



Cuello, Héctor Adrián

# Participación de la glicosilación aberrante en glioma y neuroblastoma



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Cuello, H. A. (2020). *Participación de la glicosilación aberrante en glioma y neuroblastoma. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*  
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2367>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## **Participación de la glicosilación aberrante en glioma y neuroblastoma**

*TESIS DOCTORAL*

**Héctor Adrián Cuello**

hectorcuello@live.com.ar

### **Resumen**

Los glicanos son considerados una de las cuatro macromoléculas esenciales para la vida celular. La glicosilación es un mecanismo enzimático finamente regulado que afecta a una gran cantidad de proteínas y lípidos, y que participa tanto estructural como funcionalmente en la biología celular. Dentro de los glicoconjugados, las glicoproteínas poseen principalmente modificaciones postraduccionales con N- y O-glicanos, definidos por su enlace covalente a la Asparagina o Serina/Treonina del polipéptido, respectivamente.

La investigación en glicobiología no deja de poner en evidencia la importancia de los glicanos en la gran mayoría de los procesos celulares. En este sentido, en el fenómeno de transformación maligna, la participación de los glicanos ocupa un papel protagónico. En las células tumorales se expresa un perfil de glicosilación con características particulares conocido como glicosilación aberrante que, en gran medida, modula la interacción de la célula tumoral con su entorno. Las alteraciones que ocurren con mayor frecuencia están asociadas a los procesos de sialilación, fucosilación, aparición de glicanos de la familia Lewis, síntesis de glicanos truncados y alteraciones en las ramificaciones tanto en N- como en O-glicanos. Si bien la glicosilación aberrante es un actor importante en la biología tumoral, su conocimiento proviene principalmente del estudio de indicaciones como carcinomas de adultos y poco se sabe sobre su papel en cánceres de origen del sistema nervioso como el neuroblastoma (NB) y el glioma. Por lo tanto, este trabajo trata sobre la caracterización de la glicosilación aberrante en estas indicaciones y su participación en la biología de la célula tumoral. Principalmente se caracterizó la expresión de O-glicanos truncados y de la familia Lewis, así como la expresión de las glicosiltransferasas involucradas en su síntesis, sus implicancias en diferentes capacidades celulares, y se estudió de manera preliminar la regulación de su expresión mediada por mecanismos epigenéticos. Además, se profundizó el estudio en glioma haciendo foco en dos glicoproteínas estrechamente vinculadas con la malignidad y que son blanco de diferentes estrategias terapéuticas en la actualidad, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la integrina  $\alpha v$  ( $\text{I}\alpha\text{v}$ ).

El NB es la neoplasia maligna pediátrica más común diagnosticada antes del primer año, en la que la amplificación del oncogen MYCN se asocia con un mal pronóstico y es el principal criterio clínico para estratificación en alto riesgo. En este trabajo se utilizaron líneas celulares humanas y material histológico de pacientes con diferente estatus de amplificación de MYCN. Los resultados muestran alta expresión de glicanos de la familia Lewis en líneas celulares con amplificación de MYCN. Los resultados indicaron que estos glicanos en NB se asientan prioritariamente en anclajes de tipo O. Tanto las líneas celulares como las muestras de pacientes con amplificación de MYCN mostraron sobreexpresión de la glicosiltransferasa iniciadora de las estructuras del core 2 de los O-glicanos, C2GNT1, así como de sialil- y fucosiltransferasas necesarias para la síntesis de los Lewis, en comparación con sus contrapartes sin amplificación del oncogen. El tratamiento con el inhibidor de N-glicanos tunicamicina (TNM) no produjo cambios en la expresión de los Lewis en las células de NB. Por el contrario, el silenciamiento de C2GNT1 disminuyó la expresión de los Lewis, la unión a E- y P-selectina, así como también redujo la adhesión, la migración y la proliferación celular *in vitro*. Por otro lado, el tratamiento de las células sin amplificación de MYCN con el inhibidor de amplio espectro de deacetilasas de histonas (HDAC) conocido como tricostatina A (TSA), aumentó la expresión de glicanos Lewis, la unión a E-selectina y la expresión de glicosiltransferasas de su vía de síntesis. Estos resultados contribuyen a la hipótesis de que las células de NB con amplificación de MYCN sobreexpresan los glicanos de la familia Lewis, anclados principalmente a estructuras del core 2 O-glicanos, y que su expresión juega un papel clave en el comportamiento maligno de las células NB, que además esta modulada por mecanismos epigenéticos.

Los gliomas son un grupo de tumores del sistema nervioso central derivados de la glia, siendo los tumores primarios intracraneales más comunes. Para este trabajo se utilizaron diez líneas celulares de glioma humano de alto y bajo grado. Los resultados muestran alta expresión de glicanos Lewis, principalmente S<sub>Lex</sub>, y sobreexpresión de sialil- y fucosiltransferasas en las líneas de glioma de alto grado. Se caracterizaron estructuras de ramificación de glicanos, donde se observó una asociación de N-glicanos complejos tri- y/o tetra-antenarios con ramificaciones  $\beta$ 1-6GlcNAc en las líneas de alto grado y sobreexpresión de los niveles de transcripto del gen MGAT5, que codifica la enzima que sintetiza estas ramificaciones. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de los transcriptos de C2GNT1 entre las líneas celulares, así como tampoco cambios en la adhesión o migración tras su silenciamiento. La regulación negativa de la N-glicosilación mediante la incubación con los inhibidores TNM y swainsonina (SW), o el silenciamiento de MGAT5 produjeron una reducción en la expresión de S<sub>Lex</sub>, así como la disminución en las capacidades de adhesión y migración en glioma de alto grado. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en estas capacidades celulares en células de bajo grado

luego de estos tratamientos. La inhibición de HDAC con TSA provocó un aumento en la expresión de los Lewis en células de glioma de bajo grado.

Estos resultados contribuyen a la hipótesis de que las células de glioma de alto grado presentan alta expresión de los glicanos de la familia Lewis, anclados principalmente a N-glicanos complejos, que su expresión juega un papel clave en el comportamiento maligno de las células tumorales, y que su expresión estaría parcialmente modulada por mecanismos epigenéticos.

Se continuó con el estudio de la glicosilación de las proteínas asociadas al glioma, EGFR e *lav*. Los resultados obtenidos de la caracterización indirecta sobre células de alto grado mediante inmunoprecipitación y *Western Blot* mostraron el reconocimiento de Lex y glicanos complejos tri-/tetra-antenarios con ramificaciones  $\beta$ 1-6 GlcNAc en EGFR, así como glicanos de tipo oligomanosa y /o complejos bi-antenarios en *lav*. Se estudió la respuesta a EGF en glioma de alto y bajo grado tras la regulación negativa de la Nglicosilación.

En ambas líneas celulares se evidenció una inhibición de la reorganización del citoesqueleto de actina bajo el estímulo con EGF, sugiriendo un rol importante de los N-glicanos en la interacción de EGFR con su ligando y/o con su par dimerico. La caracterización de la glicosilación de *lav* mediante espectrometría de masas permitió describir seis sitios de glicosilación en células de alto grado (Asn74, Asn554, Asn615, Asn875 y Asn945) y dos en las de bajo grado (Asn74 y Asn875). En glioma de alto grado se observaron eventos de microheterogeneidad con glicanos pertenecientes a diferentes familias estructurales en cuatro de los seis sitios estudiados. En general se observó una mayor abundancia de N-glicanos de tipo complejo/híbrido, aunque también se detectaron N-glicanos del tipo oligomanosa. En la *lav* de células de glioma de bajo grado solo se encontraron N-glicanos de tipo oligomanosa.

La participación de los glicanos en el contexto tumoral pone de manifiesto la importancia de estas moléculas en la biología tumoral. El estudio de la glicosilación aberrante en cáncer emerge como un nicho de biomarcadores y blancos terapéuticos novedosos que pueden ser de interés para el desarrollo de terapias dirigidas. Los resultados de este trabajo aportan valiosa información al conocimiento de la glicobiología sobre el glioma y el NB, explorando la participación de los glicanos en la biología tumoral.



Tesis Doctoral

**Autor**

Lic. Héctor Adrián Cuello

**Director:** Dr. Mariano Rolando Gabri

**Co-Directora:** Dra. Valeria Inés Segatori

**“Participación de la glicosilación aberrante en  
glioma y neuroblastoma”**



**Doctorado en Ciencia y Tecnología**

Universidad Nacional de Quilmes

Departamento de Ciencia y Tecnología

Laboratorio de Oncología Molecular

**-2020-**



## Los resultados de esta tesis dieron lugar a la siguiente publicación:

- Cuello HA, Segatori VI, Alberto M, Gulino CA, Aschero R, Camarero S, Galluzzo Mutti L, Madauss K, Alonso DF, Lubieniecki F, and Gabri MR. Aberrant O-Glycosylation Modulates Aggressiveness in Neuroblastoma. *Oncotarget*. **2018**; 9:34176-34188, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26169>.

## Los resultados de esta tesis fueron presentados en los siguientes congresos:

### Internacionales

- Cuello HA, Ferreira GM, Gulino CA, Albertó M, Aschero R, Galluzzo Mutti L, Alonso DF, Lubieniecki F, Segatori VI and Gabri MR. Aberrant glycosylation in nervous system tumors. 22nd Annual San Diego Glycobiology Symposium (SDGS). February **2019**. San Diego, California, USA.
- Cuello HA, Segatori VI, Albertó M, Gulino CA, Aschero R, Camarero S, Galluzzo Mutti L, Madauss K, Alonso DF, Lubieniecki F, and Gabri MR. Lewis glycans and their epigenetic regulation are associated with neuroblastoma aggressiveness. 25th biennial congress of the European Association for Cancer Research (EACR). July **2018**. Amsterdam, Netherlands. doi: 10.1136/esmooopen-2018-EACR25.266

### Nacionales

- Cuello HA, Ferreira GM, Gulino CA, Segatori VI and Gabri MR. Evaluation of glycans profile of human glioma cell lines and their impact in cell biology. 3<sup>rd</sup> Argentinian Symposium on Glycobiology. Mayo **2019**. Buenos Aires, Argentina.
- Cuello HA, Ferreira GM, Gulino CA, Segatori VI and Gabri MR. Characterization of aberrant glycosylation in human glioma cell lines. LXIII Reunión Anual de la

Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Medicina 78. Noviembre **2018**. Buenos Aires, Argentina.

- Cuello HA, Ferreira GM, Gulino CA, Alberto M, Segatori VI and Gabri MR. Characterization of the glycosylation profile in glioma associated proteins. XXXIII Oncology Meeting, Instituto Ángel H. Roffo, Universidad de Buenos Aires. Octubre **2018**. Buenos Aires, Argentina.
- Cuello HA, Segatori VI, Alberto M, Gulino CA, Aschero R, Camarero S, Galluzzo Mutti L, Madauss K, Alonso DF, Lubieniecki F, and Gabri MR. O-Glycosylation Modulates Aggressiveness in Neuroblastoma”. LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Noviembre **2017**. Buenos Aires, Argentina.
- Cuello HA, Segatori VI, Alberto M, Gulino CA, Alonso DF, Gabri MR. La expresión de glicanos de la familia Lewis asocia con el estatus de amplificación de N-MYC y se encuentra regulada por mecanismos epigenéticos. XXXII Jornadas de Oncología, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Universidad de Buenos Aires. Octubre de **2017**. **Premio Mejor Poster en Investigación Básica**.
- Cuello HA, Segatori VI, Alberto M, Gulino CA, Aschero R, Galluzzo Mutti L, Lubieniecki F, and Gabri MR. Characterization of the Glycophenotype and the Related Glycoenzymes in Pediatric Cancer Cell Lines and Patient’s Derived Primary Tumors. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Noviembre **2016**. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.



# Índice

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>14</b>
<b>Introducción General .....</b>	<b>19</b>
<b>Cáncer .....</b>	<b>21</b>
Definición y estadísticas.....	21
Transformación maligna .....	22
Consideraciones sobre el cáncer pediátrico .....	25
<b>Aspectos Generales en Glicobiología .....</b>	<b>27</b>
Glicobiología y rol biológico de los glicanos .....	27
Clases principales de glicoconjugados.....	29
Síntesis de glicoconjugados .....	31
N-glicosilación .....	33
O-glicosilación .....	39
Proteínas de unión a glicanos .....	41
<b>Glicosilación y Cáncer .....</b>	<b>44</b>
Glicosilación aberrante .....	44
Glicanos de la familia Lewis .....	45
Alteraciones en ramificaciones y fucosilación de N-glicanos.....	53
Truncamiento en la síntesis de glicanos O-GalNAc .....	56
Alteraciones en la ramificación de glicanos O-GalNAc .....	59
Glicanos como blancos terapéuticos .....	62
<b>Hipótesis y Objetivo General.....</b>	<b>65</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>69</b>
Líneas celulares y condiciones de cultivo .....	71
Material histológico de pacientes .....	73
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente .....	73
Citometría de flujo .....	73
Anticuerpos .....	74
Lectinas.....	75
Unión a selectinas .....	76
Extracción de ARN .....	76
Síntesis de ADN copia .....	76
PCR en tiempo real.....	77
Tratamiento con tricostatina A.....	78
Tratamiento con tunicamicina.....	78
Tratamiento con swainsonina .....	79
Silenciamiento mediado por <i>siRNA</i> .....	79
Adhesión celular.....	79
Proliferación celular .....	80
Migración en <i>Transwell</i> .....	80
Cromatografía de Intercambio aniónico de alto rendimiento con detección de fluorescencia .....	81
Inmunoprecipitación de proteínas .....	82
SDS PAGE y Western Blot .....	82
Concentración de proteínas.....	83
Tinción de proteínas por <i>Coomassie</i> coloidal.....	84
Espectrometría de masas.....	84
Inmunofluorescencia .....	85
Estudio del citoesqueleto de actina.....	86
Microscopía confocal .....	86

Análisis estadísticos .....	87
<b>Capítulo I .....</b>	<b>89</b>
<b>Introducción Capítulo I .....</b>	<b>91</b>
Características clínicas y biológicas del neuroblastoma .....	93
Lesiones genéticas.....	93
Tratamiento.....	95
Glicosilación aberrante en neuroblastoma .....	95
<b>Objetivos Capítulo I .....</b>	<b>99</b>
<b>Resultados Capítulo I .....</b>	<b>103</b>
Caracterización del perfil de glicanos .....	105
Caracterización del perfil de expresión de glicosiltransferasas .....	107
Estructuras de N- y core 2 O-glicanos (O-GalNAc).....	111
Participación de los glicanos O-GalNAc del core 2 en la biología celular del neuroblastoma ....	116
Evaluación de la regulación epigenética de los Lewis en neuroblastoma .....	118
<b>Discusión Capítulo I .....</b>	<b>121</b>
<b>Conclusiones Capítulo I .....</b>	<b>129</b>
<b>Capítulo II .....</b>	<b>133</b>
<b>Introducción Capítulo II .....</b>	<b>135</b>
Características clínicas y biológicas del glioma .....	137
Tratamiento.....	138
Glicosilación aberrante en glioma .....	139
<b>Objetivos Capítulo II .....</b>	<b>143</b>
<b>Resultados Capítulo II .....</b>	<b>147</b>
Comportamiento celular <i>in vitro</i> del glioma de alto y bajo grado.....	149
Caracterización del perfil de glicanos .....	149
Caracterización del perfil de expresión de glicosiltransferasas .....	151
Caracterización de glicanos O-GalNAc del core 2 .....	153
.....	153
Caracterización de N-glicanos .....	153
Participación de N- y O-glicanos en glioma de alto grado .....	157
Participación de N-glicanos en glioma de bajo grado .....	162
Evaluación de la regulación epigenética de los Lewis en glioma .....	164
<b>Discusión Capítulo II .....</b>	<b>169</b>
<b>Conclusiones Capítulo II .....</b>	<b>179</b>
<b>Capítulo III .....</b>	<b>183</b>
<b>Introducción Capítulo III .....</b>	<b>185</b>
La glicosilación en terapias dirigidas contra el cáncer .....	187
EGFR.....	188
Integrina $\alpha v$ .....	192
<b>Objetivos Capítulo III .....</b>	<b>195</b>
<b>Resultados Capítulo III .....</b>	<b>199</b>
Expresión de EGFR en líneas celulares de glioma de alto y bajo grado.....	201
Expresión de glicanos asociados a EGFR.....	203
Participación de la glicosilación de EGFR en la polimerización del citoesqueleto de actina .....	204
Expresión de Iav en líneas celulares de glioma de alto y bajo grado .....	210
Análisis de sitios glicosilación de Iav en glioma de alto grado mediante EM .....	213
Análisis de sitios glicosilación de Iav en glioma de bajo grado mediante EM .....	221

<i>Discusión Capítulo III</i> .....	223
<i>Conclusiones Capítulo III</i> .....	233
<i>Conclusión</i> .....	237
<i>Agradecimientos</i> .....	241
<i>Referencias</i> .....	248
<i>Anexo</i> .....	268



## Abreviaturas

**aa:** Aminoácido.

**AAL:** Aleuria aurantia.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNc:** ADN copia.

**ANOVA:** Análisis de varianza.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ARNm:** ARN mensajero.

**Asn:** Asparagina.

**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*.

**BSA:** Sero-Albúmina Bovina.

**BVZ:** Bevacizumab.

**CDR:** Carbohydrate Recognition Domain.

**CF:** Citometría de flujo.

**C2GNT:** *Core 2 Beta1,6 N-Acetilglucosaminil transferasa*.

**ConA:** Concanavalina A.

**DAPI:** 4', 6-diamino-2-fenilindol.

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**Dol-P:** Dolicol fosfato.

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico.

**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

**EM:** Espectrometría de masas.

**FAK:** Quinasa de Adhesión Focal.

**FDA:** *Food and Drug Administration (USA)*.

**FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína.

**Fuc:** Fucosa.

**FUT:** Fucosiltransferasa.

**Gal:** Galactosa.

**GalNAc:** N-Acetilgalactosamina.

**GALNT:** Polipéptido N-Acetil-galactosamintransferasa.

**GBM:** Glioblastoma.

**Glc:** Glucosa.

**GlcNAc:** N-Acetilglucosamina.

**GPT:** GlcNAc fosfotransferasa.

**HAT:** Histona acetiltransferasa.

**HDAC:** Histona deacetilasa.

**HER2:** Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano.

**HPRT1:** Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa 1.

**I $\alpha$ v:** Integrina alfa v.

**IL:** Interleuquina.

**IMFr:** Intensidad Media de Fluorescencia Relativa.

**Le<sup>a</sup>:** Lewis A.

**Le<sup>b</sup>:** Lewis B.

**Le<sup>x</sup>:** Lewis X.

**Le<sup>y</sup>:** Lewis Y.

**LOH:** *Loss of Heterozygosity events.*

**mAb:** Anticuerpo monoclonal.

**Man:** Manosa.

**MEM:** *Eagle`s Minimum Essential Medium.*

**MGAT:** Manosil acetilglucosaminiltransferasa.

**MYCN:** *V-myc myelocytomatosis viral-related oncogene.*

**NB:** Neuroblastoma.

**NCAM:** *Neural Cell Adhesion Molecule.*

**NeuAc:** Ácido siálico N-Acetil-Neuramínico.

**NeuGc:** Ácido siálico N-Glicolil-Neuramínico.

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information (USA).*

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**OST:** Oligosacariltransferasa.

**PBS:** *Buffer fosfato salino.*

**PE:** R-Ficoeritrina.

**PHA-E:** *Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin.*

**PHA-L:** *Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin.*

**Pro:** Prolina.

**Poli-LacNAc:** Poli-N-Acetil-Lactosamina.

**PSGL-1:** *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1.*

**qRT-PCR:** PCR cuantitativa en Tiempo Real.

**RE:** Retículo endoplasmático.

**Ser:** Serina.

**SFB:** Suero Fetal Bovino.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**siRNA:** *Small interfering RNA.*

**Sia:** Ácido siálico.

**SLe<sup>a</sup>:** Sialil Lewis A.

**SLe<sup>x</sup>:** Sialil Lewis X.

**ST:** SialilT.

**STn:** SialilTn.

**ST3Gal:**  $\alpha$ 2,3 Sialiltransferasa.

**ST6Gal:**  $\alpha$ 2,6 Sialiltransferasa.

**SW:** Swainsonina.

**T:** Antígeno Thomsen–Friedenreich.

**TACA:** *Tumor Associated Carbohydrate Antigen.*

**Thr:** Treonina.

**TMZ:** Temozolomida.

**TNM:** Tunicamicina.

**TSA:** Tricostatina A.

**VEGF:** Factor de crecimiento de endotelio vascular.

**2AB:** 2-Amino Bencidina.





Introducción General

---



# Cáncer

---

## Definición y estadísticas

El término cáncer conjuga un grupo diverso de más de cien enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, desencadenado como consecuencia de una suma de alteraciones moleculares en las células normales, que en conjunto conforman un proceso denominado transformación celular. Estas células transformadas presentan como característica principal una tasa proliferativa exacerbada, independiente de las señales regulatorias que impone el microambiente tisular, dando lugar a la formación de nuevos crecimientos tisulares denominados neoplasias o tumores<sup>1</sup>. En esta definición se hace referencia a los tumores sólidos, ya que existe un grupo de indicaciones originadas a partir de precursores hematológicos que comparten las características que describen a la célula transformada, pero que no forman masas tumorales, como es el caso de las leucemias.

Las neoplasias sólidas benignas son aquellas que se circunscriben a su localización original, presentando un límite definido en la arquitectura tisular que las rodea, sin comprometer el estado vital del organismo. Las neoplasias malignas son producto de la existencia de células agresivas con capacidad de invadir los tejidos circundantes, diseminarse y formar focos metastásicos en sitios distantes, por lo que pueden afectar el normal funcionamiento del tejido en el que se encuentran. La presencia de tumores malignos define el estado patológico denominado cáncer. Las neoplasias también pueden ser clasificadas en graduaciones según su agresividad o riesgo para el paciente y, dependiendo de la indicación, también se tienen en cuenta factores con valor pronóstico tanto moleculares como histológicos.

El cáncer es considerado un importante problema de salud pública en todo el mundo. En el año 2018, fue responsable de un estimado de 9.6 millones de muertes a nivel mundial. Según las últimas estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC), en base a datos disponibles a nivel mundial para el año 2018, Argentina presenta una tasa de incidencia de 212 casos cada 100.000 habitantes (considerando ambos sexos y todos los tumores a excepción de piel no

## *-Introducción General-*

melanoma), cifra que la posiciona dentro de los países del mundo con incidencia de cáncer media-alta. Esta estimación corresponde a más de 125.000 casos nuevos de cáncer en ambos sexos por año, con porcentajes similares tanto en hombres como en mujeres. En incidencia sobre ambos sexos, lidera el cáncer de mama (16,7%), seguido de colon (9,6%), próstata y pulmón (9%), entre otros. Por su parte, los tumores del sistema nervioso central presentaron una incidencia del 2,3%<sup>2</sup>.

En relación con los cánceres pediátricos, según datos del Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino (ROHA) se han registrado 21.912 casos de niños menores de 15 años con patología oncológica en el período 2000-2016. Los tumores más frecuentes registrados son las leucemias (37%), seguidos de tumores del sistema nervioso central (19%), linfomas (11,8%), partes blandas (6,3%), neuroblastoma (5,7%), entre otros<sup>3</sup>.

Aunque el desarrollo de terapias antineoplásicas exitosas ha crecido de manera sustancial en las últimas décadas, sobre todo con el advenimiento de terapias inmunológicas, la mortalidad ocasionada por esta enfermedad continúa siendo desmesurada. Por este motivo es imprescindible continuar con el estudio del cáncer desde múltiples ángulos, para mejorar su caracterización y así arribar a nuevas estrategias terapéuticas. En la presente tesis se abordaron dos indicaciones, una pediátrica y una de adultos, siendo las mismas neuroblastoma y glioma, respectivamente. El abordaje sobre ellas se realizará en los capítulos I y II.

## **Transformación maligna**

El proceso por el cual las células normales se transforman en células cancerosas se denomina carcinogénesis, oncogénesis o transformación maligna. El desarrollo de un tumor maligno en un tejido sano es el resultado de una serie compleja de múltiples pasos, que conlleva alteraciones genéticas y epigenéticas, que se trasladan a todos los niveles celulares para producir el fenotipo de la célula maligna<sup>4</sup>.

El cáncer se caracteriza por ser una enfermedad compleja donde intervienen múltiples factores tanto intrínsecos de la célula tumoral, como extrínsecos provenientes del microambiente tumoral. Si bien los diferentes tipos de cáncer pueden presentar diferencias entre sí, como la modulación de distintas vías de señalización, respuesta

diferencial a las terapias o distinto “diálogo” con el sistema inmune y el microambiente, todos comparten características distintivas de la enfermedad. Las células cancerosas presentan capacidad proliferativa sostenida, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa ilimitada, capacidad de inducir angiogénesis, invadir tejidos circundantes con potencial desarrollo de metástasis, reprogramar el metabolismo energético y evadir la inmunovigilancia. Subyacentes a estas características se encuentran la inestabilidad del genoma, motor de la adaptación del tejido a las diversas condiciones microambientales, y la interacción con elementos de este microambiente tumoral que, en conjunto, sostienen la supervivencia del tejido transformado<sup>5</sup>.

La ganancia de las capacidades ventajosas de la célula tumoral está asentada en el fenómeno de inestabilidad genómica, dada por la desregulación de mecanismos de control y de los sistemas de reparación del ADN en etapas tempranas de este proceso de transformación. La alta frecuencia de mutaciones en las células tumorales genera una diversidad genética entre las células que conforman la masa tumoral, dando lugar a la selección de los clones con un fenotipo adecuado para el ambiente tisular local. De esta manera, las distintas etapas de la progresión tumoral se pueden entender como una suma de expansiones clonales, donde cada una está desencadenada por la adquisición azarosa de un genotipo y, en consecuencia, un fenotipo mutante con mayores capacidades que el anterior.

El cáncer depende de la acumulación de alteraciones en genes que intervienen en la regulación de la proliferación, diferenciación o supervivencia celular. Las mutaciones que conducen a las células tumorales a su comportamiento patológico se relacionan fundamentalmente con dos mecanismos moleculares: la activación de oncogenes y la pérdida de la función de genes supresores de tumor. El primero se corresponde con la alteración del funcionamiento de un gen normal, del grupo de los proto-oncogenes, que se modifica transformándose en un oncogén, confiriendo a la célula características neoplásicas. A su vez, los distintos oncogenes necesitarían de la expresión de otros genes adicionales que cooperan con el establecimiento del fenotipo neoplásico. En el segundo mecanismo, en cambio, sucede la inactivación de genes que presentan normalmente propiedades supresoras del malfuncionamiento celular (genes supresores de tumores), provocando el fallo de los sistemas de control celular a

## *-Introducción General-*

diferentes niveles, como pueden ser la promoción de la diferenciación celular y la apoptosis<sup>1</sup>.

Un mecanismo adicional que acompaña el proceso de transformación maligna involucra la alteración de la regulación de la expresión de genes críticos para las vías de transformación mediada por mecanismos epigenéticos. Las principales modificaciones epigenéticas en mamíferos, y particularmente en humanos, son la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de histonas (acetilación, metilación, fosforilación, etc). Mecanismos de este tipo son ejemplos de que algunas expansiones clonales pueden ser desencadenadas por cambios no mutacionales que afectan la regulación de la expresión génica<sup>6,7</sup>. Cambios sustanciales en la metilación del ADN fueron de las primeras alteraciones epigenéticas identificadas en cáncer, donde la hipometilación del genoma en general es asociada al aumento de la inestabilidad genómica y activación de los proto-oncogenes; y la hipermetilación sitio específica de promotores (islas CpG) contribuye al silenciamiento de genes supresores de tumor. Otra alteración epigenética vinculada al cáncer es la presencia de patrones aberrantes de acetilación de histonas. Los niveles de acetilación son el resultado del equilibrio de la actividad de histona acetiltransferasas (HATs) e histona deacetilasas (HDACs). Las HDACs a menudo se encuentran sobreexpresadas en varias indicaciones, mediando la pérdida de acetilación de histonas que conduce a la represión génica<sup>8</sup>. Además, las HDACs están involucradas en la desacetilación de otras proteínas no histonas, como factores de transcripción, involucradas en la regulación de diferentes procesos celulares como progresión del ciclo celular, diferenciación y apoptosis<sup>9</sup>.

Teniendo en cuenta el proceso de progresión tumoral, la capacidad de replicación descontrolada, así como la evasión de la senescencia y apoptosis, son los motores que sustentan la formación de la masa tumoral. Durante este proceso, el aumento de la masa celular demanda nutrientes y oxígeno por lo que se activa un "interruptor angiogénico", causando que de la vasculatura normalmente inactiva broten nuevos vasos que ayudan a mantener la expansión y el crecimiento de la neoplasia. A su vez, la adquisición de las capacidades de migración, de adhesión a la matriz extracelular y de degradación de la misma para invadir tejidos circundantes, resumen los comportamientos principales que hacen que la neoplasia pueda acceder a tejidos vecinos<sup>10,11</sup>. El proceso de invasión y metástasis prevé una sucesión de pasos biológicos,

## *-Introducción General-*

comenzando con invasión local, luego intravasación por células cancerosas en los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, tránsito de células cancerosas a través de los sistemas linfático y hematógeno, seguido por el escape de las células cancerosas de la luz de los vasos en el parénquima de tejidos distantes (extravasación). Finalmente, la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis) y, posteriormente, su crecimiento en tumores macroscópicos, proceso denominado "colonización"<sup>12</sup>. Si bien estas características se toman como generales del cáncer, no son aplicables a todos los tipos tumorales, un ejemplo son los originados del sistema nervioso central que rara vez metastatizan<sup>13</sup>.

## Consideraciones sobre el cáncer pediátrico

Los cánceres que ocurren en niños y adolescentes son un espectro de neoplasias malignas biológicamente distintas a las que se presentan en adultos. En muchos casos, los tumores pediátricos son clasificados histológicamente como tumores embrionarios, porque parecen recapitular el desarrollo de órganos embrionarios o fetales. Sin embargo, muchos tumores pediátricos que encuentran su génesis en el desarrollo embrionario del individuo, no se asemejan estrictamente a órganos en desarrollo. La caracterización molecular de estos tumores, a través del estudio de perfiles genómicos y transcriptómicos, ha demostrado que muchas de estas neoplasias (meduloblastoma, tumor de Wilms, neuroblastoma) parecen ser el resultado de la proliferación de células primitivas que se asemejan al órgano en desarrollo, y se detienen en etapas inmaduras por la activación aberrante de vías de señalización, y no por el resultado de agentes externos que forman parte de las causas de la mayoría de las neoplasias de adultos<sup>14-17</sup>.

La incidencia mundial y la distribución de tumores sólidos pediátricos en niños, y el período de tiempo mucho más corto para que se desarrollen, indican una alta probabilidad de que sean el resultado de mutaciones espontáneas y que podrían requerir menos eventos oncogénicos que los cánceres de adultos. Esto se encuentra apoyado por análisis citogenéticos que demuestran reordenamientos específicos de tumor (translocaciones, amplificaciones genéticas) y cariotipos no complejos en algunos de estos tumores<sup>18</sup>.

## -Introducción General-

Como se comentó anteriormente, la transformación maligna sucede como resultado de alteraciones del material genético en un proceso multifactorial en eventos sucesivos. En los cánceres infantiles, tan solo dos mutaciones pueden ser suficientes para el inicio del tumor, como lo describe el modelo de “dos golpes” de Knudson (*two hits*) para tumores embrionarios. Aunque no se adapte a todas las neoplasias, esta teoría desarrollada a partir del estudio del retinoblastoma ha formado un paradigma para comprender las diferencias entre los procesos cancerígenos entre niños y adultos<sup>19</sup>.

El modelo de Knudson fue postulado mediante el estudio del retinoblastoma, tumor pediátrico que se origina en la retina en desarrollo. Su origen está atribuido a mutaciones que inactivan el gen RB1, el primer gen supresor tumoral identificado. Este modelo propone que dos eventos mutacionales son necesarios para el desarrollo tumoral. El primer evento puede ser heredado y, por lo tanto, presente en todas las células del cuerpo. En aproximadamente el 15% de los casos, este primer golpe es heredado, pero en la mayoría de los casos, la primera mutación surge *de novo* dentro de uno de los gametos de los padres. El segundo evento ocurre en una célula retiniana y da como resultado la pérdida de alelo restante, más comúnmente por pérdida del cromosoma, deleciones grandes o conversión de genes. El resultado es un trastorno del ciclo celular con entrada inapropiada en la fase S (síntesis)<sup>20,21</sup>.

Los cánceres infantiles difieren en muchos aspectos de los que ocurren en edades mayores, incluso cuando aparentemente son tumores similares. Sin embargo, algunos de los factores causales sospechosos de cáncer infantil también parecen influir en el riesgo y desarrollo de los diferentes tipos de cáncer en adultos. Las mutaciones de la línea germinal en RB1 no solo confieren un riesgo de retinoblastoma, también afectan el riesgo de que ocurran una amplia variedad de tumores desde la infancia hasta edad adulta, como melanoma, vejiga, cáncer de pulmón y otras neoplasias malignas.

Además, al igual que en tumores de adultos, se han identificado otras anomalías genéticas somáticas en tumores sólidos pediátricos como la pérdida de genes supresores de tumor, amplificación de oncogenes, metilación anormal, impronta genómica, mecanismos defectuosos para reparar el ADN y anomalías en la actividad de la telomerasa<sup>22</sup>.

## Aspectos Generales en Glicobiología

---

### Glicobiología y rol biológico de los glicanos

La glicobiología se define como el estudio de la estructura, biosíntesis, biología y evolución de los carbohidratos (también llamados sacáridos, azúcares o glicanos) que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, y en las proteínas que los reconocen<sup>23</sup>. Se utilizará el término glicanos para definir a las macromoléculas conformadas por polímeros de carbohidratos.

En comparación con las demás macromoléculas fundamentales para la vida celular, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, los glicanos presentan una mayor complejidad estructural que deriva en una enorme diversidad de especies. Esta complejidad es consecuencia del número de monosacáridos que los conforman y de las múltiples opciones de unión posible entre ellos. Los glicanos derivan inicialmente de 32 carbohidratos utilizados en el proceso enzimático de la glicosilación<sup>24</sup>. Los glicanos pueden unirse a diferentes macromoléculas como lípidos o proteínas, conformando los glicoconjugados, o bien permanecer como entidades independientes. Las estructuras de glicanos son el resultado de la expresión y actividad de un pequeño porcentaje de los genes conocidos en el genoma humano, que incluye tanto enzimas como transportadores involucrados en su biosíntesis. A pesar del desafío que implica esta complejidad estructural en su estudio, el campo de la glicobiología ha crecido de manera sustancial en las últimas décadas, expandiendo el horizonte tecnológico para su abordaje y profundizando así los conocimientos sobre la diversidad, la estructura y el papel de los glicanos en la biología celular y la fisiología de los organismos<sup>25</sup>.

Los glicanos son de naturaleza universal y esenciales para la existencia de todos los organismos vivos conocidos<sup>26</sup>. En un comienzo, debido a su presencia en las membranas celulares formando el glicocalix, a los glicanos se les han atribuido fundamentalmente roles estructurales. Sin embargo, en la actualidad se conoce que están involucrados en una amplia gama de funciones esenciales en la biología de la célula. Una clasificación simple divide las funciones de los glicanos en cuatro categorías:

## *-Introducción General-*

(1) rol estructural y modulador, (2) reconocimiento intra-especie, (3) reconocimiento inter-especies y (4) mimetismo molecular de los glicanos del huésped<sup>27</sup>.

El rol estructural y modulador hace referencia a efectos biológicos mediados por las propiedades de su estructura primaria y/o que modulan funciones de las moléculas a las que están unidos. Los glicanos tienen funciones de protección, estabilización, organización, de barrera y de reserva energética. Por ejemplo, los glicanos de la matriz extracelular, son importantes para el mantenimiento de la estructura, la porosidad y la integridad de los tejidos<sup>28</sup>. Los glicanos también están involucrados en el plegamiento de polipéptidos recién sintetizados en el retículo endoplasmático (RE) y en el mantenimiento posterior de la solubilidad y conformación de proteínas<sup>29,30</sup>. Estas moléculas también pueden modular las interacciones de proteínas entre sí, como ligandos y receptores, así como mediar un efecto de encendido y apagado, como es el caso de factores de transcripción. Se ha demostrado también que los glicanos pueden tener implicancias en la señalización celular, por ejemplo, estructuras específicas de glicanos pueden afectar las propiedades de señalización de diferentes receptores de membrana<sup>31</sup>.

Los glicanos funcionan también como ligandos de diferentes proteínas que los reconocen, mediando procesos de reconocimiento con una consecuencia biológica determinada. Este reconocimiento puede ocurrir intra-especie, donde las interacciones ocurren dentro de un mismo sistema, o inter-especie, donde los glicanos median interacciones con agentes externos, como los patógenos. Dentro del reconocimiento intra-especie, el reconocimiento específico de ciertos residuos de glicanos desempeñan un papel clave en la regulación del proceso de degradación asociada al RE de proteínas, también tienen roles en el tráfico intracelular, inducción de la endocitosis o incluso pueden actuar como moléculas tipo hormona<sup>32,33</sup>. Los glicanos tienen muchas funciones biológicas específicas en el reconocimiento célula-célula y las interacciones célula-matriz. Un ejemplo bien caracterizado es la familia de las selectinas, moléculas de adhesión que reconocen glicanos en sus ligandos y median las interacciones críticas entre las células sanguíneas y las células vasculares en una variedad de situaciones normales y patológicas<sup>34</sup>.

En relaciones de reconocimiento entre diferentes organismos, tanto la proteína como el glicano pueden pertenecer a cualquiera de los dos sistemas. Distintos

## -Introducción General-

patógenos como virus, bacterias y parásitos, y ciertas toxinas, pueden reconocer glicanos presentes en la célula diana<sup>35</sup>. Además, muchos patrones moleculares asociados a patógenos a menudo consisten en glicanos extraños y/o patrones de glicanos en microbios invasores reconocidos por las células del sistema inmune innato, por medio de receptores específicos. Dentro de esta interacción con patógenos, los glicanos pueden tener también funciones de mimetismo molecular, donde los patógenos que invaden animales multicelulares se decoran con estructuras de glicanos idénticas o casi idénticas a las de las superficies de las células huésped, bloqueando el reconocimiento de los epítopes antigénicos subyacentes para evadir las respuestas inmunes del huésped<sup>30,36</sup>.

## Clases principales de glicoconjugados

Las clases comunes de glicanos se definen principalmente de acuerdo con la naturaleza del enlace del glicoconjugado, siendo éste una proteína o lípido. En la síntesis de los glicoconjugados de mamíferos sólo se encuentran comúnmente 17 monosacáridos y se listan en la **tabla suplementaria 1** en el Anexo<sup>37</sup>. La nomenclatura de símbolos allí listada se utilizará para la representación gráfica de glicanos a lo largo de este trabajo de tesis.

En la **figura 1** se esquematizan las clases más comunes de glicoconjugados en células animales<sup>38</sup>. Comenzando con las glicoproteínas, estas se conforman por una proteína que presenta uno o más glicanos unidos covalentemente a su esqueleto polipeptídico, generalmente a través de enlaces con un nitrógeno (N) u oxígeno (O). Este tipo de unión define los dos grupos de glicanos más representados en las glicoproteínas, los N- y O-glicanos.

En los N-glicanos el oligosacárido se encuentra unido al nitrógeno de un residuo de Asparagina (Asn). Comúnmente involucra la unión del N a una N-Acetil-Glucosamina (GlcNAc), siendo Asn-X-Serina/Treonina (Ser/Thr) la secuencia consenso para esta glicosilación, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Prolina (Pro).

Por otro lado, un O-glicano se une frecuentemente al polipéptido a través de una N-acetilgalactosamina (GalNAc) a un grupo hidroxilo de un residuo de Ser/Thr y la cadena puede extenderse a diferentes tipos estructurales denominados *cores* o núcleos.

### *-Introducción General-*

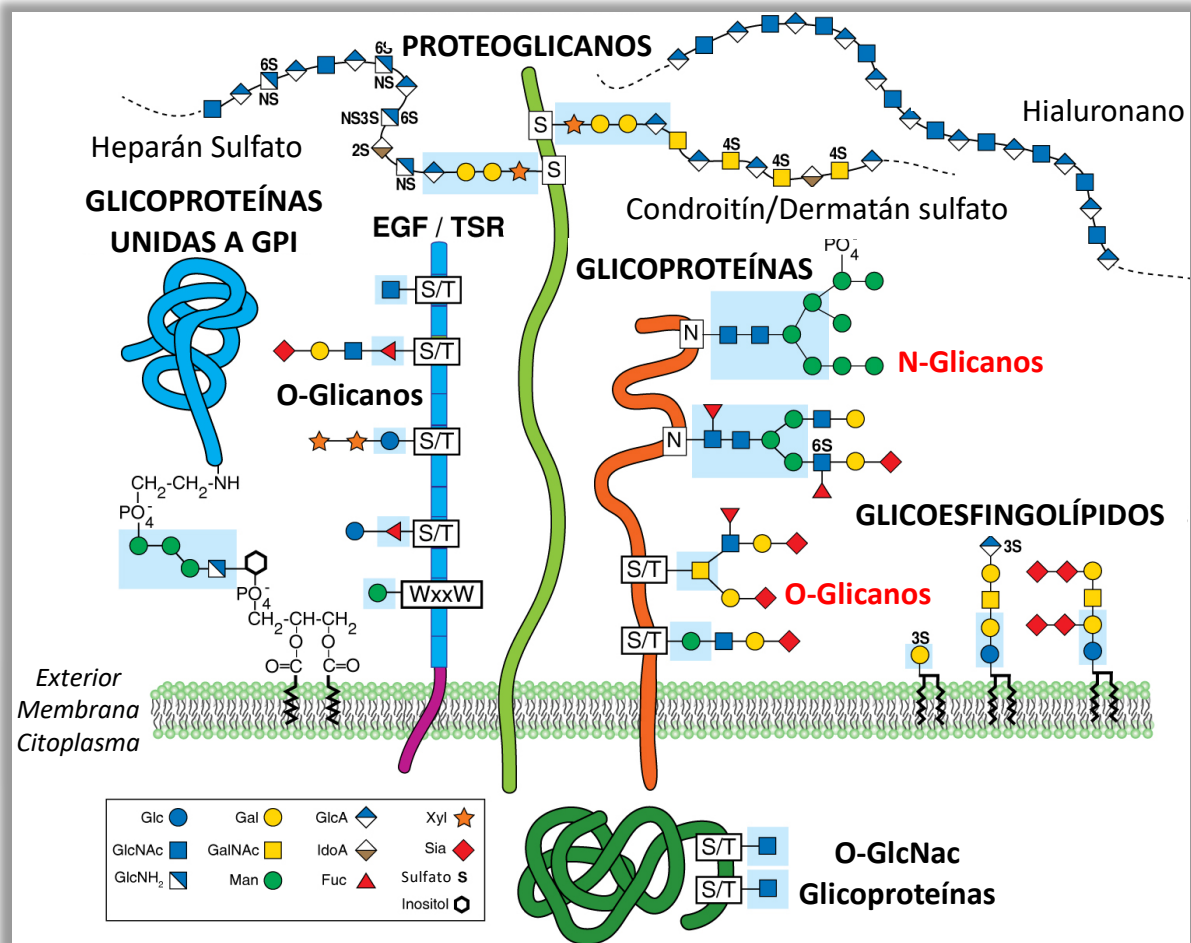
Existen otros tipos de O-glicanos en los cuales se une otro tipo de carbohidrato, como fucosa, glucosa o manosa, en proteínas o dominios específicos, como las repeticiones del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), las repeticiones de Trombospondina tipo I (TSR) o distroglicano.

Otro tipo de glicoproteínas, con uniones de tipo O, corresponde al grupo de las glicoproteínas O-GlcNac, un caso particular de glicoconjugados que no son de membrana ni secretados. Este grupo está compuesto por proteínas citoplasmáticas y nucleares que poseen un solo residuo GlcNac en uno o más de sus residuos de Ser/Thr.

Un proteoglicano es un glicoconjugado que tiene una o más cadenas de glicosaminoglicano (GAG) (Heparán/Condroitín/Dermatán sulfato), unidas a una proteína central a través de una región típica que tiene en su extremo reductor un residuo de xilosa unido al grupo hidroxilo de un residuo de serina. Algunos polipéptidos de proteoglicanos pueden presentar GAGs y diferentes O- y N-glicanos. Otro tipo de GAG, el hialuronano, se encuentra principalmente como un glicano libre.

Otro tipo de glicoconjugado es el grupo de las glicoproteínas unidas a un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI). En estas moléculas los glicanos forman un puente entre fosfatidilinositol y una fosfoetanolamina unida al carboxilo terminal de una proteína. Esta estructura generalmente constituye el único anclaje a la membrana de la bicapa lipídica para estas proteínas.

Los lípidos son la otra clase de macromoléculas que pueden ser glicosiladas, conformando el grupo de los glicolípidos (o glicoesfingolípidos). Los mismos consisten en un glicano generalmente unido a través de una glucosa o galactosa al grupo hidroxilo primario terminal generalmente de una ceramida. Esta ceramida se forma por un aminoalcohol de cadena larga (esfingosina) y un ácido graso. Los glicolípidos sialilados conforman un grupo de moléculas denominado gangliósidos.



**Figura 1 | Clases más comunes de glicanos en animales.** Representación esquemática de los diferentes grupos de glicanos en las células animales y su disposición extra o intracelular. Modificado de "Essentials of Glycobiology", tercera edición.

## Síntesis de glicoconjugados

La glicosilación de proteínas y lípidos ocurre en el RE y aparato de Golgi, con la mayor parte del procesamiento terminal en los compartimentos del cis-, medial y trans-Golgi. En estas organelas, actúan las glicosiltransferasas y las glicosidasas, enzimas encargadas de la transferencia o hidrólisis de los carbohidratos, respectivamente. Son las responsables de formar estructuras de glicanos en una serie de pasos regulados por la disponibilidad de sustrato, actividad enzimática, niveles de transcripción génica y ubicación de las enzimas dentro de las organelas. Por lo tanto, el glicoma de una célula particular es el reflejo del patrón de expresión génica, que determina los niveles de las enzimas responsables de la síntesis de glicanos<sup>39</sup>.

## *-Introducción General-*

Las glicosiltransferasas son las responsables de ensamblar restos de monosacáridos en cadenas de glicanos que pueden ser tanto lineales como ramificadas. Las glicosiltransferasas más comunes en animales incluyen aquellas que transfieren residuos de glucosa (Glc), galactosa (Gal), manosa (Man), N-Acetilglucosamina (GlcNAc), N-Acetilgalactosamina (GalNAc), fucosa (Fuc) y ácido siálico (Sia). En muchos casos, las glicosiltransferasas transfieren formas activadas de monosacáridos (nucleótidos azúcar), hacia aceptores que incluyen proteínas, lípidos y cadenas de glicanos en crecimiento<sup>40,41</sup>. En la **tabla suplementaria 2** del Anexo se listan las formas activadas de donantes de monosacáridos en células animales. En otros casos, los sustratos donantes contienen un resto lipídico, como dolicol-fosfato, ligado a manosa, glucosa o incluso un oligosacárido. Los precursores de los monosacáridos se importan a la célula, se rescatan de los glicanos degradados o se crean enzimáticamente a partir de otros azúcares dentro de la célula. La activación y las interconversiones de monosacáridos se producen principalmente en el citoplasma, que luego son transportados a los compartimientos requeridos por transportadores específicos.

La mayoría de las glicosiltransferasas muestran un alto grado de especificidad tanto para sus sustratos donantes como aceptores, como es el caso de la formación del grupo sanguíneo humano B, donde una  $\alpha$ 1-3 galactosiltransferasa agrega galactosa en un enlace  $\alpha$  al grupo hidroxilo C-3 de un residuo de galactosa en el sustrato aceptor. La enzima sólo actúa sobre la galactosa modificada por fucosa en el enlace  $\alpha$ 1-2, por lo que la modificación previa por otros monosacáridos, como por ácido siálico unido en  $\alpha$ 2-6, produce un glicano que no es un sustrato para dicha enzima<sup>42</sup>. Sin embargo, para otras actividades se encuentra reportada la redundancia enzimática, casos en los que más de una glicosiltransferasa puede usar el mismo aceptor para catalizar el mismo enlace, por ejemplo las fucosiltransferasas humanas 3-7 y 9-11, todas unen fucosa en un enlace  $\alpha$ 1-3 a restos N-acetilglucosamina<sup>43</sup>. En la **tabla suplementaria 3** del Anexo se lista la nomenclatura utilizada para las principales glicosiltransferasas. Por otro lado, las glicosidasas catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos y están involucradas en etapas de síntesis de N-glicanos (RE y Golgi), en la degradación de carbohidratos en lisosomas, citoplasma y núcleo (glicoproteínas O-GlcNAc), así como también en la biosíntesis y degradación de polímeros como el glucógeno<sup>44</sup>.

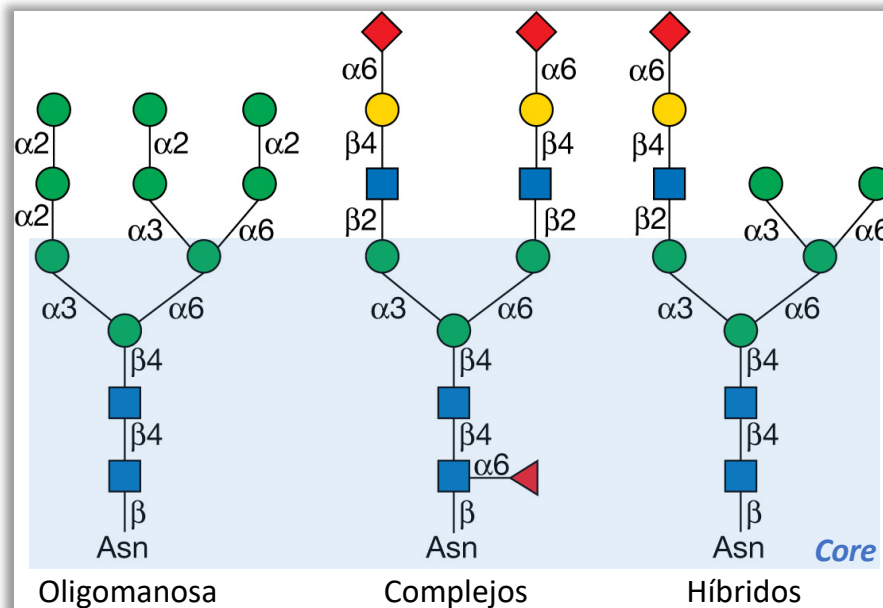
## -Introducción General-

Además de estas actividades enzimáticas, la estructura de los glicanos puede ser complejizada aún más por la acción de otras enzimas como las sulfotransferasas, fosfotransferasas, O-acetil-transferasas, O-metiltransferasas, piruviltransferasas y fosfoetanolaminas transferasas.

Finalmente, sumado a la diversidad de glicoconjugados y la complejidad de su síntesis, la glicosilación es un proceso sensible a las señales del entorno celular, de manera que, pequeñas variaciones en las señales ambientales pueden causar cambios dramáticos en la expresión de glicanos, variaciones dinámicas que ocurren en el curso del desarrollo, la diferenciación, cambios metabólicos, el envejecimiento, la inflamación, la infección o la malignidad.

## N-glicosilación

Todos los N-glicanos eucariotas comparten una secuencia central común o *core*, constituida por cinco monosacáridos,  $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1,4\text{-GlcNAc}\beta 1,4\text{-GlcNAc}\beta 1\text{-Asn}$ . Los N-glicanos pueden estar extendidos por diferentes estructuras a partir de este *core*, por lo que se clasifican en tres tipos: (1) oligomanosa (o alta manosa), en la que sólo residuos de manosa extienden el *core*; (2) complejos, en los que dicha extensión presenta "antenas" formadas por GlcNAcs; y (3) híbridos, en los que la manosa extiende el brazo  $\text{Man}\alpha 1-6$  del *core* y una o dos GlcNAcs extienden el brazo  $\text{Man}\alpha 1-3$ . En la **figura 2** se esquematizan estas estructuras<sup>45</sup>.



**Figura 2 | Tipos de N-glicanos.** Representación esquemática de los diferentes tipos de N-glicanos que surgen como extensión del *core* Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-6) Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-Asn-X-Ser / Thr. Modificado de “*Essentials of Glycobiology*”, tercera edición.

La síntesis de N-glicanos comienza con un precursor lipídico sobre el que se ensambla de forma secuencial una estructura oligosacárida conservada que constituye el glicano que se transfiere en primer lugar al sitio de glicosilación. En la **figura 3** se esquematiza la síntesis de los N-glicanos, dividida en cuatro etapas, que se describen a continuación:

(1) Formación del precursor lipídico y montaje del glicano al polipéptido. En la formación del precursor interviene un poli-isoprenoide (lípidico), denominado dolicol-fosfato (Dol-P) en eucariotas. La síntesis comienza con la transferencia, catalizada por GlcNAc fosfotransferasa (GPT), de N-acetilglucosamina 1-Fosfato (GlcNAc-1-P) a una molécula de Dol-P para generar Dol-P-P-GlcNAc, reacción que ocurre en la cara citoplasmática de la membrana del RE. Luego el Dol-P-P-GlcNAc se extiende a una estructura mayor (Dol-P-P-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub>) y es volteado hacia el lado luminal del RE (“*flip*”). Una vez en la luz del RE, esta estructura es elongada hasta formar el precursor glicolipídico que contiene un oligosacárido de 14 azúcares (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>). Posteriormente este oligosacárido se transfiere a la cadena lateral de Asn dentro de la secuencia de aminoácidos Asn-X-Ser/Thr por la enzima oligosacariltransferasa (OST)<sup>46</sup>.

(2) Procesamiento temprano. El complejo carbohidrato-proteína naciente se somete a un procesamiento adicional en el RE, que implica la eliminación secuencial de residuos de glucosa por dos  $\alpha$ -glucosidasas ( $\alpha$ -Glc I – II), y un residuo de manosa inicial que se elimina por una  $\alpha$ -manosidasa ( $\alpha$ -Man RE). Estos pasos iniciales tienen funciones clave en la regulación del plegamiento de glicoproteínas a través de interacciones con chaperonas que reconocen características específicas del N-glicano recortado. Después de un control de calidad, la glicoproteína es transportada al aparato de Golgi (cis-Golgi) para recorte adicional por  $\alpha$ -manosidasas I y II ( $\alpha$ -Man I – II) y otras modificaciones, previo a su transporte hacia el medial-Golgi para su maduración.

(3) Procesamiento tardío. Existe una distribución diferencial de glicosidasas y transferasas entre las cisternas del Golgi. Entre ellas, las GlcNAc-transferasa I-IV (GnT I–IV),  $\beta$ 1,4 galactosiltransferasas (GalT),  $\alpha$ 2,3 sialiltransferasas (ST3Gal),  $\alpha$ 2,6 sialiltransferasas (ST6Gal), fucosiltransferasas (FucT) catalizan el procesamiento adicional para crear una gran cantidad de glicofomas<sup>47</sup>.

La biosíntesis de N-glicanos híbridos y complejos se inicia en el medial-Golgi por la acción de una N-acetilglucosaminiltransferasa GnT-I (codificada por el gen MGAT1) que agrega un residuo GlcNAc a la  $\alpha$ 1-3Man en la estructura  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ . Posteriormente, la mayoría de los N-glicanos se recortan mediante las enzimas  $\alpha$ -manosidasa II (MAN2A1 o MAN2A2) en el medial-Golgi, eliminando los residuos terminales  $\alpha$ 1-3Man y  $\alpha$ 1-6Man. Una vez que se eliminan ambos residuos, se agrega una segunda GlcNAc a la  $\alpha$ 1-6Man en el *core* por la acción de GnT-II (MGAT2), dando lugar al precursor de todos los N-glicanos complejos bi-antenarios. Pueden ocurrir ramificaciones adicionales por acción de otras N-acetilglucosaminiltransferasas, como GnT-IV (MGAT4A, MGAT4B) en la  $\alpha$ 1-3Man y GnT-V (MGAT5) en la  $\alpha$ 1-6Man del *core*, para producir N-glicanos tri- y tetra-antenarios. GnT-III (MGAT3) cataliza la producción de N-glicanos complejos bisectados. Por otro lado, los híbridos se forman si la  $\alpha$ -manosidasa II no actúa sobre el glicano producido por GnT-I.

## *-Introducción General-*

(4) *Maduración*. Las modificaciones adicionales de los N-glicanos complejos e híbridos maduros incluyen adiciones de carbohidratos al *core*, alargamiento de las ramificaciones formadas por adición de GlcNAc, y reacciones "*capping*" o terminación que modifican estas ramas alargadas.

La modificación principal del *core* en los N-glicanos de vertebrados es la adición de  $\alpha$ 1-6 Fuc a la GlcNAc unida a la Asn de la proteína (denominada fucosa del *core*). Esta reacción es catalizada por la  $\alpha$ 1-6 fucosiltransferasa (FucT8, gen FUT8), que requiere la acción previa de GnT-I.

La mayoría de los N-glicanos complejos e híbridos tienen ramificaciones extendidas que se construyen mediante la adición de galactosa a la GlcNAc que inicia la ramificación para producir el bloque de construcción Gal $\beta$ 1-4GlcNAc, denominado LacNAc. La adición secuencial de disacáridos de LacNAc da repeticiones en tándem denominadas poli-LacNAc. Estas extensiones se producen preferentemente en los multi-antenarios, particularmente en ramificaciones  $\beta$ 1-6GlcNAc sintetizadas por la GnT-V (MGAT5). Las reacciones de terminación que dan como resultado los glicanos maduros pueden incluir la acción de glicosiltransferasas que transfieren azúcares a una galactosa terminal o GlcNAc subterminal, generando estructuras sialiladas, fucosiladas o sulfatadas<sup>48</sup>. Las cadenas de poli-LacNAc pueden servir como andamios lineales y extendidos para la presentación de glicanos terminales específicos, como los glicanos de la familia Lewis. Las cadenas de poli-LacNAc también se reconocen con alta afinidad por las galectinas que reconocen tanto las ramificaciones internas como las terminales<sup>49-51</sup>.

### *Inhibición de la síntesis de N-glicanos*

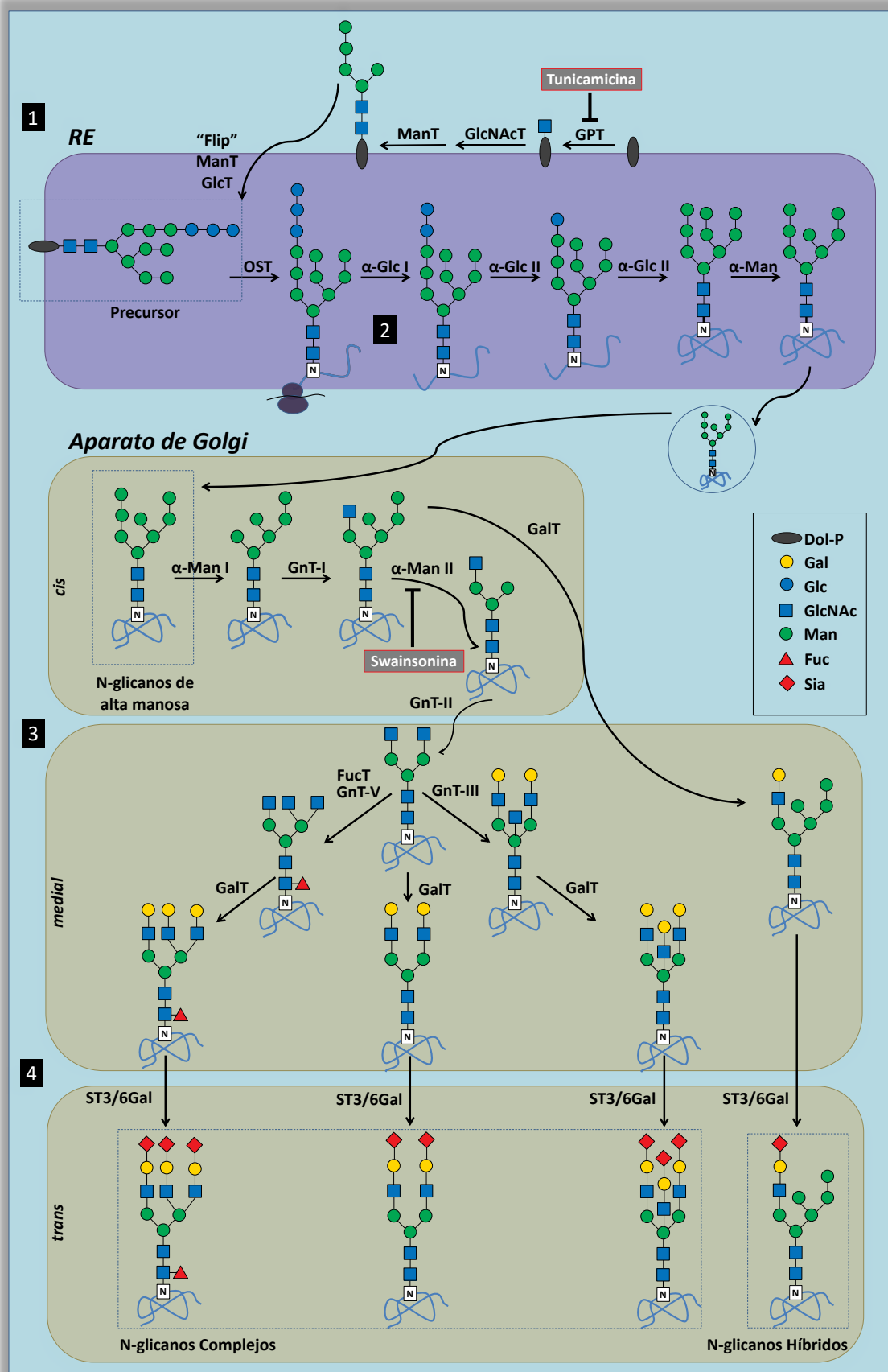
El uso de herramientas químicas para inhibir la glicosilación proporciona un enfoque poderoso para estudiar las funciones de los glicanos. La tunicamicina (TNM) y la swainsonina (SW), son algunos de los inhibidores de la síntesis de N-glicanos, cuya acción se ilustra en la vía de síntesis de la **figura 3**.

TNM bloquea el primer paso de la vía de síntesis de N-glicanos, la transferencia de GlcNAc-1-P de UDP-GlcNAc a Dol-P para generar Dol-P-P-GlcNAc. La misma fue identificada por primera vez en *Streptomyces lysosuperificus*. TNM es un antibiótico

### *-Introducción General-*

homólogo de nucleósido que inhibe la familia de enzimas UDP-HexNAc: poliprenol-P HexNAc-1-P, en la que se incluye la GlcNAc fosfotransferasa (GPT). Debido a la función de los N-glicanos en el correcto plegamiento de las proteínas, este inhibidor puede causar estrés del RE por acumulación de proteínas mal plegadas<sup>52</sup>.

Por otro lado, SW es un alcaloide que se descubrió por primera vez en plantas de especies *Swainsonacanesens*. Al inhibir la  $\alpha$ -manosidasa II, la swainsonina causa la acumulación de oligosacáridos  $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  y cadenas de tipo híbrido, disminuyendo los oligosacáridos complejos<sup>53</sup>.



**Figura 3 | Síntesis N-glicanos.** (1) Síntesis del precursor lipídico. (2) Procesamiento temprano. (3) Procesamiento tardío. (4) Maduración. Se señalan dos puntos de inhibición enzimática mediados por tunicamicina y swainsonina. Adaptado de Reily, C. et al. *Nature Reviews Nephrology* (2019).

## O-glicosilación

Dentro del grupo de los O-glicanos, en este apartado se hará hincapié en los de tipo O-GalNAc. Los glicanos unidos a GalNAc, también llamados O-glicanos de tipo mucina, son abundantes en muchas glicoproteínas extracelulares y secretadas, incluyendo las mucinas que forman una interfaz crucial entre las células epiteliales y las superficies externas de las mucosas del cuerpo<sup>54</sup>.

La síntesis de este grupo de glicanos comienza con la transferencia de un residuo de GalNAc a Ser/Thr, dando lugar al O-glicano más simple llamado antígeno Tn, cuya presencia no es común en mucinas normales. Esta reacción es catalizada por una enzima denominada polipéptido-N-acetil-galactosaminiltransferasa (GalNAcT, codificada por GALNT) que actúa después de que la proteína se haya plegado correctamente y transportada al Golgi. Los humanos tienen 20 genes que codifican para estas enzimas. Todas unen UDP-GalNAc como sustrato donante, pero pueden diferir en las especificidades de los péptidos receptores<sup>55</sup>.

A diferencia de la N-glicosilación, no se reconoce un motivo de secuencia específico de este tipo de glicosilación, pero se ha observado cierta especificidad de isoforma. En general, se transfiere GalNAc a las cadenas laterales de residuos de Ser/Thr que se encuentran en regiones relativamente no estructuradas de la proteína plegada. Aunque no se conozca una secuencia, ciertos aminoácidos son preferidos. Los residuos de Pro cerca del sitio de adición de GalNAc suelen ser favorables para la O-glicosilación, mientras que los aminoácidos cargados pueden interferir con la actividad GalNAcT. Es posible que el papel de la Pro sea exponer los residuos de Ser/Thr en una conformación de giro  $\beta$ , lo que lleva a una O-glicosilación más eficiente<sup>56,57</sup>.

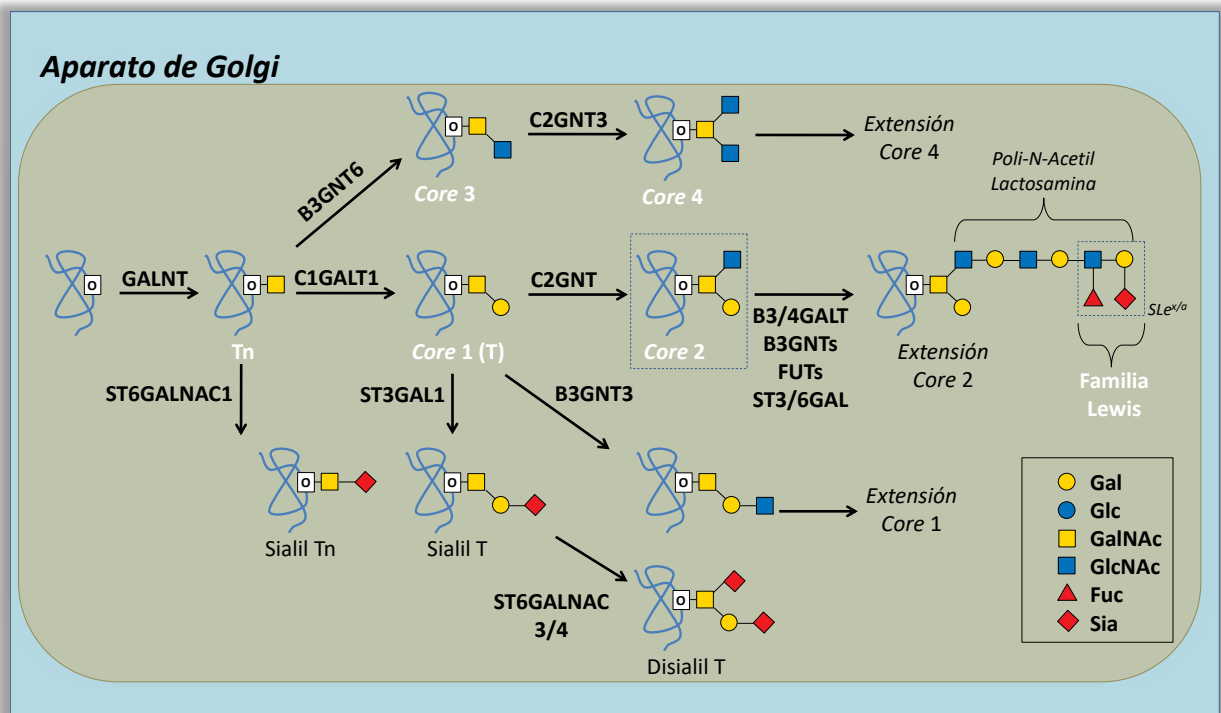
La GalNAc unida a la Ser o Thr generalmente se extiende para formar una de las ocho estructuras centrales comunes (cada una denominada *core*). Cada *core* luego puede extenderse para dar un glicano O-GalNAc maduro, lineal o ramificado. La disposición dentro del Golgi es similar a una "línea de ensamblaje" con reacciones tempranas en el cis y reacciones tardías en el trans-Golgi, aunque muchas de las enzimas se distribuyen de manera difusa en los compartimentos. En la **figura 4** se representa esquemáticamente la síntesis de los cuatro principales *cores* estructurales<sup>58,59</sup>.

## *-Introducción General-*

El *core 1* se forma mediante la transferencia de una galactosa al antígeno Tn, para dar lugar al antígeno Thomsen-Friedenreich (TF o T, Gal $\beta$ 1-3GalNAc). Esta reacción es catalizada por una  $\beta$ 1-3 GalT denominada T sintasa o C1GalT1. Tanto el antígeno Tn como el T pueden modificarse mediante ácido siálico para formar Sialil Tn o Sialil T (STn o ST), por la acción de las enzimas ST6GalNAc1 y ST3Gal1, respectivamente.

Los glicanos del *core 2* O-GalNAc son estructuras ramificadas del *core 1*, y su expresión está altamente regulada durante la activación de linfocitos, la estimulación de citoquinas y el desarrollo embrionario. Si bien se expresan en muchos tejidos, como la mucosa intestinal, se han reportado cantidades exacerbadas de estas estructuras en situaciones patológicas como el cáncer. La enzima responsable de la síntesis los glicanos del *core 2* en glicanos del tipo O-GalNAc es la  $\beta$ 1-6 N-acetilglucosaminiltransferasa o C2GnT (gen C2GNT)<sup>60</sup>. Al menos tres genes codifican esta subfamilia de enzimas, denominados C2GNT1, C2GNT2 y C2GNT3. C2GnT1 sintetiza sólo la estructura del *core 2*, mientras que C2GnT2 y C2GnT3 participan en la síntesis del *cores 2* y 4. C2GnT2 participa también en la síntesis de otras ramificaciones GlcNAc $\beta$ 1-6. C2GnT1 se encuentra ampliamente expresada, C2GnT2 se expresa principalmente en los órganos secretores de mucosa y C2GnT3 exhibe un patrón de expresión restringido en órganos humanos normales con alta expresión en el timo.

Al igual que los N-glicanos, los núcleos estructurales pueden extenderse para formar estructuras de poli-LacNAc, terminados por la unión de azúcares adicionales o grupos funcionales. Las extensiones de poli-LacNAc en los glicanos O-GalNAc ocurren preferentemente en la  $\beta$ 1-6GlcNAc transferida por la C2GnT1. Las terminales de los glicanos O-GalNAc pueden contener fucosa y ácido siálico en enlaces  $\alpha$ , galactosa, GalNAc y GlcNAc en enlaces  $\alpha$  y  $\beta$ , y sulfatos. Los glicanos O-GalNAc pueden incluir los determinantes del grupo sanguíneo ABO y los Lewis, ácido polisiálico, glicanos lineales y ramificados<sup>61</sup>.



**Figura 4 | Síntesis de glicanos O-GalNAc.** Representación de la síntesis de glicanos de la familia O-GalNAc y formación de los diferentes *cores* estructurales. Las enzimas se mencionan con el nombre del gen codificante. Se representa la extensión de los *core 2* O-GalNAc con la terminación del grupo SLe<sup>x</sup>. Modificado de Ho et al. *Journal of Hematology and Oncology* (2016).

## Proteínas de unión a glicanos

Las proteínas que reconocen glicanos se encuentran en todos los organismos vivos y se dividen en dos grupos generales: lectinas y proteínas de unión a GAGs. Particularmente, las lectinas se clasifican en familias relacionadas evolutivamente según sus dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD, del inglés *carbohydrate-recognition domains*) basado en similitudes estructurales primarias y/o tridimensionales. Los CRDs pueden existir como proteínas independientes o como dominios dentro de proteínas multidominio más grandes. Por lo general, reconocen grupos terminales en glicanos.

Las lectinas fueron descritas originalmente en plantas, por sus capacidades de aglutinar glóbulos rojos animales. Sus actividades específicas de unión a glicano hacen que las lectinas de las plantas sean herramientas científicas extremadamente útiles para estudiar el estado de glicosilación de una célula. En la **figura suplementaria 1** del Anexo

## -Introducción General-

se listan las lectinas más relevantes para este trabajo, junto a las estructuras principales que reconocen.

Otros ejemplos que participan activamente en la biología celular, tanto en escenarios fisiológicos como patológicos, incluyen representantes de las familias de las galectinas y las selectinas. Las galectinas son una familia de proteínas solubles que se unen a los glicanos que contienen  $\beta$ -galactósidos y están implicadas en diversos eventos como la regulación del sistema inmune y en la modulación de procesos de la biología del cáncer, como la apoptosis, la agregación celular homotípica, la angiogénesis, la migración celular y el escape inmune del tumor. Las selectinas son una familia de moléculas de adhesión celular que median las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales, también células cancerosas y plaquetas, facilitando la invasión y metástasis de las células tumorales<sup>62</sup>.

Existen tres miembros descritos en esta última familia, denominadas P-, E- y L-selectina. La P-selectina se expresa constitutivamente en megacariocitos, donde se almacena en las membranas de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas circulantes. También se encuentra en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales vasculares. La P-selectina se expresa inmediatamente en la superficie celular, luego de la activación de las plaquetas o de las células endoteliales por moléculas como histamina, trombina o componentes del complemento. La L-selectina se expresa constitutivamente en las microvellosidades de la mayoría de los leucocitos, incluidas todas las células mieloides, células T y B vírgenes, y algunas células T de memoria y efectoras. La E-selectina no se expresa constitutivamente en las células endoteliales de la mayoría de los tejidos (médula ósea y piel son excepciones). Los procesos de transcripción dependientes de citoquinas proinflamatorias conducen a una expresión inducible de E-selectina en la superficie del endotelio<sup>63</sup>.

Las selectinas son moléculas de adhesión mediadoras de las primeras etapas del tráfico de leucocitos, migración constitutiva de linfocitos a los ganglios linfáticos periféricos y a la piel; y tráfico de células madre hematopoyéticas a la médula<sup>64,65</sup>. Las interacciones entre las selectinas y los ligandos glicoconjugados de la superficie celular promueven el anclaje y el *rolling* de los leucocitos y las plaquetas en las vénulas postcapilares, y son importantes para el reclutamiento de leucocitos en sitios de inflamación y lesión.

### *-Introducción General-*

El CRD de cada selectina interactúa débilmente con pequeños oligosacáridos sialilados, fucosilados, como sialil Lewis X o sialil Lewis A, y se unen con mayor afinidad a estos glicanos en el contexto de un glicoconjugado<sup>66</sup>. Una característica única de los ligandos de L-selectina es el requerimiento de glicanos sulfatados, tales como 6-sulfo-SLe<sup>x</sup>. Aunque hay varias proteínas glicosiladas que son capaces de unirse a un tipo particular de selectina, sólo una proteína ha surgido como el ligando mejor caracterizado para las tres, denominada PSGL-1 (del inglés *P-Selectin Glycoprotein ligand 1*)<sup>67</sup>. Esta glicoproteína demostró ser el principal contrarreceptor para las tres selectinas que unen las plaquetas, los leucocitos y las células endoteliales. PSGL-1 tiene residuos de tirosina sulfatados adyacentes a SLe<sup>x</sup> expresados en glicanos O-GalNAc del *core 2*. Además, es una molécula expresada constitutivamente en la superficie de la mayoría de los leucocitos (incluidos neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y subconjuntos de células T), y también en células madre hematopoyéticas<sup>68,69</sup>.

## Glicosilación y Cáncer

---

### Glicosilación aberrante

El perfil de glicosilación anormal que sucede como parte del fenómeno de transformación maligna es conocido como glicosilación aberrante. Esta modificación del glicoma celular es un factor clave para la selección positiva de las células transformadas, confiriendo ventajas adaptativas frente a las células normales. La glicosilación aberrante participa en la interacción con el sistema inmune, la angiogénesis y los múltiples pasos de progresión tumoral, como el crecimiento y la proliferación celular, la migración, la invasión y la metástasis<sup>70,71</sup>.

Dentro de las primeras evidencias de cambios en el perfil de glicosilación en cáncer se describen estudios con lectinas de plantas. Estudios que comparaban sueros de pacientes oncológicos e individuos sanos mostraron que aquellos provenientes de los pacientes presentaban una mayor unión y aglutinación de glicoproteínas mediada por lectinas<sup>72</sup>. Otra de las primeras evidencias proviene de ensayos *in vitro* con fibroblastos de ratón transformados con virus. La comparación de componentes de membrana entre células transformadas y normales demostró que la transformación va acompañada de un aumento en el tamaño de los glicopéptidos como resultado del incremento de glucosaminas<sup>73</sup>. Con el advenimiento de los anticuerpos monoclonales, se encontraron muchos anticuerpos específicos de tumor dirigidos contra epítopes de glicanos, especialmente contra glicolípidos. Luego de ser caracterizados, muchos de estos epítopes representaron "antígenos onco-fetales", es decir, epítopes de glicanos expresados en células tumorales y tejidos embrionarios<sup>74-76</sup>.

El hallazgo de una correlación entre ciertos tipos de glicosilación alterada y el pronóstico de evolución de la enfermedad en ciertas indicaciones oncológicas, tanto en modelos animales como en pacientes, aumentó el interés en el campo de la glicosilación aberrante del cáncer<sup>77</sup>. Actualmente, se considera que los cambios en la glicosilación son críticos para varios aspectos del comportamiento de las células tumorales.

Los cambios en los patrones de glicosilación no ocurren al azar. Dado que el cáncer es considerado un proceso microevolutivo en el cual hay expansiones clonales en múltiples etapas, se entiende que estos cambios específicos en la expresión de

## *-Introducción General-*

glicanos prevalecen durante la progresión del tumor reflejando la selección de clones que presentan ventajas adaptativas. Esto explicaría por qué sólo un subconjunto muy limitado de cambios se correlaciona con frecuencia con la transformación maligna y la progresión tumoral. Los cambios más comunes en la glicosilación de las células tumorales derivan en pérdida o expresión excesiva de ciertos glicanos, aumento de la expresión de glicanos incompletos o truncados, modificaciones en sus ramificaciones y, con menos frecuencia, la aparición de nuevas estructuras<sup>71</sup>.

La maquinaria encargada de la síntesis de los glicanos de la célula se modifica durante la transformación maligna. Se observa una modificación en la actividad de las glicosiltransferasas, en buena medida a través de modificaciones en su expresión (por múltiples motivos como desregulación transcripcional y de la función de chaperonas), como así en su localización espacial. Se describen además cambios en la expresión de glicosidasas, alteraciones en la molécula que se conjuga al glicano (como ser cambios en la conformación terciaria de proteínas), así como disponibilidad y abundancia de donantes de nucleótidos azúcar y cofactores<sup>78</sup>.

Las alteraciones en el proceso de glicosilación en cáncer que ocurren con mayor frecuencia están asociadas a los procesos de sialilación, fucosilación, aparición de glicanos de la familia Lewis, síntesis truncada de glicanos O-GalNAc y alteraciones en ramificaciones tanto en N- como en O-glicanos. A continuación, se describirán algunas de las glicosilaciones aberrantes más destacadas y sus implicancias en cáncer.

### **Glicanos de la familia Lewis**

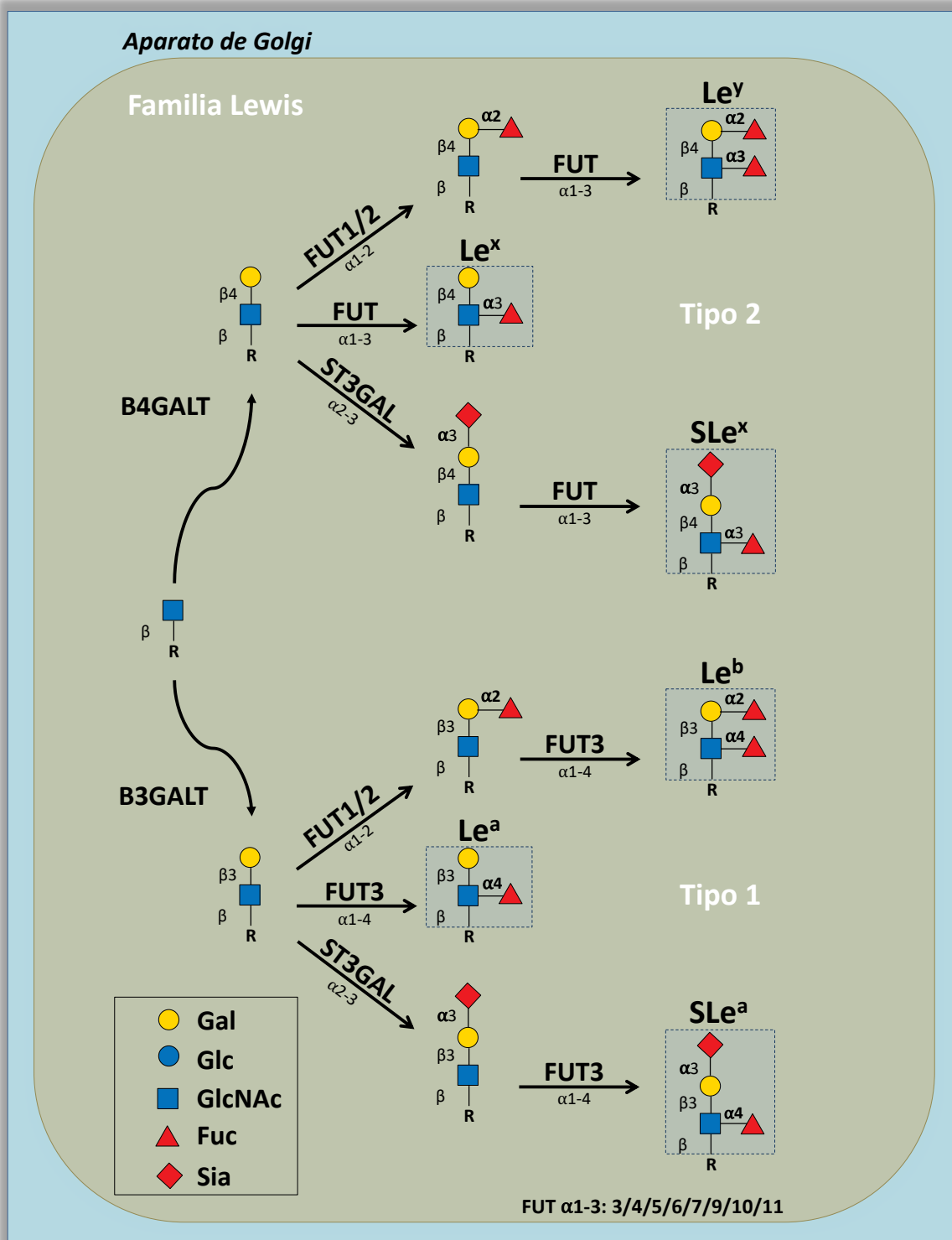
Los glicanos de la familia Lewis (Le) pueden encontrarse en los diferentes glicoconjugados, como terminales de estructuras de extensión y también en estructuras cortas. Son un conjunto relacionado de glicanos que contienen residuos de Fuc  $\alpha$ 1-3/ $\alpha$ 1-4. Las mismas tres unidades de monosacáridos están presentes en todos ellos, GlcNAc, Gal y Fuc, que difieren sólo en sus enlaces glicosídicos correspondientes. La adición de ácidos siálicos a estos epítopes puede dar lugar a estructuras de glicanos más complejas, como sialil Lewis a (SLe<sup>a</sup>) y sialil Lewis x (SLe<sup>x</sup>). Los Lewis se expresan moderadamente en tejidos adultos sanos, como el epitelio de la mucosa del sistema digestivo, el cerebro y ciertos subconjuntos de células inmunes. Sin embargo, la sobreexpresión de estos

### *-Introducción General-*

antígenos, junto con las glicosiltransferasas respectivas, se han reportado en muchos tipos diferentes de cáncer.

Los Lewis se dividen en dos grupos denominados de tipo 1 y de tipo 2, su biosíntesis se representa en la **figura 5**. Los de tipo 1 son los glicanos Le<sup>b</sup>, Le<sup>a</sup> y SLe<sup>a</sup>, sintetizados por  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasas (B3GalT),  $\alpha$ 1-2/ $\alpha$ 1-4 fucosiltransferasas (FucT) y, para el caso de SLe<sup>a</sup>,  $\alpha$ 2-3 sialiltransferasas (ST3Gal). Los glicanos de tipo 2 son Le<sup>y</sup>, Le<sup>x</sup> y SLe<sup>x</sup>, sintetizados por  $\beta$ 1,4-galactosiltransferasas (B4GalT),  $\alpha$ 1-2/ $\alpha$ 1-3 fucosiltransferasas y, para el caso de SLe<sup>x</sup>,  $\alpha$ 2-3 sialiltransferasas<sup>78</sup>.

En relación con las actividades enzimáticas, FucT1 y FucT2 (genes FUT1 y FUT2) son fucosiltransferasas  $\alpha$ 1-2, mientras que las FucT 3-7 y las FucT 9-11 son fucosiltransferasas  $\alpha$ 1-3 (genes FUT3/4/5/6/7/9/10/11). Llamativamente, sólo la enzima FucT3 exhibe una actividad combinada de fucosiltransferasa  $\alpha$ 1-3 y  $\alpha$ 1-4<sup>79,80</sup>. De las seis ST3Gal descritas hasta la fecha, ST3Gal4, ST3Gal6 y, en menor grado, ST3Gal3, se encuentran reportadas en la síntesis de los glicanos de esta familia (genes ST3GAL3/4/6)<sup>80</sup>. En cuanto a las galactosiltransferasas, siete B4GalT (B4GalT1-7) y cuatro B3GalT (B3GalT1, 2, 4 y 5) han sido reportadas en humanos<sup>79,81-84</sup>.



**Figura 5 | Síntesis de los glicanos de la familia Lewis.** Representación de la síntesis de glicanos de la familia Lewis de tipo 1 y tipo 2. Las enzimas se mencionan con el nombre del gen codificante. Modificado de Pinho, S. et al. *Nature Reviews Cancer* (2015)<sup>80</sup>.

La contribución real de las diferentes glicosiltransferasas en la biosíntesis de los glicanos de la familia Lewis no se encuentra en la actualidad certeramente establecida.

### -Introducción General-

Esto se debe a que su regulación transcripcional depende de factores específicos del tejido, ambientales y patológicos, así como de otras variables como la localización enzimática, la competencia por el sustrato y su disponibilidad.

La presencia de estos glicanos en diferentes tumores está asociada principalmente a sobreexpresión o síntesis *de novo*, aunque también han sido reportados, algunos de ellos, como producto de síntesis incompleta<sup>85</sup>. Las causas principales se asocian a modificaciones en la expresión y/o regulación de los diferentes agentes involucrados en su síntesis, principalmente a los eventos de fucosilación y sialilación. En tejidos tumorales, los glicanos de esta familia modulan la adhesión, las interacciones célula-matriz, la señalización celular, el metabolismo, la angiogénesis y el sistema inmune, actuando como partícipes en los fenómenos de progresión tumoral y diseminación metastásica.

### *Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup>*

$Le^x$  es también conocido como SSEA-1, del inglés *Stage-Specific Embryonic Antigen-1*. Su expresión comienza gradualmente durante la diferenciación celular en el conducto y túbulo nefrítico, el saco vitelino y en la superficie de las células ectodérmicas embrionarias de la epidermis, donde tiene un papel vital en los procesos de reconocimiento y adhesión célula-célula<sup>86</sup>.  $Le^x$  es el antígeno fucosilado predominante en el cerebro y facilita las interacciones célula-célula involucradas en el desarrollo neuronal, siendo FucT9 la enzima responsable de su síntesis en el sistema nervioso<sup>87</sup>. En los tejidos epiteliales, la expresión de  $Le^x$  se encuentra principalmente en el estómago, el colon, las glándulas salivales, los riñones, la vejiga, el epidídimo, el útero, el cuello uterino y la médula<sup>88</sup>.

La sobreexpresión de  $Le^x$  se ha reportado en diferentes tipos de cáncer de pulmón, donde se asocia con una menor supervivencia de los pacientes<sup>89</sup>. Su expresión es un factor pronóstico independiente para la supervivencia de pacientes jóvenes (menores a 50 años) con cáncer de mama triple negativo (estadios I, II y III) y se correlaciona con una pobre supervivencia total y libre de recurrencia<sup>90</sup>. Además, se ha reportado una asociación entre su expresión y el frente invasivo del tumor, señalando un posible papel de este antígeno en la metástasis del cáncer de mama<sup>91</sup>. En cáncer colorrectal, su

## *-Introducción General-*

expresión aumenta en la superficie de las células inflamatorias infiltrantes y las células cancerosas durante la progresión de la enfermedad<sup>92</sup>. Aunque Le<sup>x</sup> no se expresa en el páncreas normal, su sobreexpresión se ha identificado en el 50-70% de los tejidos de pacientes con cáncer de páncreas<sup>93</sup>. En glioblastoma, se ha propuesto como marcador de selección de células madre<sup>94</sup>. La sobreexpresión de este glicano se ha reportado en otros tipos de cáncer como carcinoma hepatocelular, de vejiga, renal y tumores no sólidos como leucemia mieloide, también asociado con malignidad<sup>95-97</sup>.

La expresión de Le<sup>y</sup> se encuentra principalmente en tejido embrionario, y en adultos se ha detectado en células epiteliales de mama, pulmón, próstata, colon, estómago, páncreas, útero, ovario, glándulas salivales y en las células de Panneth del intestino delgado. Se sobreexpresa en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas y se considera un marcador valioso de diferenciación<sup>98</sup>. Además, su sobreexpresión, en pacientes con cáncer de mama con ganglios linfáticos negativos, se asocia con un pronóstico desfavorable y una disminución sustancial de la supervivencia<sup>99</sup>. Se detecta en el 40-50% del total de casos con malignidad gástrica o colorrectal, y su sobreexpresión se correlaciona con un aumento en la estratificación del tumor, especialmente en el estadio IV<sup>100</sup>. En cáncer de próstata, se ha detectado alta expresión en adenocarcinomas localizados y metastásicos<sup>101</sup>. En general, la alta expresión de Le<sup>y</sup> se correlaciona con un estado de diferenciación pobre y alto potencial metastásico. Además, se ha descrito una estrecha correlación entre la expresión de este glicano en hepatocarcinoma y el grado de dediferenciación, así como con el aumento del potencial proliferativo y metastásico<sup>102</sup>.

Le<sup>b</sup> se expresa en todo el colon durante la vida fetal, pero después del nacimiento desaparece gradualmente en el colon distal, existiendo una expresión limitada en el colon proximal en adultos. Le<sup>a</sup> exhibe una distribución a lo largo del colon, incluso después del nacimiento<sup>103</sup>. Formas solubles de ambos antígenos se liberan en secreciones y fluidos corporales, donde pueden ser capturados y expresados por eritrocitos<sup>104</sup>.

La reaparición del antígeno Le<sup>b</sup> se utiliza como marcador tumoral para distinguir los tumores malignos de los benignos, lo cual también puede aplicarse al cáncer de colon distal. El pronóstico de pacientes con carcinomas de pulmón y colon se correlaciona negativamente con una mayor expresión de Le<sup>b</sup><sup>105</sup>. Por su lado, Le<sup>a</sup> se sobreexpresa en

## -Introducción General-

adenocarcinoma pulmonar, encontrando una mayor presencia en los cánceres en estadio avanzado. La supervivencia a 5 años de estos pacientes con expresión de Le<sup>a</sup> es menor que para aquellos en los que está ausente<sup>106</sup>. Le<sup>a</sup> también ha sido detectado sobreexpresado en tumores gástricos y pancreáticos<sup>86,107</sup>.

Si bien se ha estudiado la expresión de los diferentes glicanos en cáncer, poco se sabe sobre sus implicancias funcionales. Existen algunos reportes que vinculan a estos Lewis con algunas características de las células tumorales como su papel en la cascada metastásica, inducción de angiogénesis o inmunosupresión. Por ejemplo, Le<sup>x</sup> expresado por células de cáncer de pulmón de células no pequeñas interactúa con E-selectina inducida por TNF $\alpha$  en las células endoteliales del cerebro, facilitando la adhesión entre estos dos tipos de células y promoviendo metástasis en el sistema nervioso central, de manera similar que SLe<sup>x</sup><sup>108</sup>. ICAM-3, es un receptor tipo lectina expresado en humanos en la superficie de las células presentadoras de antígeno, como células dendríticas inmaduras y macrófagos. Esta lectina reconoce específicamente todos los antígenos de Lewis no sialilados (Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Le<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup>), y sus funciones principales están relacionadas con la adhesión celular, la migración celular, la captación de antígeno y la posterior presentación de antígeno<sup>88,109</sup>

### SLe<sup>x</sup> y SLe<sup>a</sup>

Dentro de los principales antígenos sialilados asociados al cáncer se encuentran los glicanos SLe<sup>x</sup> y SLe<sup>a</sup>. Ambos glicanos han sido identificados como esenciales para la unión de los leucocitos al endotelio vascular, por el reconocimiento de estas estructuras por medio de selectinas<sup>110</sup>. Su expresión correlaciona con un mal pronóstico en cáncer, asociado al fenotipo metastásico en diferentes tipos de neoplasias como el cáncer de colon, gástrico, próstata, renal, pancreático y de pulmón. Esta caracterización, proveniente principalmente de análisis histopatológicos, concluye que la expresión de SLe<sup>x/a</sup> correlaciona con grados de diferenciación en el tumor primario y metástasis. En carcinoma renal se sugiere a SLe<sup>x</sup> como indicador de pronóstico<sup>111-113</sup>. La expresión de SLe<sup>x/a</sup> en las células tumorales ha correlacionado con una mayor capacidad de adhesión a las células endoteliales activadas y a células del estroma *in vitro*<sup>114,115</sup>. En ensayos *in vivo* de metástasis experimental con células de carcinoma humano, los altos niveles SLe<sup>x</sup>

### *-Introducción General-*

en la superficie celular se vinculan con una mayor actividad metastásica<sup>116</sup>. En cáncer de mama, el aumento en la detección de SLe<sup>x</sup> en suero de pacientes se asoció con cáncer invasivo, por lo que tendría valor pronóstico en esta indicación<sup>117</sup>.

SLe<sup>a</sup> es el epítotope de glicoconjugados detectados por el análisis serológico CA19-9 y se lo considera un marcador asociado al cáncer, ampliamente utilizado en la práctica clínica. El ensayo CA19-9 se ha aplicado principalmente en pacientes con un establecido diagnóstico de cáncer pancreático, colorrectal, gástrico o biliar, y se utiliza para controlar la respuesta clínica a la terapia. Además, concentraciones preoperatorias elevadas están asociadas con pronóstico pobre en carcinoma de colon y gástrico<sup>118,119</sup>.

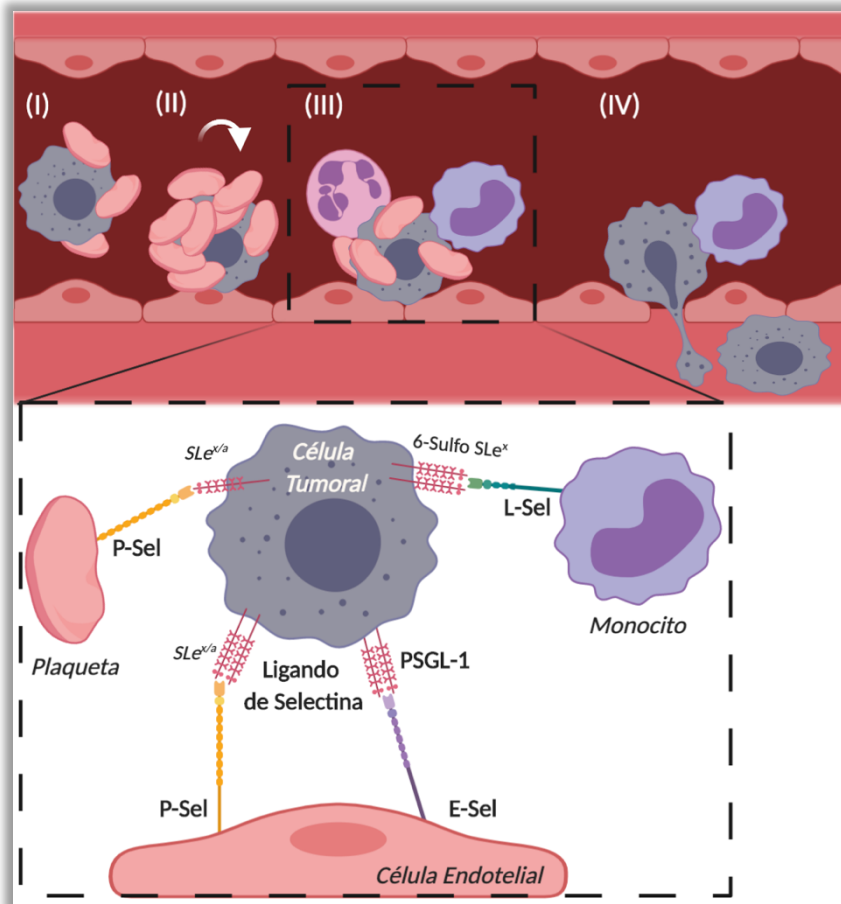
Estas estructuras han sido reportadas en algunos casos como productos de síntesis incompleta de glicanos que se encuentran en tejidos normales. La variante con un ácido siálico adicional unido a la posición C6 del penúltimo GlcNAc en SLe<sup>a</sup>, disialil-Le<sup>a</sup>, se expresa preferentemente en células epiteliales de colon no malignas, y su expresión disminuye significativamente en la transformación maligna. Se ha demostrado que la transcripción reducida de la sialiltransferasa responsable de la sialilación en esta posición disminuye significativamente en cáncer debido a una regulación epigenética<sup>120</sup>. En analogía, SLe<sup>x</sup> se utiliza como marcador tumoral, y su derivado 6-sulfatado, 6-sulfo-SLe<sup>x</sup>, se expresa preferentemente en células no transformadas<sup>121</sup>. En cáncer, se ha observado una reducción en la expresión de moléculas responsables de la sulfatación de SLe<sup>x</sup> como la 6-sulfotransferasa y el transportador de sulfato. Particularmente, se encontró una transcripción reducida del transportador de sulfato de la displasia diastrófica (DTDST) en pacientes con cáncer de colon, lo que asocia a un papel dominante en la reducción de 6-sulfo-SLe<sup>x</sup> y ganancia de SLe<sup>x</sup>. Además, se ha demostrado que el silenciamiento de DTDST en tumores se encuentra regulado epigenéticamente por la modificación de histonas<sup>122</sup>.

De todas maneras, la mayor expresión de SLe<sup>x</sup> y SLe<sup>a</sup> en células tumorales se ha atribuido mayoritariamente a niveles elevados de diferentes glicosiltransferasas. Por ejemplo, estudios sobre muestras de pacientes con cáncer de pulmón, por inmunohistoquímica y PCR, determinaron que la expresión de FUT7 correlaciona con la expresión de SLe<sup>x</sup> y con el aumento de la malignidad tumoral<sup>123</sup>. En células de cáncer de próstata metastásico, los altos niveles de SLe<sup>x</sup> y del número de metástasis se correlacionó con la sobreexpresión de los genes FUT3 y FUT6<sup>124</sup>. Por otro lado, en cáncer

### *-Introducción General-*

de mama, FUT3, FUT4 y ST3GAL6 se vieron significativamente aumentados y se correlacionaron con metástasis en hueso<sup>125</sup>.

La conexión entre la expresión de SLe<sup>x/a</sup> y el fenotipo metastásico se atribuye a la interacción de las selectinas con sus ligandos y a la funcionalidad de la interacción en el endotelio vascular<sup>126,127</sup>. En el proceso de metástasis, después de ingresar al torrente sanguíneo, las células tumorales circulan y se unen a plaquetas, leucocitos y células endoteliales. En la **figura 6** se resume esquemáticamente este proceso. Primero, se unen a plaquetas activadas a través de P-selectina. Las plaquetas apoyan su extravasación y las protegen del sistema inmune innato y del estrés mecánico mediante la formación de un micro-émbolo tumoral (I). Luego las células tumorales ruedan sobre las células endoteliales por interacciones mediadas por E- y P- selectina del endotelio activado (II), para finalmente detenerse en la microvasculatura de órganos distantes (III). Las células tumorales también interaccionan con leucocitos que pueden apoyar su adhesión a la pared de los vasos, esto ocurre por unión a L-selectina. El reclutamiento de neutrófilos y monocitos también se regula a través de interacciones mediadas por el endotelio. Finalmente, luego de detenerse y establecer una unión firme, las células tumorales extravasan hacia un nuevo nicho metastásico (IV)<sup>128</sup>. Diversos ligandos naturales de selectinas que se encuentran en estados no patológicos se han reportado expresados en células tumorales, por ejemplo, PSGL-1 en melanoma, próstata, colon y diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón<sup>129-133</sup>.



**Figura 6 | Representación esquemática de las interacciones mediadas por selectinas y sus ligandos durante la metástasis.** Las células tumorales circulan en el torrente sanguíneo donde se unen a plaquetas formando un microémbolo (I). Las células tumorales se unen y ruedan en el endotelio (II), luego son detenidas (III), forman uniones fuertes y finalmente migran desde la vasculatura (IV). La interacción con selectinas ocurre con ligandos expresados en las células tumorales. Adaptado de Kappelmayer & Nagy, B. *BioMed Research International* (2017).

## Alteraciones en ramificaciones y fucosilación de N-glicanos

Una aberración común de la glicosilación en neoplasias malignas constituye la sobreexpresión de N-glicanos complejos con ramificaciones de GlcNAc en enlace  $\beta$ -1,6 en la superficie celular. Esta modificación resulta de la sobreexpresión GnT-V (codificada por MGAT5), la cual cataliza la transferencia de residuos de GlcNAc a N-glicanos en crecimiento, conduciendo a la formación de cadenas multi-antenarias. El aumento de la transcripción del gen MGAT5 es inducido por varios factores de transcripción oncogénicos, particularmente se encuentra reportado que la expresión de MGAT5

## *-Introducción General-*

puede estar regulada por la vía de señalización que involucra RAS–RAF–MAPK, la cual se encuentra activada en diversas indicaciones oncológicas.

Se encuentra reportado para distintos tipos de cáncer que el aumento de la expresión de N-glicanos GlcNAc  $\beta$ -1,6 ramificados y de MGAT5 está críticamente involucrado en el crecimiento tumoral y la metástasis. Uno de los más concluyentes informa la supresión del crecimiento y metástasis de tumores mamarios inducidos por el virus oncogénico *Polyomavirus middle T antigen* (PyMT), en un modelo murino *knockout* para MGAT5. Otros ensayos *in vivo* han demostrado también que células con mayor expresión de MGAT5 presentan una mayor frecuencia de metástasis en ratones<sup>134</sup>. Además, estudios histopatológicos con la lectina fitohemaglutinina o leucoaglutinina (PHA-L) han reportado que diferentes tipos de tumores humanos, como mama, colon y melanomas, expresan niveles elevados de N-glicanos ramificados GlcNAc  $\beta$ -1,6<sup>135</sup>. Dicha lectina se une a estructuras de N-glicanos tri- y tetra-atenarios sólo formados después de la acción de MGAT5<sup>136</sup>. La reactividad de la lectina se encuentra aumentada en casos de hiperplasia atípica y en los carcinomas de mama y colon, comparada con lesiones normales y benignas. Se ha observado también una reactividad mayor de la lectina en el frente invasivo del carcinoma esofágico<sup>137,138</sup>.

Las ramificaciones producidas por GnT-V son los intermediarios preferidos para la extensión con estructuras de poli-LacNAc. A su vez las estructuras poli-LacNAc son reconocidas por galectinas, proteínas con una función relevante en diferentes indicaciones oncológicas<sup>139</sup>. Las poli-LacNAc también pueden estar terminadas con ácido siálico y fucosa, constituyendo glicanos de la familia Lewis como SLe<sup>x</sup>. Este glicano puede ser reconocido por selectinas y mediar pasos clave en la metástasis de las células tumorales.

La presencia de otras ramificaciones como GlcNAc  $\beta$ 1-4 en N-Glicanos, sintetizadas por GnT-IV (MGAT4), también se encuentran asociadas a la progresión tumoral de diferentes tipos de cáncer, como el cáncer de mama<sup>140</sup>.

En contraste, GnT-III (codificada por MGAT3) cataliza la adición de N-glicanos bisectados por el agregado de GlcNAc en un enlace  $\beta$ 1,4, lo cual impide el procesamiento adicional y alargamiento de N-glicanos tales como las estructuras de ramificación GlcNAc  $\beta$ 1,6. Por estas razones, al tener una actividad de competencia con MGAT5, se la asocia a un buen pronóstico. Por ejemplo, ratones que carecen de MGAT3 muestran

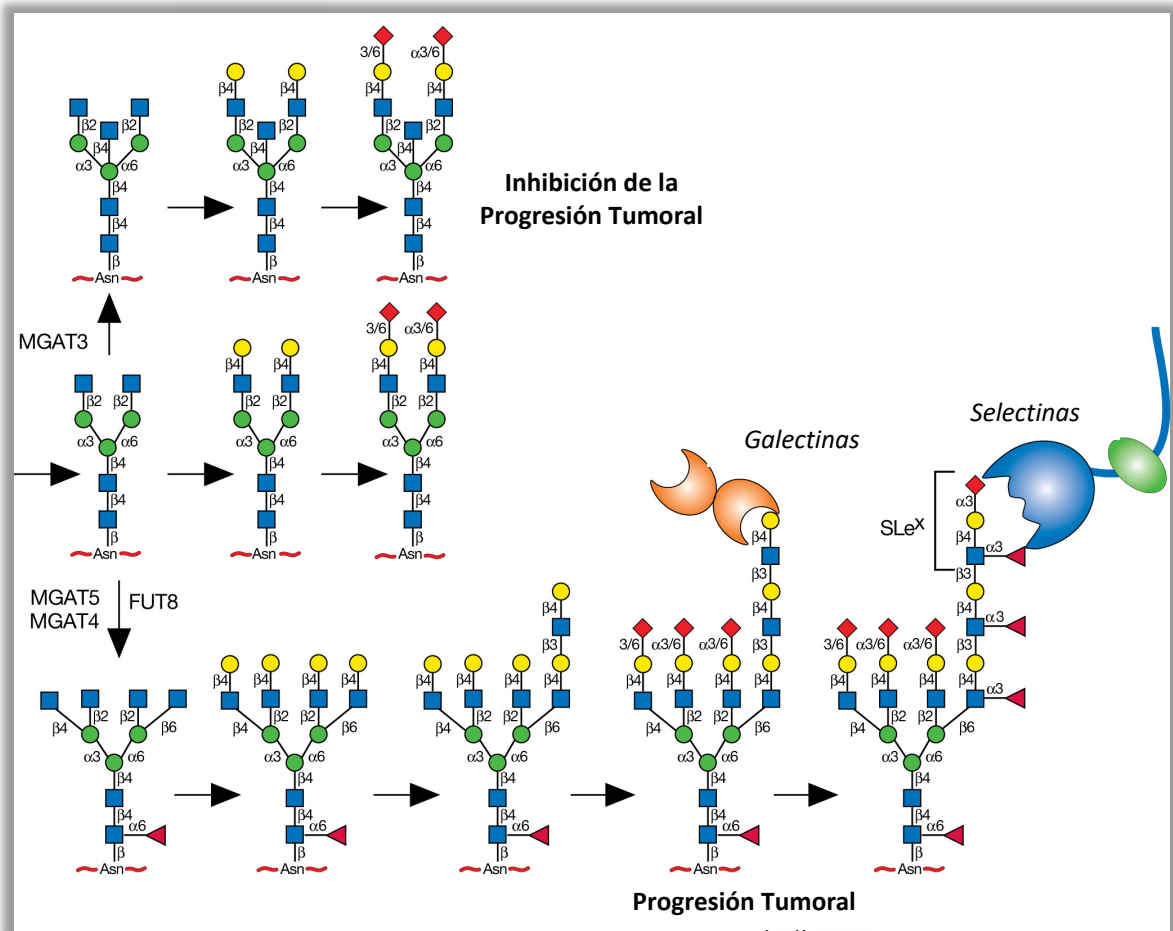
### *-Introducción General-*

un aumento de tumores mamarios y metástasis pulmonares. En un modelo celular de melanoma transfectado para expresar el producto de MGAT3, se observó disminución de estructuras de ramificación GlcNAc  $\beta$ 1,6 y supresión de la capacidad de realizar metástasis pulmonares. Además, la alta expresión de MGAT3 se correlaciona con una mejor supervivencia libre de recaída en cáncer de mama humano. Sin embargo, existen algunas excepciones a su actividad supresora de tumor, es el caso de ensayos *in vivo* en los cuales se ha observado reducción de tumores hepáticos en ratones que carecen de MGAT3. Por lo cual se propone que la participación de MGAT3 en la progresión tumoral depende de la presencia de otros factores<sup>141,142</sup>.

Otro punto de síntesis en el que los N-glicanos pueden presentar alteraciones es en la expresión y actividad de la glicosiltransferasa codificada por el gen FUT8. La sobreexpresión de FUT8 y presencia la fucosa del *core* en N-glicanos es una característica importante en varios tipos de cáncer, como el cáncer de mama y pulmón. Este aumento de la fucosilación del *core* se refleja en el aumento de fucosiltransferasas plasmáticas en el pacientes con carcinoma hepatocelular<sup>143</sup>. En sintonía, la fucosilación del *core* en N-glicanos de la  $\alpha$ -fetoproteína es un biomarcador aprobado para la detección temprana del carcinoma hepatocelular, distinguiéndolo de otras patologías como la hepatitis crónica. En cáncer de mama, esta fucosilación en el receptor EGFR se ha asociado con un aumento en su dimerización y fosforilación, por lo que se vincula con la proliferación de las células tumorales y su malignidad<sup>144</sup>. Recientemente, también se ha demostrado que en células MCF-7 deficientes de FUT8 se suprime la migración al afectar la fucosilación del *core* de N-glicanos de E-cadherina y la vía de señalización FAK/integrina<sup>145</sup>.

## -Introducción General-

En la **figura 7** se representan las reacciones catalizadas por las glicosiltransferasas mencionadas en este apartado y la unión de dos tipos diferentes de lectinas que reconocen sus productos.



**Figura 7 | Alteraciones en la ramificación de N-glicanos.** La ilustración representa la vía de síntesis de N-glicanos y las diferentes modificaciones que asocian con la progresión tumoral, así como su reconocimiento por galectinas y selectinas. Adaptado de "Essentials of Glycobiology", tercera edición.

## Truncamiento en la síntesis de glicanos O-GalNAc

Otra característica común hallada en varios tipos de tumores es la sobreexpresión de O-glicanos truncados. Los glicanos O-GalNAc, O-glicanos de tipo mucina, se encuentran con frecuencia en la mayoría de las glicoproteínas transmembrana y secretadas. Como resultado de la transformación maligna, la glicosilación aberrante despliega sobre estas glicoproteínas la expresión anormal de glicanos acortados o truncados, iniciadores de la vía de los glicanos O-GalNAc. Entre ellos

### -Introducción General-

se encuentran el disacárido Thomsen Friedenreich (antígeno T, *core 1*) y el monosacárido GalNAc (también conocido como Tn), así como sus versiones sialiladas ST y STn (**figura 4**)<sup>146</sup>.

Diversos mecanismos se han reportado como desencadenantes de la sobreexpresión de los antígenos T, ST, Tn y STn en cáncer. La alta expresión de O-GalNAc truncados ha sido asociada a mecanismos que interfieren con la falta de extensión hacia el *core 1*. La enzima iniciadora del *core 1* en los glicanos O-GalNAc, T sintasa (gen C1GALT1), requiere una chaperona molecular específica llamada *Cosmc* (codificada por el gen C1GALT1C1) que es responsable de su plegamiento y la estabilidad<sup>58,59</sup>. La ausencia de *Cosmc* conduce a la degradación de esta glicosiltransferasa. El gen para esta chaperona se encuentra ubicado en el cromosoma X, por lo que una sola mutación puede ser suficiente para eliminar la expresión. Mutaciones en el gen codificante para *Cosmc* se han asociado a la expresión de Tn y STn y con la pérdida de su función en diversas neoplasias, como cáncer de colon y melanoma. En consonancia, el silenciamiento de la T-sintasa resultó en un marcado aumento de Tn y particularmente de STn en las células de carcinoma de colon<sup>129</sup>.

De manera similar, la disminución de la actividad de la enzima C2GnT1 (C2GNT1), formadora del *core 2* O-GalNAc, impide una mayor extensión del antígeno T (*core 1*), lo que resulta en la acumulación de antígenos T o ST en los tejidos malignos. La sialilación de Tn o T previene su extensión, y en diversas indicaciones está asociado a una sobreexpresión de sialiltransferasas, como de ST6GalNAc1 y ST6GalNAc2 en el caso de STn<sup>148</sup>. Células de cáncer gástrico humano con sobreexpresión de ST6GalNAc1 mostraron metástasis intraperitoneales más altas en comparación con las células tumorales negativas para este antígeno. Del mismo modo, la sobreexpresión de ST6GalNAc1 en células de cáncer de mama humano condujo a un mayor crecimiento tumoral en el desafío de ratones inmunodeficientes<sup>149</sup>. En el caso del antígeno ST, su expresión en cáncer de mama se encuentra relacionada a sobreexpresión en los niveles de ST3Gal1. Su sobreexpresión fue vinculada al aumento de la tumorigénesis en modelos murinos, lo cual indica que esta enzima *per se* actuaría como un promotor tumoral<sup>150,151</sup>.

Otros mecanismos pueden contribuir a la formación de estos antígenos, incluida una mayor disponibilidad del sustrato UDP-galactosa o transportador de UDP-galactosa.

## *-Introducción General-*

Se encuentra reportado para cáncer de colon, niveles aumentados del transportador UDP-galactosa, que estaría vinculado con una mayor disponibilidad del donante de azúcar en el aparato de Golgi, en comparación con la mucosa no maligna<sup>152</sup>.

Otros defectos en la biosíntesis de los glicanos O-GlcNAc reportados en cáncer, se vinculan con la expresión alterada de GALNTs, cuyos productos inician este tipo glicosilación. Estas enzimas controlan los sitios y densidad de ocupación de O-glicanos, por lo que cambios en su expresión conducen a alteraciones en la O-glicosilación<sup>56</sup>. Se ha reportado, por ejemplo, que la relocalización del Golgi hacia el RE de algunas GALNTs conduce a altos niveles de Tn en líneas celulares y en el 70% de los cánceres mamarios<sup>153</sup>. Además, las enzimas que compiten por el mismo sustrato también pueden inducir la expresión de glicanos truncados. Se ha demostrado que las actividades relativas de C2GnT1 y ST3Gal1, que compiten por el mismo sustrato (*core 1*), determinan la estructura de O-glicano sobre MUC1 en células de cáncer mamario<sup>154</sup>.

Si bien en tejidos sanos T y Tn están casi ausentes, en aproximadamente el 90% de todos los carcinomas humanos se detectan estas estructuras precursoras. Tn se ha reportado en cánceres humanos de colon, mama, vejiga, próstata, hígado, ovario y estómago; y su presencia se correlaciona con la progresión tumoral y la metástasis. Del mismo modo, los antígenos ST y STn se correlacionan con la progresión del cáncer epitelial y un mal pronóstico clínico de muchos carcinomas<sup>152,155,156</sup>.

Las mucinas secretadas que expresan T, Tn o STn a menudo aparecen en el torrente sanguíneo de pacientes con cáncer. Debido a que estos glicanos ocurren con poca frecuencia en los tejidos normales, provocan respuestas inmunitarias en el paciente, que pueden ser útiles tanto a nivel pronóstico como terapéutico.

Se sabe que solo unas pocas glicoproteínas presentan estos antígenos en tejidos malignos, un ejemplo claro es la mucina MUC1. La sobreexpresión de los antígenos Tn, STn y T en MUC1 se asocia con un alto potencial metastásico y un mal pronóstico. Sin embargo, se conoce poco sobre la consecuencia funcional de esta glicosilación aberrante durante la progresión del cáncer. En células de cáncer de mama humano, la expresión de STn en MUC1 se asoció con una disminución en la adhesión y una mayor migración celular<sup>157</sup>.

Los O-glicanos truncados, como parte de glicoproteínas no mucinas, también han sido asociados con una participación en diferentes indicaciones oncológicas. Por

## *-Introducción General-*

ejemplo, formas aberrantes de O-glicanos en integrinas  $\beta 1$  han sido asociadas con metástasis. Se ha reportado que la sobreexpresión de ST6GalNAc1 en células de carcinoma murino condujo a un aumento en la expresión de STn en la subunidad de integrina  $\beta 1$ , lo cual se vincula con cambios morfológicos que incluyen pérdida de apariencia epitelial, desorganización de las fibras de estrés de actina y capacidad reducida para migrar sobre fibronectina<sup>158</sup>.

La glicosilación aberrante no sólo afecta el comportamiento de las células tumorales en procesos como proliferación, diferenciación y adhesión; sino que también contribuye al control del microambiente local, las respuestas inmunes y la metástasis. En el caso de los O-glicanos truncados, existe evidencia de que las estructuras T, Tn y STn promueven la metástasis a través de la unión a Galectina-3, cuya expresión también se ve aumentada en sueros de pacientes de varios tipos de cáncer y se asocia con un mayor riesgo de metástasis<sup>159,160</sup>.

## Alteraciones en la ramificación de glicanos O-GalNAc

Otra alteración reportada en cáncer en el grupo de los glicanos O-GalNAc es el aumento o disminución de los diferentes *cores* estructurales, así como de las glicosiltransferasas que los sintetizan<sup>161</sup>.

Durante la transformación maligna, las mucinas del intestino, el colon, el hígado y el páncreas reducen las estructuras del *core 3*, que correlaciona con aumento en sialilación de los antígenos Tn y T. Los glicanos derivados del *core 3* son un tipo principal expresado por las células epiteliales normales del tracto gastrointestinal, que están regulados negativamente en las neoplasias malignas debido a la pérdida de la expresión funcional de la  $\beta 3$ -N-acetilglucosaminiltransferasa-6 (*core 3* sintasa)<sup>162,163</sup>. Al igual que el 3, el *core 4* se encuentra regulado negativamente en cáncer, debido al requerimiento de la estructura del *core 3* para ser sintetizado. Como otra característica compartida, el *core 4* se encuentra restringido a mucinas y glicoproteínas en los tejidos gastrointestinales y bronquiales, en condiciones fisiológicas<sup>164,165</sup>.

El *core 2* se encuentra en glicoproteínas y mucinas producidas en muchos tipos de células diferentes, pero en cáncer, el *core 2* se encuentra regulado positivamente en varios tipos tumorales, incluidos los colorrectales, pulmonares, de próstata y de

## *-Introducción General-*

vejiga<sup>166-170</sup>. Aunque existen excepciones, como el cáncer de mama en el cual su expresión se encuentra reducida, pero acompañada con un aumento del antígeno T<sup>171</sup>.

Los glicanos O-GalNAc del *core 2* suelen extenderse en cadenas de poli-LacNAc, que en sus formas sialilada y/o fucosilada participan en varios pasos de la formación de tumores. Esto se encuentra vinculado a que las estructuras basadas en el *core 2* son las principales portadoras del motivo de glicano SLe<sup>x/a</sup>, que se sobreexpresa también en algunos tipos tumorales<sup>77</sup>. El *core 2* se sintetiza por la actividad 1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa (genes C2GNT1, 2 y 3). Como se mencionó en la sección de síntesis, sólo C2GnT1 es exclusivo del *core 2*, C2GnT2 y C2GnT3 pueden sintetizar además el *core 4*.

Se encuentra descrito en la bibliografía el rol imprescindible de C2GNT1 en la síntesis de los glicanos O-GalNAc y SLe<sup>x</sup> en el contexto de ligandos de selectinas, tanto en condiciones fisiológicas como en cáncer<sup>172</sup>. El control de la relación *core 2/core 1* ocurre mediante el cambio de la expresión de C2GNT1, que regula la expresión de SLe<sup>x</sup> en células dendríticas maduras, células T, y células linfocíticas pre-B<sup>173-175</sup>. La pérdida de oligosacáridos del *core 2* reduce el *rolling* de neutrófilos en sustratos que contienen selectinas E, L y P y el reclutamiento de los mismos a los sitios de inflamación. Esto se debe a un defecto grave en la biosíntesis de ligandos de selectinas en las células mieloides, lo que lleva a una disminución del reclutamiento de neutrófilos. Los ratones con deficiencia de C2GNT1 también exhiben una reducción parcial en la biosíntesis de ligando de L-selectina en vénulas endoteliales altas, lo que resulta en una reducción de la localización de células B y de la colonización de los ganglios linfáticos periféricos. Además, los progenitores tímicos de ratones con deficiencia de C2GNT1 tienen una capacidad reducida para albergar el timo debido a la pérdida de ligandos de P-selectina en estas células<sup>176-179</sup>.

La enzima codificada por C2GNT1 tiene un rol clave en diferentes tipos tumorales. En cáncer colorrectal, un estudio sobre la expresión de ARNm demostró que su sobreexpresión está ligada a la expresión de glicanos O-GalNAc ramificados en el *core 2*, y está estrechamente relacionada con el potencial maligno de este tipo de tumor<sup>180</sup>. En adenocarcinoma pulmonar, la expresión de ARNm de C2GNT1 y las variables clínico-patológicas se correlacionan con la invasión de los vasos y metástasis a los ganglios linfáticos<sup>170</sup>. También se ha demostrado, por análisis histopatológico, que la expresión

## -Introducción General-

de la enzima está estrechamente relacionada con el potencial agresivo de cáncer testicular, de vejiga y próstata<sup>166,181,182</sup>. En este último, la sobreexpresión de esta glicosiltransferasa se asocia con niveles más altos de glicanos del *core 2* con terminaciones de SLe<sup>x</sup> en las proteínas PSA, PAP y MUC1. Asimismo, se reportó una asociación con la progresión en esta indicación, vinculada a un aumento del crecimiento del tumor *in vivo*<sup>183,184</sup>.

Si bien las enzimas codificadas por C2GNT2 y C3GNT3 también pueden sintetizar el *core 2*, estudios realizados en ratones *knockout* para estos genes demostraron que no estarían involucrados en la síntesis del *core 2* de los glicanos O-GalNAc en el contexto de SLe<sup>x</sup> y ligandos de selectinas. Se informó que los ligandos de P- y E-selectina en neutrófilos de ratones deficientes para estas dos glicosiltransferasas se expresan normalmente<sup>185</sup>. En los ratones deficientes de C2GNT2 se detectaron disminuciones en ramificaciones de poli-LacNAc, cambios menores en las estructuras del *core 2*, junto con aumento en varias estructuras del *core 1*. Mientras que para los deficientes de C2GNT3, la pérdida de la glicosiltransferasa no condujo a cambios marcados en las estructuras de glicanos O-GalNAc<sup>185</sup>.

C2GNT2 se encuentra vinculado a estructuras ramificadas de poli-LacNAc. Su expresión se encuentra regulada negativamente en melanomas y se vincula con una disminución de estructuras ramificadas de poli-LacNAc en N-glicanos. Funcionalmente, se encontró que la transfección de C2GNT2 disminuyó significativamente el crecimiento *in vivo* de tumores *xenograft* de melanoma e inhibió la formación y supervivencia de colonias tridimensionales *in vitro*<sup>186</sup>. C2GNT2 también se encuentra regulado negativamente en cáncer colorrectal en comparación con la mucosa normal, y esta disminución está vinculada a una metilación en su promotor<sup>187</sup>. Sin embargo, estudios funcionales demostraron que la expresión de C2GNT2 incrementa la migración e invasión celular *in vitro* y las metástasis pulmonares de las células de cáncer de mama<sup>188</sup>.

Finalmente, la expresión del gen C2GNT3 se ha encontrado regulada negativamente en muestras de cáncer colorrectal en comparación con el tejido de colon no patológico. La transfección de C2GNT3 en células de cáncer de colon reduce la proliferación celular, la adhesión, la invasión y la muerte celular *in vitro*, así como inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*. C2GNT3 se propone como marcador potencial de buen pronóstico en cáncer de colon y también podría ser un biomarcador para monitorear la

## -Introducción General-

respuesta tumoral a la quimioterapia<sup>189</sup>. También se lo ha considerado como biomarcador en el cáncer epitelial de ovario. En consecuencia, la re-expresión de C2GNT3 conduce a la ganancia de propiedades celulares anticancerígenas al reducir el crecimiento celular, la invasión y al cambiar las capacidades metabólicas<sup>189</sup>.

En la **tabla 1** se resumen de manera general los cambios en la expresión de las diferentes extensiones de los glicanos O-GalNAc y las glicosiltransferasas con actividad C2GnT.

<b>-Glicanos-</b>	<b>-Estatus en cáncer-</b>
<i>Tn</i>	↑
<i>STn</i>	↑
<i>Core 1 (T)</i>	↑
<i>ST</i>	↑
<i>Core 2</i>	↑↓
<i>Core 3</i>	↓
<i>Core 4</i>	↓
<b>-Glicosiltransferasas-</b>	
<i>C2GNT1</i>	↑
<i>C2GNT2</i>	↑↓
<i>C2GNT3</i>	↓

**Tabla 1 | Resumen de los cambios en expresión de los *cores* estructurales en glicanos O-GalNAc y glicosiltransferasas involucradas en su ramificación.** Las enzimas se mencionan con los nombres de los genes codificantes.

## Glicanos como blancos terapéuticos

Los glicanos que se expresan excesivamente en los tejidos tumorales son denominados antígenos de carbohidratos asociados a tumores (TACA, del inglés *Tumor-Associated Carbohydrate Antigens*). Esta identificación hizo que sean considerados marcadores para diagnóstico y seguimiento de algunas indicaciones, y más tarde posibles objetivos para el desarrollo de estrategias terapéuticas<sup>190</sup>. La relevancia de estos patrones diferenciales fue destacada cuando se comenzó a comprender el papel funcional de los mismos en el desarrollo y progresión del cáncer, develando que la

### *-Introducción General-*

mayoría de los TACAs constituyen una maquinaria esencial para esta enfermedad. Hasta el momento se han identificado numerosos TACAs para diferentes tipos tumorales, muchos de los cuales ya se han mencionado. Estos incluyen (1) los glicanos truncados: Tn, TF y STn; (2) glicanos Lewis: Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, SLe<sup>x</sup> y SLe<sup>a</sup>; (3) glicolípidos de la clase Globo: Globo-H, Gb3, Gb4, Gb5; (4) gangliósidos: GD2, GD3, GM2, GM3, GT1b, RM2, A2B5, fucosil-GM1, entre otros<sup>191</sup>.

Dentro de las estrategias terapéuticas desarrolladas contra glicanos se destacan las terapias inmunológicas. La inmunoterapia contra el cáncer puede clasificarse en tipo pasiva y tipo activa, en función de su capacidad para involucrar al sistema inmunitario del paciente contra el tumor. La inmunoterapia pasiva fortalece las respuestas antitumorales existentes, como la administración de anticuerpos. En cambio, la inmunoterapia activa capacita al sistema inmunitario para que elimine las células tumorales a través de los antígenos asociados al tumor, como las vacunas<sup>192</sup>.

Dentro de las inmunoterapias pasivas dirigidas a epítopes de glicanos se destaca Dinutuximab, un monoclonal quimérico dirigido contra el gangliósido GD2. Fue aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2015, para uso en pacientes pediátricos de neuroblastoma de alto riesgo, en combinación con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleuquina-2 (IL-2) y ácido 13-cis-retinoico. Otro ejemplo es Le<sup>y</sup>, varios anticuerpos contra este glicano han sido evaluados en la clínica. Uno de ellos es BR96, que conjugado con doxorubicina y docetaxel (conocido como SGN-15) fue evaluado en pacientes avanzados con cáncer de pulmón de células no pequeñas en un ensayo aleatorizado de fase II, generando un aumento en la supervivencia de los pacientes en comparación con los pacientes que recibieron las monoterapias<sup>193</sup>.

En contraste con la inmunoterapia pasiva, el campo de vacunación dirigida a TACAs como inmunoterapia activa ha sido explorado con mayor profundidad. Si bien la mayoría de las vacunas basadas en TACAs han demostrado ser eficaces en la vacunación de ratones, cuando se probaron en entornos clínicos, las respuestas inmunes humorales específicas no se correlacionaron con una buena respuesta clínica. Como ejemplo, la vacuna Theratope está dirigida contra el glicano STn y utiliza la hemocianina de lapa californiana como *carrier* antigénico (STn-KLH) y QS-21 como adyuvante. La misma fue

### *-Introducción General-*

evaluada en pacientes con cáncer de mama y mostró seguridad pero no beneficio en la sobrevida<sup>194</sup>.

Por otro lado, existe otro enfoque terapéutico de inmunoterapia activa, los miméticos de TACAs. Pueden ser péptidos o hasta proteínas (como anticuerpos anti-idiotipo) y su acción es imitar la estructura del antígeno en cuestión. El ejemplo más relevante es el anticuerpo Racotumomab, una terapia en la que nuestro grupo de investigación ha estado trabajando por más de quince años. Racotumomab-alum (Vaxira®) es un anticuerpo monoclonal anti-idiotipo que produce respuesta inmune dirigida a gangliósidos que contienen NeuGc (ácido siálico incapaz de ser sintetizado en humanos) como NeuGcGM3, un xenoantígeno específico de tumor ampliamente reportado en muchos tipos de cáncer. Este monoclonal ha sido aprobado en países de América Latina como una inmunoterapia activa para el tratamiento avanzado del cáncer de pulmón de células no pequeñas. Este ejemplo es la única terapia activa dirigida contra un epítipo de carbohidrato, en el contexto de un glicoconjugado, que se encuentra aprobado para su uso en humanos en la actualidad<sup>195-197</sup>.

El campo de la glicobiología ha aportado desde biomarcadores hasta novedosos blancos terapéuticos en diferentes tipos de cáncer. Por lo que la investigación en este campo puede considerarse un nicho clave a explorar para comprender la patología y desarrollar terapias que la combatan. Notablemente, el conocimiento general de la glicobiología de los tumores proviene principalmente del estudio de indicaciones de adultos y en su mayoría, de carcinomas. Por lo que, debido a las implicancias de la glicosilación aberrante, es necesario su estudio en indicaciones menos abordadas como los cánceres pediátricos y cánceres cerebrales de adultos, siendo ejemplos de éstas el neuroblastoma y el glioma.

Hipótesis y Objetivo General

---



## **Hipótesis General**

Los glicanos participan activamente en la promoción y sostén del comportamiento maligno de la célula transformada. Por lo cual, patrones diferenciales de glicanos están asociados a fenotipos más agresivos, basados en diferencias en sus vías de síntesis y mecanismos que regulan su expresión. El estudio del arreglo de glicanos, sus biosíntesis y mecanismos de regulación, brindarán información relevante para comprender su participación en la biología tumoral del glioma y el neuroblastoma.

## **Objetivo General**

El objetivo general de este trabajo se centra en caracterizar la glicosilación aberrante en glioma y neuroblastoma, evaluar su impacto en procesos asociados a la biología tumoral y estudiar su regulación por mecanismos epigenéticos. Dicha caracterización se centra en N- y O-glicanos, sus ramificaciones, y las estructuras de glicanos O-GalNAc truncados y de la familia Lewis.



Materiales y Métodos

---



## Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizaron líneas de neuroblastoma humano con amplificación del oncogén MYCN (CHP-212, IMR-32, SK-N-BE(2)) y sin amplificación (SK-N-AS y SK-N-SH)<sup>198-200</sup>. CHP-212 y SK-N-BE(2) fueron crecidas en una mezcla 1:1 de *Eagle's Minimum Essential Medium* (MEM) (Sigma Aldrich, Alemania) y *Ham's F-12 Nutrient Mix* (Gibco, Estados Unidos). SK-N-AS fue crecida en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco, Estados Unidos) y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco, Estados Unidos). IMR-32 y SK-N-SH fueron crecidas en MEM. Todas las líneas de neuroblastoma humano fueron suplementadas con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Estados Unidos).

Además, se utilizó un panel de líneas celulares de glioma humano de alto y bajo grado<sup>201-208</sup>. En el grupo de alto se incluyeron las líneas de glioblastoma (grado IV) LN229, LN18, U87MG, U251, U373, T98G, U118 y A172. En el grupo de bajo grado se incluyeron las líneas derivadas de un astrocitoma difuso y un oligodendroglioma (grado II), SW1088 y HS683, respectivamente. LN229, LN18, U87MG, U251, U373, T98G y U118 fueron crecidas en DMEM, mientras que SW1088, HS683 y A172 fueron crecidas en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, Alemania). Las líneas de glioma fueron suplementadas con 10% de SFB, a excepción de LN18 que fue suplementada con 5% SFB.

Todas las líneas celulares fueron mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda gaseada con 5% de CO<sub>2</sub>. Las monocapas fueron rutinariamente subcultivadas mediante el uso de solución de Tripsina-EDTA (Gibco, Estados Unidos), utilizando procedimientos estándares. Las mismas fueron testeadas para *Mycoplasma* mensualmente mediante tinción con 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Vector, Estados Unidos) y visualización al microscopio de fluorescencia. Repiques menores a 20 fueron usados en los experimentos de este trabajo. Todos los medios fueron suplementados con 80 µg/ml de gentamicina (Northia, Argentina).

Las líneas CHP-212, IMR-32, SK-N-BE(2), SK-N-AS, SK-N-SH, T98G y LN229 fueron compradas a la empresa *American Type Culture Collection* (ATCC, Estados Unidos). Las líneas LN18, U118, A172, SW1088 y HS683 fueron cedidas gentilmente por la empresa GlaxoSmithKline, Estados Unidos. Las líneas U87MG, U251 y U373 fueron cedidas gentilmente por la Dra. Marianela Candolfi, Instituto de Investigaciones Biomédicas (CONICET).

En las **tablas 2 y 3** se encuentran descriptas algunas de las características clínicas y moleculares de las líneas utilizadas en este trabajo.

<b>Líneas celulares de neuroblastoma humano</b>				
<i>Catálogo</i>	<i>Nombre</i>	<i>Edad (años.meses)</i>	<i>Sexo</i>	<i>Estatus MYCN</i>
ATCC® HTB-11	SK-N-SH	4	F	NA
ATCC® CRL-2137	SK-N-AS	6	F	NA
ATCC® CRL-2271	SK-N-BE(2)	2.2	M	A
ATCC® CCL-127	IMR-32	1.1	M	A
ATCC® CRL-2273	CHP-212	1.8	M	A

**Tabla 2 | Líneas celulares de neuroblastoma humano.** F: Femenino. M: Masculino. A: Amplificado. NA: No Amplificado.

<b>Líneas celulares de glioma humano</b>				
<i>Catálogo</i>	<i>Nombre</i>	<i>Edad (años)</i>	<i>Sexo</i>	<i>Grado</i>
ATCC® CRL-1620	A-172	53	M	IV
ATCC® CRL-2611	LN-229	60	F	IV
ATCC® CRL-2610	LN-18	65	M	IV
ATCC® CRL-1690	T98G	61	M	IV
ATCC® HTB-14	U87MG	No conocido	M	IV
ATCC® HTB-15	U118MG	50	M	IV
RRID:CVCL_0021	U251MG	75	M	IV
RRID:CVCL_2818	U373MG	61	M	IV
ATCC® HTB-12	SW1088	72	M	II
ATCC® HTB-138	HS683	76	M	II

**Tabla 3 | Líneas celulares de glioma humano.** Líneas celulares de glioma humano. F: Femenino. M: Masculino.

## Material histológico de pacientes

Se utilizaron cuatro muestras histológicas de pacientes con diagnóstico de neuroblastoma provenientes del Hospital Pediátrico Argentino "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Se utilizaron secciones histológicas fijadas en formalina y embebidas en parafina para la determinación de la amplificación de MYCN y tejido congelado (2 mg) de los mismos pacientes para extracción de ARNm. El uso del material fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Revisión de Investigación del Hospital. Los pacientes dieron su consentimiento para realizar los procedimientos.

## Hibridación *in situ* fluorescente

El estado de amplificación del oncogén MYCN en las muestras de pacientes fue determinado por el servicio de Patología del Hospital Garrahan bajo la técnica de Hibridación *in situ* fluorescente (FISH). La misma fue llevada a cabo con el kit Vysis Paraffin II Pretreatment Reagent Kit (Abbott Laboratories, Estados Unidos). Se utilizaron las secciones histológicas fijadas en formalina y embebidas en parafina de 3  $\mu$ m de espesor, y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se realizó desparafinización de la sección histológica con xileno, luego un pretratamiento con una solución de tiocianato de guanidinio durante 10 minutos a 80 ° C, seguido de digestión enzimática a 37 ° C durante 10 minutos. Después de eso, las secciones de tejido se incubaron con la sonda LSI MYCN (2p24.1) en el hibridador HYBrite (Abbott Laboratories, Estados Unidos) para los procesos de desnaturalización (73 ° C durante 5 min) e hibridación (37 ° C durante 20 h). Los lavados posteriores a la hibridación se realizaron usando *buffer* SSC con NP40. Las secciones de tejido se tiñeron con DAPI y se observaron con un microscopio de fluorescencia (Eclipse 80i, Nikon, Japón).

## Citometría de flujo

Las células fueron crecidas durante 24 h en medio de cultivo sin SFB. Las mismas fueron colectadas mediante solución de disociación no enzimática (Gibco, Estados Unidos) y resuspendidas en buffer fosfato salino (PBS).

## *-Materiales y Métodos-*

Para citometrías de flujo (CF) con anticuerpos,  $1 \times 10^6$  células por muestra fueron incubadas en 50  $\mu$ l de PBS con la dilución correspondiente del anticuerpo primario o su control de isotipo, durante 30 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas con PBS, centrifugadas e incubadas con una dilución 1/100 del anticuerpo secundario correspondiente en un volumen final de 50  $\mu$ l con PBS por 30 minutos a 4°C. Se utilizaron los anticuerpos secundarios policlonales de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a R-Ficoeritrina (PE) (Dako, Estados Unidos) o anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) según corresponda.

Para CF con lectinas, se incubaron 0,5  $\mu$ g de las lectinas biotiniladas (Vector , Estados Unidos) con 0,5  $\mu$ g del complejo estreptavidina-FITC (Vector , Estados Unidos) en 50  $\mu$ l de PBS durante 30 minutos a 4°C. Seguidamente,  $5 \times 10^5$  células fueron incubadas con la mezcla antes descrita, por 45 minutos a 4°C.

Finalmente, las células fueron analizadas en citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Estados Unidos), adquiriendo  $1 \times 10^5$  eventos por muestra. Los datos fueron analizados mediante el software FlowJo®. Los valores obtenidos para cada anticuerpo fueron analizados como intensidad media de fluorescencia, y la misma fue relativizada como cociente de su control de isotipo (IMFr). Para los anticuerpos contra los glicanos O-GalNAc truncados y los de la familia Lewis fue considerada alta expresión mayor a 1,5 IMFr, media entre 1,5 y 1,25 IMFr, y baja menor a 1,25 IMFr.

### Anticuerpos

En la **tabla 4** se listan los anticuerpos utilizados en este trabajo, justo con sus características principales.

Anticuerpo	Catálogo	CF	WB	Marca	Isotipo	Clon	Especie
Le <sup>a</sup>	ab3967	1/50	1/50	Abcam	IgG	7LE	Ratón
Le <sup>b</sup>	ab3968	1/100	1/50	Abcam	IgG	2-25LE	Ratón
Le <sup>x</sup>	NBP2-22179	1/100	1/50	Novus biologicals	IgG	4 E 10	Ratón
Le <sup>y</sup>	ab3359	1/50	1/50	Abcam	IgM	F3	Ratón
SLe <sup>x</sup>	551344	1/50	1/100	BD Pharmingen™	IgM	CSLEX1	Ratón
SLe <sup>a</sup>	MAB2095	1/25	1/50	Millipore	IgG	KM231	Ratón
STn	sc-20042	1/25	1/50	Santa Cruz	IgG	B72.3	Ratón
T	NBP2-45282	1/25	1/50	Novus Biologicals	IgM	SPM320	Ratón
Tn	ab115949	1/25	1/50	Abcam	IgM	Tn 218	Ratón
PSGL-1	BMS164	1/50	-	Thermo Scientific	IgG	PL-1	Ratón
β-Tubulina	556321	-	1/10000	BD Bioscience	IgM	5-H1	Ratón
Integrina Iαv	ab179475	1/200	1/5000	Abcam	IgG	EPR16800	Conejo
EGFR	MA5-13048	1/100	1/100	Invitrogen	IgG	EGFR.1	Ratón
EGFR	ab52894	-	1/1000	Abcam	IgG	EP38Y	Conejo
Isotipo IgG	X0931	1/100	-	Dako	IgG	-	Ratón
Isotipo IgM	X0942	1/100	-	Dako	IgM	-	Ratón

Tabla 4 | Lista de anticuerpos utilizados. CF: Citometría de flujo. WB: *Western Blot*.

## Lectinas

Las lectinas son glicoproteínas con dominio de unión a carbohidratos. Poseen una capacidad de unión reversible a restos de azúcar específicos en glicoproteínas o glicolípidos, así como a estructuras de monosacáridos y glicanos libres. Las lectinas biotiniladas utilizadas en este trabajo fueron ConA y PHA-L (Vector, Estados Unidos). En la **figura suplementaria 1** del Anexo se muestran las lectinas mencionadas como herramienta para la detección de estructuras de glicanos y sus afinidades.

## Unión a selectinas

Las células CHP-212 y SK-N-AS fueron crecidas durante 24 h en medio de cultivo sin SFB. Las mismas fueron colectadas mediante solución de disociación no enzimática (Gibco, Estados Unidos), resuspendidas PBS e incubadas con los complejos de selectinas por 30 minutos a 4°C, lavadas con PBS y analizadas mediante citómetro de flujo FACSCalibur. Se adquirieron  $1 \times 10^5$  eventos por muestra. Los datos fueron analizados mediante el programa FlowJo®. La formación de los complejos de selectinas fue llevada a cabo en PBS + 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  + 1 mM  $\text{Mg}^{2+}$  con 1 mg/ml de las selectinas humanas (E-, L- o P-) recombinantes (quimeras con la región Fc de IgG1) (R&D systems, Estados Unidos) y 0.5 mg/ml de anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulinas humanas conjugado a FITC (Abcam, Reino Unido). Se utilizó como control de isotipo el control Fc, recomendado por el fabricante (R&D systems, Estados Unidos).

## Extracción de ARN

La extracción de ARN fue llevada a cabo mediante *EasyPure® RNA Purification Kit* (TransGen Biotech Co., China), según las indicaciones provistas por el fabricante. El material de partida consistió en  $1 \times 10^6$  células provenientes de líneas celulares o tejido tumoral proveniente de muestras de pacientes. La concentración de ARN se midió mediante la absorbancia a 260 nm y la pureza fue analizada mediante las relaciones 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm, utilizando el espectrómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

## Síntesis de ADN copia

Para síntesis de ADN copia (ADNc), se realizó la de retrotranscripción con 2 µg de ARN molde, 500 ng de oligodT (12-18 pb de longitud) y 10 mM de dNTPs, incubados durante 5 minutos a 65°C. Dicha mezcla fue incubada 1 minuto en hielo y luego se le adicionaron 1 µl de ditiotreitól (DTT) (0,1M), 4 µl de *Buffer First Strand*, 1 µl de *RNAseout* (Invitrogen, USA) y 1 µl de *SuperScript III* (Invitrogen, Estados Unidos). Finalmente la

mezcla se incubó durante 50 minutos a 50°C. Las incubaciones fueron realizadas en el termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient.

## PCR en tiempo real

Todos los *primers* de esta tesis fueron diseñados sobre los ARNm de los genes de interés (**tabla 5**), utilizando el *software* Primer3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), corroborando su especificidad mediante el *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Los mismos fueron puestos a punto mediante cálculo de la eficiencia y obtención de pico único mediante análisis de curva de *melting*. Los primers fueron producidos por la empresa Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Los ensayos de PCR en tiempo Real (qRT-PCR) fueron llevados a cabo utilizando el termociclador StepOne® (Applied Biosystems, Estados Unidos). La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 10 µl, conteniendo 2 µl (0,01 µg ADNc) de molde, Power SYBR™ Green PCR Master Mix 1X (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y agua bidestilada. Se utilizó el siguiente perfil de ciclado: 30 minutos a 48°C, 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 60 segundos a 60°C. Una vez definidos todos los parámetros de la reacción, los resultados fueron analizados mediante el método de  $\Delta\Delta CT$  con el StepOne® Software versión v2.3, utilizando los genes HPRT1 (hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa 1) o  $\beta$ -Actina como controles endógenos para las muestras de neuroblastoma o glioma, respectivamente.

Nombre	Secuencia Forward (5' → 3')	Secuencia Reverse (5' → 3')
β-Actina	CAAGATCATTGCTCCTCCTG	AGCACTTGCGGTGCACGATG
HPRT1	AACGTCTTGCTCGAGATGTG	GCTTTGATGTAATCCAGCAGG
C2GNT1	AAGCAGTTGCCAGGTTTG	ACACTGAGCGCACATGGAC
FUT3	GGGTTAAGAGCTCAGAGTTCAGAC	AGCAGCAATTTCCCTCAACCC
FUT4	TTGCACAGCTAGCAATTGGG	ATTCAGGAAACCGCCTCAAC
FUT5	AAGCCACATCGCATTGAAGC	TGGAGCCCGGACATCCTTTG
FUT6	CACCTCCGAGGCATCTTCAACTG	CGTTGGTATCGGCTCTCATTATG
FUT7	CACCTCCGAGGCATCTTCAACTG	CGTTGGTATCGGCTCTCATTATG
FUT8	GGTCGAGCTTCCATTGTAG	GCGAGGTCTTCTGGTACAGC
FUT9	CTTACCGCCGTGATTGAGAT	AATGCTTGCCCGTAGGTATG
FUT11	CTCTTGGCTTTCTTGTC	ATGACGGAGTGATTGTTT
ST3GAL3	TCTCCGCTGTGGTCATTTAGG	AGTACCAGAAAGAGGCAGAGG
ST3GAL4	AGTAGAAAACAACCCAGACAC	AGAGGTTGAGAATCCGAA
ST3GAL6	AGAGTCCTTTGCACTACTATGG	CACTGTTAGCATCATCTTCTGAG
MGAT5	AGCCTGAAAGCAGCTCCAT	GCCAGTGCCTTGATGTACCT

Tabla 5 | Secuencias de primers utilizados en qRT-PCR.

### Tratamiento con tricostatina A

La tricostatina A (TSA) fue generosamente provista por el Dr. Norberto W. Zwirner, Laboratorio de Patofisiología de la inmunidad innata, Instituto de Biología Experimental y Medicina (IBYME), Argentina. Las células fueron cultivadas en presencia de 1 mM de TSA por 24 h, los controles fueron cultivados en igual volumen de Dimetilsulfóxido (DMSO)<sup>209</sup>.

### Tratamiento con tunicamicina

Monocapas celulares, con un 80% de confluencia, fueron tratadas con 150 nm de tunicamicina (TNM) proveniente *Streptomyces sp.* (Merck KGaA, Alemania) o su

## *-Materiales y Métodos-*

correspondiente volumen de DMSO. Las células fueron colectadas luego de 24 horas de tratamiento para realizar los respectivos ensayos<sup>210,211</sup>.

### Tratamiento con swainsonina

Las monocapas celulares, con un 80% de confluencia, fueron tratadas con de swainsonina (SW) de origen sintético (Sigma, Estados Unidos) o su correspondiente volumen de PBS. Las células fueron colectadas luego de 24 h de tratamiento para realizar los respectivos ensayos<sup>210</sup>.

### Silenciamiento mediado por *siRNA*

Las expresiones de los genes C2GNT1 y MGAT5 fueron moduladas negativamente mediante el uso de *siRNA* (*small interfering RNA*). Tanto los *siRNA* específicos de secuencia como el control *siRNA* (*scramble*) fueron obtenidos de la empresa Origene (Estados Unidos). Los mismos están compuestos por 3 dúplex únicos de *siRNA* 27mer (Locus ID 2650 para C2GNT1 y Locus ID 4249 para MGAT5).

Monocapas celulares con un 80% de confluencia fueron transfectadas mediante el uso de Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) siguiendo las indicaciones del proveedor. Las células fueron colectadas luego de 24 o 48 h y utilizadas para los ensayos correspondientes.

### Adhesión celular

Para todas las líneas utilizadas,  $4 \times 10^4$  células fueron sembradas por *well* en placas de 96 *wells*, en un volumen final de 100  $\mu$ l en el medio correspondiente suplementado con 10% de SFB y 80  $\mu$ g/ml de gentamicina. Luego de 1-3 h de incubación a 37°C, las células no adheridas fueron removidas cuidadosamente con PBS. Posteriormente, las células adheridas fueron fijadas y teñidas con una solución de cristal violeta 0,5% y metanol 20%. Finalmente, la placa fue lavada con agua destilada. El colorante se solubilizó con una solución de metanol 10% y ácido acético 5%, en agitación

## *-Materiales y Métodos-*

por 5 min. Posteriormente se leyó la absorbancia a 595 nm con un lector de microplacas Asys UVM3400Z.

### **Proliferación celular**

Se evaluó el efecto en la proliferación celular del silenciamiento del gen C2GNT1 sobre las líneas de neuroblastoma, mediante el ensayo de MTS (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; Promega, Estados Unidos). Las células fueron sembradas en placa de 96 *wells* en una densidad de  $5 \times 10^3$  células/*well* en 200  $\mu$ l del medio correspondiente suplementado con 10% SFB. 20  $\mu$ l de MTS fueron agregados a cada *well* y se incubó a 37° C por 2-4 h. Se registró la absorbancia en lector de microplacas Asys UVM3400Z a 490 nm, a los tiempos 24 h, 48 h y 72 h.

Se evaluó el efecto en la proliferación celular de los inhibidores TNM y SW a 24 h por método colorimétrico utilizando cristal violeta. Las células fueron sembradas en placa de 96 *wells* en una densidad de  $5 \times 10^3$  células/*well* en 200  $\mu$ l del medio correspondiente suplementado con 10% SFB. Las placas fueron lavadas con PBS, fijadas y teñidas con una solución de cristal violeta 0,5% y metanol 20%. Seguidamente las placas fueron lavadas con agua destilada y el colorante se solubilizó con una solución de metanol 10% y ácido acético 5%, en agitación por 5 min. Se registró la absorbancia a 595 nm con un lector de microplacas Asys UVM3400Z.

### **Migración en *Transwell***

Luego de una incubación de 24 h sin SFB, las células fueron sembradas en la cámara superior de los insertos *Transwell* de 8  $\mu$ m de poro (Corning, Estados Unidos), en un volumen de 100  $\mu$ l de medio sin SFB. Se sembraron en la cámara superior de los insertos *Transwell*  $3 \times 10^5$  células CHP-212 o SK-N-AS, y  $1 \times 10^5$  células LN229 o SW1088. En el caso de células silenciadas, luego de 48 h de silenciamiento (con 24 h sin SFB) las mismas fueron sembradas en los insertos. Se colocó en la cámara inferior de los insertos el medio correspondiente conteniendo 10% de SFB como quimioattractante. Luego de

## *-Materiales y Métodos-*

24 h de incubación en los insertos, en condiciones estándar de cultivo, las células que migraron fueron fijadas y teñidas con solución de cristal violeta 0,5% y metanol 20%. Las células que no migraron fueron removidas con cotonete. Las células que migraron fueron capturadas mediante microscopio invertido (Leica Dmi1). Se adquirieron cinco campos en aumento 40X, los cuales fueron cuantificados y normalizados al control.

### **Cromatografía de Intercambio aniónico de alto rendimiento con detección de fluorescencia**

El análisis de la composición de N-glicanos, por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección de fluorescencia (HPAEC-FL), fue realizado en el *GlycoAnalytics Core* de la Universidad de San Diego, California. Se utilizaron 50 µg de proteína total proveniente de lisados de las líneas LN229, U87MG, U251 y U373, realizados con *buffer* Ripa (TrisHCl 1M, NaCl 5M, Triton X100 0,1% v/v). La cuantificación de proteína total fue realizada por método colorimétrico con ácido bicinónico mediante el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) según instrucciones del fabricante. Los N-glicanos fueron liberados mediante el kit PNGasa F recombinante (New England Biolabs, Estados Unidos). Los N-glicanos liberados fueron pasados por cartuchos Sep-Pak C18 y carbono grafito poroso (PGC) conectados en tándem, equilibrados en agua. Los glicanos unidos a PGC se eluyeron con acetonitrilo al 30%, TFA 0,1% en agua, y se liofilizaron en vacufuge plus, 30 V-AQ. Para la marcación fluorescente los glicanos se resuspendieron con 2-amino bencidina (2-AB) disuelto en una mezcla de reacción de cianoborohidruro a 65 ° C durante 2,5 h. El exceso de reactivo se eliminó con cartucho de *Glycoclean S*. Los glicanos marcados con 2-AB se separaron por HPAEC y se detectaron mediante fluorescencia usando una columna Dionex Carbo-Pak PA-1 o PA-100 utilizando hidróxido de sodio y gradiente de acetato de sodio. Se utilizaron como patrones los N-glicanos de RNAsa b y Fetuina A, requeridos para las asignaciones de glicanos, cuyas señales cromatográficas se encuentran validadas por espectrometría de masas. Estos patrones permiten identificar estructuras de 1) N-glicanos complejos cortos no sialilados como G0F1, G1F1, G2F1 (donde G y F indican el número de galactosas y fucosas, respectivamente); 2) N-glicanos de oligomanosa como Man5/6/7/8/9; y 3) estructuras complejas tri-antenarias con

## *-Materiales y Métodos-*

diferente número de ácidos siálicos (3ant 1/2/3/4 Sia). Los cromatogramas fueron analizados mediante el *software Chromeleon™ 6.8 Chromatography Data System* (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos). Las áreas de los picos de los cromatogramas proporcionaron la abundancia de cada especie.

### Inmunoprecipitación de proteínas

Para una reacción de inmunoprecipitación (IP),  $4 \times 10^6$  células LN229 fueron lavadas con PBS, lisadas con 600  $\mu$ l de *buffer* RIPA suplementado inhibidor de proteasas y centrifugadas por 30 minutos a 12000 g y 4°C. El sobrenadante fue incubado con 15  $\mu$ l de *beads* de proteína A-sefarosa (Invitrogen, Estados Unidos) (previamente lavadas con PBS), durante 60 minutos a 4°C en agitador orbital. Seguidamente, el lisado fue centrifugado a 3000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante fue recuperado e incubado con el anticuerpo monoclonal contra EGFR o Integrina  $\alpha$ v (concentraciones 1/100) en agitación a 4°C, *overnight*. Luego, se adicionaron 30  $\mu$ l de *beads* de proteína A-sefarosa (previamente lavadas con PBS) y se agitó durante 2 horas a 4°C. Finalmente, las *beads* unidas a los complejos anticuerpo-proteína se lavaron tres veces con PBS mediante centrifugación a 3000 rpm durante 2 minutos. Finalmente, se resuspendió en un volumen final de 50  $\mu$ l de PBS. Las proteínas fueron eluidas del complejo mediante incubación por 10 minutos a 95°C.

### *SDS PAGE y Western Blot*

Monocapas celulares de  $5 \times 10^5$  células, fueron lisadas con *buffer* RIPA suplementado con inhibidor de proteasas y de fosfatasa (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Los lisados fueron clarificados y la concentración de proteínas normalizada mediante cuantificación por método colorimétrico con ácido bicinónico mediante el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) según instrucciones del fabricante. Se adicionó *buffer* de siembra a los lisados celulares totales o proteínas inmunoprecipitadas y las mismas fueron incubadas a 100°C durante 5 min. 150  $\mu$ g de los lisados celulares totales, 15  $\mu$ g (EGFR) o 10  $\mu$ g (Integrina  $\alpha$ v) de las IPs, fueron sembrados en gel de poliacrilamida de 1,5 mm de espesor. Para lisados totales o

## *-Materiales y Métodos-*

IP de Integrina  $\alpha_v$  se utilizó gel de poliacrilamida 10%, y 8% para EGFR. Se utilizó el marcador de peso molecular *Full Range Rainbow* (GE Healthcare, Estados Unidos). La corrida electroforética se realizó a 100 v durante 2 h. Posteriormente las proteínas fueron transferidas mediante transferencia semiseca a membrana de *polyvinylidene difluoride* (PDVF, GE Healthcare, Estados Unidos) de 0,45 $\mu$ m.

Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h mediante una suspensión de leche en polvo baja en grasas en TBS-Tween 0,1% y luego incubadas *overnight* con anticuerpo primario, siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. Luego de tres lavados de 5 min con TBS-Tween 0,1%, las membranas se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente, anti-inmunoglobulinas de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) o de ratón (Vector, Estados Unidos) conjugados a HRP (*Horseradish Peroxidase*). Luego de tres lavados de 5 min con TBS-Tween 0,1%, las membranas fueron incubadas con un kit de bioluminiscencia (Bio-Lumina, PBL, Argentina) por 1 min.

Para los *Western Blots* con lectinas, las membranas luego de ser transferidas fueron bloqueadas *overnight* con una solución de sero-albúmina bovina (BSA) (Bio-Rad, Estados Unidos) 1% en TBS-Tween 0,1%. Seguidamente, fueron incubadas durante 1 h con una solución de la lectina biotinilada y el complejo estreptavidina-HRP.

En ambos casos, la imagen de la membrana fue capturada usando el C-DiGit<sup>®</sup> Blot Scanner (Li-Cor, Estados Unidos).

## Concentración de proteínas

Para los ensayos de espectrometría de masas, las inmunoprecipitaciones fueron concentradas mediante el uso de centricones Vivaspin<sup>®</sup> 500 (Sartorius AG, Alemania), según las instrucciones del fabricante. 450  $\mu$ l (150  $\mu$ g aproximadamente) del producto de IP fueron centrifugadas a 15000 rpm durante 2,30 h, hasta alcanzar un volumen final entre 50 y 75  $\mu$ l. Dicho volumen fue sometido a corrida electroforética y tinción con *Coomassie* coloidal.

## Tinción de proteínas por *Coomassie* coloidal

Luego de la corrida electroforética, los geles de las muestras utilizadas para el servicio de espectrometría de masas (nanoLC-MS/MS) fueron fijados durante 3 h en una solución de 50% Metanol, 2% ácido fosfórico. Seguidamente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con agua bidestilada y luego los geles se incubaron durante 1 h en solución de equilibrado (33% metanol, 17% sulfato amónico, 3% ácido fosfórico). Luego de este tiempo, se adicionó *Coomassie Brilliant Blue G 250* (*Coomassie* coloidal, Sigma Aldrich, Estados Unidos), en una concentración final 0.06% *Coomassie* y se incubó *overnight*. Finalmente, los geles fueron lavados 3 veces con agua bidestilada en agitación y se cortaron las bandas de las proteínas de interés.

## Espectrometría de masas

Para la identificación de proteínas de los picos principales en el cromatograma RP, se recortaron las bandas diana de los geles *SDS PAGE* teñidos con *Coomassie Brilliant Blue G 250* (Sigma Aldrich, Estados Unidos). La digestión de proteínas y el análisis por espectrometría de masas (EM) se realizaron en el Servicio de Proteómica del CEQUIBIEM de la Universidad de Buenos Aires/CONICET. Brevemente, las bandas cortadas se lavaron secuencialmente con 50 mM de bicarbonato de amonio (AB), 25 mM AB, 50% ACN y 100% ACN; se redujeron y alquilaron con 10 mM de ditioneitol (DTT) y 20 mM de yodoacetamida (IAA), y se digirieron en gel con 100 ng de tripsina (Promega, Estados Unidos) en 25 mM AB *overnight* a 37°C. Los péptidos se recuperaron por elución con un 50% de ACN / 0,5% de TFA, incluyendo una breve sonicación, y luego se concentraron por secado rápido al vacío. Las muestras se resuspendieron en 15 µL de agua conteniendo 0,1% de ácido fórmico (AF). Los productos de digestión se analizaron por nanoLC-MS/MS en un nanoHPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) acoplado a un espectrómetro de masas QExactive. Para la desalinización de los péptidos se utilizó una precolumna C18 (Acclaim PepMap 3 µm, 100a, 75 µm x 20mm), y posteriormente se utilizó un gradiente de 75 minutos de H<sub>2</sub>O: ACN a un flujo de 33 nL/min con una columna Easy Spray C18 de 2 mm x 150 mm. Se utilizó el método MS2, dependiente de los datos, para fragmentar los picos de mayor intensidad de cada ciclo.

## -Materiales y Métodos-

Los datos crudos del análisis de espectrometría de masas se procesaron utilizando el software *Proteome Discoverer*, versión 2.1.1.21 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) para la búsqueda en bases de datos con el algoritmo de búsqueda SEQUEST. La búsqueda se realizó contra una base de datos de Uniprot *Homo sapiens* y seleccionándose tripsina como la enzima utilizada. La tolerancia de masa del precursor se estableció en 10 ppm y la tolerancia de iones del producto en 0,05 Da. Se estableció como modificación fija la carbamidometilación de Cys, y como modificación dinámica a la oxidación de Met. Las coincidencias de proteínas se filtraron para obtener coincidencias de péptidos de alta confianza con una tasa máxima de falsos positivos del 1% calculada mediante el empleo de una estrategia de base de datos inversa.

Para los análisis de espectrometría de masas de glicopéptidos se realizó previamente un paso de enriquecimiento. La mezcla resultante de la digestión trípica se enriqueció en glicopéptidos utilizando la técnica de *Cotton*-HILIC. La mezcla se solubilizó en 50  $\mu$ L de ACN 85% - H<sub>2</sub>O 15%, y se sembró en un cartucho de SPE-HILIC equilibrado en la misma solución. Se lavó con 25  $\mu$ L de ACN 85% - H<sub>2</sub>O 14% - 1% TFA y la fracción enriquecida en glicopéptidos se eluyó con 25  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. Esta última fracción se liofilizó y previo al análisis por espectrometría de masa se solubilizó en 5  $\mu$ L ACN 50% - 49% H<sub>2</sub>O - 1% TFA. Los péptidos identificados con identidad de la proteína de interés se segregaron en glicopéptidos en función de la presencia de *Oxonium ions* [M+H]<sup>+</sup> en sus espectros (como Hex y HexNAc, de señales en el espectro m/z de aproximadamente 163,06 y 204,08, respectivamente). En la **figura suplementaria 2** del Anexo se muestra la identificación de glicanos en uno de los glicopéptidos encontrados. Las estructuras de glicanos encontradas fueron corroboradas mediante la plataforma GlyConnect (<https://glyconnect.expasy.org/>).

## Inmunofluorescencia

5x10<sup>5</sup> células (LN229, T98G, SW1088, HS683) fueron sembradas sobre *coverslips* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) en placas de 6 *wells*. Una vez alcanzada la confluencia deseada los vidrios fueron lavados con PBS y fijados durante 10 min con formalina 4% en PBS. Luego de la fijación los vidrios fueron lavados en PBS y bloqueados durante una hora con BSA 1% en PBS.

## *-Materiales y Métodos-*

Para marcaciones de membrana, los vidrios fueron incubados con 0,5 µg de la lectina biotinilada PHA-L overnight a 4°C. Seguidamente fueron lavados tres veces en PBS e incubados con 0,5 µg del complejo estreptavidina-FITC en 50 µl de PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, los vidrios fueron lavados tres veces con PBS y montados utilizando medio de montaje con DAPI (Vector Laboratories, Estados Unidos).

Para marcaciones intracelulares, antes del bloqueo, las células fueron permeabilizadas mediante incubación con Tween 0,1% en PBS durante 5 min. Posterior al bloqueo las células fueron incubadas con faloidina conjugada a Alexa Fluor-555 (Invitrogen, Estados Unidos) durante 25 min. Los vidrios fueron lavados tres veces en PBS y montados. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio confocal TCS SP8.

### Estudio del citoesqueleto de actina

5x10<sup>5</sup> células fueron sembradas en *coverslips*. Luego, las células fueron incubadas por 24 h con TNM, SW o silenciadas con *siRNA* (MGAT5) según los protocolos anteriormente detallados (en medio sin SFB). Para el silenciamiento, luego de 24 h de transfección las células fueron desprovistas de suero por 24 h antes de la estimulación. Luego de los tratamientos, las células fueron lavadas y estimuladas con 100 ng/ml de EGF (Sigma, Estados Unidos) durante 15 min. Luego de la estimulación, las células se fijaron y tiñeron con faloidina según indica el protocolo de inmunofluorescencia. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio confocal TCS SP8.

### Microscopía confocal

Se utilizó un Microscopio Confocal invertido de escaneo espectral, marca Leica, modelo TCS SP8 (*Leica laser-scanning spectral confocal microscope TCS SP8; Leica Microsystem*) equipado con una línea de láser de diodo, láser Helio-Neón y un láser argón multilínea. Los fluorocromos empleados fueron: DAPI (exc: 405 nm), Alexa Fluor-555 y 594 (exc: 561nm) y FITC (exc: 488 nm). La observación se realizó con los objetivos 20X y 40X (*zoom in 1-2*). Las imágenes fueron capturadas mediante escaneo secuencial (*sequential scans*) configurando diferentes canales de detección para cada fluorocromo, cada canal de detección posee un fotomultiplicador independiente. Además, el *software*

## *-Materiales y Métodos-*

LasX que provee el fabricante y que opera el microscopio permitió digitalizar imágenes en el formato JPG con una resolución de 1024 x 1024 píxeles.

### **Análisis estadísticos**

La significancia estadística fue evaluada mediante el programa *GraphPad Prism* (GraphPad, Inc., Estados Unidos). Los resultados presentes en este trabajo están expresados como la media y su desvío estándar. Se realizó el análisis de la normalidad de los datos previo a la prueba estadística. Para comparaciones entre dos muestras independientes se utilizó el T. Test o el test Mann–Whitney, según corresponda. Para comparaciones múltiples entre grupos experimentales se realizó ANOVA, seguido de Tukey como post test. La significancia fue definida como \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0.01$  y  $p^{***} < 0.001$ .



## Capítulo I

---

*Participación de la glicosilación aberrante  
en la agresividad del neuroblastoma*







# Neuroblastoma

## Características clínicas y biológicas del neuroblastoma

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más común en la infancia, representa aproximadamente entre el 7% y 10% de los cánceres pediátricos y el 15% de todas las muertes por cáncer pediátrico en pacientes menores de 15 años a nivel mundial. Se caracteriza por ser una enfermedad biológicamente heterogénea, con un comportamiento clínico variado en donde se observan pacientes con una rápida progresión de la enfermedad y casos de regresión espontánea. Como resultado, tanto el pronóstico como la respuesta al tratamiento pueden variar sustancialmente<sup>212</sup>.

El NB es un tumor embrionario que deriva de precursores de células del sistema nervioso periférico (simpático)<sup>213</sup>. La mayoría de los NBs se estima que surgen de células derivadas de la cresta neural, principalmente de precursores simpaticoadrenales. La localización del tumor primario generalmente es la médula suprarrenal, sin embargo, los ganglios simpáticos paraespinales en el cuello, el pecho, el abdomen o la pelvis también pueden ser sitios primarios. Aproximadamente la mitad de los pacientes presentan formas diseminadas de la enfermedad en el momento del diagnóstico, la cual puede ocurrir a través de la vía linfáticas y/o hematogena. Aproximadamente el 35% tiene diseminación en ganglios linfáticos regionales en el momento del diagnóstico. Además, los huesos, la médula ósea y el hígado son los sitios más comunes de diseminación hematogena<sup>214,215</sup>.

## Lesiones genéticas

La aberración cromosómica más frecuente asociada con un mal pronóstico es la amplificación somática del oncogén MYCN (del inglés *V-myc myelocytomatosis viral-related oncogene*). También se incluyen otras alteraciones cromosómicas como las deleciones homocigotas de 1p y 11q (LOH, del inglés *Loss of Heterozygosity events*) y la ganancia desbalanceada de 17q<sup>212,216</sup>. En relación a mutaciones, estudios de secuenciación del exoma y genoma completo sobre muestras de tejido de NB mostraron

un recuento bajo de mutaciones somáticas y han concluido que no existe un evento de mutación genética único que sea común a todos los casos de NB<sup>217</sup>. La quinasa de linfoma anaplásico (ALK) es el gen mutado más frecuente detectado en el 7% al 10% de los NB primarios, el cual tiene un supuesto rol en la regulación de la diferenciación neuronal. Las mutaciones ALK también están presentes en casi todos los casos de NB familiares, los cuales representan sólo del 1% al 2% de los casos de NB. Esta quinasa de superficie celular es un objetivo terapéutico promisorio para el NB de alto riesgo<sup>212,218</sup>.

De la multitud de factores pronósticos conocidos, muchos de ellos no tienen un valor independiente y se presentan asociados con otros de mayor peso. La edad, el estadio y la amplificación MYCN son los factores admitidos como marcadores con valor pronóstico independiente, siendo la amplificación de MYCN el principal indicador de pronóstico adverso para el NB<sup>214</sup>. Desde el 2009 se ha implementado un sistema de clasificación guiado por el Sistema de Estadificación del Grupo de Riesgo de Neuroblastoma (INRGSS, del inglés, *International Neuroblastoma Risk Group Staging System*), a fin de desarrollar un enfoque consensuado para la estratificación del riesgo previo al tratamiento<sup>219</sup>. Dicho sistema clasifica los diagnósticos en grupos de riesgo muy bajo, bajo, intermedio o alto, según edad, histología, grado de diferenciación, estatus de MYCN, alteraciones en el cromosoma 11q y la ploidía. Como una característica general de esta clasificación, la amplificación del oncogén MYCN categoriza de manera directa al tumor como de alto riesgo<sup>220,221</sup>.

La amplificación MYCN ocurre aproximadamente en el 25–33% de los pacientes considerándose una característica del NB agresivo<sup>214,222</sup>. El proto-oncogén MYCN codifica para la proteína N-MYC, y es considerado un regulador maestro de transcripción que puede activar genes que afectan características distintivas del cáncer, como el crecimiento sostenido y la represión de genes que impulsan la diferenciación<sup>212,214</sup>.

La amplificación de MYCN se correlaciona con el comportamiento invasivo y metastásico<sup>223</sup>. MYCN contribuye a todas las facetas de la metástasis: adhesión, motilidad, invasión y degradación de las matrices circundantes. Se ha observado que células de NB con amplificación de MYCN presentan una regulación negativa de las integrinas  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  y una mayor transcripción de la quinasa de adhesión focal (FAK), favoreciendo el desprendimiento de la matriz extracelular y la motilidad celular<sup>224,225</sup>. Líneas celulares con amplificación de MYCN mostraron mayor migración e invasión que

líneas sin dicha alteración<sup>226</sup>. Además, MYCN se encuentra vinculado a un aumento de la expresión, secreción y activación de metaloproteasas, lo que probablemente conduce a un fenotipo más tumorigénico debido a una mayor invasión mediada por las metaloproteasas que degradan la matriz<sup>227</sup>. Sumado a los eventos en el proceso de metástasis, la amplificación de MYCN correlaciona con una alta vascularización, lo cual también favorece la diseminación y es característica de un fenotipo más agresivo<sup>228</sup>.

## **Tratamiento**

La terapéutica actual para el grupo de alto riesgo incorpora quimioterapia de inducción (para reducir la carga de tumor primario y metástasis) usando un régimen de quimioterapia combinada con cuatro a seis agentes, con eliminación de células madre de sangre periférica. Se continúa con una cirugía retrasada para eliminar el tumor primario y subsecuente quimioterapia mieloablativa apoyada con el trasplante de células madre hematopoyéticas autólogas. Luego se indica terapia de mantenimiento para tratar la enfermedad mínima residual con inmunoterapias basada en el monoclonal anti-GD2 y citoquinas, además de terapia de diferenciación con isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico). Durante la terapia de inducción puede ocurrir resistencia al fármaco y evolución clonal, lo que puede conducir a una recaída si los tumores no se eliminan mediante terapia mieloablativa y la terapia de mantenimiento<sup>223,229-231</sup>. La supervivencia a 5 años de los pacientes con NB de alto riesgo ha crecido de 29% a 50% en los últimos 30 años, mejora atribuida a la terapia mieloablativa e inmunoterapia. A pesar de que la perspectiva ha mejorado, nuevos avances en el tratamiento son imprescindibles<sup>229</sup>.

## **Glicosilación aberrante en neuroblastoma**

A pesar de que el conocimiento sobre la participación de los glicanos en la biología de los tumores está en continuo crecimiento, poco se explora sobre la glicobiología de los cánceres pediátricos y el papel que desempeñan los glicanos en el fenotipo maligno de tumores como el NB<sup>61</sup>. Muchos informes se centran en el estudio de las glicosiltransferasas, pero muy pocos describen la expresión de glicanos en esta indicación.

En cuanto a estudios histopatológicos de glicoconjugados en esta indicación, sin duda, el estudio más profundo ha sido realizado sobre los gangliósidos. Uno de los ejemplos más relevantes es el gangliósido GD2. Su expresión es un indicador de la presencia de NB, y los altos niveles de GD2 circulante se han correlacionado con una progresión más rápida de la enfermedad entre pacientes en etapas avanzadas<sup>232</sup>. El beneficio clínico de la terapia anti-GD2 (Dinituximab), para esta indicación, subraya el importante papel que este glicolípido tiene en la biología de estas células tumorales<sup>233</sup>.

También existen algunos reportes sobre la glicosilación aberrante en el campo de los N-glicanos. Se ha reportado una comparación de la variación glicómica entre dos líneas celulares de NB con y sin amplificación de MYCN, a través de una combinación de cromatografía líquida-espectrometría de masas y análisis bioinformático. En este reporte se identificaron estructuras de glicanos más grandes y más sialiladas en las células con amplificación de MYCN<sup>234</sup>. En relación con la glicosilación específica de proteínas, se ha demostrado que la expresión de la molécula de adhesión intercelular-2 (ICAM-2) limita la motilidad de un panel de líneas celulares de NB *in vitro*, y suprime el desarrollo de tumores diseminados en un modelo de NB metastásico *in vivo*. Sin embargo, la mutagénesis dirigida sobre sitios de N-glicosilación de ICAM-2 resulta en una capacidad atenuada de la supresión tumoral, exponiendo el rol de los N-glicanos en la función antimetastásica de esta proteína<sup>235,236,237</sup>.

Si bien la glicosilación alterada de glicoconjugados es un sello distintivo de los carcinomas, que expresan versiones truncadas o sialiladas de las contrapartes normales como los O-glicanos truncados o la familia Lewis, existe poca evidencia sobre su presencia en NB. La primera publicación en NB analiza solo 5 muestras de tumores fijados en parafina, describiendo la ausencia de expresión de los antígenos T, Tn, STn, Le<sup>a</sup>, SLe<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Le<sup>x</sup>, SLe<sup>x</sup>, polifucosil-Le<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup><sup>86</sup>. No se han encontrado otros informes que caractericen la expresión de estos glicanos asociados a tumor sobre NB en los últimos años.

Sin embargo, la descripción de estructuras de glicanos O-GalNAc de tipo mucina (como Tn) en ciertas proteínas de neuronas, como sindecan-3 y la  $\alpha$ -sinucleína humana relacionada con la enfermedad de Parkinson, condujo el interés hacia la búsqueda del rol de glicosiltransferasas vinculadas a la síntesis de esta familia de O-glicanos en NB<sup>238-240</sup>. Estudios sobre las glicosiltransferasas relacionadas a la síntesis de mucinas sugieren

que estas estructuras tienen un papel importante en la biología del NB. Entre ellas se destaca la familia de las iniciadoras de la glicosilación O-GalNAc (genes GALNT). El grupo de Berois y colaboradores reportó que GALNT13 puede servir como un marcador para el diagnóstico molecular de la afectación de la médula ósea y seguimiento de enfermedad mínima residual en pacientes con NB<sup>241</sup>. El análisis de expresión de transcritos de GALNT13 en varias líneas celulares de NB, así como en tumores neuroblásticos favorables y de alto riesgo, mostraron que GALNT13 es sobreexpresado en neuroblastos más agresivos. El mismo grupo, propone a GALNT9 como marcador de buen pronóstico en pacientes con NB. Mediante el análisis de perfiles de expresión de GALNTs se demostró que GALNT9 tiene una expresión opuesta a GALNT13, y en un modelo experimental *in vivo* se encontró expresada en neuroblastos derivados del tumor primario, pero no en neuroblastos derivados de metástasis de médula ósea<sup>232,242</sup>. En relación con un buen pronóstico, Ho y colaboradores han informado que la sobreexpresión de GALNT2 en tumores primarios se correlacionan con el grado de diferenciación histológica y estadios clínicos tempranos<sup>243</sup>.

La expresión de glicosiltransferasas encargadas de la extensión también se encuentran asociadas a un valor pronóstico en NB. En contraste con otros tipos de cáncer, la expresión de GnT-V (MGAT5) en NB se encuentra asociada a un pronóstico favorable y respuesta al tratamiento<sup>244</sup>. Por otro lado, Ho y colaboradores describieron que la expresión de B3GNT3 (cuyo producto cataliza la extensión del *core* 1 de los glicanos O-GalNAc) modula el fenotipo maligno en una línea de NB y predice una tasa de supervivencia favorable de 5 años para los pacientes<sup>245</sup>. El mismo grupo reportó que la expresión de B4GALNT3 (asociado a la síntesis de estructuras LacdiNAc) en tumores de NB, se correlaciona positivamente con el estado de diferenciación y estadios clínicos tempranos<sup>246</sup>. Por otro lado, la sobreexpresión de B4GALT3, involucrada en la síntesis de estructuras de poli-LacNAc, se correlaciona negativamente con el histología de los tumores y se propone como un factor pronóstico desfavorable independiente para pacientes con NB<sup>61,247</sup>.

Mediante la incorporación de nuevos conocimientos sobre la biología molecular del NB y la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos, se podrá aumentar la precisión del tratamiento para mejorar la supervivencia y la calidad de vida del paciente. En este sentido la investigación en glicobiología del cáncer ha demostrado ser un nicho de

nuevos biomarcadores y posibles dianas terapéuticas en diferentes indicaciones. Es por ello que este capítulo se basa en la caracterización del fenotipo de glicanos y la expresión de glicosiltransferasas en NB en función de la amplificación de MYCN como criterio de agresividad.

*Objetivos Capítulo I*



## Objetivo General Capítulo I

Caracterizar la glicosilación aberrante en líneas celulares y material histológico de pacientes con NB humano con y sin amplificación del oncogén MYCN, evaluar su participación en la biología tumoral y la contribución de la acetilación de la cromatina como mecanismo de modulación. Esta caracterización se centra en N- y O-glicanos, sus ramificaciones, y las estructuras terminales de glicanos O-GalNAc truncados y de la familia Lewis.

## Objetivos Específicos Capítulo I

- I. Caracterizar la expresión de glicanos de la familia Lewis y O-glicanos truncados (O-GalNAc) en un panel de líneas celulares con y sin amplificación del oncogén MYCN como marcador de agresividad tumoral, mediante anticuerpos monoclonales (mAbs) y citometría de flujo (CF).
- II. Comparar los niveles de expresión de los transcritos codificantes para las glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de los glicanos de la familia Lewis, en el panel de líneas celulares y muestras de pacientes de NB humano, mediante qRT-PCR.
- III. Estudiar la estructura a la que se encuentran anclados los glicanos expresados, mediante la utilización del inhibidor de la N-glicosilación (TNM) y el silenciamiento del gen codificante para la glicosiltransferasa troncal en la síntesis de los glicanos O-GalNAc del *core 2*, C2GNT1.
- IV. Estudiar la expresión de ligandos de selectinas y evaluar la participación de los glicanos O-GalNAc del *core 2* en la unión a las mismas, sobre líneas celulares con y sin amplificación de MYCN, mediante selectinas recombinantes, silenciamiento de C2GNT1 y CF.
- V. Estudiar la participación de los glicanos O-GalNAc del *core 2* en eventos clave de la biología celular del NB, como la proliferación, adhesión y migración, mediante silenciamiento de C2GNT1.

- VI. Estudiar la regulación epigenética de la expresión de los glicanos y glicosiltransferasas caracterizadas, mediante la utilización del inhibidor de deacetilasas de histonas, tricostatina A (TSA).

*Resultados Capítulo I*



## Caracterización del perfil de glicanos

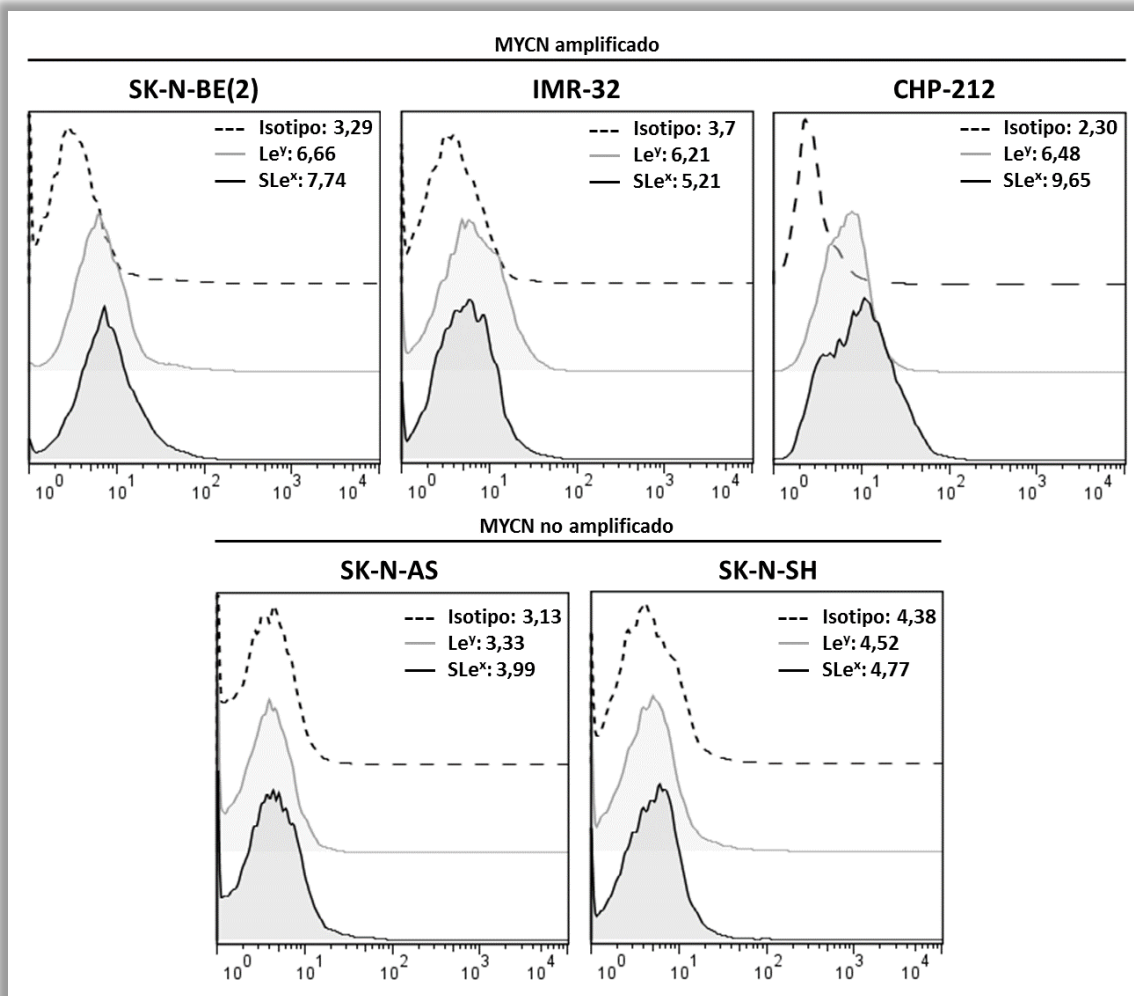
Se estudió la expresión de glicanos O-GalNAc truncados y de la familia Lewis sobre cinco líneas celulares de NB humano. Las mismas se clasificaron en dos grupos según el estatus de amplificación del oncogén MYCN. Se utilizaron las líneas celulares de NB humano CHP-212, IMR-32 y SK-N-BE(2), con amplificación de MYCN, y las líneas SK-N-AS y SK-N-SH, sin amplificación del mismo.

En la **Tabla I.1** se presentan las intensidades medias de fluorescencia relativas al control de isotipo (IMFr), obtenidas mediante CF para cada anticuerpo. Se consideró como alta expresión niveles mayores a 1,5 IMFr, media entre 1,5 y 1,25 y baja menor a 1,25. En la **figura I.1** se pueden observar los histogramas para la expresión de SLe<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup> en las cinco líneas celulares utilizadas, con las intensidades de fluorescencia (IF) correspondientes a un ensayo representativo.

En términos generales, el grupo con amplificación de MYCN presentó mayor expresión de los glicanos de la familia Lewis en comparación con el grupo sin amplificación del oncogén. No se encontraron diferencias entre grupos en cuanto a la expresión de O-glicanos truncados. Las líneas que amplifican MYCN (SK-N-BE(2), IMR-32 y CHP-212) presentaron alta y media expresión de SLe<sup>x</sup>, Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup> and Le<sup>b</sup>. La expresión de los glicanos Le<sup>a</sup> y SLe<sup>a</sup> fue media y alta en CHP-212 y SK-N-BE(2), respectivamente. En relación a los O-GalNAc truncados, baja o nula presencia fue observada en la mayoría de las líneas celulares, a excepción del antígeno T (*core 1*) que presentó alta y media expresión en SK-N-BE(2) (MYCN amplificado) y SK-N-SH (MYCN no amplificado), respectivamente.

	-Líneas celulares de Neuroblastoma Humano-				
	MYCN amplificado			MYCN no amplificado	
	SK-N-BE(2)	IMR-32	CHP-212	SK-N-AS	SK-N-SH
<b>Familia Lewis</b>					
Le <sup>a</sup>	1,53 ± 0,25	1,08 ± 0,05	1,01 ± 0,08	1,17 ± 0,05	1,03 ± 0,12
SLe <sup>a</sup>	1,10 ± 0,18	1,03 ± 0,01	1,32 ± 0,31	1,09 ± 0,08	1,11 ± 0,05
Le <sup>b</sup>	2,29 ± 0,30	2,27 ± 0,19	1,32 ± 0,20	1,37 ± 0,06	1,05 ± 0,02
Le <sup>x</sup>	2,19 ± 0,63	1,51 ± 0,09	1,66 ± 0,14	1,16 ± 0,16	1,05 ± 0,10
SLe <sup>x</sup>	1,87 ± 0,14	1,32 ± 0,09	5,33 ± 1,29	1,23 ± 0,13	1,15 ± 0,09
Le <sup>y</sup>	1,75 ± 0,45	1,72 ± 0,55	2,70 ± 0,32	1,04 ± 0,11	1,15 ± 0,13
<b>O-Glicanos truncados</b>					
T	1,57 ± 0,25	1,21 ± 0,14	1,09 ± 0,03	1,11 ± 0,05	1,38 ± 0,06
Tn	1,06 ± 0,02	1,07 ± 0,02	1,07 ± 0,05	1,06 ± 0,04	1,15 ± 0,06
STn	1,02 ± 0,06	1,06 ± 0,04	1,05 ± 0,06	1,10 ± 0,06	1,06 ± 0,03

**Tabla 1.1 | Expresión de glicanos de la familia Lewis y O-Glicanos truncados (O-GalNAc) en las líneas celulares de NB con y sin amplificación de MYCN.** Los valores expresados representan el promedio de las IMFr, de tres ensayos independientes con su desvío estándar. Fue considerada baja expresión por debajo de 1,25 IMFr, media entre 1,25 y 1,5, y alta mayor a 1,5 IMFr.

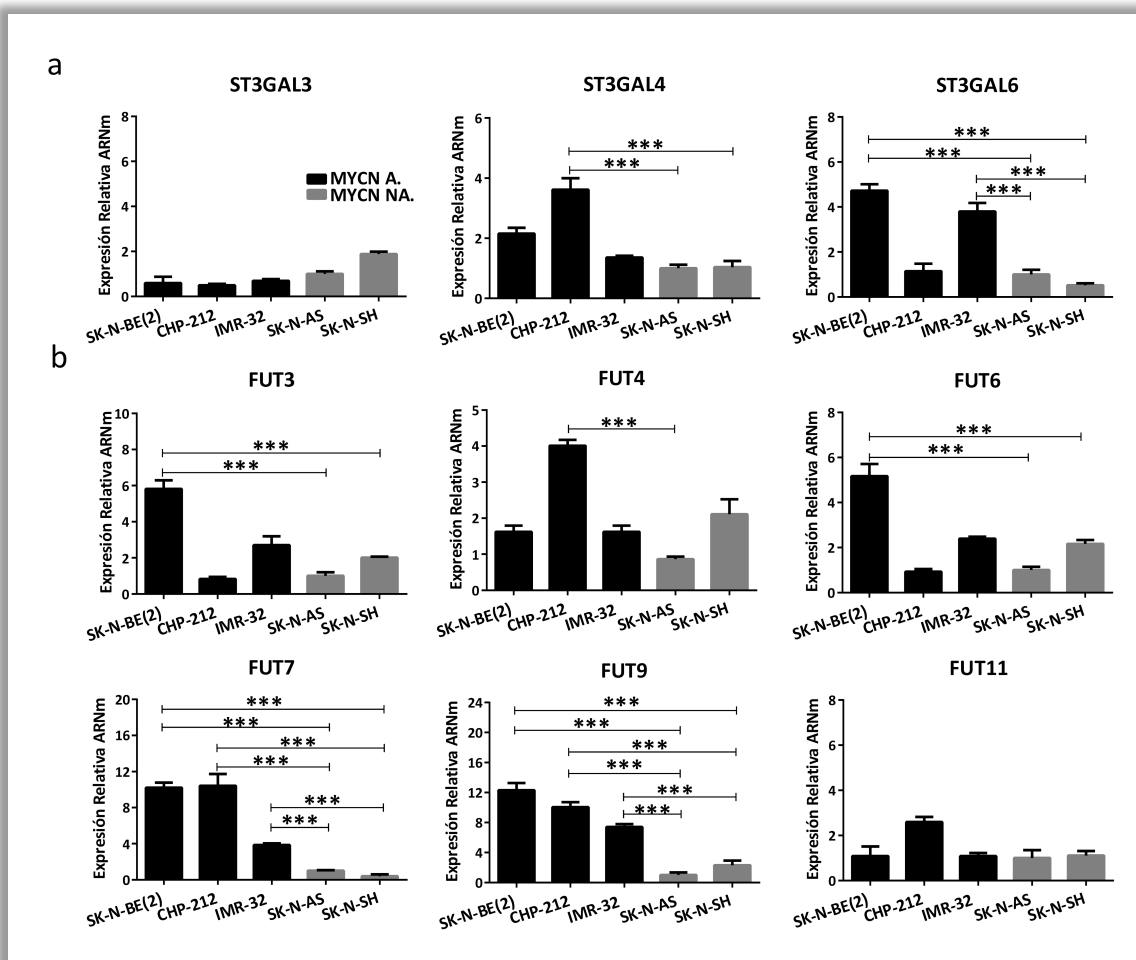


**Figura I.1 | Expresión de los glicanos SLe<sup>X</sup> y Le<sup>Y</sup> en las líneas celulares de NB con y sin amplificación de MYCN.** Los valores expresados representan las IMF, correspondientes a cada anticuerpo, de un ensayo representativo.

### Caracterización del perfil de expresión de glicosiltransferasas

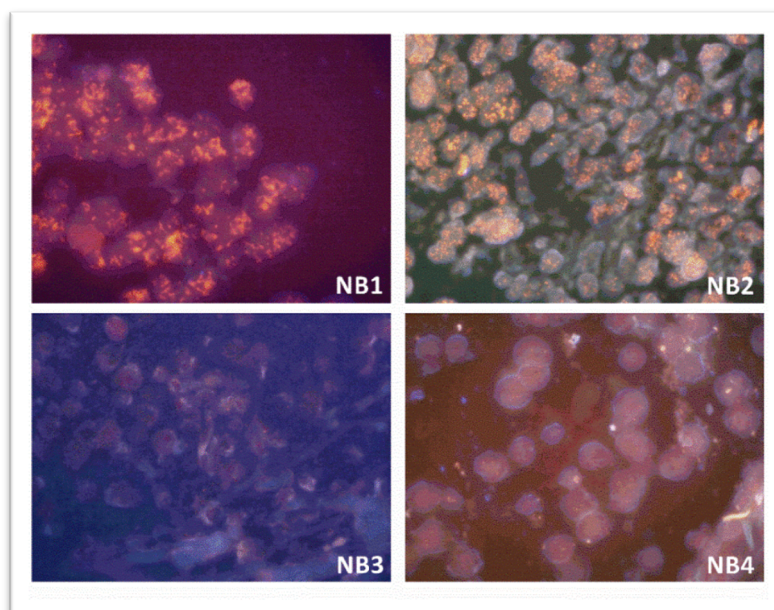
Debido a que los glicanos Lewis presentaron una expresión diferencial entre los grupos de estudio, se continuó con el estudio de esta familia en mayor profundidad. Luego de estudiar la presencia de estas familias de glicanos, se comparó la expresión de ARNm de las glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de los glicanos Lewis mediante qRT-PCR. Particularmente se evaluaron genes codificantes para fucosiltransferasas  $\alpha$ 1-3/ $\alpha$ 1-4 (FUT3, 4, 5, 6, 7, 9 y 11) y sialiltransferasas  $\alpha$ 2-3 (ST3GAL3, 4 y 6).

En la **figura 1.2** se presenta la expresión comparada de la transcripción de las glicosiltransferasas antes mencionadas, sobre las cinco líneas celulares de NB agrupadas según la amplificación de MYCN. En general, el grupo con amplificación del oncogén presentó sobreexpresión de los niveles de ARNm de al menos una sialiltransferasa y más de una fucosiltransferasa. CHP-212 mostró sobreexpresión de ST3GAL4, FUT4/7/9, y por su lado, IMR-32 de ST3GAL6 y FUT7/9. SK-N-BE(2) mostró sobreexpresión de ST3GAL6 y FUT3/6/7/9.



**Figura 1.2 | Comparación relativa de los niveles de transcritos para las glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de los glicanos de la familia Lewis en las líneas de NB con y sin amplificación de MYCN. (a) Sialiltransferasas (b) Fucosiltransferasas. Los niveles de ARNm fueron analizados mediante qRT-PCR, mediante el diseño  $\Delta\Delta CT$ . SK-N-AS se utilizó como muestra de referencia. Los valores representan la media y desvío estándar de tres ensayos independientes. \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA, seguido de post test Tukey.**

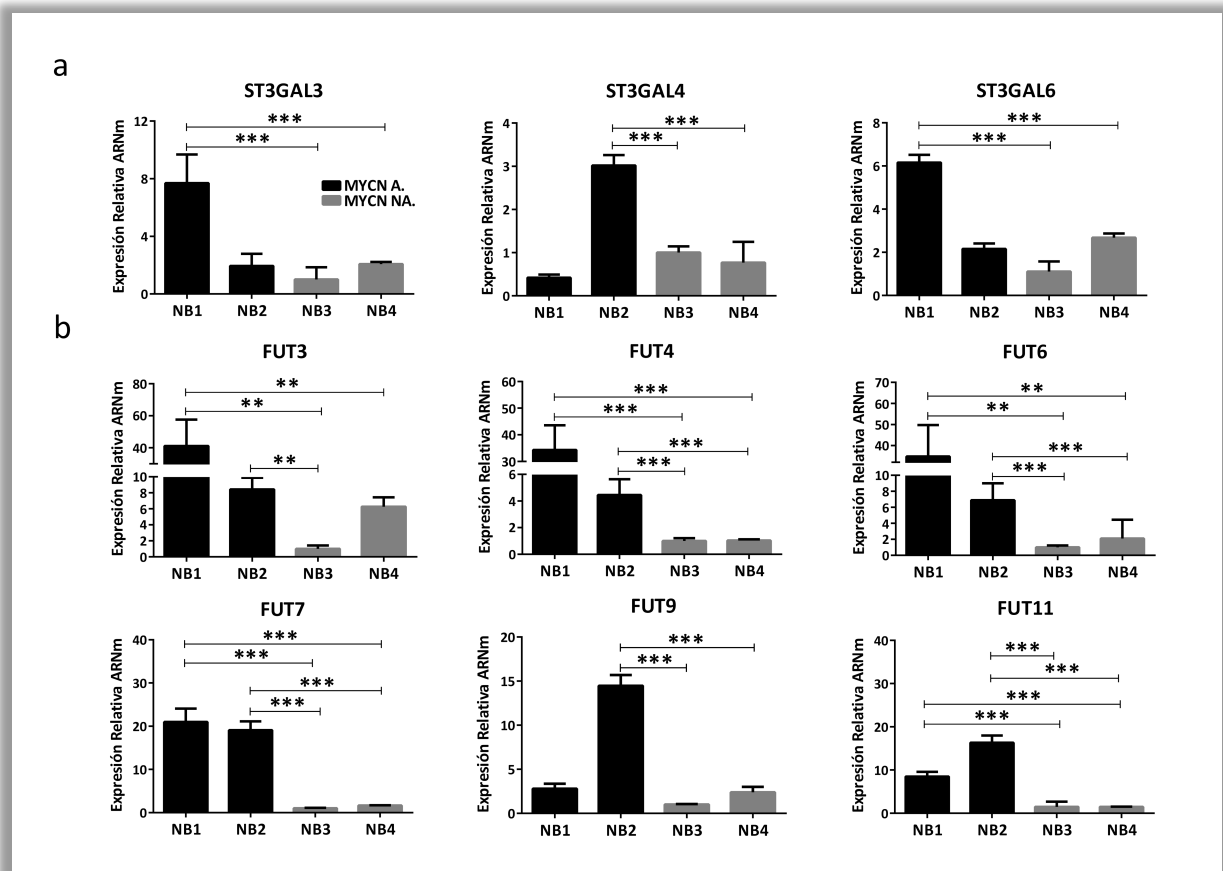
De la misma manera en que se estudió sobre líneas celulares, se evaluaron los niveles de la expresión de ARNm de las glicosiltransferasas sobre muestras tumorales de pacientes diagnosticados con NB. Se extrajo ARN de tejido tumoral proveniente de dos pacientes con amplificación de MYCN (muestras NB1 y NB2) y dos sin amplificación (muestras NB3 y NB4). El estatus de amplificación de MYCN fue evaluado mediante hibridación fluorescente in situ (FISH), sobre piezas pareadas a las que se utilizaron para los análisis de qRT-PCR. En la **figura I.3** se puede observar la señal producida por la unión de la sonda sobre las cuatro muestras utilizadas.



**Figura I.3 | Determinación del estado de amplificación de MYCN en muestras de pacientes, mediante Hibridación in situ fluorescente (FISH).** MYCN amplificado NB1 y NB2: MYCN no amplificado NB3 y NB4. Se utilizó la sonda LSI MYCN (2p24.1) y las imágenes fueron adquiridas con microscopio de fluorescencia (Eclipse 80i, Nikon, Japón), en aumento 40X.

En la **figura I.4** se presenta la expresión comparada de los niveles de transcritos de las glicosiltransferasas para los tumores de pacientes. NB1 mostró sobreexpresión de ST3GAL3/6, y de FUT3/4/6/7/11. La muestra NB2 presentó niveles significativamente mayores de expresión de ARNm de ST3GAL4 y de todas las fucosiltransferasas evaluadas, frente a las muestras que no amplifican MYCN. Las muestras sin amplificación

de MYCN presentaron niveles significativamente menores de transcripción de todas las glicosiltransferasas evaluadas.



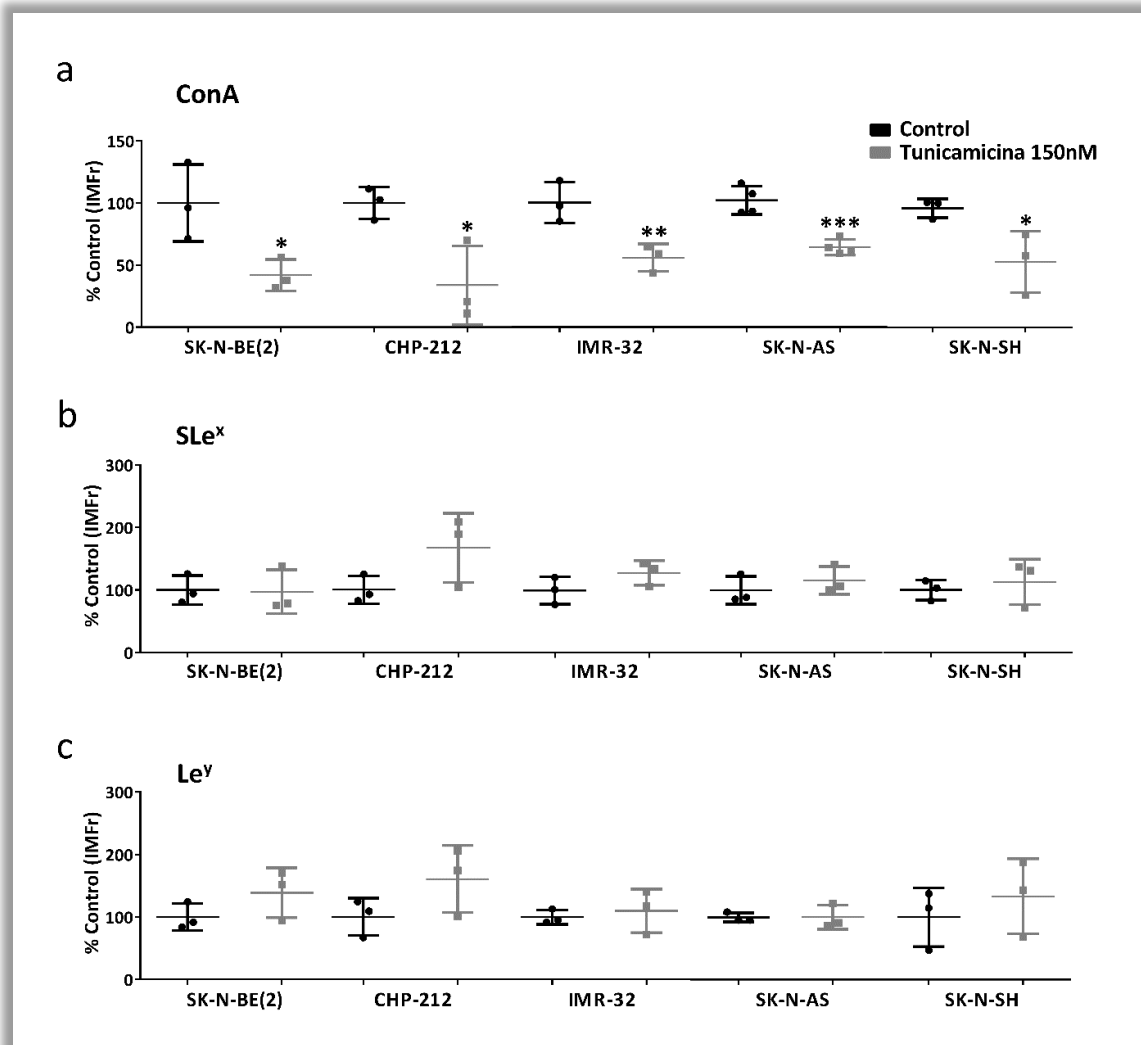
**Figura 1.4 | Comparación relativa de los niveles de transcritos codificantes para las glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de los glicanos de la familia Lewis en las muestras de pacientes de NB con y sin amplificación de MYCN. (a) Sialiltransferasas (b) Fucosiltransferasas. Los niveles de ARNm fueron analizados mediante qRT-PCR, mediante el diseño  $\Delta\Delta CT$ . NB3 se utilizó como muestra de referencia. Los valores representan la media y desvío estándar de tres ensayos independientes. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA, seguido de post test Tukey.**

## Estructuras de N- y core 2 O-glicanos (O-GalNAc)

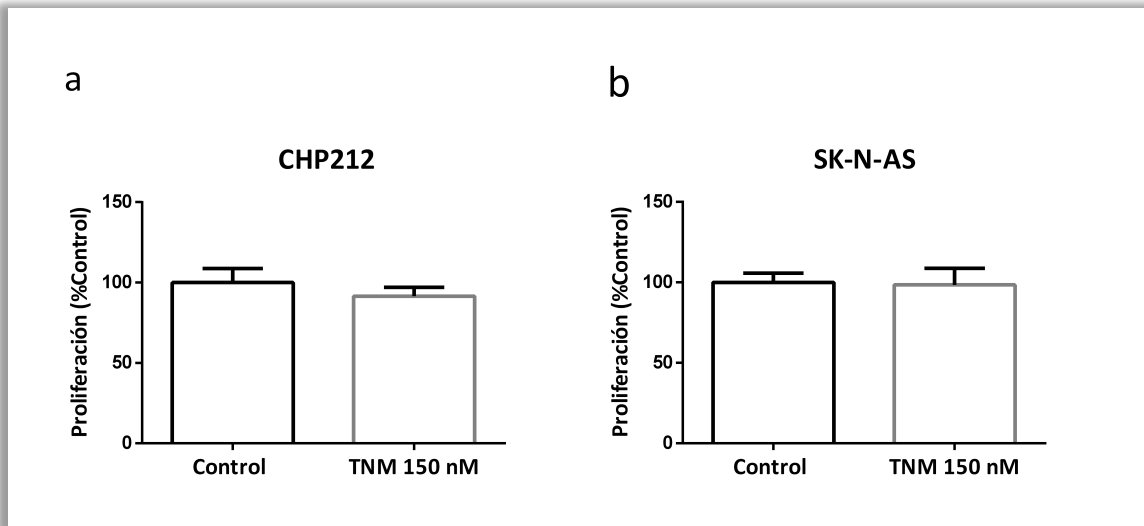
Debido a que los glicanos Lewis pueden encontrarse en estructuras de N- y O-glicanos en glicoproteínas, se evaluó su presencia en dichas estructuras mediante dos estrategias: el tratamiento con TNM (inhibidor de la síntesis de N-glicanos) y el silenciamiento del gen C2GNT1 (codifica para la principal iniciadora de la síntesis de los glicanos O-GalNAc del core 2) mediante *siRNA* (del inglés *small interfering RNA*). Se utilizaron como marcadores los glicanos SLe<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup>, cuya presencia fue evaluada por CF luego de los diferentes tratamientos.

En cuanto a los N-glicanos, luego del tratamiento con TNM, ninguna de las líneas evaluadas mostró disminución significativa en la presencia de SLe<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup>. En contraparte, luego de este tratamiento se observó una disminución de las estructuras de N-glicanos evidenciada por una disminución en la unión de la lectina ConA (**figura I.5**). No se observaron diferencias significativas en la proliferación de CHP-212 y SK-N-AS luego del tratamiento con TNM (**figura I.6**).

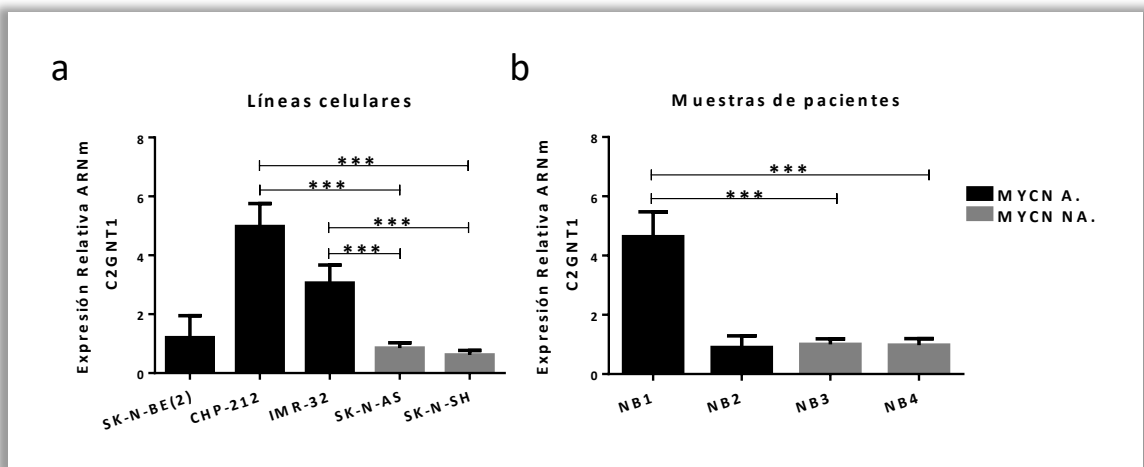
En relación con los glicanos O-GalNAc del core 2, en primer lugar, se evaluó la expresión de transcritos de C2GNT1 (**figura I.7**). En cuanto a las líneas celulares, dos de las tres líneas con amplificación de MYCN (IMR-32 y CHP-212) presentaron sobreexpresión en su transcripción con un incremento de más de 3 veces en comparación con las líneas sin amplificación de oncogén. En cuanto a las muestras de pacientes, la muestra NB1 presentó sobreexpresión de los niveles de ARNm de C2GNT1 en comparación con las muestras que no amplifican MYCN (NB3 y NB4).



**Figura 1.5 | Expresión de glicanos en el panel de líneas de NB en función del tratamiento con TNM.** (a) Unión a ConA. (b) Expresión de SLe<sup>x</sup>. (c) Expresión de Le<sup>y</sup>. Las células fueron incubadas durante 24 h con 150 nM de TNM y consecuentemente sometidas a CF con los anticuerpos y lectinas mencionados. Los valores representan el promedio de las IMFr de tres ensayos independientes y su desvío estándar, relativizados a la media del control sin tratar. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, T.Test.

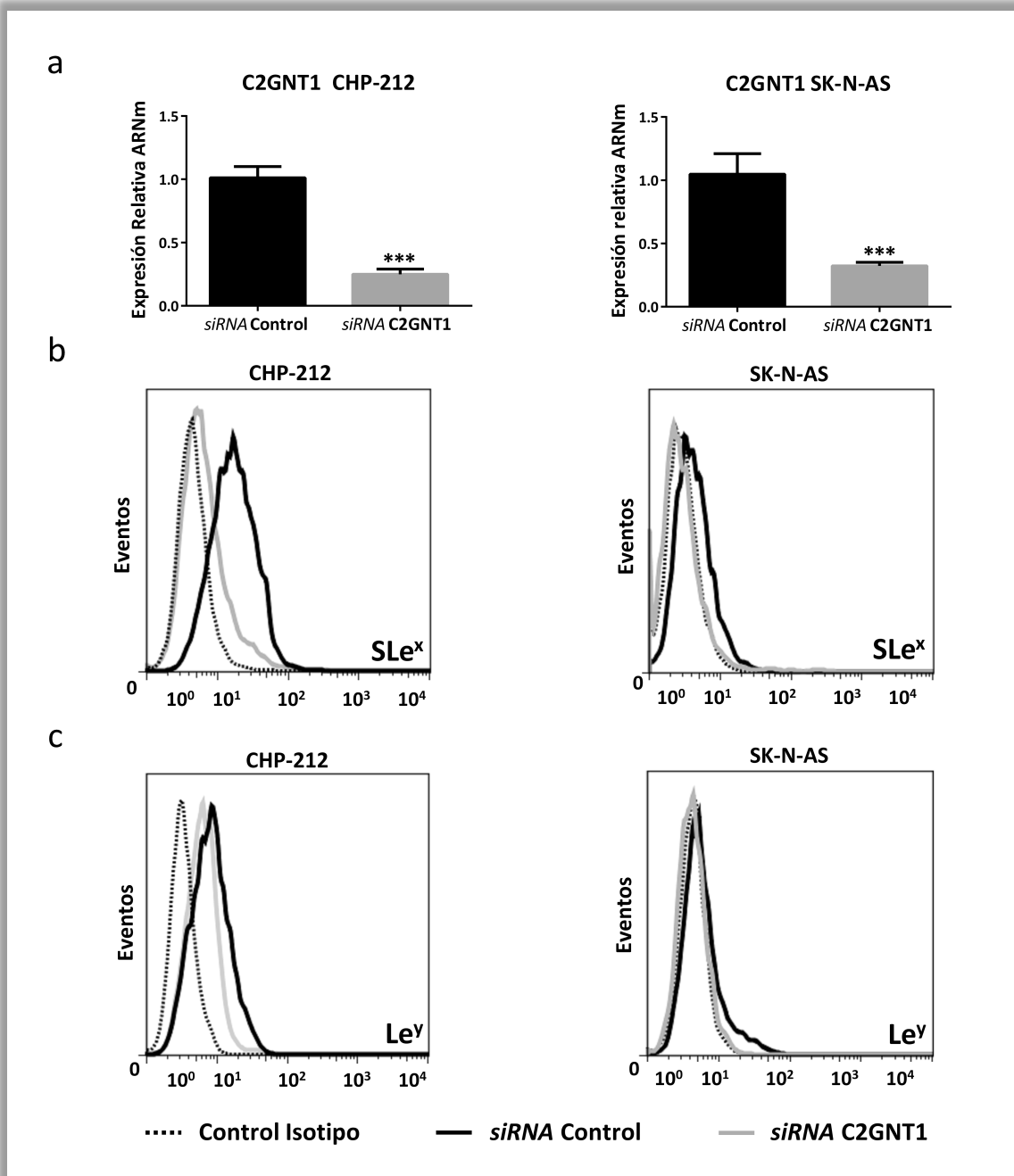


**Figura I.6 | Proliferación a 24 h en función del tratamiento con TNM.** (a) CHP-212 (b) SK-N-AS. Luego de 24 h de ser sembradas, las células fueron tratadas con TNM 150 nM durante 24 h. La proliferación fue cuantificada por método colorimétrico con cristal violeta, midiendo absorbancia a 595 nm. Los valores representan las medias y desvío estándar de dos ensayos independientes.  $p > 0.05$  T.Test.



**Figura I.7 | Comparación relativa de los niveles de transcritto de C2GNT1 en (a) líneas celulares y (b) muestras de pacientes de NB con y sin amplificación de MYCN.** Los niveles de ARNm fueron analizados mediante qRT-PCR, mediante el diseño  $\Delta\Delta CT$ . SK-N-AS y NB3 se utilizaron como muestra de referencia. Los valores representan la media y desvío estándar de tres ensayos independientes. \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA, seguido de post test Tukey.

Se seleccionaron las líneas CHP-212 y SK-N-AS como representantes de los grupos con y sin amplificación de MYCN, respectivamente. Continuando con la estrategia para evaluar la presencia de los Lewis en estructuras de glicanos O-GalNAc del *core 2*, se silenció C2GNT1 en las líneas SK-N-AS y CHP-212. La disminución en los niveles de transcritos luego del silenciamiento fue corroborada mediante qRT-PCR (**figura 1.8a**). La disminución de los niveles de transcripción de C2GNT1 en las células CHP-212 causó una disminución significativa en la presencia de SLe<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup>. De la misma manera, aún cuando la expresión de estos glicanos es baja en SK-N-AS, también se observó una disminución de los mismos luego del silenciamiento de este gen (**figuras 1.8b y c**).

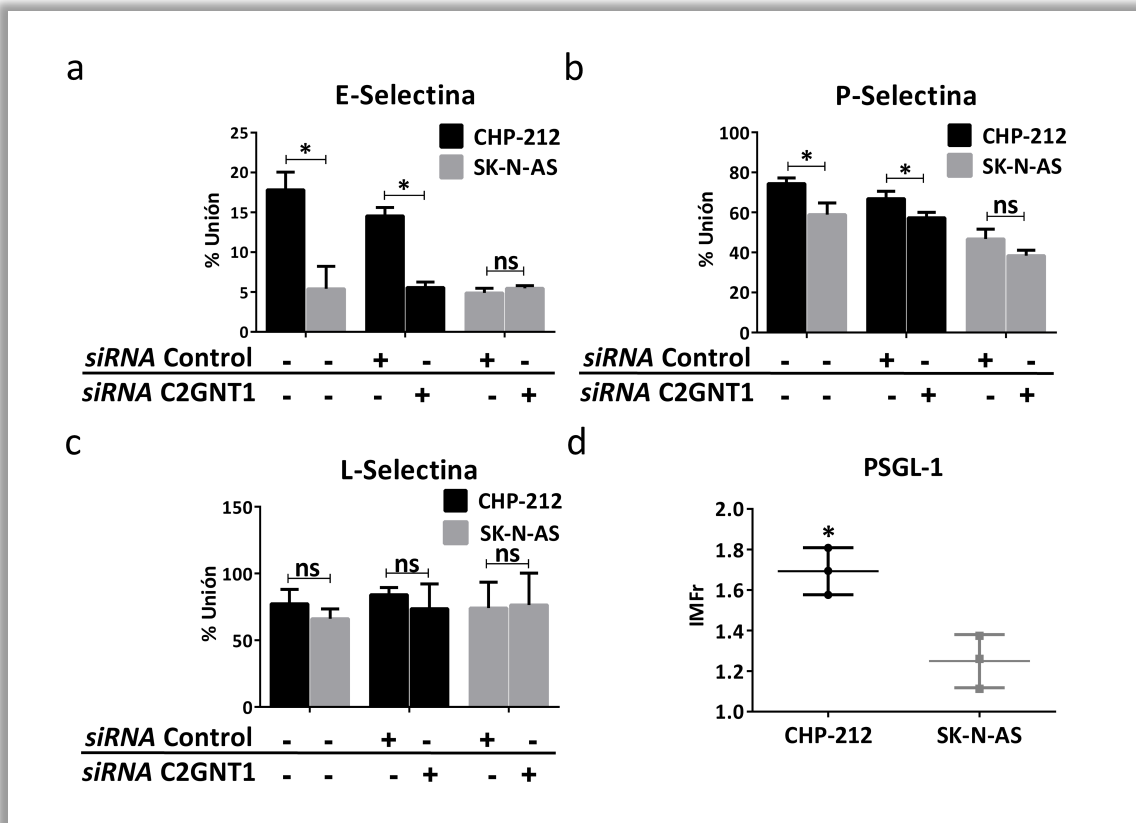


**Figura 1.8 | Silenciamiento del gen C2GNT1 mediante transfección con siRNA específico o control, durante 48h .(a) Determinación de los niveles de transcripto de C2GNT1 en CHP-212 y SK-N-AS mediante qRT-PCR (\*\*\*) $\rho < 0.001$ , T. Test). Los valores representan la media y desvío estándar de dos ensayos independientes. (b) y (c) Expresión de SLe<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup>, respectivamente, evaluado mediante CF. Los histogramas ilustran un ensayo representativo.**

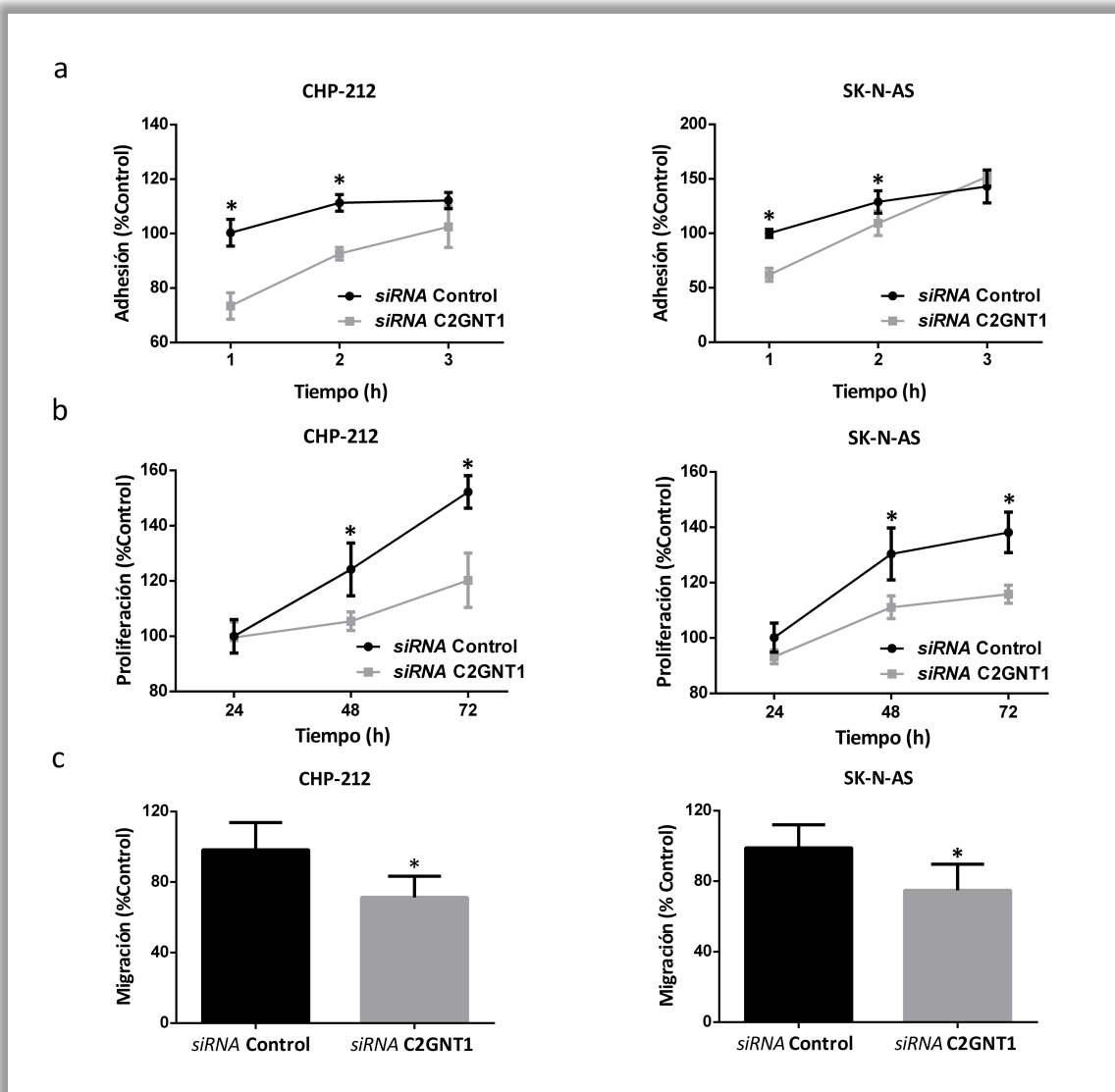
## Participación de los glicanos O-GalNAc del *core 2* en la biología celular del neuroblastoma

Debido a la expresión diferencial de SLe<sup>x</sup> encontrada en los grupos, y considerando a este glicano como determinante para la unión de selectinas con sus ligandos, se estudió la capacidad de las líneas celulares de unirse a selectinas recombinantes mediante CF. Dicha capacidad de unión fue evaluada, a su vez, en función del silenciamiento de C2GNT1. CHP-212 (MYCN amplificado) presentó una mayor capacidad de unión a E- y P- selectinas comparada con su contraparte sin amplificación de MYCN, SK-N-AS. Además, la expresión del ligando de selectinas PSGL-1 fue significativamente superior en CHP-212 comparado con SK-N-AS. CHP-212 presentó una reducción en su capacidad de unión tanto a E- como a P-selectina luego del silenciamiento de C2GNT1. La línea SK-N-AS no mostró diferencias significativas en la unión a selectinas luego de dicho silenciamiento. No se observaron diferencias significativas en la unión a L-selectina entre las líneas, como tampoco para cada una de ellas luego del silenciamiento de C2GNT1 (**Figuras I.9 a-d**).

En función de estudiar el impacto de los glicanos en la biología celular, se realizaron ensayos de cuantificación de la adhesión, proliferación y migración *in vitro* con las líneas CHP-212 y SK-N-AS, con y sin el silenciamiento de la expresión de la enzima codificada por el gen C2GNT1. La disminución en la expresión del gen produjo una reducción de la medición de los tres comportamientos celulares en ambas líneas en comparación con las líneas transfectadas con *siRNA* control. El silenciamiento de C2GNT1 provocó una reducción en la adhesión del 30% para CHP-212 y del 35% para SK-N-AS, comparado con los controles. En ambas líneas celulares el tratamiento causó una reducción significativa en la proliferación celular. De la misma manera, la migración tanto de CHP-212 como de SK-N-AS se redujo significativamente (**figura I.10**).



**Figura 1.9 |** Expresión de ligandos de selectinas y silenciamiento de C2GNT1 sobre CHP-212 y SK-N-AS. (a) Unión a E-selectina. (b) Unión a P-selectina. (c) Unión a L-selectina. Para cada gráfico, comparación de la unión a la selectina recombinante por CF entre CHP-212 y SK-N-AS sin transfección, y comparación de la unión a la selectina correspondiente a cada línea celular luego de 48 h de transfección con *siRNA* C2GNT1 o *siRNA* control. (d) Expresión comparada de PSGL-1 entre CHP-212 y SK-N-AS, determinada por CF. Los valores representan la media y desvío estandar de tres experimentos independientes. ns, no significativo; \*  $p < 0,05$ , T.Test.

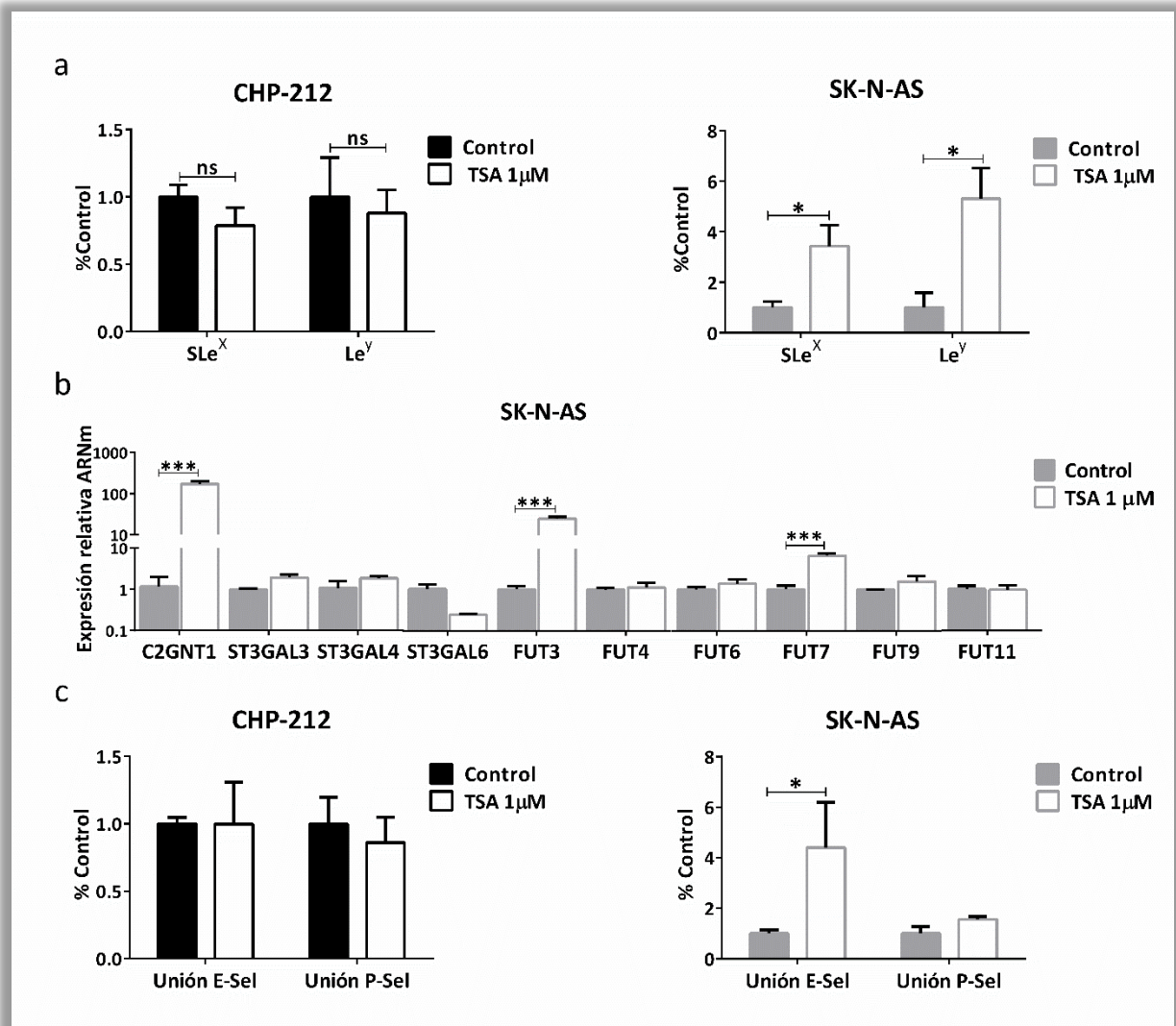


**Figura 1.10 | Silenciamiento del gen C2GNT1 mediante transfección con *siRNA* específico o control, durante 48h.** (a) Adhesión celular a 1-3 h evaluada mediante método colorimétrico de cristal violeta (\* $p < 0,05$ , T. Test). (b) Proliferación celular a 24-72 h, mediante el ensayo de MTS (\* $p < 0,05$ , T. Test). (c) Migración en *Transwell* (\* $p < 0,05$ , T. Test). Los valores representan la media y desvío estándar de tres ensayos independientes.

## Evaluación de la regulación epigenética de los Lewis en neuroblastoma

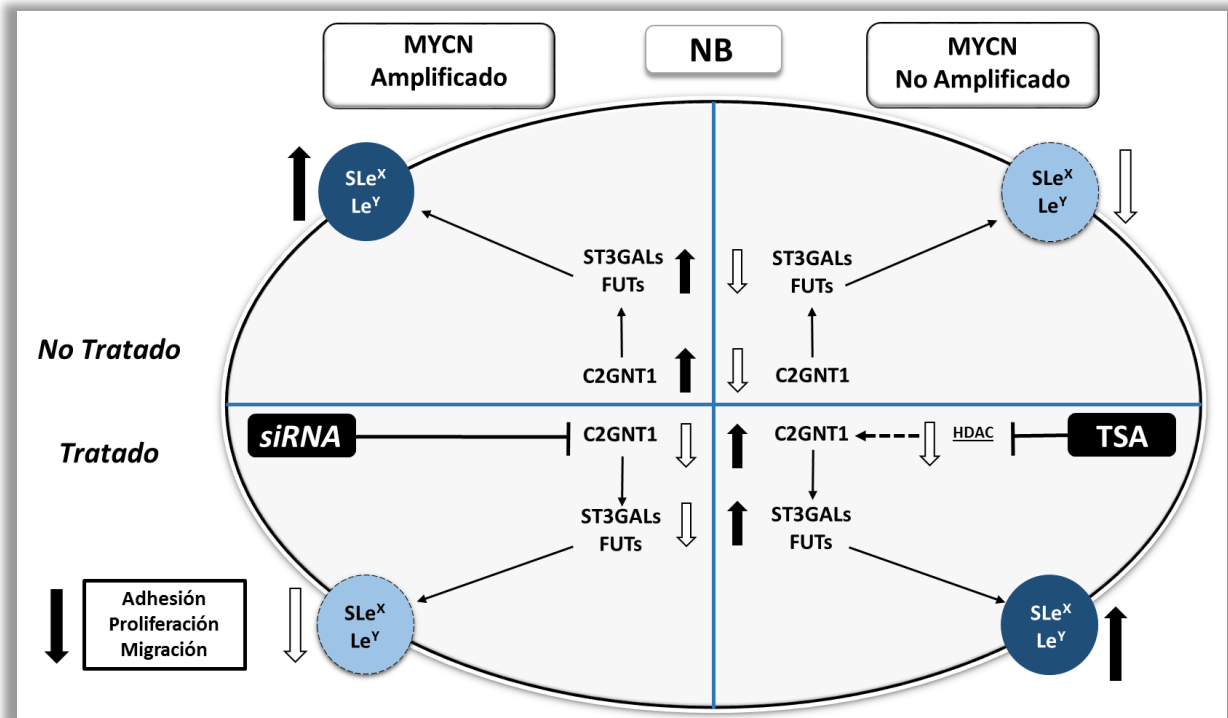
Finalmente, se estudió la regulación de la expresión de los glicanos en función de mecanismos epigenéticos que modulan la acetilación de la cromatina. Para ello se utilizó el inhibidor de amplio espectro de HDAC, TSA. Como se ilustra en la **figura I.11**, se evidenció un incremento en la expresión de SLe<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup> en la línea SK-N-AS luego del

tratamiento con TSA. De la misma manera, en esta línea celular se observó un incremento en la capacidad de unión a E- pero no a P-selectina. En cuanto a la transcripción de glicosiltransferasas, luego de este tratamiento los niveles de C2GNT1, FUT3/7 incrementaron significativamente en comparación al control no tratado. La línea CHP-212 no presentó cambios en la expresión de los glicanos estudiados ni en la capacidad de unión a E- y P-selectina.



**Figura 1.11 | Evaluación de la regulación epigenética.** Las líneas CHP-212 y SK-N-AS fueron tratadas con TSA 1  $\mu$ M o igual volumen de DMSO durante 24 h. (a) Determinación de la expresión por CF de los glicanos SLe<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup> (\*p < 0.05, T-Test). (b) Comparación relativa de los niveles de transcrito codificantes para las glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de los glicanos de la familia Lewis, mediante qRT-PCR ( $\Delta\Delta$ CT) (\*\*\*)p < 0.001, T. Test). (c) Unión a E- y P-selectina (\*p < 0.05, Mann-Whitney para E-selectina y T. Test para P-selectina). Los valores representan la media y desvío estándar de tres ensayos independientes.

En la **figura I.12** se esquematizan, a modo de resumen, los resultados principales de este capítulo para los modelos de estudio de NB utilizados, en relación con los perfiles de glicanos y glicosiltransferasas, capacidades celulares y tratamientos.



**Figura I.12** | Representación esquemática de los resultados obtenidos para los glicanos de la familia Lewis y las glicosiltransferasas en las células de NB con y sin amplificación del oncogén MYCN, sin tratamiento y sometidas al silenciamiento de C2GNT1 y tratamiento con TSA.

*Discusión Capítulo I*



Si bien diferentes glicosiltransferasas y glicoconjugados han sido vinculados con el pronóstico pobre de pacientes con NB, pocos reportes establecen una relación entre glicanos, glicosiltransferasas y MYCN, como se presenta en este trabajo. En este capítulo se realizó la caracterización de los perfiles de expresión de las familias de glicanos truncados y de la familia Lewis en cinco líneas celulares de NB, segregadas según la amplificación de MYCN como criterio de agresividad. Esta caracterización reveló una alta expresión de los glicanos de la familia Lewis (Le<sup>x</sup>, SLe<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup> y Le<sup>b</sup>) en aquellas células con amplificación del oncogén MYCN. Por el contrario, no se observaron diferencias entre los modelos, en la expresión de los glicanos O-GalNAc truncados. Los resultados muestran que la alta expresión de los antígenos de Lewis en líneas celulares con MYCN amplificado podría ser una consecuencia de la sobreexpresión de las sialiltransferasas codificadas por ST3GAL4 y ST3GAL6, y más de una fucosiltransferasa. Particularmente, FUT7/9 presentaron sobreexpresión en todas las líneas celulares que amplifican MYCN, con niveles de transcritos superiores a las demás fucosiltransferasas. Curiosamente, no se observó sobreexpresión de ST3GAL3 y FUT11 en ninguna de las líneas celulares evaluadas. Notablemente, no se encontró sobreexpresión de ARNm de ninguna glicosiltransferasa en líneas celulares que no amplifican MYCN, lo cual se relaciona con la baja expresión de los glicanos Lewis.

Resultados similares se obtuvieron con muestras de tumor primario derivadas de pacientes. En las muestras que amplifican MYCN, la sobreexpresión de niveles de ARNm de ST3GAL3 y ST3GAL6 se detectaron en NB1, mientras que la sobreexpresión de ST3GAL4 se encontró en NB2. En estas muestras también se encontraron niveles significativamente superiores de transcritos para la mayoría de las fucosiltransferasas. En contraste con las líneas celulares, FUT4/6/7/11 se sobreexpresaron en las dos muestras que amplifican MYCN en comparación con las dos que no lo amplifican. Los resultados obtenidos sugieren que, en la biosíntesis de los glicanos de Lewis en NB existen actividades enzimáticas redundantes que conducen a la presencia de estas estructuras en las células malignas.

En glicoproteínas, los Lewis pueden estar asentados sobre N- y O-glicanos. Para estudiar su presencia en N-glicanos, las líneas celulares se incubaron con el inhibidor de la N-glicosilación, TNM. Curiosamente, luego del tratamiento no se observó disminución

en la presencia los glicanos SLe<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup> en ninguna de las líneas de NB utilizadas. Esto sugiere que dichos glicanos no se encontrarían asentados en estructuras de N-glicanos.

Por otro lado, como en glicanos O-GalNAc la familia Lewis se encuentra principalmente sobre el *core 2*, se comenzó el estudio de estas estructuras comparando los niveles de transcripción de C2GNT1. La sobreexpresión de ARNm en IMR-32 y CHP-212, frente a SK-N-SH y SK-N-AS, sugiere una mayor presencia de glicanos de este *core* en las células con amplificación de MYCN. En este sentido, si bien SK-N-BE(2) (MYCN amplificado) no mostró sobreexpresión C2GNT1, evidenció niveles sobreexpresados de diferentes glicosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de los Lewis. La sobreexpresión en los niveles de ARNm de C2GNT1 también se observó en la muestra de paciente NB1, con amplificación de MYCN. NB2, presenta una situación comparable a SK-N-BE(2), aunque no mostró niveles significativamente superiores de C2GNT1 frente a las muestras sin amplificación de MYCN, mostró sobreexpresión de diferentes glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de los Lewis. Aunque los resultados en muestras de pacientes sugieren una expresión elevada de glicanos de esta familia en indicaciones con amplificación de MYCN, es necesaria la evaluación de la expresión de estos glicanos sobre material histológico de pacientes para establecer la asociación con la amplificación de este oncogén.

Con el fin de evaluar la presencia de los Lewis sobre estructuras del *core 2*, se continuó con el silenciamiento de C2GNT1. Esta regulación negativa del gen produjo una reducción en la expresión de los glicanos de la familia Lewis en las líneas de NB CHP-212 y SK-N-AS. Estos resultados sugieren que la familia Lewis se encontraría principalmente asentada sobre estructuras del *core 2* en glicanos O-GalNAc.

Las implicancias de los glicanos Lewis en las células tumorales fueron evaluadas mediante el silenciamiento de C2GNT1. Dicho tratamiento provocó la disminución de diferentes capacidades biológicas de las células tumorales vinculadas con la agresividad. La disminución de la transcripción de C2GNT1 redujo la adhesión, proliferación y migración celular *in vitro* de las células de NB con y sin amplificación de MYCN. La sumatoria de los efectos en el silenciamiento de C2GNT1 sugieren una disminución del fenotipo agresivo, manifestando la participación de los glicanos O-GalNAc del *core 2* en la biología del NB.

En línea con los resultados obtenidos que asocian a los glicanos Lewis a estructuras de O-glicanos, diversas glicosiltransferasas relacionadas a este tipo estructural han sido propuestas como biomarcadores de NB. Por ejemplo, Ho y colaboradores han informado que la sobreexpresión de GALNT2, que codifica para una de las glicosiltransferasas iniciadoras de la síntesis de glicanos O-GalNAc, suprime el fenotipo maligno de células de NB al modular la glicosilación del receptor IGF-1 (del inglés *Insulin-like growth factor receptor 1*). Particularmente, IGF-1R está involucrado en el potencial metastásico del NB y su expresión potenciada por MYCN se asocia con una enfermedad altamente maligna y un pronóstico pobre. Este grupo reportó que la sobreexpresión de GALNT2 disminuye la proliferación y la migración dependiente de IGF de células de NB e incrementa los niveles del glicano truncado Tn en IGF-1R<sup>243</sup>.

Por otro lado, la expresión de B3GNT3, conduce a la extensión del *core 1* de los glicanos O-GalNAc, y también se ha correlacionado con un pronóstico clínico favorable. Experimentos sobre una línea celular de NB demostraron que la expresión de B3GNT3 inhibe el fenotipo maligno al suprimir la migración y la invasión<sup>245</sup>. Teniendo en cuenta la ruta de síntesis de los glicanos O-GalNAc, se destaca que las glicosiltransferasas codificadas por B3GNT3 y C2GNT1 utilizan el mismo sustrato para conducir a una ramificación de glicanos diferentes, la extensión del *core 1* o la formación del *core 2*. Es posible que estos resultados que asocian una expresión de glicanos del *core 1* extendido a un mejor pronóstico, sean complementarios a los resultados obtenidos en este trabajo donde los glicanos del *core 2* promoverían un fenotipo más agresivo.

La capacidad metastásica y la expresión de los glicanos de la familia Lewis en células tumorales se encuentra vinculada por selectinas. Estas moléculas se han vinculado en diferentes indicaciones oncológicas como mediadoras del *rolling* y adhesión de células tumorales al endotelio vascular. SLe<sup>x</sup> y SLe<sup>a</sup> son determinantes esenciales que deben estar presente en los ligandos para producir unión con las selectinas<sup>248</sup>. En este sentido, Hill y colaboradores reportaron que el silenciamiento de C2GNT1 en células de carcinomas hepático y de colon resultó en una disminución de la expresión de SLe<sup>x</sup>, menor capacidad de unión a E-selectina y reducción de la invasión *in vitro*, demostrando que SLe<sup>x</sup>, en el contexto de los glicanos O-GalNAc del *core 2*, regula la invasión mediada por ligandos de E-selectina<sup>180</sup>. En comparación, los resultados de este capítulo han demostrado que la línea de NB con amplificación de MYCN CHP212,

además de presentar altos niveles de SLe<sup>x</sup> y sobreexpresión de los niveles de ARNm de diferentes glicosiltransferasas, mostró una mayor capacidad de unión a E- y P-selectina en comparación con SK-N-AS (sin amplificación de MYCN). En línea con esto, CHP-212 presentó mayor expresión del ligando de selectinas PSGL-1. Estos resultados sugieren que la línea que amplifica MYCN presenta mayor expresión de ligandos para estas moléculas de adhesión. Más aún, el silenciamiento de C2GNT1 redujo la unión a E- y P-selectina de esta línea celular, vinculando la presencia de glicanos del *core 2* en los ligandos de selectinas de CHP-212. Si bien ensayos *in vitro* han demostrado que células de NB presentan unión a P-selectina mediada por ligandos glicosilados con estructuras de glicanos O-GalNAc, su asociación con C2GNT1 no se encuentra reportada<sup>249</sup>. Por otro lado, el silenciamiento de C2GNT1 no provocó disminución en la unión de las células de NB a L-selectina, lo cual podría estar relacionado con reportes que informan la presencia de ligandos de esta selectina en estructuras del *core 1* en linfocitos<sup>250,251</sup>.

Evidencias recientes en glicobiología han identificado fenotipos de glicanos específicos en cáncer que se encuentran regulados por mecanismos epigenéticos. Por ejemplo, Anugraham y colaboradores reportaron por primera vez la regulación de la expresión de MGAT3 por la hipometilación del ADN, lo que conduce a N-glicanos bisectados en las proteínas de membrana de células de cáncer de ovario<sup>252</sup>. Otro de los mecanismos de regulación epigenética involucra los niveles de acetilación de histonas. En particular, las histona deacetilasas (HDACs) son una familia de 18 enzimas que mantienen histonas en un estado cargado positivamente que a su vez impiden la transcripción de genes<sup>253</sup>. Las HDACs se encuentran involucradas en la progresión del cáncer vinculadas a la regulación del ciclo celular, apoptosis, respuesta al daño del ADN, metástasis y angiogénesis. La participación de esta familia de enzimas ha sido reportada en NB. En un análisis de expresión génica sobre 17 líneas celulares, Keshelava y colaboradores demostraron una asociación de la expresión del gen HDAC1 con resistencia a múltiples fármacos<sup>254</sup>. Además, Oehme y colaboradores reportaron la correlación entre la expresión de HDAC8, estadio avanzado y un resultado clínico desfavorable, en un análisis con 118 muestras de pacientes con NB. En este trabajo, los autores mostraron una correlación entre la expresión HDAC8 y el Sistema Internacional de Estadificación del Neuroblastoma (INSS), pero no demostraron una asociación con el

estado de amplificación MYCN<sup>255</sup>. Muy pocos informes establecen una relación entre las HDACs, el fenotipo de glicanos y la regulación de las glicosiltransferasas.

Si bien el tratamiento con inhibidores de HDAC ralentiza la tasa de crecimiento en muchos tipos de células tumorales, en otros casos también aumentan las propiedades oncogénicas, como el aumento de la movilidad y la capacidad invasiva<sup>256</sup>. Además, sus efectos de amplio espectro y a menudo pleiotrópicos hacen que sea difícil prever un mecanismo de acción. Recientemente, Montgomery y colaboradores demostraron la relación entre la actividad HDAC y la expresión de genes relacionados a la glicosilación en un modelo celular de carcinoma adrenocortical. En este trabajo, los autores trataron células SW13 con FK228, un inhibidor de HDAC con alta afinidad por HDAC1. El tratamiento con FK228 alteró la expresión de enzimas de todas las principales rutas de glicosilación y de varias proteínas de unión a glicanos. Paralelamente, el tratamiento aumentó el potencial metastásico y redujo la sensibilidad al paclitaxel de estas células<sup>257</sup>. Por otro lado, en NB se ha demostrado que el tratamiento con el inhibidor de amplio espectro Vorinostat en células de NB humanas y murinas, tanto *in vivo* como *in vitro*, aumenta la expresión del gangliósido GD2 asociada a la sobreexpresión de ST3GAL5 y ST8SIA1. En este escenario, los inhibidores de HDAC se proponen como potenciadores de terapias inmunológicas al sobreexpresar estos blancos terapéuticos. En relación con estos reportes, en el presente trabajo la incubación de células SK-N-AS con el inhibidor TSA produjo una notable sobreexpresión de C2GNT1 y FUT3/7, que resulta en una alta expresión de SLe<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup>. En concordancia, este tratamiento también induce un aumento en la unión a selectinas en las células que no amplifican MYCN. Estos resultados describen que células sin amplificación de MYCN con un fenotipo menos agresivo, comienzan a expresar glicanos Lewis en ausencia de la represión transcripcional ocasionada por HDAC, en niveles comparables a las células con fenotipo más agresivo y amplificación de MYCN.

Existe una vinculación entre MYCN y mecanismos de regulación epigenética. Además de su papel como factor de transcripción clásico, MYCN también actúa para regular la estructura global de la cromatina modificando la acetilación de histonas. En los progenitores neurales, la pérdida de MYCN produce una cromatina represiva, una disminución de H3 y H4 acetiladas y una condensación general de cromatina. Una mayor expresión de MYCN se ha correlacionado con un mayor tamaño nuclear<sup>258</sup>. Asociado a

los resultados descritos en este capítulo para SK-N-AS, se ha demostrado que la sobreexpresión de MYCN en esta línea celular induce un aumento al doble en tamaño relativo de los núcleos, sugiriendo un estado mayor de cromatina activa en condiciones que imitan la amplificación de MYCN<sup>259</sup>.

Los resultados presentados en este trabajo aportan información relevante sobre la síntesis y la regulación epigenética involucrada en la expresión de antígenos de la familia Lewis como parte de glicanos O-GalNAc del *core 2* en NB. En resumen, estos resultados y la evidencia proporcionada por otros grupos apoyan la hipótesis que los glicanos de la familia Lewis como parte de los glicanos O-GalNAc del *core 2* tienen un papel relevante en el comportamiento de las células malignas de NB con amplificación de MYCN.

*Conclusiones Capítulo I*



## Conclusiones Capítulo I

- I. Los glicanos de la familia Lewis se sobreexpresan en las líneas celulares de NB más agresivas, con amplificación de MYCN, en comparación con las líneas sin amplificación de este oncogén.
- II. Los glicanos O-GalNAc truncados no presentan diferencias entre las líneas celulares en relación con la amplificación de MYCN.
- III. Las líneas celulares y las muestras de pacientes de NB utilizadas como modelos de estudio sobreexpresan glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de los glicanos de la familia Lewis, tanto sialil- como fucosiltransferasas. Diferentes enzimas de estas familias se encuentran sobreexpresadas, reforzando la teoría de la redundancia en la actividad enzimática para la síntesis de estos glicanos.
- IV. Los glicanos de la familia Lewis se encuentran asentados principalmente sobre estructuras del *core 2* de glicanos O-GalNAc, en los modelos de NB utilizados.
- V. Las líneas celulares de NB con amplificación de MYCN sobreexpresan ligandos de E- y P-selectina. La capacidad de unión de estas células a E- y P-selectina depende de estructuras de glicanos O-GalNAc del *core 2*.
- VI. Los Lewis, en estructuras de glicanos O-GalNAc del *core 2*, tienen implicancias en eventos celulares de la biología tumoral tales como la proliferación, adhesión, y migración.
- VII. Los glicanos de la familia Lewis y las glicosiltransferasas involucradas en su síntesis se encuentran regulados por mecanismos epigenéticos, que involucran deacetilasas de histonas en células de NB sin amplificación de MYCN.



## Capítulo II

---

*Participación de la glicosilación aberrante  
en la biología del glioma*



*Introducción Capítulo II*



## Glioma

### Características clínicas y biológicas del glioma

Los gliomas representan un grupo de tumores del sistema nervioso central (SNC) que se originan en la glía. Representan los tumores primarios intracraneales más comunes que, excluyendo las metástasis de otros cánceres que llegan al SNC, constituyen el 81% de todos los tumores cerebrales malignos<sup>260</sup>.

Una de las grandes incógnitas del glioma es su origen celular. Una de las teorías más aceptadas establece que células madre neurales o células progenitoras relacionadas pueden ser transformadas a células madre cancerosas dando lugar a los gliomas malignos. Otra teoría señala la desdiferenciación inducida por mutación de las células cerebrales maduras, como astrocitos y oligodendrocitos. Sin embargo, se requieren más evidencias para clarificar su origen y poder explicar la gran heterogeneidad histológica encontrada en los gliomas<sup>261</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los gliomas de acuerdo con el tipo celular a partir del cual se hipotetiza que dio lugar a la diferenciación, debido a sus características astrocíticas, oligodendrogiales o de células endimarias. Los astrocitomas, se localizan frecuentemente en el cerebro y cerebelo, los oligodendrogliomas en los hemisferios cerebrales, y los endimomas se encuentran generalmente en la medula espinal, revestimiento de ventrículos o regiones cercanas al cerebelo. Según la OMS, estos tumores se categorizan en grados de I a IV, de acuerdo al nivel de malignidad tumoral basado en características histopatológicas tales como atipia citológica, anaplasia (desdiferenciación), actividad mitótica, proliferación microvascular y necrosis<sup>262</sup>. Se consideran de bajo grado los categorizados como I y II, y alto grado III y IV. Los tumores de grado I se asocian a pacientes pediátricos, mientras que los grados II a IV ocurren en adultos. Como característica general, en contraste a otros tumores sólidos, los gliomas no suelen metastatizar fuera del sistema nervioso central, por lo que el grado del tumor es determinante del resultado clínico<sup>13</sup>.

Los gliomas grado I (astrocitomas pilocíticos) no contienen ninguna de las características histológicas mencionadas anteriormente, y los tumores de grado II, se

caracterizan por poseer sólo atipia citológica. Los tumores de grado I son de crecimiento lento y representan tumores biológicamente benignos que se curan quirúrgicamente. Los tumores de grado II también son de crecimiento lento, pero son considerados malignos, no son curables mediante cirugía y pueden seguir cursos clínicos largos. Dentro del grado II se incluyen los astrocitomas difusos, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas mixtos. Debido a su naturaleza infiltrante, pueden acontecer recurrencias e incluso evolucionar a tumores más agresivos (grado III o IV). Los tumores de grado III incluyen a los astrocitomas anaplásicos, oligodendrogliomas anaplásicos y oligoastrocitomas mixtos anaplásicos; además de presentar características morfológicas de células desdiferenciadas, son tumores con actividad mitótica exacerbada. Los tumores de grado III son malignos, crecen más rápido y más agresivamente que los gliomas de grado II, a menudo recidivan como tumores de mayor grado y pueden conducir a la muerte en unos pocos años. El grado IV agrupa un subtipo de astrocitomas denominados glioblastomas (GBMs), que histológicamente presentan anaplasia, actividad mitótica elevada con proliferación microvascular y/o necrosis. Estos tumores son altamente invasivos, con una infiltración difusa a lo largo del parénquima cerebral, presentan una angiogénesis robusta y suelen ser resistentes a la quimioterapia<sup>262,263</sup>.

Dentro de los gliomas de bajo grado, los tumores de grado I se asocian con una supervivencia a largo plazo, mientras que el glioma de grado II es una enfermedad con una sobrevida promedio de aproximadamente 7 años. En el caso de los gliomas de alto grado, los tumores de grado III tienen una sobrevida media de 3 años<sup>264</sup>. Los GBMs son la forma más común y letal de gliomas, los cuales presentan una sobrevida media de 14,6 meses y una tasa de sobrevida a 5 años menor al 5%<sup>265</sup>.

## Tratamiento

La resección quirúrgica sigue siendo la modalidad de tratamiento de primera línea para este tipo de cáncer, siempre que sea factible, para extirpar el tumor y obtener tejido para realizar el diagnóstico definitivo<sup>266</sup>. Debido a que la resección total macroscópica es típicamente curativa para el astrocitoma de grado I, estos pacientes rara vez son tratados con radiación y quimioterapia. Para tumores de grado II, los pacientes son estratificados según su perfil de riesgo en función de variables clínicas

para determinar si la quimioterapia y la radioterapia serían apropiadas<sup>264</sup>. El tratamiento estándar actual para los pacientes con GBM es la cirugía, seguida de radioterapia y quimioterapia con administración de temozolomida (TMZ), un agente alquilante. Los tumores de grado III también se tratan con un enfoque de modalidad dual, incluyendo radioterapia con TMZ concurrente y adyuvante, o un régimen de radioterapia menos agresiva sólo con adyuvante TMZ<sup>267</sup>. Pese a las estrategias terapéuticas disponibles, debido a la imposibilidad de la resección total por la capacidad invasiva de las células tumorales, los gliomas recurren inevitablemente un tiempo después a centímetros de la localización inicial del tumor<sup>268</sup>.

En los últimos años, con el avance en el conocimiento de la patogénesis molecular de los gliomas, se comenzaron a ensayar terapias dirigidas a blancos relevantes. En 2009, la FDA aprobó la utilización de bevacizumab (BVZ), un anticuerpo monoclonal que reconoce al factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) sobreexpresado en gliomas, para el tratamiento de GBM recurrente después de la terapia estándar<sup>269</sup>. Sin embargo, la supervivencia total producida por BVZ solo o en combinación con otras terapias alcanza los 4 meses<sup>270</sup>.

## Glicosilación aberrante en glioma

La investigación sobre la glicobiología de los tumores cerebrales incluye estudios descriptivos sobre glicoconjugados, estudios que examinan la expresión de glicosiltransferasas específicas y estudios destinados a mostrar una relación funcional entre glicoconjugados específicos relevantes para un desarrollo terapéutico<sup>271</sup>.

Una de las características clínicas más importantes de los gliomas es su capacidad de invadir el tejido cerebral normal. En este sentido, se han identificado glicoproteínas de la superficie celular que están asociadas con el potencial invasivo de los gliomas malignos, como NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*), cadherinas, integrinas y galectinas. Por ejemplo, se ha reportado que la glicosilación de NCAM con estructuras de ácido polisialílico facilita la invasión tumoral de líneas celulares de glioma, y estudios sobre biopsias de pacientes lo proponen como marcador de pronóstico<sup>272,273</sup>. E-cadherina es una glicoproteína transmembrana que media eventos de adhesión, y su N-glicosilación en glioma, principalmente mediada por GnT-III, es necesaria para la

expresión, plegado y tráfico a la membrana celular. Las galectinas participan en la modulación de la adhesión e invasión celular, así como en la regulación del crecimiento celular y la apoptosis de los gliomas. La expresión de galectina-1 y -3, dos de las principales galectinas encontradas en los gliomas, se correlacionan directamente con el grado de tumor y pronóstico del paciente. En el campo de las integrinas, un ejemplo es el cambio a N-glicanos altamente ramificados con estructuras GlcNAc- $\beta$ 1,6 en la integrina  $\alpha$ 3 $\beta$ 1, que conduce a una disminución en la adhesión celular, aumento en la motilidad celular y en la tumorigenicidad<sup>274</sup>.

Existen pocos estudios descriptivos que relacionen glicosiltransferasas y estructuras de glicanos en glioma<sup>275</sup>. Con respecto a los ácidos siálicos, uno de los primeros trabajos mediante estudios histopatológicos con anticuerpos anti-sialiltransferasa  $\alpha$ 2,6 y la lectina que reconoce el producto de la misma (SNA), revelaron que los tumores de origen glial se encuentran desprovistos de expresión tanto de la enzima como de ácido siálico  $\alpha$ 2,6<sup>276</sup>. Su ausencia o baja expresión es considerada parte de la transformación maligna en glioma. Es más, la transfección de ST6GAL1, que codifica para la sialiltransferasa  $\alpha$ 2,6, en una línea celular de glioma humano, redujo invasión y su capacidad de formación tumoral *in vivo*<sup>274</sup>. Por otro lado, se ha demostrado la expresión robusta de ARNm de sialiltransferasas  $\alpha$ 2,3, así como la sobreexpresión de ácidos siálicos  $\alpha$ 2,3 en gliomas, en comparación con astrocitos humanos normales<sup>277</sup>. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el aumento de la sialilación de glicoproteínas unidas en  $\alpha$ 2,3, y no en  $\alpha$ 2,6, puede desempeñar un papel importante en la tumorigénesis de los gliomas. En relación a otras estructuras relacionadas, Xu y colaboradores reportaron la sobreexpresión de diversas  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasas y de estructuras de poli-LacNAc en astrocitomas de alto grado en comparación con cerebro normal<sup>278</sup>.

En relación con los diferentes tipos de estructuras de N-glicanos, en un trabajo con muestras de tejido de cerebro normal, Tsuchiya y colaboradores informaron la expresión de estructuras bi-antenarias y de oligomanosa (M5, M6 y M9). No se reportaron estructuras tri- ni tetra-antenarias en cerebro normal<sup>279</sup>. En contraste, Yamamoto y colaboradores examinaron la expresión de ARNm de MGAT3 y MGAT5 en gliomas, genes responsables de estructuras de N-glicanos bisectados y ramificaciones GlcNAc- $\beta$ 1,6, respectivamente. En este trabajo se informó que los tejidos normales

expresan niveles sustanciales de MGAT3, pero niveles insignificantes MGAT5, así como cantidades variables de ambos transcritos en muestras de glioma. En el mismo trabajo, mediante estudios histopatológicos con la lectina PHA-L, se reportó la expresión de N-glicanos con ramificaciones GlcNAc- $\beta$ 1,6 en cinco muestras de glioma humano de alto grado, y la ausencia de estas estructuras en astrocitos del cerebro de adulto normal. Finalmente, estudiaron el impacto de la sobreexpresión de MGAT5 en una línea celular de glioma humano, la cual resultó en cambios tanto en la morfología como en las adherencias focales, así como se tradujo en un aumento de la invasión de las células *in vitro*<sup>280</sup>. Estos resultados apoyan la hipótesis de la asociación de las ramificaciones GlcNAc  $\beta$ 1,6 con la agresividad tumoral.

Escasos estudios se centran en la comparación entre los diferentes grados de glioma relacionados a patrones de glicosilación aberrante. En este sentido, y en base a la teoría de múltiples pasos de la tumorigénesis, el grupo de Furukawa desarrolló un modelo de tumorigénesis de múltiples pasos que utiliza astrocitos humanos normales, para imitar los grados de tumor cerebral humano I-IV. Dicho modelo incluye la introducción en serie de la telomerasa para extender la vida celular (hTERT), de la región temprana del antígeno T del virus del simio 40 SV40 (ER) para interrumpir la expresión de las proteínas supresoras de tumores p53 y Rb, de RasV12 oncogénico y de una forma constitutivamente activa de AKT (myrAKT) en astrocitos humanos normales<sup>281</sup>. De manera interesante, tanto la introducción de hTERT (modela grado I) como la introducción de hTERT, SV40ER y RasV12 (modela grado III), aumenta los niveles de N-glicanos con estructura ramificada GlcNAc  $\beta$ 1,6, así como los niveles de expresión de MGAT5. El modelo de grado III además, muestra una depleción de la biosíntesis de glicanos O-GalNAc del *core* 2. La introducción de los cuatro genes (grado IV), exhibe una marcada disminución de N-glicanos bisectados, y un aumento en la expresión de N-glicanos con múltiples residuos de fucosa, tanto del *core* como terminales<sup>282</sup>.

En línea con la fucosilación aberrante, Kroes y colaboradores compararon por *microarray* los perfiles de expresión de 359 genes involucrados en las vías de síntesis de glicanos, entre seis muestras de cerebro humano normal y seis GBMs. Se encontraron 11 genes sobreexpresados en los tumores en comparación con el cerebro normal y 25 genes modulados negativamente en GBM. Se destaca dentro de la lista de genes sobreexpresados FUT3, el cual codifica para una fucosiltransferasa terminal involucrada

en la síntesis de los glicanos de la familia Lewis<sup>283</sup>. Sin embargo, dentro de los glicanos de la familia Lewis con expresión reportada en glioma asociada a agresividad sólo se encuentra Le<sup>x</sup>. El mismo se propone como marcador para células iniciadoras de tumor o células madre tumorales, particularmente en GBM<sup>284</sup>.

En relación con la modulación de la expresión de glicanos y glicosiltransferasas en glioma, existen escasas evidencias de una relación directa con mecanismos epigenéticos. El ejemplo prominente es el caso de la sialiltransferasa ST6GAL1. Análisis de niveles de transcripto sobre tres líneas celulares de glioma invasivo después del tratamiento con un inhibidor de ADN metiltransferasas, demostraron la modulación epigenética de la expresión de la sialiltransferasa en esta indicación<sup>285</sup>. Sumando a este antecedente, los datos provenientes del análisis transcriptómico por *microarrays* realizado por el grupo de Kroes en muestras de GBM demuestran que la expresión de la mayoría de los genes relacionados a vías de glicosilación (más de 70% de los analizados), se encuentran expresados de manera reducida en GBM. En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que la existencia de cambios epigenéticos pueden tener implicancias en la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de glicanos en glioma<sup>283</sup>.

Resulta imprescindible el desarrollo de nuevas estrategias que sean capaces de atacar selectivamente a las células blanco sin generar daños cognitivos en este tipo de indicación. Por lo que es necesario, el progreso en el conocimiento de la biología del glioma para ofrecer nuevas posibilidades de desarrollo de terapias que permitan mejorar los resultados del tratamiento actual. El campo de la glicobiología es un nicho interesante para esta búsqueda, sobre todo en indicaciones poco exploradas como el glioma. En línea con esta idea, en el presente capítulo se presenta la caracterización de la glicosilación aberrante en gliomas de alto y bajo grado en relación con estructuras de glicanos asociadas a tumor como glicanos truncados y la familia Lewis. Se analizan también estructuras de N- y O-glicanos, niveles de expresión de glicosiltransferasas y una evaluación preliminar de la regulación del fenotipo de glicanos por mecanismos epigenéticos.

*Objetivos Capítulo II*



## Objetivo General Capítulo II

Caracterizar la glicosilación aberrante en líneas celulares de glioma de bajo y alto grado, evaluar su participación en la biología tumoral y la contribución de la acetilación de la cromatina como mecanismo de modulación. Esta caracterización se centra en N- y O-glicanos, sus ramificaciones, y las estructuras terminales de glicanos O-GalNAc truncados y la familia Lewis.

## Objetivos Específicos Capítulo II

- I. Comparar el comportamiento celular entre modelos seleccionados de alto y bajo grado, en relación con sus capacidades de adhesión y migración *in vitro*.
- II. Caracterizar la expresión de glicanos de la familia Lewis y O-glicanos truncados (O-GalNAc) en un panel de líneas celulares de glioma humano de alto y bajo grado, mediante mAbs y CF.
- III. Comparar los niveles de expresión de los transcritos codificantes para las glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de los glicanos de la familia Lewis, en líneas celulares seleccionadas, mediante qRT-PCR.
- IV. Caracterizar estructuras de N-glicanos sobre líneas celulares de glioma humano de alto y bajo grado, mediante CF con lectinas vegetales, cromatografía de intercambio aniónico y cuantificación relativa de transcritos de glicosiltransferasas por qRT-PCR.
- V. Estudiar la estructura a la que se encuentran anclados los glicanos expresados, mediante la modulación negativa de la síntesis de N-glicanos con inhibidores de síntesis TNM y SW y el silenciamiento del gen MGAT5; y modulación negativa de la síntesis de estructuras de glicanos O-GalNAc del *core 2* mediante el silenciamiento del gen C2GNT1.
- VI. Estudiar la participación de los N-glicanos en los procesos de adhesión y migración en glioma de alto grado, mediante el uso de los inhibidores TNM y SW, y silenciamiento del gen MGAT5.

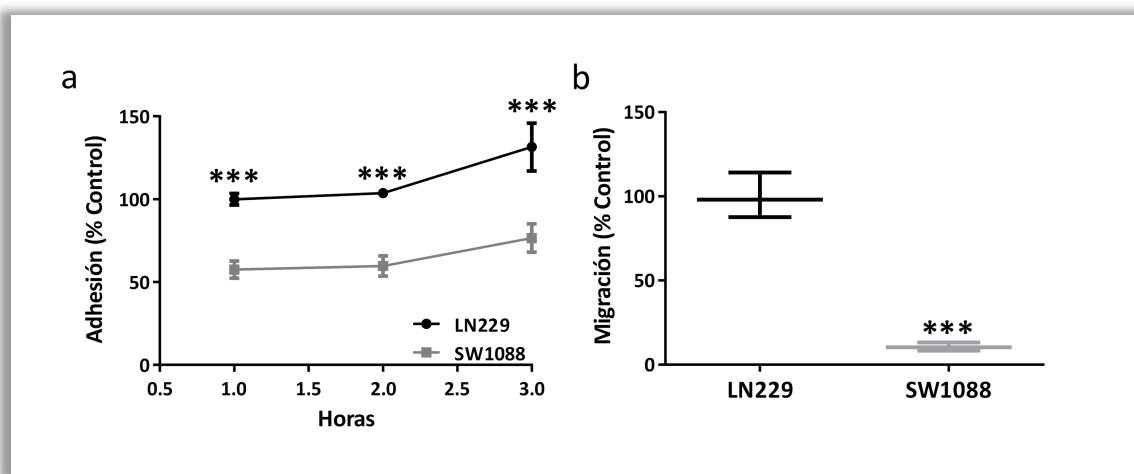
- VII. Estudiar la participación de los glicanos O-GalNAc del *core 2* en los procesos de adhesión y migración del glioma de alto grado, mediante el silenciamiento del gen C2GNT1.
- VIII. Estudiar la participación de N-glicanos mediante los inhibidores TNM y SW, en glioma de bajo grado.
- IX. Evaluar la regulación epigenética de la expresión de los glicanos Lewis y glicosiltransferasas asociadas en glioma mediante el tratamiento con inhibidor TSA.

*Resultados Capítulo II*



## Comportamiento celular *in vitro* del glioma de alto y bajo grado

En primer lugar, se estudió el fenotipo agresivo mediante comparación de las capacidades de adhesión y migración *in vitro* de las líneas celulares LN229 y SW1088, clasificadas como de alto y bajo grado, respectivamente. Como se puede observar en la **figura II.1**, la línea celular LN229 mostró una capacidad de adhesión a 1, 2 y 3 horas, así como una capacidad de migración en *Transwell*, significativamente superior a la línea celular de bajo grado SW1088.



**Figura II.1 | Comparación del comportamiento celular entre LN229 y SW1088.** (a) Adhesión *in vitro* por cristal violeta, \*\*\* $p < 0.001$ , T. Test (b) Migración en *Transwell*, \*\*\* $p < 0.001$ , T. Test. Los valores representan la media y desvío estándar de dos ensayos independientes.

## Caracterización del perfil de glicanos

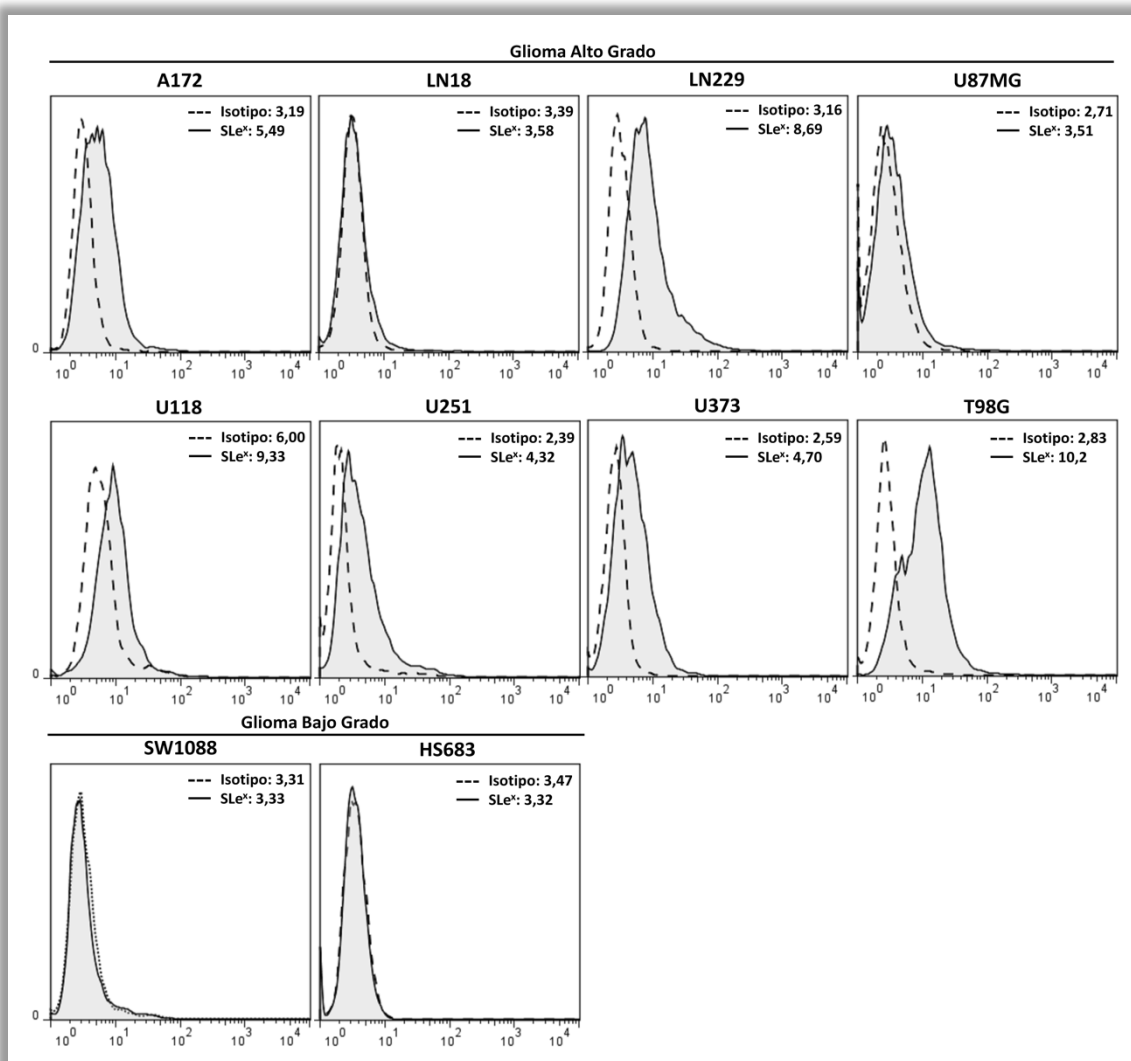
Seguidamente, se estudió la expresión de los glicanos de la familia Lewis y los glicanos O-GalNAc truncados sobre el panel de líneas celulares de glioma humano de alto y bajo grado, mediante CF. En la **tabla II.1** se presentan las medias de intensidades de fluorescencia relativizadas al control de isotipo para cada anticuerpo utilizado. Se consideró como alta expresión mayor a 1.5 IMFr, media entre 1,5 y 1,25, y baja menor a 1,25 IMFr. En general, se observó una mayor expresión de los glicanos de la familia Lewis en las líneas celulares de glioma de alto grado, principalmente del glicano SLe<sup>x</sup>. Todas las líneas celulares de alto grado presentaron expresión media o alta de al menos un glicano

de la familia Lewis, en contraste a las líneas de bajo grado que mostraron baja expresión de todos los glicanos analizados. SLe<sup>x</sup> presentó una alta expresión en las líneas A172, LN229, U118, U251, U373 y T98G; media expresión en la línea U87MG y baja en LN18. Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup> se expresaron en intensidad media en las líneas LN18 y U251. Le<sup>y</sup> presentó expresión media en las líneas A172 y T98G. Sle<sup>a</sup> mostró una expresión media sólo en la línea LN229.

Los glicanos O-GalNAc truncados presentaron baja expresión en todas las líneas analizadas, a excepción de Tn que mostró una expresión media en las líneas U87MG y T98G, ambas de alto grado. En la **figura II.2** se pueden observar los histogramas que ilustran las expresiones del glicano SLe<sup>x</sup> en el panel de líneas celulares utilizadas, con los valores de intensidad media de fluorescencia respectivos, de un ensayo representativo.

Familia	Glioma Alto Grado								Glioma Bajo Grado	
	A172	LN18	LN229	U87MG	U118	U251	U373	T98G	SW1088	HS683
<b>Lewis</b>										
Le <sup>a</sup>	0,97 ± 0,12	1,26 ± 0,09	0,99 ± 0,20	1,07 ± 0,02	0,99 ± 0,04	1,33 ± 0,05	1,01 ± 0,05	0,99 ± 0,10	1,02 ± 0,05	1,01 ± 0,12
Sle <sup>a</sup>	0,90 ± 0,12	0,94 ± 0,2	1,26 ± 0,09	1,02 ± 0,03	1,01 ± 0,03	1,17 ± 0,06	1,03 ± 0,05	1,01 ± 0,10	1,11 ± 0,06	1,04 ± 0,10
Le <sup>b</sup>	0,96 ± 0,10	1,25 ± 0,11	1,19 ± 0,06	1,16 ± 0,12	1,02 ± 0,10	1,32 ± 0,12	1,01 ± 0,10	1,01 ± 0,08	1,15 ± 0,06	1,12 ± 0,10
Le <sup>x</sup>	0,95 ± 0,09	1,04 ± 0,10	1,12 ± 0,11	0,97 ± 0,09	1,05 ± 0,04	1,21 ± 0,04	1,02 ± 0,12	1,05 ± 0,06	0,97 ± 0,02	1,16 ± 0,05
SLe <sup>x</sup>	1,60 ± 0,17	1,05 ± 0,06	2,84 ± 0,45	1,26 ± 0,12	1,50 ± 0,08	1,82 ± 0,42	1,87 ± 0,14	3,83 ± 0,60	1,14 ± 0,09	1,03 ± 0,09
Le <sup>y</sup>	1,47 ± 0,2	1,15 ± 0,06	1,18 ± 0,07	1,10 ± 0,13	1,16 ± 0,01	1,21 ± 0,06	1,02 ± 0,03	1,48 ± 0,12	1,04 ± 0,10	1,09 ± 0,07
<b>O-GalNAc truncados</b>										
T	1,14 ± 0,10	1,01 ± 0,05	1,05 ± 0,06	1,09 ± 0,1	0,95 ± 0,03	0,94 ± 0,09	1,12 ± 0,08	1,05 ± 0,10	1,01 ± 0,03	-
Tn	1,07 ± 0,12	0,99 ± 0,10	0,99 ± 0,10	1,32 ± 0,09	0,97 ± 0,10	1,01 ± 0,08	1,23 ± 0,02	1,29 ± 0,08	1,02 ± 0,1	-
STn	1,04 ± 0,09	1,05 ± 0,10	1,06 ± 0,10	0,99 ± 0,06	1,02 ± 0,10	1,24 ± 0,2	0,96 ± 0,10	1,18 ± 0,06	1,14 ± 0,10	-

**Tabla II.1 | Expresión de glicanos de la familia Lewis y O-Glicanos truncados (O-GalNAc) en las líneas celulares de glioma humano de alto y bajo grado.** Los valores expresados representan el promedio de las IMFr de tres ensayos independientes, con su desvío estándar. Fue considerada baja expresión por debajo de 1,25 IMFr, media entre 1,25 y 1,5, y alta mayor a 1,5 IMFr.

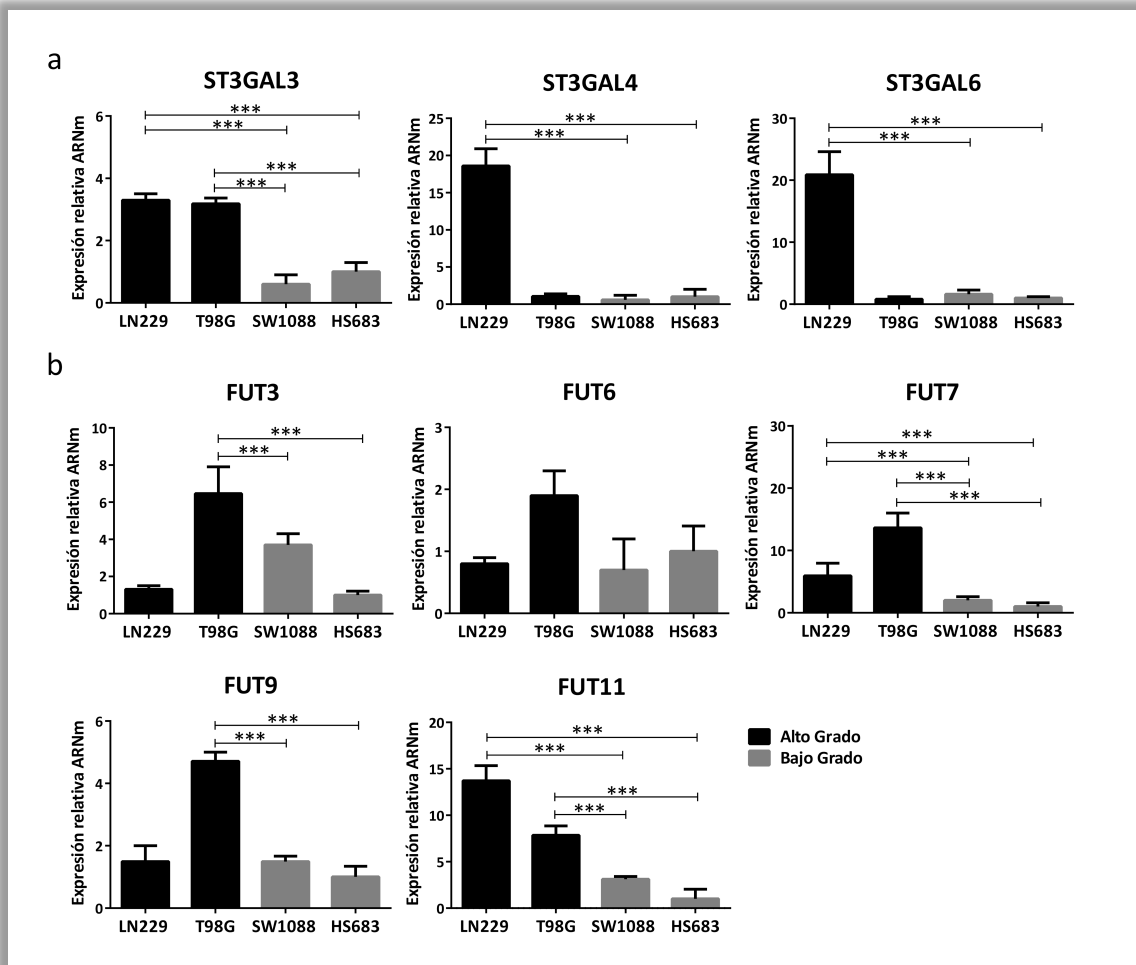


**Figura II.2 |** Expresión de SLe<sup>x</sup> en las líneas celulares de glioma humano de alto y bajo grado. Los valores expresados representan las IMF correspondientes a cada anticuerpo, de un ensayo representativo.

### Caracterización del perfil de expresión de glicosiltransferasas

Se continuó con el estudio de los glicanos de la familia Lewis, ya que presentaron una expresión diferencial entre los grupos de alto y bajo grado. En cuanto a la expresión de las glicosiltransferasas de la vía de biosíntesis, se cuantificaron de manera comparativa por qRT-PCR los niveles de transcritos expresados por las líneas celulares LN229, T98G, SW1088 y HS683 (**figura II.3**). De manera general, las líneas de alto grado sobreexpresaron niveles de transcritos de diversas sialil- y fucosiltransferasas, en comparación a las de bajo grado. Tanto LN229 como T98G sobreexpresaron niveles de

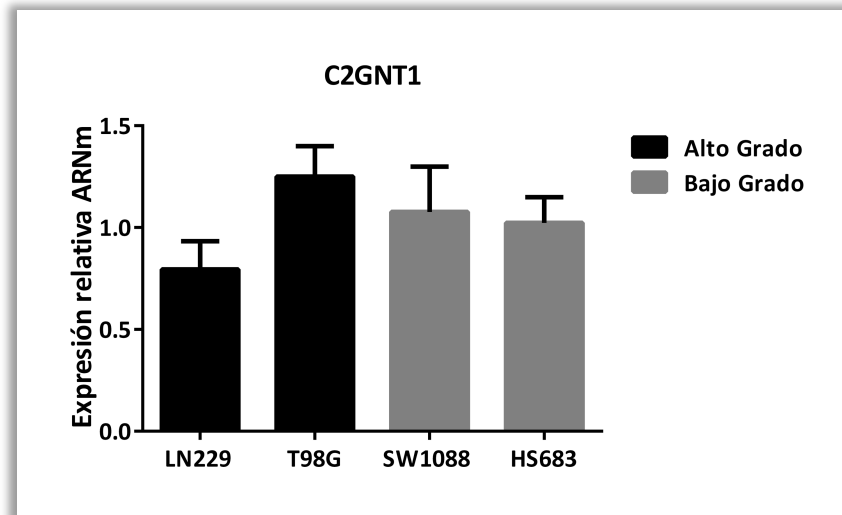
ARNm de FUT7/11, frente a las dos líneas de bajo grado, SW1088 y HS683. Además, T98G mostró una sobreexpresión significativa en los niveles de transcripto de FUT3/9 en comparación con las líneas de bajo grado. LN229 sobreexpresó niveles de ARNm de las ST3GAL4/6. ST3GAL3 fue sobreexpresado por LN229 y T98G, en menor medida que los genes de las otras sialiltransferasas.



**Figura II.3 | Comparación relativa de los niveles de transcripto codificantes para las glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de los glicanos de la familia Lewis en las líneas de glioma de alto y bajo grado. (a) Sialiltransferasas (b) Fucosiltransferasas. Los niveles de ARNm fueron analizados mediante qRT-PCR ( $\Delta\Delta CT$ ). HS683 se utilizó como muestra de referencia. Los valores representan la media y desvío estándar de tres ensayos independientes. \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA, seguido de post test Tukey.**

## Caracterización de glicanos O-GalNAc del core 2

La presencia de glicanos O-GalNAc del core 2, fue estudiada mediante cuantificación relativa de los niveles de transcripto de C2GNT1. Todas las líneas evaluadas mostraron niveles similares de transcripción del gen, sin exhibir diferencias significativas entre las líneas de alto y bajo grado (**figura II.4**).



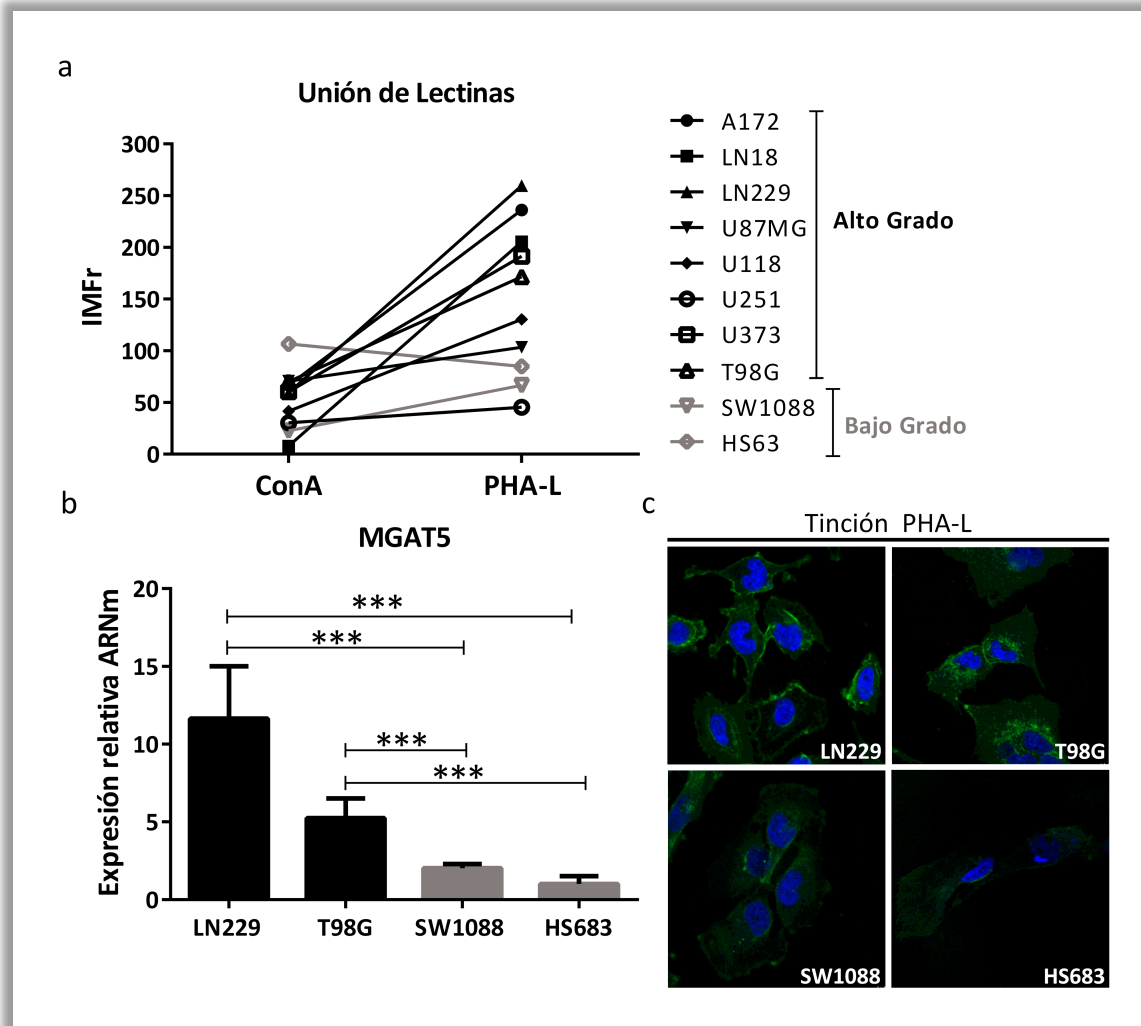
**Figura II.4 | Comparación relativa de los niveles de transcripto codificantes de C2GNT1 en glioma de alto y bajo grado.** Los niveles de ARNm fueron analizados mediante qRT-PCR ( $\Delta\Delta CT$ ). HS683 se utilizó como muestra de referencia. Los valores representan la media y desvío estándar de dos ensayos independientes.  $p > 0.05$ , ANOVA, seguido de post test Tukey.

## Caracterización de N-glicanos

Se analizaron diferentes estructuras de N-glicanos mediante la unión de lectinas vegetales cuantificada por CF. ConA es una lectina de unión a  $\alpha$ -manosa/ $\alpha$ -glucosa que reconoce N-glicanos de tipo oligomanosa con una alta afinidad y N-glicanos bi-antenarios de tipo complejo con baja afinidad. PHA-L reconoce estructuras con ramificaciones GlcNAc  $\beta 1,6$ , en N-glicanos complejos tri- y tetra-antenarios. En la **figura II.5a** se presentan las IMFr medias correspondientes a la unión de estas lectinas en las líneas celulares. De manera general, las líneas de glioma humano utilizadas presentan mayor unión de la lectina PHA-L en comparación con la unión de la lectina ConA. La única línea celular que presenta la relación inversa es la línea de bajo grado HS683. No se

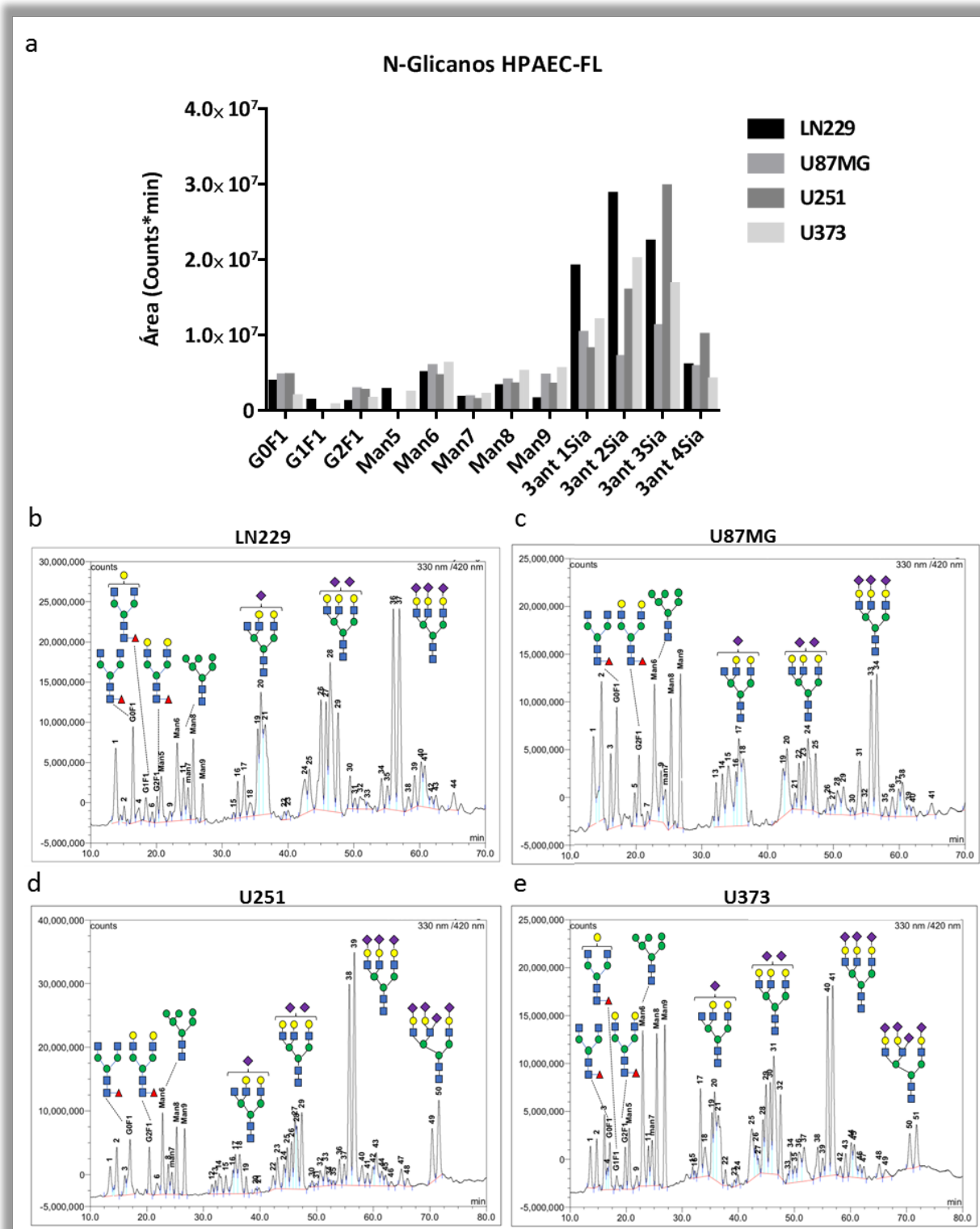
encontraron diferencias significativas en la unión de ConA entre todas las líneas celulares utilizadas. Para PHA-L, la mayoría de las líneas de alto grado presentaron mayor unión a esta lectina. La línea celular U251 fue la única de alto grado que presentó una unión a PHA-L comparable con las de bajo grado. En la **figura II.5b** se muestran los niveles de transcripción del gen MGAT5 que codifica para la enzima GnT-V, involucrada en la síntesis de las estructuras GlcNAc  $\beta$ 1,6 en N-glicanos. LN229 y T98G mostraron sobreexpresión de MGAT5, en comparación con las dos líneas de bajo grado. En la **figura II.5c** se puede observar la unión de PHA-L a las líneas mencionadas.

También se analizaron los perfiles de N-glicanos mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección de fluorescencia (HPAEC-FL). A partir de los patrones utilizados se identificaron estructuras de 1) N-glicanos complejos cortos no sialilados como G0F1, G1F1, G2F1 (donde G y F indican el número de galactosas y fucosas, respectivamente); 2) N-glicanos de oligomanosa como Man5/6/7/8/9; y 3) estructuras complejas con diferente número de ácidos siálicos (3ant 1/2/3/4 Sia). En la **figura II.6a** se presenta la comparación de las abundancias de las diferentes estructuras de N-glicanos analizadas para las líneas de alto grado LN229, U87MG, U251 y U373. En las **figuras II.6b-e** se ilustran los cromatogramas. En general, las cuatro líneas presentaron un perfil con bajos niveles de N-glicanos de estructura corta, así como de tipo oligomanosa. En cambio, todas las líneas mostraron alta abundancia en N-glicanos complejos, tri-antenarios y sialilados (Sia1-3).



**Figura II.5 | Caracterización de estructuras de N-glicanos en las líneas de glioma de alto y bajo grado.**

(a) Unión a las lectinas ConA y PHA-L por CF. Los valores corresponden a las medias de las IMFr de tres ensayos independientes. (b) Comparación relativa de los niveles de transcritto del gen MGAT5, mediante qRT-PCR ( $\Delta\Delta CT$ ), utilizando HS683 como referencia y el gen Actina como control endógeno. Los valores representan la media y desvío estándar de dos ensayos independientes. \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA. (c) Microscopía confocal (40X), tinción con PHA-L biotinilada y estreptavidina-FITC.



**Figura II.6** | Caracterización de estructuras de N-glicanos en las líneas de glioma de alto grado por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección de fluorescencia (HPAEC-FL). (a) Comparación de las abundancias de las diferentes especies de estructuras detectadas. (b-e) Cromatogramas y asignaciones de las líneas LN229, U87MG, U251 y U373, respectivamente.

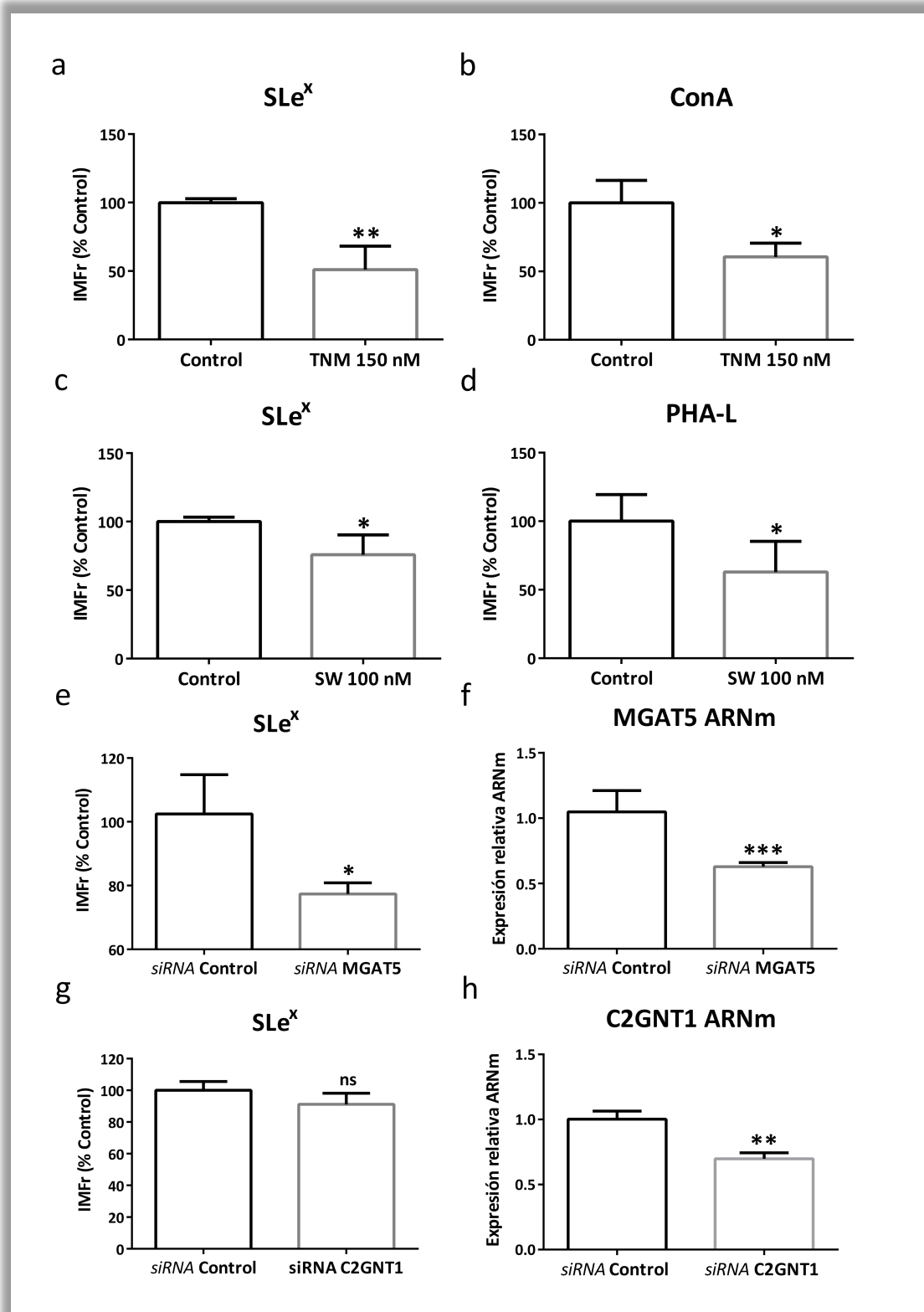
## Participación de N- y O-glicanos en glioma de alto grado

En relación con la alta expresión de SLe<sup>x</sup> en las líneas de glioma de alto grado, se continuó con diferentes estrategias para evaluar su presencia en estructuras tanto de N-glicanos, como en glicanos O-GalNAc del *core 2*. Para estas determinaciones se eligió continuar con la línea celular LN229 como modelo de glioma de alto grado. Las estrategias para evaluar la N-glicosilación consistieron en la utilización de dos inhibidores de síntesis, SW y TNM, y el silenciamiento del gen MGAT5. Para los glicanos O-GalNAc del *core 2*, se realizó el silenciamiento del gen C2GNT1.

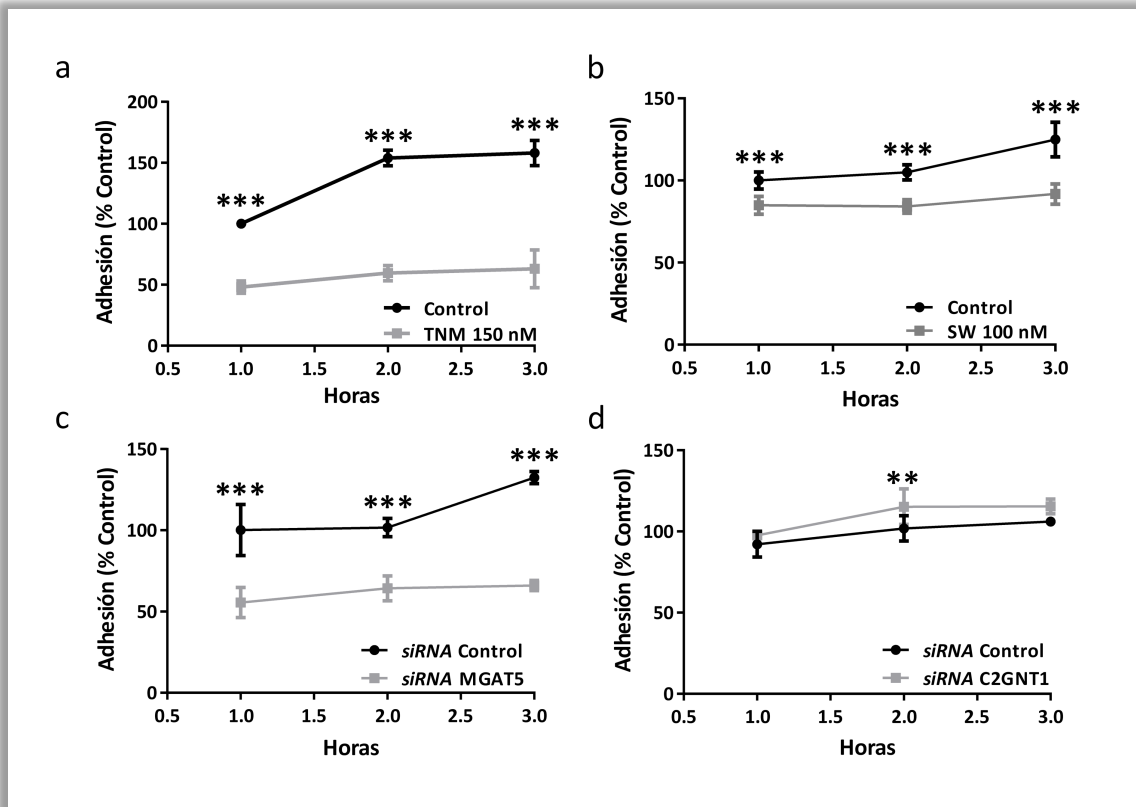
En la **figura II.7** se puede observar la expresión del glicano SLe<sup>x</sup> luego de las diferentes estrategias experimentales. En general, sólo la modulación negativa de la síntesis de N-glicanos produjo una reducción significativa en los niveles de SLe<sup>x</sup> en la membrana de las células LN229, cuantificada por CF. El tratamiento con TNM provocó una reducción de la expresión del glicano cercana al 50%, así como la disminución de la unión de la lectina ConA, utilizada como control de la reducción de N-glicanos (**figuras II.7a y b**). El tratamiento con SW también produjo una disminución en la presencia de SLe<sup>x</sup>, cercana al 30%, así como de la unión de la lectina PHA-L utilizada como control de la disminución de N-glicanos complejos (**figuras II.7c y d**). En cuanto a los silenciamientos, sólo la modulación negativa del gen MGAT5 causó disminución significativa de la expresión de SLe<sup>x</sup>, no se encontraron diferencias para C2GNT1 (**figuras II.7e y g**). Los *siRNAs* utilizados para los silenciamientos provocaron una reducción de los niveles de transcritos cercanas al 30% y 50%, para C2GNT1 y MGAT5, respectivamente (**figuras II.7f y h**).

Bajo las mismas condiciones experimentales se estudió también el impacto de los glicanos en la adhesión y la migración *in vitro*. En paralelo a la disminución de SLe<sup>x</sup>, las estrategias utilizadas para modular negativamente la síntesis de N-glicanos produjeron una disminución significativa en la cuantificación de ambos comportamientos. Los tratamientos con TNM, SW y el silenciamiento de MGAT5 provocaron una disminución de la adhesión celular de LN229 en todos los tiempos evaluados (**figuras II.8a-c**). En cambio, el silenciamiento de C2GNT1 indujo una disminución mínima en la adhesión de LN229 observada a las 2h del ensayo (**figura II.8d**). La migración celular fue inhibida en un 95%, 75% y 60%, bajo los tratamientos con

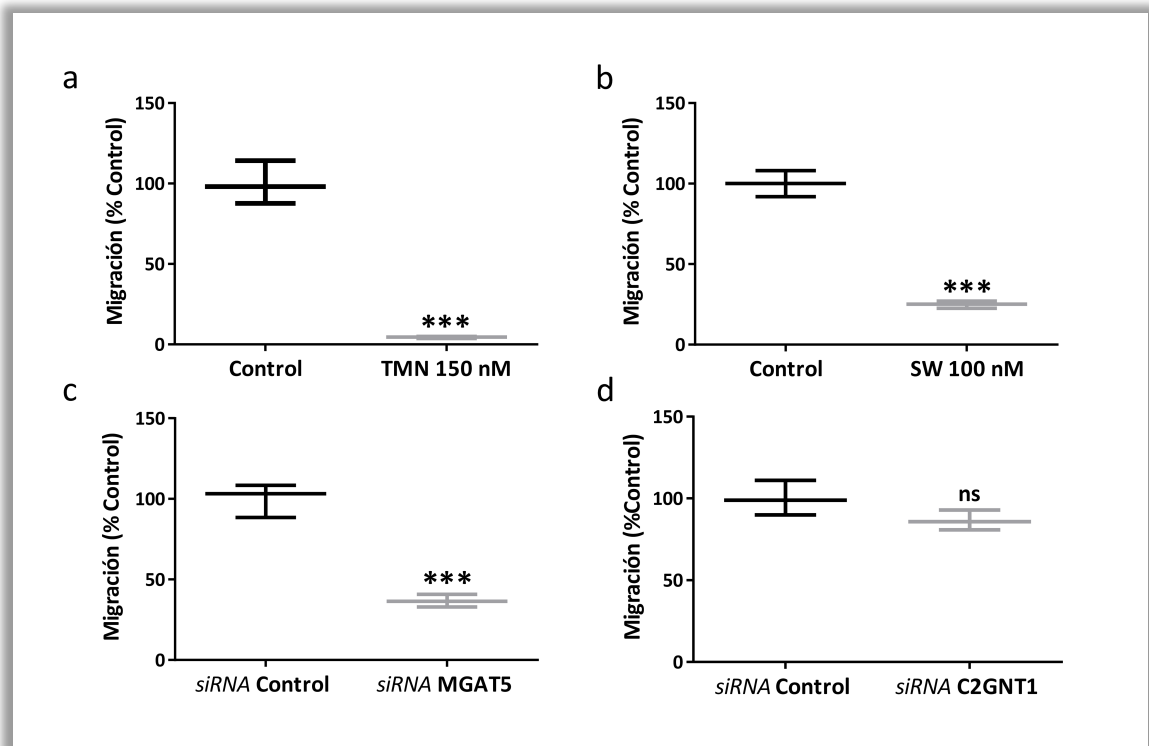
TNM, SW y silenciamiento de MGAT5, respectivamente (**figuras II.9a-c**). El silenciamiento de C2GNT1 no provocó cambios significativos en la migración de la línea celular LN229 (**figura II.9d**).



**Figura II.7 | Expresión de SLe<sup>x</sup> por CF en LN229 bajo diferentes estrategias experimentales y sus controles.** (a) Tratamiento con TNM 150 nM por 24 h. (b) Tratamiento TNM, unión a ConA. (c) Tratamiento con SW 100 nM por 24 h. (d) Tratamiento con SW, unión a PHA-L. (e) Silenciamiento de MGAT5 por transfección de *siRNA* durante 48h. (f) Niveles de ARNm de MGAT5 luego de silenciamiento durante 48 h. (g) Silenciamiento de C2GNT1 por transfección de *siRNA* durante 48h. (h) Niveles de transcritos de C2GNT1 luego de silenciamiento durante 48 h. Los valores representan medias y desvío estándar de tres ensayos independientes. (a, c, y e) Mann–Whitney. (b, d, f, g y h) T. Test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

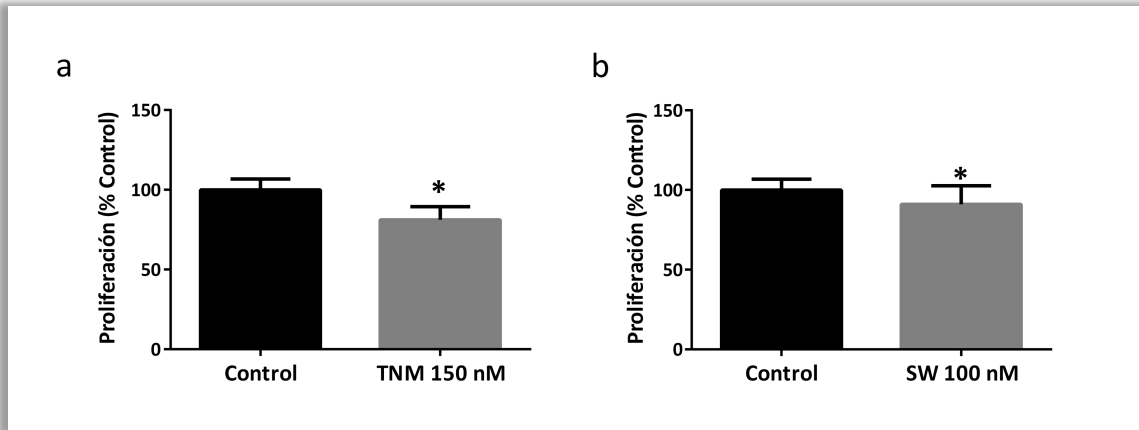


**Figura 11.8 | Adhesión celular *in vitro* de la línea celular LN229 bajo de diferentes estrategias experimentales.** (a) Tratamiento con TNM 150 nM durante 24 h. (b) Tratamiento con SW 100 nM durante 24 h. (c) Transfección con *siRNA* control o MGAT5 durante 48 h. (d) Transfección con *siRNA* control o C2GNT1 durante 48 h. La adhesión celular fue evaluada a 1-3 h y cuantificada mediante método colorimétrico de cristal violeta (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , T. Test). Los valores representan la media y desvío estándar de tres ensayos independientes.



**Figura II.9 | Migración *en Transwell* de la línea celular LN229 luego de diferentes estrategias experimentales.** (a) Tratamiento con TNM 150 nM durante 24 h. (b) Tratamiento con SW 100 nM durante 24 h. (c) Transfección con *siRNA* control o MGAT5 durante 48 h. (d) Transfección con *siRNA* control o C2GNT1 durante 48 h. Los valores representan la media y desvío estándar de tres ensayos independientes (\*\*\*)  $p < 0,001$ , T.Test).

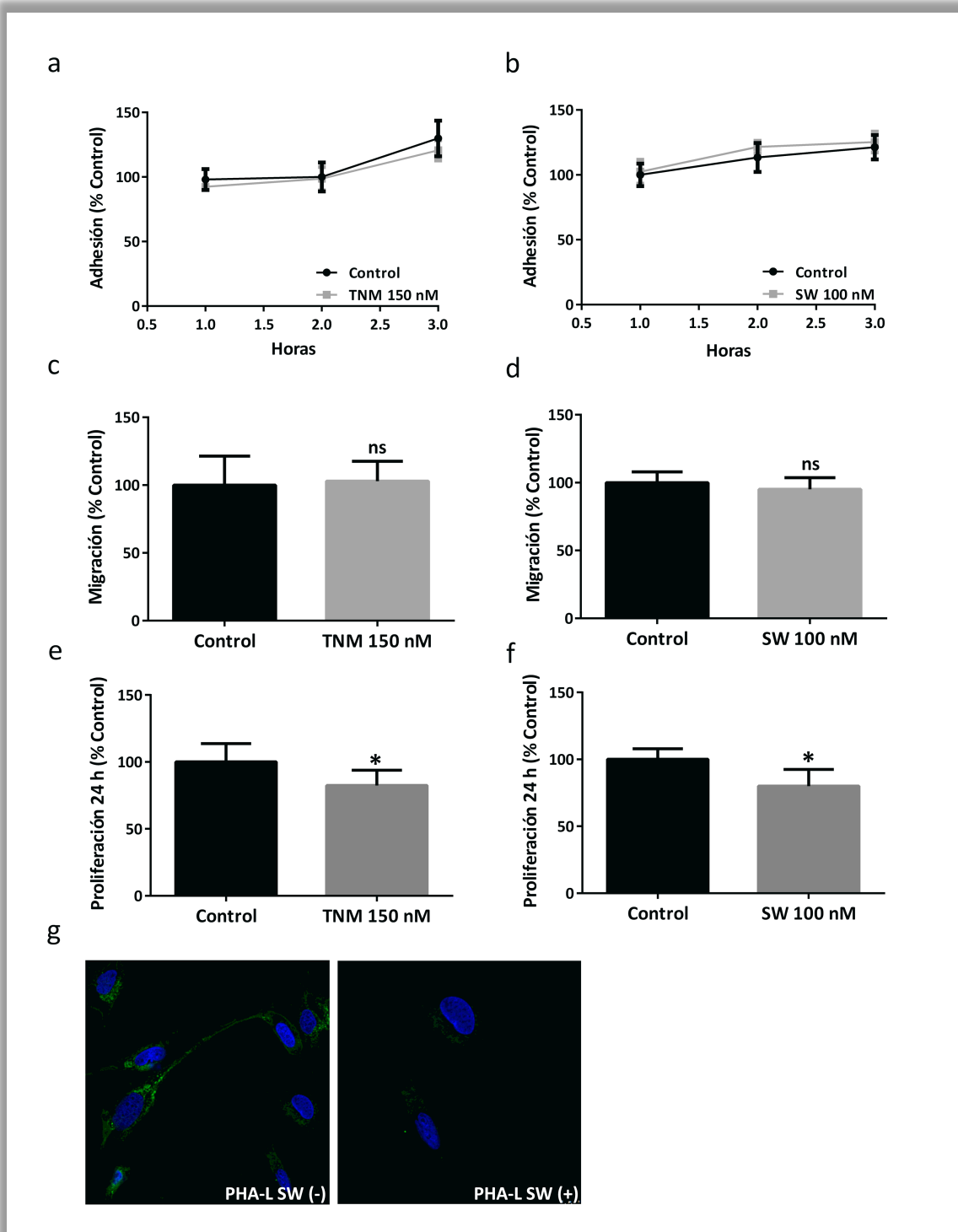
Como control de viabilidad celular se evaluó la proliferación a 24 h de incubación con los inhibidores. TNM y SW causaron reducción de la proliferación en un 20% y 10%, respectivamente, sobre la línea LN229 (figura II.10).



**Figura II.10** | Proliferación celular *in vitro* de LN229 luego del tratamiento con TNM y SW. (a) Tratamiento con TNM 150 nM durante 24 h. (b) Tratamiento con SW 100 nM durante 24 h. La proliferación fue cuantificada mediante método colorimétrico de cristal violeta. Los valores representan la media y desvío estándar de dos ensayos independientes (\* $p < 0,05$ , T. Test).

### Participación de N-glicanos en glioma de bajo grado

Debido a la participación de los N-glicanos en los eventos celulares evaluados en la línea de alto grado LN229, se decidió evaluar su participación en la línea celular de glioma de bajo grado SW1088. Para ello las células fueron tratadas con los inhibidores TNM y SW. No se observaron diferencias en adhesión y migración sobre esta línea celular como resultado de los tratamientos (**figuras II.11a y d**). Las incubaciones con TNM y con SW provocaron la disminución de la proliferación celular, en una relación cercana al 20% de sus controles (**figuras II.11e y f**). La incubación con SW 100 nM produjo una reducción en la unión a PHA-L, observada por microscopia confocal (**figura II.11g**).



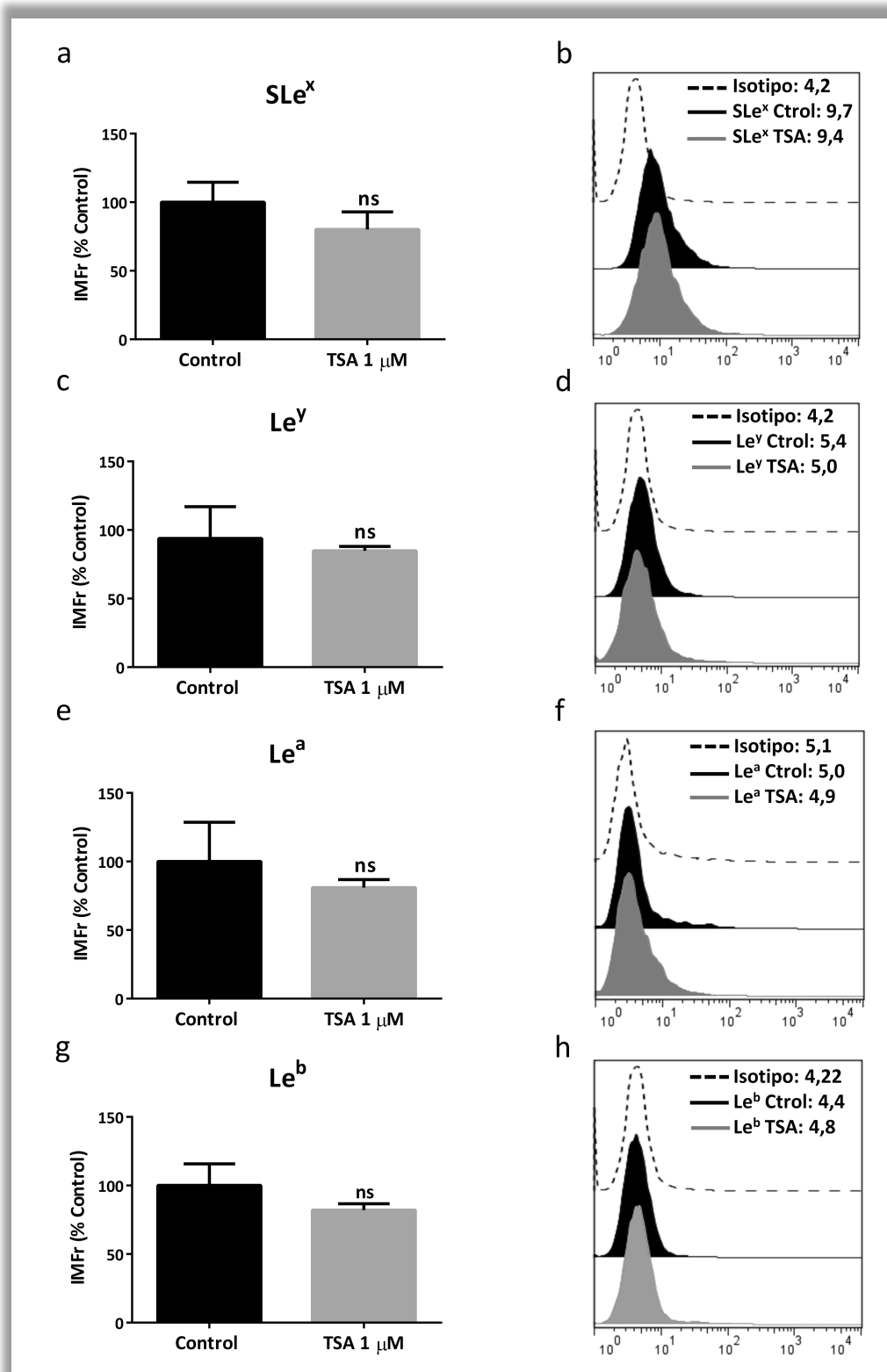
**Figura II.11 | Estrategias de inhibición de N-glicanos en la línea celular de bajo grado SW1088.** (a, c y e) Adhesión, migración en *Transwell* y proliferación celular luego del tratamiento con TNM 150 nM 24 h, respectivamente. (b, d y f) Adhesión, migración en *Transwell* y proliferación celular luego del tratamiento con SW 100 nM 24 h, respectivamente. Los valores representan la media y desvío estándar de tres ensayos independientes. (a-d)  $p > 0,05$ , T. Test. (e y f)  $*p < 0,05$ , T. Test. (g) Microscopía confocal (40X), *zoom in 1*, tinción de PHA-L control (SW -) y SW 100 nM (SW +).

## Evaluación de la regulación epigenética de los Lewis en glioma

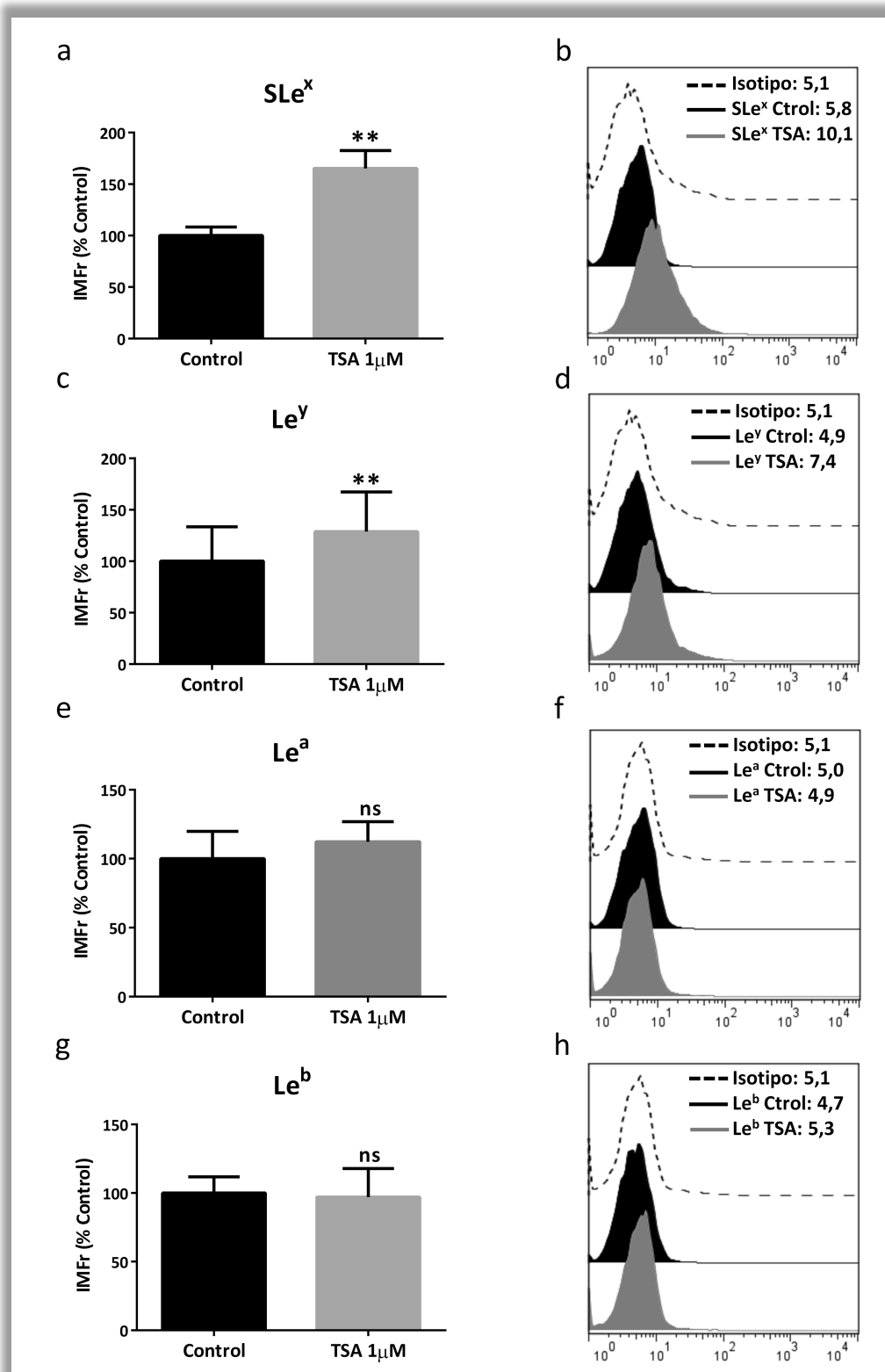
La evaluación de la regulación epigenética de los glicanos de la familia Lewis se realizó mediante la incubación con TSA. Luego de dicho tratamiento, se evaluó por CF la expresión de los glicanos SLe<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup>.

En la línea de alto grado, LN229, si bien se puede observar una tendencia a una menor presencia de los glicanos medida por CF, el tratamiento con TSA 1  $\mu$ M no causó diferencias significativas en la expresión de SLe<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup> (**figura II.12a-h**).

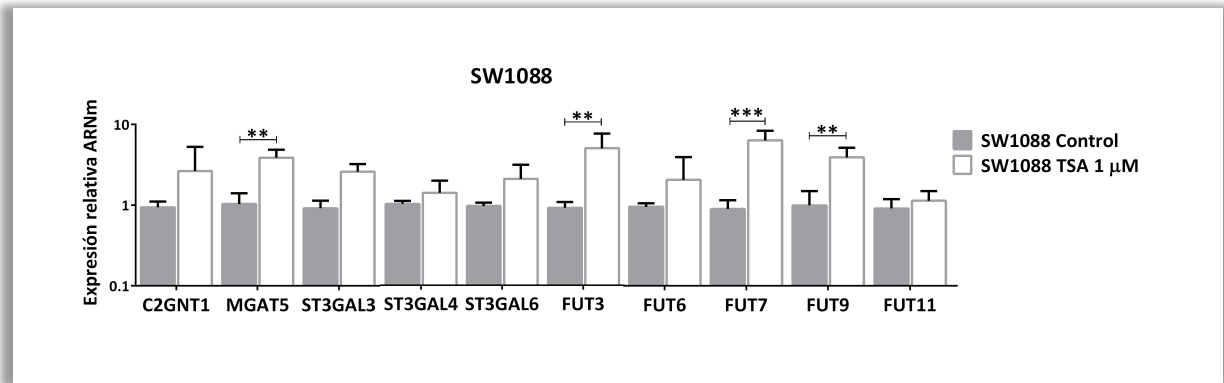
En la línea de bajo grado, SW1088, el tratamiento con TSA 1  $\mu$ M causó un aumento significativo en la expresión de SLe<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup>, en un 60% y un 30%, respectivamente (**figuras II.13a-d**). La expresión de Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup> no fue modulada de manera significativa por este tratamiento (**figuras II.13e-h**). Seguidamente se evaluaron los niveles de transcritos para las glicosiltransferasas FUT3/6/7/9/11, ST3GAL3/4/6 MGAT5 y C2GNT1 por qRT-PCR. El tratamiento con TSA produjo un aumento significativo de los niveles de ARNm de MGAT5 y de FUT3/7/9 (**figura II.14**).



**Figura II.12** | Evaluación de la regulación epigenética de los glicanos Lewis sobre glioma de alto grado. La línea LN229 fue tratada con TSA 1 μM o igual volumen de DMSO durante 24 h y la expresión de los diferentes glicanos fue determinada por CF. (a y b) SLe<sup>x</sup>. (c y d) Le<sup>y</sup>. (e y f) Le<sup>a</sup> (g y h) Le<sup>b</sup>. Los valores representan la media y desvío estándar de tres ensayos independientes. (a, c y g) \*p<0,05, T. Test. (e) Mann–Whitney. Los gráficos b, d f y h muestran un ensayo representativo.

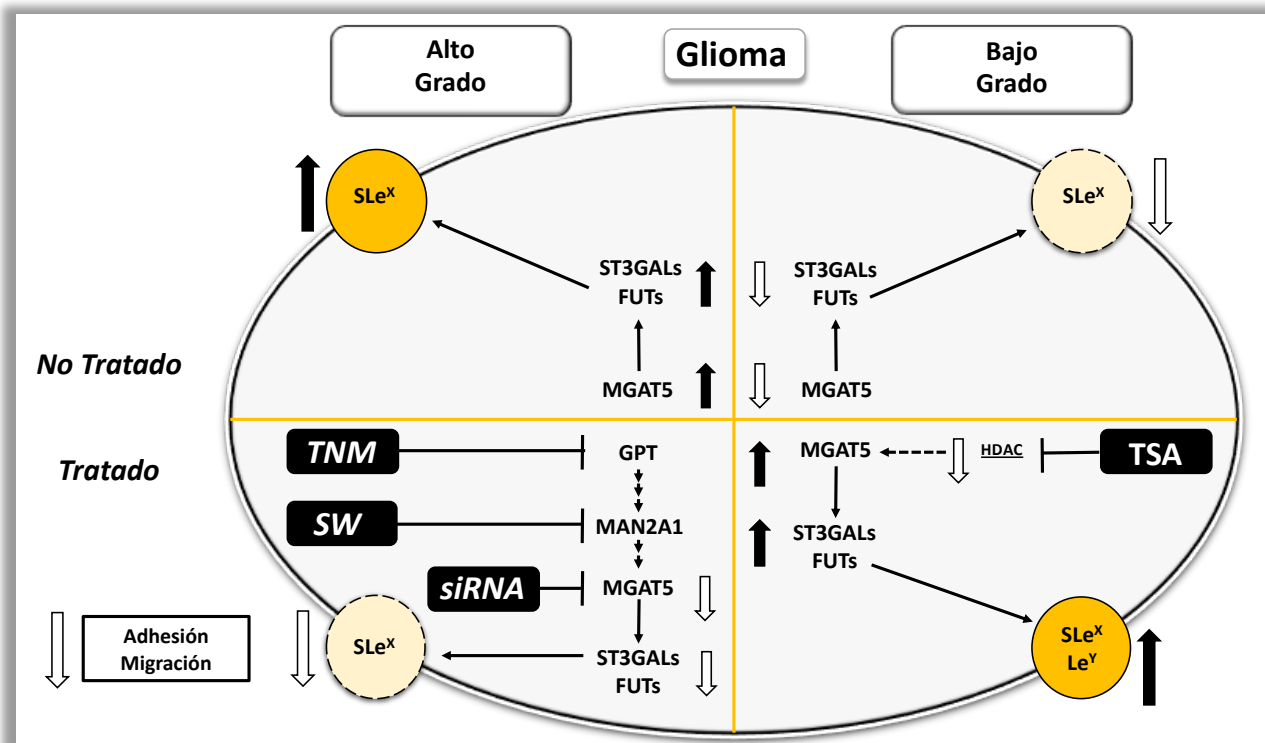


**Figura II.13 | Evaluación de la regulación epigenética de los glicanos Lewis sobre glioma de bajo grado.** La línea SW1088 fue tratada con TSA 1 μM o igual volumen de DMSO durante 24 h y la expresión de los diferentes glicanos fue determinada por CF. (a y b) SLe<sup>x</sup>. (c y d) Le<sup>y</sup>. (e y f) Le<sup>a</sup> (g y h) Le<sup>b</sup>. Los valores representan la media y desvío estándar de tres ensayos independientes (\*p<0,05, T.Test). Los gráficos b, d f y h muestran un ensayo representativo.



**Figura II.14 | Evaluación de la regulación epigenética de glicosiltransferasas sobre glioma de bajo grado.** La línea SW1088 fue tratada con TSA 1 μM o igual volumen de DMSO durante 24 h y la expresión de las glicosiltransferasas fue determinada por qRT-PCR ( $\Delta\Delta CT$ ). Los valores representan la media y desvío estándar de dos ensayos independientes (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , T.Test).

A modo de resumen, en la **figura II.15** se esquematizan los resultados principales de este capítulo para los modelos de estudio de glioma utilizados, en relación con los perfiles de glicanos y glicosiltransferasas, capacidades celulares y tratamientos.



**Figura II.15 | Representación esquemática de los resultados obtenidos.** Expresión de los Lewis y glicosiltransferasas en glioma de alto y bajo grado, sin tratamiento y bajo la modulación negativa de la N-glicosilación mediante los inhibidores TNM, SW y silenciamiento del gen MGAT5, así como tratadas con el inhibidor de deacetilasas de histonas, TSA. Las enzimas se expresan con los nombres de sus genes codificantes.



*Discusión Capítulo II*



El glioma humano es el tipo de tumor más frecuente en el sistema nervioso central, que incluye un grupo heterogéneo de neoplasias con diferentes grados de agresividad. El tratamiento actual para el tipo de glioma más agresivo, el GBM, brinda una sobrevivida promedio de los pacientes poco mayor a un año, por lo que la búsqueda de nuevas terapias para tratar esta indicación tan agresiva y con pocas opciones terapéuticas, es una necesidad.

Dentro del campo de las terapias dirigidas en glioma, diversos blancos han sido estudiados y muchas estrategias se encuentran en ensayos clínicos. Hasta el momento, sólo una terapia dirigida contra el receptor VEGFR se encuentra aprobada (BVZ), pero su beneficio clínico continua en observación<sup>269</sup>. En este escenario, sabiendo que la glicosilación aberrante es un proceso que acompaña la transformación maligna, su estudio representa un nicho para la búsqueda de nuevos blancos para el desarrollo de terapias novedosas en glioma.

En este capítulo se presenta un estudio sobre la participación de la glicosilación aberrante en glioma humano de alto y bajo grado utilizando un panel de diez líneas celulares como modelos de estudio. Principalmente se caracterizó la expresión de dos familias de glicanos reportadas en otras indicaciones, los O-GalNAc truncados y los Lewis, las glicosiltransferasas involucradas en su síntesis, la evaluación de la estructura principal en la que se encuentran presentes, la evaluación de su impacto en la biología tumoral y el estudio preliminar de su regulación epigenética mediada por deacetilasas de histonas.

Las líneas celulares utilizadas de glioma de alto grado presentaron una alta expresión de diferentes miembros de los glicanos de la familia Lewis, pero principalmente se observó un patrón diferencial de expresión en el glicano SLe<sup>x</sup>. La alta expresión de estos glicanos se encuentra apoyada por una sobreexpresión de los transcritos de las glicosiltransferasas involucradas en su síntesis. A su vez, los niveles de ARNm de varias de estas enzimas con la misma actividad presentaron sobreexpresión frente a las líneas de bajo grado, lo que sugiere un solapamiento de actividades en la síntesis de estas estructuras. Particularmente, los niveles de transcrito de FUT7/11 y ST3GAL3 se vieron sobreexpresados en las líneas de alto grado con respecto a las de bajo grado. Estos resultados se encuentran en línea con los hallazgos del grupo de Kroes, que describen la sobreexpresión de 11 genes en GBM, de los 359 genes involucrados en vías de

glicosilación analizados. Dentro de los genes sobreexpresados en GBM en comparación al tejido sano, se reportó FUT3. Asociado a los resultados descritos en este capítulo, los niveles de ARNm de esta fucosiltransferasa se hallaron sobreexpresados en la línea de alto grado T98G<sup>283</sup>.

Además del grupo de Kroes, existen otros reportes que sugieren la expresión de glicanos de la familia Lewis en glioma de alto grado. En el modelo de alto grado del grupo de Furukawa, que implica la transformación de astrocitos normales con diferentes oncogenes, las células presentan una sobreexpresión de estructuras fucosiladas, donde se destaca la fucosilación terminal<sup>282</sup>. En este trabajo, el grupo discute una sobreexpresión de fucosas en enlaces  $\alpha$ 1,2 y  $\alpha$ 1,3/4, hecho que se vincula con la sobreexpresión de las enzimas requeridas para la síntesis de los glicanos de la familia Lewis. Sumado a estas evidencias, en un trabajo de caracterización que compara los perfiles de glicoproteínas expresadas en las líneas celulares T98G y HS683, se observó mediante lectinas que la línea de alto grado T98G presenta mayores niveles de  $\alpha$ -1,2 fucosa y ácido siálico  $\alpha$ -2,3, en comparación con la línea de bajo grado HS683<sup>286</sup>. En consonancia, el grupo de Yamamoto fue uno de los primeros en reportar la sobreexpresión de ARNm de sialiltransferasas con actividad  $\alpha$ -2,3, así como del glicano unido en dicho enlace, en muestras de GBMs en comparación con astrocitos normales<sup>277</sup>. Estos reportes, en conjunto con los resultados presentados en este trabajo, apoyan la hipótesis del aumento de estructuras fucosiladas en enlaces  $\alpha$ -1,2 y  $\alpha$ -1,3/4 y sialiladas  $\alpha$ -2,3 en tumores más agresivos, que a su vez constituyen los requerimientos enzimáticos para la biosíntesis de los glicanos de la familia Lewis.

Además de los glicanos terminales, se buscó evaluar las estructuras de ramificación presentes en las líneas celulares. En relación con los N-glicanos, se estudió la presencia de estructuras de oligomanosa, así como de estructuras más complejas con ramificaciones GlcNAc  $\beta$ 1,6, mediante la unión de las lectinas ConA y PHA-L, respectivamente. De manera general, las líneas de glioma mostraron un perfil de N-glicanos del tipo ramificado, con menor presencia de estructuras oligomanosa. Comparando alto y bajo grado, las líneas de alto grado LN229 y T98G mostraron mayor presencia de ramificaciones GlcNAc  $\beta$ 1,6, acompañada de una sobreexpresión de los transcritos de MGAT5, en comparación con las líneas de bajo grado. El análisis por HPLC-FL mostró que las líneas de alto grado (LN229, U87MG, U251 y U373) presentan

un perfil general de N-glicanos similar. Se observaron N-glicanos cortos no sialilados y oligomanosas en menor proporción, y gran abundancia de N-glicanos complejos multi-antenarios con más de un ácido siálico. Estos resultados acompañan la hipótesis de la presencia de las ramificaciones GlcNAc  $\beta$ 1,6 en la transformación maligna de neoplasias de tejido glial<sup>280</sup>.

Considerando a SLe<sup>x</sup> como un glicano terminal asociado con glioma de alto grado, se evaluó su presencia en respuesta a distintos tratamientos para establecer la naturaleza de los glicanos de los cuales forma parte y su participación en la biología tumoral. Para ello se utilizaron tres estrategias que modulan negativamente los N-glicanos, TNM que bloquea la síntesis en la etapa de la síntesis del precursor lipídico; SW que inhibe a la enzima  $\alpha$ -manosidasa II bloqueando la producción de N-glicanos complejos; y el silenciamiento de MGAT5, enzima que cataliza las ramificaciones GlcNAc  $\beta$ 1,6 en N-glicanos complejos. Por otro lado, la participación de los glicanos O-GalNAc del *core* 2, se estudió mediante silenciamiento de C2GNT1. Las cuatro estrategias fueron realizadas sobre la línea de GBM con alta expresión de SLe<sup>x</sup>, LN229.

En relación con los N-glicanos, la presencia de SLe<sup>x</sup> se redujo en las tres condiciones de manera significativa, pero no de manera total. Esto supone la presencia de SLe<sup>x</sup> principalmente en glicoproteínas con estructuras de N-glicanos complejos. Este glicano también podría encontrarse en otros tipos de glicanos o glicoconjugados, como glicanos O-manosa o glicolípidos. Por ejemplo, se encuentra reportado que un glicano de esta familia, Le<sup>x</sup>, se expresa en la etapa inicial del cerebro en desarrollo y podría ser parte de glicanos O-manosilados en tejido del sistema nervioso normal<sup>287</sup>.

Además de la presencia de SLe<sup>x</sup> en N-glicanos, también se evaluó el impacto de la ausencia de estas estructuras andamio sobre la biología del GBM, estudiando las capacidades de adhesión y migración *in vitro* de LN229. La reducción de N-glicanos totales por tratamiento con TNM, así como la disminución de N-glicanos complejos mediante el silenciamiento de MGAT5 y el tratamiento con SW, se tradujo en una disminución de las capacidades celulares de adhesión y migración *in vitro*. Estudios sobre la adhesión con *coating* de *matrigel* u otros componentes de matriz extracelular son requeridos para complementar los resultados de adhesión *in vitro* obtenidos. En relación a la migración, la reducción causada por las estrategias experimentales va en línea con resultados obtenidos por otros grupos en los que vinculan las ramificaciones

GlcNAc  $\beta$ 1,6 en N-glicanos con la invasión del glioma<sup>280</sup>. Una evidencia que se destaca proviene del grupo de Hassani y colaboradores, los cuales han reportado que la inhibición de la actividad de GnT-V, sobre modelos de injerto ortotópico de la línea de GMB SNB75, conduce a una reducción drástica de la capacidad invasiva y proliferativa y a un aumento de la supervivencia general en relación con la terapia estándar con TMZ<sup>288</sup>. En conjunto, los resultados de las estrategias de reducción de la presencia de estructuras de N-glicanos en la línea LN229 sugieren una participación clave de las mismas en la biología del glioma, en donde se destaca la presencia de SLe<sup>x</sup> como glicano terminal de N-glicanos complejos.

En contraste con los resultados obtenidos para la línea de alto grado, si bien las incubaciones con TNM y SW sobre la línea celular de bajo grado SW1088 provocaron una disminución de las estructuras de N-glicanos y un leve impacto en la proliferación celular, no se vieron modificadas las capacidades de adhesión y migración *in vitro*. Esto sugiere una participación menor de estructuras de N-glicanos en glicoproteínas en la agresividad del glioma de bajo grado. En línea con esta hipótesis el grupo de Rooprai y colaboradores describió que compuestos propuestos como inhibidores de la invasión celular, como SW y diferentes flavonoides, no modificaron el fenotipo maligno de las líneas de glioma de bajo grado utilizadas<sup>289</sup>. En el presente trabajo se compararon las capacidades de adhesión y migración de las líneas celulares LN229 y SW1088, demostrando que la línea celular LN229 presenta características más agresivas que células de bajo grado SW1088. En este sentido, es interesante el impacto que tiene la modulación de la N-glicosilación en el fenotipo del glioma de alto grado y la ausencia de modulación en el glioma de bajo grado. Esto sugiere que determinadas estructuras de N-glicanos presentes en glicoproteínas en la línea celular de glioma de alto grado cumplen un rol importante en su agresividad, y que las mismas podrían no estar presentes en el glioma de bajo grado o que su disminución no es esencial para modificar eventos clave de la biología tumoral.

Con relación a los glicanos O-GalNAc, en la literatura se encuentran pocos trabajos que hagan referencia a su implicancia en glioma. Uno de los ejemplos principales proviene del campo de las glicosiltransferasas iniciadoras de este tipo de glicosilación (GALNT). El grupo de Zhang y colaboradores reportó que GALNT13 y GALNT1 se expresan de manera abundante en neuronas y en neoplasias como NB, pero ausente en

astrocitos y GBMs<sup>238,290</sup>. Por otro lado, el modelo de Furukawa de glioma de alto grado por la transformación de astrocitos con hTERT, SV40ER y RasV12, demuestra una reducción de glicanos O-GalNAc del *core 2*<sup>282</sup>. Este grupo sugiere que esta incapacidad de producir estructuras extendidas del *core 2* podría resultar en la acumulación de glicanos truncados. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo describen sólo altas expresiones de Tn en dos líneas de GBM. Esta ausencia de glicanos truncados podría deberse a la acumulación del antígeno T y, como consecuencia, de su versión sialilada (disialilT). En consonancia, la comparación de los niveles de expresión de C2GNT1, iniciadora del *core 2* de los glicanos O-GalNAc, realizada, no mostró diferencias entre las líneas de glioma de alto y bajo grado. En línea con esto, la modulación negativa de C2GNT1 no produjo disminución de la expresión de SLe<sup>x</sup> en la línea de alto grado LN229. Más aún, el silenciamiento de C2GNT1 tampoco moduló los procesos de adhesión y migración celular *in vitro* de esta línea celular. Los resultados obtenidos con relación a estas estructuras de O-glicanos, en conjunto con lo reportado en bibliografía, sugieren un rol menor en la participación de los glicanos O-GalNAc del *core 2* en el glioma de alto grado.

La regulación de la expresión génica mediada por epigenética involucra diferentes estrategias como la metilación del ADN y la modificación postraducciona de histonas por metilación, acetilación o fosforilación, entre otras. Una modificación epigenética clásica en el glioblastoma adulto es la hipermetilación del ADN de la enzima O-6-metilguanina ADN metiltransferasa, que suprime su función normal para eliminar grupos alquilo del ADN<sup>291</sup>. Esto hace que los pacientes con esta alteración sean más sensibles a los agentes alquilantes como la TMZ. Este es un ejemplo dentro de pacientes con GBM donde el silenciamiento se relaciona con una mayor sobrevida. En base a estos antecedentes, se decidió estudiar de manera preliminar la regulación de la expresión de los glicanos en glioma, evaluando mecanismos epigenéticos que controlan la condensación de la cromatina.

En relación con la glicobiología del glioma, pocos reportes asocian la regulación epigenética a la expresión de glicanos y glicosiltransferasas. Uno de los ejemplos principales es la sialilación  $\alpha 2,6$ . Se han analizado más de 200 gliomas primarios, un amplio repertorio de líneas celulares de glioma, así como un panel de 24 xenoinjertos de GBM, y en ninguno de los casos se han detectado niveles medibles del gen ST6GAL1

( $\alpha$ 2,6 sialiltransferasa 1)<sup>292</sup>. Sin embargo, el tratamiento con un inhibidor de ADN metiltransferasas en líneas celulares de glioma de alto grado produjo un aumento de la expresión de la enzima, aumento de las estructuras de glicano producto de su catálisis, y una disminución del fenotipo agresivo. Los resultados demuestran la participación de la regulación epigenética en GBM en relación con la expresión de glicanos<sup>285</sup>. En este sentido, el mismo grupo demostró mediante un análisis de ARNm por *microarrays*, que la expresión de la mayoría de los genes relacionados a vías de glicosilación (más de 70% de los analizados), se encuentran expresados de manera reducida en GBM. En conjunto, estos trabajos apoyan la hipótesis de que la existencia de cambios epigenéticos pueden tener implicancias en la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de glicanos<sup>283</sup>.

La regulación de los niveles de acetilación de la cromatina es uno de los mecanismos epigenéticos asociado a la regulación de la expresión génica en diversos tipos de tumores, incluyendo el glioma. En relación con las enzimas vinculadas a la represión transcripcional, las 18 HDACs reportadas en mamíferos pueden clasificarse como zinc dependiente (clase I, IIa, IIb y IV) o independiente (clase III). Diferentes grupos han reportado cambios en las expresiones de HDACs en gliomas con distintos perfiles de agresividad<sup>293</sup>. El grupo de Lucio-Etevoric y colaboradores evaluó la expresión de ARNm de diferentes clases de HDACs en 20 gliomas de bajo grado y 23 gliomas de alto grado. En dicho trabajo se informó la expresión disminuida de HDACs de clases II y IV en alto grado, en comparación con gliomas de bajo grado y tejido cerebral normal. En contraste, la sobreexpresión de HDAC I ha sido reportada en tumores proliferativos de alto grado en etapa tardía<sup>294</sup>. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la línea celular de bajo grado SW1088, utilizando el inhibidor de amplio espectro de HDACs I y II (TSA), muestra la regulación epigenética de la expresión de los glicanos de la familia Lewis SLe<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup>, así como de las glicosiltransferasas codificadas por MGAT5, FUT3/7/9. El tratamiento con TSA induce la expresión de genes regulados negativamente en la línea de glioma de bajo grado, lo que se traduce en un aumento de los glicanos Lewis en la membrana de estas células, a niveles comparables con la expresión encontrada en la línea celular de alto grado. Interesantemente, la línea más agresiva no modificó la expresión de los glicanos Lewis luego del tratamiento con el inhibidor. Sería interesante evaluar si el fenotipo maligno de la línea de bajo grado se modifica con inhibición de la represión epigenética, como sucede con el fenotipo de glicanos.

Los resultados de este capítulo demuestran un patrón diferencial de glicanos terminales de la familia Lewis en las líneas celulares de glioma de alto grado, y su asociación con la sobreexpresión de diferentes glicosiltransferasas involucradas en su vía de síntesis. Además, estos glicanos serían parte de estructuras de N-glicanos complejos, los cuales tiene un rol relevante en eventos clave de la biología tumoral del glioma como la adhesión y la migración celular. Finalmente, existen mecanismos de regulación epigenéticos que estarían mediando la expresión de este fenotipo de glicanos en el glioma de bajo grado.



*Conclusiones Capítulo II*



## Conclusiones Capítulo II

- I. La sobreexpresión de los glicanos de la familia Lewis, en particular de SLe<sup>x</sup>, se asocia con glioma de alto grado.
- II. Los glicanos O-GalNAc truncados no presentan diferencias de expresión entre las líneas celulares de glioma de alto y bajo grado.
- III. Las líneas celulares de alto grado sobreexpresan niveles de transcritos de sialil y fucosiltransferasas involucradas en la síntesis de los glicanos de la familia Lewis. Diferentes enzimas de estas familias se encuentran sobreexpresadas, reforzando la teoría de la redundancia en la actividad enzimática para la síntesis de los glicanos.
- IV. Los glicanos O-GalNAc del *core 2* parecerían no poseer un rol relevante en glioma. Las líneas celulares evaluadas no presentaron diferencias en los niveles de transcritos de C2GNT1, clave para la síntesis de estas estructuras. Además, su modulación negativa no produjo disminución de la expresión de glicanos Lewis, así como tampoco demostró un impacto en la biología tumoral de las células.
- V. Los glicanos de la familia Lewis se encuentran asentados principalmente sobre estructuras de N-glicanos complejos, con ramificaciones GlcNAc- $\beta$ 1,6, en los modelos utilizados.
- VI. Las líneas de glioma presentan un perfil predominante de N-glicanos complejos, con presencia de ramificaciones GlcNAc- $\beta$ 1,6. Dichas ramificaciones son predominantes en las líneas celulares de alto grado. Estas estructuras tendrían un rol relevante en la biología del glioma de alto grado, ya que su modulación negativa causa disminución del fenotipo agresivo en la línea de alto grado LN229.
- VII. Las estructuras de N-glicanos parecerían no presentar un rol clave en el fenotipo maligno de glioma de bajo grado, debido a la no modulación de capacidades como adhesión y migración tras su modulación negativa en la línea SW1088.

- VIII. Los glicanos de la familia Lewis y las glicosiltransferasas involucradas en su síntesis se encuentran regulados por mecanismos epigenéticos mediados por deacetilasas de histonas en la línea de bajo grado SW1088.

## Capítulo III

---

*Caracterización de la glicosilación de  
proteínas con interés terapéutico en glioma*



*Introducción Capítulo III*



## La glicosilación en terapias dirigidas contra el cáncer

Los desarrollos recientes en el campo de la oncología clínica han proporcionado avances significativos en el manejo de la enfermedad, con mejoras sustanciales en la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, las estrategias terapéuticas innovadoras dirigidas a proteínas específicas, expresadas tanto por células cancerosas como por células inmunes, han demostrado ser efectivas en ciertas indicaciones y en grupos de pacientes con características particulares. Lamentablemente, sigue existiendo un cierto número de pacientes que no muestran respuesta definitiva a este tipo de tratamientos. Este escenario pone en evidencia la necesidad de una mejor estratificación de la patología y un conocimiento integral de las moléculas involucradas<sup>295</sup>.

Un ejemplo que ilustra el papel de la glicosilación como parte de objetivos terapéuticos para el tratamiento del cáncer es la interacción entre el receptor inhibitor PD1 (*programmed death 1*) y su ligando PD-L1 (*programmed death-ligand 1*), considerados los objetivos terapéuticos con más trascendencia de los últimos años. PD-L1 en células cancerosas interactúa con PD-1 en células T, lo que permite a las células tumorales escapar de la vigilancia del sistema inmune<sup>296</sup>. La glicosilación no sólo es un requisito para su reconocimiento, sino que media las funciones de inmunosupresión<sup>297</sup>. Lo que es más, se ha reportado que la deglicosilación de PD-L1 no sólo incrementa su detección, sino que también incrementa la afinidad de unión de los anticuerpos anti PD-L1 aprobados por la FDA, tanto para diagnóstico como para su uso en terapia<sup>298</sup>. Esto ha motivado el desarrollo de diversos mAbs dirigidos a sitios puntuales de glicosilación en estas proteínas, que hasta el momento han presentado prometedores resultados preclínicos<sup>299,300</sup>. Por otro lado, el patrón de glicosilación también demostró influir en el resultado de terapias dirigidas a receptores con actividad tirosina quinasa. Por ejemplo, la expresión de la sialiltransferasa ST6GAL1 promueve la resistencia a la apoptosis mediada por gefitinib (inhibidor de EGFR) y trastuzumab (anticuerpo anti-HER2) en células de cáncer de ovario y gástrico<sup>295</sup>. Estas evidencias son un claro ejemplo de la necesidad de conocer la glicosilación de las dianas moleculares de las terapias dirigidas, ya que podría ser determinante para el éxito de la misma, así como también abrir nuevos horizontes para el desarrollo de terapias más específicas.

La pobre respuesta a los tratamientos, como la naturaleza altamente invasiva de los gliomas malignos que impide la extracción quirúrgica de todas las células tumorales, hace que en la actualidad se registre una inevitable recaída clínica de los pacientes. En general, estas capacidades migratorias e invasivas están mediadas por cascadas de señalización iniciadas por moléculas de adhesión, como integrinas (integrina  $\alpha v$  por ejemplo), o receptores del factor de crecimiento, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*)<sup>301</sup>. Por lo cual, el estudio de la glicosilación de estas moléculas de membrana con un rol clave en la progresión del glioma maligno, podría brindar nuevos enfoques para el desarrollo de terapias glico-dirigidas.

## EGFR

EGFR es un receptor tirosina quinasa transmembrana, con un dominio de unión a ligando extracelular, uno transmembrana y un dominio tirosina quinasa intracelular. Es miembro de la familia de receptores ErbB, que consta de 4 tirosinas quinasa relacionadas: EGFR (ErbB-1), HER2 /neu (ErbB-2), HER 3 (ErbB-3) y HER 4 (ErbB-4). EGFR puede activarse mediante el factor de crecimiento epidérmico (EGF), entre otros ligandos. Tras su activación, la dimerización del receptor induce la autofosforilación de los residuos de tirosina en los dominios C-terminales, provocando la activación de la proteína. Los residuos de tirosina fosforilados sirven como sitios de acoplamiento para proteínas adaptadoras que unen el receptor a las vías de señalización río abajo que culminan en la regulación de la migración celular, la proliferación y la supervivencia<sup>302</sup>. Además, EGFR regula la polimerización del citoesqueleto de actina. Los filamentos de actina actúan como un andamio al que se une el complejo de señalización inducido por EGF. Los cambios morfológicos y la reorganización del citoesqueleto de actina son algunas de las primeras respuestas a la activación de EGFR<sup>303</sup>. En diversas indicaciones, oncológicas, la expresión de EGFR se encuentra asociada a un aumento de la proliferación y migración de células tumorales mediado por las vías de señalización EGFR-Ras/Raf/MEK/ERK y EGFR-PI3K/AKT. En particular, EGF desencadena la reorganización del citoesqueleto de microfilamentos de actina mediante la regulación

de los miembros de la familia Rho GTPasas, pequeñas proteínas de unión a GTP que pertenecen a la superfamilia Ras, como Rho A, Rac y Cdc42<sup>304</sup>.

EGFR es considerado un potente oncogén, el cual puede presentar varias alteraciones en los diferentes grados de glioma, especialmente en GBM, como amplificación del gen, sobreexpresión del receptor, expresión de versiones con deleciones activadoras, entre otras. En glioma, dichas alteraciones se encuentran asociadas a la promoción de la proliferación, supervivencia, angiogénesis e invasión<sup>305</sup>. La amplificación del gen se ha descrito en niveles muy variables entre los diferentes grados de glioma, con valores entre 0-4%, 0-33% y 34%-64% en grados II, III y IV, respectivamente<sup>305</sup>. En GBM, se ha demostrado que la amplificación de EGFR promueve la invasión, proliferación y resistencia a la radioterapia y quimioterapia<sup>306</sup>. En un estudio de 87 pacientes con GBM se reportó que la amplificación de EGFR es un predictor independiente, significativo y desfavorable para la sobrevida general de los pacientes<sup>307</sup>. La sobreexpresión del receptor también se ha descrito de manera variable entre los grados de glioma, pero con mayor ocurrencia en GBM, alcanzando aproximadamente al 60% de los pacientes. Además, la amplificación y la sobreexpresión de EGFR han mostrado una distribución homogénea a través del tejido tumoral de los gliomas, y bajos niveles detectados en el tejido cerebral normal, lo que posiciona a EGFR como un blanco interesante para terapia dirigida<sup>308</sup>.

Se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas contra este receptor y muchos productos farmacéuticos están aprobados solos o en combinación con quimioterapia para el cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón y el cáncer de páncreas, entre otros. Los agentes aprobados son en su mayoría inhibidores de la tirosina quinasa que interfieren con la señalización del receptor, o mAbs dirigidos al receptor en la superficie celular para interferir con la unión del ligando<sup>309</sup>. Estas estrategias han alcanzado fases clínicas avanzadas en glioma. Como ejemplo, el mAb cetuximab en fase II no pudo demostrar la eficacia como agente único para el glioblastoma recurrente o en combinación con otros agentes o radiación. Por otro lado, nimotuzumab fue aprobado para el glioma en algunos países incluyendo Argentina y se le ha otorgado el estatus de medicamento huérfano para el glioma en EE. UU. Se encuentra en discusión por qué la mayoría de estas terapias no han tenido éxito en el tratamiento del glioma, pese a las características de blanco terapéutico que posee<sup>310</sup>.

EGFR es una proteína altamente glicosilada, el análisis de su secuencia aminoacídica muestra que en el dominio extracelular existen 11 sitios potenciales de N-glicosilación<sup>311</sup>. Los primeros estudios han demostrado que los glicanos en EGFR contribuyen en aproximadamente 40 kDa de su peso aproximado de 175 kDa. Estudios con inhibidores de glicosilación y monosacáridos marcados radioactivamente han demostrado que los N-glicanos son importantes para su translocación y maduración<sup>312</sup>. El patrón de glicosilación del receptor ha sido profundamente estudiado en modelos celulares, principalmente en células de ovario de hámster chino (CHO) y la línea celular de carcinoma epidermoide humano A431, describiendo su glicosilación en la mayoría de los sitios canónicos. El patrón de glicosilación de EGFR descrito para células A431 presenta, en su mayoría, N-glicanos del tipo complejo, predominantemente cadenas tri-/tetra-antenarias con Neu5Ac, Fuc y  $\alpha$ -GalNAc terminales, y en un porcentaje menor, N-glicanos tipo oligomanosa (principalmente Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>)<sup>313</sup>.

Si bien son numerosos los reportes que describen la glicosilación de EGFR, el rol de los glicanos en los mecanismos de unión de ligando y transducción de señales ha sido menos abordado, menos aún si se tienen en cuenta las variaciones de la glicosilación entre tipos celulares o estados patológicos como el cáncer. Un ejemplo que se destaca es el trabajo de Tsuda y colaboradores, donde informan que la eliminación del sitio de glicosilación en la Asn 420 de EGFR en células COS-1 (línea inmortalizada, derivada de tejido renal de mono) produce la dimerización espontánea del receptor, demostrando su relevancia en la función del receptor<sup>314</sup>. En relación a la unión con su ligando, se ha informado que la unión de EGF a EGFR se reduce significativamente por el tratamiento de células A431 con inhibidores de la N-glicosilación, así como por la ausencia de la fucosilación del *core* demostrado en ratones *knockout* para FUT8<sup>315,316</sup>. En células de rata PC12 se describió que la transfección con MGAT3 induce la presencia de N-glicanos bisectados en EGFR y una disminución significativa en la unión de EGF y la autofosforilación de EGFR<sup>317</sup>.

Trabajos sobre diferentes modelos de cáncer han descrito un rol relevante de N-glicanos ramificados  $\beta$ 1,6-GlcNAc en la señalización de EGFR<sup>318</sup>. El silenciamiento de MGAT5 sobre la línea de carcinoma de mama humano altamente invasivo MDA-MB231 produce una atenuación del fenotipo invasivo así como una inhibición de la señalización vía EGFR<sup>319</sup>. En modelos tanto *in vitro* como *in vivo* de carcinoma nasofaríngeo, la

inhibición de GnT-V produce una disminución de ramificaciones  $\beta$ 1,6-GlcNAc en EGFR, disminuyendo la señalización del receptor y aumentando la sensibilidad a cetuximab<sup>320</sup>. Según estudios llevados a cabo por el grupo de Liu y colaboradores, seis sitios de glicosilación en EGFR parecen tener glicanos de tipo complejo con terminales sialiladas y fucosiladas en líneas celulares de cáncer de pulmón<sup>321</sup>. Con relación a estas estructuras, dentro de la familia Lewis se destaca la presencia de Le<sup>y</sup> en EGFR, mediando el fenotipo agresivo de líneas celulares de carcinoma de ovario, oral, melanoma y cáncer de pulmón. Otros miembros de esta familia como SLe<sup>x</sup> o SLe<sup>a</sup> se han reportado en otros receptores RTK, como C-Met o ErbB2, respectivamente<sup>318</sup>. En consonancia, en un estudio reportado por Stroop y colaboradores sobre la versión secretada de EGFR en la línea A431, se caracterizan 32 glicanos de tipo complejo que contienen los glicanos Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup> y SLe<sup>x</sup><sup>322</sup>.

En glioma, trabajos sobre un número limitado de líneas celulares muestran un rol relevante de los N-glicanos en la función de EGFR. Sobre la línea U251 de glioma humano, la inhibición de la N-glicosilación mediada por diferentes agentes reduce la autofosforilación, y en el caso particular de tunicamicina, disminuye la expresión de EGFR. Estos tratamientos además devuelven la sensibilidad a radiación ionizante, a la cual la línea es resistente<sup>210</sup>. En relación con N-glicanos complejos, el grupo de Rebaa y colaboradores ha reportado el bloqueo de la unión de EGF al receptor mediante la lectina que reconoce N-glicanos bisectados (PHA-E). Sin embargo, el mismo grupo ha descrito que la sobreexpresión de MGAT3 en la línea U373 conduce a una disminución significativa de la unión de EGF y la autofosforilación de EGFR<sup>323</sup>. A diferencia de otras indicaciones, en glioma no se encuentra claramente descrita la relación de ramificaciones  $\beta$ 1,6-GlcNAc en EGFR. En conjunto, estos reportes sugieren el rol relevante de N-glicanos complejos en la función del receptor EGF, lo cual podría tener implicancias terapéuticas en glioma.

## Integrina $\alpha v$

Las integrinas son heterodímeros compuestos por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ , caracterizadas por un gran dominio extracelular, un dominio transmembrana corto y otro intracelular pequeño no catalítico. Hasta la fecha en humanos se han identificado 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$ , las cuales forman al menos 24 heterodímeros únicos, dentro de los cuales 8 reconocen la secuencia RGD (arginina, glicina, ácido aspártico) en los ligandos nativos. Cada combinación  $\alpha/\beta$  determina la capacidad y funciones específicas de unión. Estos receptores juegan un papel en la regulación de la adhesión a proteínas de la matriz extracelular o a proteínas de otras células como las del sistema inmune<sup>324</sup>. Las integrinas se agrupan en la membrana y transducen señales intracelulares a través de su dominio citoplasmático (principalmente a través de la subunidad  $\beta$ ) por activación de quinasas (quinasa de adhesión focal o FAK), quinasa ligada integrina o Rho-GTPasas. Las integrinas pueden activar vías que conducen a la transcripción génica para mantener la proliferación, supervivencia, diferenciación y migración<sup>325</sup>. En particular, la integrina  $\alpha v$  ( $I\alpha v$ ) es una molécula de aproximadamente 135 kDa que forma heterodímeros de membrana integral unidos por puente disulfuro con al menos cinco cadenas  $\beta$ , incluidas  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$  y  $\beta 8$ <sup>326</sup>. Esta subunidad es una glicoproteína transmembrana de 1048 aminoácidos (aa) con un dominio extracelular de 962 aa, y una cola citoplasmática corta de 32 aa. El extremo N-terminal contiene un dominio de hélice  $\beta$  que consta de siete repeticiones de 60 aa, el dominio de unión a ligando<sup>327</sup>. Las integrinas que contienen  $\alpha v$  se unen a múltiples moléculas de la matriz extracelular, incluyendo vitronectina, laminina, fibronectina, entre otros<sup>326</sup>.

Dentro de los pares que puede integrar la subunidad  $\alpha v$ , las integrinas  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha v\beta 5$  fueron las primeras de su familia en ser identificadas como atractivas dianas terapéuticas en GBM<sup>328,329</sup>. Estas integrinas se expresan específicamente en células de GBM y se encuentran ausentes en células cerebrales normales. Aunque varias integrinas se han reportado sobreexpresadas en esta indicación, no todas correlacionan con una menor supervivencia total de los pacientes. Los niveles de expresión de las integrinas  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  y  $\alpha v\beta 8$  y las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ , se han asociado con mayores grados de glioma, y en particular las sobreexpresiones de  $\alpha v\beta 3$  o  $\alpha 3\beta 1$ , se correlacionaron con mal pronóstico en GBM<sup>330,331</sup>. El grupo de Malric y colaboradores realizó un análisis

estadístico basado en datos de la base TCGA para determinar la sobrevida total de pacientes con GBM según alta o baja expresión de ARNm de diferentes integrinas sobre un grupo de GBM primarios tratados con radio y quimioterapia estándar. En este análisis la sobreexpresión de  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha v$ , pero no de  $\beta 5$ ,  $\beta 4$ ,  $\alpha 6$  ni  $\alpha 7$ , correlacionó significativamente con una disminución de la sobrevida total de los pacientes. Estos datos muestran que varias integrinas podrían desempeñar un papel en la progresión del GBM y que podrían ser de interés terapéutico<sup>331</sup>. En este sentido, diversos agentes dirigidos específicamente a integrinas (como anticuerpos, péptidos, peptidomiméticos antagonistas y otras moléculas pequeñas) han alcanzado ensayos clínicos, para diferentes indicaciones incluyendo GBM. Un ejemplo que se destaca es el pentapéptido RGD ciclado Cilengitida, el cual bloquea la activación de las integrinas  $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ . Esta molécula tuvo resultados satisfactorios en ensayos clínicos de fase I y II en GBM en combinación con radio y quimioterapias, con buena tolerancia y beneficio clínico en sobrevida libre de progresión y sobrevida total. Sin embargo, ensayos de fase II y III diseñados para evaluar la eficacia de Cilengitida en pacientes con GBM con diferente estatus de metilación del promotor de MGMT, no mostraron una mejora en la sobrevida de los pacientes<sup>332,333</sup>. Monoclonales humanizados dirigidos a la subunidad  $\alpha v$  también han llegado a ensayos clínicos de fase II en melanoma y cáncer colorrectal, pero sin beneficios frente a las terapias estándar<sup>331,334</sup>.

La subunidad  $\alpha v$  posee 13 sitios potenciales de N-glicosilación, según *The Universal Protein Resource* (UniProt)<sup>335</sup>. Existen pocos reportes que describan la glicosilación de esta proteína. Estas investigaciones fueron llevadas a cabo en diferentes modelos de estudio, entre ellos células CHO, células T Jurkat y hasta tejido hepático; y pocas abordan en profundidad la estructura de N-glicanos encontrada<sup>336-338</sup>. En particular, se destaca la publicación realizada por el grupo de Hu y colaboradores, donde realizan un reanálisis de datos proteómicos globales de tejidos de xenoinjerto de cáncer de mama<sup>339</sup>. Dentro de este análisis se describen cuatro posiciones de glicosilación de la integrina  $\alpha v$  (Asn 74, 488, 615 y 945), con la presencia de distintos tipos de N-glicanos en la misma posición, evento denominado microheterogeneidad. Debido a que la glicosilación es dependiente de muchos factores entre los cuales se encuentra el tipo celular o de tejido, esta información brinda un mapa de posibles sitios de N-glicosilación de la  $\alpha v$ , que podría no ser compatible con otros tejidos o modelos. Con relación al

cáncer, existen algunos reportes que mencionan la glicosilación de esta subunidad como factor importante en la biología de las células. Pochech y colaboradores informaron la presencia de alteraciones en el patrón de glicosilación de la  $\alpha v$  en melanoma. Utilizando modelos de melanoma primario y altamente metastásicos se describió un perfil de N-glicanos de alta manosa y bisectados en el modelo menos agresivo, a diferencia de N-glicanos con reducción de ácido siálico  $\alpha 2-6$  y aumento del  $\alpha 2-3$ , en el modelo más agresivo<sup>340</sup>. En un trabajo con una línea celular de carcinoma de colon, Lehmann y colaboradores estudiaron la glicosilación de la subunidad  $\alpha v$  mediante inmunoprecipitación y digestión con glicosidasas. En este trabajo reportan la presencia de N-glicanos maduros con presencia de ácidos siálicos, así como también la presencia de N-glicanos inmaduros<sup>341</sup>. No se han encontrado en la literatura trabajos similares sobre la  $\alpha v$  en glioma.

Debido a las características que los hacen blancos terapéuticos interesantes para el tratamiento del glioma, y lo poco que se conoce sobre su glicosilación, en este capítulo se propone realizar un abordaje sobre el perfil de glicanos presentes en EGFR e  $\alpha v$ .

*Objetivos Capítulo III*



## Objetivo General Capítulo III

Caracterizar la glicosilación del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la subunidad de Integrina  $\alpha v$  ( $\text{I}\alpha v$ ).

## Objetivos Específicos Capítulo III

- I. Caracterizar la expresión de EGFR mediante CF y *Western Blot* en líneas celulares de glioma humano.
- II. Inmunoprecipitar EGFR a partir de la línea de alto grado LN229, mediante mAbs y proteína A-sefarosa.
- III. Caracterizar la glicosilación de EGFR mediante mAbs y lectinas.
- IV. Estudiar la participación de la glicosilación de EGFR en la polimerización del citoesqueleto de actina, mediante modulación negativa de la síntesis de N-glicanos y estimulación con su ligando EGF en la línea de alto grado LN229.
- V. Estudiar la participación de la glicosilación de EGFR en la polimerización del citoesqueleto de actina, mediante modulación negativa de la síntesis de N-glicanos y estimulación con su ligando EGF en la línea de bajo grado SW1088.
- VI. Caracterizar la expresión de  $\text{I}\alpha v$  mediante *Western Blot* y CF en líneas celulares de glioma humano.
- VII. Inmunoprecipitar  $\text{I}\alpha v$  a partir de la línea de alto grado LN229, mediante mAbs y proteína A-sefarosa.
- VIII. Caracterizar la glicosilación de  $\text{I}\alpha v$  en LN229 mediante mAbs y lectinas.
- IX. Caracterizar la glicosilación de  $\text{I}\alpha v$  en LN229 mediante espectrometría de masas (EM).
- X. Inmunoprecipitar y caracterizar la glicosilación de  $\text{I}\alpha v$  en SW1088 mediante EM.

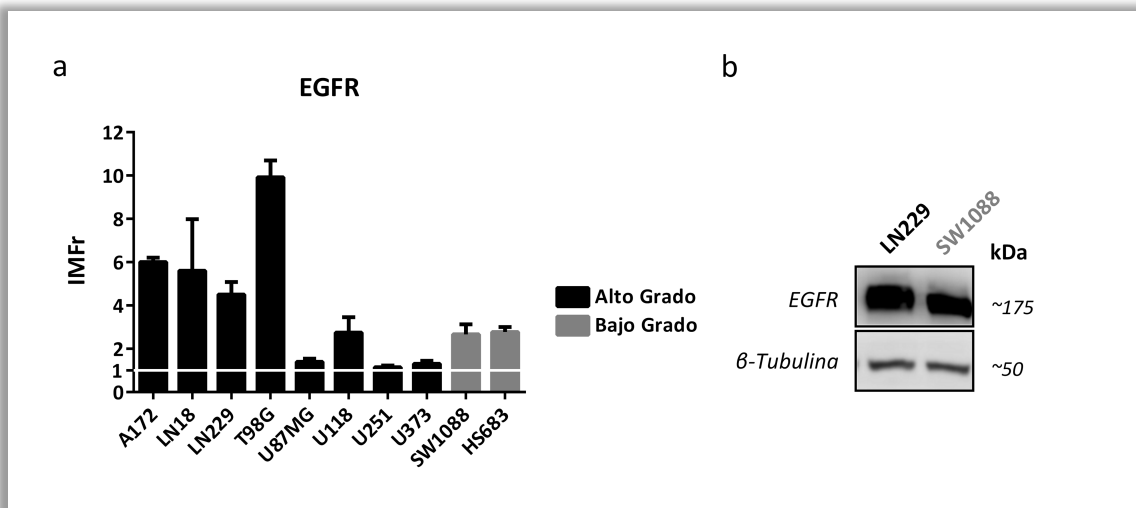


*Resultados Capítulo III*

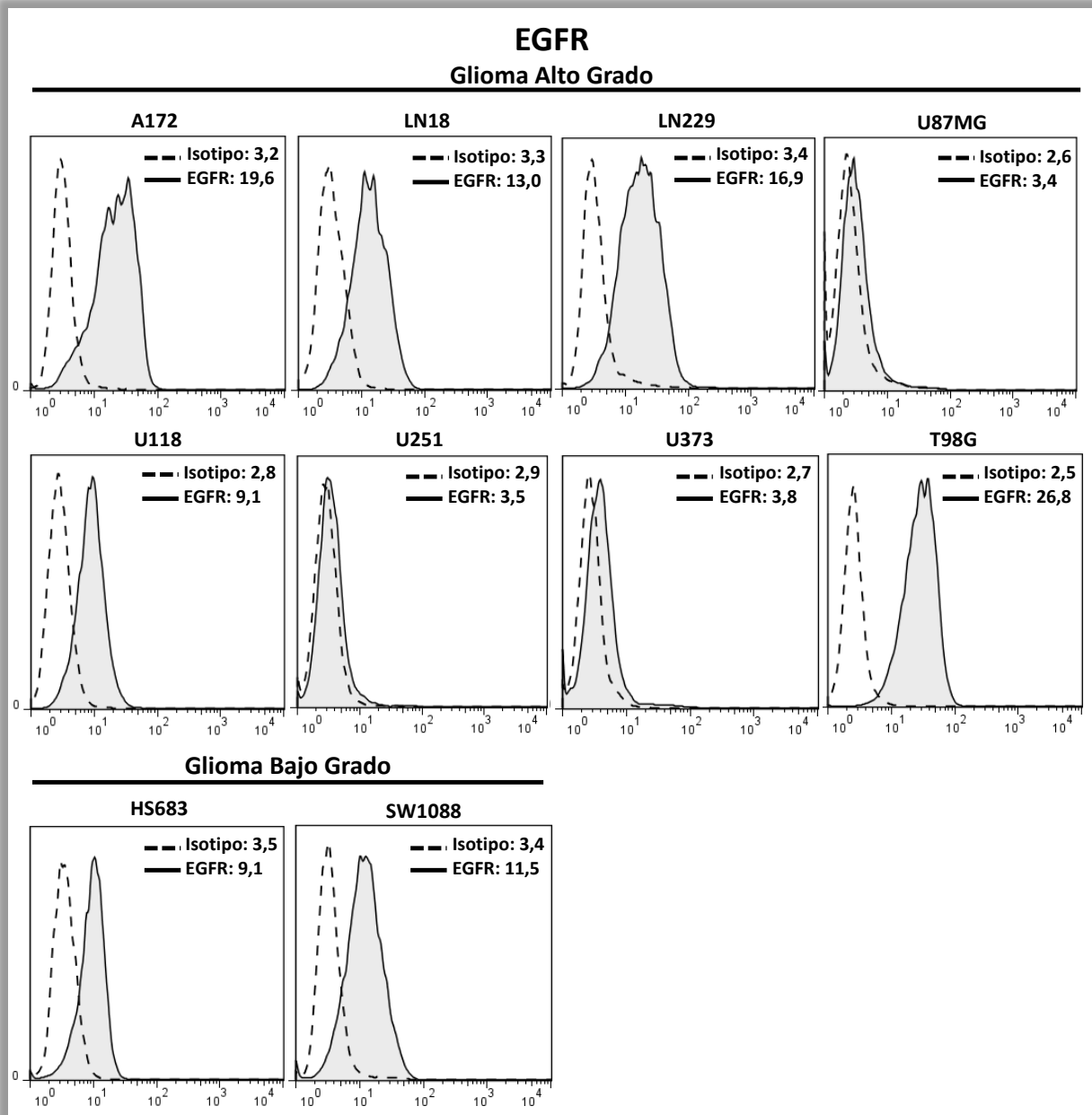


## Expresión de EGFR en líneas celulares de glioma de alto y bajo grado

Se caracterizó la expresión de EGFR en el panel de diez líneas celulares de glioma, de alto y bajo grado. En la figura III.1a se representan las expresiones de la proteína obtenidas mediante CF, en IMFr para cada línea celular. En general, todas las líneas celulares presentaron expresión del receptor, diferenciando un subgrupo de las líneas de alto grado con una sobreexpresión en comparación con las demás líneas celulares. Las líneas de alto grado T98G, A172, LN18 y LN229 presentaron niveles de IMFr entre 4,5 y 10. En comparación, las líneas de alto grado U87MG, U251 y U373 mostraron niveles menores de expresión del receptor, con valores de IMFr entre 1,2 y 1,5. La línea de alto grado U118, junto con las dos de bajo grado, SW1088 y HS683, expresaron niveles de EGFR cercanas a 3 IMFr. En la figura III.1b se muestra la expresión de EGFR mediante *Western Blot* de las líneas LN229 y SW1088, de glioma de alto y bajo grado respectivamente, donde se pueden observar mayores niveles de expresión de EGFR en la línea LN229. En la figura III.2 se ilustra un ensayo representativo de CF de la expresión de EGFR sobre cada una de las líneas celulares.



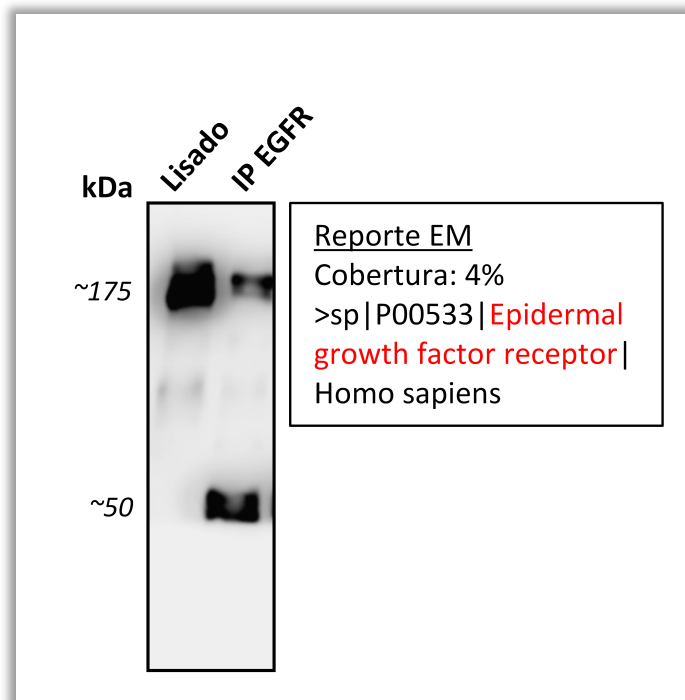
**Figura III.1 | Expresión de EGFR en las líneas celulares de glioma humano de alto y bajo grado.** (a) CF. Los valores representan el promedio de IMFr, de tres ensayos independientes, con su desvío estándar. El valor uno referencia el control de Isotipo. (b) *Western Blot* de EGFR y  $\beta$ -Tubulina sobre LN229 y SW1088.



**Figura III.2 |** Expresión de EGFR en las líneas celulares de glioma humano de alto y bajo grado. Los valores expresados representan las IMF, correspondientes a cada anticuerpo, de un ensayo representativo.

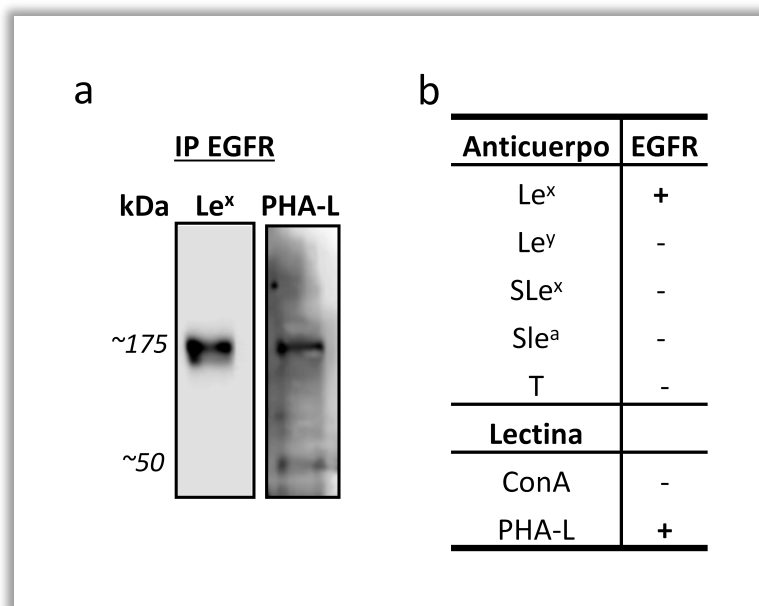
## Expresión de glicanos asociados a EGFR

Con el objetivo de caracterizar la glicosilación sobre este receptor, se llevó adelante la inmunoprecipitación (IP) del mismo, a partir de la línea celular LN229. En un primer paso, se llevó a cabo la confirmación del aislamiento de la proteína mediante *Western Blot*. En la **figura III.3** se puede observar que luego de la reacción de IP con proteína A-sefarosa y el anticuerpo monoclonal dirigido a la proteína de interés, se identifican bandas de proteínas con pesos aproximados de 175 y 50 kDa, correspondientes al peso molecular de EGFR y a la cadena pesada de la inmunoglobulina. La identidad de las proteínas observadas en el bandeo aproximado de 175 kDa fue corroborada mediante espectrometría de masas (EM), llevada a cabo en el servicio de proteómica del CEQUIBIEM. En la muestra proteica tripsinizada se lograron identificar 4 péptidos que presentan 100% de identidad con EGFR, completando una cobertura de secuencia que sólo alcanza el 4%.



**Figura III.3 | Inmunoprecipitación de EGFR proveniente de LN229.** La reacción de IP fue llevada a cabo mediante proteína A-sefarosa y el anticuerpo monoclonal dirigidos a EGFR. El producto de la IP y el lisado total fueron sometidos a *SDS PAGE* y *Western Blot* de EGFR. Para la determinación de identidad po EM se utilizaron 12 reacciones de IP que fueron concentradas y corridas en *SDS PAGE*. El gel fue teñido con *Coomasie* coloidal y se seleccionó la banda de aproximadamente 175 kDa.

Posteriormente, se condujo una valoración preliminar de la expresión de glicanos en EGFR mediante *Western Blot* con anticuerpos y lectinas. Como se muestra en la **figura III.4a**, se observó que EGFR presente en células LN229 es reconocido por el anticuerpo dirigido al glicano terminal Le<sup>x</sup>, y por la lectina PHA-L. Los anticuerpos dirigidos a los glicanos Le<sup>y</sup>, SLe<sup>x</sup>, SLe<sup>a</sup> y T, así como la lectina ConA, no evidenciaron reconocimiento de EGFR en las condiciones ensayadas (**figura III.4b**).



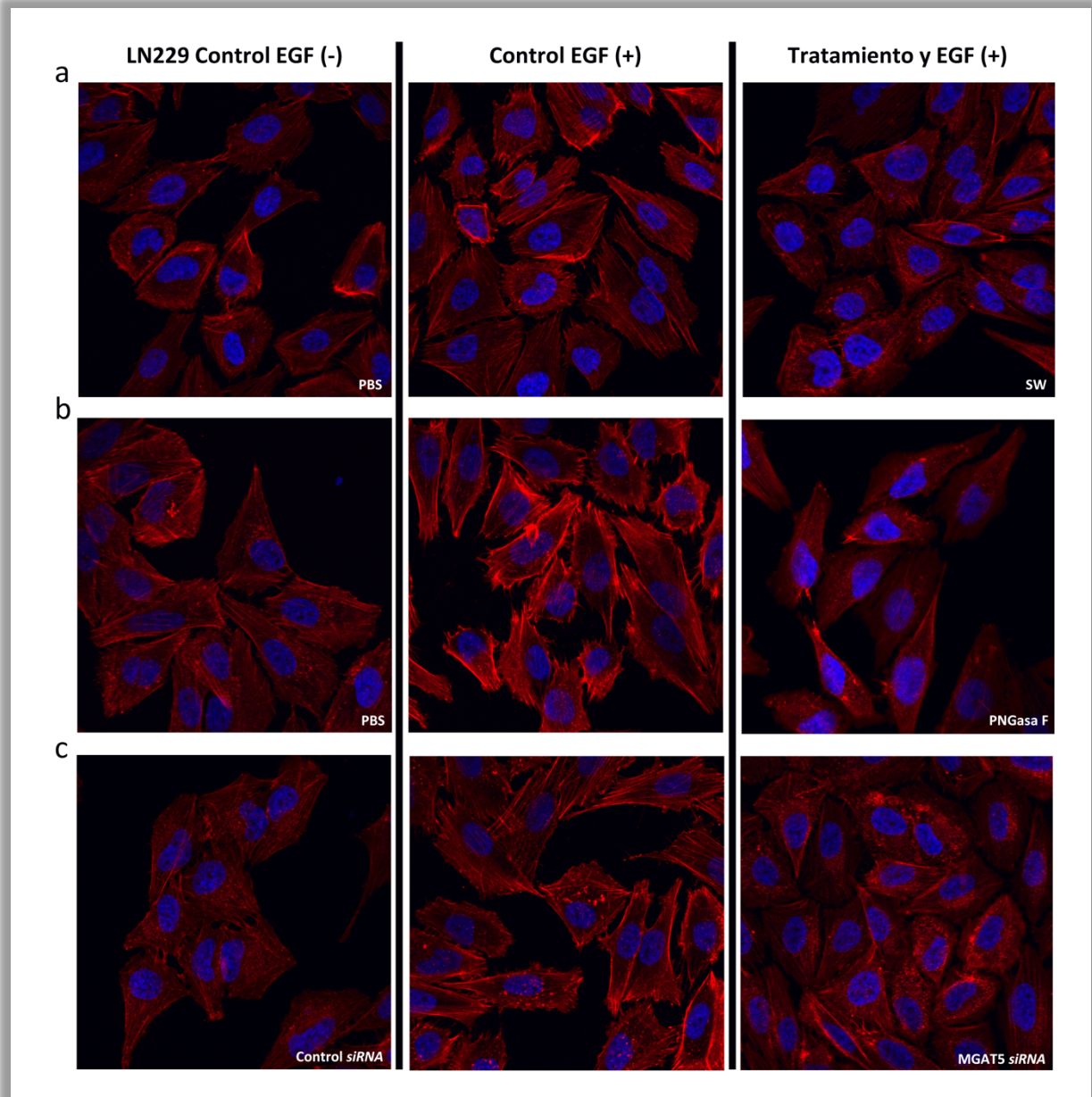
**Figura III.4 | Caracterización de la glicosilación de EGFR de LN229.** La caracterización fue realizada mediante *Western Blot* con mAbs dirigidos a los glicanos Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, SLe<sup>x</sup>, SLe<sup>a</sup> y T, y con las lectinas PHA-L y ConA, de reconocimiento de estructuras de N-glicanos. (a) *Western Blot* para Le<sup>x</sup> y PHA-L (b) Tabla resumen de resultados, (+): positivo, (-): negativo.

### Participación de la glicosilación de EGFR en la polimerización del citoesqueleto de actina

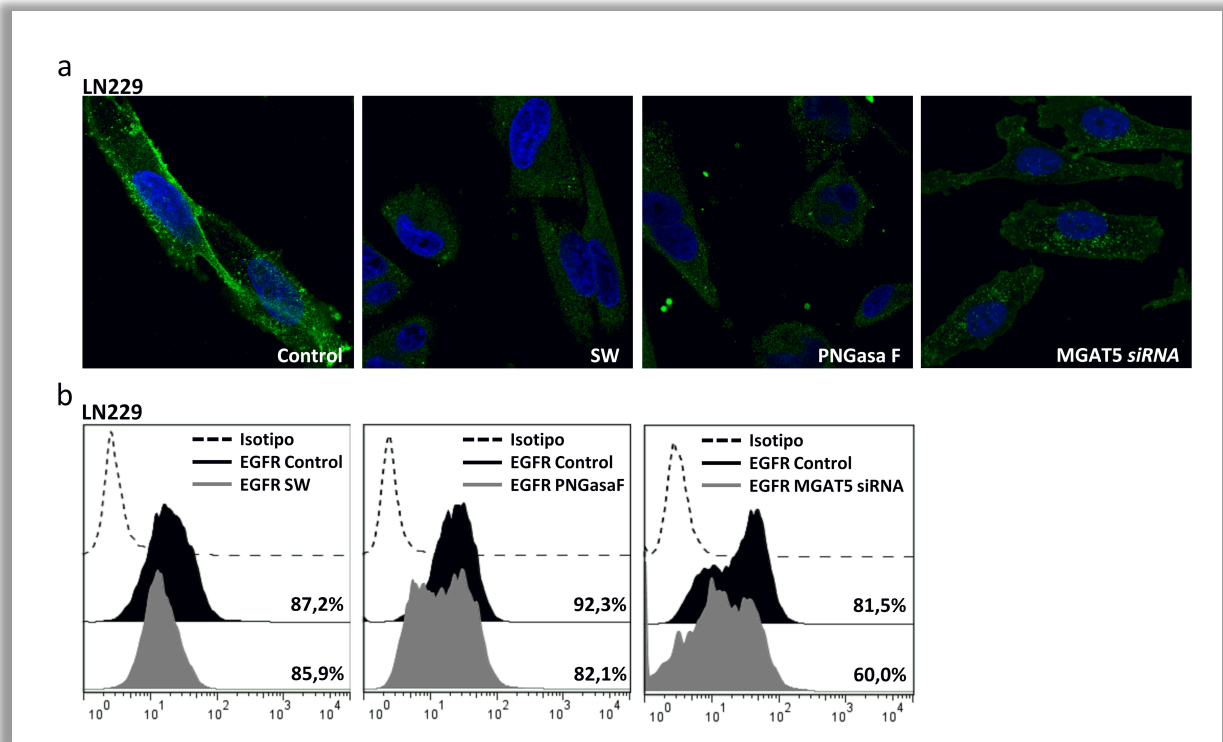
Seguido al estudio de la glicosilación de EGFR, se continuó con la evaluación del impacto de los glicanos en la polimerización del citoesqueleto de actina, considerado un efecto celular inmediato de la señalización vía EGFR por estimulación con EGF. Para ello las células fueron tratadas con el inhibidor SW, la enzima PNGasa F que cliva N-glicanos, o transfectadas con *siRNA* para MGAT5. En la **figura III.5** se presentan tres ensayos representativos que muestran la tinción del citoesqueleto de actina con la toxina faloidina conjugada a fluorocromo, de los diferentes tratamientos con sus respectivos

controles. La estimulación con EGF en los controles de los tratamientos induce una reorganización del citoesqueleto de actina, reforzando los haces paralelos en el citoplasma celular, así como con un evidenciado aumento de este polímero en una posición cortical. Tanto la incubación con el inhibidor de la síntesis de N-glicanos SW, el tratamiento con PNGasa F, como el silenciamiento de MGAT5, producen una inhibición de la polimerización del citoesqueleto de actina bajo la estimulación con EGF, mostrando un patrón similar al de las células sin estimular. La disminución de N-glicanos complejos como la alta expresión de EGFR en las distintas condiciones evaluadas puede observarse en los paneles de las **figuras III.6a y b**.

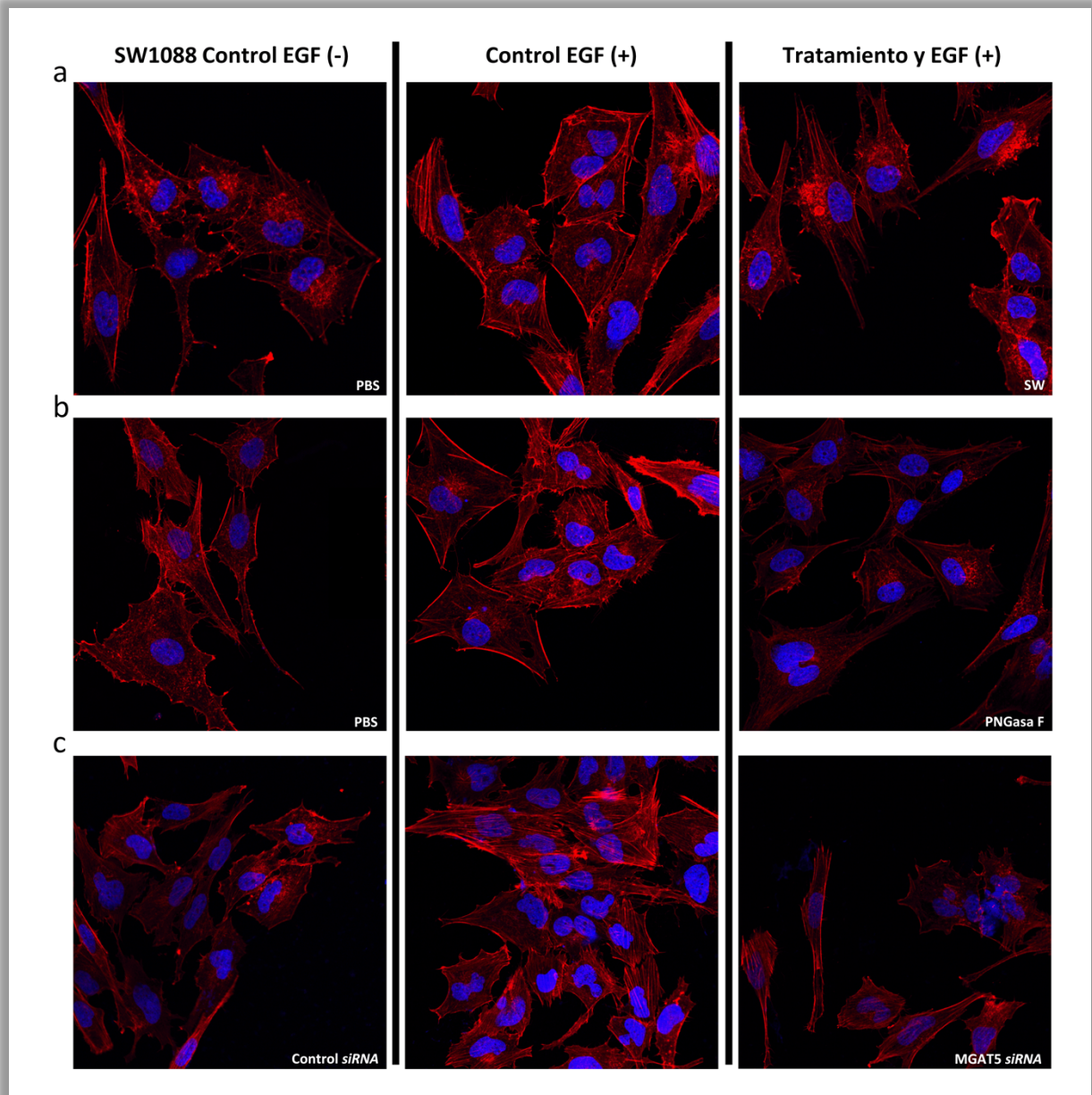
Como se observó expresión de EGFR en la línea de bajo grado SW1088, se estudió de la misma manera el impacto de los N-glicanos en la polimerización del citoesqueleto de actina en esta línea celular (**figura III.7**). Los resultados muestran respuestas similares a los observados con la línea LN229. En la **figura III.8** se muestran fotografías representativas de la unión de PHA-L a las células SW1088 bajo el tratamiento con PNGasa F y transfección con *siRNA* de MGAT5. El control de tratamiento con SW se encuentra en resultados del capítulo II.



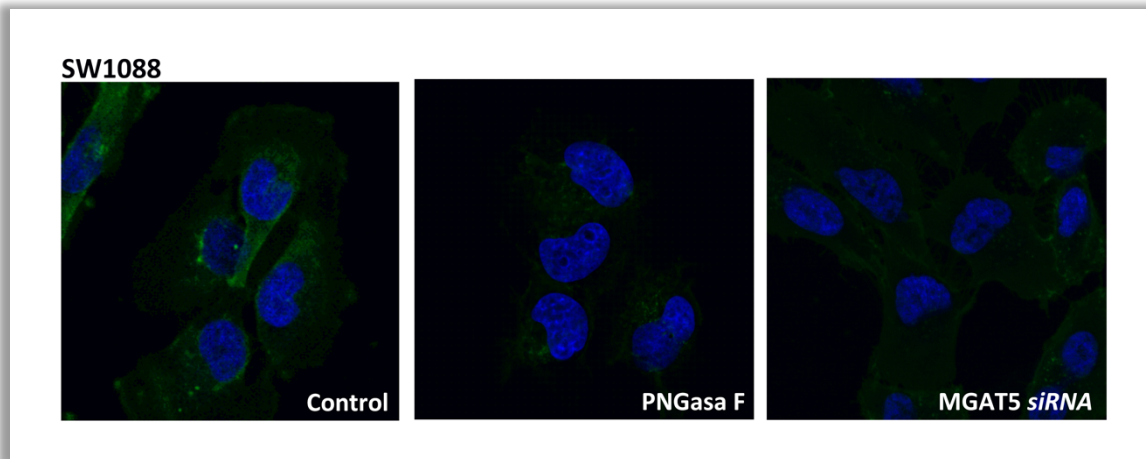
**Figura III.5 | Participación de la glicosilación de EGFR en la polimerización del citoesqueleto de actina sobre células LN229.** Fotografías representativas de células LN229 control estimuladas y sin estimular con EGF 100 ng/ml por 15 min, y bajo diferentes tratamientos con estimulación de EGF. (a) Incubación con SW 100 nM por 24 h. (b) Incubación con PNGasa F 25 unidades por 24 h. (c) Transfección con *siRNA* específico de MGAT5 por 48 h. Las células fueron fijadas y teñidas con faloidina-Alexa Fluor555. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio confocal, aumento 40X y *zoom in 1-2*.



**Figura III.6 | Expresión de estructuras de N-glicanos complejos y de EGFR bajo tratamientos de modulación negativa de N-glicanos en LN229** (a) Fotografías representativas de células LN229 tratadas con SW 100 nM, PNGase F 25 unidades por 24 h, o transfectadas con siRNA específico de MGAT5 por 48 h. Las células fueron fijadas y teñidas con PHA-L biotinilada y estreptavidina-FITC. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio confocal, aumento 40X, zoom in 1-2. (b) Expresión de EGFR por CF con células LN229 sin SBF tratadas con SW 100 nM, PNGase F 25 unidades por 24 h, o transfectadas con siRNA específico de MGAT5 por 48 h. Se representan los histogramas y se indican los porcentajes de células positivas de un ensayo representativo.



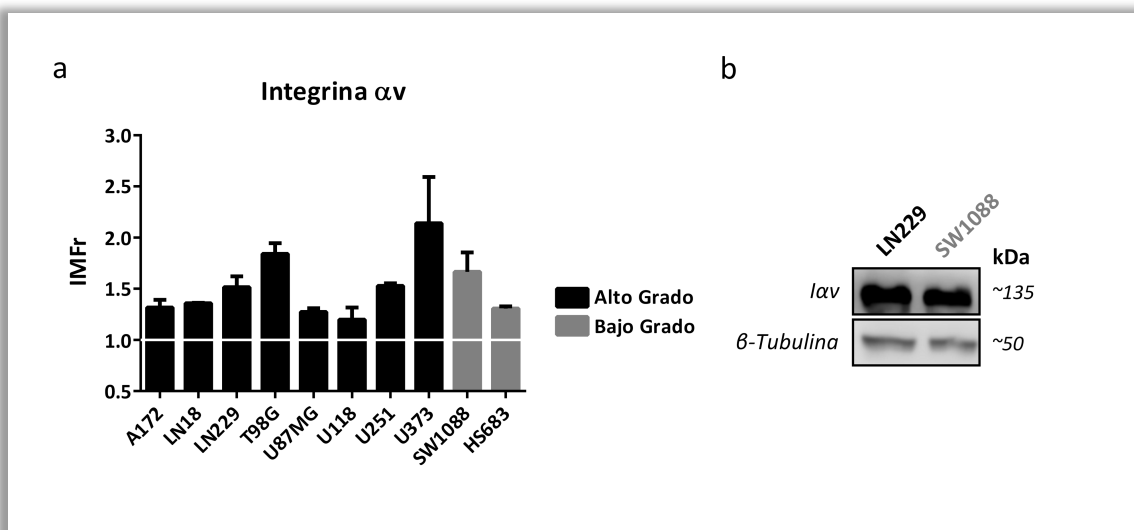
**Figura III.7 | Participación de la glicosilación de EGFR en la polimerización del citoesqueleto de actina sobre células SW1088.** Fotografías representativas de células SW1088 control estimuladas y sin estimular con EGF 100 ng/ml por 15 min, y bajo diferentes tratamientos con estimulación de EGF 100 ng/ml. (a) Incubación con SW 100 nM por 24 h. (b) Incubación con PNGasa F 25 unidades por 24 h. (c) Transfección con *siRNA* específico de MGAT5 por 48 h. Las células fueron fijadas y teñidas con faloidina-Alexa Fluor555. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio confocal, aumento 40X y *zoom in 1-2*.



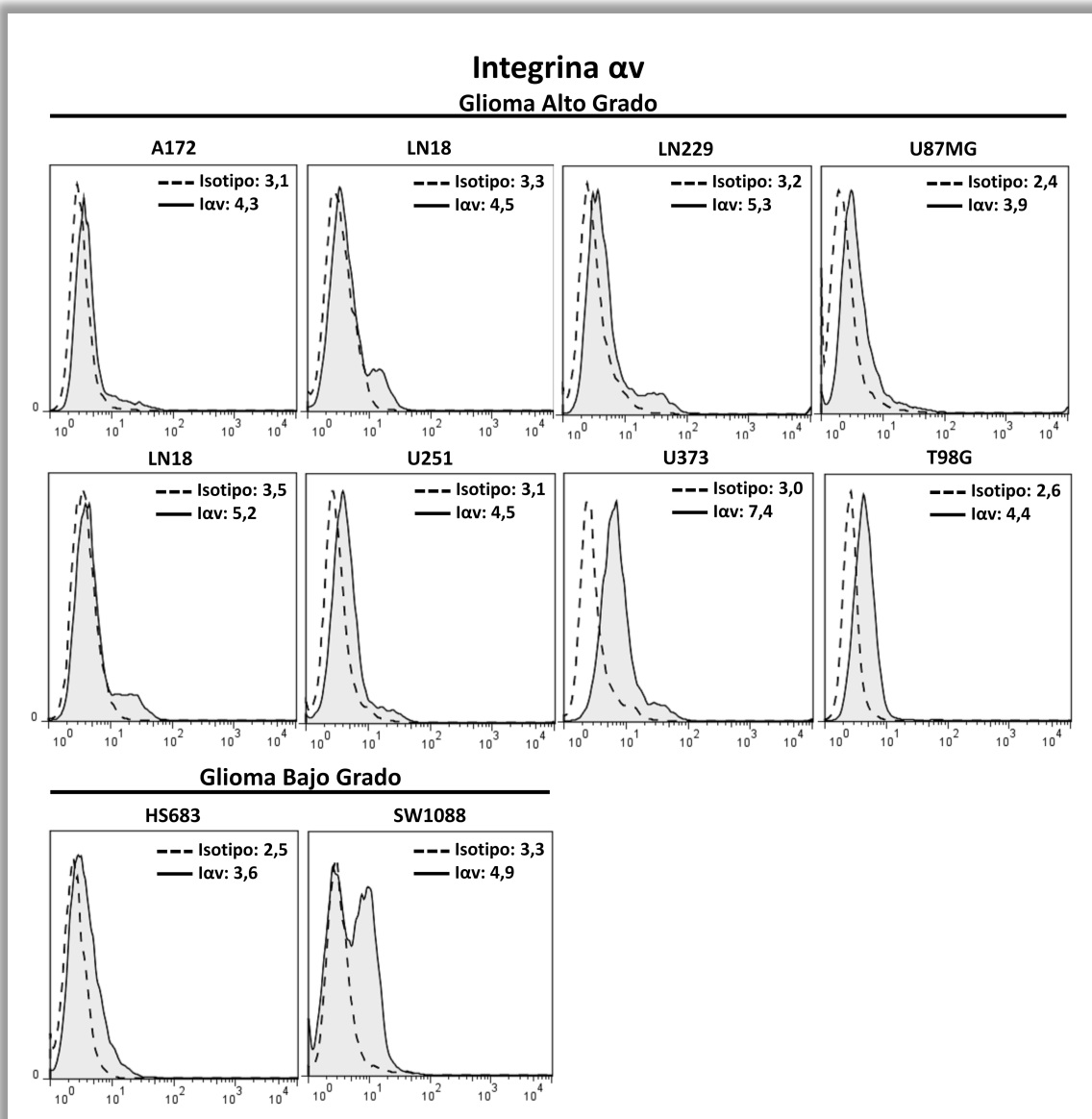
**Figura III.8 | Expresión de estructuras de N-glicanos complejos bajo tratamientos de modulación negativa de N-glicanos en SW1088.** Fotografías representativas de células SW1088 sin SBF tratadas con PNGasa F 25 unidades por 24 h, o transfectadas con *siRNA* específico de MGAT5 por 48 h. Las células fueron fijadas y teñidas con PHA-L biotinilada y estreptavidina-FITC. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio confocal, aumento 40X, *zoom in 1-2*.

## Expresión de $\alpha v$ en líneas celulares de glioma de alto y bajo grado

Se caracterizó la expresión de  $\alpha v$  en el panel de diez líneas celulares de glioma, de alto y bajo grado. En la figura III.9a se representan las expresiones de la proteína obtenidas mediante CF, en intensidades medias de fluorescencia para cada línea celular. En general, todas las líneas celulares presentaron expresión de la integrina. Las líneas de alto grado LN229, T98G, U251 y U373, así como la de bajo grado SW1088, presentaron niveles de expresión superiores a 1,5 IMFr. La línea de alto grado U373 presentó los niveles más altos de expresión para esta proteína, con una IMFr promedio de 2,13. Las líneas A172, LN18, U87MG, U118 y HS683 mostraron niveles de expresión entre 1,2 y 1,35 IMFr. En la figura III.9b se presenta la expresión de  $\alpha v$  mediante *Western Blot* de las líneas LN229 y SW1088. En la figura III.10 se ilustra un ensayo representativo de CF de la expresión de  $\alpha v$  sobre cada una de las líneas celulares.



**Figura III.9 | Expresión de  $\alpha v$  en líneas celulares de glioma humano.**(a) CF. Los valores representan el promedio de IMFr, de tres ensayos independientes, con su desvío estándar. El valor uno referencia al control de Isotipo. (b) *Western Blot* de  $\alpha v$  y  $\beta$ -Tubulina sobre LN229 y SW1088.

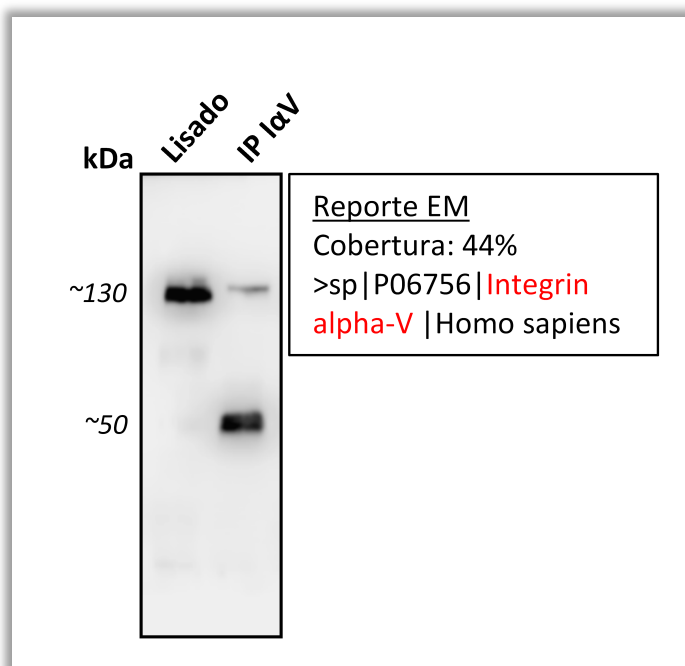


**Figura III.10 | Expresión de  $\alpha v$  en las líneas celulares de glioma humano de alto y bajo grado.** Los valores expresados representan las IMF, correspondientes a cada anticuerpo, de un ensayo representativo.

### Expresión de glicanos asociados a Integrina $\alpha v$ por *Western Blot*

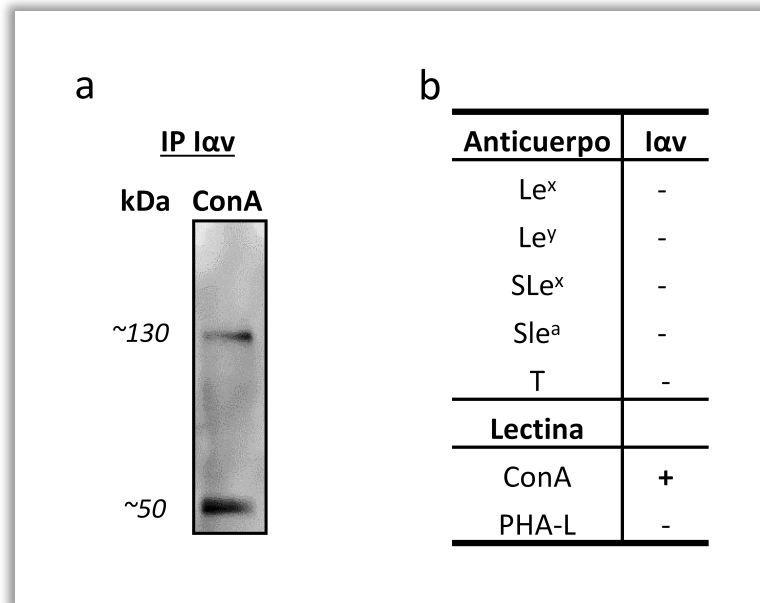
Con el objetivo de caracterizar la glicosilación de la Integrina  $\alpha v$ , se realizó la IP de la proteína utilizando la línea LN229. En un primer paso, se llevó a cabo la confirmación del aislamiento de la proteína mediante *Western Blot*. En la **figura III.11** se pueden observar las bandas de proteínas con masas aproximadas de 130 y 50 kDa, correspondientes al peso molecular de  $\alpha v$  y la cadena pesada de la inmunoglobulina. La identidad de las proteínas observadas en el bandeo aproximado de 130 kDa fue

corroborada mediante EM. En la muestra proteica tripsinizada se lograron identificar más de 40 péptidos correspondientes a la secuencia aminoacídica de Integrina  $\alpha_v$ , alcanzando una cobertura de secuencia del 40%.



**Figura III.11 | Inmunoprecipitación de Integrina  $\alpha_v$  proveniente de LN229.** La reacción de IP fue llevada a cabo mediante proteína A-sefarosa y el mAAb dirigido a  $\alpha_v$ . El producto de la IP y el lisado total fueron sometidos a SDS PAGE y Western Blot. Para la determinación de identidad por EM se utilizaron 12 reacciones de IP que fueron concentradas y corridas en SDS PAGE. El gel fue teñido con Coomassie coloidal y se seleccionó la banda de aproximadamente 130 kDa.

Posteriormente, se evaluó la glicosilación asociada a  $\alpha_v$  mediante Western Blot. Como se muestra en la **figura III.12a**,  $\alpha_v$  es reconocido por la lectina ConA. Tanto Los anticuerpos dirigidos a los glicanos Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, SLe<sup>x</sup>, SLe<sup>a</sup> y T, así como la lectina PHA-L, no evidenciaron reconocimiento de  $\alpha_v$  en las condiciones ensayadas (**figura III.12b**).



**Figura III.12 | Caracterización de la glicosilación de Iαv de LN229.** La caracterización fue realizada mediante *Western Blot* con mAbs dirigidos a los glicanos Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, SLe<sup>x</sup>, SLe<sup>a</sup> y T, y con las lectinas PHA-L y ConA, de reconocimiento de estructuras de N-glicanos. (a) *Western Blot* para ConA (b) Tabla resumen de resultados, (+): positivo, (-): negativo.

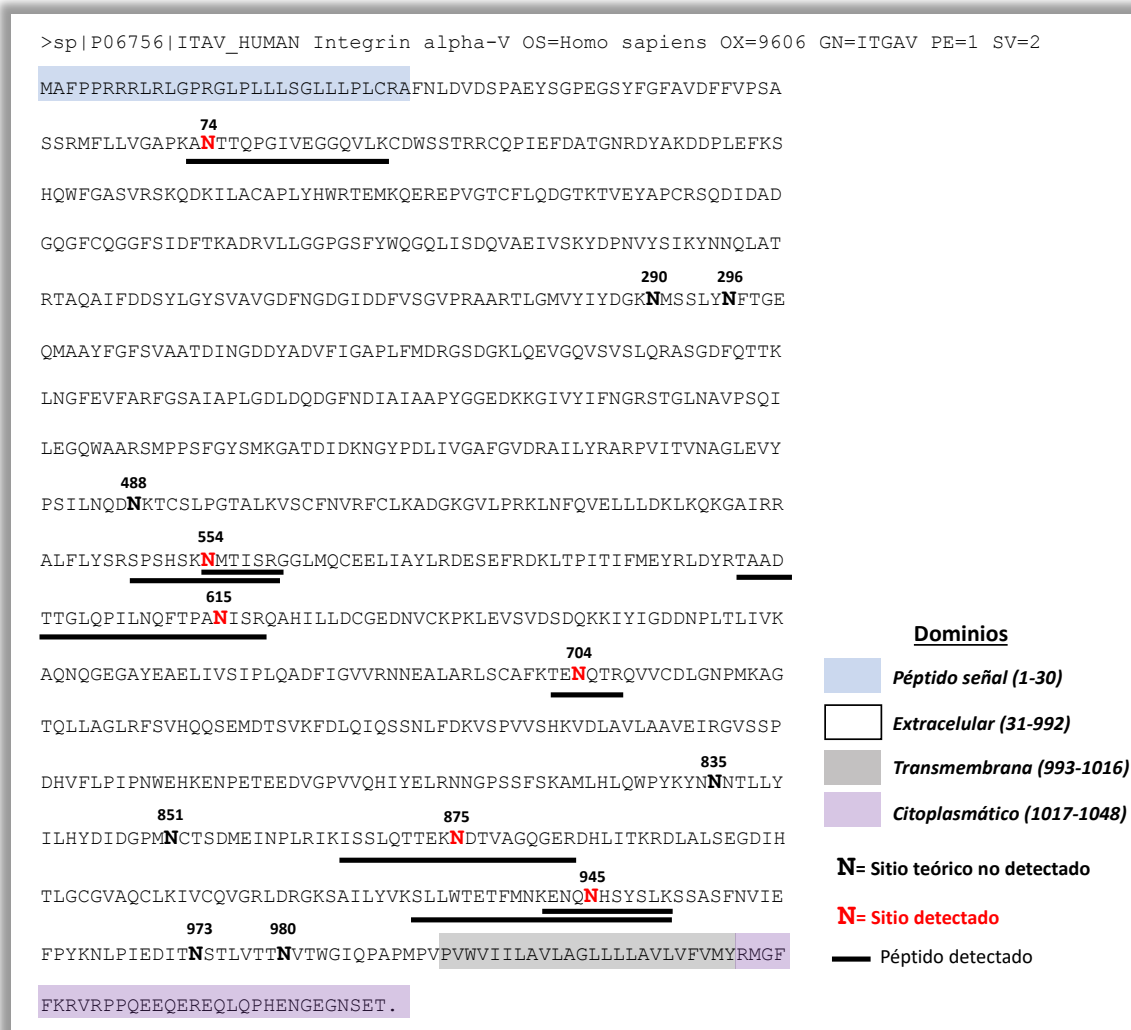
### Análisis de sitios glicosilación de Iαv en glioma de alto grado mediante EM

En primer lugar, se analizó la secuencia aminoacídica de Iαv para identificar los sitios probables de N-glicosilación. Para ello se utilizó la secuencia aminoacídica almacenada en el repositorio UniProtKB/Swiss-Prot, y se utilizó el *software* Prosite para identificar las secuencias de aminoácidos con la tríada N-X-T/S<sup>342</sup>. Del análisis se excluyó al aminoácido Pro de la segunda y cuarta posición, debido a la inhibición o reducción de la probabilidad de glicosilación reportada cuando este aminoácido se encuentra en dichas posiciones<sup>343</sup>. Del análisis se obtuvieron 13 sitios probables de N-glicosilación, que se listan en la **tabla III.1**.

Predicción Prosite	
PS00001: ASN_GLYCOSYLATION	
Query: P06756 Gene: ITGAV	
Posición	N-X(P)-T/S-(P)
74	NTTQ
290	NMSS
296	NFTG
488	NKTC
554	NMTI
615	NISR
704	NQTR
835	NNTL
851	NCTS
875	NDTV
945	NHSY
973	NSTL
980	NVTW

**Tabla III.1 | Identificación de los sitios probables de N-glicosilación de  $\alpha v$  mediante Prosite.** Se utilizó la secuencia aminoacídica correspondiente a  $\alpha v$  (P06756, UniProtKB/Swiss-Prot) de 1048 aminoácidos (NCBI) y el software Prosite para la identificación de los sitios de N-glicosilación. La secuencia de N-glicosilación utilizada para la búsqueda fue N-X(P)-T/S-X(P), donde se excluye Pro de la segunda y cuarta posición.

Para los análisis por EM, se utilizó como material de partida la inmunoprecipitación de la proteína demostrada anteriormente. Entre los péptidos con identidad para  $\alpha v$ , se encontraron 8 de ellos glicosilados. Dichas secuencias fueron alineadas con la secuencia aminoacídica de la proteína mediante Blastp (NCBI). En la **figura III.13** se presentan, de manera esquemática, las ubicaciones de los glicopéptidos encontrados en la secuencia de la proteína, junto con los sitios de N-glicosilación analizados mediante Prosite. Las secuencias de los glicopéptidos identificados, junto con las glicoformas encontradas se encuentran en la **tabla III.2**. Los parámetros de carga y masa de los péptidos se encuentran listados en la **tabla suplementaria 4** del Anexo.



**Figura III.13 | Representación esquemática del alineamiento de secuencias de los glicopeptidos identificados por EM.** Se utilizó la secuencia aminoacídica correspondiente a la proteína identificada como P06756 (UniProtKB/Swiss-Prot), de 1048 aminoácidos y el software Blastp (NCBI) para el alineamiento de secuencias. Se incluyen los dominios de la proteína, junto con los sitios de N-glicosilación identificados con el análisis del Prosite.

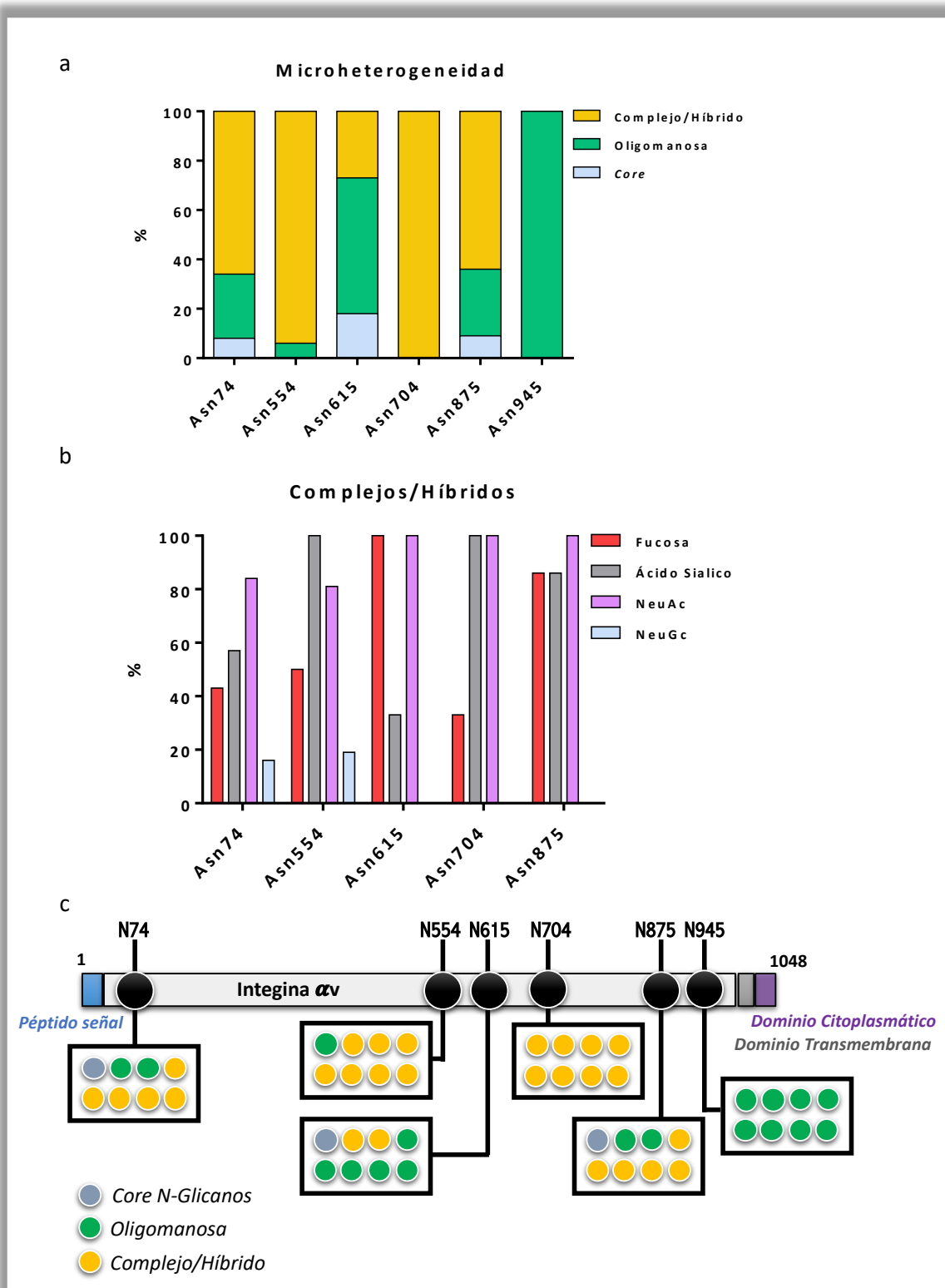
<b>Péptido/Posición Asn</b>	<b>Glicoforma</b>
<b>ANTTQPGIVEGGQVLK</b> <b>Asn74</b>	HexNAc(1) HexNAc(1)Fuc(1) HexNAc(2) HexNAc(2)Hex(10) HexNAc(2)Hex(3) HexNAc(2)Hex(4) HexNAc(2)Hex(4)Fuc(1) HexNAc(2)Hex(5) HexNAc(2)Hex(6) HexNAc(2)Hex(7) HexNAc(2)Hex(8) HexNAc(2)Hex(9) HexNAc(3)Hex(4) HexNAc(3)Hex(4)Fuc(1) HexNAc(3)Hex(4)Fuc(1)NeuAc(1) HexNAc(3)Hex(4)NeuAc(1) HexNAc(3)Hex(5)Fuc(1) HexNAc(3)Hex(5)NeuAc(1) HexNAc(3)Hex(6) HexNAc(3)Hex(6)Fuc(1) HexNAc(3)Hex(6)Fuc(1)NeuAc(1) HexNAc(3)Hex(6)NeuAc(1) HexNAc(4)Hex(4) HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1) HexNAc(4)Hex(4)Fuc(2)NeuAc(1) HexNAc(4)Hex(4)NeuGc(1) HexNAc(4)Hex(5) HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1) HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(1) HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2) HexNAc(4)Hex(5)NeuAc(1) HexNAc(4)Hex(5)NeuGc(1) HexNAc(4)Hex(6) HexNAc(4)Hex(6)NeuAc(1) HexNAc(5)Hex(5)NeuAc(2)
<b>SPSHSKNMTISR</b> <b>Asn554</b>	HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(1) HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2) HexNAc(5)Hex(5)NeuAc(2) HexNAc(5)Hex(6)Fuc(1)NeuAc(2) HexNAc(5)Hex(6)Fuc(1)NeuAc(3)
<b>NMTISR</b> <b>Asn554</b>	HexNAc(2)Hex(10) HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2) HexNAc(5)Hex(6)Fuc(3)NeuAc(1) HexNAc(6)Hex(4)NeuAc(1)

	HexNAc(6)Hex(4)NeuAc(2) HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(1)NeuGc(1) HexNAc(4)Hex(6)NeuAc(1) HexNAc(5)Hex(5)NeuAc(1)NeuGc(1) HexNAc(5)Hex(5)NeuAc(2) HexNAc(5)Hex(6)Fuc(1)NeuAc(1) HexNAc(6)Hex(6)NeuAc(1)NeuGc(1) HexNAc(6)Hex(6)NeuAc(2)
TAADTTGLQPILNQFTPANISR <b>Asn 615</b>	HexNAc(1) HexNAc(2) HexNAc(2)Hex(10) HexNAc(2)Hex(4) HexNAc(2)Hex(5) HexNAc(2)Hex(7) HexNAc(2)Hex(8) HexNAc(2)Hex(9) HexNAc(4)Hex(3)Fuc(3) HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1)NeuAc(1) HexNAc(5)Hex(3)Fuc(1)NeuAc(1)
TENQTR <b>Asn 704</b>	HexNAc(3)Hex(6)NeuAc(1) HexNAc(5)Hex(5)NeuAc(2) HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2)
ISSLQTTEKNDTVAGQGER <b>Asn 875</b>	HexNAc(1) HexNAc(2)Hex(7) HexNAc(2)Hex(8) HexNAc(2)Hex(9) HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(1) HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2) HexNAc(5)Hex(5)NeuAc(2) HexNAc(5)Hex(6)Fuc(1)NeuAc(2) HexNAc(5)Hex(6)Fuc(1)NeuAc(3) HexNAc(6)Hex(7)Fuc(1)NeuAc(1) HexNAc(6)Hex(7)Fuc(1)NeuAc(3)
SLLWTETFM*ENQNHSYSLK <b>Asn 945</b>	HexNAc(2)Hex(8) HexNAc(2)Hex(9)
ENQNHSYSLK <b>Asn 945</b>	HexNAc(2)Hex(6) HexNAc(2)Hex(9)

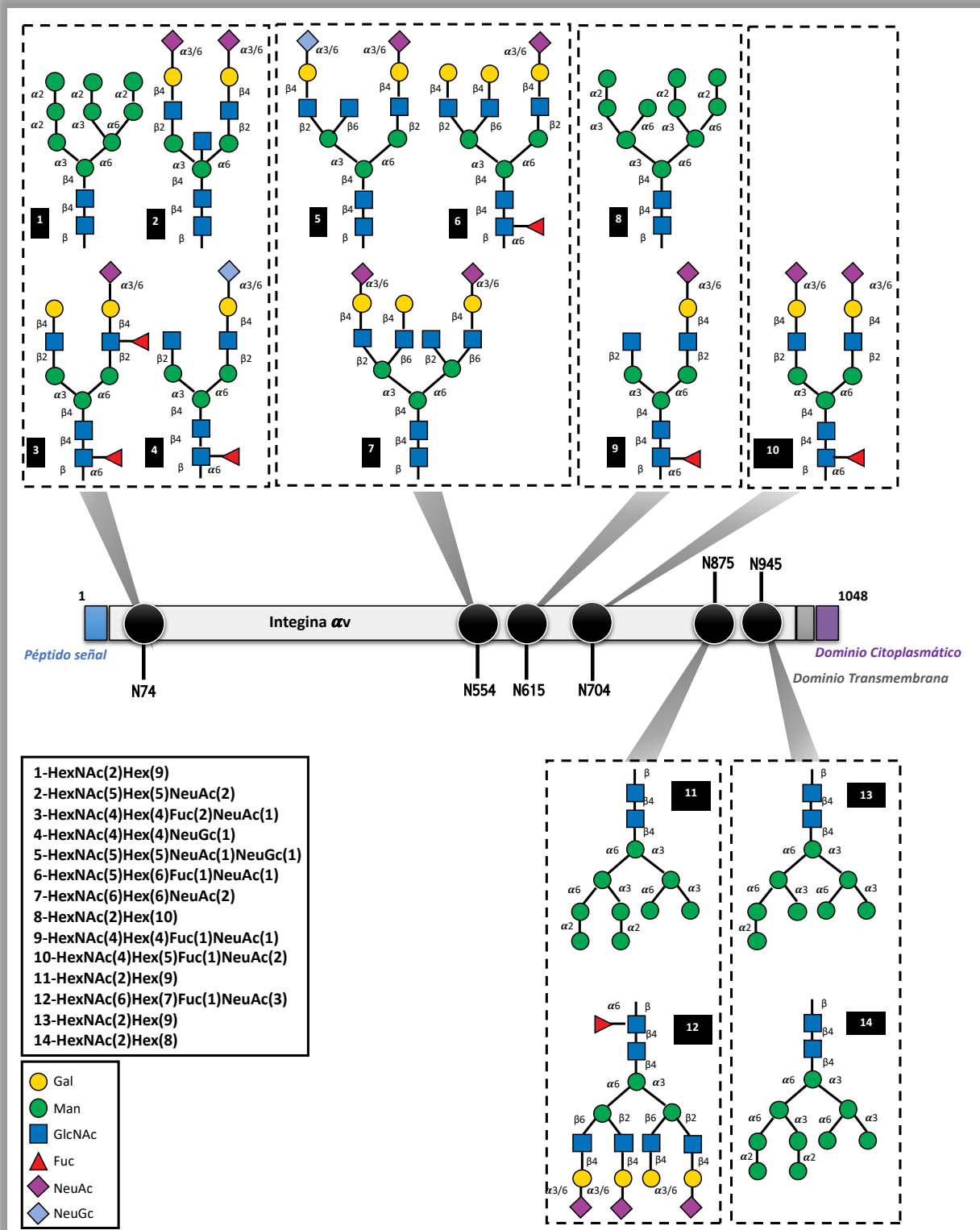
**Tabla III.2 | Análisis de la glicosilación de los glicopéptidos identificados de la proteína Iav por EM.** Los productos de las IPs fueron digeridos con tripsina y enriquecidos en glicopéptidos mediante columna HILIC. Para EM se utilizó un espectrómetro Q-Exactive con una celda de HCD (*High Collision Dissociation*) y un analizador Orbitrap.  $[M+H]^+$  en el m/z: HexNAc (204,08), Hex (163, 06), Fuc (147,06), NeuAc (292,10), NeuGc (308,08). HexNAc representa GlcNAc o GalNAc, mientras que Hex representa Man, Glc o Gal. Las masas identificadas en el análisis de EM fueron comparadas con los valores teóricos de las estructuras para el cálculo del error.

Los glicanos encontrados en los diferentes sitios se clasificaron según el tipo de N-glicanos existentes, discriminando estructuras del *core*, del tipo oligomanosa y complejos y/o híbridos. En la figura **III.14a** se muestra el análisis sobre los diferentes tipos encontrados en cada posición, donde se puede observar microheterogeneidad en la mayoría de ellas. En la posición Asn704 se hallaron sólo N-glicanos complejos/híbridos y en la posición Asn945 sólo se encontraron N-glicanos oligomanosa. En cambio, en Asn74, Asn554 y Asn875 se observó mayoritariamente la presencia de N-glicanos del tipo complejo/híbrido, con una abundancia menor de estructuras del *core* u oligomanosa. En la Asn615 se observó la relación opuesta, con un porcentaje mayoritario de N-glicanos del tipo oligomanosa.

Dentro del grupo de los glicanos complejos/híbridos se realizó la comparación de las abundancias de estructuras fucosiladas y sialiladas (**figura III.14b**). Con respecto a la fucosilación, todas las posiciones, salvo la Asn704, presentaron porcentajes de fucosilación superiores al 40%. De ellas, existen pocos ejemplos con más de una fucosa, por lo que este glicano podría ser asociado a una glicosilación del *core*. Para la sialilación de este grupo de complejos/híbridos ocurre un patrón similar, a excepción de las Asn 615 y 704, los glicanos del resto de las posiciones presentaron porcentajes mayores al 50% en sus glicoformas. Además, dentro de los ácidos siálicos se discriminaron las abundancias de NeuAc y NeuGc. NeuAc es el ácido siálico mayoritario en las estructuras de glicanos, y NeuGc fue identificado en un porcentaje menor en las Asn74 y Asn554. En la **figura III.14c** se presenta de manera esquemática la microheterogeneidad de glicoformas encontrada en las posiciones de N-glicosilación de la lav proveniente de la línea celular de glioma de alto grado LN229. En la **figura III.15** se ilustran algunas de las estructuras posibles de los glicanos identificados por el análisis de EM en dicha proteína, las cuales fueron corroboradas mediante la plataforma *GlyConnect*.



**Figura III.14 | Análisis de la composición de N-glicanos de *lav*.** (a) Las estructuras fueron clasificadas en glicanos del *core*, oligomanosa y complejos/híbridos. Los valores representan el porcentaje de abundancia de estos grupos en cada posición de glicosilación. (b) Abundancia de glicanos fucosilados y sialilados dentro del grupo de los glicanos complejos/híbridos. El total de ácidos siálicos se comparó entre NeuAc y NeuGc. (c) Esquema representativo de la microheterogeneidad de glicanos en la *lav*.



**Figura III.15** | Representación de las glicofórmulas encontradas en  $\alpha v$  de LN229 por EM. Las estructuras en el esquema son posibles estructuras de N-glicanos según la secuencia identificada en el espectro de EM, corroboradas mediante la plataforma *Glyconnect*.

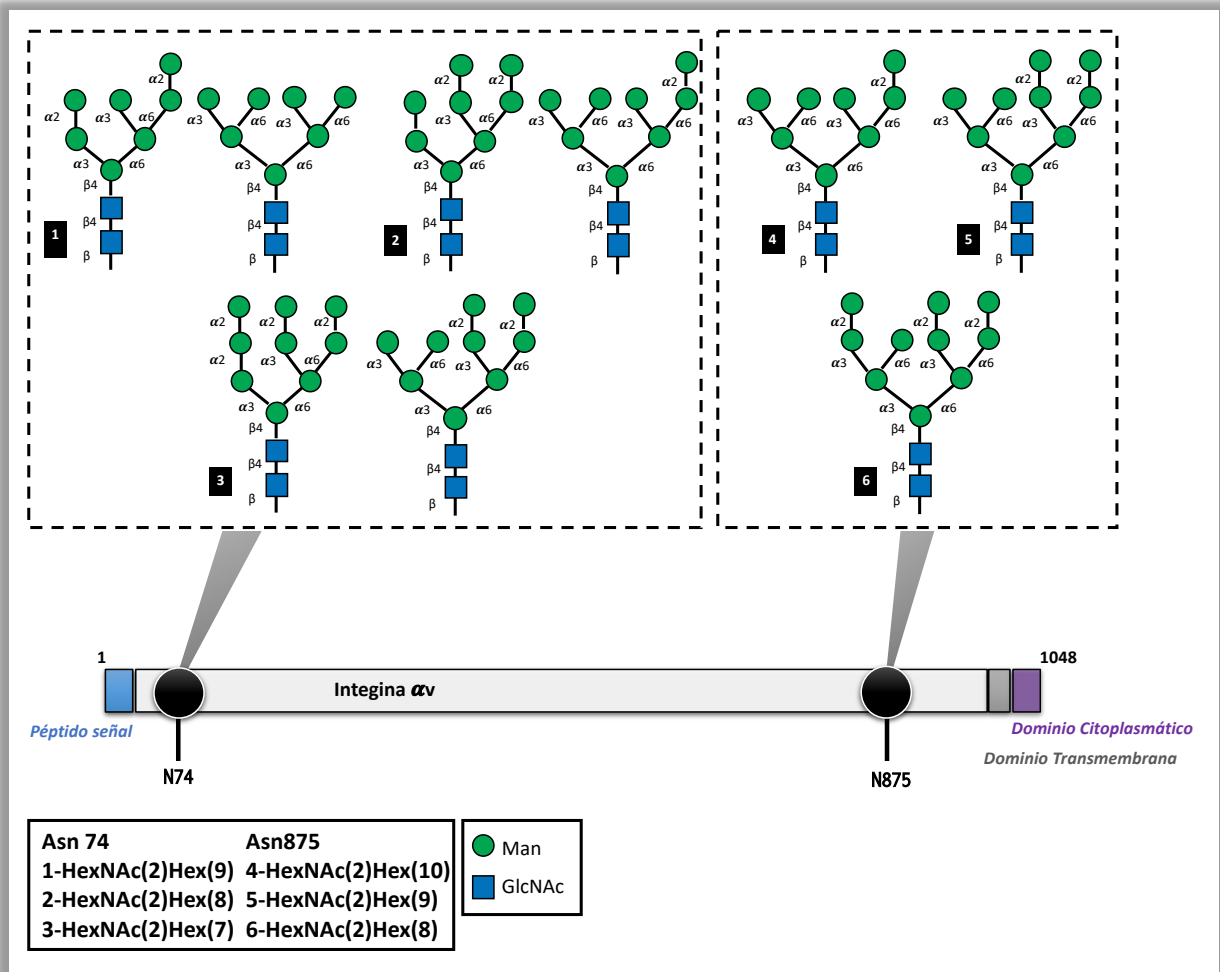
### Análisis de sitios glicosilación de *lax* en glioma de bajo grado mediante EM

Se inmunoprecipitó *lax* proveniente de la línea de glioma de bajo grado SW1088. Dicha identidad fue confirmada por EM, con una cobertura de secuencia del 45%. Se identificaron glicanos presentes en dos posiciones de glicosilación, las Asn74 y 875. En la **tabla III.3** se listan las secuencias de los péptidos y las glicoformas. Los parámetros de carga y masa de los péptidos se encuentran listados en la **tabla suplementaria 5** del Anexo.

Péptido/Posición Asn	Glicoforma
<p>ANTTQPGIVEGGQVLK <b>Asn74</b></p>	HexNAc(2)Hex(9)
	HexNAc(2)Hex(8)
	HexNAc(2)Hex(7)
<p>ISSLQTTEKNDTVAGQGER <b>Asn875</b></p>	HexNAc(2)Hex(10)
	HexNAc(2)Hex(9)
	HexNAc(2)Hex(8)

**Tabla III.3 | Análisis de la glicosilación de los glicopéptidos identificados de la proteína *lax* por EM, proveniente de IP con la línea SW1088.** Los productos de las IPs fueron digeridos con tripsina y enriquecidos en glicopéptidos mediante columna HILIC. Para EM se utilizó un espectrómetro Q-Exactive con una celda de HCD (*High Collision Dissociation*) y un analizador Orbitrap.  $[M+H]^+$  en el m/z: HexNAc (204,08), Hex (163, 06), Fuc (147,06), NeuAc (292,10), NeuGc (308,08). HexNAc representa GlcNAc o GalNAc, mientras que Hex representa Man, Glc o Gal. Las masas identificadas en el análisis de EM fueron comparados con los valores teóricos de las estructuras para el cálculo del error.

En cuanto a la composición de las glicoformas encontradas, sólo se identificaron glicanos del tipo oligomanosa en las dos posiciones de glicosilación mencionadas. En la **figura III.16** se ilustran estructuras posibles de glicanos en la secuencia aminoacídica de la *lax* de la línea celular de bajo grado SW1088.



**Figura III.16** | Representación de las glicofomas encontradas en lav de SW1088 por EM. Las estructuras en el esquema son posibles estructuras de N-glicanos según la secuencia identificada en el espectro de EM, corroboradas mediante la plataforma *Glyconnect*.

*Discusión Capítulo III*



El entendimiento profundo en la glicosilación de proteínas asociadas a tumor y su participación en la biología tumoral, abre nuevos espacios de conocimiento sobre elementos de reconocido papel en la enfermedad y permite potencialmente el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Es por esto que en este trabajo se propuso profundizar el conocimiento de la glicosilación de proteínas con interés terapéutico en glioma, lo cual no sólo implicaría una contribución al conocimiento general de la patología, sino que también podría sentar las bases para el desarrollo de terapias glicodirigidas. En este trabajo se estudió la glicosilación de EGFR e Iav, dos glicoproteínas directamente vinculadas a la agresividad tumoral del glioma.

EGFR es una glicoproteína cuya sobreexpresión está directamente vinculada a la agresividad tumoral en esta indicación<sup>305</sup>. En este trabajo se encontró una expresión variable de EGFR entre los grupos de líneas celulares de alto y bajo grado, pero con una clara sobreexpresión en un subgrupo de las líneas celulares de GBM. Comparando las líneas caracterizadas en más profundidad, la línea LN229 presenta una sobreexpresión de EGFR frente a la de bajo grado SW1088.

De la caracterización de la glicosilación de EGFR en LN229, se determinó la presencia del glicano terminal Le<sup>x</sup>. Si bien la presencia de este glicano no es alta en LN229, los niveles de expresión de diversas fucosiltransferasas en la línea celular justificarían su presencia en el receptor. Esto es interesante, ya que se ha propuesto el posible papel de este glicano como marcador de células madre cancerosas en GMB. Se ha informado que células positivas para Le<sup>x</sup> son altamente tumorigénicas cuando son inoculadas en el cerebro de ratones inmunocomprometidos, mostrando también propiedades de auto-renovación<sup>88</sup>. En esta misma línea, el grupo de Liu y colaboradores reportó la presencia de seis sitios de glicosilación en EGFR con glicanos de tipo complejo con terminales sialiladas y fucosiladas, vinculando la sobreexpresión de FUT4 y FUT6 a la fucosilación terminal de EGFR en líneas celulares cáncer de pulmón<sup>321</sup>. La presencia de glicanos de la familia Lewis en EGFR ha sido reportada en otras indicaciones oncológicas, principalmente el glicano Le<sup>y</sup> en cáncer oral y melanoma, entre otros. Li y colaboradores reportaron la glicosilación de EGFR con Le<sup>y</sup> en células de carcinoma oral de células escamosas OC-2, y describen cómo la ausencia de este glicano por silenciamiento de FUT1 debilita la fosforilación de AKT y ERK bajo el estímulo de EGF. En este mismo trabajo aseguran que la modificación con Le<sup>y</sup> estabiliza EGFR en membrana

tras la activación por su ligando EGF, ya que su ausencia acelera la degradación del receptor<sup>344</sup>. En conjunto, estos antecedentes contribuyen con la hipótesis de que los glicanos Lewis en el receptor de EGF en glioma podrían tener un rol relevante en su función. Sería interesante evaluar los efectos biológicos de la supresión de la expresión de Le<sup>y</sup> en EGFR en las líneas de glioma de alto grado, así como evaluar su expresión en las líneas de bajo grado.

Adicionalmente, se observó que esta proteína fue reconocida por la lectina PHA-L, la cual reconoce estructuras de N-glicanos complejas tri- y/o tetra-antenarias con ramificaciones  $\beta$ 1,6-GlcNAc. La línea celular LN229 mostró altos niveles de este tipo de ramificaciones, así como altos niveles de transcripto de MGAT5, en coherencia con la presencia de estas estructuras en EGFR. La participación de estas ramificaciones ha sido descrita sobre EGFR, en indicaciones como cáncer de mama o carcinoma nasofaríngeo<sup>318</sup>. Como ejemplo, se ha demostrado que el silenciamiento de MGAT5, reduce el fenotipo agresivo regulando negativamente su señalización río abajo en células de carcinoma mamario humano MDA-MB231<sup>319</sup>. En glioma, existen trabajos que reportan una reducción del fenotipo maligno tras la regulación negativa de estas ramificaciones, pero no existe una vinculación clara de las ramificaciones  $\beta$ 1,6-GlcNAc presentes en EGFR y su rol en la agresividad. Los trabajos sobre estructuras de glicanos complejas en EGFR en glioma refieren principalmente a N-glicanos bisectados. Estos glicanos son sintetizados por GnT-III (codificada por MGAT3), que en algunas indicaciones oncológicas se asocia con un buen pronóstico, debido a su competencia por el sustrato con GnT-V (MGAT5) y bloqueo de la síntesis de las ramificaciones  $\beta$ 1,6-GlcNAc<sup>142</sup>. Por ejemplo, en la línea celular de GBM U373 se ha informado el bloqueo de la unión de EGF a EGFR, mediado por la lectina PHA-E, que reconoce N-glicanos bisectados. Sin embargo, la sobreexpresión de MGAT3 en la misma línea celular conduce a un aumento de N-glicanos bisectados en el receptor, así como a una disminución significativa de la unión de EGF y su autofosforilación<sup>323</sup>. Por otro lado, se ha reportado que el tratamiento de la línea de GBM U251 con TNM y SW, resulta en una disminución de la fosforilación de EGFR<sup>210</sup>. En este sentido, en el presente trabajo se han detectado las ramificaciones  $\beta$ 1,6-GlcNAc en EGFR de la línea de GBM LN229 y que el tratamiento con diferentes estrategias que modulan negativamente la presencia de N-glicanos complejos en la superficie celular interrumpen la reorganización del citoesqueleto de

actina mediada por el estímulo con EGF. Este efecto fue observado tras la incubación con PNGasa F, la cual escinde todos los tipos de N-glicanos, así como con SW, que reduce los niveles de N-glicanos complejos en general, y con el silenciamiento de MGAT5, que conduce a una disminución específica de ramificaciones  $\beta$ 1,6-GlcNAc. El mismo efecto fue visualizado en la línea de bajo grado SW1088. Aunque estos tratamientos no modularon negativamente la adhesión o migración de SW1088 vista en el Capítulo II, lograron reducir la reorganización del citoesqueleto de actina tras el estímulo de EGF. Esto podría implicar una participación de los N-glicanos complejos en el rol de EGFR en el glioma de bajo grado.

La inhibición de la reorganización del citoesqueleto de actina conducido por la disminución o ausencia de N-glicanos en EGFR, podría deberse a las implicancias de estos glicanos tanto en la unión con el ligando, como en la unión de EGFR a sus pares diméricos. En este sentido, se requieren más estudios para determinar la participación de estas estructuras en la unión del receptor al ligando, así como en su dimerización. En un elegante trabajo *in silico* de dinamismo molecular, Azimzadeh Irani y colaboradores han descrito que la N-glicosilación del dominio extracelular de EGFR desempeña papeles críticos en la unión con factores de crecimiento, mAbs, así como con sus socios diméricos. En este trabajo informan que la N-glicosilación forma interacciones no covalentes entre los glicanos y el dominio extracelular EGFR que estabilizan la unión de EGF, así como también los glicanos ayudan a mantener la interfaz dimérica. Sin embargo, la limitación de este modelado *in silico* radica en que se utilizaron únicamente estructuras del *core* de N-glicanos para modelar dichas interacciones<sup>345</sup>. No existen trabajos similares con N-glicanos complejos multi-antenarios con ramificaciones  $\beta$ 1,6-GlcNAc. En conjunto, los reportes de otros grupos, así como los resultados obtenidos en este trabajo, exhiben un rol relevante de los N-glicanos complejos en la función de EGFR, lo cual sugiere que terapias dirigidas a la glicosilación específica de este receptor podrían tener un efecto terapéutico potencial sobre el glioma.

En relación a  $\alpha$ v, se encuentra descrito en la literatura que la expresión de las integrinas  $\alpha$ v $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 5 y  $\alpha$ v $\beta$ 8 se asocian con gliomas de alto grado y, en particular, la sobreexpresión de  $\alpha$ v $\beta$ 3 se correlaciona con mal pronóstico en GBM<sup>331</sup>. En este trabajo se comparó la expresión de la subunidad integrina  $\alpha$ v en el panel de diez líneas celulares

de glioma, encontrando un patrón de expresión variado, sin grandes diferencias entre las líneas de alto y bajo grado.

Las integrinas son proteínas altamente glicosiladas, por lo que modificaciones en este proceso pueden derivar en cambios de conformación, afinidad y función. En el caso de Iav, la misma posee 13 sitios teóricos de N-glicosilación, de los cuales 11 se han reportado glicosilados, en un número muy bajo de trabajos utilizando diferentes modelos de estudio<sup>336-338,346</sup>. La mayoría de estos reportes realiza análisis de las posiciones de glicosilación, sin ahondar en la estructura de los N-glicanos presentes. De la caracterización preliminar de la glicosilación por *Western Blot* de esta proteína en la línea LN229, se encontró un reconocimiento específico por la lectina ConA, lo cual indicaría la presencia de N-glicanos. Esta lectina presenta una mayor afinidad por N-glicanos de tipo oligomanosa, y una menor afinidad por N-glicanos complejos bi-antennarios, principalmente. Mediante el análisis de la glicosilación de esta proteína por EM, se lograron detectar seis sitios glicosilados en su dominio extracelular, siendo Asn74, Asn554, Asn615, Asn875 y Asn945.

Las glicoproteínas generalmente existen como poblaciones de variantes glicosiladas de un mismo polipéptido, conocidas como glicofomas<sup>38</sup>. Consecuentemente con este hecho, por EM se encontraron en todas las posiciones glicofomas que varían en el número de monosacáridos, por ejemplo HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(1) y HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2) en la Asn875. Estas glicofomas podrían indicar la coexistencia de las diferentes formas estructurales como finales en la proteína madura, ser estructuras prematuras en la síntesis, o bien, formas clivadas por el método de colisión en la EM. Por otro lado, debido a que el análisis por EM no devuelve identidad de glicanos, sino masas a las cuales se les puede asignar una identidad conforme al análisis integral del espectro de ese glicano, las estructuras representadas se construyeron en virtud de las vías de síntesis de glicanos canónicas del estado del arte de la glicobiología. Se requieren otras técnicas para poder asegurar una identidad definitiva a los glicanos, así como los enlaces de unión, ya que muchos de ellos tienen igual masa, por ejemplo, HexNAc puede ser tanto GlcNAc como GalNAc.

Además de la observación de estructuras que parecerían pertenecer al mismo tipo de glicano en diferente extensión, se pueden observar en algunas de las posiciones eventos de microheterogeneidad. La microheterogeneidad es un evento común en

glicoproteínas que implica la presencia de glicanos de diferentes familias en el mismo sitio de glicosilación<sup>347</sup>. Las Asn74, Asn554 y Asn875 se encontraron glicosiladas mayoritariamente con N-glicanos complejos/híbridos y en menor proporción con estructuras del *core* u oligomanosa. En cambio, en la Asn615 se observó un porcentaje mayoritario de N-glicanos del tipo oligomanosa. Interesantemente, sólo en dos posiciones se encontró un tipo de N-glicanos, siendo complejos/híbridos en la Asn704 y oligomanosa en la Asn945. En comparación, en el análisis de la glicosilación por EM de  $\lambda v$  en la línea de bajo grado SW1088, se pudieron describir solo dos sitios glicosilados, con presencia de N-glicanos de oligomanosa en ambas. Esto resulta interesante desde el punto de vista de las capacidades de migración y adhesión de las líneas de alto y bajo grado. La diferencia de glicofomas en estas posiciones podría indicar consecuencias en el fenotipo maligno de la línea celular.

Retomando lo reportado para la glicosilación de  $\lambda v$ , el grupo de Hu y colaboradores, describió la N-glicosilación de diferentes glicoproteínas en modelos de cáncer de mama, entre ellas  $\lambda v$ <sup>339</sup>. En este reanálisis de datos proteómicos se caracterizan cuatro sitios de glicosilación, Asn 74, Asn488, Asn615 y Asn945. Al igual que los resultados presentados en este capítulo, en el reporte de este grupo la posición 74 es la que presenta una mayor cantidad de glicofomas, siendo 35 y 19, respectivamente. Comparando las estructuras de esta posición de glicosilación, nueve glicanos comparten identidad completa entre ambos trabajos, los cuales corresponden a N-glicanos tanto de oligomanosa como complejos sialilados y fucosilados. En contraste, el grupo de Hu describe una variedad de glicofomas de oligomanosa y complejos híbridos en las posiciones Asn615 y Asn945.

En relación con las glicofomas de glicanos agrupados como complejos/híbridos, se observó un gran porcentaje de eventos de sialilación y fucosilación. Debido a que la mayoría de las formas presenta una fucosa, podría estar asociada a la presencia de fucosa del *core*, lo que va en línea una mayor actividad de FUT8 en cerebro en comparación con otros tejidos<sup>275</sup>. Con respecto a la sialilación, estos residuos podrían asociarse a un enlace  $\alpha 2,3$ , vinculado a los reportes que indican ausencia de ácido siálico  $\alpha 2,6$  y aumento de  $\alpha 2,3$  en glioma<sup>277</sup>. Dentro de los tipos de ácido siálico detectados, la especie mayoritaria fue NeuAc y sólo en dos de las posiciones de glicosilación analizadas se encontró la presencia de NeuGc en un porcentaje menor. Los ácidos siálicos

predominantes en la mayoría de las células de mamíferos son NeuAc y NeuGc, los cuales difieren en un átomo de oxígeno que se agrega a través de la hidroxilación de CMP-NeuAc para formar CMP-NeuGc, reacción catalizada por la enzima CMP-NeuAc hidroxilasa (*cmah*). En humanos el gen CMAH presenta una deleción inactivadora, por lo que la presencia de la variante NeuGc es prácticamente indetectable en las células normales<sup>348</sup>. Sin embargo, ha sido ampliamente reportada en la literatura la presencia de NeuGc, especialmente en gangliósidos, en células de diversas neoplasias, como melanoma, NB y cáncer de pulmón de células no pequeñas<sup>349–351</sup>. La teoría más aceptada indica que esta variante de ácido siálico necesita ser incorporada de fuentes externas, como la dieta humana, de manera preferencial por las células tumorales por su tasa metabólica aumentada y por la condición hipóxica dentro de la masa tumoral<sup>71,352</sup>. Además, en vertebrados la presencia de NeuGc en cerebro es considerada un evento no común, existiendo una presencia casi universal de NeuAc. La supresión de Neu5Gc específica del cerebro, conservada evolutivamente, puede indicar que su presencia es tóxica para este órgano<sup>353</sup>. La relación entre NeuGc y glioma se encuentra escasamente abordada, se destaca el reporte del grupo de Furukawa, donde el modelo de transformación de astrocitos humanos presenta este ácido siálico luego de la introducción de los genes hTERT y SV40ER<sup>282</sup>. El NeuGc detectado como parte de esta integrina podría deberse a que las células fueron cultivadas en presencia de SFB, que debido a su origen animal contiene este ácido siálico. En conjunto con la bibliografía, la presencia de NeuGc podría sugerir un rol de este ácido siálico en la *lav* del glioma.

Las integrinas conformadas por la subunidad  $\alpha_v$  reconocen la secuencia RGD de sus ligandos. El extremo N-terminal de *lav* contiene un dominio de hélice  $\beta$  que consta de siete repeticiones de 60 aminoácidos, el dominio de unión a ligando<sup>327</sup>. Dentro de las posiciones de N-glicosilación descritas en este trabajo sólo la Asn74 se encuentra en este dominio de reconocimiento de ligando. Sería interesante evaluar las implicancias funcionales de las especies diferenciales de glicanos encontradas en Asn74 del glioma de alto y bajo grado, que varían entre N-glicanos complejos y oligomanosa, respectivamente. Por ejemplo, se podría evaluar la respuesta al tratamiento con el pentapéptido RGD Cilengitida (bloqueante de integrinas  $\alpha\beta_3/\alpha\beta_5$ ). Los cambios en el tipo de N-glicanos pueden resultar en grandes cambios en la función de una proteína. Un ejemplo que evidencia este impacto es el caso de los receptores de leucocitos que

unen la región constante (Fc) de las IgG circulantes (FcγR). Se ha descrito que FcγRIIIa con N-glicanos de tipo oligomanosa (Man5) se une al Fc de IgG1 con una afinidad 12 veces mayor que cuando esta glicosilado con N-glicanos de tipo complejo altamente procesados. Interesante, estas modificaciones de glicanos producen sólo un cambio de afinidad de 3,1 veces en el receptor FcγRIIIb, el cual presenta un alto grado de homología estructural y de secuencia con FcγRIIIa<sup>354</sup>. Esto evidencia que la composición de glicanos no sigue un patrón de función general y que puede afectar de manera diferente a proteínas íntimamente relacionadas.

Finalmente, los resultados de este trabajo aportan al conocimiento integral de dos proteínas con gran relevancia en la biología del glioma y contribuyen al conocimiento sobre la participación de su glicosilación en la malignidad. Se describen patrones de glicosilación que conducen a nuevas hipótesis sobre el rol que podrían tener N-glicanos complejos y glicanos Lewis en EGFR, así como N-glicanos complejos y el ácido siálico NeuGc en Iαv.



*Conclusiones Capítulo III*



## Conclusiones Capítulo III

### EGFR

- I. El receptor de EGF se expresa en todas las líneas celulares de glioma humano evaluadas. Su expresión es variable entre los grados tumorales, pero con mayores niveles en las líneas de alto grado.
- II. El glicano Le<sup>x</sup>, así como estructuras de N-glicanos complejos tri- o tetra-anténarios con ramificaciones GlcNAc- $\beta$ 1,6, son posibles modificaciones postraduccionales de EGFR en la línea de alto grado LN229.
- III. Los N-glicanos complejos, incluidos aquellos con ramificaciones GlcNAc- $\beta$ 1,6, son importantes para la modulación del citoesqueleto de actina mediada por el ligando EGF, en células de glioma de alto y bajo grado.

### Integrina $\alpha$ v

- I. La subunidad  $\alpha$ v se expresa en las líneas celulares de glioma utilizadas, de manera variable entre los grados tumorales.
- II. Integrina  $\alpha$ v en células de alto grado LN229 se encuentra modificada postraduccionalmente con estructuras de N-glicanos en las posiciones Asn74, Asn554, Asn615, Asn704, Asn875 y Asn945, con mayor abundancia del tipo complejo.
- III. Integrina  $\alpha$ v en células de alto grado LN229 presenta eventos de microheterogeneidad en las Asn74, Asn554, Asn615 y Asn875, con N-glicanos del *core*, oligomanosa y complejos/híbridos.
- IV. Las posiciones Asn704 y Asn945 presentan sólo glicofomas relacionadas a N-glicanos complejos/híbridos y oligomanosa, respectivamente.
- V. Existe una alta frecuencia de fucosilación y sialilación en los N-glicanos complejos/híbridos en  $\alpha$ v de LN229.
- VI. El ácido siálico preponderante en  $\alpha$ v en células LN229 es NeuAc. La presencia de NeuGc podría tener implicancias en el fenotipo maligno.

- VII. Integrina  $\alpha_v$  de células de bajo grado SW1088 se encuentra modificada postraduccionalmente con estructuras de N-glicanos de oligomanosa en las posiciones Asn74 y Asn875.

Conclusión

---



En este trabajo se propuso estudiar el proceso de glicosilación aberrante, bajo la premisa que la transformación maligna va acompañada de cambios en el patrón de glicosilación de las células tumorales que le confieren ventajas adaptativas que contribuyen a la agresividad y, por ende, a la progresión tumoral. Los resultados de este estudio significan un aporte al conocimiento de dos indicaciones tumorales con origen en el sistema nervioso, el NB y el glioma, en las cuales la investigación en el campo de la glicobiología ha sido poco explorada.

En ambas indicaciones se compararon diferentes grados de agresividad, segregadas por parámetros clínicos que lo fundamentan. Principalmente la comparación del patrón de glicosilación reveló una asociación de los glicanos de la familia Lewis con un fenotipo más agresivo, la cual es sustentada por una sobreexpresión de las enzimas involucradas en su biosíntesis. Dentro de esta familia se destaca la presencia de SLe<sup>x</sup>. En NB se observó que los Lewis se encuentran anclados principalmente a estructuras del *core* 2 de los O-glicanos, mientras que en glioma se encontraron mayoritariamente sobre estructuras de N-glicanos complejos. El estudio de las implicancias en la biología celular de estos tipos de estructuras permitió evidenciar el rol que las mismas presentan en eventos determinantes de las células tumorales como la migración, adhesión, y en el caso de NB, la unión a selectinas. A su vez, el abordaje preliminar sobre la regulación de la expresión de los glicanos Lewis por mecanismos que involucran deacetilasas de histonas, permitió exponer que las líneas menos agresivas de ambas indicaciones experimentan un aumento de determinados glicanos Lewis al inhibir la acción de estos agentes supresores de la transcripción génica. Por el contrario, los modelos celulares más agresivos, con alta expresión de los glicanos, no mostraron modificación en su fenotipo de glicanos.

Tomando como punto de partida la caracterización la glicosilación realizada en glioma, se seleccionaron dos proteínas clave en la agresividad de este tipo tumoral, el receptor de EGF y la molécula de adhesión  $\alpha v$ . La caracterización de EGFR sugiere una participación de glicanos Lewis y N-glicanos del tipo complejo en la función y/o estructura del receptor. Por otro lado, en el caso de  $\alpha v$  se caracterizó la glicosilación de seis sitios en el modelo de alto grado y dos en el modelo de bajo grado. En glioma de alto grado se encontraron sitios de glicosilación con microheterogeneidad que evidencian la coexistencia de diferentes tipos estructurales de N-glicanos, y se observó

una presencia predominante de glicanos complejos en la mayoría de estas posiciones. En cambio, en el modelo de bajo grado sólo se encontraron glicanos del tipo oligomanosa.

Dado el papel crítico de los glicanos en la biología del cáncer, es evidente que la glicosilación genera un nivel más de complejidad para ser incorporada en el entorno clínico-oncológico. La gran cantidad de información que engloban el glicoma y glicoproteoma en el contexto tumoral emerge como fundamental para la comprensión de los tantos factores cruciales que afectan la progresión del cáncer, la inmunidad tumoral, y el resultado clínico de los pacientes. Este conocimiento podría brindar biomarcadores adicionales para la estratificación de pacientes, así como objetivos novedosos para terapias dirigidas mejoradas en especificidad y eficacia. El direccionamiento de estrategias terapéuticas hacia proteínas, con una glicosilación asociada a la malignidad, emerge como una posible alternativa para aumentar la especificidad antitumoral y limitar los efectos tóxicos de las terapias por actividad fuera del objetivo molecular.

Agradecimientos





Agradecer significa muchísimo para mí. Tener la posibilidad de hacerlo refleja lo afortunado que soy por recibir el apoyo, el tiempo, una frase de aliento, un abrazo, así como el amor de las personas que me acompañaron durante este proceso de cinco años, que culmina con esta tesis doctoral. Considero este trabajo el resultado de un esfuerzo colectivo en el que todos ustedes contribuyeron para que se convierta en realidad. Así que mi más sincero gracias por acompañarme de la forma en la que lo hicieron.

Me enorgullece haber sido parte de un laboratorio con gente tan linda, pero más aún, lleno de excelentes profesionales que me hicieron crecer todos los días. En primer lugar, quisiera darles las gracias a los directores del Laboratorio de Oncología Molecular (LOM) de la Universidad Nacional de Quilmes, los doctores Daniel Gómez y Daniel Alonso, por permitirme ser parte de este gran equipo, otras veces titulado “una banda de rock”. Personalmente lo llamaría “un remolino organizado de ciencia, comida, bebidas espirituosas y buena gente”. LOM es un lugar donde, además de hacer ciencia, tuve la suerte de conocer grandes personas. Como este GRAN GRACIAS también se tiñe de despedida, no quiero dejar de expresar todo lo que los quiero y cuánto los voy a extrañar. Sé que nos volveremos a ver, y que no van a faltar las tortas de frutos rojos, las cervezas y todas esas carcajadas al unísono.

A mi director, Marian. Gracias por confiar en mí para seguir en esta etapa doctoral, por mostrarme este mundo de glicanos y cáncer que me terminó fascinando. Muchas gracias por darme la libertad de seguir mis pensamientos y mi curiosidad científica en cada momento, gracias por tus consejos y por bajarme a tierra en tantas oportunidades.

A mi codirectora, Vale. Gracias por guiarme en lo experimental desde aquellos momentos cuando era estudiante y aún no sabía agarrar una pipeta, gracias por tanta ayuda. Gracias por ser el ejemplo de alguien que ama lo que hace, por preocuparte siempre por mí, y por todas esas charlas iluminadoras. Me encantó trabajar a tu lado, espero que el mundo de los azúcares y las birras nos sigan encontrando.

A Cyn, esa amiga incondicional que encontré haciéndonos un nudo entre los *tips* de p200 en citometrías de muchísimos tubos. Gracias por entenderme con tan solo una mirada. Gracias por estar siempre cerca, por ofrecer tu ayuda en cada momento desde el primer día, por pensar siempre en el bien colectivo y por ser la mejor *Lab Manager* que LOM podría tener. Gracias por tu hermosa amistad y por chequearme siempre Chequia. Ni las cuerlomas me van a separar de vos.

A Magui, bastaron pocos segundos para darme cuenta de que trabajar con vos iba a ser genial. Mi compañera de decir la hora a lo indio, de anécdotas de pueblo, de cofias anti-queratina, de ruidos de *scrapers* incesantes y de mil líneas celulares en cultivo. Gracias por bancarte mi intensidad desde el primer día, y por bancarte esta tesis

con independencia. Más aún, gracias por tus consejos, cartelitos de aliento, por enseñarme a usar el *ahre*, gracias por tu amistad.

A Maru, mi primera compañera de línea. Gracias por ser tan buena compañera y tomarte el tiempo para enseñarme tantas cosas. Gracias por todas esas correcciones de escritos en inglés, por tus anécdotas desopilantes y por todos tus consejos.

A Romi, la persona más buena que conozco. Tu amabilidad, honestidad y amor por toda criatura viva hace que seas tan especial. Ojalá ser como vos fuera contagioso, el mundo sería un lugar mejor. Gracias por acompañarme desde mis primeros días en el labo, por ayudarme a resolver mil misterios experimentales desde geles hasta de *Real Time*, por saber todas las canciones del mundo, por tus bailes geniales, por tus consejos y, principalmente, por tu amistad.

A Die, uno de mis referentes laboratoriles preferidos. El que sabe qué experimento vas a hacer, te hace pensar antes de largarlo y no se olvida de preguntarte cómo te fue. Gracias por escucharme siempre, por los tantos consejos que me diste, por preocuparte siempre por mí, gracias por tu amistad. Gracias por esos abrazos apretados y ese “papito” que tanto voy a extrañar.

A Joy, mi china Suárez de LOM. Gracias por sacarme siempre una carcajada con tus comentarios y noticias recordadas no inventadas. Gracias por estar siempre presente, por tu sinceridad brutal y por tu linda amistad. Por más birras en cualquier lugar del mundo.

A Juli, mi compañero de *Western* y “La Faraona”. Gracias por escucharme, aconsejarme y querer sacarme las llaves del labo en múltiples oportunidades. Gracias por ese humor tan divertido que te saca una sonrisa en todo momento. Gracias por ser tan buen amigo. Al igual que Joy, por más birras en cualquier lugar del mundo, obligación llevarme a Vito.

A Nanish, la de los posters más lindos y los pantalones geniales. Gracias por todos esos consejos de edición, por seguirme siempre en el doble sentido, por ofrecer siempre tu ayuda así tengas mil ensayos que largar, gracias por tu linda amistad.

A Georgi, el ejemplo de la responsabilidad y el trabajo duro. Gracias por tener siempre tiempo para discutir resultados conmigo, por compartir tu conocimiento y los innumerables modelos de todo tipo de presentaciones. Gracias por tus consejos, por preocuparte siempre por mí, por ser tan linda conmigo y por las recomendaciones de los lugares más *trendy* de Palermo y del mundo.

A Juan, el Yonito, mi compañero de corridas y de quemaduras irregulares en Mardel. Gracias por todas esas charlas alentadoras y todos tus de consejos. Gracias por tu buena onda de siempre, por ponerte al hombro todos los asados LOM, y no puedo dejar de mencionar tu música tan genial.

A Carli, la diosa del olimpo. Gracias por tu humor tan genial, tu risa contagiosa, tus bailes sensuales, los *boomerangs* con duchas y por ser tan linda conmigo. Gracias por tu ayuda con todos esos *Western Blots*, por tus consejos tanto experimentales como personales.

A Flor, otro gran ejemplo de trabajo. Gracias por tener siempre tiempo para discutir experimentos, estrategias de escritura y estrategias de vida. Gracias por traer al labo siempre una sonrisa, por tu pensamiento siempre conciliador y constructivo, y por estar siempre dispuesta a ayudar.

A Mari Pifano, el ejemplo de compromiso y compañerismo. Muchas gracias por compartir tu conocimiento de estadística con todes, por tus anécdotas tan divertidas, fiestas picantes, gracias por tus consejos y tu buena onda.

A Rocío, mi compañera de cursada, *Western* y cultivo los fines de semana. Gracias por ofrecer siempre tu ayuda, desde tareas comunes hasta geles. Gracias por preocuparte por mí y por todas esas charlas lindas de aliento que me has dado. Mucha suerte para lo que sigue, sé que la vas a romper.

A RoRo, gracias por los tantos mensajes alentadores, por preguntarme siempre por los experimentos y la escritura. Gracias por los mejores alfajorcitos de maicena y por ser tan buena compañera.

A Luisita, gracias por compartir con la *people* la última canción de moda y el último filtro de Instagram. Gracias por tu buena onda de todos los días.

A Lucas, gracias por ser tan buen compañero, por compartir siempre cursos y *papers* interesantes.

A Nori, Lore y Humber, gracias por su buena onda y compañerismo. Nori y Lore, Gracias por las hermosísimas fotos del confocal que aparecen en esta tesis, y por compartir conmigo tantas anécdotas divertidas mientras les pedía otro *zoom in*.

A Hernán y Giselle, gracias por sus comentarios y observaciones siempre constructivas.

A las nuevas incorporaciones del grupo, Juli, Sele y Aylu. Gracias por su buena onda, les deseo mucha suerte en lo que sigue. Sele gracias por tu ayuda con las inmunos. Aylu gracias por tu ayuda en los últimos ensayos. Bienvenidas al mundo de los glicanos!

A Lau, mi profe de inglés y mi amiga. Gracias por creer tanto en mí, por todo tu apoyo en todas las presentaciones, posters, *abstracts* y *papers*. Gracias por ser esa oreja amiga, por ser también esa profe que además de enseñar te da herramientas para seguir creciendo.

A mis amigas de la universidad y de la vida, May, Pri, Flor, Ivvi y Lu. Gracias por bancarme tanto.

A Ale, bastaron pocas palabras para saber que trabajar con vos iba a ser increíble. Gracias por hacer que mi estadía en San Diego sea tan amena como productiva. Gracias por ser un gran mentor, “the mass spec guy” con increíbles ideas, y más aún, una excelente persona. Maang, bro, hermano, sé que nos vamos a volver a encontrar y habrá “fika” para discutir de ciencia y hablar de la vida.

A Joa, gracias por tu amistad incondicional. Gracias por hacerme ver todo desde otra perspectiva y por obligarme a hacer cosas divertidas cuando siempre estoy ocupado.

A Gi, no puedo dejar de agradecer todo lo que me apoyaste. Gracias por ser mi ejemplo de libertad, transparencia y lucha por lo que uno quiere. Gracias por enseñarme que acompañar es amar.

A mi familia, mi gran sostén, que sin su apoyo no podría haber alcanzado este momento. Gracias por ser incondicionales, inclusive desde la distancia. Me siento muy afortunado por contar con una familia con los valores como los de ustedes. Gracias, papá y mamá por enseñarme que soñar nos hace libres, y que no existe nada más lindo que la libertad. Gracias por ser el ejemplo del trabajo duro, y por enseñarme que es el medio para alcanzar todas las metas.

A mi hermana Ka, la que soportó esta tesis más que nadie, junto con Feli. Gracias por tanto apoyo, por hacer tanto por mí. Gracias por hacerme ver siempre el lado positivo, por buscar siempre la manera de construir, por ayudarme a vivir el ahora. Gracias por confiar y creer tanto en mí, gracias por enseñarme tanto.

A mi queridísima abuela Leo, la que llama a la radio para avisar que su nieto llegó de Buenos Aires a visitarla, la abuela más compañera y dulce que existe. Gracias por estar ahí, detrás del teléfono llamando desde La Pampa para preguntar cómo estoy, y por estar más ansiosa que yo por cada paso que doy. Gracias por ser el ejemplo de la fuerza y la convicción, son principios que siempre me guiarán.

Finalmente quiero agradecer a la universidad pública. Porque sin ella hubiera sido imposible para mí y mi familia haber pensado siquiera en la posibilidad alcanzar un título universitario. Tengo la suerte de estar finalizando mi formación doctoral gracias a este derecho, por lo que no tengo más que palabras de agradecimiento para nuestro país y para la Universidad Nacional de Quilmes, mi segundo hogar.

¡Muchísimas gracias a todos!

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'A' followed by 'le', with a horizontal line underneath.

*-Agradecimientos-*

Referencias

---



1. Gomez, D. E. & Alonso, D. F. *Introducción a la oncología molecular*. (Universidad Nacional de Quilmes, 1998). doi:21-53-2-1-10-19700101.
2. Ferlay, J. *et al.* Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://Gco.Iarc.Fr/Today> (2018) doi:10.1002/ijc.31937.
3. Agustina, F. M. ; M. *Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino: TENDENCIA DE INCIDENCIA 2000-2016, SUPERVIVENCIA A 5 AÑOS 2005-2011, TENDENCIA DE SUPERVIVENCIA SECULAR: 2000-04, 2005-09 Y 2010-14*. (Chaplin. - 6a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Instituto Nacional del Cáncer., 2018).
4. Bal de Kier Joffé, E., Puricelli, L. & Alonso, D. F. *Biología tumoral: claves celulares y moleculares del cáncer*. (Eudeba, 2008). doi:9789502316246/1655361.
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011) doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
6. Berdasco, M. & Esteller, M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Developmental Cell* (2010) doi:10.1016/j.devcel.2010.10.005.
7. Esteller, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics* (2007) doi:10.1038/nrg2005.
8. Sharma, S., Kelly, T. K. & Jones, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* (2009) doi:10.1093/carcin/bgp220.
9. Ropero, S. & Esteller, M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology* (2007) doi:10.1016/j.molonc.2007.01.001.
10. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* (1996) doi:10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
11. Gupta, G. P. & Massagué, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* (2006) doi:10.1016/j.cell.2006.11.001.
12. Pantel, K. & Brakenhoff, R. H. Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer* (2004) doi:10.1038/nrc1370.
13. Maher, E. A. *et al.* Malignant glioma: Genetics and biology of a grave matter. *Genes and Development* (2001) doi:10.1101/gad.891601.
14. Rushton, J. & López-Terrada, D. Molecular and genetic basis of childhood cancer. *Cancer Biomarkers* (2011) doi:10.3233/CBM-2011-0199.
15. Kho, A. T. *et al.* Conserved mechanisms across development and tumorigenesis revealed by a mouse development perspective of human cancers. *Genes Dev.* (2004) doi:10.1101/gad.1182504.
16. Palmer, R. D. *et al.* Pediatric malignant germ cell tumors show characteristic transcriptome profiles. *Cancer Res.* (2008) doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5560.
17. Maris, J. M. & Denny, C. T. Focus on embryonal malignancies. *Cancer Cell* (2002) doi:10.1016/S1535-6108(02)00206-4.
18. Knudson, A. G., Hethcote, H. W. & Brown, B. W. Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1975) doi:10.1073/pnas.72.12.5116.
19. Dunn, J. M., Phillips, R. A., Becker, A. J. & Gallie, B. L. Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene. *Science* (80-. ). (1988) doi:10.1126/science.3175621.
20. Lohmann, D. R. & Gallie, B. L. Retinoblastoma: Revisiting the model prototype of inherited cancer. *Am. J. Med. Genet.* (2004) doi:10.1002/ajmg.c.30024.
21. Harbour, J. W. & Dean, D. C. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nature Cell Biology* (2000) doi:10.1038/35008695.
22. Murphy, M. F. G., Bithell, J. F., Stiller, C. A., Kendall, G. M. & O'Neill, K. A. Childhood and adult cancers: Contrasts and commonalities. *Maturitas* (2013) doi:10.1016/j.maturitas.2013.05.017.
23. Ajit, V. & Sharon, N. Chapter 1 Historical Background and Overview. *Essentials Glycobiol.* (2009) doi:10.1101/glycobiology.3e.001.

24. Marth, J. D. A unified vision of the building blocks of life. *Nature Cell Biology* (2008) doi:10.1038/ncb0908-1015.
25. Cummings, R. D. & Pierce, J. M. The challenge and promise of glycomics. *Chemistry and Biology* (2014) doi:10.1016/j.chembiol.2013.12.010.
26. Varki, A. Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: Why cell surface glycans are universal to living cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2011) doi:10.1101/cshperspect.a005462.
27. Varki, A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* (2017) doi:10.1093/glycob/cww086.
28. Watanabe, H., Yamada, Y. & Kimata, K. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *Journal of Biochemistry* (1998) doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022166.
29. Weerapana, E. & Imperiali, B. Asparagine-linked protein glycosylation: From eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* (2006) doi:10.1093/glycob/cwj099.
30. Varki, A. & Gagneux, P. Chapter 7 Biological Functions of Glycans. *Essentials Glycobiol. 3rd Ed.* (2017) doi:10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.007.
31. Wang, X. *et al.* Dysregulation of TGF- $\beta$ 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005) doi:10.1073/pnas.0507375102.
32. Samuelson, J. & Robbins, P. W. Effects of N-glycan precursor length diversity on quality control of protein folding and on protein glycosylation. *Seminars in Cell and Developmental Biology* (2015) doi:10.1016/j.semcd.2014.11.008.
33. Song, R. *et al.* Soluble biglycan induces the production of ICAM-1 and MCP-1 in human aortic valve interstitial cells through TLR2/4 and the ERK1/2 pathway. *Inflamm. Res.* (2014) doi:10.1007/s00011-014-0743-3.
34. Schnaar, R. L. Glycobiology simplified: diverse roles of glycan recognition in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* (2016) doi:10.1189/jlb.3ri0116-021r.
35. Nizet, V., Varki, A. & Aebi, M. *Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins. Essentials of Glycobiology* (2015).
36. Michon, F., Brisson, J. Robert, Dell, A., Kasper, D. L. & Jennings, H. J. Multiantennary Group-Specific Polysaccharide of Group B Streptococcus. *Biochemistry* (1988) doi:10.1021/bi00414a059.
37. Varki, A. *et al.* Symbol nomenclature for graphical representations of glycans. *Glycobiology* (2015) doi:10.1093/glycob/cwv091.
38. Varki, A. *et al.* *Essentials of glycobiology, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press* (2017).
39. Rini, J. M. & Esko, J. D. *Glycosyltransferases and Glycan-Processing Enzymes. Essentials of Glycobiology* (2015).
40. Paulson, J. C. & Colley, K. J. Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *Journal of Biological Chemistry* (1989).
41. Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J. & Withers, S. G. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* (2008) doi:10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322.
42. Itzkowitz, S. H., Dahiya, R., Byrd, J. C. & Kim, Y. S. Blood group antigen synthesis and degradation in normal and cancerous colonic tissues. *Gastroenterology* (1990) doi:10.1016/0016-5085(90)91026-3.
43. Gloster, T. M. Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective. *Current Opinion in Structural Biology* (2014) doi:10.1016/j.sbi.2014.08.012.
44. Kötler, M. P., Hancock, S. M. & Withers, S. G. Glycosidases: Functions, Families and Folds. in *eLS* (2014). doi:10.1002/9780470015902.a0020548.pub2.
45. Stanley P, Taniguchi N, A. M. N-glycans. in *Essentials of Glycobiology* (2017). doi:10.1101/glycobiology.3e.009.
46. Burda, P. & Aebi, M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochimica et*

- Biophysica Acta - General Subjects* (1999) doi:10.1016/S0304-4165(98)00127-5.
47. Stanley, P. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2011) doi:10.1101/cshperspect.a005199.
  48. Yu, H. & Chen, X. Carbohydrate post-glycosylational modifications. *Org. Biomol. Chem.* (2007) doi:10.1039/b700034k.
  49. Sauerzapfe, B. *et al.* Chemo-enzymatic synthesis of poly-N-acetyllactosamine (poly-LacNAc) structures and their characterization for CGL2-galectin-mediated binding of ECM glycoproteins to biomaterial surfaces. *Glycoconj. J.* (2009) doi:10.1007/s10719-008-9172-2.
  50. Ujita, M. *et al.* Regulation of I-branched poly-N-acetyllactosamine synthesis: Concerted actions by i-extension enzyme, I-branching enzyme, and  $\beta$ 1,4- galactosyltransferase I. *J. Biol. Chem.* (1999) doi:10.1074/jbc.274.14.9296.
  51. Ujita, M., Misra, A. K., McAuliffe, J., Hindsgaul, O. & Fukuda, M. Poly-N-acetyllactosamine extension in N-glycans and core 2- and core 4- branched O-glycans is differentially controlled by i-extension enzyme and different members of the  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase gene family. *J. Biol. Chem.* (2000) doi:10.1074/jbc.M001034200.
  52. Wu, J. *et al.* Tunicamycin specifically aggravates ER stress and overcomes chemoresistance in multidrug-resistant gastric cancer cells by inhibiting N-glycosylation. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* (2018) doi:10.1186/s13046-018-0935-8.
  53. Cook, D. *et al.* Production of the alkaloid swainsonine by a fungal endosymbiont of the ascomycete order chaetothyriales in the host ipomoea carnea. *J. Agric. Food Chem.* (2013) doi:10.1021/jf4008423.
  54. Brockhausen, I. & Stanley, P. *O-GalNAc Glycans. Essentials of Glycobiology* (2015).
  55. Ten Hagen, K. G., Fritz, T. A. & Tabak, L. A. All in the family: The UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* (2003) doi:10.1093/glycob/cwg007.
  56. Bennett, E. P. *et al.* Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* (2012) doi:10.1093/glycob/cwr182.
  57. Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R. & Brunak, S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* (2005) doi:10.1093/glycob/cwh151.
  58. Ju, T., Aryal, R. P., Kudelka, M. R., Wang, Y. & Cummings, R. D. The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer. *Cancer Biomarkers* (2014) doi:10.3233/CBM-130375.
  59. Ju, T., Otto, V. I. & Cummings, R. D. The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. *Angewandte Chemie - International Edition* (2011) doi:10.1002/anie.201002313.
  60. Schwientek, T. *et al.* Control of O -Glycan Branch Formation . *J. Biol. Chem.* (2000) doi:10.1074/jbc.275.15.11106.
  61. Ho, W. L., Hsu, W. M., Huang, M. C., Kadomatsu, K. & Nakagawara, A. Protein glycosylation in cancers and its potential therapeutic applications in neuroblastoma. *Journal of Hematology and Oncology* (2016) doi:10.1186/s13045-016-0334-6.
  62. Cagnoni, A. J., Pérez Sáez, J. M., Rabinovich, G. A. & Mariño, K. V. Turning-off signaling by siglecs, selectins, and galectins: Chemical inhibition of glycan-dependent interactions in cancer. *Frontiers in Oncology* (2016) doi:10.3389/fonc.2016.00109.
  63. Cummings, R. D. & Smith, D. F. The selectin family of carbohydrate-binding proteins: Structure and importance of carbohydrate ligands for cell adhesion. *BioEssays* (1992) doi:10.1002/bies.950141210.
  64. Lorenzon, P. *et al.* Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J. Cell Biol.* (1998) doi:10.1083/jcb.142.5.1381.
  65. Bevilacqua, M. P. & Nelson, R. M. Selectins. *Journal of Clinical Investigation* (1993) doi:10.1172/JCI116210.
  66. Varki, A. Review Selectin ligands. *PNAS, Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994).

67. Moore, K. L., Varki, A. & McEver, R. G. GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils: Evidence for a lectin-like interaction. *J. Cell Biol.* (1991) doi:10.1083/jcb.112.3.491.
68. Vachino, G. *et al.* P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-functional form on many lymphocytic cells. *J. Biol. Chem.* (1995) doi:10.1074/jbc.270.37.21966.
69. Laszik, Z. *et al.* P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood* (1996) doi:10.1182/blood.v88.8.3010.bloodjournal8883010.
70. Ohtsubo, K. & Marth, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* (2006) doi:10.1016/j.cell.2006.08.019.
71. Boligan, K. F., Mesa, C., Fernandez, L. E. & Von Gunten, S. Cancer intelligence acquired (CIA): Tumor glycosylation and sialylation codes dismantling antitumor defense. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2015) doi:10.1007/s00018-014-1799-5.
72. Rostenberg, I. *et al.* Distinct glycosylation of serum proteins in patients with cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* (1978) doi:10.1093/jnci/60.1.83.
73. Wu, H. C., Meezan, E., Black, P. H. & Robbins, P. W. Comparative Studies on the Carbohydrate-Containing Membrane Components of Normal and Virus-Transformed Mouse Fibroblasts. I. Glucosamine-Labeling Patterns in 3T3, Spontaneously Transformed 3T3, and SV-40-Transformed 3T3 Cells. *Biochemistry* (1969) doi:10.1021/bi00834a038.
74. Feizi, T. Carbohydrate antigens in human cancer. *Cancer Surveys* (1985).
75. Munkley, J. & Elliott, D. J. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget* (2016) doi:10.18632/oncotarget.8155.
76. Hakomori, S. I. & Murakami, W. T. Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1968) doi:10.1073/pnas.59.1.254.
77. Varki, A., Kannagi, R., Toole, B. & Stanley, P. *Glycosylation Changes in Cancer. Essentials of Glycobiology* (2015).
78. Pinho, S. S. & Reis, C. A. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer* (2015) doi:10.1038/nrc3982.
79. Abrantes, J., Posada, D., Guillon, P., Esteves, P. J. & Le Pendu, J. Widespread gene conversion of alpha-2-fucosyltransferase genes in mammals. *J. Mol. Evol.* (2009) doi:10.1007/s00239-009-9239-0.
80. Sperandio, M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS Journal* (2006) doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05437.x.
81. De Vries, T., Knegtel, R. M. A., Holmes, E. H. & Macher, B. A. Fucosyltransferases: Structure/function studies. *Glycobiology* (2001) doi:10.1093/glycob/11.10.119R.
82. Mollicone, R. *et al.* Activity, splice variants, conserved peptide motifs, and phylogeny of two New  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase families (FUT10 and FUT11). *J. Biol. Chem.* (2009) doi:10.1074/jbc.M809312200.
83. Kolbinger, F., Streiff, M. B. & Katopodis, A. G. Cloning of a human UDP-galactose:2-acetamido-2-deoxy-D-glucose 3 $\beta$ -galactosyltransferase catalyzing the formation of type 1 chains. *J. Biol. Chem.* (1998) doi:10.1074/jbc.273.1.433.
84. Furukawa, K. & Sato, T.  $\beta$ -1,4-Galactosylation of N-glycans is a complex process. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (1999) doi:10.1016/S0304-4165(99)00169-5.
85. Hakomori, S. itiroh. Glycosphingolipids as differentiation-dependent, tumor-associated markers and as regulators of cell proliferation. *Trends in Biochemical Sciences* (1984) doi:10.1016/0968-0004(84)90156-7.
86. Zhang, S. *et al.* Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: II. Blood group-related antigens. *Int. J. Cancer* (1997) doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970926)73:1<50::AID-IJC9>3.0.CO;2-0.

87. Nishihara, S. *et al.* ,3-Fucosyltransferase IX (Fut9) determines Lewis X expression in brain. *Glycobiology* (2003) doi:10.1093/glycob/cwg048.
88. Blanas, A., Sahasrabudhe, N. M., Rodríguez, E., van Kooyk, Y. & van Vliet, S. J. Fucosylated antigens in cancer: An alliance toward tumor progression, metastasis, and resistance to chemotherapy. *Frontiers in Oncology* (2018) doi:10.3389/fonc.2018.00039.
89. Kadota, A., Masutani, M., Takei, M. & Horie, T. Evaluation of expression of CD15 and sCD15 in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* (1999) doi:10.3892/ijo.15.6.1081.
90. Koh, Y. W., Lee, H. J., Ahn, J. H., Lee, J. W. & Gong, G. Expression of Lewis X is associated with poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* (2013) doi:10.1309/AJCP2E6QNDIDPTTC.
91. Brooks, S. A. & Leathem, A. J. C. Expression of the CD15 antigen (Lewis x) in breast cancer. *Histochem. J.* (1995) doi:10.1007/BF02388541.
92. Jang, T. J., Park, J. B. & Lee, J. I. The expression of CD10 and CD15 is progressively increased during colorectal cancer development. *Korean J. Pathol.* (2013) doi:10.4132/KoreanJPathol.2013.47.4.340.
93. Kim, Y. S. *et al.* Lex and Ley Antigen Expression in Human Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* (1988).
94. Son, M. J., Woolard, K., Nam, D. H., Lee, J. & Fine, H. A. SSEA-1 Is an Enrichment Marker for Tumor-Initiating Cells in Human Glioblastoma. *Cell Stem Cell* (2009) doi:10.1016/j.stem.2009.03.003.
95. Kajiwara, H., Yasuda, M., Kumaki, N., Shibayama, T. & Osamura, Y. Expression of carbohydrate antigens (SSEA-1, Sialyl-Lewis X, DU-PAN-2 and CA19-9) and E-selectin in urothelial carcinoma of the renal pelvis, ureter, and urinary bladder. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* (2005).
96. Liebert, M. *et al.* Detection of SSEA-1 on human renal tumors. *Cancer* (1987) doi:10.1002/1097-0142(19870415)59:8<1404::AID-CNCR2820590804>3.0.CO;2-D.
97. Lenkei, R., Björk, O., Öst, Å. & Biberfeld, P. Expression of CD15 as predictor of relapse in children with acute lymphoblastic leukemia of the pre-B type. *Leukemia Research* (1991) doi:10.1016/0145-2126(91)90120-I.
98. Tanaka, F. *et al.* Lewis Y antigen expression and postoperative survival in non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* (1998) doi:10.1016/S0003-4975(98)00937-0.
99. Madjd, Z. *et al.* High expression of Lewisy/bantigens is associated with decreased survival in lymph node negative breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* (2005) doi:10.1186/bcr1305.
100. Baldus, S. E. *et al.* Lewis y antigen (CD174) and apoptosis in gastric and colorectal carcinomas: Correlations with clinical and prognostic parameters. *Histol. Histopathol.* (2006) doi:10.14670/HH-21.503.
101. Myers, R. B., Srivastava, S. & Grizzle, W. E. Lewis Y Antigen as Detected by the Monoclonal Antibody BR96 is Expressed Strongly in Prostatic Adenocarcinoma. *J. Urol.* (1995) doi:10.1016/S0022-5347(01)67464-0.
102. Wakabayashi, M. *et al.* Lewis Y antigen expression in hepatocellular carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer* (1995) doi:10.1002/1097-0142(19950615)75:12<2827::AID-CNCR2820751207>3.0.CO;2-Z.
103. Jass, J. R. & Robertson, A. M. Colorectal mucin histochemistry in health and disease: A critical review. *Pathol. Int.* (1994) doi:10.1111/j.1440-1827.1994.tb02599.x.
104. Stanley, P. & Cummings, R. D. *Structures Common to Different Glycans. Essentials of Glycobiology* (2015).
105. Miyake, M. & Hakomori, S. I. A Specific Cell Surface Glycoconjugate Controlling Cell Motility: Evidence by Functional Monoclonal Antibodies That Inhibit Cell Motility and Tumor Cell Metastasis. *Biochemistry* (1991) doi:10.1021/bi00227a023.
106. Li, J., Zhou, X., Liu, Q., Wang, Z. & Li, Y. The correlation between the expression of ABH and Lewis A histo-blood group antigens and the biological behavior of primary pulmonary

- adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* (2009).
107. Pour, P. M. *et al.* Expression of Blood Group-related Antigens ABH, Lewis A, Lewis B, Lewis X, Lewis Y, and CA 19–9 in Pancreatic Cancer Cells in Comparison with the Patient’s Blood Group Type. *Cancer Res.* (1988).
  108. Jassam, S. A. *et al.* TNF- $\alpha$  enhancement of CD62E mediates adhesion of non-small cell lung cancer cells to brain endothelium via CD15 in lung-brain metastasis. *Neuro. Oncol.* (2016) doi:10.1093/neuonc/nov248.
  109. Geijtenbeek, T. B. H. *et al.* Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* (2000) doi:10.1016/S0092-8674(00)80693-5.
  110. Tsuboi, S. & Fukuda, M. Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *BioEssays* (2001) doi:10.1002/1521-1878(200101)23:1<46::AID-BIES1006>3.0.CO;2-3.
  111. Irimura, T. *et al.* Increased Expression of Sialyl Lewisx Antigen Correlates with Poor Survival in Patients with Colorectal Carcinoma: Clinicopathological and Immunohistochemical Study. *Cancer Res.* (1993).
  112. Jørgensen, T. *et al.* Up-Regulation of the Oligosaccharide Sialyl Lewisx: A New Prognostic Parameter in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res.* (1995).
  113. Tozawa, K. *et al.* Positive correlation between sialyl Lewis X expression and pathologic findings in renal cell carcinoma. *Kidney Int.* (2005) doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00216.x.
  114. Burdick, M. M., Michael McCaffery, J., Kim, Y. S., Bochner, B. S. & Konstantopoulos, K. Colon carcinoma cell glycolipids, integrins, and other glycoproteins mediate adhesion to HUVECs under flow. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* (2003) doi:10.1152/ajpcell.00423.2002.
  115. Mannori, G. *et al.* Differential Colon Cancer Cell Adhesion to E-, P-, and L-selectin: Role of Mucin-type Glycoproteins. *Cancer Res.* (1995).
  116. Weston, B. W. *et al.* Expression of human  $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells. *Cancer Res.* (1999).
  117. Cohen, E. N. *et al.* Elevated serum levels of sialyl Lewis X (sLeX) and inflammatory mediators in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* (2019) doi:10.1007/s10549-019-05258-0.
  118. Marrelli, D. *et al.* Preoperative positivity of serum tumor markers is a strong predictor of hematogenous recurrence of gastric cancer. *J. Surg. Oncol.* (2001) doi:10.1002/jso.1163.
  119. Scarà, S., Bottoni, P. & Scatena, R. CA 19-9: Biochemical and clinical aspects. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2015). doi:10.1007/978-94-017-7215-0\_15.
  120. Miyazaki, K. *et al.* Loss of disialyl Lewis<sub>x</sub>, the ligand for lymphocyte inhibitory receptor sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-7 (Siglec-7) associated with increased sialyl Lewis<sub>x</sub> expression on human colon cancers. *Cancer Res.* (2004) doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3614.
  121. Izawa, M. *et al.* Expression of sialyl 6-sulfo Lewis X is inversely correlated with conventional sialyl Lewis X expression in human colorectal cancer. *Cancer Res.* (2000).
  122. Yusa, A., Miyazaki, K., Kimura, N., Izawa, M. & Kannagi, R. Epigenetic silencing of the sulfate transporter gene DTDST induces sialyl Lewis<sub>x</sub> expression and accelerates proliferation of colon cancer cells. *Cancer Res.* (2010) doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2383.
  123. Ogawa, J. I., Inoue, H. & Koide, S. Expression of  $\alpha$ -1,3-fucosyltransferase type IV and VII genes is related to poor prognosis in lung cancer. *Cancer Res.* (1996).
  124. Barthel, S. R. *et al.* Alpha 1,3 fucosyltransferases are master regulators of prostate cancer cell trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2009) doi:10.1073/pnas.0906074106.
  125. Julien, S. *et al.* Selectin ligand sialyl-lewis x antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. *Cancer Res.* (2011) doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1139.
  126. Insug, O., Otvos, L., Kieber-Emmons, T. & Blaszczyk-Thurin, M. Role of SA-Lea and E-

- selectin in metastasis assessed with peptide antagonist. *Peptides* (2002) doi:10.1016/S0196-9781(02)00024-4.
127. Hoos, A., Protsyuk, D. & Borsig, L. Metastatic growth progression caused by PSGL-1-Mediated recruitment of monocytes to metastatic sites. *Cancer Res.* (2014) doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0946.
128. Kappelmayr, J. & Nagy, B. The interaction of selectins and PSGL-1 as a key component in thrombus formation and cancer progression. *BioMed Research International* (2017) doi:10.1155/2017/6138145.
129. Ma, Y.-Q. & Geng, J.-G. Heparan Sulfate-Like Proteoglycans Mediate Adhesion of Human Malignant Melanoma A375 Cells to P-Selectin Under Flow. *J. Immunol.* (2000) doi:10.4049/jimmunol.165.1.558.
130. Goetz, D. J. *et al.* A human colon carcinoma cell line exhibits adhesive interactions with P-selectin under fluid flow via a PSGL-1-independent mechanism. *Am. J. Pathol.* (1996).
131. Heidemann, F. *et al.* Selectins mediate small cell lung cancer systemic metastasis. *PLoS One* (2014) doi:10.1371/journal.pone.0092327.
132. Dimitroff, C. J. *et al.* Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer Res.* (2005) doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4653.
133. Li, J. *et al.* Inflammatory molecule, PSGL-1, deficiency activates macrophages to promote colorectal cancer growth through NF $\kappa$ B signaling. *Mol. Cancer Res.* (2017) doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0309.
134. Granovsky, M. *et al.* Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat. Med.* (2000) doi:10.1038/73163.
135. Dennis, J. W., Demetrio, M. & Dennis, J. W.  $\beta$ 1-6 Branched Oligosaccharides as a Marker of Tumor Progression in Human Breast and Colon Neoplasia. *Cancer Res.* (1991).
136. Cummings, R. D. & Kornfeld, S. Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. *J. Biol. Chem.* (1982).
137. Seelentag, W. K. F. *et al.* Prognostic value of  $\beta$ 1,6-branched oligosaccharides in human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* (1998).
138. Takano, R., Nose, M., Nishihira, T. & Kyogoku, M. Increase of  $\beta$ 1-6-branched oligosaccharides in human esophageal carcinomas invasive against surrounding tissue in vivo and in vitro. *Am. J. Pathol.* (1990).
139. Hirabayashi, J. *et al.* Oligosaccharide specificity of galectins: A search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (2002) doi:10.1016/S0304-4165(02)00311-2.
140. Potapenko, I. O. *et al.* Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Molecular Oncology* (2010) doi:10.1016/j.molonc.2009.12.001.
141. Yoshimura, M., Nishikawa, A., Ihara, Y., Taniguchi, S. & Taniguchi, N. Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1995) doi:10.1073/pnas.92.19.8754.
142. Taniguchi, N., Miyoshi, E., Ko, J. H., Ikeda, Y. & Ihara, Y. Implication of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer: Gene regulation and signaling mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (1999) doi:10.1016/S0925-4439(99)00066-6.
143. Hutchinson, W. L., Du, M. -Q, Johnson, P. J. & Williams, R. Fucosyltransferases: Differential plasma and tissue alterations in hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Hepatology* (1991) doi:10.1002/hep.1840130412.
144. Takahashi, M., Kuroki, Y., Ohtsubo, K. & Taniguchi, N. Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core: their functions and target proteins.

- Carbohydrate Research* (2009) doi:10.1016/j.carres.2009.04.031.
145. Liu, D., Gao, Z. & Yue, L. Fucosyltransferase 8 deficiency suppresses breast cancer cell migration by interference of the FAK/integrin pathway. *Cancer Biomarkers* (2019) doi:10.3233/CBM-190209.
  146. Kudelka, M. R., Ju, T., Heimbürg-Molinario, J. & Cummings, R. D. Simple sugars to complex disease-mucin-type O-glycans in cancer. in *Advances in Cancer Research* (2015). doi:10.1016/bs.acr.2014.11.002.
  147. Ju, T. *et al.* Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Res.* (2008) doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2345.
  148. Marcos, N. T. *et al.* Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated Sialyl-Tn antigen. *Cancer Res.* (2004) doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1921.
  149. Ozaki, H. *et al.* Enhancement of metastatic ability by ectopic expression of ST6GalNAcI on a gastric cancer cell line in a mouse model. *Clin. Exp. Metastasis* (2012) doi:10.1007/s10585-011-9445-1.
  150. Burchell, J. *et al.* An  $\alpha$ 2,3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas. *Glycobiology* (1999) doi:10.1093/glycob/9.12.1307.
  151. Picco, G. *et al.* Over-expression of ST3Gal-I promotes mammary tumorigenesis. *Glycobiology* (2010) doi:10.1093/glycob/cwq085.
  152. Häuselmann, I. & Borsig, L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Frontiers in Oncology* (2014) doi:10.3389/fonc.2014.00028.
  153. Gill, D. J. *et al.* Initiation of GalNAc-type O-glycosylation in the endoplasmic reticulum promotes cancer cell invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2013) doi:10.1073/pnas.1305269110.
  154. Dalziel, M. *et al.* The Relative Activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I Glycosyltransferases Determine O-Glycan Structure and Expression of a Tumor-associated Epitope on MUC1. *J. Biol. Chem.* (2001) doi:10.1074/jbc.M006523200.
  155. Campbell, B. J., Finnie, I. A., Hounsell, E. F. & Rhodes, J. M. Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin. *J. Clin. Invest.* (1995) doi:10.1172/jci117700.
  156. Springer, G. F. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* (1984) doi:10.1126/science.6729450.
  157. Yu, L. G. The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression. *Glycoconjugate Journal* (2007) doi:10.1007/s10719-007-9034-3.
  158. Clément, M., Rocher, J., Loirand, G. & Le Pendu, J. Expression of sialyl-Tn epitopes on  $\beta$ 1 integrin alters epithelial cell phenotype, proliferation and haptotaxis. *J. Cell Sci.* (2004) doi:10.1242/jcs.01350.
  159. Bian, C. F., Zhang, Y., Sun, H., Li, D. F. & Wang, D. C. Structural basis for distinct binding properties of the human galectins to Thomsen-Friedenreich antigen. *PLoS One* (2011) doi:10.1371/journal.pone.0025007.
  160. Iurisci, I. *et al.* Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin. Cancer Res.* (2000).
  161. Chia, J., Goh, G. & Bard, F. Short O-GalNAc glycans: Regulation and role in tumor development and clinical perspectives. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* (2016) doi:10.1016/j.bbagen.2016.03.008.
  162. Brockhausen, I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: Glycodynamics and functions. *EMBO Reports* (2006) doi:10.1038/sj.embor.7400705.
  163. Iwai, T. *et al.* Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005) doi:10.1073/pnas.0407983102.
  164. Vavasseur, F., Yang, J. M., Dole, K., Paulsen, H. & Brockhausen, I. Synthesis of O-glycan

- core 3: Characterization of UDP-GlcNAc: GalNAc-R  $\beta$ 3-N-acetyl-glucosaminyltransferase activity from colonic mucosal tissues and lack of the activity in human cancer cell lines. *Glycobiology* (1995) doi:10.1093/glycob/5.3.351.
165. VAVASSEUR, F. *et al.* O-glycan biosynthesis in human colorectal adenoma cells during progression to cancer. *Eur. J. Biochem.* (1994) doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18880.x.
  166. Tsuboi, S. *et al.* A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans. *EMBO J.* (2011) doi:10.1038/emboj.2011.215.
  167. Yousefi, S. *et al.* Increased UDP-GlcNAc:Gal $\beta$ 1-3GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc)  $\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase activity in metastatic murine tumor cell lines. Control of poly lactosamine synthesis. *J. Biol. Chem.* (1991).
  168. Hagisawa, S. *et al.* Expression of core 2  $\beta$ 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase facilitates prostate cancer progression. *Glycobiology* (2005) doi:10.1093/glycob/cwi086.
  169. Shimodaira, K. *et al.* Carcinoma-associated expression of core 2  $\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase gene in human colorectal cancer: Role of O- glycans in tumor progression. *Cancer Res.* (1997).
  170. Machida, E., Nakayama, J., Amano, J. & Fukuda, M. Clinicopathological significance of core 2  $\beta$ 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase messenger RNA expressed in the pulmonary adenocarcinoma determined by in situ hybridization. *Cancer Res.* (2001).
  171. Brockhausen, I., Yang, J. -M, Burchell, J., Whitehouse, C. & Taylor-Papadimitriou, J. Mechanisms Underlying Aberrant Glycosylation of MUC1 Mucin in Breast Cancer Cells. *Eur. J. Biochem.* (1995) doi:10.1111/j.1432-1033.1995.607\_2.x.
  172. Dall'Olio, F., Malagolini, N., Trinchera, M. & Chiricolo, M. Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. *Frontiers in Bioscience* (2012) doi:10.2741/3951.
  173. Julien, S. *et al.* Sialyl-Lewis x on P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Is Regulated during Differentiation and Maturation of Dendritic Cells: A Mechanism Involving the Glycosyltransferases C2GnT1 and ST3Gal I . *J. Immunol.* (2007) doi:10.4049/jimmunol.179.9.5701.
  174. Tsuboi, S. & Fukuda, M. Overexpression of branched O-linked oligosaccharides on T cell surface glycoproteins impairs humoral immune responses in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* (1998) doi:10.1074/jbc.273.46.30680.
  175. Nakamura, M. *et al.* Single glycosyltransferase, core 2  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6-N-acetylglucosaminyltransferase, regulates cell surface sialyl-Le(x) expression level in human pre-B lymphocytic leukemia cell line KM3 treated with phorbol ester. *J. Biol. Chem.* (1998) doi:10.1074/jbc.273.41.26779.
  176. Ellies, L. G. *et al.* Core 2 oligosaccharide biosynthesis distinguishes between selectin ligands essential for leukocyte homing and inflammation. *Immunity* (1998) doi:10.1016/S1074-7613(00)80653-6.
  177. Wang, H. *et al.* Core2  $\beta$ 1-6-N-glucosaminyltransferase-i is crucial for the formation of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2009) doi:10.1161/ATVBAHA.108.170969.
  178. Gauguet, J. M., Rosen, S. D., Marth, J. D. & Von Andrian, U. H. Core 2 branching  $\beta$ 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase and high endothelial cell N-acetylglucosamine-6-sulfotransferase exert differential control over B- and T-lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *Blood* (2004) doi:10.1182/blood-2004-05-1986.
  179. Rossi, F. M. V *et al.* Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat. Immunol.* (2005) doi:10.1038/ni1203.
  180. St. Hill, C. A., Baharo-Hassan, D. & Farooqui, M. C2-O-sLeX Glycoproteins are E-Selectin ligands that regulate invasion of human colon and hepatic carcinoma cells. *PLoS One* (2011) doi:10.1371/journal.pone.0016281.
  181. Hatakeyama, S. *et al.* Core 2 N-acetylglucosaminyltransferase-1 expression induces aggressive potential of testicular germ cell tumor. *Int. J. Cancer* (2010) doi:10.1002/ijc.25117.

182. Kojima, Y. *et al.* Detection of Core2  $\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase in post-digital rectal examination urine is a reliable indicator for extracapsular extension of prostate cancer. *PLoS One* (2015) doi:10.1371/journal.pone.0138520.
183. Chen, Z., Gulzar, Z. G., St. Hill, C. A., Walcheck, B. & Brooks, J. D. Increased expression of GCNT1 is associated with altered O-glycosylation of PSA, PAP, and MUC1 in human prostate cancers. *Prostate* (2014) doi:10.1002/pros.22826.
184. Munkley, J. *et al.* Glycosylation is an Androgen-Regulated Process Essential for Prostate Cancer Cell Viability. *EBioMedicine* (2016) doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.018.
185. Stone, E. L. *et al.* Glycosyltransferase Function in Core 2-Type Protein O Glycosylation. *Mol. Cell. Biol.* (2009) doi:10.1128/mcb.00204-09.
186. Sweeney, J. G. *et al.* Loss of GCNT2/I-branched glycans enhances melanoma growth and survival. *Nat. Commun.* (2018) doi:10.1038/s41467-018-05795-0.
187. Nakamura, K., Sawaki, H., Yamashita, K., Watanabe, M. & Narimatsu, H. Identification of epigenetic silencing of GCNT2 expression by comprehensive real-time PCR screening in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* (2014) doi:10.1200/jco.2014.32.3\_suppl.506.
188. Zhang, H. *et al.* Engagement of I-branching  $\beta$ -1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase 2 in breast cancer metastasis and TGF- $\beta$  signaling. *Cancer Res.* (2011) doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0414.
189. Fernández, L. P. *et al.* The role of glycosyltransferase enzyme GCNT3 in colon and ovarian cancer prognosis and chemoresistance. *Sci. Rep.* (2018) doi:10.1038/s41598-018-26468-4.
190. Kailemia, M. J., Park, D. & Lebrilla, C. B. Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* vol. 409 (2017).
191. Hossain, F. & Andreana, P. R. Developments in carbohydrate-based cancer therapeutics. *Pharmaceuticals* (2019) doi:10.3390/ph12020084.
192. Slovin, S. F., Keding, S. J. & Ragupathi, G. Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. *Immunol. Cell Biol.* (2005) doi:10.1111/j.1440-1711.2005.01350.x.
193. Tolcher, A. W. *et al.* Randomized phase II study of BR96-doxorubicin conjugate in patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* (1999) doi:10.1200/jco.1999.17.2.478.
194. Wei, M. M., Wang, Y. S. & Ye, X. S. Carbohydrate-based vaccines for oncotherapy. *Medicinal Research Reviews* (2018) doi:10.1002/med.21493.
195. Segatori, V. I., Vazquez, A. M., Gomez, D. E., Gabri, M. R. & Alonso, D. F. Preclinical evaluation of racotumomab, an anti-idiotypic monoclonal antibody to N-glycolyl-containing gangliosides, with or without chemotherapy in a mouse model of non-small cell lung cancer. *Front. Oncol.* (2012) doi:10.3389/fonc.2012.00160.
196. Gabri, M. R., Cacciavillano, W., Chantada, G. L. & Alonso, D. F. Racotumomab for treating lung cancer and pediatric refractory malignancies. *Expert Opinion on Biological Therapy* (2016) doi:10.1517/14712598.2016.1157579.
197. Segatori, V. I. *et al.* Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by active immunotherapy based on racotumomab in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* (2018) doi:10.1007/s00262-018-2188-y.
198. Harenza, J. L. *et al.* Transcriptomic profiling of 39 commonly-used neuroblastoma cell lines. *Sci. Data* (2017) doi:10.1038/sdata.2017.33.
199. Thiele, C. J. Neuroblastoma Cell Lines. *Neuroblastoma Masters, J. Hum. Cell Cult.* **Vol 1**, p 21-53 (1998).
200. Biedler, J. L., Helson, L. & Spengler, B. A. Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Res.* (1973).
201. In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* (1973) doi:10.1093/jnci/51.5.1417.
202. Cowley, G. S. *et al.* Parallel genome-scale loss of function screens in 216 cancer cell lines for the identification of context-specific genetic dependencies. *Sci. Data* (2014) doi:10.1038/sdata.2014.35.

203. Diserens, A. C. *et al.* Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. *Acta Neuropathol.* (1981) doi:10.1007/BF00697180.
204. Stein, G. H. T98G: An anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *J. Cell. Physiol.* (1979) doi:10.1002/jcp.1040990107.
205. Westermarck, B. The deficient density-dependent growth control of human malignant glioma cells and virus-transformed glia-like cells in culture. *Int. J. Cancer* (1973) doi:10.1002/ijc.2910120215.
206. Macintyre, E. H., Pontén, J. & Vatter, A. E. THE ULTRASTRUCTURE OF HUMAN AND MURINE ASTROCYTES AND OF HUMAN FIBROBLASTS IN CULTURE. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A Pathol.* (1972) doi:10.1111/j.1699-0463.1972.tb02176.x.
207. Fogh, J., Fogh, J. M. & Orfeo, T. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* (1977) doi:10.1093/jnci/59.1.221.
208. Owens, R. B., Smith, H. S., Nelson-Rees, W. A. & Springer, E. L. Brief communication: Epithelial cell cultures from normal and cancerous human tissues. *J. Natl. Cancer Inst.* (1976) doi:10.1093/jnci/56.4.843.
209. Rossi, L. E. *et al.* Histone deacetylase inhibitors impair NK cell viability and effector functions through inhibition of activation and receptor expression. *J. Leukoc. Biol.* (2012) doi:10.1189/jlb.0711339.
210. Contessa, J. N., Bhojani, M. S., Freeze, H. H., Rehemtulla, A. & Lawrence, T. S. Inhibition of N-linked glycosylation disrupts receptor tyrosine kinase signaling in tumor cells. *Cancer Res.* (2008) doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6389.
211. Dricu, A., Carlberg, M., Wang, M. & Larsson, O. Inhibition of N-linked glycosylation using tunicamycin causes cell death in malignant cells: Role of down-regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor in induction of apoptosis. *Cancer Res.* (1997).
212. Jiang, M., Stanke, J. & Lahti, J. M. *The Connections Between Neural Crest Development and Neuroblastoma. Current Topics in Developmental Biology* (2011). doi:10.1016/B978-0-12-380916-2.00004-8.
213. Brodeur, G. M. Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer* (2003) doi:10.1038/nrc1014.
214. Aygun, N. Biological and Genetic Features of Neuroblastoma and Their Clinical Importance. *Curr. Pediatr. Rev.* (2018) doi:10.2174/1573396314666180129101627.
215. Shimada, H. *et al.* International Neuroblastoma Pathology Classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: A report from the Children's Cancer Group. *Cancer* (2001) doi:10.1002/1097-0142(20011101)92:9<2451::AID-CNCR1595>3.0.CO;2-S.
216. Johnsen, J. I., Dyberg, C. & Wickström, M. Neuroblastoma—A neural crest derived embryonal malignancy. *Frontiers in Molecular Neuroscience* (2019) doi:10.3389/fnmol.2019.00009.
217. Pugh, T. J. *et al.* The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat. Genet.* (2013) doi:10.1038/ng.2529.
218. Chen, Y. *et al.* Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* (2008) doi:10.1038/nature07399.
219. Chen, A. M., Trout, A. T. & Towbin, A. J. A review of neuroblastoma image-defined risk factors on magnetic resonance imaging. *Pediatric Radiology* (2018) doi:10.1007/s00247-018-4117-9.
220. Monclair, T. *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: An INRG Task Force report. *J. Clin. Oncol.* (2009) doi:10.1200/JCO.2008.16.6876.
221. Cohn, S. L. *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: An INRG task force report. *J. Clin. Oncol.* (2009) doi:10.1200/JCO.2008.16.6785.
222. Thompson, D. *et al.* Identification of patient subgroups with markedly disparate rates of MYCN amplification in neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma

- Risk Group project. *Cancer* (2016) doi:10.1002/cncr.29848.
223. Matthay, K. K. *et al.* Neuroblastoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* (2016) doi:10.1038/nrdp.2016.78.
224. Goodman, L. A. *et al.* Modulation of N-myc expression alters the invasiveness of neuroblastoma. *Clin. Exp. Metastasis* (1997) doi:10.1023/A:1018448710006.
225. Beierle, E. A. *et al.* N-MYC regulates focal adhesion kinase expression in human neuroblastoma. *J. Biol. Chem.* (2007) doi:10.1074/jbc.M701450200.
226. Zaizen, Y., Taniguchi, S., Noguchi, S. & Suita, S. The effect of N-myc amplification and expression on invasiveness of neuroblastoma cells. *J. Pediatr. Surg.* (1993) doi:10.1016/0022-3468(93)90321-B.
227. Noujaim, D., van Golen, C. M., van Golen, K. L., Grauman, A. & Feldman, E. L. N-Myc and Bcl-2 coexpression induces MMP-2 secretion and activation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* (2002) doi:10.1038/sj.onc.1205552.
228. Meitar, D., Crawford, S. E., Rademaker, A. W. & Cohn, S. L. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* (1996) doi:10.1200/JCO.1996.14.2.405.
229. Van Arendonk, K. & Chung, D. Neuroblastoma: Tumor Biology and Its Implications for Staging and Treatment. *Children* (2019) doi:10.3390/children6010012.
230. Park, J. R. *et al.* Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: Neuroblastoma. *Pediatric Blood and Cancer* (2013) doi:10.1002/pbc.24433.
231. Pinto, N. R. *et al.* Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology* (2015) doi:10.1200/JCO.2014.59.4648.
232. Berois, N. & Osinaga, E. Glycobiology of neuroblastoma: Impact on tumor behavior, prognosis, and therapeutic strategies. *Frontiers in Oncology* (2014) doi:10.3389/fonc.2014.00114.
233. Xu, H., Guo, H., Cheung, I. Y. & Cheung, N. K. V. Antitumor efficacy of anti-GD2 IgG1 Is enhanced by Fc glyco-engineering. *Cancer Immunol. Res.* (2016) doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0221.
234. Hu, Y. *et al.* N-Linked glycan profiling in neuroblastoma cell lines. *J. Proteome Res.* (2015) doi:10.1021/pr5011718.
235. Yoon, K. J. *et al.* ICAM-2 expression mediates a membrane-actin link, confers a nonmetastatic phenotype and reflects favorable tumor stage or histology in neuroblastoma. *PLoS One* (2008) doi:10.1371/journal.pone.0003629.
236. Feduska, J. M. *et al.* N-glycosylation of ICAM-2 is required for ICAM-2-mediated complete suppression of metastatic potential of SK-N-AS neuroblastoma cells. *BMC Cancer* (2013) doi:10.1186/1471-2407-13-261.
237. Glüer, S., Zense, M., Radtke, E. & Von Schweinitz, D. Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood ganglioneuroma and neuroblastoma of different histological grade and clinical stage. *Langenbeck's Arch. Surg.* (1998) doi:10.1007/s004230050145.
238. Zhang, Y. *et al.* Cloning and characterization of a new human UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, designated ppGalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc  $\alpha$ -serine/threonine antigen. *J. Biol. Chem.* (2003) doi:10.1074/jbc.M203094200.
239. Shimura, H. *et al.* Ubiquitination of a new form of  $\alpha$ -synuclein by parkin from human brain: Implications for Parkinson's disease. *Science* (80-. ). (2001) doi:10.1126/science.1060627.
240. Akita, K. *et al.* Identification of the core protein carrying the Tn antigen in mouse brain: Specific expression on syndecan-3. *Cell Struct. Funct.* (2001) doi:10.1247/csf.26.271.
241. Berois, N. *et al.* ppGalNAc-T13: A new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma. *Clin. Chem.* (2006) doi:10.1373/clinchem.2006.067975.
242. Berois, N. *et al.* GALNT9 gene expression is a prognostic marker in neuroblastoma patients. *Clin. Chem.* (2013) doi:10.1373/clinchem.2012.192328.

243. Ho, W. L. *et al.* GALNT2 suppresses malignant phenotypes through IGF-1 receptor and predicts favorable prognosis in neuroblastoma. *Oncotarget* (2014) doi:10.18632/oncotarget.2627.
244. Inamori, K. I. *et al.* High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Lett.* (2006) doi:10.1016/j.febslet.2005.12.089.
245. Ho, W. L. *et al.* B3GNT3 expression suppresses cell migration and invasion and predicts favorable outcomes in neuroblastoma. *Cancer Sci.* (2013) doi:10.1111/cas.12294.
246. Hsu, W. M. *et al.* B4GALNT3 expression predicts a favorable prognosis and suppresses cell migration and invasion via  $\beta$  1 integrin signaling in neuroblastoma. *Am. J. Pathol.* (2011) doi:10.1016/j.ajpath.2011.05.025.
247. Chang, H. H. *et al.*  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase III enhances invasive phenotypes via  $\beta$ 1-integrin and predicts poor prognosis in neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* (2013) doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2367.
248. Ley, K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecular Medicine* (2003) doi:10.1016/S1471-4914(03)00071-6.
249. Stone, J. P. & Wagner, D. D. P-selectin mediates adhesion of platelets to neuroblastoma and small cell lung cancer. *J. Clin. Invest.* (1993) doi:10.1172/JCI116654.
250. Yeh, J. C. *et al.* Novel sulfated lymphocyte homing receptors and their control by a core1 extension  $\beta$ 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Cell* (2001) doi:10.1016/S0092-8674(01)00394-4.
251. Mitoma, J. *et al.* Extended core 1 and core 2 branched O-glycans differentially modulate sialyl Lewis x-type L-selectin ligand activity. *J. Biol. Chem.* (2003) doi:10.1074/jbc.M212756200.
252. Anugraham, M. *et al.* Specific glycosylation of membrane proteins in epithelial ovarian cancer cell lines: Glycan structures reflect gene expression and DNA methylation status. *Mol. Cell. Proteomics* (2014) doi:10.1074/mcp.M113.037085.
253. Li, Y. & Seto, E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2016) doi:10.1101/cshperspect.a026831.
254. Keshelava, N. *et al.* Histone deacetylase 1 gene expression and sensitization of multidrug-resistant neuroblastoma cell lines to cytotoxic agents by depsipeptide. *J. Natl. Cancer Inst.* (2007) doi:10.1093/jnci/djm044.
255. Oehme, I. *et al.* Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clin. Cancer Res.* (2009) doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0684.
256. Lin, K. T. *et al.* HDAC inhibitors augmented cell migration and metastasis through induction of PKCs leading to identification of low toxicity modalities for combination cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* (2012) doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0633.
257. Montgomery, M. R. & Hull, E. E. Alterations in the glycome after HDAC inhibition impact oncogenic potential in epigenetically plastic SW13 cells. *BMC Cancer* (2019) doi:10.1186/s12885-018-5129-4.
258. Knoepfler, P. S. *et al.* Myc influences global chromatin structure. *EMBO J.* (2006) doi:10.1038/sj.emboj.7601152.
259. He, S., Liu, Z., Oh, D. Y. & Thiele, C. J. MYCN and the epigenome. *Frontiers in Oncology* (2013) doi:10.3389/fonc.2013.00001.
260. Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro. Oncol.* **18**, v1–v75 (2016).
261. Dunn, G. P. *et al.* Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev.* (2012) doi:10.1101/gad.187922.112.
262. Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* (2007) doi:10.1007/s00401-007-0243-4.
263. Bonavia, R., Inda, M. D. M., Cavenee, W. K. & Furnari, F. B. Heterogeneity maintenance

- in glioblastoma: A social network. *Cancer Research* (2011) doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0153.
264. Dong, X. *et al.* Survival trends of grade I, II, and III astrocytoma patients and associated clinical practice patterns between 1999 and 2010: A SEER-based analysis. *Neuro-Oncology Pract.* (2014) doi:10.1093/nop/npv016.
265. Preusser, M. *et al.* Current concepts and management of glioblastoma. *Ann. Neurol.* **70**, 9–21 (2011).
266. Wen, P. Y. & Kesari, S. Malignant gliomas in adults. *New England Journal of Medicine* (2008) doi:10.1056/NEJMra0708126.
267. Sasaki, H. & Yoshida, K. Treatment recommendations for adult patients with diffuse gliomas of grades II and III according to the new WHO classification in 2016. *Neurologia Medico-Chirurgica* (2017) doi:10.2176/nmc.ra.2017-0071.
268. Kirkpatrick, J. P. & Sampson, J. H. Recurrent malignant gliomas. *Seminars in Radiation Oncology* (2014) doi:10.1016/j.semradonc.2014.06.006.
269. Tanase, C. *et al.* Anti-cancer Therapies in High Grade Gliomas. *Curr. Proteomics* (2013) doi:10.2174/1570164611310030007.
270. Jain, K. K. A critical overview of targeted therapies for glioblastoma. *Frontiers in Oncology* (2018) doi:10.3389/fonc.2018.00419.
271. Moskal, J. R., Kroes, R. A. & Dawson, G. The glycobiology of brain tumors: Disease relevance and therapeutic potential. *Expert Review of Neurotherapeutics* (2009) doi:10.1586/ern.09.105.
272. Suzuki, M. *et al.* Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology* (2005) doi:10.1093/glycob/cwi071.
273. Amoureux, M. C. *et al.* Polysialic acid neural cell adhesion molecule (psa-ncam) is an adverse prognosis factor in glioblastoma, and regulates olig2 expression in glioma cell lines. *BMC Cancer* (2010) doi:10.1186/1471-2407-10-91.
274. Yamamoto, H., Oviedo, A., Sweeley, C., Saito, T. & Moskal, J. R.  $\alpha$ 2, 6-sialylation of cell-surface N-glycans inhibits glioma formation in vivo. *Cancer Res.* (2001).
275. Veillon, L., Fakih, C., Abou-El-Hassan, H., Kobeissy, F. & Mechref, Y. Glycosylation Changes in Brain Cancer. *ACS Chemical Neuroscience* (2018) doi:10.1021/acscemneuro.7b00271.
276. Takashima, S., Tsuji, S. & Tsujimoto, M. Characterization of the second type of human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase (ST6Gal II), which sialylates Galbeta 1,4GlcNAc structures on oligosaccharides preferentially. *J. Biol. Chem.* (2002) doi:10.1074/jbc.M206808200.
277. Yamamoto, H. *et al.*  $\alpha$ 2,3-Sialyltransferase mRNA and  $\alpha$ 2,3-linked glycoprotein sialylation are increased in malignant gliomas. *Brain Res.* (1997) doi:10.1016/S0006-8993(97)00241-2.
278. Xu, S. *et al.* Over-expression of  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase I, II, and V in human astrocytoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (2001) doi:10.1007/s004320100246.
279. Tsuchiya, N. *et al.* Isolation and characterization of an N-linked oligosaccharide that is increased in glioblastoma tissue and cell lines. *Int. J. Oncol.* (2005) doi:10.3892/ijo.27.5.1231.
280. Yamamoto, H. *et al.*  $\beta$ 1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas: Implications for a role in regulating invasivity. *Cancer Res.* (2000).
281. Sasai, K. *et al.* O6-methylguanine-DNA methyltransferase is downregulated in transformed astrocyte cells: Implications for anti-glioma therapies. *Mol. Cancer* (2007) doi:10.1186/1476-4598-6-36.
282. Furukawa, J. I. *et al.* Comprehensive glycomics of a multistep human brain tumor model reveals specific glycosylation patterns related to malignancy. *PLoS One* (2015) doi:10.1371/journal.pone.0128300.
283. Kroes, R. A., Dawson, G. & Moskal, J. R. Focused microarray analysis of glyco-gene expression in human glioblastomas. *J. Neurochem.* (2007) doi:10.1111/j.1471-

- 4159.2007.04780.x.
284. Ludwig, K. & Kornblum, H. I. Molecular markers in glioma. *Journal of Neuro-Oncology* (2017) doi:10.1007/s11060-017-2379-y.
  285. Kroes, R. A. & Moskal, J. R. The role of DNA methylation in ST6Gal1 expression in gliomas. *Glycobiology* (2016) doi:10.1093/glycob/cww058.
  286. Park, Y. E. *et al.* Identification of Plasma Membrane Glycoproteins Specific to Human Glioblastoma Multiforme Cells Using Lectin Arrays and LC-MS/MS. *Proteomics* (2018) doi:10.1002/pmic.201700302.
  287. Yaji, S. *et al.* Major glycan structure underlying expression of the Lewis X epitope in the developing brain is O-mannose-linked glycans on phosphacan/RPTP $\beta$ . *Glycobiology* (2015) doi:10.1093/glycob/cwu118.
  288. Hassani, Z. *et al.* Phostine PST3.1a targets MGAT5 and inhibits glioblastoma-initiating cell invasiveness and proliferation. *Mol. Cancer Res.* (2017) doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0120.
  289. Rooprai, H. K. *et al.* Evaluation of the effects of swainsonine, captopril, tangeretin and nobiletin on the biological behaviour of brain tumour cells in vitro. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* (2001) doi:10.1046/j.0305-1846.2000.00298.x.
  290. Hussain, M. R. M., Hoessli, D. C. & Fang, M. N-acetylgalactosaminyltransferases in cancer. *Oncotarget* (2016) doi:10.18632/oncotarget.10042.
  291. Hegi, M. E. *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* (2005) doi:10.1056/NEJMoa043331.
  292. Giannini, C. *et al.* Patient tumor EGFR and PDGFRA gene amplifications retained in an invasive intracranial xenograft model of glioblastoma multiforme. *Neuro. Oncol.* (2005) doi:10.1215/s1152851704000821.
  293. Kim, Y. Z. Altered Histone Modifications in Gliomas. *Brain Tumor Res. Treat.* (2014) doi:10.14791/btrt.2014.2.1.7.
  294. Lucio-Eterovic, A. K. B. *et al.* Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: Class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas. *BMC Cancer* (2008) doi:10.1186/1471-2407-8-243.
  295. Mereiter, S., Balmaña, M., Campos, D., Gomes, J. & Reis, C. A. Glycosylation in the Era of Cancer-Targeted Therapy: Where Are We Heading? *Cancer Cell* (2019) doi:10.1016/j.ccell.2019.06.006.
  296. Wei, S. C., Duffy, C. R. & Allison, J. P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discovery* (2018) doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0367.
  297. Li, C. W. *et al.* Eradication of Triple-Negative Breast Cancer Cells by Targeting Glycosylated PD-L1. *Cancer Cell* (2018) doi:10.1016/j.ccell.2018.01.009.
  298. Lee, H. H. *et al.* Removal of N-Linked Glycosylation Enhances PD-L1 Detection and Predicts Anti-PD-1/PD-L1 Therapeutic Efficacy. *Cancer Cell* (2019) doi:10.1016/j.ccell.2019.06.008.
  299. Salatino, M., Girotti, M. R. & Rabinovich, G. A. Glycans Pave the Way for Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Cell* (2018) doi:10.1016/j.ccell.2018.01.015.
  300. Wang, M. *et al.* Identification of a monoclonal antibody that targets PD-1 in a manner requiring PD-1 Asn58 glycosylation. *Commun. Biol.* (2019) doi:10.1038/s42003-019-0642-9.
  301. Liu, C. A. *et al.* Migration/invasion of malignant gliomas and implications for therapeutic treatment. *International Journal of Molecular Sciences* (2018) doi:10.3390/ijms19041115.
  302. Lund-Johansen, M. *et al.* Effect of Epidermal Growth Factor on Glioma Cell Growth, Migration, and Invasion in Vitro. *Cancer Res.* (1990).
  303. Rijken, P. J., Hage, W. J., Van Bergen En Henegouwen, P. M. P. & Verkleij Boonstra, A. J. Epidermal growth factor induces rapid reorganization of the actin microfilament system in human A431 cells. *J. Cell Sci.* (1991).

304. Chan, A. Y., Bailly, M., Zebda, N., Segall, J. E. & Condeelis, J. S. Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. *J. Cell Biol.* (2000) doi:10.1083/jcb.148.3.531.
305. Saadeh, F. S., Mahfouz, R. & Assi, H. I. Egfr as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. *International Journal of Biological Markers* (2018) doi:10.5301/ijbm.5000301.
306. Hatanpaa, K. J., Burma, S., Zhao, D. & Habib, A. A. Epidermal growth factor receptor in glioma: Signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance1. *Neoplasia* (2010) doi:10.1593/neo.10688.
307. Shinjima, N. *et al.* Prognostic Value of Epidermal Growth Factor Receptor in Patients with Glioblastoma Multiforme. *Cancer Res.* (2003).
308. Andersson, U. *et al.* Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol.* (2004) doi:10.1007/s00401-004-0875-6.
309. Yewale, C., Baradia, D., Vhora, I., Patil, S. & Misra, A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies. *Biomaterials* (2013) doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.100.
310. Westphal, M., Maire, C. L. & Lamszus, K. EGFR as a Target for Glioblastoma Treatment: An Unfulfilled Promise. *CNS Drugs* (2017) doi:10.1007/s40263-017-0456-6.
311. Cummings, R. D., Soderquist, A. M. & Carpenter, G. The oligosaccharide moieties of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. Presence of complex-type N-linked chains that contain terminal N-acetylgalactosamine residues. *J. Biol. Chem.* (1985).
312. Gamou, S. & Shimizu, N. Glycosylation of the epidermal growth factor receptor and its relationship to membrane transport and ligand binding. *J. Biochem.* (1988) doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122478.
313. Zhen, Y., Caprioli, R. M. & Staros, J. V. Characterization of glycosylation sites of the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* (2003) doi:10.1021/bi027101p.
314. Tsuda, T., Ikeda, Y. & Taniguchi, N. The Asn-420-linked sugar chain in human epidermal growth factor receptor suppresses ligand-independent spontaneous oligomerization: Possible role of a specific sugar chain in controllable receptor activation. *J. Biol. Chem.* (2000) doi:10.1074/jbc.M003400200.
315. Soderquist, A. M. & Carpenter, G. Glycosylation of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. The contribution of carbohydrate to receptor function. *J. Biol. Chem.* (1984).
316. Wang, X. *et al.* Core fucosylation regulates epidermal growth factor receptor-mediated intracellular signaling. *J. Biol. Chem.* (2006) doi:10.1074/jbc.M510893200.
317. Gu, J. *et al.*  $\beta$ 1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase III down-regulates neurite outgrowth induced by costimulation of epidermal growth factor and integrins through the Ras/ERK signaling pathway in PC12 cells. *Glycobiology* (2004) doi:10.1093/glycob/cwh016.
318. Ferreira, I. G. *et al.* Glycosylation as a main regulator of growth and death factor receptors signaling. *International Journal of Molecular Sciences* (2018) doi:10.3390/ijms19020580.
319. Guo, H. B., Johnson, H., Randolph, M., Lee, I. & Pierce, M. Knockdown of GnT-Va expression inhibits ligand-induced downregulation of the epidermal growth factor receptor and intracellular signaling by inhibiting receptor endocytosis. *Glycobiology* (2009) doi:10.1093/glycob/cwp023.
320. Huang, X. *et al.* Inhibition of N-acetylglucosaminyltransferase v enhances the cetuximab-induced radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells likely through EGFR N-glycan alterations. *Glycobiology* (2017) doi:10.1093/glycob/cwx046.
321. Liu, Y. C. *et al.* Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2011) doi:10.1073/pnas.1107385108.
322. Stroop, C. J. M. *et al.* Characterization of the carbohydrate chains of the secreted form of the human epidermal growth factor receptor. *Glycobiology* (2000)

- doi:10.1093/glycob/10.9.901.
323. Rebbaa, A. *et al.* Gene transfection-mediated overexpression of  $\beta$ 1,4-N-acetylglucosamine bisecting oligosaccharides in glioma cell line U373 MG inhibits epidermal growth factor receptor function. *J. Biol. Chem.* (1997) doi:10.1074/jbc.272.14.9275.
  324. Barczyk, M., Carracedo, S. & Gullberg, D. Integrins. *Cell and Tissue Research* (2010) doi:10.1007/s00441-009-0834-6.
  325. Hehlhans, S., Haase, M. & Cordes, N. Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (2007) doi:10.1016/j.bbcan.2006.09.001.
  326. Nemeth, J. A. *et al.* Alpha-v integrins as therapeutic targets in oncology. *Cancer Investigation* (2007) doi:10.1080/07357900701522638.
  327. *Encyclopedia of Signaling Molecules. Encyclopedia of Signaling Molecules* (2018). doi:10.1007/978-3-319-67199-4.
  328. Gladson, C. L., Wilcox, J. N., Sanders, L., Gillespie, G. Y. & Cheresh, D. A. Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors. *J. Cell Sci.* (1995).
  329. Roth, P. *et al.* Integrin control of the transforming growth factor- $\beta$  pathway in glioblastoma. *Brain* (2013) doi:10.1093/brain/aws351.
  330. Schittenhelm MD, J. *et al.* Longitudinal Expression Analysis of [alpha]v Integrins in Human Gliomas Reveals Upregulation of Integrin [alpha]v[Beta]3 as a Negative Prognostic Factor. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* (2013).
  331. Malric, L. *et al.* Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: An update. *Oncotarget* (2017) doi:10.18632/oncotarget.20372.
  332. Reardon, D. A. *et al.* Cilengitide: An RGD pentapeptide  $\alpha$ v $\beta$ 3 and  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin inhibitor in development for glioblastoma and other malignancies. *Futur. Oncol.* (2011) doi:10.2217/fon.11.8.
  333. Scaringi, C., Minniti, G., Caporello, P. & Enrici, R. M. Integrin inhibitor cilengitide for the treatment of glioblastoma: A brief overview of current clinical results. *Anticancer Research* (2012).
  334. O'Day, S. *et al.* A randomised, phase II study of intetumumab, an anti- $\alpha$  v-integrin mAb, alone and with dacarbazine in stage IV melanoma. *Br. J. Cancer* (2011) doi:10.1038/bjc.2011.183.
  335. Bateman, A. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* (2019) doi:10.1093/nar/gky1049.
  336. Dong, X. *et al.* Force interacts with macromolecular structure in activation of TGF- $\beta$ . *Nature* (2017) doi:10.1038/nature21035.
  337. Wollscheid, B. *et al.* Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nat. Biotechnol.* (2009) doi:10.1038/nbt.1532.
  338. Chen, R. *et al.* Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *J. Proteome Res.* (2009) doi:10.1021/pr8008012.
  339. Hu, Y., Shah, P., Clark, D. J., Ao, M. & Zhang, H. Reanalysis of Global Proteomic and Phosphoproteomic Data Identified a Large Number of Glycopeptides. *Anal. Chem.* (2018) doi:10.1021/acs.analchem.8b01137.
  340. Pocheć, E. *et al.* Aberrant glycosylation of  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin is associated with melanoma progression. *Anticancer Res.* (2015).
  341. Lehmann, M., El Battari, A., Abadie, B., Martin, J. M. & Marvaldi, J. Role of alpha v beta 5 and alpha v beta 6 integrin glycosylation in the adhesion of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29-D4). *J Cell Biochem* (1996).
  342. Sigrist, C. J. A. *et al.* New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.*

- (2013) doi:10.1093/nar/gks1067.
343. Gavel, Y. & Heijne, G. Von. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated asn-x-thr/ser acceptor sites: Implications for protein engineering. *Protein Eng. Des. Sel.* (1990) doi:10.1093/protein/3.5.433.
344. Lin, W. L., Lin, Y. S., Shi, G. Y., Chang, C. F. & Wu, H. L. Lewisy promotes migration of oral cancer cells by glycosylation of epidermal growth factor receptore0120162. *PLoS One* (2015) doi:10.1371/journal.pone.0120162.
345. Azimzadeh Irani, M., Kannan, S. & Verma, C. Role of N-glycosylation in EGFR ectodomain ligand binding. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* (2017) doi:10.1002/prot.25314.
346. Zhang, H., Li, X. jun, Martin, D. B. & Aebersold, R. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* (2003) doi:10.1038/nbt827.
347. Riley, N. M., Hebert, A. S., Westphall, M. S. & Coon, J. J. Capturing site-specific heterogeneity with large-scale N-glycoproteome analysis. *Nat. Commun.* (2019) doi:10.1038/s41467-019-09222-w.
348. Muchmore, E. A., Milewski, M., Varki, A. & Diaz, S. Biosynthesis of N-glycolyneuraminic acid. The primary site of hydroxylation of N-acetylneuraminic acid is the cytosolic sugar nucleotide pool. *J. Biol. Chem.* (1989).
349. Blanco, R. *et al.* Prognostic Significance of N-Glycolyl GM3 Ganglioside Expression in Non-Small Cell Lung Carcinoma Patients: New Evidences. *Patholog. Res. Int.* (2015) doi:10.1155/2015/132326.
350. Carr, A. *et al.* A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* (2000) doi:10.1089/02724570050109639.
351. Scursioni, A. M. *et al.* Detection of N-glycolyl GM3 ganglioside in neuroectodermal tumors by immunohistochemistry: An attractive vaccine target for aggressive pediatric cancer. *Clin. Dev. Immunol.* (2011) doi:10.1155/2011/245181.
352. Malykh, Y. N., Schauer, R. & Shaw, L. N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie* (2001) doi:10.1016/S0300-9084(01)01303-7.
353. Davies, L. R. L. & Vark, A. Why Is N-glycolylneuraminic acid rare in the vertebrate brain? *Top. Curr. Chem.* (2013) doi:10.1007/128\_2013\_419.
354. Subedi, G. P. & Barb, A. W. CD16a with oligomannose-type N-glycans is the only 'low-affinity' Fc  $\gamma$  receptor that binds the IgG crystallizable fragment with high affinity in vitro. *J. Biol. Chem.* (2018) doi:10.1074/jbc.RA118.004998.

Anexo





Monosacárido	Abreviatura	Símbolo
Arabinosa	Ara	★
Fructosa	Fru	⬠
Fucosa	Fuc	▲
Galactosa	Gal	●
Galactosamina	GalN	◻
N-Acetilgalactosamina	GalNAc	■
Glucosa	Glc	●
Glucosamina	GlcN	◻
N-Acetilglucosamina	GlcNAc	■
Ácido glucurónico	GlcA	◊
Manosa	Man	●
Ácido murámico	Mur	⬡
Ácido siálico	Sia	◆
Ácido N-Acetilneuramínico (Ácido siálico)	Neu5Ac	◆
Ácido N-Glicolilneuramínico (Ácido siálico)	Neu5Gc	◊
Ramnosa	Rha	▲
Ribosa	Rib	★
Xilosa	Xyl	★

**Tabla Suplementaria 1 | Monosacáridos comunes en mamíferos.** Nomenclatura de símbolos para la representación gráfica de glicanos. *Glycobiology* 25: 1323-1324, 2015.

Monosacárido	Forma activada
Glc Gal GlcNAc GalNAc GlcA Xyl	UDP-carbohidrato
Man Fuc	GDP-carhohidrato
Sia	CMP-Sia

**Tabla Suplementaria 2** | Forma activada de donantes de monosacáridos en células animales. Glycobiology 25: 1323-1324, 2015. UDP, uridina difosfato. GDP, guanosina difosfato. Citidina monofosfato.

Glicosiltransferasas		
Actividad	Nombre enzima	Gen
$\alpha$ 1,2-fucosiltransferasa	FucT1	FUT1
	FucT2	FUT2
$\alpha$ 1,3-fucosiltransferasa	FucT3	FUT3
	FucT4	FUT4
	FucT6	FUT6
	FucT7	FUT7
	FucT9	FUT9
	FucT11	FUT11
$\alpha$ 1,4-fucosiltransferasa	FucT3	FUT3
$\alpha$ 1,6-N-fucosiltransferasa	FucT8	FUT8
$\alpha$ 2,3-sialiltransferasa	ST3Gal3	ST3GAL3
	ST3Gal4	ST3GAL4
	ST3Gal6	ST3GAL6
$\alpha$ 2,6-sialiltransferasa	ST6Gal1	ST6GAL1
Polipéptido GalNAc transferasa	GalNAcT	GALNT
Core 2 $\beta$ 1-6 N-acetil-glucosaminiltransferasa 1	C2GnT1	C2GNT1
N-acetil-glucosaminiltransferasa	GnT-III	MGAT3
	GnT-V	MGAT5
$\beta$ 1,3-galactosiltransferasa	B3GalT	B3GALT
$\beta$ 1,4-galactosiltransferasa	B4GalT	B4GALT
$\beta$ 1,3-glucosaminiltransferasa	B3GnT	B3GNT
$\beta$ 1,4-galactosaminiltransferasa	B4GalnT	B4GALNT

**Tabla Suplementaria 3** | Nomenclatura utilizada para las glicosiltransferasas.

Análisis de la glicosilación de Integrina $\alpha$ v por EM					
Péptido/Posición Asn	Glicoforma	Carga	m/z obs.	m/z calc	Error
ANTTQPGIVEGGQVLK	HexNAc(1)	2	1814,950	1814,949	0,1
<b>Asn74</b>	HexNAc(1)Fuc(1)	3	1961,008	1961,007	0,4
	HexNAc(2)	3	2018,029	2018,029	0,0
	HexNAc(2)Hex(10)	3	3638,559	3638,557	0,4
	HexNAc(2)Hex(3)	3	2504,188	2504,187	0,3
	HexNAc(2)Hex(4)	2	2666,240	2666,240	0,0
	HexNAc(2)Hex(4)Fuc(1)	3	2812,298	2812,298	0,0
	HexNAc(2)Hex(5)	3	2828,292	2828,293	-0,4
	HexNAc(2)Hex(6)	2	2990,346	2990,346	0,2
	HexNAc(2)Hex(7)	2	3152,399	3152,399	0,2
	HexNAc(2)Hex(8)	3	3314,447	3314,451	-1,2
	HexNAc(2)Hex(9)	3	3476,505	3476,504	0,2
	HexNAc(3)Hex(4)	3	2869,314	2869,319	-1,8
	HexNAc(3)Hex(4)Fuc(1)	3	3015,381	3015,377	1,2
	HexNAc(3)Hex(4)Fuc(1)NeuAc(1)	3	3306,476	3306,473	1,0
	HexNAc(3)Hex(4)NeuAc(1)	3	3160,425	3160,415	3,1
	HexNAc(3)Hex(5)Fuc(1)	3	3177,433	3177,430	0,9
	HexNAc(3)Hex(5)NeuAc(1)	3	3322,472	3322,468	1,1
	HexNAc(3)Hex(6)	3	3193,427	3193,425	0,4
	HexNAc(3)Hex(6)Fuc(1)	3	3339,486	3339,483	0,9
	HexNAc(3)Hex(6)Fuc(1)NeuAc(1)	3	3630,581	3630,578	0,6
	HexNAc(3)Hex(6)NeuAc(1)	3	3484,521	3484,521	0,3
	HexNAc(4)Hex(4)	3	3072,403	3072,399	1,4
	HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1)	3	3218,464	3218,457	2,1
	HexNAc(4)Hex(4)Fuc(2)NeuAc(1)	3	3655,595	3655,610	-4,2
	HexNAc(4)Hex(4)NeuGc(1)	3	3379,487	3379,489	-0,7
	HexNAc(4)Hex(5)	3	3234,457	3234,452	1,6
	HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)	3	3380,513	3380,510	0,9
	HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(1)	3	3671,607	3671,605	0,6
	HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2)	4	3962,708	3962,700	1,9
	HexNAc(4)Hex(5)NeuAc(1)	3	3525,563	3525,547	4,6
	HexNAc(4)Hex(5)NeuGc(1)	3	3541,551	3541,542	2,6
	HexNAc(4)Hex(6)	3	3396,514	3396,505	2,9
	HexNAc(4)Hex(6)NeuAc(1)	3	3687,611	3687,600	2,9
	HexNAc(5)Hex(5)NeuAc(2)	3	4019,732	4019,722	2,5
SPSHSKNMTISR	HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(1)	4	3420,398	3420,399	-0,2
<b>Asn554</b>	HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2)	4	3711,497	3711,494	0,7
	HexNAc(5)Hex(5)NeuAc(2)	3	3768,522	3768,516	1,6
	HexNAc(5)Hex(6)Fuc(1)NeuAc(2)	4	4076,631	4076,626	1,1
	HexNAc(5)Hex(6)Fuc(1)NeuAc(3)	4	4366,736	4367,722	4,0
<b>NMTISR</b>	HexNAc(2)Hex(10)	2	2764,049	2764,048	0,2
<b>Asn554</b>	HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2)	3	3088,195	3088,191	1,3

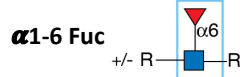
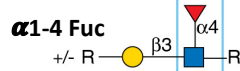
	HexNAc(5)Hex(6)Fuc(3)NeuAc(1)	3	3454,337	3454,344	-2,1
	HexNAc(6)Hex(4)NeuAc(1)	3	2895,148	2895,144	1,3
	HexNAc(6)Hex(4)NeuAc(2)	3	3186,247	3186,239	2,2
	HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(1)NeuGc(1)	2	3088,190	3088,191	-0,6
	HexNAc(4)Hex(6)NeuAc(1)	3	2797,105	2797,096	3,2
	HexNAc(5)Hex(5)NeuAc(1)NeuGc(1)	3	3145,214	3145,213	0,3
	HexNAc(5)Hex(5)NeuAc(2)	3	3129,234	3129,218	5,0
	HexNAc(5)Hex(6)Fuc(1)NeuAc(1)	3	3146,224	3146,233	-3,0
	HexNAc(6)Hex(6)NeuAc(1)NeuGc(1)	3	3510,354	3510,345	2,4
	HexNAc(6)Hex(6)NeuAc(2)	3	3494,354	3494,350	1,1
TAADTTGLQPILNQF- TPANISR	HexNAc(1)	3	2532,294	2532,294	-0,1
<b>Asn 615</b>	HexNAc(2)	3	2735,382	2735,373	3,1
	HexNAc(2)Hex(10)	3	4355,902	4355,902	0,2
	HexNAc(2)Hex(4)	3	3383,580	3383,585	-1,3
	HexNAc(2)Hex(5)	3	3545,649	3545,638	3,1
	HexNAc(2)Hex(7)	3	3869,748	3869,743	1,1
	HexNAc(2)Hex(8)	4	4031,800	4031,796	0,9
	HexNAc(2)Hex(9)	4	4193,850	4193,849	0,4
	HexNAc(4)Hex(3)Fuc(3)	4	4065,860	4065,864	-1,1
	HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1)NeuAc(1)	4	4227,899	4226,897	-0,2
	HexNAc(5)Hex(3)Fuc(1)NeuAc(1)	3	4267,906	4267,923	-4,1
TENQTR	HexNAc(3)Hex(6)NeuAc(1)	4	2621,008	2621,009	-0,5
<b>Asn 704</b>	HexNAc(5)Hex(5)NeuAc(2)	3	3156,221	3156,210	3,4
	HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2)	3	3099,196	3099,189	2,4
ISLQTTEKNDTVAG- QGER	HexNAc(1)	3	2237,092	2237,089	1,3
<b>Asn 875</b>	HexNAc(2)Hex(7)	3	3574,544	3574,538	1,6
	HexNAc(2)Hex(8)	3	3736,594	3736,591	0,7
	HexNAc(2)Hex(9)	4	3898,648	3898,644	0,9
	HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(1)	4	4093,750	4093,745	1,2
	HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2)	3	4383,840	4384,840	0,6
	HexNAc(5)Hex(5)NeuAc(2)	4	4441,859	4441,862	-0,6
	HexNAc(5)Hex(6)Fuc(1)NeuAc(2)	4	4749,978	4749,972	1,3
	HexNAc(5)Hex(6)Fuc(1)NeuAc(3)	4	5040,078	5041,068	2,7
	HexNAc(6)Hex(7)Fuc(1)NeuAc(1)	4	4824,013	4824,009	0,8
	HexNAc(6)Hex(7)Fuc(1)NeuAc(3)	4	5405,186	5406,200	-1,9
SLLWTETFM*EN- QNHSYSLK	HexNAc(2)Hex(8)	4	4288,809	4288,811	-0,3
<b>Asn 945</b>	HexNAc(2)Hex(9)	4	4450,860	4450,864	-0,8
ENQNHSYSLK	HexNAc(2)Hex(6)	3	2598,049	598,046	1,1
<b>Asn 945</b>	HexNAc(2)Hex(9)	3	3084,208	3084,204	1,3

**Tabla Suplementaria 4 | Glicopéptidos identificados para Iαv proveniente de LN229.** Parámetros de EM. Fragmentación HCD [M+H]<sup>+</sup>. Las masas identificadas en el análisis de EM fueron comparados con los valores teóricos de las estructuras para el cálculo del error.

<b>ANTTQPGIVEGGQVLK</b> <b>Asn74</b>	HexNAc(2)Hex(9)	3	1159.5056	1159.5062	0.5
	HexNAc(2)Hex(8)	3	1105.4904	1105.4886	-1.6
	HexNAc(2)Hex(7)	3	1051.4688	1051.4710	2.1
<b>ISSLQTTEKNDTVAGQGER</b> <b>Asn875</b>	HexNAc(2)Hex(10)	3	1354.2418	1354.2371	-3.5
	HexNAc(2)Hex(9)	3	1300.2217	1300.2195	-1.7
	HexNAc(2)Hex(8)	4	934.9016	934.9032	1.7

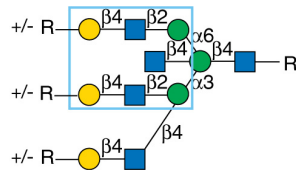
**Tabla Suplementaria 5 | Glicopéptidos identificados para Iav proveniente de SW1088.** Parámetros de EM. Fragmentación HCD [M+H]<sup>+</sup>. Las masas identificadas en el análisis de EM fueron comparados con los valores teóricos de las estructuras para el cálculo del error.

### Aleuria aurantia (AAL)



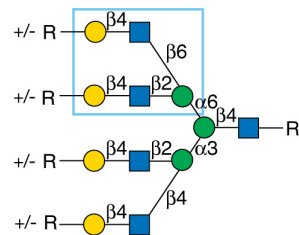
### Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)

N-glicanos di-,  
Tri-antenarios  
bisectados



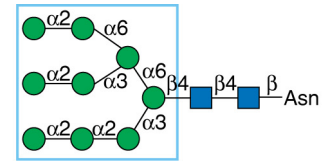
### Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L)

N-glicanos tri-,  
Tetra-antenarios  
con ramificaciones  
 $\alpha$ 2,6 GlcNAc

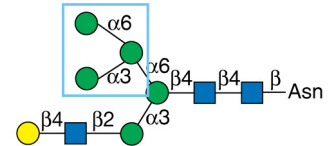


### ConcanavalinaA (ConA)

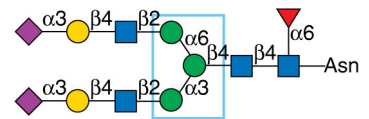
N-glicanos oligomanosa  
Afinidad Alta



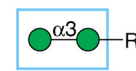
N-glicanos Híbridos  
Afinidad Alta



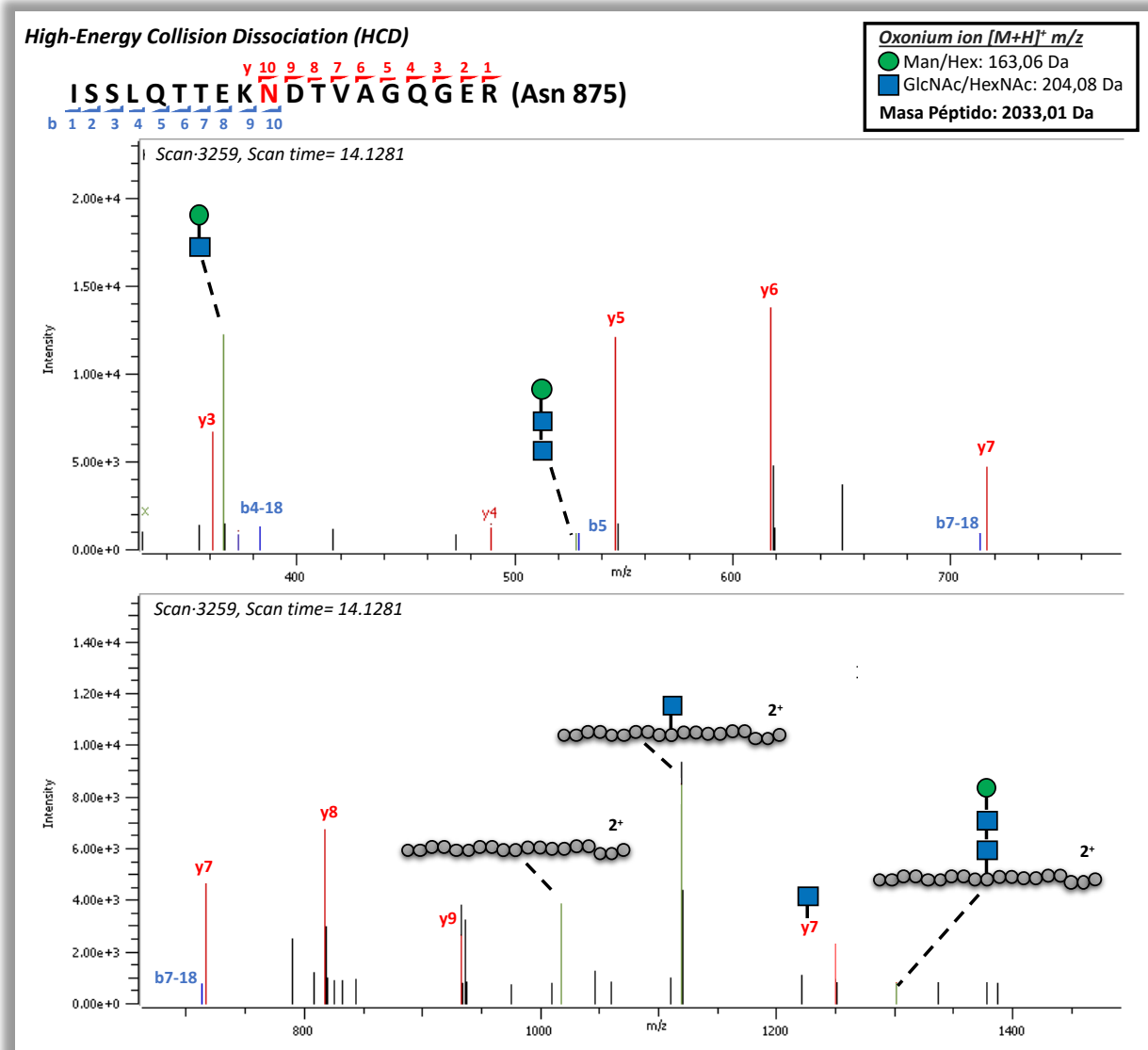
N-glicanos bi-antenarios  
complejos  
Afinidad Baja



Manosa  $\alpha$ 1-3 terminal  
Afinidad Baja



**Figura Suplementaria 1 | Lectinas y sus afinidades.** Representación gráfica de las estructuras de glicanos reconocidas por las lectinas vegetales AAL, PHA-E, PHA-L y ConA. Modificado de “Essentials of Glycobiology”, tercera edición.



**Figura Suplementaria 2 | Análisis de la glicosilación del péptido ISSLQTEKNDTVAGQGER correspondiente a Iαv por EM.** Para EM se utilizó un espectrómetro Q-Exactive. El equipo cuenta con una celda de HCD (*High Collision Dissociation*), generando fragmentos y/b, y un analizador Orbitrap.  $[M+H]^+$  en el  $m/z$ : HexNAc (204,08), Hex (163,06), Fuc (147,06), NeuAc (292,10), NeuGc (308,08). HexNAc representa GlcNAc o GalNAc, mientras que Hex representa Man, Glc o Gal. Las masas identificadas en el análisis de EM fueron comparados con los valores teóricos de las estructuras para el cálculo del error.



