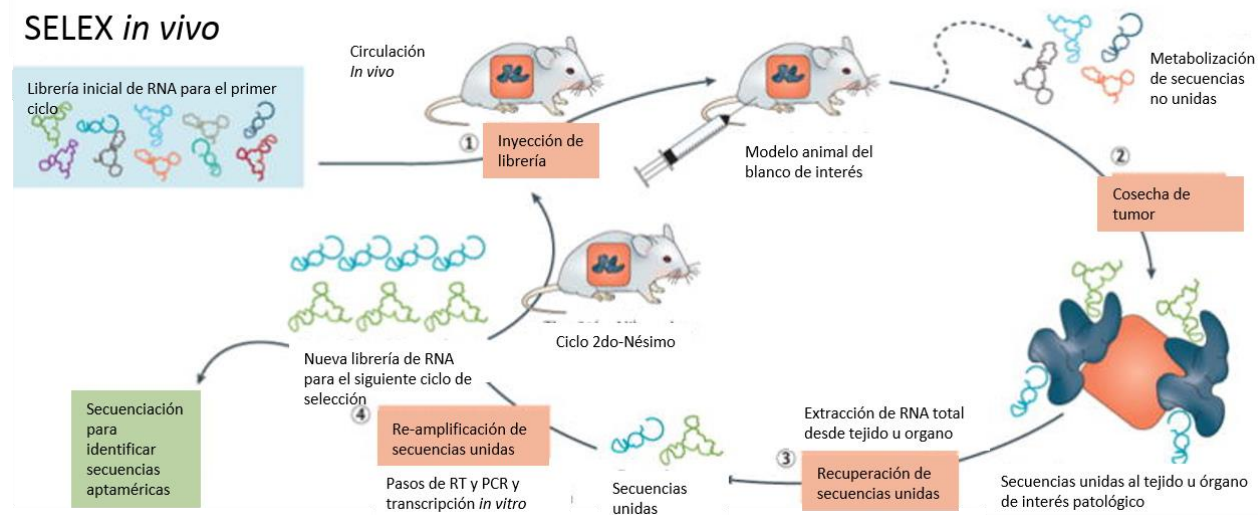


FIGURA 11: ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LOS DIVERSOS MÉTODOS DE SELECCIÓN PARA LA GENERACIÓN DE APTÁMEROS, ADAPTADO DE ¹¹⁵.

La potencia terapéutica de los aptámeros está limitada por sus características fisicoquímicas inherentes. Estas características pueden afectar las propiedades farmacocinéticas como la inestabilidad metabólica, la rápida filtración renal, la rápida distribución desde el compartimiento plasmático a los tejidos (por ejemplo, hígado, bazo), la activación inmune no específica y los efectos polianiónicos. Para subsanar esta problemática se han desarrollado varias modificaciones químicas y conjugaciones para mejorar las propiedades farmacocinéticas de las terapias basadas en aptámeros¹¹⁶. Los aptámeros no modificados son susceptibles a la degradación mediada por nucleasas, lo que causa vidas medias muy cortas cuando son inyectados *in vivo* (iv), (vida media menor a 10 minutos)¹¹⁷. La mayoría de los aptámeros en los estudios clínicos fueron modificados químicamente reemplazando la posición 2' del azúcar con un grupo de flúor- (F), amino- (NH₂) u O-metilo (OCH₃) y el extremo 3' de la secuencia es protegido con una timidina invertida para aumentar la resistencia a las nucleasas y mismo al tiempo mejorar la afinidad de unión^{118,116}. En la práctica, se aplican dos estrategias diferentes para incorporar nucleótidos modificados en aptámeros: in-SELEX y post-SELEX. En la primera estrategia, los aptámeros con las modificaciones deseadas se aíslan directamente de una biblioteca de ADN o ARN que contiene nucleótidos modificados^{119,120}. Dentro de este primer tipo, también hay un método llamado selección SOMAmer® (Aptamer modificado de velocidad de desactivación lenta) ^{121,122}, desarrollado por SomaLogic®, utiliza deoxyuracil modificado que lleva grupos funcionales hidrofóbicos en la posición C5, que es bien tolerado por la ADN polimerasa. Actualmente hay tres aptámeros siendo evaluados clínicamente con modificaciones llamadas Spiegelmers®, aptámeros de ARN de conformación L, inversiones quirales de sus formas naturales D. Dado que los Spiegelmers® no pueden ser reconocidos por las nucleasas, muestran una excelente bioestabilidad *in vivo* en comparación con los ácidos nucleicos naturales¹²³. Sin embargo, la tecnología Spiegelmer® requiere obtener el enantiómero del ligando de interés para su selección, lo que limita su uso para algunas macromoléculas biológicas¹²⁴.

En las estrategias post-SELEX, se introducen modificaciones en varias posiciones (por ejemplo, la posición 2' del anillo del azúcar, grupo fosfato), en aptámeros preseleccionados, durante la síntesis química. A veces se aplican múltiples modificaciones en combinación para un rendimiento óptimo. Dado que la afinidad / especificidad y función de un aptámero es sensible a su estructura, las modificaciones posteriores al SELEX pueden afectar las propiedades inherentes y las estructuras de plegado de los aptámeros originales, comprometiendo así la afinidad de unión. Por lo tanto, es necesario adaptar con precisión las modificaciones para las funciones

deseadas¹²⁵. Desafortunadamente los aptámeros no se comportan de manera homogénea y a menudo se necesita una evaluación / optimización laboriosa¹²⁶.

Más allá de la degradación por nucleasas, los aptámeros administrados al torrente sanguíneo son rápidamente excretados a través de la filtración renal debido a su pequeño tamaño menor 5 nm (6–30 kDa)¹²⁷. Para superar este inconveniente y extender el tiempo de circulación, los aptámeros generalmente se formulan con un resto voluminoso de manera tal de aumentar su masa molecular, como PEG¹²⁸, colesterol^{73,129,130} proteínas^{131,132}, liposomas¹³³, nanomateriales orgánicos o inorgánicos^{134,135}, o son multimerizados^{121,136,137} de manera a crear una molécula que sobrepase el umbral de corte de filtrado en el glomérulo renal (30–50 kDa).

La información toxicológica con respecto a los aptámeros en humanos es muy limitada^{138,139}. Aunque los eventos adversos relacionados con el aptámero son raros en las evaluaciones clínicas hasta la fecha, pueden surgir toxicidades potenciales de los efectos polianiónicos, la acumulación inesperada en el tejido, la modificación química intensiva o la conjugación y la activación inmune no específica, en particular con la administración continua o repetida de los mismos^{140–145}.

APTÁMEROS COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA

Las terapias que utilizan aptámeros se basan en diferentes cualidades de estos, entre las que se destacan aquellas que utilizan al **aptámero como un antagonista** para bloquear la interacción de moléculas asociadas a enfermedades, por ejemplo, proteína-proteína o receptor-ligando; aquellas que lo utilizan como agonista para activar la función de los receptores objetivo o bien aquellas que lo utilizan como un vehículo para administrar otros agentes terapéuticos a las células o tejidos diana^{97,115}.

Actualmente, todos los aptámeros en ensayos clínicos en curso utilizan la capacidad de los aptámeros de unirse a una proteína diana para desactivar su función. Numerosos grupos han desarrollado aptámeros contra objetivos terapéuticamente relevantes asociados con una amplia variedad de enfermedades humanas, incluidos trastornos oculares, trastornos hemorrágicos, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurológicas degenerativas y enfermedades infecciosas^{146,147}. A pesar de la exquisita afinidad y especificidad, el potencial terapéutico de los aptámeros inhibidores puede no alcanzarse por completo debido a un diseño o formulaciones subóptimas y al ya mencionado problema de biodistribución, por lo que los mayores esfuerzos están dirigidos a adquirir formulaciones que permitan a los aptámeros llegar a sus objetivos sin ser degradados.

Hasta la fecha, solo unos pocos **aptámeros** se han desarrollado para funcionar

como **agonistas** terapéuticos. Esto incluye aptámeros ARN dirigidos al receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3 / ERBB3)¹⁴⁸, OX40 (CD134)¹⁴⁹, 4-1BB (CD137)¹⁵⁰, CD40¹⁵¹, CD28¹⁵¹, y aptámeros de ADN dirigidos a VEGFR-2r¹⁵² humano y el receptor de insulina receptor (IR) ¹⁵³. En búsqueda de inmunoterapias contra el cáncer, se han diseñado varios aptámeros de ARN dirigidos a los receptores inmunes coestimulantes (CD28, CD40, OX40 y 4-1BB) en versiones multiméricas para poder actuar como agonistas de los receptores¹⁵⁴. Una coestimulación eficiente generada por el agrupamiento de receptores debido a la interacción de los aptámeros multivalentes y los receptores en la superficie de las células presentadoras de antígeno o las células T podría desempeñar un papel crucial en la mejora de la inmunidad antitumoral¹⁵⁵.

Además de su utilidad como terapias independientes, se ha utilizado la capacidad de los aptámeros de unirse a su diana con gran afinidad para que éstos funcionen como direccionantes de otros agentes terapéuticos, formando lo que se denomina quimeras aptámero-agente terapéutico. Al aprovechar la alta afinidad y especificidad de los aptámeros, los compuestos terapéuticos pueden dirigirse a las células o tejidos deseados, mejorando así su concentración local y su eficacia terapéutica¹⁵⁶.

A fin de conseguir una administración dirigida, los aptámeros han sido vehiculizados (como por ejemplo mediante el uso de nanotransportadores orgánicos o inorgánicos) o bien conjugados con agentes terapéuticos (por ejemplo, siRNA, microRNA, anti-miR, quimioterapéuticos o toxinas). En el caso de la conjugación de un aptámero a su carga de ARN interferente pequeño (del inglés siRNA) se logra de dos formas: la co-transcripción del aptámero y una de las dos cadenas del siRNA, seguida de la hibridación con la cadena complementaria del siRNA. ^{151,157-159}. La segunda forma consiste en acoplar un shRNA: las hebras se co-transcriben con el aptámero dejando un espaciador entre el aptámero y shRNA, el que es susceptible de ser clivado por la enzima endoribonucleasa / helicasa DICER y luego incorporados en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC)¹⁶⁰. Si bien, la adaptación de los oligonucleótidos a un aptámero resulta más sencilla que para el caso de los anticuerpos, es un problema generalizado la pérdida de función del ARN pequeño al ser quimerizado con el aptámero. Al respecto, Berezhnoy y colaboradores llegaron a desarrollar una serie de pautas a tener en cuenta para el diseño racional de las quimeras aptaméricas entre las que se encuentran colocar la secuencia sentido del siRNA río debajo del aptámero y que ésta, además, posea temperaturas de fusión intermedias¹⁶¹.

APTÁMERO ARN CONTRA 4-1BB

La expresión de 4-1BB (CD137) es inducida en los linfocitos T CD8⁺ bajo condiciones de activación celular ¹⁶². Esta molécula ha sido categorizada como un potente co-estimulador en fases muy tempranas de la activación de los linfocitos T CD8⁺¹⁶³. La interacción con su ligando también modula de manera fina las propiedades funcionales de las células presentadoras del antígeno⁴. Teniendo en cuenta la expresión selectiva y la importancia funcional de 4-1BB en la regulación de las células CD8⁺, Mc Namara y colaboradores desarrollaron un aptámero ARN capaz de unirse a este receptor. Aunque tanto el aptámero monovalente como el bivalente se unen a las células que expresan 4-1BB, solo el aptámero bivalente fue capaz de coestimular la activación de las células T y promover el rechazo de un tumor *in vivo*, con una mejor eficacia que los anticuerpos anti-4-1BB disponibles comercialmente ¹⁵⁰. Dado que la actividad coestimuladora depende de la disposición espacial y la distancia de los receptores vinculados para desencadenar la oligomerización de los receptores 4-1BB, se tomó como referencia de la distancia entre los dominios a aquella correspondiente a las dos regiones variables del anticuerpo anti-4-1BB (5-18 nm). Un enlazador de 21 pb de doble cadena proporcionó una distancia de 7,1 nm entre los dos dominios del aptámero para 4-1BB, y permitió la orientación correcta para unirse a un par de receptores 4-1BB.

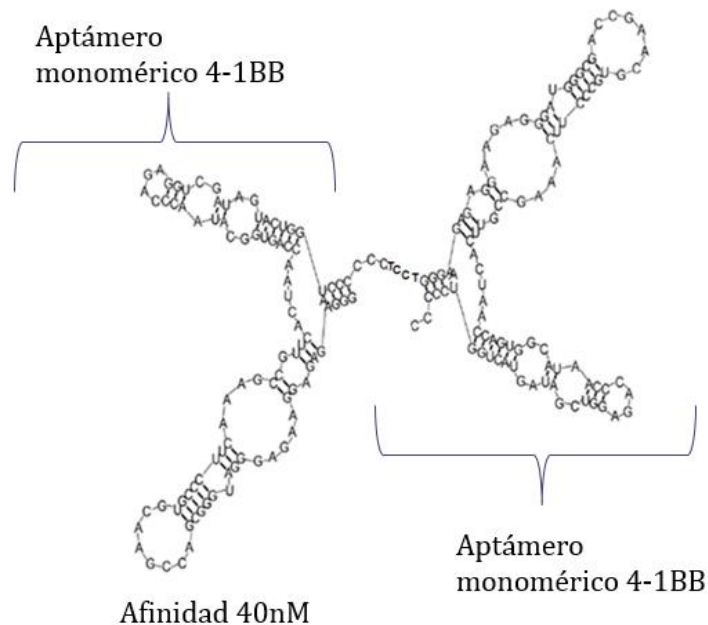


FIGURA 11: ESQUEMA DE APTÁMERO DIMÉRICO CONTRA 4-1BB CON AFINIDAD DE 40NM, ADAPTADO DE ¹⁵⁰.

Este estudio proporcionó un ejemplo preliminar de aptámeros multivalentes con función agonística para la inmunoterapia del cáncer.

Hipótesis y objetivos

HIPOTESIS y OBJETIVOS

En este trabajo nos planteamos la siguiente hipótesis:

Además de los efectos adscritos a Gal-1 que son mediados por su interacción con receptores glicosilados presentes en la membrana plasmática y la matriz extracelular (efectos extracelulares), esta lectina posee efectos endógenos adicionales que participarían en la regulación de la función inmune.

Sobre la base de los argumentos planteados en la introducción, analizamos el papel de la galectina-1 endógena como regulador de la respuesta citotóxica de linfocitos T CD8+. Para alcanzar este objetivo, esta tesis propuso un enfoque interdisciplinario, que combina inmunología, glicobiología, oncología y biología molecular para comprender y modificar el microentorno del tumor a fines de inducir la correcta activación primaria del sistema inmunitario (profilaxis) y / o revertir los procesos de tolerancia ya establecidos (terapéuticos).

Los objetivos específicos para el primer capítulo fueron:

1. Analizar los efectos en la proliferación, la apoptosis y la desgranulación de los linfocitos T CD8+ como consecuencia de la ausencia de la Gal-1 endógena.
2. Analizar las propiedades funcionales de las células regulatorias en ratones salvaje o carentes en Gal-1.
3. Analizar los mecanismos celulares implicados en los efectos notados en los linfocitos T CD8+ como consecuencia de su carencia en Gal-1 endógena.

Una vez determinado este punto nos propusimos el desarrollo de un método de silenciamiento de esta lectina aplicable tanto a modelos murinos como humanos.

El objetivo específico para el segundo capítulo fue:

1. Desarrollo de un aptámero ARN específico para 4-1BB quimérico con un shRNA que inhiba a Gal-1.

Páginas 57 a 73 eliminadas a pedido del autor.

Resultados

Capítulo I

RESULTADOS: CAPÍTULO I

Como hemos visto en la introducción, la Galectina-1 es una molécula secretada por diferentes tipos de cánceres con el fin de promover un microambiente tolerogénico¹⁶⁸. Estos efectos de tolerancia se producen localmente, en el sitio del tumor primario, pero también a distancia, ya que Gal-1 se encuentra soluble en plasma y es transporta dentro de microvesículas como los exosomas¹⁶⁹. De hecho, la mayoría de los estudios encontrados en la bibliografía sobre Gal-1 se centran en sus propiedades de lectina resultantes de su interacción con β -galactósidos y la formación de redes con receptores de membrana y proteínas de matriz extracelular [revisado en¹⁷⁰]. Este tipo de interacciones inducen una activación linfocitaria primaria deficiente con inducción de apoptosis de los linfocitos activados^{66,72,78}, la supresión de las respuestas inmunitarias debido a la activación de sistemas regulatorios, un agotamiento de las células T e inhibición de la migración de las células T a través de las células endoteliales¹⁷¹. Todas estas acciones llevan a respuestas inmunes ineficientes. Sin embargo, Gal-1 también es expresada intracelularmente en varios tipos de células como los linfocitos T reguladores^{79,80}, las células presentadoras de antígenos^{68,172} y fundamentalmente las células tumorales^{64,173-175}; en todas ellas la Gal-1 endógena desempeña un papel como regulador de las respuestas inmunes antitumorales.

Interesantemente, los linfocitos T efectores también expresan Gal-1 de manera endógena; la ausencia de Gal-1 en los linfocitos promueve una respuesta Th1 durante las enfermedades parasitarias^{176,177}. Se dispone de pocos datos sobre el papel de la Gal-1 endógena en el control de las respuestas de las células T CD8+ citotóxicas. Por un lado, se conoce que Gal-1 regula negativamente la expansión de las células T CD8+, y su supervivencia tras la activación¹⁶⁶. Por otro lado, otro estudio ha demostrado que los ratones deficientes en Gal-1 tienen una respuesta inmune mediada por células T CD8+ anti-virales *in vivo* ineficientes¹⁷⁸. Pero hasta el momento no había datos sobre el papel de la Gal-1 endógena expresada por los linfocitos T CD8+ en el control de las propiedades antitumorales.

Cabe destacar un indicio interesante. La inyección de líneas celulares tumorales en ratones *Lgals1* -/- demostraron una tumorigénesis muy disminuída^{179,180}, lo que pone en evidencia la importancia relativa del estroma (incluidas las células inmunes) en la determinación del potencial de tumorigénesis.

LA GAL-1 ENDÓGENA REGULA NEGATIVAMENTE LA PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS LINFOCITOS T EN UN CONTEXTO TUMORAL

En el CaP se expresan niveles elevados de Gal-1, tanto en líneas celulares tumorales humanas, como en prostatectomías de pacientes, donde se ve una correlación positiva entre la progresión de la enfermedad y el nivel de Gal-1 detectado^{181,182}. Resultados previos a modo exploratorio del laboratorio determinaron los niveles de expresión de Gal-1 en células TC-1 murinas (Figura 17), que servirán de modelo experimental en esta tesis.

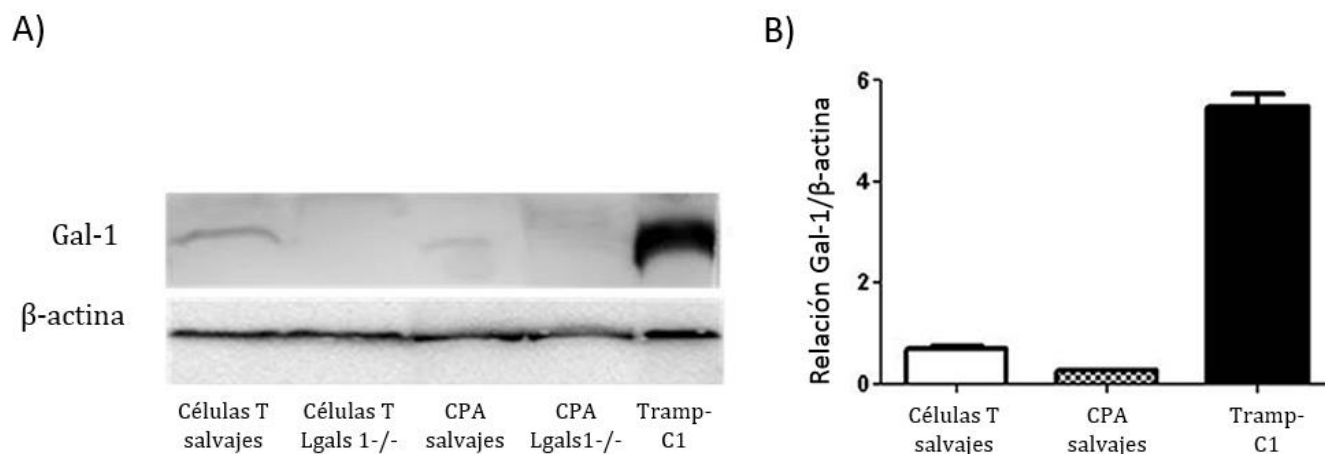


FIGURA 17: COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINA-1 EN CÉLULAS TUMORALES E INMUNES. GAL-1 ES DETECTADA POR WESTERN BLOT EN SUBPOBLACIONES INMUNES PURIFICADAS. LOS LINFOCITOS T SE PURIFICARON POR CELL SORTING A PARTIR DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS ABRIM, LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS A PARTIR DE BAZOS POR ADHERENCIA A PLÁSTICO. LA ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA SE VERIFICÓ UTILIZANDO CÉLULAS LGALS1 -/-. SE RESOLVIERON 20 μ G DE PROTEÍNA EN SDS-PAGE AL 15%, LAS PROTEÍNAS SE TRANSFIRIERON A MEMBRANAS DE PVDF, EN LAS QUE GAL-1 SE DETECTÓ UTILIZANDO ANTICUERPOS COMERCIALES ANTI-GAL-1 ACOPLADOS A UN SISTEMA DE REVELADO. (A) INMUNOBLOT REPRESENTATIVO (N = 3). (B) NIVELES MEDIOS DE GAL-1 EN LOS TRES EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN RELACIÓN GAL-1 / B-ACTINA.

Además de las células tumorales, otras células del microambiente asociado al tumor juegan un papel fundamental en la determinación de la evolución del tumor. Entender cómo la Gal-1 endógena afecta a cada una de estas células en sus propiedades funcionales ayudaría a tener una imagen funcional más completa del microambiente en el CaP. En particular, poco se conoce sobre el papel endógeno de Gal-1 en las células inmunes. Por lo tanto, primero verificamos la expresión de Gal-1 en los linfocitos y

células presentadoras de antígenos provenientes de ratones tanto salvajes como de ratones *Lgals1* ^{-/-}. De manera interesante, los niveles de expresión de Gal-1 en las células inmunes [linfocitos T y células presentadoras de antígeno (CPA)] presentaron niveles menores (10-20 veces menores) que los de las células tumorales (Figuras 17A y B). No obstante, estos bajos niveles de expresión de Gal-1 en las células inmunes no nos indican *a priori* que la Gal-1 endógena de los linfocitos no desempeñe algún papel como modulador intrínseco de sus propiedades funcionales.

A partir de esta observación, decidimos diseñar un modelo experimental *in vitro* en el que la función de los linfocitos *Lgals1* ^{-/-} se compararía con los de tipo salvaje (WT) en presencia o ausencia de tumor WT, siendo éste último el responsable de la secreción y el mantenimiento de los altos niveles de Gal-1 en el medio de cultivo. Para el análisis nos centramos en las propiedades funcionales de los linfocitos T CD8⁺, ya que estas células son primordiales en la respuesta citotóxica antitumoral¹⁸³. Analizando la dilución de CFSE en dicha población luego de su activación, nuestros resultados demostraron que cuando la Gal-1 endógena está ausente en los linfocitos, estos poseían tasas de proliferación aumentadas (Figura 18). Un análisis detallado de estos resultados muestra que, en ausencia de tumor, hubo una mayor proliferación de linfocitos T CD8⁺ deficientes en Gal-1, principalmente en condiciones subóptimas de estimulación (Figuras 18A, 1 µg/ml de anti-CD3).

De manera interesante, estos resultados fueron significativos para cada una de las concentraciones de anti-CD3 testeadas de manera independiente en presencia de un microambiente inmunosupresor generado por las células tumorales (Figuras 18B).

Cabe destacar que la finalidad de esta serie de experimentos no era la comparación entre las distintas concentraciones de anticuerpos o establecer una curva de dosis respuesta, sino dar con la mínima concentración de anticuerpo que generara una diferencia significativa entre el grupo salvaje y deficiente para Gal-1.

Como mencionamos, en estas condiciones experimentales la mayor fuente de Gal-1 extracelular fueron las células tumorales que saturan el medio extracelular por la secreción de altas cantidades de Gal-1. Cuantificaciones por ELISA arrojaron niveles de 20 ng/ml en estos medios de cultivo experimentales, esto no solo concordaba con lo esperado en base a la Figura 17, sino con lo observado en pacientes en nuestro estudio anterior⁵⁰ y en los informes de los dosajes en sueros de pacientes con cáncer^{184,185}, por lo que nuestra aproximación, si bien era un modelo artificial *in vitro*, se aproximaba a lo observado en la clínica.

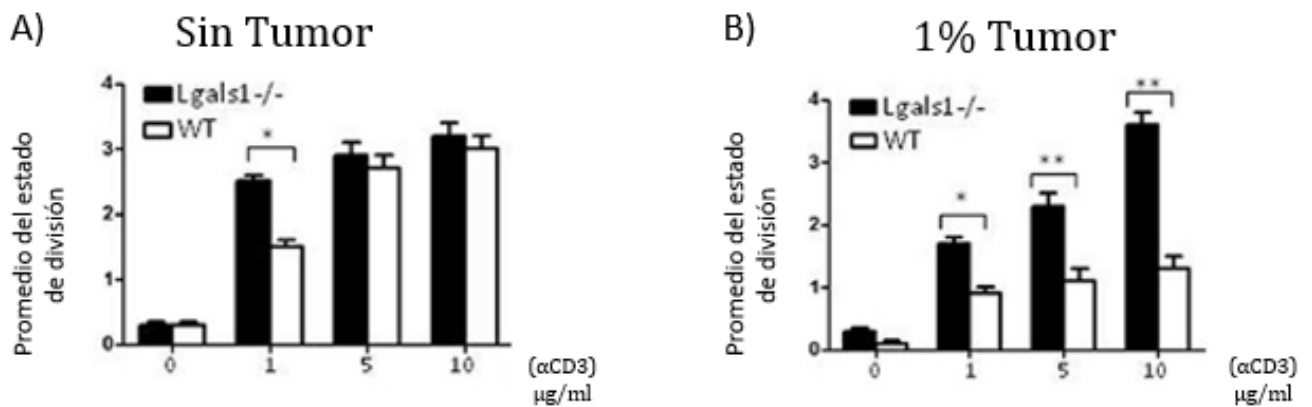


FIGURA 18: PAPEL DE LA GALECTINA-1 ENDÓGENA EN LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T CD8+. LAS TASAS DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T CD8+ DE TIPO SALVAJE Y LGALS1 -/- SE COMPARAN TRAS LA ACTIVACIÓN CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTI-CD3 EN UN ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE 72 HRS POR DILUCIÓN DE CFSE; EN AUSENCIA DE CÉLULAS TUMORALES (A) O EN PRESENCIA DE 1% TC-1 (B). LAS BARRAS GRAFICAN EL PROMEDIO DEL ESTADO DE DIVISIÓN OBTENIDA DE TRES EXPERIENCIAS INDEPENDIENTES; BARRAS BLANCAS: CÉLULAS DE TIPO SALVAJE; BARRAS NEGRAS: CÉLULAS LGALS1 -/- (N=3, * P <0.05, ** P <0.005 PRUEBA WILCOXON).

Si bien los efectos inmunitarios de Gal-1 en las células tumorales habían sido evaluados ampliamente^{64,173,174,186}, el efecto de la Gal-1 endógena en los linfocitos resultaba original y requería de una mayor comprensión.

Dado que una acción ampliamente descrita para la Gal-1 exógena es la inducción de muerte celular en linfocitos T activados⁷², decidimos estudiar el rol de la Gal-1 endógena en los linfocitos activados en un microambiente tumoral. Para ello, utilizando nuestro modelo de activación linfocitaria *in vitro* en condiciones de presencia de tumor (TC-1 1%), a las 72hs hicimos una marcación para la detección de anexina V. Esta es una proteína de la familia de las anexinas, que se une con alta afinidad a fosfolípidos de manera Ca²⁺ dependiente. Como sabemos durante las primeras etapas de la apoptosis las fosfatidilserinas (PS) translocan del lado interno de la membrana plasmática a la capa externa, por lo que las PS quedan expuestas en la superficie externa de la célula, siendo susceptibles a la unión por la anexina V. En consecuencia, el uso de anexina V acoplado a fluoróscoros permite detectar células apoptóticas por citometría de flujo^{187,188}.

La Figura 19A muestra el porcentaje de células apoptóticas determinado por este tipo de marcación dentro de la subpoblación de células T CD8+; del análisis resulta evidente que la población linfocitaria T CD8+ presenta una menor apoptosis cuando no

posee Gal-1 de manera endógena. Con el fin de profundizar más el estudio de este fenómeno la Figura 19B muestra la misma marcación dentro de cada uno de los picos de división (CFSE) de las células T CD8+. La diferencia en la proporción de células en apoptosis fue significativa entre ratones *Lgals1* ^{-/-} y salvajes para los eventos de 0, 1, 2, 3 y 5 divisiones, por lo que el efecto no fue discreto para un evento de división, sino que por el contrario resulto evidente para una gran cantidad de los eventos de división analizados. Cabe destacar que en estos experimentos no se buscó hacer múltiples comparaciones entre los distintos eventos, sino ver de manera independiente que acontecía en cada uno de los distintos eventos de división.

En su conjunto, estos resultados indican que la ausencia de Gal-1 endógena de los linfocitos T CD8+ protege a estas células de la apoptosis en un contexto de altos títulos de Gal-1 extracelular de origen tumoral.

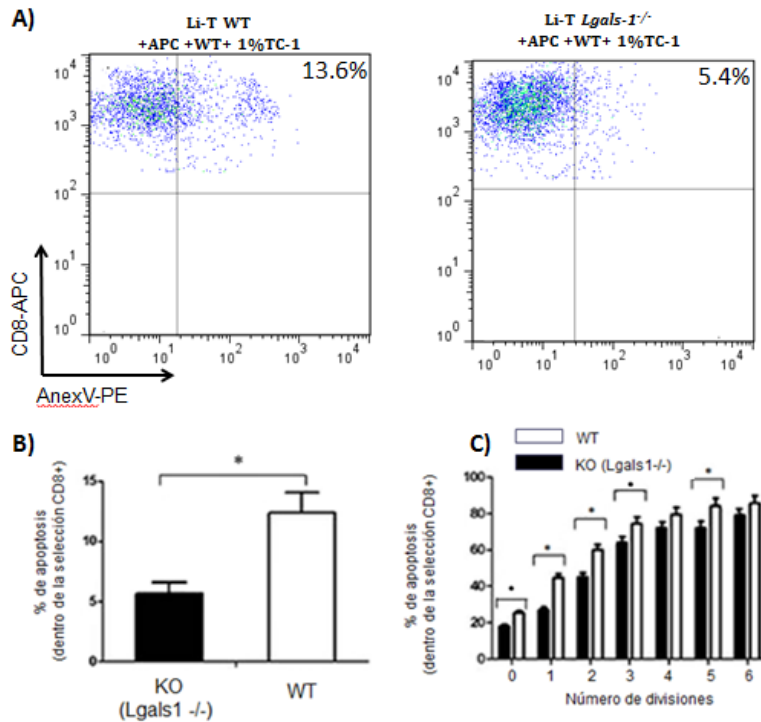


FIGURA 19: PAPEL DE LA GALECTINA-1 ENDÓGENA EN LA APOPTOSIS LINFOCITARIA. GRÁFICO REPRESENTATIVO DE LAS CÉLULAS T CD8+ TRAS LA ACTIVACIÓN POLICLONAL EN PRESENCIA DE CÉLULAS TC-1 AL 1%. LAS TASAS DE APOPTOSIS DE LOS LINFOCITOS DE TIPO SALVAJE (N = 3) Y LGALS1 ^{-/-} (N = 3) SE ANALIZAN COMPARATIVAMENTE MEDIANTE MARCACIÓN CON ANEXINA V DENTRO DE LA VENTANA DE SELECCIÓN DE LINFOCITOS T CD8+. (A) GRÁFICO DOTBLOT EN PSEUDOCOLOR PARA LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES. (B) GRÁFICO DE BARRAS CUANTITATIVO DE (A). (C) ANALISIS PARA CADA PICO DE DIVISIÓN (DILUCIÓN DE CFSE) . BARRAS BLANCAS: CÉLULAS DE TIPO SALVAJE; BARRAS NEGRAS: LGALS1 ^{-/-} (N=3, * P <0.05, · 0,1<P <0,05 PRUEBA WILCOXON).

Los linfocitos T citotóxicos patrullan y protegen al organismo reconociendo antígenos en las células diana por intermedio de su receptor específico, blancos que son eliminados principalmente por dos vías: la vía de Fas-Fas ligando (FasL) o exocitosis direccional de gránulos citotóxicos presentes en el citoplasma. Estos gránulos median la muerte de la célula diana a través de las moléculas citolíticas, que incluyen, entre otras, a una familia de serin proteasas llamadas granzimas, y las moléculas formadoras de poros, perforinas (pfn)¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Estos gránulos líticos están rodeados por una bicapa lipídica que contiene numerosas proteínas de membrana asociadas a los lisosomas (LAMP, CD107 a y b); por lo tanto, al marcar las células respondedoras con anticuerpos anti-CD107 y medir su expresión mediante citometría de flujo se puede identificar directamente los linfocitos T CD8+ desgranulantes. Los resultados mostrados en la Figura 20 demuestran que la ausencia de Gal-1 endógena en los linfocitos T CD8+ aumenta su capacidad para desgranular, independientemente de la presencia de células tumorales. De manera interesante, la Gal-1 endógena en los linfocitos afecta no solo a los porcentajes de células desgranuladoras (Figura 20A), sino también a la intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD107a. Este último resultado indica que la expresión / exposición intrínseca de CD107a está regulada negativamente por esta lectina (Figura 20B); es decir que al estar Gal-1 presente de manera endógena en las células respondedoras, éstas presentan una menor cantidad de gránulos líticos o bien estos son de menor tamaño. Como corolario de estos resultados podemos notar que la Gal-1 endógena en las células T CD8+ desempeña un papel importante en el control de su función.

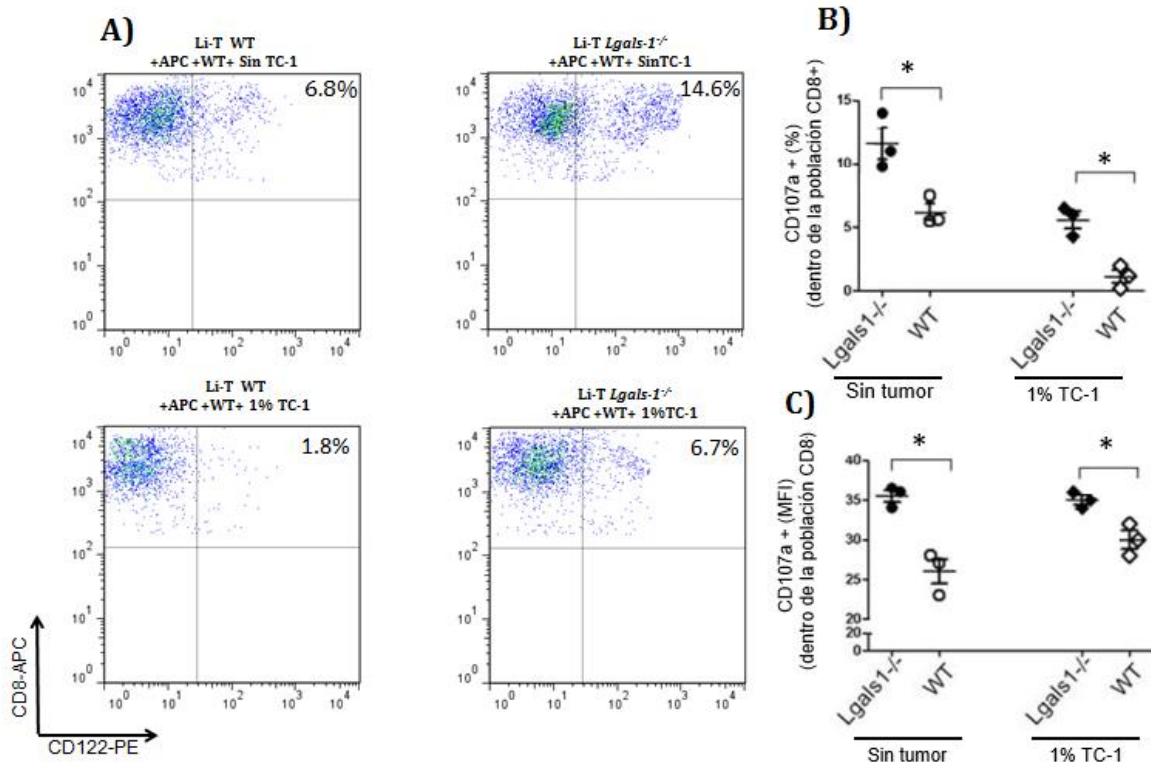


FIGURA 20: PAPEL DE LA GAL-1 ENDÓGENA EN LA CAPACIDAD DE DESGRANULACIÓN DE LINFOCITOS T CD8⁺. LINFOCITOS T PROVENIENTES RATONES DE TIPO SALVAJE Y LGALS1^{-/-} SE CULTIVARON EN PRESENCIA DE CPA SALVAJES Y SIN CÉLULAS TUMORALES O 1% DE CÉLULAS TC-1. LOS LINFOCITOS FUERON ESTIMULADOS POLICLONALMENTE CON ANTICUERPO AGONISTA DEL RECEPTOR CD3. DESPUÉS DE 48 HRS, LA MOVILIZACIÓN DE CD107A FUE EVALUADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO. (A) SE MUESTRAN LOS DOTBLOT PSEUDOCOLOR COMPARATIVOS PARA CONDICIONES SIN CÉLULAS TUMORALES Y CON 1% TC-1 DE RATONES DEFICIENTES O SALVAJES EN GAL-1 (B) PORCENTAJE DE CÉLULAS T CD8⁺ QUE EXPRESAN CD107A. + (N=3, * P <0.05, PRUEBA WILCOXON) (C) INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA (MFI) DE CD107A EN CÉLULAS T CD8⁺ (N=3, * P <0.05, PRUEBA T STUDENT).

LA GAL-1 ENDÓGENA MODULA LA FUNCIÓN LINFOCITARIA INDEPENDIENTEMENTE DE FACTORES EXÓGENOS

Tal como hemos enunciado precedentemente, la ausencia endógena de Gal-1 en los linfocitos produce un aumento en sus propiedades funcionales (Figura 18 y 20); lo que no sabíamos es si era un efecto de carácter intrínseco, en la misma célula, o bien si este efecto resultaba de su interacción con otras poblaciones celulares, ya sea por contacto directo o por vía de factores solubles, un efecto de carácter microambiental. Para dilucidar esto, realizamos en primera instancia experimentos de transwell. La Figura 21A muestra que los linfocitos deficientes en Gal-1 proliferan más extensamente que los de tipo salvaje cuando se activan en presencia de tumor (en concordancia con la Figura 18). A continuación, co-cultivamos linfocitos de tipo salvaje y deficientes en Gal-1 en una misma cámara y por tanto en contacto directo entre ambas poblaciones Figura 21B. El análisis se realizó sobre los linfocitos deficientes en Gal-1 exclusivamente. Esto fue posible debido a que se utilizaron ratones que, además de diferir en la expresión de Gal-1 endógena, difirieron en la expresión de la isoforma de CD45 (los linfocitos salvajes expresan CD45.1, mientras que los linfocitos *Lgals1*^{-/-} expresan la isoforma CD45.2). Ambos tipos linfocitarios se activaron policlonalmente por el agregado de anti-CD3 de manera soluble, pero la proliferación se evaluó en la población *Lgals1*^{-/-}, CD45.2. Cabe destacar que el co-cultivo de las células salvajes CD45.1 con células salvajes CD45.2 no afecta la proliferación de éstas últimas (Figura Suplementaria 1).

Los resultados demostraron que la presencia de células de tipo salvaje reduce la proliferación de células T CD8⁺ deficientes en Gal-1, transformando la proliferación de estos linfocitos *Lgals1*^{-/-} en indistinguible de los salvajes. Sin embargo, cuando estas dos fuentes de linfocitos se separaron a través de una membrana Transwell Figura 21C, ya no se observó ningún efecto en la proliferación y los linfocitos *Lgals1*^{-/-} continuaron a mostrar mayores índices proliferativos.

Este experimento demuestra claramente el papel fundamental de la Gal-1 endógena en el control de la función linfocitaria tras la activación, fenómeno que es independiente de la presencia de factores solubles. Introduciendo nuevas variantes para la comprensión actual del papel de Gal-1 en la definición de un contexto tolerogénico asociado al tumor.

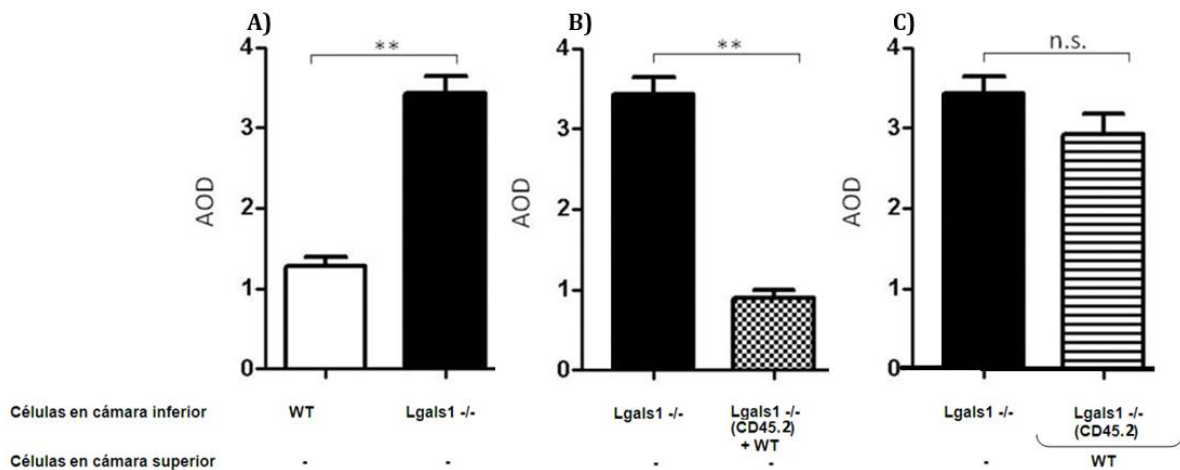


FIGURA 21: GAL-1 ENDÓGENA REGULA LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS A TRAVÉS DE CONTACTOS DE CÉLULA A CÉLULA. LOS LINFOCITOS DE RATONES LGALS1 -/- (BARRAS NEGRAS) Y DE TIPO SALVAJE (BARRAS BLANCAS) SE ACTIVARON POLICLONALMENTE EN PRESENCIA DE 1% DE CÉLULAS TC-1 Y 10% DE CPA (A).

ADEMÁS, LOS LINFOCITOS LGALS1 -/- (MARCADOS CON CFSE) Y LOS DE TIPO SALVAJE (CD45.1; CFSE-) SE COCULTIVARON JUNTOS (BARRAS PUNTEADAS) (B) O SEPARADOS A TRAVÉS DE UN TRANSWELL (BARRAS CON LÍNEAS HORIZANTALES)(C).

EN TODOS LOS CASOS, LA ACTIVACIÓN SE REALIZÓ CON 0,25 μ G/ML DE ANTI-CD3 SOLUBLE. LA PROLIFERACIÓN SE EVALUÓ A LAS 72 HRS POR DILUCIÓN DEL CFSE EN LA SUBPOBLACIÓN CD8+ CD45.2+. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO PROMEDIO DE DIVISIÓN (AOD) Y REPRESENTAN LA MEDIA \pm DE TRES EXPERIENCIAS INDEPENDIENTES. SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA ** P <0,01 (PRUEBA WILCOXON).

LA GAL-1 REGULA NEGATIVAMENTE LA INMUNIDAD *IN VIVO*

Datos bibliográficos demuestran que varias células tumorales poseen una tumorigenicidad reducida cuando se inyectan en ratones Lgals1 -/-, en comparación con su inyección en ratones de tipo salvaje ^{179,180}, por lo que evaluamos el comportamiento de la línea tumoral TC-1 en este contexto. El resultado fue similar a lo descrito, el 92% de los ratones de tipo salvaje que fueron inyectados de manera subcutánea con las células TC-1 desarrollaron tumores y presentaron un tiempo lag de 47 \pm 5 días (tiempo requerido para que el tumor aparezca y sea palpable) y una tasa de duplicación de 7 \pm 2 días (n = 5). Por el contrario, no se obtuvieron tumores cuando

estas mismas células fueron inyectadas en ratones *Lgals1* $-/-$, ninguno de los 4 ratones inyectados desarrolló una neoplasia hasta el día 80 posterior a la inyección. Resultaba complejo formular conclusiones a partir de este tipo de modelo experimental ya que el impacto de los efectos inmunitarios no se puede establecer de manera definitiva dado que, en este diseño experimental, Gal-1 está ausente en todas las células de los sujetos experimentales, incluyendo a las células endoteliales, población ésta en la que se demostró anteriormente que Gal-1 juega un importante rol regulador. Para evaluar con mayor precisión el rol de la Gal-1 endógena de los linfocitos en el control del crecimiento tumoral *in vivo*, nos vimos forzados a desarrollar una nueva estrategia. Primero, con el objetivo de incrementar la frecuencia de las poblaciones de linfocitos reactivos contra el tumor y poder evaluar el efecto antineoplásico experimentalmente, inmunizamos ratones de tipo salvaje y *Lgals1* $-/-$ con 400.000 células dendríticas pulsadas con lisados tumorales y maduras. Brevemente, se realizó la extracción de médula de ratones de tipo salvajes y se indujo la diferenciación los progenitores a células dendríticas, mediante el agregado al medio de cultivo de interleuquina 4 y el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF por su sigla en inglés). Transcurridos los 5 días de cultivo, las células fueron pulsadas con lisado tumoral de células TC-1, para luego inducir su maduración con el agregado del complejo PEI-PolyU y CpG. En el día 7 post-inmunización, se obtuvieron células inmunes provenientes de los ganglios linfáticos ABRIM. Primeramente, se realizó una caracterización fenotípica de las células inmunes provenientes de los ratones inmunizados salvajes y *Lgals1*, en la que no se detectaron cambios significativos entre ambos tipos de ratones (tanto en el número total de células absolutas, como relativas: % CD4+, % CD4+CD25+Foxp3+, % CD8+, %CD8+ CD122+). A continuación, los linfocitos obtenidos de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados (tipo salvaje o *Lgals1* $-/-$) fueron transferidos en una proporción 1:1 a ratones inmunodeficientes (Nude). Los ratones Nude poseen todos los compartimentos no inmunes (por ejemplo, estroma y particularmente las células endoteliales) salvajes para Gal-1, pero al no poseer timo, carecen de células T provenientes de este órgano. Entonces, a excepción de los linfocitos T en aquellos ratones transferidos con el sistema inmunitario *Lgals* $-/-$, todas las células del ratón expresan niveles fisiológicos de Gal-1. Esta configuración experimental nos permitió comparar la capacidad de los linfocitos *Lgals1* $-/-$ y salvaje para controlar el crecimiento tumoral en un macroambiente de tipo salvaje *in vivo*. Al analizar el desarrollo tumoral en detalle notamos que los ratones reconstituidos con linfocitos *Lgals1* $-/-$ mostraron un marcado aumento en la latencia (tiempo de aparición) del tumor y una ligera disminución en la tasa de duplicación tumoral (Figura 22 y Tabla 3). Bajo estas condiciones, la tumorigénesis, definida como el porcentaje de ratones que desarrollaron tumor, fue del 100% en ambos grupos experimentales, lo que implica

que la Gal-1 endógena en los linfocitos juega un papel importante en el control del crecimiento tumoral en fases iniciales, pero posteriormente otras vías moleculares pueden eludir su acción.

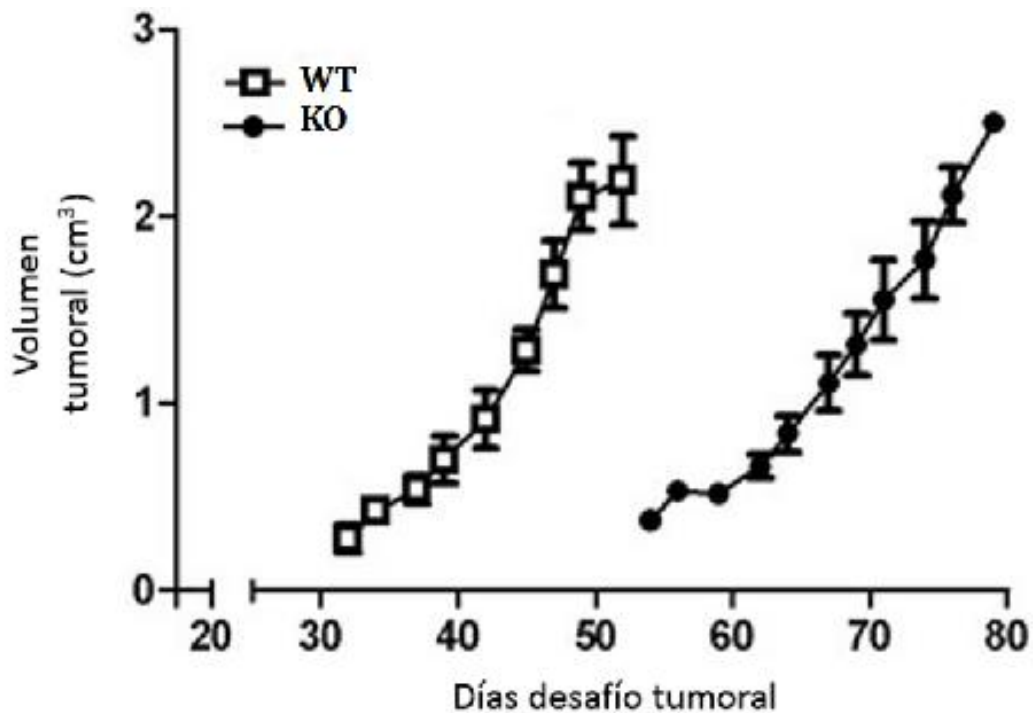


FIGURA 22: LA GAL-1 ENDÓGENA EN LOS LINFOCITOS ACELERA EL CRECIMIENTO DEL TUMOR TC-1 *IN VIVO*. RATONES NUDE MACHOS ADULTOS FUERON RECONSTITUIDOS CON CÉLULAS INMUNITARIAS ENRIQUECIDAS EN LINFOCITOS ONCOREACTIVOS DE RATONES DE TIPO SALVAJE (CUADRADOS BLANCOS; N = 5) O LGALS1 -/- (CÍRCULOS NEGROS; N = 6). EL DÍA DESPUÉS, LOS RATONES RECIBIERON 1×10^6 TC-1 EN GELTREX®.

	Latencia/Lag (días)	tasa de duplicación (días)
Linfocitos salvajes (WT)	32 ± 2 *	6.0 ± 1.2 *
Linfocitos Lgals 1 - / - (KO)	54 ± 4	8.2 ± 0.4

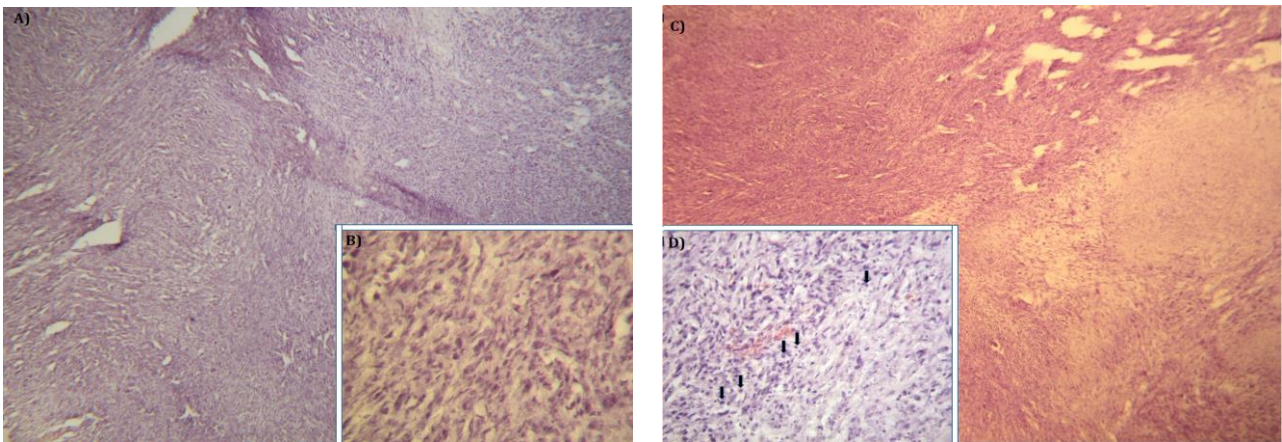
TABLA 6: CRECIMIENTO TUMORAL, EN RATONES NUDE ADULTOS RECONSTITUIDOS CON CÉLULAS INMUNES SALVAJES O LGALS1 -/- . (N=5, * P <0.05, PRUEBA T STUDENT (LATENCIA), WILCOXON (TASA DE DUPLICACIÓN TUMORAL).

Una vez que se alcanzó el límite ético permitido de volumen tumoral (2 cm^3 dictaminado por el comité de ética institucional), los ratones fueron sometidos a eutanasia por dislocación cervical y se procedió a extirpar los tumores y criopreservarlos para su posterior procesamiento histológico. En colaboración con el

Dr. Vázquez del laboratorio de Neuropatología Experimental FMED-UBA, se realizaron los cortes en criostato, se montaron las muestras y se realizaron las tinciones con hematoxilina-eosina o bien marcaciones de inmunohistoquímica.

El análisis de los cortes histológicos fue efectuado en colaboración con la Dra. Vanzulli en la Academia Nacional de Medicina. El informe se detalla a continuación: “Los tumores generados con la línea celular murina TC-1 creciendo en ratones NUDE muestran a nivel morfológico un patrón de crecimiento predominantemente fusocelular con células de citoplasma ahusado y marcado pleomorfismo nuclear característico de tumores de alta agresividad. El análisis de los cortes tumorales en las condiciones de transferencia linfocitaria adoptiva salvaje para Galectina-1 mostró un crecimiento sólido con ausencia de áreas necróticas (Figura 23 A y B). El análisis de los cortes tumorales provenientes de ratones transferidos adoptivamente con células inmunes deficientes para galectina-1 exhibió un amplio centro necrótico circundado por tejido tumoral (Figura 23 C y D).

FIGURA 23: ANÁLISIS HISTOLÓGICO POR TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA SOBRE CORTES REPRESENTATIVOS DE TUMORES TC-1. A) CORTE REPRESENTATIVO DE RATONES TRANSFERIDOS ADOPTIVAMENTE CON SISTEMA INMUNE SALVAJE. MAGNIFICACIÓN X5; B) CORTE REPRESENTATIVO DE RATONES



TRANSFERIDOS ADOPTIVAMENTE CON SISTEMA INMUNE SALVAJE. MAGNIFICACIÓN X60; C) CORTE REPRESENTATIVO DE RATONES TRANSFERIDOS ADOPTIVAMENTE CON SISTEMA INMUNE DEFICIENTE EN GAL-1, DONDE SE PRESENTA EN EL EXTREMO INFERIOR DERECHO UNA ZONA NECRÓTICA Y TEJIDO TUMORAL VIABLE EN ZONA SUPERIOR IZQUIERDA. MAGNIFICACIÓN X5. D) CORTE REPRESENTATIVO DE RATONES TRANSFERIDOS CON SISTEMA INMUNE DEFICIENTE EN GAL-1. LAS FLECHAS INDICAN LINFOCITOS INFILTRANTES EN LA INTERFASE ZONA NECRÓTICA-VIABLE. MAGNIFICACIÓN X60.

En la interface zona viable / área necrótica, se visualiza un discreto infiltrado linfocitario (Figura 23 D, tener en cuenta que son animales reconstituidos, de allí su baja frecuencia). El mismo está ausente en el tejido transferido con células salvajes

para galectina-1 (Figura 23 B). El análisis inmunohistoquímico para Ki67, no mostró diferencia entre los grupos analizados (Figura 24).

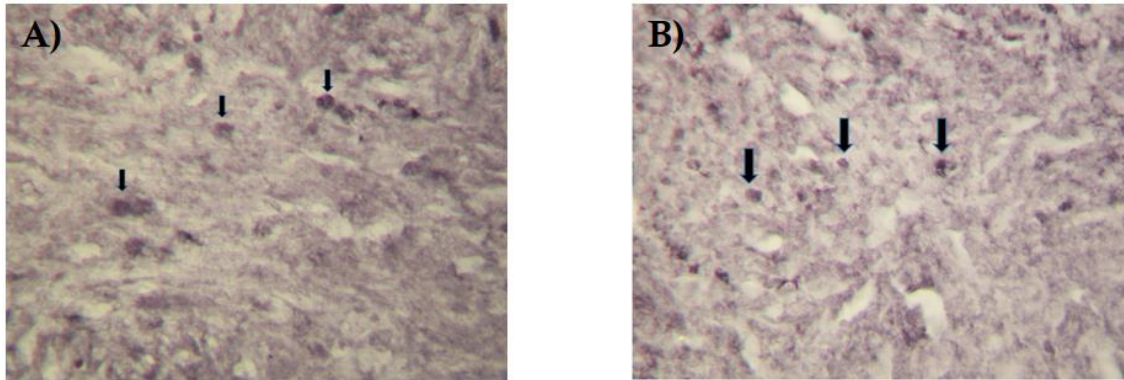


FIGURA 24: ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO POR MARCACIÓN CON ANTICUERPO ANTI KI-67 SOBRE CORTES REPRESENTATIVOS DE TUMORES TC-1. A) CORTE REPRESENTATIVO DE RATONES TRANSFERIDOS ADOPTIVAMENTE CON SISTEMA INMUNE DEFICIENTE EN GAL-1. MAGNIFICACIÓN X50; B) CORTE REPRESENTATIVO DE RATONES TRANSFERIDOS ADOPTIVAMENTE CON SISTEMA INMUNE SALVAJE. MAGNIFICACIÓN X50. (N=3, SE REALIZARON 3 CORTES POR N, SE ANALIZARON 5 CAMPOS POR CORTE).

MECANISMOS CELULARES INVOLUCRADOS EN LA MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES MEDIADOS POR LA GAL-1 ENDÓGENA LINFOCITARIA.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* mostrados anteriormente, decidimos analizar el impacto de la ausencia endógena de la Gal-1 en las diferentes subpoblaciones de células involucradas en la respuesta inmune. Para este propósito, purificamos células T CD4⁺ y CD8⁺ por citometría de flujo acoplada a *cell sorting* (pureza mayor a 98%) y células presentadoras de antígenos (CPA) por adherencia a plástico. Realizamos ensayos de proliferación *in vitro* co-cultivando, en cada pocillo por separado, todas las posibles combinatorias de las subpoblaciones de diferentes genotipos en proporciones fisiológicas (CD4⁺: CD8⁺ = 5:3). Por un lado, vimos que la ausencia de Gal-1 endógena en las células presentadoras de antígenos, no tenía ningún efecto sobre las tasas proliferativas de los linfocitos CD8⁺, ya sean salvajes o deficientes en Gal-1 en presencia linfocitos T CD4⁺ salvajes o deficientes para Gal-1 (datos no mostrados). Al no mostrar diferencia en las tasas proliferativas de los linfocitos T CD8⁺ todos los experimentos se realizaron en presencia de CPA salvajes.

Los resultados de la Figura 24 demuestran que la ausencia de Gal-1 en células T CD4⁺, da como resultado mayores tasas de proliferación en los linfocitos T CD8⁺, en un

contexto de activación policlonal en presencia de tumor. No obstante, un mayor efecto se observó cuando Gal-1 estaba ausente en las propias células T CD8+ respondedoras, al comparar el efecto producido por los CD4+ (AOD = 1.7 vs. 1.1 respectivamente). No obstante, el efecto pro-proliferativo de la ausencia de Gal-1 endógena fue máximo cuando la lectina estaba ausente tanto en la población CD4+ como en la CD8+ (AOD = 2.8).

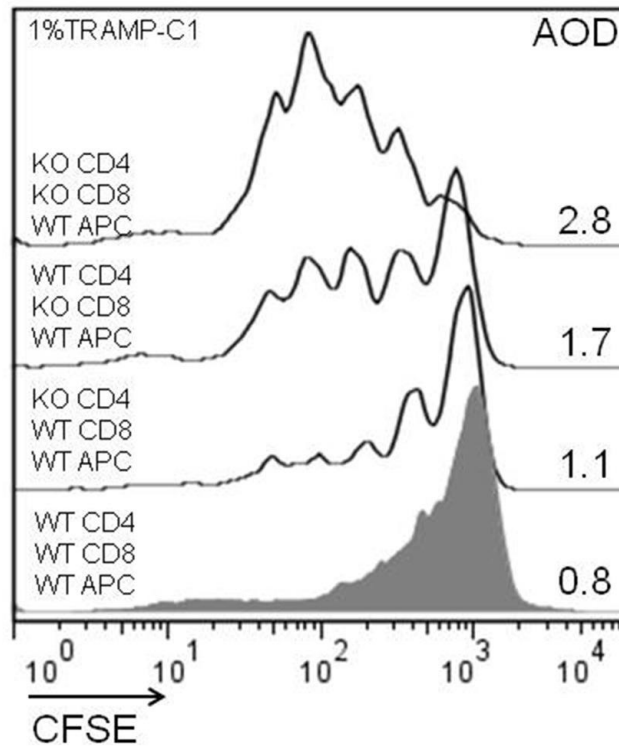


FIGURA 24: MECANISMOS CELULARES IMPLICADOS EN EL EFECTO ANTITUMORAL MEDIADOS POR LA GAL-1 ENDÓGENA LINFOCITARIA. CÉLULAS T CD4+ Y CD8+ DE TIPO SALVAJE Y LGALS1 -/- (PUREZA > 98%) Y CPA (PUREZA CD14+ > 90%) SE COMBINARON Y CO-CULTIVARON EN PRESENCIA DE 1% DE CÉLULAS TUMORALES TC-1. LOS LINFOCITOS FUERON ACTIVADOS POLICLONALMENTE CON ANTI-CD3. LAS TASAS DE PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULAS T CD8+ EN LAS DIFERENTES COMBINACIONES SE EVALUARON MEDIANTE DILUCIÓN CFSE A LAS 72 HORAS. AOD: PROMEDIO DE LA DIVISIONES. SE MUESTRA UN EXPERIMENTO REPRESENTATIVO DE TRES.

Una vez notada las diferencias en las tasas de proliferación de células T CD8+ en ausencia de la Gal-1 endógena decidimos a investigar las posibles causas de éstas, ya que las mismas pueden implicar dos niveles de regulación distintos. La ausencia de Gal-1 podría afectar intrínsecamente a los linfocitos T CD8+ o CD4+ respondedores directamente, o bien por un efecto indirecto, donde la ausencia de Gal-1 cause alteraciones (cualitativas o cuantitativas) en una población reguladora incluida dentro de los fenotipos CD8+ o CD4+ y, por lo tanto, que esto afecte la proliferación de células

respondedoras. Para realizar un análisis más profundo y determinar si había alteraciones (cuantitativas o cualitativas) en las poblaciones supresoras incluidas dentro de los fenotipos CD8+ o CD4+, células de los ganglios linfáticos ABRIM fueron obtenidas de ambos tipos de ratones (salvajes y deficientes en Gal-1; *Lgals1*^{-/-}) y marcadas utilizando los anticuerpos fluorescentes anti-CD8-APC, CD28-FITC y CD122PE; o bien anti-CD4-APC, CD25-FITC y FOXP3-PE. En principio no encontramos diferencias en la proporción de linfocitos de la subpoblación Treg CD4+ en los ratones analizados (datos no mostrados), pero si se encontraron reducciones en la población de linfocitos T con fenotipo CD8+ CD28- CD122+ en los ratones deficientes de Gal-1 (Figura 25, n=5). Las funciones supresoras de las respuestas inmunes por este tipo celular han sido descritas previamente ^{192,193}. Los efectos de Gal-1 en la población regulatoria CD4+ ha sido reportada en la bibliografía ^{79,80}, mientras que los efectos sobre las poblaciones de fenotipo CD8+ resultaba un campo aún inexplorado.

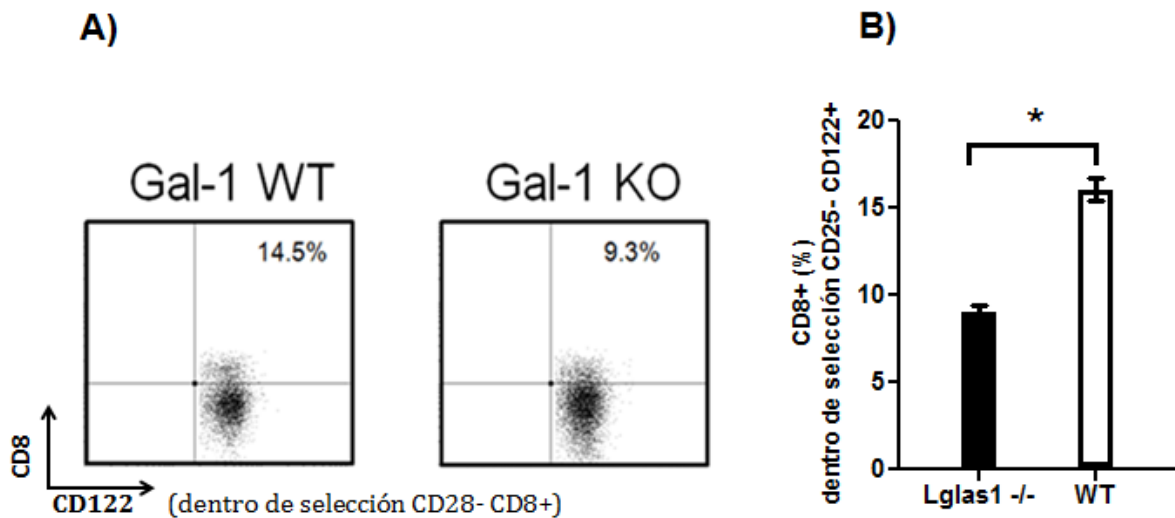


FIGURA 25: ANALISIS DE POBLACIONES T REGULATORIAS. ANALISIS FENOTIPICO DE CÉLULAS CD8+ CD28-CD122+ EN RATONES C57BL/6 SALVAJES Y LGALS1^{-/-} (DEFICIENTES EN GAL-1). A) LOS GRÁFICOS REPRESENTAN LA EXPRESIÓN CD8/CD122 AL INTERIOR DE LA SELECCIÓN CD28-. B) LAS BARRAS MUESTRAN LA PROPORSION DE CELULAS CD8+ DENTRO DE LA SELECCIÓN CD25- CD122+. (N=5). SIGNIFICACION ESTADISTICA * P < 0.05 PRUEBA WILCOXON.

Si bien habíamos descripto una diferencia cuantitativa de células T CD8+ CD28-CD122+ en ausencia de la Gal-1 endógena, no podíamos asumir alteraciones funcionales en esos linfocitos. Con el fin de dilucidar si existía alguna diferencia funcional entre las células regulatorias CD8+ de tipo salvaje y aquellas de mismo fenotipo provenientes de ratones *Lgals1* *-/-*, se realizaron suspensiones celulares de ganglios ABRIM de ambos tipos de ratones y las células se marcaron con anti-CD8-APC, CD28-PE-Cy-7 y CD122-PE. Las células CD8+ CD28- CD122+ se purificaron por fluorescencia acoplada a *cell sorting* y se cocultivaron adicionalmente con linfocitos marcados con CFSE provenientes de ganglios ABRIM de ambos tipos de ratones. Además, se agregó 10% de CPA esplénicas de tipo salvaje purificadas en función a su adherencia a placas de cultivo.

El efecto supresor de las células CD8+ CD28- CD122+ obtenidas de ratones *Lgals1* *-/-* y salvajes se evaluaron comparativamente agregando estas células purificadas en una proporción del 0,5% de los linfocitos totales en el pocillo. Las células fueron activadas policlonalmente con anti-CD3 adsorbido (1 µg/ml) en una placa de 96 pocillos en presencia de 1% de células tumorales TC-1. La proliferación de células T CD8+ se evaluó a las 72 hrs por dilución con CFSE. El análisis de las proliferaciones mostró una mayor inmunosupresión por parte de las células CD8+ CD28- CD122+ cuando éstas eran salvajes para Gal-1 (Figure 26). Es decir que la Gal-1 de tipo endógena sería necesaria para una óptima inmunosupresión de las células regulatorias de fenotipo CD8+.

En total, estos resultados demuestran fehacientemente que la Gal-1 endógena en los linfocitos regula las propiedades funcionales tanto de las células T CD4+ y CD8+ a varios niveles, proponiendo un nuevo marco teórico para la comprensión de las propiedades funcionales de la Gal-1 endógena en la respuesta inmune antitumoral.

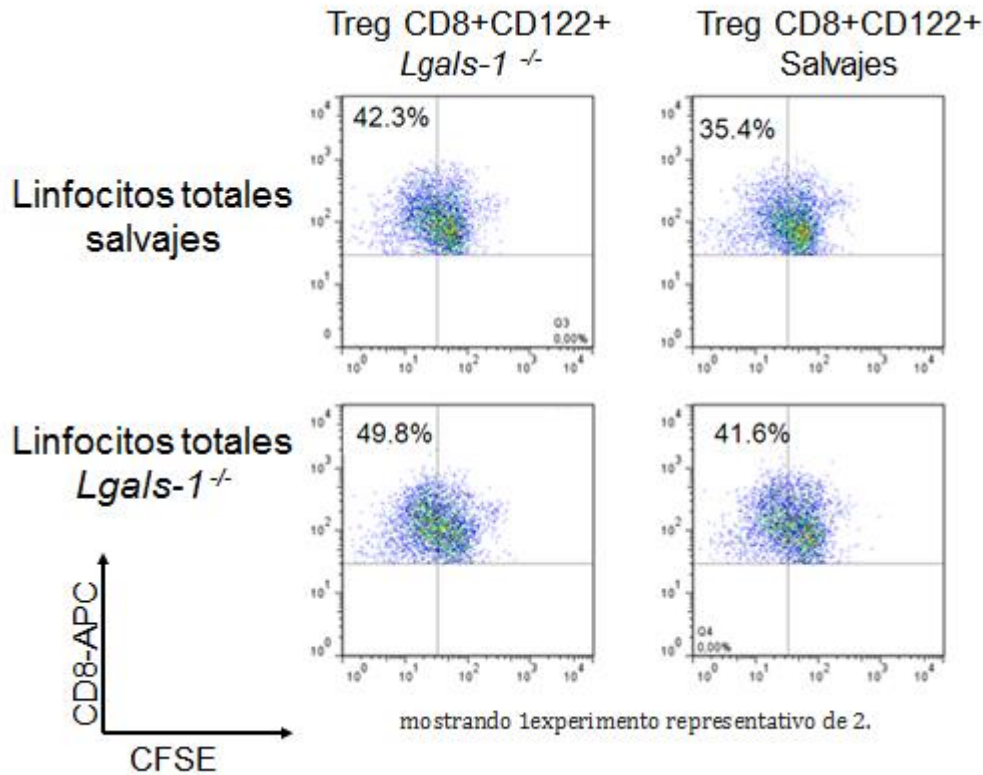


FIGURA 26: IMPACTO DE LA GAL-1 ENDÓGENA EN LA FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8+ CD28- CD122+. LINFOCITOS CD8+ CD28- CD122+ PROVENIENTES DE RATONES LGALS1^{-/-} O SALVAJES FUERON CULTIVADOS CONJUNTAMENTE CON CÉLULAS TOTALES DE GANGLIOS ABRIM EN PRESENCIA DE CPA SALVAJES EN UN CONTEXTO DE TUMOR TC-1. LAS TASAS DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS T CD8+ SE EVALUARON MEDIANTE DILUCIÓN DE CFSE A LAS 72 HRS POSTERIORES A LA ACTIVACIÓN. (N=2).

Capítulo II

RESULTADOS: CAPÍTULO II

Se han descrito varios mecanismos por los que Gal-1 tumoral participaría en la creación del microambiente tolerogénico. Éstos, en su gran mayoría, involucran interacciones a nivel extracelular. Además de este rol ampliamente evaluado, hemos propuesto alternativas teóricas adicionales donde la Gal-1 intrínseca (propia de los linfocitos T) CD4+ y CD8+ posea un impacto negativo sobre la proliferación de los linfocitos T CD8+, efecto aún más evidente en un contexto tumoral. Demostramos que, además del efecto proliferativo, la ausencia Gal-1 afectaba la apoptosis y la capacidad efectora en los linfocitos T CD8+ y que este fenómeno implicaba contactos de célula a célula independientemente de la presencia de factores solubles. Lo que introducía nuevas variantes para la comprensión actual del papel de Gal-1 en la definición de un contexto tolerogénico asociado al tumor. Luego, se analizó la implicancia de estos resultados en un modelo *in vivo* donde se corroboró la hipótesis de que la Gal-1 intrínseca posee un impacto en el control de las propiedades anti-tumorales de los linfocitos. En estas experiencias, el análisis histológico de los tumores demostró una mayor necrosis y menores índices mitóticos cuando Gal-1 está ausente en la población linfocitaria. Por último, nos propusimos evaluar los mecanismos celulares involucrados en estos fenómenos, demostramos que la Gal-1 endógena afecta las propiedades funcionales de los linfocitos CD4+ y CD8+, siendo una molécula clave para el efecto inmunosupresor de la población regulatoria CD8+ CD28- CD122+.

Si bien estos resultados resultan alentadores en la búsqueda de potenciales nuevas estrategias de intervención para el cáncer, nuestros resultados fueron realizados utilizando células provenientes de ratones carentes en Gal-1 desde su desarrollo inicial y estos efectos podrían ser afectados por mecanismos compensatorios. Si bien las perturbaciones genéticas juegan un papel importante en la evolución; los organismos requieren sistemas de amortiguación para garantizar su desarrollo armónico, por lo que parte de los efectos evaluados pueden ser, en parte, enmascarados por la robustez genética. Esto es el reflejo de la capacidad de un organismo vivo para mantener su viabilidad y estado físico a pesar de variaciones genéticas y/o ambientales que puedan ocurrir¹⁹⁴. La robustez genética puede surgir de genes redundantes, por lo que la pérdida de un gen puede ser compensada por otro con funciones y patrones de expresión superpuestos, como se informó para varios mutantes en un rango de organismos modelo¹⁹⁵⁻¹⁹⁸ (revisado en ¹⁹⁹). Otra forma de robustez surge de redes moleculares estrechamente reguladas, como las metabólicas, las de señalización y las transcripcionales donde la perturbación de la función de un gen particular en una red

puede alterar la expresión de otros genes dentro de la misma red, a fin de mantener así el bienestar celular^{200,201}. Es por esto que en la bibliografía pueden encontrarse numerosos casos donde ratones deficientes (knockout) para una proteína fallan a la hora de mostrar un fenotipo marcado o incluso que los cambios fenotípicos sean nulos, mientras que los ratones en los que el bloque de una proteína es condicional y/o parcial el fenotipo es más evidente^{198,202-204}. Tal es el caso por ejemplo los knockdown del supresor de tumores retinoblastoma (Rb1) donde los fibroblastos embrionarios de ratón (Fer) son capaces de reingresar al ciclo celular, mientras que los Fer derivados de animales mutantes para Rb1 no pueden volver a ingresar al ciclo celular debido, al menos en parte, a la regulación compensatoria de p107²⁰⁵.

A partir de este conocimiento básico actual, nos propusimos desarrollar un método que permitiera regular en forma negativa la expresión intrínseca de esta galectina, específicamente en los linfocitos T. Las premisas fundamentales consistieron en que el método debía ser de utilización simple, con reproducibilidad biológica, aplicable tanto a situaciones *in vitro* como *in vivo*, específico para el blanco celular de interés (en nuestro caso los linfocitos T CD8+) y aplicable a sistemas tanto murinos como humanos para mejorar el carácter traslacional del compuesto. Para estos fines, nos propusimos la utilización de un shRNA específico contra Gal-1 que habíamos evaluado en nuestro laboratorio y que regula negativamente la expresión de esta lectina en un 90%, tanto en células murinas como humanas⁵⁰. Este silenciamiento condicional y parcial haría evidenciar aún más el fenotipo conforme a lo visto en la bibliografía. Para direccionar su distribución de manera específica hacia los linfocitos T CD8+, se acoplo dicho shRNA a un aptámero ligando de 4-1BB¹⁵⁰, formando así una quimera aptámero 4-1BB - shGal-1 (Apt4-1BB/shGal-1). Proponíamos que la utilización de esta construcción generara cambios funcionales en los linfocitos T CD8+ tanto *in vivo* como *in vitro*.

DESARROLLO DE UN MÉTODO SIMPLE DE SILENCIAMIENTO EFICAZ Y SELECTIVO DE LA GAL-1 INTRÍNSECA EN LOS LINFOCITOS T CD8+.

Como mencionamos en la introducción, nuestro objetivo es regular negativamente la expresión de Gal-1 en los linfocitos. Para ello propusimos una estrategia basada en el uso de ARN interferentes. No obstante, para lograr una biodistribución restringida, necesitábamos de una molécula que direccionara el ARN interferente a los linfocitos T CD8+ de manera específica y con gran afinidad. Para ello, planteamos el clonado de un shRNA específico para Gal-1 río abajo de un aptámero agonista para 4-1BB (CD137), puesto que la expresión de 4-1BB es inducida en los linfocitos T CD8+ bajo condiciones de activación celular²⁰⁶. Ha sido demostrado la

relevancia de esta molécula como potente co-estímulo de fases tempranas de la activación de los linfocitos T CD8+ ¹⁶³ y mediante la interacción con su ligando, la modulación fina de las propiedades funcionales de las células presentadoras del antígeno⁴.

Gracias a la colaboración establecida con el Dr. E. Gilboa de la Universidad de Miami contamos con un plásmido que codifica para un aptámero específico para 4-1BB. Esta molécula ARN posee dos dominios monoméricos que interaccionan con la molécula 4-1BB con una afinidad de (Kd=40 nM), comprobada experimentalmente²⁰⁶, la que excede a aquella de los anticuerpos disponibles en el mercado y posee actividad agonista, proveyendo una potente señal de co-estimulación para los linfocitos T CD8+. Además de este efecto, planteamos que este aptámero fuese utilizado para direccionar un shRNA anti-Gal-1 hacia el tipo celular deseado, en nuestro caso los linfocitos T CD8+ activados. De esta forma y utilizando técnicas de clonado, se adicionó una secuencia oligonucleotídica que codifica para el shRNA específica para el transcripto *Lgals1* (shRNAgal-1) o bien para un shRNA Scramble (shRNAscrbl) que posee la misma proporción y calidad de bases pero que codifica para un shRNA que no hibrida con ningún ARN mensajero en las células (señalado en rojo en la Figura 27).

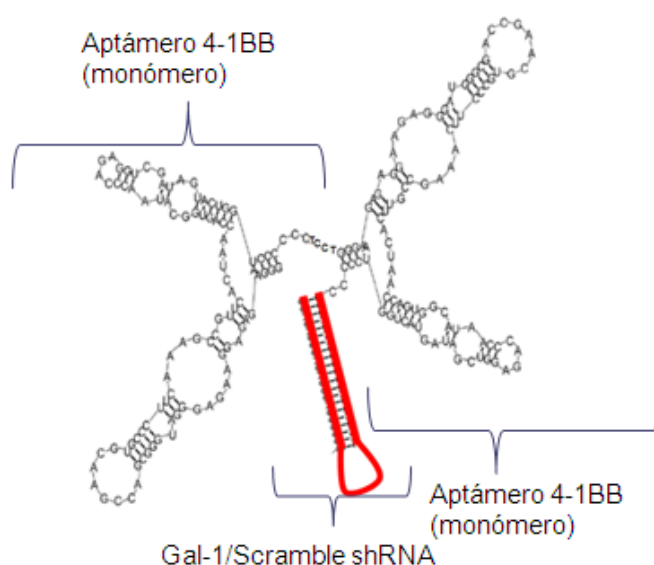


FIGURA 27: ESQUEMA DE LA MOLÉCULA QUIMERA APTÁMERO SHRNA ADAPTADO DE ¹⁵⁰

En otros modelos se había demostrado que una vez que los dominios monoméricos del aptámero interaccionan con la molécula 4-1BB de superficie, este complejo molecular es endocitado por el linfocito T CD8+ y al encontrarse en el espacio citoplasmático la enzima intracelular DICER genera el ARN interferente²⁰⁷.

Es interesante remarcar que la utilización de esta construcción implica la asociación de un efecto direccionante (que es *per se* una potente señal co-estimuladora inmunitaria) a un shRNA que reduce los niveles de la Gal-1 intrínseca y que por lo tanto debía promover una mayor capacidad proliferativa y/o efectora en los linfocitos T CD8+. Los dos efectos podían tener naturaleza aditiva/sinérgica y por ende serían de gran beneficio para los fines de inmunoterapia para cáncer.

Una vez clonado el vector y verificado por secuenciación, se efectuó la transcripción *in vitro* (kit RiboMax™ Large Scale RNA production System, Promega P1300). Análisis en geles de agarosa mostraron la integridad del producto.

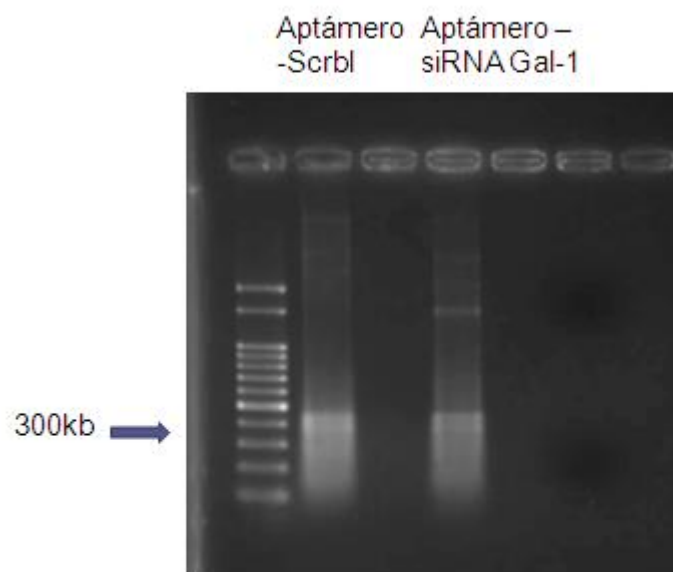


FIGURA 28: GEL DE AGAROSA DE LOS APTÁMEROS SHRNA. EL GEL MUESTRA LA INTEGRIDAD DE LOS PRODUCTOS DE SÍNTESIS TANTO PARA SHRNA-GAL-1 COMO PARA EL SHRNA-SCRBL.

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL SILENCIAMIENTO DE LA GAL-1 INTRÍNSECA EN LOS LINFOCITOS T CD8+ (*IN VITRO*)

Para evaluar la eficiencia de las quimeras shRNA/aptámeros se realizó un ensayo de proliferación linfocitaria *in vitro*. De manera similar a los resultados descritos en las secciones anteriores, realizamos ensayos de activación policlonal (anti-CD3) en presencia de tumor (TC-1) agregando los ARN aptámeros-shRNA (Gal-1 o control *scramble*) a distintos tiempos luego de la activación (0, 12, 24 y 48h). La elección de esta cinética de incubación con aptámeros-shRNA no es fortuita, coincide

con los tiempos de regulación positiva de 4-1BB post-activación en los linfocitos T CD8⁺¹⁶³. En colaboración con el Lic. Y Rondon, evaluamos la cinética de expresión de 4-1BB en la superficie celular luego de la activación linfocitaria y, si bien los resultados son de carácter aún preliminar, muestran que el pico de aparición del co-receptor se encuentra dentro de las primeras 24hs, lo que confirma que el agregado de aptámero durante las primeras 48hs sería suficiente para lograr un efecto (Figura Suplementaria 1). Cabe destacar que los cultivos primarios de linfocitos no son sincrónicos, por lo que el agregado de aptámeros debe exceder al tiempo de aparición marcado por la cinética de 4-1BB en superficie. Las dosis utilizadas fueron las mismas que se describieron para otros sistemas, 100nM¹⁵⁰. La proliferación linfocitaria fue evaluada por dilución de CFSE. En la Figura 29 y en concordancia con lo reportado en ¹⁵⁰, al comparar los dos histogramas inferiores se puede notar el efecto co-estimulador proveniente de la interacción del aptámero con su ligando; es decir que el aptámero retenía la capacidad de co-estimular cuando está acoplado a un shRNA. El análisis de los histogramas medio y superior demostró una mayor proliferación de los linfocitos T CD8⁺ cuando se adicionó la quimera shRNAGal-1; por lo que el constructo no solo retenía la capacidad co-estimuladora debido a la oligomerización de los receptores 4-1BB, sino que podía ser internalizado (en el proceso de reciclado de receptores) y una vez degradado, el shRNA Gal-1 era procesado por la maquinaria celular y ejercía su efecto biológico. Las diferencias en la proliferación resultaron significativas para todas las comparaciones cuando se realizó una ANOVA de 1 factor y se analizaron los intervalos de confianza para 0.95 generados con el método de Tukey.

Este experimento no sólo ponía en evidencia una vez más el papel inmunomodulador negativo de la Gal-1 linfocitaria endógena, sino que en principio el modelo de internalización y procesamiento de las quimeras Aptámero/shRNA estaba funcionando. Actualmente nos encontramos trabajando en colaboración con el Lic. Y. Rondón en experimentos que confirmen esta hipótesis; experimentos preliminares de RT-qPCR muestran la regulación negativa de Gal-1 a nivel de su mensajero en un 50% en células T CD8⁺. Brevemente, se realizó un ensayo de activación policlonal por anti-CD3, como el descrito en la sección de materiales y métodos, luego se trató con Apt4-1BB/shRNAGal-1 a las 15,19 y 24hs. Por citometría de flujo acoplada a “*cell sorting*” se separaron las poblaciones T activados (CD8⁺CD25⁺) de las T CD8⁺ no activadas (CD8⁺CD25⁻), se realizó una extracción de ARN utilizando la metodología de TRIZOL, una transcripción reversa y luego se cuantificaron de manera relativa los transcritos de galectina-1 y un transcripto de referencia (36B4) mediante una PCR en tiempo real. Cabe destacar que se compararon linfocitos T no activados CD8⁺ CD25⁻ (que no expresan 4-1BB, y por consiguiente no son blanco de la construcción) con linfocitos T activados (CD8⁺ CD25⁺, que co-expresan 4-1BB y que por consiguiente son

blancos de la construcción). Dicho de otra forma, los linfocitos no activados no expresan 4-1BB en superficie por lo que el aptámero no puede ser internalizado y en consecuencia no son blancos de silenciamiento por shRNA. Previamente se demostró co-expresión de 4-1BB y CD25, por lo que se utilizó éste último receptor para la purificación de células. Bajo estas condiciones, los niveles del transcripto de Gal-1 fueron de un 50% en las células CD8+ blanco de la construcción comparadas con aquellas que no lo son, demostrando el shGal1 de la construcción es efectivo.

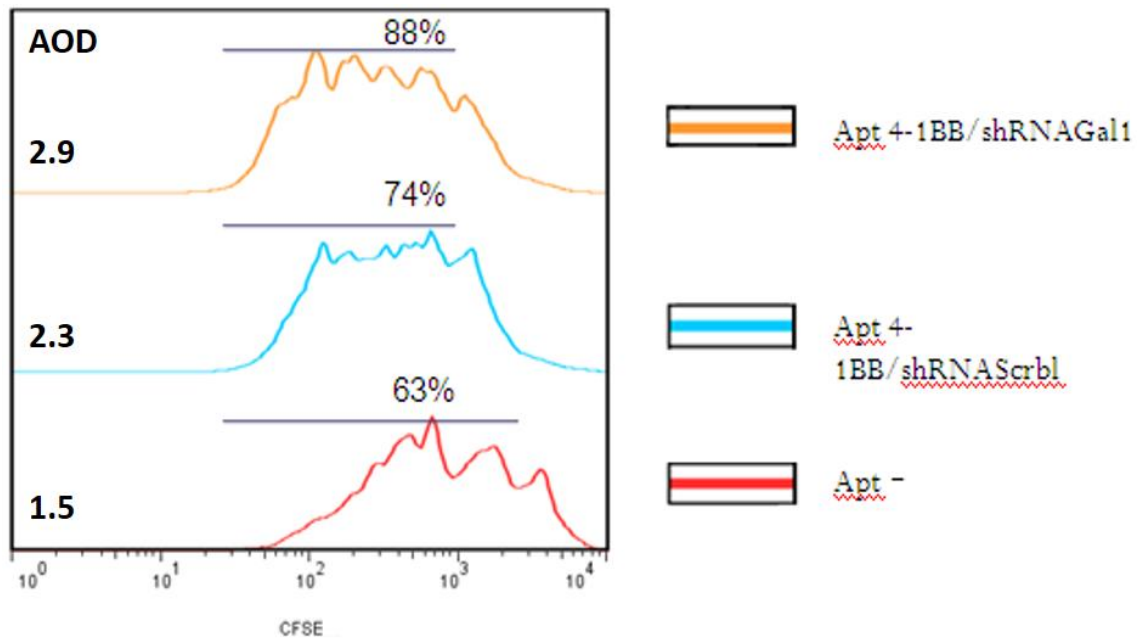


FIGURA 29: MODULACIÓN FUNCIONAL EN LINFOCITOS T CD8+ POR QUIMERAS APTÁMERO-SHRNA. LOS LINFOCITOS DE RATONES DE TIPO SALVAJE SE ACTIVARON POLICLONALMENTE EN PRESENCIA DE 1% DE CÉLULAS TC-1 Y 10% DE CPA. LOS LINFOCITOS SE MARCARON CON CFSE Y SE COCULTIVARON EN PRESENCIA DE O NO DE QUIMERAS APTAMÉRICAS. EN TODOS LOS CASOS, LA ACTIVACIÓN SE REALIZÓ CON 0,25 MG/ML DE ANTI-CD3 SOLUBLE. LA PROLIFERACIÓN SE EVALUÓ A LAS 72 HRS POR DILUCIÓN DEL CFSE EN LA SUBPOBLACIÓN CD8+. (N=3)

EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE LA GAL-1 INTRÍNSECA EN LOS LINFOCITOS T CD8+ EN UN MODELO TUMORAL *IN VIVO*

Con el fin de evaluar si los linfocitos tratados con las quimeras aptaméricas eran capaces de controlar el crecimiento tumoral *in vivo*, desarrollamos el protocolo de inmunización y transferencia adoptiva descrito en materiales y métodos y en la Figura

30. Brevemente, ratones C57BL/6 machos fueron inmunizados con células dendríticas pulsadas con lisados tumorales TC-1 (y maduras *in vitro*). Al día 7 se efectuó una reestimulación con lisado tumoral. Al día 14, se extrajeron los órganos linfoides y se efectuaron suspensiones celulares. Los linfocitos fueron activados *in vitro* en presencia de anti-CD3 y las construcciones quiméricas aptaméricas (o sin oligonucleótido agregado). Estos linfocitos fueron utilizados para reconstituir ratones inmunodeficientes Nude. Al día siguiente, los animales fueron inyectados con 1×10^6 células TC-1 en Geltrex®. Se efectuaron inyecciones de oligonucleótidos cada 3 días y se evaluó el crecimiento tumoral. Es de destacar que, bajo tales configuraciones de reconstitución, todos los compartimentos no inmunes del ratón reconstituido (por ejemplo, estroma y particularmente células endoteliales) expresaban Gal-1 a niveles normales, con la excepción de células inmunitarias (transferidas).

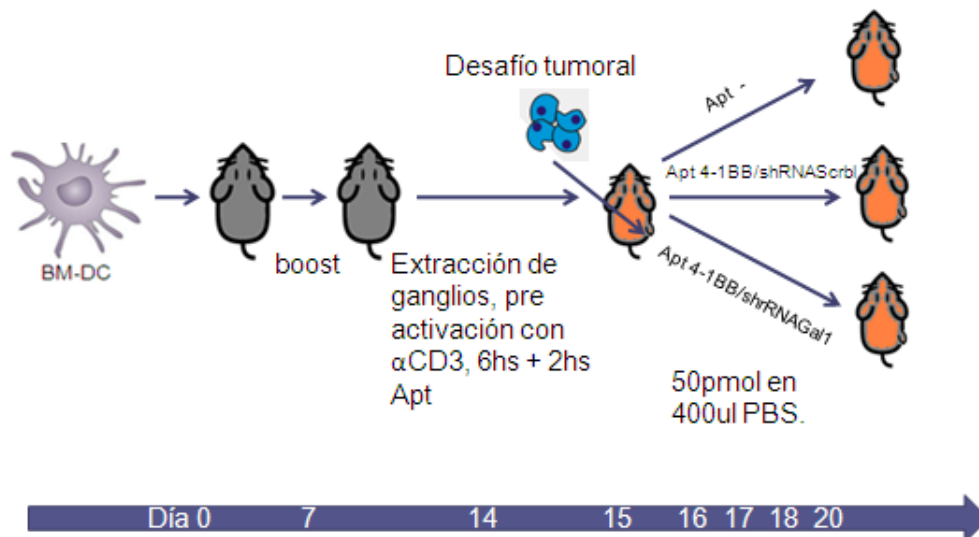


FIGURA 30: ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN Y TRANSFERENCIA ADOPTIVA. EN EL ESQUEMA SE MUESTRA EL PROTOCOLO UTILIZADO PARA LA VALIDACIÓN DEL MODELO APTAMÉRICO *IN VIVO*.

Estas experiencias arrojaron en primera instancia resultados alentadores donde se pudo observar un menor desarrollo tumoral durante las primeras cinco semanas posteriores al desafío tumoral, al comparar aquellos ratones tratados con aptámeros con aquellos ratones tratados con PBS. Un análisis más detallado de los ratones tratados con aptámero, arrojó que aquellos ratones tratados con los aptámeros acoplados al shARN Gal-1 poseían un crecimiento más lento que aquellos tratados con aptámeros acoplados a una construcción aleatoria en los primeros 31 días de tratamiento. Por otra parte, el pre-tratamiento de los linfocitos y el tratamiento de los ratones con Apt4-1BB/shRNA Gal-1 incrementó en 10 días el tiempo Lag (la aparición

de tumores en el 50% de los ratones desafiados cuando se los compara con aquellos tratados con Apt4-1BB/shRNA Scrbl).

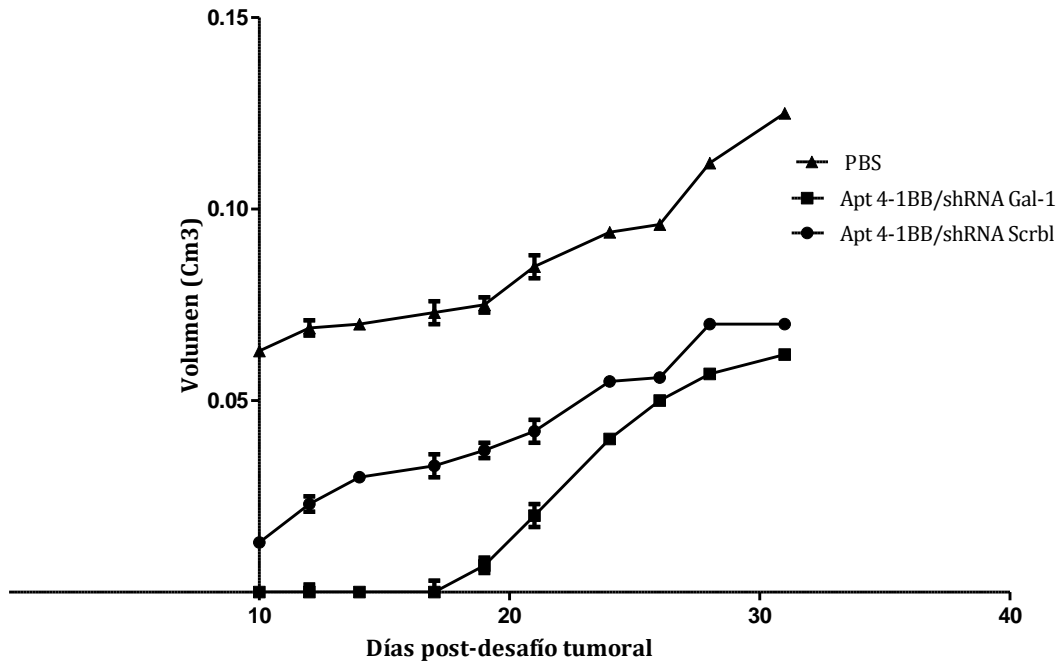


FIGURA 31: LA GAL-1 ENDÓGENA EN LOS LINFOCITOS ACELERA EL CRECIMIENTO DEL TUMOR TC-1 *IN VIVO*. RATONES NUDE MACHOS ADULTOS FUERON RECONSTITUIDOS CON CÉLULAS INMUNITARIAS ENRIQUECIDAS EN LINFOCITOS ONCOREACTIVOS DE RATONES DE TIPO SALVAJE Y TRATADOS CON SHRNA GAL-1 (CUADRADOS; N = 5) O SHRNA SCRBL (CÍRCULOS; N = 6). EL DÍA DESPUÉS, LOS RATONES RECIBIERON 1×10^6 TC-1 EN GELTREX®. SE EVALUÓ EL CRECIMIENTO TUMORAL.

Esta forma de medición tumoral resultó satisfactoria para los primeros días post-desafío tumoral, no obstante, con el correr del tiempo la medición tradicional no fue más posible debido a la naturaleza de los tumores implantados en aquellos ratones tratados con Apt4-1BB/shARN Gal-1. Éstos, en lugar de presentar una composición globular modelable como una masa de desarrollo volumétrico esférico (Figura 32), crecían en forma de un anillo compuesto por varias esferas, los que hizo pensar a una colonización por nuevos clones resistentes a la terapia.



FIGURA 32: IMÁGENES DEL DESARROLLO TUMORAL EN RATONES NUDE TRASFERIDOS ADOPTIVAMENTE CON SISTEMAS INMUNES MODULADOS. A LA IZQUIERDA SE OBSERVA UN RATON TRATADO CON APTÁMEROS 4-1BB ACOPLADOS A SECUENCIA SCRAMBLE, A LA DERECHA UN RATON TRATADO CON APTÁMEROS 4-1BB ACOPLADOS A SHRNA-GAL-1.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DEL SILENCIAMIENTO DE LA GAL-1 INTRÍNSECA EN LOS LINFOCITOS T CD8⁺ PARA SISTEMAS *IN VIVO*

Como describimos en la introducción, la mayoría de los aptámeros evaluados actualmente en los estudios clínicos son modificados químicamente, con el objeto de aumentar su resistencia a las nucleasas, maximizar la biodisponibilidad en pacientes cuando éstos son administrados de manera sistémica y al mismo al tiempo mejorar la afinidad de unión a sus ligandos¹¹⁸¹¹⁶. En este contexto, evaluamos una estrategia utilizando la modificación de las pirimidinas en la posición 2' de la ribosa con un grupo de flúor- (F), para ello se utilizó el kit comercial de transcripción *in vitro* (EurX) y se procedió conforme al protocolo recomendado.

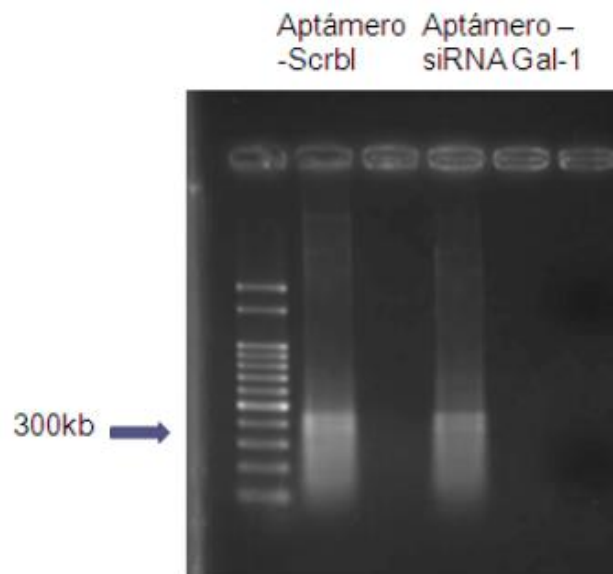


FIGURA 33: GEL DE AGAROSA DE LOS PRODUCTOS DE TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*. EL GEL MUESTRA LA INTEGRIDAD DE LOS PRODUCTOS DE SÍNTESIS TANTO PARA APT4-1BB/SHRNA-GAL-1 COMO PARA EL APT4-1BB/SHRNA-SCRBL CUANDO SE UTILIZAN BASES PIRIMIDÍNICAS MODIFICADAS.

Una vez que purificamos estos aptámeros procedimos a realizar ensayos de activación policlonal (anti-CD3) en presencia de tumor (TC-1) agregando los aptámeros-shRNA fluorados (Gal-1 o control *scramble*) a distintos tiempos luego de la activación (0, 12, 24 y 48h) de manera análoga a lo realizado anteriormente, utilizando también la dosis de 100nM. La proliferación linfocitaria fue evaluada por dilución de CFSE. En la Figura 34 y en concordancia con lo reportado en ¹⁵⁰, se puede notar el efecto co-estimulador proveniente de la interacción del aptámero con su ligando (histogramas inferiores); es decir que el aptámero retenía la capacidad de coestimular cuando este está modificado en sus bases pirimidínicas con flúor en la posición 2' y acoplado a un shRNA. Al analizar las condiciones donde el shRNA codifica para el transcripto de Gal-1 (histogramas medio y superior) no observamos el efecto potenciador sobre la proliferación de los linfocitos T CD8+, por lo que los cambios introducidos en los nuevos aptámeros afectaron sus propiedades funcionales.

Las diferencias en la proliferación resultaron significativas al comprar las condiciones sin aptámero con aquellas con aptámeros, pero no cuando se compararon las condiciones de aptámeros ente si, cuando se realizó una ANOVA de 1 factor y se analizaron los intervalos de confianza para 0.95 generados con el método de Tukey.

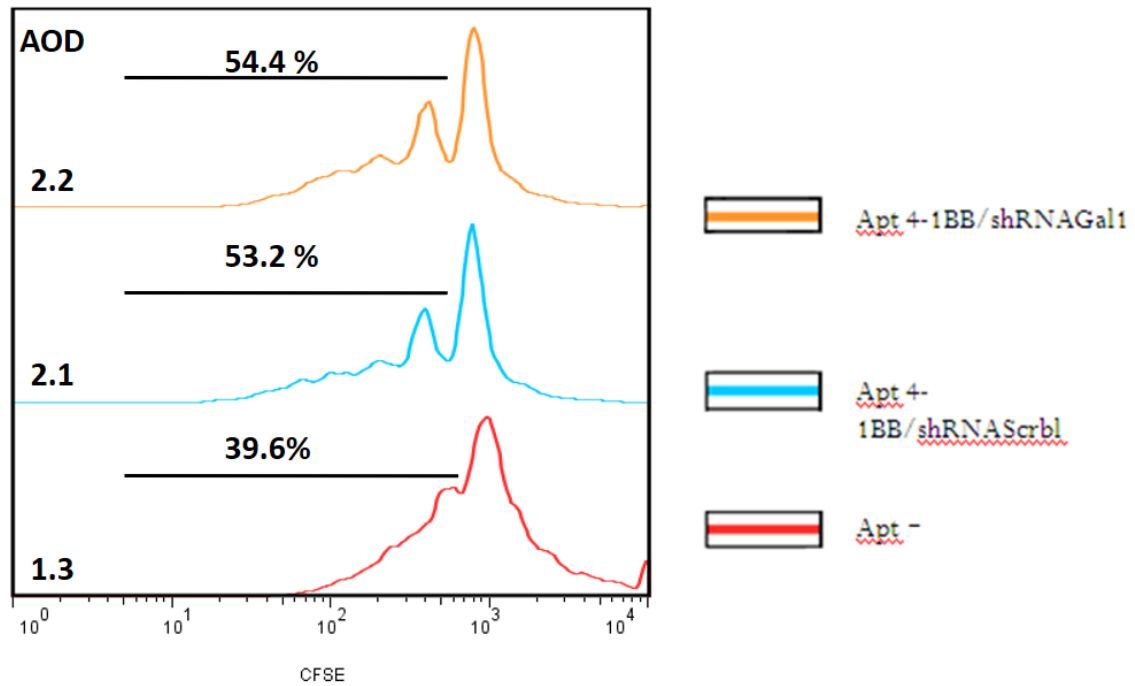


FIGURA 34: MODULACIÓN FUNCIONAL EN LINFOCITOS T CD8⁺ POR QUIMERAS APTÁMERO-SHRNA CON BASES MODIFICADAS. LOS LINFOCITOS DE RATONES DE TIPO SALVAJE SE ACTIVARON POLICLONALMENTE EN PRESENCIA DE 1% DE CÉLULAS TC-1 Y 10% DE CPA. LOS LINFOCITOS SE MARCARON CON CFSE Y SE COCULTIVARON EN PRESENCIA (O NO) DE QUIMERAS APTAMÉRICAS MODIFICADAS EN LA POSICIÓN 2' DE LAS PIRIMIDINAS CON FLUOR. EN TODOS LOS CASOS, LA ACTIVACIÓN SE REALIZÓ CON 0,25 MG/ML DE ANTI-CD3 SOLUBLE. LA PROLIFERACIÓN SE EVALUÓ A LAS 72 HRS POR DILUCIÓN CFSE EN LA SUBPOBLACIÓN T CD8⁺. (N=3).

Discusión

DISCUSIÓN

I. GALECTINA-1

Las funciones pleiotrópicas de Gal-1 se deben, en parte, a la compleja distribución celular de esta lectina. A nivel extracelular, Gal-1 es capaz de interactuar con los receptores glicosilados (a través de sus residuos N-acetilactosamina), formando enrejados que unen receptores de membrana [revisado en⁵³]. A través de este proceso de entrada y salida, Gal-1 regula varias propiedades celulares, actuando como un regulador negativo de las respuestas inmunitarias [revisado en^{208,209}]. Consistentemente, la mayoría de las estrategias inmunitarias actuales basadas en la regulación de Gal-1 para autoinmunidad y cáncer se focalizan en su actividad a nivel extracelular. Se ha demostrado que la regulación negativa de la Gal-1 expresada por las células tumorales tiene un efecto directo sobre la respuesta inmune^{64,173,174,186,210,211}. De manera interesante, Gal-1 también es expresada por otras células del microambiente tumoral y la función endógena de Gal-1 en esas células puede afectar el crecimiento del tumor de manera indirecta. De hecho, varios informes han demostrado una disminución del potencial tumorigénico de varias líneas celulares tumorales cuando éstas son inyectadas en ratones deficientes en Gal-1^{180,212}. Dicho efecto biológico ha sido asociado a una angiogénesis deficiente por parte del estroma carente de Gal-1 (en este caso, se ha postulado un rol fundamental de las células endoteliales), lo que impide un suministro adecuado de nutrientes, oxígeno y hormonas, factores estos esenciales para el crecimiento óptimo del tumor¹⁸⁰.

Numerosa es la bibliografía sobre los efectos de Gal-1 sobre el sistema inmune asociado a los tumores, y el impacto que tienen estos efectos sobre la progresión de la enfermedad. En este sentido, Gal-1 puede modular una variedad de respuestas inflamatorias, promoviendo o inhibiendo las funciones de células inmunes efectoras⁵⁹. A través de interacciones lectínicas, las galectinas secretadas pueden tener efectos tolerogénicos afectando la supervivencia de las células T efectoras^{72,213,214} alterando el balance de citoquinas^{78,185,215,216}, la señalización por parte de los TCR²¹⁷ o promoviendo la expansión y funcionalidad de células T regulatorias²¹⁸⁷⁹ y de manera indirecta, afectando su activación por intermedio de un control de las células responsables de la presentación antigénica. Mientras que cada miembro de la familia de galectinas influye selectivamente sobre diferentes procesos biológicos, el balance final de sus efectos conjuntos determinará la activación, polarización y resolución de la respuesta inmune adaptativa contra el tumor²⁵⁰.

Esta tesis plantea fenómenos adicionales que deben tenerse en consideración al evaluar los efectos mediados por la Gal-1. En efecto, la regulación intracelular de Gal-1 regula varios procesos celulares, como el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación; varios de estos efectos son independientes de los carbohidratos, o sea que no son mediados por una función lectínica [revisados en ⁵³].

Si bien esta tesis no excluye la importancia en la modulación de la respuesta antitumoral por parte de la Gal-1 extracelular, propone una alternativa complementaria en la que los tumores requieren la expresión en forma endógena de Gal-1 en los linfocitos T para escapar del ataque inmunológico. De hecho, nuestros resultados demuestran que los linfocitos T CD8+ aislados de ratones deficientes en Gal-1 tienen mayores tasas de proliferación celular (Figura 18), disminución en la apoptosis (Figura 19) e incremento en las funciones efectoras (Figura 20) y éstas se ven exacerbadas en presencia de altos niveles de Gal-1 extracelular secretada por las células tumorales. Esta observación biológica podría deberse a un efecto endógeno directo de Gal-1 en las células T CD8+ o por efectos indirectos sobre otros tipos de células intervinientes en la respuesta inmune. En este sentido, nuestros resultados demuestran que la expresión de Gal-1 en las células presentadoras de antígenos es indiferente a la hora de potenciar las funciones de las células T CD8+. Sin embargo, la ausencia de Gal-1 en las células T CD4+ y/o CD8+ induce mayores niveles de proliferación de los linfocitos T CD8+ (Figura 24).

De manera interesante, al analizar y comparar por técnicas histológicas los tumores provenientes de ratones NUDE transferidos adoptivamente con sistemas inmunes deficientes o salvajes para Gal-1, la presencia de la lectina en la población inmune permite el crecimiento de la masa tumoral, mientras que una población inmune carente de Gal-1 propicia un extenso núcleo de células necróticas. El análisis de los cortes por inmunohistoquímica no mostraron diferencia significativa en la proliferación de las células tumorales medidas por Ki-67, por lo que una vez más queda demostrado que la diferencia observada no adviene de las propiedades intrínsecas del tumor o de la Gal-1 por él secretada, sino que la lectina endógena en la población linfocitaria funcionaría como un potente supresor de la actividad citotóxica. Este cuadro de situación concuerda con un informe anterior que demostró que Gal-1 tiene un impacto importante sobre la explosión proliferativa, la supervivencia y el destino del efector de los linfocitos en un modelo de activación policlonal ¹⁶⁶.

Adicionalmente, otros grupos de investigación han demostrado que Gal-1 juega un papel fundamental en el control de la diferenciación y la función de CD4+ CD25+ Foxp3+ (Tregs convencionales)⁷⁹. Si bien no detectamos cambios en la frecuencia de Tregs convencionales en nuestro modelo experimental, la bibliografía demuestra que dichos Treg son funcionalmente deficientes⁷⁹. En consecuencia, las subpoblaciones de

células T CD4+ de ratones *Lgals1* -/- y los de tipo salvaje difieren, al menos, a este nivel funcional. Por el contrario, al analizar la población regulatoria enmarcada dentro del fenotipo CD8+ (CD8+ CD28- CD122+) se observaron cambios en la frecuencia y, más interesadamente, en sus propiedades regulatorias, donde la ausencia de la lectina reduce su capacidad inmunosupresora (Figura 25 y 26).

Desde un punto de vista de mecanismos, nuestros experimentos de transwell demostraron que la inmunorregulación mediada por la Gal-1 endógena en las células inmunes implica interacciones de célula a célula. De hecho, el cocultivo de linfocitos deficientes para Gal-1 junto con los linfocitos de tipo salvaje abolió parcialmente la inmunopotenciación observada en células *Lgals1* -/- en un contexto tumoral. Además, nuestros resultados demuestran que los factores solubles no están involucrados en este tipo de regulación. En conjunto, estos resultados nos llevaron a la hipótesis de que los linfocitos deficientes en Gal-1 carecen de receptores de membrana inhibidores (o, como alternativa, adquieren receptores activadores de inmunidad) que tienen un efecto directo sobre la función de los linfocitos. Actualmente estamos investigando estas alternativas. Se ha informado que la Gal-1 intracelular podría afectar el comportamiento celular a través de la regulación de la maquinaria transcripcional (Gal-1 forma parte del espliceosoma), los miRNA y las vías de señalización⁵³. Los efectos provenientes de los interactores de Gal-1 intracelular en los linfocitos aún no se han investigado y plantean un muy interesante campo en el que avanzaremos en nuestras futuras investigaciones. De manera interesante, se han sugerido importantes efectos de la Gal-1 endógena sobre los linfocitos en el caso del lupus eritematoso sistémico, enfermedad autoinmune en la que se ha correlacionado bajos niveles de Gal-1 endógena tras la activación linfocitaria con el hecho que los pacientes sean propensos a reacciones de autoinmunidad ²¹⁹. En cáncer, nuestros resultados respaldan un escenario en el que los altos niveles de Gal-1 exógena producida por las células tumorales no son suficientes para evadir un ataque inmunológico; los tumores requieren licencias adicionales para lograr una inmunosupresión eficiente y las mismas son coordinadas por la Gal-1 endógena de los linfocitos. Estos resultados definieron las bases fundamentales para el desarrollo de una potencial nueva inmunoterapia capaces de ser aplicables a cáncer y CaP en particular. Desde un punto de su traslación clínica, nos resultó interesante observar que la inmunopotenciación resultante de la regulación negativa de Gal-1 en los linfocitos es aún más significativa en presencia de un tumor y, en consecuencia, una estrategia terapéutica anti-PCa basada en estos resultados debería tener pocos efectos secundarios adversos.

II. APTÁMEROS

A partir de los resultados previos nos propusimos iniciar una línea de investigación que usaría ese conocimiento básico para la generación de una potencial nueva inmunoterapia en CaP. Las premisas fundamentales, como citamos en la introducción, consistían en que el método debía ser de utilización simple, con reproducibilidad biológica, aplicable tanto a situaciones *in vitro* como *in vivo*, específico para el blanco celular de interés (en nuestro caso los linfocitos T CD8+) y aplicable a sistemas tanto murinos como humanos para mejorar el carácter traslacional del compuesto a ser sintetizado.

Concluimos que la mejor opción direccionante sería entonces una molécula de expresión ampliamente mayoritaria o exclusiva de los linfocitos T efectores. 4-1BB (CD137) es la molécula que mejor cumplía con los requisitos, ya que es inducida en los linfocitos T CD8+ bajo condiciones de activación celular¹⁶², siendo además un potente co-estimulador en fases tempranas de la activación de los linfocitos T CD8+¹⁶³. 4-1BB al interactuar con su ligando también modula de manera fina de las propiedades funcionales de las células presentadoras del antígeno⁴.

Hasta la fecha, los anticuerpos son la plataforma más versátil y comúnmente utilizada para generar ligandos con gran especificidad y avidéz^{220,221}. Sin embargo, los anticuerpos deben ser producidos en sistemas de cultivo celular, por lo que su desarrollo y obtención suelen ser tareas desafiantes y costosas. A esto se le suma una complejidad aun mayor cuando los anticuerpos deben ser acomplejados con drogas, haciendo que la purificación y el control de calidad sea una tarea sumamente extensa, que puede afectar la actividad del medicamento y reducir el rendimiento del conjugado.

Los aptámeros surgen como una alternativa biotecnológica capaz de generar ligandos que pueden unirse sus objetivos con especificidad y avidéz aún mayores a las de los anticuerpos²²². A diferencia de los anticuerpos, los aptámeros pueden sintetizarse en un proceso químico libre de células, relativamente simple, más económico y con menos restricciones regulatorias. Los aptámeros se han utilizado recientemente como ligandos para direccionar pequeños ARN interferentes (siRNA) a subconjuntos específicos de células en ratones, como es el caso de las células tumorales^{159,160,223}, infectadas por virus²²⁴ o particularmente células del sistema inmune^{150,225}, mostrando importantes efectos tanto biológicos como terapéuticos. En este sentido Mc Namara y colaboradores desarrollaron un aptámero ARN capaz de unirse a 4-1BB. Desarrollaron dos construcciones: uno monovalente (con un solo sitio de reconocimiento a 4-1BB) y otro bivalente (con dos sitios de reconocimiento). Si bien el monovalente resulta más afín por el ligando, solo el bivalente es capaz de coestimular la activación de las células T y promover el rechazo *in vivo* de un tumor,

siendo más eficiente que el anticuerpo anti-4-1BB existente en el mercado¹⁵⁰.

El análisis bibliográfico sobre la arquitectura posible para la conjugación del aptámero al siRNA asociado arrojaba dos grandes metodologías, una donde en la que el aptámero y una hebra del siRNA se producían conjuntamente por transcripción, seguido de una hibridación *in vitro* con la cadena guía (efectora) de siRNA^{150,157-159}. La segunda alternativa consisten en que ambas hebras del siRNA son producidas con un espaciador que separa las dos cadenas para permitir su hibridación intramolecular y así formar un bucle o “hairpin” que estabiliza la estructura¹⁶⁰. Es de destacar que una problemática recurrente a la hora de realizar quimeras de aptámero-siRNA es la pérdida de función de alguna de las partes al unirse; o bien se pierde el efecto direccionante o bien el efecto silenciador. Al respecto Berezhnoy y colaboradores demostraron que un detalle no menor a la hora de diseñar una quimera aptamérica es la estabilidad térmica del siRNA y que su hebra “sentido” o pasajera sea transcripta en el extremo 3’ proximal al aptámero y luego la “antisentido” o guía pueda ser hibridada o localizarse después del bucle¹⁶¹.

En nuestro modelo la secuencia sentido está próxima al aptámero y luego de un bucle se combina con la antisentido. La construcción demostró poder ser sintetizada y purificada en las condiciones del laboratorio (Figura 28). Al comparar los histogramas de la Figura 29, hemos podido ver que la construcción seguía siendo capaz de unirse al correceptor 4-1BB y podía co-estimular los linfocitos CD8+ generando una mayor proliferación de los mismos. De manera interesante, el aptámero acoplado al siRNA para Gal-1 indujo una mayor proliferación al compararse a aquél con la secuencia scramble, por lo que el modelo propuesto parecería funcionar en estas condiciones.

El análisis funcional *in vivo* de los aptámeros convencionales (sin bases modificadas químicamente) arrojó un resultado un tanto más complejo. Si bien se pudo observar un efecto anti-tumoral en las primeras semanas posteriores al desafío tumoral, donde el sistema inmune fue capaz de contener el crecimiento tumoral y en mayor medida cuando éste portaba el siRNA para Gal-1, cuando el tiempo avanzaba la biología del sistema resultó ser compleja y no analizable por las vías tradicionales. Los tumores en el caso de la quimera aptámero siRNA Gal-1 dejaron de tener una forma semejante a una esfera para tener una toroidal o de círculo hueco formado por pequeños focos tumorales. Postulamos que, tal como se observa en los cortes histológicos de los tumores crecidos en ratones transferidos con sistemas inmunes Lgals1 -/- donde el centro de la masa tumoral presentaba un aspecto más necrótico, el efecto del tratamiento exacerbó la necrosis en parte central del tumor cambiando su geometría. Con el correr del tiempo, nuevas poblaciones tumorales refractarias al tratamiento surgieron y recolonizaron el nicho tumoral. Sumado a esto, postulamos que también podría pasar que la población de linfocitos involucrados en la respuesta

inmune antitumoral deja de presentar el receptor 4-1BB en superficie haciendo que el aptámero no sea direccionado a su blanco o bien que la biodisponibilidad del aptámero fuese baja al ser degradado por RNasas presentes en los líquidos biológicos de los ratones.

En pos de una mejora para la segunda hipótesis decidimos resintetizar las construcciones aptaméricas con pirimidinas modificadas con grupos flúor en la posición 2' de la ribosa. Si bien la síntesis y la purificación fue exitosa, su evaluación *in vitro* demostró que, si bien el efecto co-estimulador 4-1BB no se perdía puesto que los linfocitos proliferaban más en presencia de las construcciones aptaméricas, no se veía el efecto inmunopotenciador adicional causado por el silenciamiento de Gal-1. Nuestra hipótesis fue que la presencia electronegativa del flúor deformaba la nube electrónica haciendo que la fuerza de unión entre las hebras del siRNA sea mayor y que de este modo su estabilidad térmica haya aumentado de manera tal que ya no era posible que Dicer o Drosha en el complejo RISC puedan procesar el constructo para liberar el silenciador. Cabe destacar que la forma en horquilla es un estabilizador estructural en sí mismo que ayudaría a este fenómeno.

En la actualidad nos encontramos trabajando en una nueva quimera donde en el extremo 3' del aptámero se encuentra la hebra "sentido" o pasajera únicamente, dejando de lado el viejo modelo de horquilla y reemplazándolo por uno de hibridación, que permitirá probar con mayor facilidad modificaciones en las bases ya sea en el aptámero conjugado, en la sonda a hibridar o en ambos.

También nuevas colaboraciones están siendo establecidas a fin de diseñar y sintetizar nano partículas de sílica de gran porosidad que puedan ser cargadas en su interior con los siRNA para Gal-1 o aleatorios y recubiertas con los aptámeros que direccionarán éstas a la población celular deseada (linfocitos T CD8+). Se plantea que las mismas podrían ser internalizadas por el reciclado de receptores y degradadas por la maquinaria celular al igual que sucede con la quimera aptámero 4-1BB- siRNA.

Si bien nuestros estudios son aún insipientes, la presente tesis propone a Gal-1 como un potente modulador de la respuesta inmunitaria mediada por los linfocitos T CD8+. En consecuencia, estrategias destinadas a la regulación transcripcional o transducional de esta proteína resultarían en una propuesta promisorias aplicables a procesos de cáncer y de CaP en particular.

CONCLUSIÓN

GENERAL

La presente tesis se basó en la hipótesis que Gal-1 además de los efectos a ella adscritos mediados por su interacción con receptores glicosilados presentes en la membrana plasmática y la matriz extracelular (efectos extracelulares), esta lectina poseía efectos endógenos adicionales que participarían en la regulación de la función inmune. Para validar dicha hipótesis esta tesis propuso un enfoque interdisciplinario, que combina inmunología, glicobiología, oncología y biología molecular para comprender y modificar el microentorno del tumor a fines de inducir la correcta activación primaria del sistema inmunitario (profilaxis) y / o revertir los procesos de tolerancia ya establecidos (terapéuticos). Los resultados de las experiencias realizadas exponen el papel de la galectina-1 endógena como regulador de la respuesta inmunológica mediada por linfocitos T CD8+. Demostrando que la Gal-1 endógena modula no solo la proliferación, sino también desgranulación y la apoptosis, generando efectos protumorales que pudieron ser probados *in vivo*. Esto reforzó nuestra idea que esgrimía, que la incapacidad de los ratones deficientes en Gal-1 para desarrollar tumores, no solo se debía a una limitación respecto de la angiogénesis, sino que esta era acompañada en parte por una respuesta inmunitaria.

Desde un punto de vista de mecanístico, nuestros experimentos de transwell mostraron que las interacciones célula-célula son fundamentales para los efectos inmunosupresivos de la Gal-1 endógena. Llevándonos a la hipótesis de que los linfocitos deficientes en Gal-1 carecen de receptores de membrana inhibidores (o, como alternativa, adquieren receptores activadores de inmunidad) que tienen un efecto directo sobre la función de los linfocitos dando lugar a un nuevo campo de investigación.

Con base en estos resultados básicos nos propusimos dar los primeros pasos en la generación de una inmunoterapia original para el CaP. Con la idea que el método debía ser aplicable tanto a modelos murinos como humanos desarrollamos de un aptámero ARN específico para 4-1BB quimérico con un shRNA que inhiba a Gal-1 que permite el silenciamiento de manera casi específica en los linfocitos T CD8+.

El aptámero mostro amentar la proliferación de los linfocitos T CD8+ *in vitro* y efectos inhibitorios en el crecimiento tumoral *in vivo*.

Sintetizado en un proceso químico libre de células los aptámeros resultaron

relativamente más simples y rentables cuando son comparados con los anticuerpos que deben ser producidos en sistemas de cultivo celular, cuyo desarrollo y fabricación resulta más desafiante y costoso. Sumado a esto al poder ser generado por SELEX resultan en un orden de magnitud más afín que los anticuerpos. Todo esto genera que los procesos de aprobación regulatoria por parte de las entidades públicas especializadas sean más simples aumentando su carácter traslacional.

Si bien nuestros estudios son aún incipientes, la presente tesis propone a Gal-1 como un potente modulador de la respuesta inmunitaria mediada por los linfocitos T CD8+ y en consecuencia, estrategias destinadas a la regulación de este blanco molecular resultarían en una propuesta promisoriosa aplicables a procesos de cáncer en general y de CaP en particular.

Resultados suplementarios

RESULTADOS SUPLEMENTARIOS

EFFECTO DE LOS LINFOCITOS SALVAJES CD45.1+ EN LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS CD8+ SALVAJES O LGALS1 -/-.

Con el fin de dilucidar si la diferencia era un efecto de carácter intrínseco, en la misma célula, o bien si éste resultaba de su interacción con otras poblaciones celulares, se realizó un ensayo de co-cultivo y luego de transwell. Primeramente, chequeamos que el co-cultivo de células salvajes CD57BL/6 CD4.51 con células salvajes CD57BL/6 CD45.2 no modificara el potencial proliferativo de las células de las segundas (CD45.2, que son sobre las que el análisis se concentra). No observamos diferencias significativas en este punto (ver tercera línea Figura Suplementaria 1). Por el contrario, y de manera interesante, el co-cultivo con células salvajes CD57BL/6 indujo una reducción en la proliferación de las células Lgals1 -/- (comparar segunda con la cuarta línea en Figura Suplementaria 1).

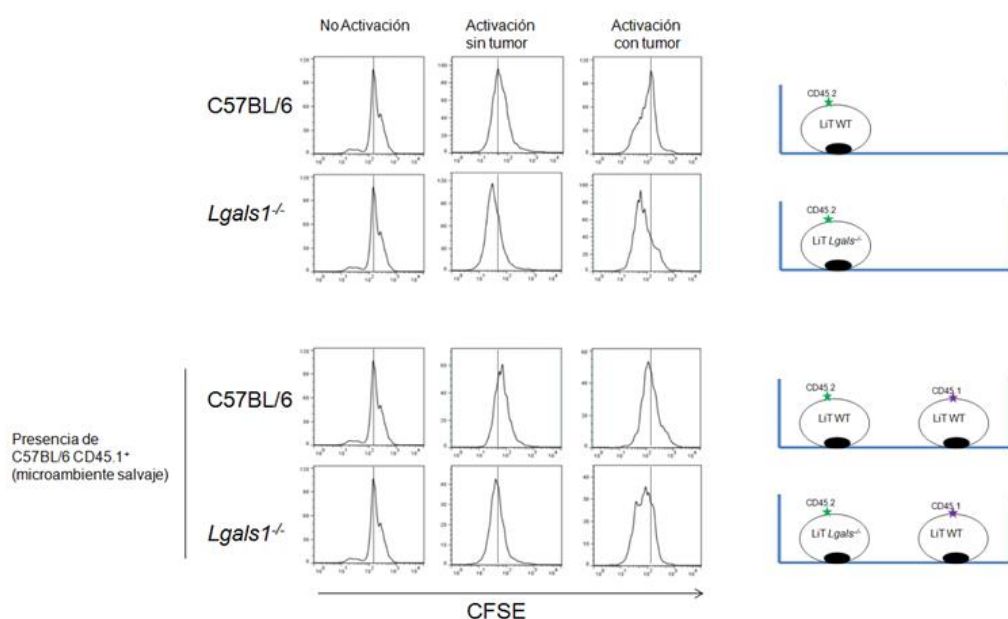


FIGURA SUPLEMENTARIA 1: EFECTO DE LOS LINFOCITOS SALVAJES CD 45.1 + EN LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS SALVAJES O LGALS1 -/- CD8+. A LA DERECHA SE MUESTRA EL ESQUEMA DE DISEÑO EXPERIMENTAL, DETALLANDO LA PRESENCIA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE LINFOCITOS EN CADA ENSAYO. LA PROLIFERACIÓN SE EVALÚA A LAS 72H DESPUÉS DE LA ACTIVACIÓN POLICLONAL, SOBRE LA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS CD8+ CD45.2+. LA PROLIFERACIÓN SE ANALIZA POR DILUCIÓN CFSE. LOS HISTOGRAMAS IZQUIERDOS MUESTRAN LOS RESULTADOS EN CONDICIONES DE NO ESTIMULACIÓN O TRAS LA ACTIVACIÓN POLICLONAL (ANTI-CD3) EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE 1% CÉLULAS TC-1. LAS LÍNEAS DE PUNTO SE AGREGARON PARA MEJORAR LA VISUALIZACIÓN COMPARATIVA DEL EFECTO BIOLÓGICO Y CORRESPONDEN A EL PICO DE NÚMERO MÁXIMO DE EVENTOS CON CIERTA DILUCIÓN DE CFSE EN LA SITUACIÓN DE CONTROL (C57BL /6 PRIMERA LÍNEA).

CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE 4-1BB EN LINFOCITOS ACTIVADOS

Con el fin de ahondar en los procesos celulares necesarios para el correcto funcionamiento de la terapia aptamérica, se procedió a realizar un ensayo de activación linfocitaria en ausencia o presencia de distintos niveles de células tumorales TC-1. Se extrajeron células a las 19, 24, 43, 50, 68 y 72 horas post-activación y se evaluó la expresión de 4-1BB por citometría de flujo usando anticuerpos directamente conjugados. El análisis muestra un pico de expresión en las primeras 24 horas de activación linfocitaria, siendo este independiente de la presencia tumoral y sus niveles. Los linfocitos no activados no expresan 4-1BB (no mostrado).

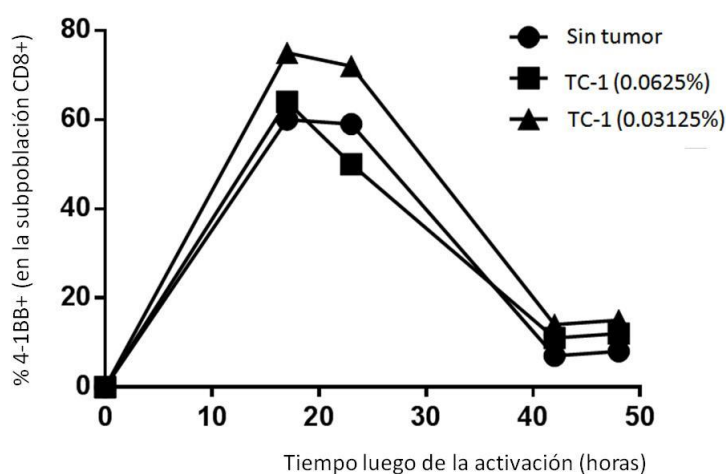


FIGURA SUPLEMENTARIA 2: EXPRESIÓN DE 4-1BB EN LA SUPERFICIE CELULAR. LOS LINFOCITOS DE RATONES DE TIPO SALVAJE SE ACTIVARON POLICLONALMENTE EN PRESENCIA DE 0 (CIRCULOS) 0.0625 (CUADRADOS) Y 0.03125 (TRIÁNGULOS) % DE CÉLULAS TC-1 Y 10% DE CPA. EN TODOS LOS CASOS, LA ACTIVACIÓN SE REALIZÓ CON 0,25 μ G/ML DE ANTI-CD3 SOLUBLE. LA EXPRESIÓN SE EVALUÓ A LAS 19, 24, 43, 50, 68 Y 72 HORAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA SUBPOBLACIÓN CD8+ POSITIVA. REPRESENTATIVA DE DOS EXPERIENCIAS INDIVIDUALES.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Leonardo Fainboim JG. Introduction to Human Immunology. 2011.
2. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2012;23(4):446-457. doi:10.1016/S0716-8640(12)70335-8
3. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science (80-)*. 2002;297(5589):2060-2063. doi:10.1126/science.1072615
4. Laderach D, Wesa A, Galy A. 4-1BB-ligand is regulated on human dendritic cells and induces the production of IL-12. *Cell Immunol*. 2003;226(1):37-44. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14746806.
5. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*. 2006;25(2):195-201. doi:10.1016/j.immuni.2006.08.003
6. Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Flavell RA. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(19):10878-10883. doi:10.1073/pnas.1834400100
7. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4 + CD25 + regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med*. 2005;202(11):1539-1547. doi:10.1084/jem.20051166
8. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007;27(4):635-646. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.014
9. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523-532. doi:10.1038/nri2343
10. Mellor AL, Munn DH.IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(10):762-774. doi:10.1038/nri1457
11. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970;18(5):723-737. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4911896>. Accessed February 25, 2019.
12. Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H. Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med*. 2004;200(9):1123-1134. doi:10.1084/jem.20040395
13. Cosmi L, Liotta F, Angeli R, et al. Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25+ regulatory thymocytes because of their

- responsiveness to different cytokines. *Blood*. 2004;103(8):3117-3121. doi:10.1182/blood-2003-09-3302
14. Xystrakis E, Dejean AS, Bernard I, et al. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood*. 2004;104(10):3294-3301. doi:10.1182/blood-2004-03-1214
15. Konya C, Goronzy JJ, Weyand CM. Treating autoimmune disease by targeting CD8 + T suppressor cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(8):951-965. doi:10.1517/14712590903020759
16. Konya C, Goronzy JJ, Weyand CM. Treating autoimmune disease by targeting CD8(+) T suppressor cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(8):951-965. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19522557.
17. Endharti AT, Rifa'i M, Shi Z, et al. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol*. 2005;175(11):7093-7097. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301610>. Accessed February 25, 2019.
18. Shi Z, Rifa'i M, Lee YH, Shiku H, Isobe K-I, Suzuki H. Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8+CD122+ regulatory T cells. *Immunology*. 2008;124(1):121-128. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02747.x
19. Shi Z, Okuno Y, Rifa'i M, et al. Human CD8+CXCR3+ T cells have the same function as murine CD8+CD122+ Treg. *Eur J Immunol*. 2009;39(8):2106-2119. doi:10.1002/eji.200939314
20. Eroshenko V. DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlation. 12th ed. Baltimore; 2013.
21. Kumar, Vinay, A.K.A NF. *Robbins Basic Pathology*. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 2009.
22. Fine SW, Reuter VE. Anatomy of the prostate revisited: implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer. *Histopathology*. 2012;60(1):142-152. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04004.x
23. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. 1979. *J Urol*. 2002;167(2 Pt 2):960-964; discussion 964-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905925>. Accessed February 25, 2019.
24. Hermann M, Untergasser G, Rumpold H, Berger P. Aging of the male reproductive system. *Exp Gerontol*. 2000;35(9-10):1267-1279. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113607>. Accessed February 25, 2019.
25. Rebbeck TR, Devesa SS, Chang B-L, et al. Global Patterns of Prostate Cancer Incidence, Aggressiveness, and Mortality in Men of African Descent. *Prostate Cancer*.

2013;2013:1-12. doi:10.1155/2013/560857

26. Bashir MN. Epidemiology of Prostate Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(13):5137-5141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26225642>. Accessed February 26, 2019.

27. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492

28. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9-29.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24399786.

29. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, et al. International Variation in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. *Eur Urol*. 2012;61(6):1079-1092. doi:10.1016/j.eururo.2012.02.054

30. Braun M, Perner S. Die hochgradige prostatistische intraepitheliale Neoplasie. *Pathologe*. 2011;32(S2):237-241. doi:10.1007/s00292-011-1500-9

31. Denmeade SR, Isaacs JT. A history of prostate cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):389-396.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12044015.

32. Walsh PC, DeWeese TL, Eisenberger MA. Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2007;357(26):2696-2705. doi:10.1056/NEJMcp0706784

33. Silvestris N, Leone B, Numico G, Lorusso V, De Lena M. Present Status and Perspectives in the Treatment of Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Oncology*. 2005;69(4):273-282. doi:10.1159/000089676

34. Dehm SM, Tindall DJ. Regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2005;5(1):63-74. doi:10.1586/14737140.5.1.63

35. Scher HI, Sawyers CL. Biology of Progressive, Castration-Resistant Prostate Cancer: Directed Therapies Targeting the Androgen-Receptor Signaling Axis. *J Clin Oncol*. 2005;23(32):8253-8261. doi:10.1200/JCO.2005.03.4777

36. Nickols NG, Nazarian R, Zhao SG, et al. MEK-ERK signaling is a therapeutic target in metastatic castration resistant prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. February 2019;1. doi:10.1038/s41391-019-0134-5

37. Drake CG. Prostate cancer as a model for tumour immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(8):580-593.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20842222.

ation&list_uids=20651745.

38. Rosenberg SA. Raising the bar: the curative potential of human cancer immunotherapy. *Sci Transl Med.* 2012;4(127):127ps8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22461638.

39. Nobel Assembly at Karolinska Institutet T. *Scientific Background Discovery of Cancer Therapy by Inhibition of Negative Immune Regulation.* <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/10/advanced-medicineprize2018.pdf>. Accessed February 27, 2019.

40. Overes IM, Fredrix H, Kester MGD, et al. Efficient Activation of LRH-1-specific CD8+ T-cell Responses From Transplanted Leukemia Patients by Stimulation With P2X5 mRNA-electroporated Dendritic Cells. *J Immunother.* 2009;32(6):539-551. doi:10.1097/CJI.0b013e3181987c22

41. Di Lorenzo G, Buonerba C, Kantoff PW. Immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(9):551-561. doi:10.1038/nrclinonc.2011.72

42. Kawakami Y, Haas GP, Lotze MT. Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes from human tumors using the T-cell growth factors interleukin-2 and interleukin-4. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1993;14(4):336-347. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8280717>. Accessed February 27, 2019.

43. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86(15):1159-1166. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8028037>. Accessed February 27, 2019.

44. Ittershagen S, Ericson S, Eldjerou L, et al. Industry's Giant Leap Into Cellular Therapy: Catalyzing Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T) Immunotherapy. *Curr Hematol Malig Rep.* January 2019. doi:10.1007/s11899-019-0498-6

45. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711-723. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20525992.

46. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2443-2454. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22658127.

47. Ledeen RW, Wu G, Andre S, et al. Beyond glycoproteins as galectin counterreceptors: tumor-effector T cell growth control via ganglioside GM1 [corrected]. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1253:206-221.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22524425.

48. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2455-2465. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22658128.

49. Kwek SS, Cha E, Fong L. Unmasking the immune recognition of prostate cancer with CTLA4 blockade. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):289-297. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22378189.

50. Laderach DJ, Gentilini LD, Giribaldi L, et al. A Unique Galectin Signature in Human Prostate Cancer Progression Suggests Galectin-1 as a Key Target for Treatment of Advanced Disease. *Cancer Res*. 2013;73(1):86-96. doi:doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1260

51. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning “sweet” on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(5):338-352.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19365409.

52. Vasta GR. Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. *Adv Exp Med Biol*. 2012;946:21-36. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21948360.

53. Compagno D, Jaworski FM, Gentilini LD, et al. Galectins: Signaling Modulators Inside and Outside the Cell. *Curr Mol Med*. 2014:1-22. doi:PMID: 24894174

54. Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*. 1993;3(4):297-304.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8400545.

55. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994;76(4):597-598. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8124704.

56. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J*. 2004;19(7-9):433-440. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cit>

ation&list_uids=14758066.

57. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* 2002;23(6):313-320.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12072371.

58. Laderach DJ, Compagno D, Toscano MA, et al. Dissecting the signal transduction pathways triggered by galectin-glycan interactions in physiological and pathological settings. *IUBMB Life.* 2010;62(1):1-13.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20014236.

59. Rabinovich GA, Croci DO. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity.* 2012;36(3):322-335.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22444630.

60. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(1):29-41.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15630413.

61. Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(6):477-488.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15931257.

62. Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, et al. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science (80-).* 2004;306(5693):120-124.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15459394.

63. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000;156(3):899-909.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10702407.

64. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, et al. 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.* 2004;5(3):241-251. doi:PMID: 15050916

65. Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, et al. Targeting galectin-1 overcomes breast cancer associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer*

Res. 2013;73(3):1107-1117. doi:doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2418

66. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol.* 2007;8(8):825-834. doi:doi: 10.1038/ni1482

67. Liu F-T, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1183(1):158-182. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05131.x

68. Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, et al. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol.* 2009;10(9):981-991. doi:doi: 10.1038/ni.1772

69. Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med.* 2007;13(12):1450-1457. doi:doi: 10.1038/nm1680

70. Perone MJ, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Transgenic galectin-1 induces maturation of dendritic cells that elicit contrasting responses in naive and activated T cells. *J Immunol.* 2006;176(12):7207-7220. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16751364.

71. Soldati R, Berger E, Zenclussen AC, et al. Neuroblastoma triggers an immunoevasive program involving galectin-1-dependent modulation of T cell and dendritic cell compartments. *Int J Cancer.* 2012;131(5):1131-1141. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22020795.

72. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature.* 1995;378(6558):736-739. doi:doi: 10.1038/378736a0

73. Pace KE, Lee C, Stewart PL, Baum LG. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol.* 1999;163(7):3801-3811. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10490978.

74. Fred Brewer C. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572(2-3):255-262. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12223273.

75. Nguyen JT, Evans DP, Galvan M, et al. CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J Immunol.* 2001;167(10):5697-5707. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cit>

ation&list_uids=11698442.

76. Earl LA, Bi S, Baum LG. N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death. *J Biol Chem.* 2010;285(4):2232-2244. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19920154.

77. Walzel H, Fahmi AA, Eldesouky MA, et al. Effects of N-glycan processing inhibitors on signaling events and induction of apoptosis in galectin-1-stimulated Jurkat T lymphocytes. *Glycobiology.* 2006;16(12):1262-1271. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16917081.

78. Motran CC, Molinder KM, Liu SD, Poirier F, Miceli MC. Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2 function. *Eur J Immunol.* 2008;38(11):3015-3027. doi:doi: 10.1002/eji.200838295

79. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood.* 2007;109(5):2058-2065. doi:doi: 10.1182/blood-2006-04-016451

80. Wang J, Lu ZH, Gabius HJ, Rohowsky-Kochan C, Ledeen RW, Wu G. Cross-linking of GM1 ganglioside by galectin-1 mediates regulatory T cell activity involving TRPC5 channel activation: possible role in suppressing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009;182(7):4036-4045. doi:doi: 10.4049/jimmunol.0802981

81. Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol.* 1997;17(8):4730-4737. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9234729.

82. Wang W, Park JW, Wang JL, Patterson RJ. Immunoprecipitation of spliceosomal RNAs by antisera to galectin-1 and galectin-3. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(18):5166-5174. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16998182.

83. Voss PG, Gray RM, Dickey SW, et al. Dissociation of the carbohydrate-binding and splicing activities of galectin-1. *Arch Biochem Biophys.* 2008;478(1):18-25. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18662664.

84. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990;249(4968):505-510. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2200121>. Accessed February 13, 2019.

85. Robertson DL, Joyce GF. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*. 1990;344(6265):467-468. doi:10.1038/344467a0
86. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346(6287):818-822. doi:10.1038/346818a0
87. Shu Y, Pi F, Sharma A, et al. Stable RNA nanoparticles as potential new generation drugs for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;66:74-89. doi:10.1016/j.addr.2013.11.006
88. Kulbachinskiy A V. Methods for selection of aptamers to protein targets. *Biochemistry (Mosc)*. 2007;72(13):1505-1518. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282139>. Accessed February 13, 2019.
89. Liu Y, Kuan C-T, Mi J, et al. Aptamers selected against the unglycosylated EGFRvIII ectodomain and delivered intracellularly reduce membrane-bound EGFRvIII and induce apoptosis. *Biol Chem*. 2009;390(2):137-144. doi:10.1515/BC.2009.022
90. Guo K-T, Ziemer G, Paul A, Wendel HP, Wendel HP. CELL-SELEX: Novel perspectives of aptamer-based therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2008;9(4):668-678. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325777>. Accessed February 15, 2019.
91. Yamamoto H, Kashio Y, Shoji H, et al. Involvement of galectin-9 in guinea pig allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;143 Suppl:95-105. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17541286.
92. Ohuchi S. Cell-SELEX Technology. *Biores Open Access*. 2012;1(6):265-272. doi:10.1089/biores.2012.0253
93. Cerchia L, Giangrande PH, McNamara JO, de Franciscis V. Cell-specific aptamers for targeted therapies. *Methods Mol Biol*. 2009;535:59-78. doi:10.1007/978-1-59745-557-2_5
94. Tang Z, Shangguan D, Wang K, et al. Selection of Aptamers for Molecular Recognition and Characterization of Cancer Cells. *Anal Chem*. 2007;79(13):4900-4907. doi:10.1021/ac070189y
95. Xiao Z, Shangguan D, Cao Z, Fang X, Tan W. Cell-Specific Internalization Study of an Aptamer from Whole Cell Selection. *Chem - A Eur J*. 2008;14(6):1769-1775. doi:10.1002/chem.200701330
96. Phillips JA, Lopez-Colon D, Zhu Z, Xu Y, Tan W. Applications of aptamers in cancer cell biology. *Anal Chim Acta*. 2008;621(2):101-108. doi:10.1016/j.aca.2008.05.031
97. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(7):537-550. doi:10.1038/nrd3141

98. Healy JM, Lewis SD, Kurz M, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharm Res.* 2004;21(12):2234-2246. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15648255>. Accessed February 15, 2019.
99. Pestourie C, Cerchia L, Gombert K, et al. Comparison of Different Strategies to Select Aptamers Against a Transmembrane Protein Target. *Oligonucleotides.* 2006;16(4):323-335. doi:10.1089/oli.2006.16.323
100. Cerchia L, de Franciscis V. Targeting cancer cells with nucleic acid aptamers. *Trends Biotechnol.* 2010;28(10):517-525. doi:10.1016/j.tibtech.2010.07.005
101. Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv.* 2015;33(6):1141-1161. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.008
102. Ozer A, Pagano JM, Lis JT. New Technologies Provide Quantum Changes in the Scale, Speed, and Success of SELEX Methods and Aptamer Characterization. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3(8):e183. doi:10.1038/mtna.2014.34
103. Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science.* 1994;263(5152):1425-1429. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7510417>. Accessed February 13, 2019.
104. Geiger A, Burgstaller P, von der Eltz H, Roeder A, Famulok M. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(6):1029-1036. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604334>. Accessed February 13, 2019.
105. Mosing RK, Mendonsa SD, Bowser MT. Capillary Electrophoresis-SELEX Selection of Aptamers with Affinity for HIV-1 Reverse Transcriptase. *Anal Chem.* 2005;77(19):6107-6112. doi:10.1021/ac050836q
106. Yufa R, Krylova SM, Bruce C, Bagg EA, Schofield CJ, Krylov SN. Emulsion PCR Significantly Improves Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures-Based Aptamer Selection: Allowing for Efficient and Rapid Selection of Aptamer to Unmodified ABH2 Protein. *Anal Chem.* 2015;87(2):1411-1419. doi:10.1021/ac5044187
107. Drabovich AP, Berezovski M, Okhonin V, Krylov SN. Selection of Smart Aptamers by Methods of Kinetic Capillary Electrophoresis. *Anal Chem.* 2006;78(9):3171-3178. doi:10.1021/ac060144h
108. Miyachi Y, Shimizu N, Ogino C, Kondo A. Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(4):e21. doi:10.1093/nar/gkp1101
109. Peng L, Stephens BJ, Bonin K, Cubicciotti R, Guthold M. A combined atomic force/fluorescence microscopy technique to select aptamers in a single cycle from a small pool of random oligonucleotides. *Microsc Res Tech.* 2007;70(4):372-381.

doi:10.1002/jemt.20421

110. Mayer G, Ahmed M-SL, Dolf A, Endl E, Knolle PA, Famulok M. Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures. *Nat Protoc.* 2010;5(12):1993-2004. doi:10.1038/nprot.2010.163
111. Raddatz ML, Dolf A, Endl E, Knolle P, Famulok M, Mayer G. Enrichment of Cell-Targeting and Population-Specific Aptamers by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Angew Chemie Int Ed.* 2008;47(28):5190-5193. doi:10.1002/anie.200800216
112. Cho M, Xiao Y, Nie J, et al. Quantitative selection of DNA aptamers through microfluidic selection and high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(35):15373-15378. doi:10.1073/pnas.1009331107
113. Huang C-J, Lin H-I, Shiesh S-C, Lee G-B. Integrated microfluidic system for rapid screening of CRP aptamers utilizing systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Biosens Bioelectron.* 2010;25(7):1761-1766. doi:10.1016/j.bios.2009.12.029
114. Sayer N, Ibrahim J, Turner K, Tahiri-Alaoui A, James W. Structural characterization of a 2'F-RNA aptamer that binds a HIV-1 SU glycoprotein, gp120. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293(3):924-931. doi:10.1016/S0006-291X(02)00308-X
115. Zhou J, Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(3):181-202. doi:10.1038/nrd.2016.199
116. Kuwahara M, Sugimoto N. Molecular Evolution of Functional Nucleic Acids with Chemical Modifications. *Molecules.* 2010;15(8):5423-5444. doi:10.3390/molecules15085423
117. Mi J, Liu Y, Rabbani ZN, et al. In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nat Chem Biol.* 2010;6(1):22-24. doi:10.1038/nchembio.277
118. Veedu RN, Wengel J. Locked nucleic acid nucleoside triphosphates and polymerases: on the way towards evolution of LNA aptamers. *Mol Biosyst.* 2009;5(8):787. doi:10.1039/b905513b
119. Jäger S, Rasched G, Kornreich-Leshem H, Engeser M, Thum O, Famulok M. A Versatile Toolbox for Variable DNA Functionalization at High Density. *J Am Chem Soc.* 2005;127(43):15071-15082. doi:10.1021/ja051725b
120. Hirao I, Kimoto M, Mitsui T, et al. An unnatural hydrophobic base pair system: site-specific incorporation of nucleotide analogs into DNA and RNA. *Nat Methods.* 2006;3(9):729-735. doi:10.1038/nmeth915
121. Gold L, Ayers D, Bertino J, et al. Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology for Biomarker Discovery. Gelain F, ed. *PLoS One.* 2010;5(12):e15004. doi:10.1371/journal.pone.0015004

122. Vaught JD, Bock C, Carter J, et al. Expanding the Chemistry of DNA for in Vitro Selection. *J Am Chem Soc.* 2010;132(12):4141-4151. doi:10.1021/ja908035g
123. Maasch C, Buchner K, Eulberg D, Vonhoff S, Klussmann S. Physicochemical Stability of NOX-E36, a 40mer L-RNA (Spiegelmer) for Therapeutic Applications. *Nucleic Acids Symp Ser.* 2008;52(1):61-62. doi:10.1093/nass/nrn031
124. Vater A, Klussmann S. Toward third-generation aptamers: Spiegelmers and their therapeutic prospects. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2003;6(2):253-261. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12669461>. Accessed February 15, 2019.
125. Lee Y, Urban JH, Xu L, Sullenger BA, Lee J. 2'Fluoro Modification Differentially Modulates the Ability of RNAs to Activate Pattern Recognition Receptors. *Nucleic Acid Ther.* 2016;26(3):173-182. doi:10.1089/nat.2015.0575
126. Aldering LJ, Tayeb H, Krishnan S, Fletcher S, Wilton SD, Veedu RN. Smart functional nucleic acid chimeras: Enabling tissue specific RNA targeting therapy. *RNA Biol.* 2015;12(4):412-425. doi:10.1080/15476286.2015.1017234
127. Guo P. The emerging field of RNA nanotechnology. *Nat Nanotechnol.* 2010;5(12):833-842. doi:10.1038/nnano.2010.231
128. Burmeister PE, Lewis SD, Silva RF, et al. Direct In Vitro Selection of a 2'-O-Methyl Aptamer to VEGF. *Chem Biol.* 2005;12(1):25-33. doi:10.1016/j.chembiol.2004.10.017
129. Rusconi CP, Roberts JD, Pitoc GA, et al. Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nat Biotechnol.* 2004;22(11):1423-1428. doi:10.1038/nbt1023
130. Lee CH, Lee S-H, Kim JH, Noh Y-H, Noh G-J, Lee S-W. Pharmacokinetics of a Cholesterol-conjugated Aptamer Against the Hepatitis C Virus (HCV) NS5B Protein. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2015;4:e254. doi:10.1038/mtna.2015.30
131. Dougan H, Lyster DM, Vo C V, Stafford A, Weitz JI, Hobbs JB. Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. *Nucl Med Biol.* 2000;27(3):289-297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10832086>. Accessed February 15, 2019.
132. Heo K, Min S-W, Sung HJ, et al. An aptamer-antibody complex (oligobody) as a novel delivery platform for targeted cancer therapies. *J Control Release.* 2016;229:1-9. doi:10.1016/j.jconrel.2016.03.006
133. Willis MC, Collins B, Zhang T, et al. Liposome-Anchored Vascular Endothelial Growth Factor Aptamers [§]. *Bioconjug Chem.* 1998;9(5):573-582. doi:10.1021/bc980002x
134. Zhou J, Soontornworajit B, Martin J, Sullenger BA, Gilboa E, Wang Y. A Hybrid DNA Aptamer-Dendrimer Nanomaterial for Targeted Cell Labeling. *Macromol Biosci.* 2009;9(9):831-835. doi:10.1002/mabi.200900046

135. Chen L, Rashid F, Shah A, et al. The isolation of an RNA aptamer targeting to p53 protein with single amino acid mutation. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(32):10002-10007. doi:10.1073/pnas.1502159112
136. Musumeci D, Montesarchio D. Polyvalent nucleic acid aptamers and modulation of their activity: a focus on the thrombin binding aptamer. *Pharmacol Ther.* 2012;136(2):202-215. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.07.011
137. Soule EE, Bompiani KM, Woodruff RS, Sullenger BA. Targeting Two Coagulation Cascade Proteases with a Bivalent Aptamer Yields a Potent and Antidote-Controllable Anticoagulant. *Nucleic Acid Ther.* 2016;26(1):1-9. doi:10.1089/nat.2015.0565
138. Choi DY, Ortube MC, Mccannel CA, et al. SUSTAINED ELEVATED INTRAOCULAR PRESSURES AFTER INTRAVITREAL INJECTION OF BEVACIZUMAB, RANIBIZUMAB, AND PEGAPTANIB. *Retina.* 2011;31(6):1028-1035. doi:10.1097/IAE.0b013e318217ffde
139. Steffensmeier ACG, Azar AE, Fuller JJ, Muller BA, Russell SR. Vitreous Injections of Pegaptanib Sodium Triggering Allergic Reactions. *Am J Ophthalmol.* 2007;143(3):512-513. doi:10.1016/j.ajo.2006.10.007
140. Agrawal S, Joshi M, Christoforidis JB. Vitreous Inflammation Associated with Intravitreal Anti-VEGF Pharmacotherapy. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:1-6. doi:10.1155/2013/943409
141. Ghasemi Falavarjani K, Nguyen QD. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye.* 2013;27(7):787-794. doi:10.1038/eye.2013.107
142. Boyer DS, Goldbaum M, Leys AM, Starita C, V.I.S.I.O.N. Study Group. Effect of pegaptanib sodium 0.3 mg intravitreal injections (Macugen) in intraocular pressure: posthoc analysis from V.I.S.I.O.N. study. *Br J Ophthalmol.* 2014;98(11):1543-1546. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-304075
143. Farman CA, Kornbrust DJ. Oligodeoxynucleotide Studies in Primates: Antisense and Immune Stimulatory Indications. *Toxicol Pathol.* 2003;31(1_suppl):119-122. doi:10.1080/01926230390174995
144. Swayze EE, Siwkowski AM, Wancewicz E V., et al. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(2):687-700. doi:10.1093/nar/gkl1071
145. Henry SP, Giclas PC, Leeds J, et al. Activation of the alternative pathway of complement by a phosphorothioate oligonucleotide: potential mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;281(2):810-816. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9152389>. Accessed February 15, 2019.
146. Shum K-T, Zhou J, Rossi J. Aptamer-Based Therapeutics: New Approaches to

- Combat Human Viral Diseases. *Pharmaceuticals*. 2013;6(12):1507-1542. doi:10.3390/ph6121507
147. Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA. Aptamers: An Emerging Class of Therapeutics. *Annu Rev Med*. 2005;56(1):555-583. doi:10.1146/annurev.med.56.062904.144915
148. Chen C -h. B, Chernis GA, Hoang VQ, Landgraf R. Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(16):9226-9231. doi:10.1073/pnas.1332660100
149. Dollins CM, Nair S, Boczkowski D, et al. Assembling OX40 Aptamers on a Molecular Scaffold to Create a Receptor-Activating Aptamer. *Chem Biol*. 2008;15(7):675-682. doi:10.1016/j.chembiol.2008.05.016
150. McNamara JO, Kolonias D, Pastor F, et al. Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8+ T cells and inhibit tumor growth in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(1):376-386. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18060045.
151. Soldevilla MM, Villanueva H, Bendandi M, Inoges S, López-Díaz de Cerio A, Pastor F. 2-fluoro-RNA oligonucleotide CD40 targeted aptamers for the control of B lymphoma and bone-marrow aplasia. *Biomaterials*. 2015;67:274-285. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.07.020
152. Ramaswamy V, Monsalve A, Sautina L, Segal MS, Dobson J, Allen JB. DNA Aptamer Assembly as a Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Agonist. *Nucleic Acid Ther*. 2015;25(5):227-234. doi:10.1089/nat.2014.0519
153. Yunn N-O, Koh A, Han S, et al. Agonistic aptamer to the insulin receptor leads to biased signaling and functional selectivity through allosteric modulation. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(16):7688-7701. doi:10.1093/nar/gkv767
154. Gilboa E, McNamara J, Pastor F. Use of Oligonucleotide Aptamer Ligands to Modulate the Function of Immune Receptors. *Clin Cancer Res*. 2013;19(5):1054-1062. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2067
155. Khedri M, Rafatpanah H, Abnous K, Ramezani P, Ramezani M. Cancer immunotherapy via nucleic acid aptamers. *Int Immunopharmacol*. 2015;29(2):926-936. doi:10.1016/j.intimp.2015.10.013
156. Zhou J, Rossi JJ. Cell-type-specific, Aptamer-functionalized Agents for Targeted Disease Therapy. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2014;3:e169. doi:10.1038/mtna.2014.21
157. Wheeler LA, Vrbanac V, Trifonova R, et al. Durable Knockdown and Protection From HIV Transmission in Humanized Mice Treated With Gel-formulated CD4

- Aptamer-siRNA Chimeras. *Mol Ther*. 2013;21(7):1378-1389. doi:10.1038/mt.2013.77
158. Neff CP, Zhou J, Remling L, et al. An aptamer-siRNA chimera suppresses HIV-1 viral loads and protects from helper CD4(+) T cell decline in humanized mice. *Sci Transl Med*. 2011;3(66):66ra6. doi:10.1126/scitranslmed.3001581
159. Pastor F, Kolonias D, Giangrande PH, Gilboa E. Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*. 2010;465(7295):227-230. doi:10.1038/nature08999
160. Ni X, Zhang Y, Ribas J, et al. Prostate-targeted radiosensitization via aptamer-shRNA chimeras in human tumor xenografts. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2383-2390. doi:10.1172/JCI45109
161. Berezchnoy A, Brenneman R, Bajgelman M, Seales D, Gilboa E. Thermal Stability of siRNA Modulates Aptamer- conjugated siRNA Inhibition. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2012;1:e51. doi:10.1038/mtna.2012.41
162. Kwon BS, Weissman SM. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(6):1963-1967. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2784565.
163. Laderach D, Movassagh M, Johnson A, Mittler RS, Galy A. 4-1BB co-stimulation enhances human CD8(+) T cell priming by augmenting the proliferation and survival of effector CD8(+) T cells. *Int Immunol*. 2002;14(10):1155-1167. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12356681.
164. Foster BA, Gingrich JR, Kwon ED, Madias C, Greenberg NM. Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Res*. 1997;57(16):3325-3330. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9269988.
165. Tomasz M, Palom Y. The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacol Ther*. 76(1-3):73-87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9535170>. Accessed February 11, 2019.
166. Liu SD, Tomassian T, Bruhn KW, Miller JF, Poirier F, Miceli MC. Galectin-1 tunes TCR binding and signal transduction to regulate CD8 burst size. *J Immunol*. 2009;182(9):5283-5295. doi:doi: 10.4049/jimmunol.0803811
167. Green R, Rogers EJ. Transformation of chemically competent E. coli. *Methods Enzymol*. 2013;529:329-336. doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00028-8
168. Wu AA, Drake V, Huang HS, Chiu S, Zheng L. Reprogramming the tumor

- microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells. *Oncoimmunology*. 2015;4(7):e1016700. doi:doi: 10.1080/2162402X.2015.1016700
169. Maybruck BT, Pfannenstiel LW, Diaz-Montero M, Gastman BR. Tumor-derived exosomes induce CD8(+) T cell suppressors. *J Immunother Cancer*. 2017;5(1):65. doi:doi: 10.1186/s40425-017-0269-7
170. Elola MT, Blidner AG, Ferragut F, Bracalente C, Rabinovich GA. Assembly, organization and regulation of cell-surface receptors by lectin-glycan complexes. *Biochem J*. 2015;469(1):1-16. doi:doi: 10.1042/BJ20150461
171. He J, Baum LG. Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. *Lab Invest*. 2006;86(6):578-590. doi:doi: 10.1038/labinvest.3700420
172. Ortner D, Grabher D, Hermann M, Kremmer E, Hofer S, Heufler C. The adaptor protein Bam32 in human dendritic cells participates in the regulation of MHC class I-induced CD8+ T cell activation. *J Immunol*. 2011;187(8):3972-3978. doi:doi: 10.4049/jimmunol.1003072
173. Banh A, Zhang J, Cao H, et al. Tumor galectin-1 mediates tumor growth and metastasis through regulation of T-cell apoptosis. *Cancer Res*. 2011;71(13):4423-4431. doi:doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4157
174. Verschuere T, Toelen J, Maes W, et al. Glioma-derived galectin-1 regulates innate and adaptive antitumor immunity. *Int J Cancer*. 2014;134(4):873-884. doi:doi: 10.1002/ijc.28426
175. Mathieu V, de Lassalle EM, Toelen J, et al. Galectin-1 in melanoma biology and related neo-angiogenesis processes. *J Invest Dermatol*. 2012;132(9):2245-2254. doi:doi: 10.1038/jid.2012.142
176. Bunn PT, Montes de Oca M, Rivera FL, et al. Galectin-1 Impairs the Generation of Anti-Parasitic Th1 Cell Responses in the Liver during Experimental Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol*. 2017;8:1307. doi:doi: 10.3389/fimmu.2017.01307
177. Lonngberg T, Svensson V, James KR, et al. Single-cell RNA-seq and computational analysis using temporal mixture modelling resolves Th1/Tfh fate bifurcation in malaria. *Sci Immunol*. 2017;2(9). doi:doi: 10.1126/sciimmunol.aal2192
178. Clemente T, Vieira NJ, Cerliani JP, et al. Proteomic and functional analysis identifies galectin-1 as a novel regulatory component of the cytotoxic granule machinery. *Cell Death Dis*. 2017;8(12):e3176. doi:doi: 10.1038/cddis.2017.506
179. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, et al. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(43):15975-15980. doi:doi: 10.1073/pnas.0603883103
180. Thijssen VL, Barkan B, Shoji H, et al. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance

endothelial cell activity. *Cancer Res.* 2010;70(15):6216-6224. doi:doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4150

181. Laderach D, Compagno D, Danos O, Vainchenker W, Galy A. RNA interference shows critical requirement for NF-kappa B p50 in the production of IL-12 by human dendritic cells. *J Immunol.* 2003;171(4):1750-1757. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12902474.

182. Compagno D, Laderach DJ, Gentilini L, Jaworski FM, Rabinovich GA. Delineating the “galectin signature” of the tumor microenvironment. *Oncoimmunology.* 2013;2(4):e23565. doi:doi: 10.4161/onci.23565

183. Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(12):717-734. doi:doi: 10.1038/nrclinonc.2017.101

184. Verschuere T, Van Woensel M, Fieuws S, et al. Altered galectin-1 serum levels in patients diagnosed with high-grade glioma. *J Neurooncol.* 2013;115(1):9-17. doi:doi: 10.1007/s11060-013-1201-8

185. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, et al. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(32):13134-13139. doi:doi: 10.1073/pnas.0706017104

186. Buchel G, Schulte JH, Harrison L, et al. Immune response modulation by Galectin-1 in a transgenic model of neuroblastoma. *Oncoimmunology.* 2017;5(5):e1131378. doi:doi: 10.1080/2162402X.2015.1131378

187. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994;84(5):1415-1420. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8068938>. Accessed April 9, 2019.

188. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995;184(1):39-51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622868>. Accessed April 9, 2019.

189. Russell JH, Ley TJ. LYMPHOCYTE-MEDIATED CYTOTOXICITY. *Annu Rev Immunol.* 2002;20(1):323-370. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730

190. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(6):401-409. doi:10.1038/nri819

191. Toscano MA, Commodaro AG, Illarregui JM, et al. Galectin-1 suppresses

autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol.* 2006;176(10):6323-6332. doi:PMID: 16670344

192. Konya C, Goronzy JJ, Weyand CM. Treating autoimmune disease by targeting CD8(+) T suppressor cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(8):951-965. doi:10.1517/14712590903020759

193. Smith TR, Kumar V. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol.* 2008;29(7):337-342. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18514574.

194. WADDINGTON CH. Canalization of Development and Genetic Assimilation of Acquired Characters. *Nature.* 1959;183(4676):1654-1655. doi:10.1038/1831654a0

195. von Koch CS, Zheng H, Chen H, et al. Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging.* 18(6):661-669. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461064>. Accessed July 23, 2019.

196. Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, et al. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature.* 2007;448(7155):811-815. doi:10.1038/nature06046

197. Cadigan KM, Grossniklaus U, Gehring WJ. Functional redundancy: the respective roles of the two sloppy paired genes in Drosophila segmentation. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(14):6324-6328. doi:10.1073/pnas.91.14.6324

198. Nedvetzki S, Gonen E, Assayag N, et al. RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: A different interpretation of redundancy. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(52):18081-18086. doi:10.1073/pnas.0407378102

199. Tautz D. Problems and paradigms: Redundancies, development and the flow of information. *BioEssays.* 1992;14(4):263-266. doi:10.1002/bies.950140410

200. Barabási A-L, Oltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet.* 2004;5(2):101-113. doi:10.1038/nrg1272

201. Davidson E, Levin M. Gene regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(14):4935-4935. doi:10.1073/pnas.0502024102

202. Dayton TL, Gocheva V, Miller KM, et al. Germline loss of PKM2 promotes metabolic distress and hepatocellular carcinoma. *Genes Dev.* 2016;30(9):1020-1033. doi:10.1101/gad.278549.116

203. Lunt SY, Muralidhar V, Hosios AM, et al. Pyruvate Kinase Isoform Expression Alters Nucleotide Synthesis to Impact Cell Proliferation. *Mol Cell.* 2015;57(1):95-107. doi:10.1016/j.molcel.2014.10.027

204. Zhou S, Xie Y, Tang J, et al. FGFR3 Deficiency Causes Multiple Chondroma-like

- Lesions by Upregulating Hedgehog Signaling. Wilkie AOM, ed. *PLOS Genet.* 2015;11(6):e1005214. doi:10.1371/journal.pgen.1005214
205. Sage J, Miller AL, Pérez-Mancera PA, Wysocki JM, Jacks T. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature.* 2003;424(6945):223-228. doi:10.1038/nature01764
206. McNamara JO, Kolonias D, Pastor F, et al. Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8+ T cells and inhibit tumor growth in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(1):376-386. doi:10.1172/JCI33365
207. Pastor F, Kolonias D, McNamara JO, Gilboa E. Targeting 4-1BB costimulation to disseminated tumor lesions with bi-specific oligonucleotide aptamers. *Mol Ther.* 2011;19(10):1878-1886. doi:10.1038/mt.2011.145
208. Ito K, Ralph SJ. Inhibiting galectin-1 reduces murine lung metastasis with increased CD4(+) and CD8 (+) T cells and reduced cancer cell adherence. *Clin Exp Metastasis.* 2012;29(6):561-572. doi:DOI: 10.1007/s10585-012-9471-7
209. Sundblad V, Morosi LG, Geffner JR, Rabinovich GA. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *J Immunol.* 2017;199(11):3721-3730. doi:doi: 10.4049/jimmunol.1701172
210. Corapi E, Carrizo G, Compagno D, Laderach D. Endogenous Galectin-1 in T Lymphocytes Regulates Anti-prostate Cancer Immunity. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.02190
211. Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572(2-3):274-284. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12223275.
212. Thijssen VL, Barkan B, Shoji H, et al. Tumor Cells Secrete Galectin-1 to Enhance Endothelial Cell Activity. *Cancer Res.* 2010;70(15):6216-6224. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4150
213. Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med.* 1997;185(10):1851-1858. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9151710.
214. Rabinovich GA, Ramhorst RE, Rubinstein N, et al. Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. *Cell Death Differ.* 2002;9(6):661-670. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12032675.

215. Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, et al. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol.* 2008;180(5):3091-3102.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18292532.
216. van der Leij J, van den Berg A, Harms G, et al. Strongly enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers. *Mol Immunol.* 2007;44(4):506-513.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16581128.
217. Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol.* 2000;165(7):3722-3729.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11034377.
218. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 2002;16(2):311-323. doi:10.1016/S1074-7613(02)00280-7
219. Deak M, Hornung A, Novak J, et al. Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions. *Immunobiology.* 2015;220(4):483-489. doi:doi: 10.1016/j.imbio.2014.10.023
220. Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin Treatment of Cancer * . *Annu Rev Med.* 2007;58(1):221-237. doi:10.1146/annurev.med.58.070605.115320
221. Campoli M, Ferris R, Ferrone S, Wang X. Immunotherapy of malignant disease with tumor antigen-specific monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res.* 2010;16(1):11-20. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2345
222. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(7):537-550. doi:10.1038/nrd3141
223. Dassie JP, Liu X-Y, Thomas GS, et al. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat Biotechnol.* 2009;27(9):839-849. doi:10.1038/nbt.1560
224. Neff CP, Zhou J, Remling L, et al. An aptamer-siRNA chimera suppresses HIV-1 viral loads and protects from helper CD4+ T cell decline in humanized mice. *Sci Transl Med.* 2011;3(66). doi:10.1126/scitranslmed.3001581
225. Wheeler LA, Trifonova R, Vrbanac V, et al. Inhibition of HIV transmission in human cervicovaginal explants and humanized mice using CD4 aptamer-siRNA chimeras. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2401-2412. doi:10.1172/JCI45876

