

Tesis Doctoral

Interacción entre lectinas y glicanos en procesos de neovascularización tumoral: implicancias en estrategias de inmunoterapia en cáncer

Croci Russo, Diego Omar

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Croci Russo, Diego Omar. (2011). Interacción entre lectinas y glicanos en procesos de neovascularización tumoral: implicancias en estrategias de inmunoterapia en cáncer. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Croci Russo, Diego Omar. "Interacción entre lectinas y glicanos en procesos de neovascularización tumoral: implicancias en estrategias de inmunoterapia en cáncer". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



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

**INTERACCIÓN ENTRE LECTINAS Y GLICANOS EN PROCESOS DE
NEOVASCULARIZACIÓN TUMORAL: IMPLICANCIAS EN ESTRATEGIAS DE
INMUNOTERAPIA EN CANCER**

Tesis presentada para optar al título de Doctor

de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Diego Omar Croci Russo

Director: Dr. Gabriel Adrián Rabinovich.

Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Clavo

Lugares de trabajo:

- Laboratorio de Inmunopatología. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).
- Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, Marzo de 2011.

RESUMEN

INTERACCIÓN ENTRE LECTINAS Y GLICANOS EN PROCESOS DE NEOVASCULARIZACIÓN TUMORAL: IMPLICANCIAS EN ESTRATEGIAS DE INMUNOTERAPIA EN CANCER

Uno de los desafíos de la biología tumoral consiste en la búsqueda de mecanismos que vinculen fenómenos de hipoxia y angiogénesis. En función del papel crítico de galectina-1 (Gal1) en la progresión tumoral investigamos su relevancia en fenómenos de neovascularización. El análisis funcional del perfil de glicosilación de células endoteliales reveló una amplificación preferencial del repertorio de glicanos críticos para la unión de Gal1 en células endoteliales expuestas a estímulos tolerogénicos, proliferativos e hipóxicos típicos de microambientes tumorales. De acuerdo a estos hallazgos, observamos que Gal1 interacciona con células endoteliales principalmente en *N*-glicanos promoviendo proliferación, migración/invasión y tubulogénesis a través de mecanismos dependientes de las vías de señalización de VEGFR2, PI3K-Akt y Erk1/2, mimetizando de este modo el efecto biológico del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Por otro lado, verificamos que Gal1 se encuentra asociada a *N*-glicanos presentes en VEGFR2 e induce su activación y segregación en estructuras tipo "*lattices*". En tal sentido, los fenómenos de migración y tubulogénesis inducidos por Gal1 fueron bloqueados al utilizar anticuerpos anti-VEGFR2 o al inhibir la disponibilidad de *N*-glicanos complejos en células endoteliales. A los fines de evaluar la regulación de la expresión de Gal1 en células tumorales se incubaron células de Sarcoma de Kaposi (KS) en condiciones de hipoxia (1% O₂), observándose un incremento marcado en la expresión de esta lectina a través de mecanismos dependientes de la activación del factor de transcripción NF- κ B y especies reactivas del oxígeno (ROS) e independientes del factor inducible por hipoxia (HIF)-1 α . Dicha expresión fue crítica para el crecimiento y la neovascularización de tumores humanos KS y murinos B16 *in vivo*. La relevancia fisiopatológica de estos hallazgos fue determinada a través de la inhibición de la

expresión de Gal1 utilizando estrategias de silenciamiento (shRNA). El bloqueo de la expresión génica de Gal1 logró inhibir la capacidad pro-angiogénica de tumores KS *in vivo* e *in vitro*. El análisis por inmunohistoquímica de diversas patologías vasculares humanas reveló que Gal1 se expresa selectivamente en patologías malignas, confirmando el impacto clínico de nuestros hallazgos. Finalmente, y con el objetivo de validar una estrategia terapéutica basada en el bloqueo de Gal1 en el microambiente tumoral, desarrollamos un panel de anticuerpos monoclonales anti-Gal1 bloqueantes los cuales lograron neutralizar los efectos pro-angiogénicos e inmunosupresores de esta lectina *in vitro* e *in vivo*. En forma notable, el bloqueo de Gal1 en tumores B16 logró remodelar la vasculatura tumoral e inducir un marcado incremento en el infiltrado inflamatorio, el cual fue capaz de montar respuestas antitumorales dependientes de células Th1 y Th17. Este efecto fue asociado no sólo al bloqueo de la capacidad inmunosupresora de Gal1 sino también a un efecto 'normalizador' sobre el endotelio permitiendo la maduración de pericitos y el influjo de células T al parénquima tumoral. En conjunto, los resultados del presente trabajo de tesis demuestran que Gal1 participaría activamente en la generación de un microambiente tumoral pro-angiogénico e inmunosupresor, en el cual la hipoxia, a través de la expresión de esta lectina y sus glicanos, modularía compartimientos inmunológicos y vasculares, favoreciendo fenómenos de angiogénesis y crecimiento tumoral. De este modo, el presente estudio permite vincular, a partir del reconocimiento de lectinas y sus ligandos específicos fenómenos de hipoxia con programas inmunológicos y de neovascularización. A su vez sugiere nuevos enfoques en el diagnóstico y tratamiento de tumores, dando luz a la primera herramienta terapéutica capaz de modular en forma específica la interacción entre Gal1 y sus glicanos interrumpiendo simultáneamente fenómenos de angiogénesis y escape tumoral.

SUMMARY

LECTIN-GLYCAN INTERACTIONS IN THE CONTROL OF TUMOR ANGIOGENESIS: IMPLICATIONS IN CANCER IMMUNOTHERAPY

Novel strategies are needed to circumvent resistance to anti-angiogenic therapies. Here we identify a glycosylation-regulated mechanism, based on arrangements of lectin-glycan lattices, which links tumor hypoxia to VEGFR2-mediated angiogenesis through HIF-1 α - and VEGF-independent pathways. Concomitant with selective remodeling of endothelial cell surface glycans, hypoxia promoted ROS/NF- κ B-dependent up-regulation of tumor-derived galectin-1 (Gal1), which signaled angiogenesis through binding to complex *N*-glycans on VEGFR2. Targeted disruption of Gal1-glycan lattices, using shRNA strategies, mAb-mediated blockade or interruption of *N*-glycan elongation, attenuated hypoxia-driven angiogenesis, while promoting pericyte maturation and vascular remodeling, thereby favoring influx and expansion of immune cells and suppression of tumor growth. Thus, hypoxia-regulated interactions between endogenous lectins and complex *N*-glycans on cognate receptors can create functional signaling clusters that substitute for canonical ligands to modulate endothelial cell biology and preserve angiogenesis. These findings highlight the versatility of endogenous lectins and the dynamics of the 'glycome' during cancer progression and provide the first evidence of a multitargeted agent capable of promoting vascular remodeling and overcoming tumor immunosuppression through specific interruption of lectin-glycan lattice formation.

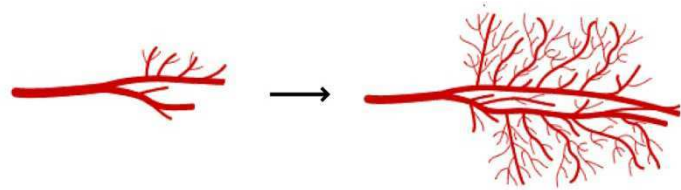
Dedicado a la memoria de mi viejo y a mis hijos

Dante y Lucio

RESUMEN	-
SUMMARY	-
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Angiogénesis en la salud y en la enfermedad: Mecanismos de neovascularización normal y tumoral, implicancias clínicas en cáncer	1
1.1.1 Mecanismos de angiogénesis fisiológica	1
1.1.2 Mecanismos de angiogénesis tumoral	4
1.1.3 Terapias anti-angiogénicas: Éxitos, fracasos y perspectivas	12
1.1.4 Mecanismos de resistencia a la terapia anti-angiogénica	17
1.1.5 Nuevos enfoques en la terapia anti-angiogénica: Normalización vascular	19
1.2 Biología tumoral y respuesta inmune	22
1.3 Glicosilación y lectinas	25
1.3.1 Vías de glicosilación: Una perspectiva funcional	25
1.3.2 Galectinas	28
1.3.3 Lectinas y glicanos en procesos de neovascularización	33
2. OBJETIVOS	37
3. RESULTADOS	38
3.1 La glicosilación regula fenómenos de biología vascular a través de la interacción entre lectinas y glicanos	38
3.1.1 Glicosilación diferencial de CEs en microambientes tolerogénicos e inflamatorios	38
3.1.2 Gal1 modula la biología de CEs a través de la interacción con glicanos específicos	44
3.1.3 Circuitos tolerogénicos, angiogénesis y Gal1	47
3.2 Gal1 co-opta por la vía de señalización VEGFR2 a través de la unión a N-glicanos complejos.	50
3.2.1 Gal1 activa vías de señalización dependientes de VEGFR2	50
3.2.2 Gal1 modula procesos de angiogénesis a través de la interacción con VEGFR2 en forma independiente de VEGF	53
3.3 La interacción entre Gal1 y glicanos específicos vincula fenómenos de hipoxia y neovascularización	58

3.3.1	La hipoxia regula la expresión de Gal1 en células tumorales por mecanismos dependientes de ROS y NF-κB e independientes de HIF-1α.	58
3.3.2	La interacción Gal1-glicanos vincula fenómenos de hipoxia y neovascularización en la interfase tumor-endotelio.	63
3.4	Relevancia del bloqueo de Gal1 y sus glicanos en fenómenos de neovascularización	67
3.4.1	El silenciamiento de Gal1 <i>in vivo</i> previene el crecimiento tumoral, disminuye la neovascularización y potencia la respuesta inmune anti-tumoral	67
3.4.2	Desarrollo de anticuerpos monoclonales bloqueantes de los efectos pro-angiogénicos de Gal1	72
3.4.3	Efecto terapéutico de anticuerpos monoclonales anti-Gal1 sobre la angiogénesis tumoral <i>in vivo</i> .	75
3.4.4	Efecto de anticuerpos monoclonales anti-Gal1 sobre la normalización del endotelio tumoral.	76
3.4.5	Efecto integrado de anticuerpos monoclonales anti-Gal-1 sobre programas vasculares y de escape tumoral	79
3.5	Relevancia clínica de la expresión de Gal1 en cáncer humano	82
3.5.1	La expresión de Gal1 se asocia a la malignidad y capacidad pro-angiogénica de tumores humanos	82
4.	DISCUSIÓN	86
5.	CONCLUSIÓN FINAL	96
6.	METODOLOGÍAS	98
7.	REFERENCIAS	114
8.	ABREVIATURAS	218
9.	PUBLICACIONES	131
10.	AGRADECIMIENTOS	135

1.INTRODUCCIÓN



1.1 ANGIOGÉNESIS EN LA SALUD Y EN LA ENFERMEDAD: MECANISMOS DE NEOVASCULARIZACIÓN NORMAL Y TUMORAL, IMPLICANCIAS CLÍNICAS EN CÁNCER

1.1.1 MECANISMOS DE ANGIOGÉNESIS FISIOLÓGICA

Las células de nuestro organismo requieren oxígeno (O_2) y nutrientes para su crecimiento y supervivencia. En metazoos primitivos y en la mayoría de los celenterados no existe un sistema circulatorio propiamente dicho. La difusión de los nutrientes tiene lugar de una célula a otra sin grandes inconvenientes (Carmeliet, 2005). Los organismos multicelulares con tamaños mayores al límite de difusión del O_2 debieron desarrollar mecanismos de transporte más complejos para asegurar un suministro adecuado de O_2 a sus células. La mayoría de los invertebrados posee un sistema circulatorio abierto, en el que la hemolinfa circula a través de un sistema de canales o senos. Muchos invertebrados poseen además estructuras pulsátiles para dirigir la circulación de la hemolinfa. En algunos grupos, estas estructuras de bombeo no son más que simples vasos con cierta capacidad contráctil; no obstante existen grupos de animales que poseen órganos más especializados y complejos. Los vertebrados y algunos grupos de invertebrados poseen sistemas circulatorios cerrados con auténticos vasos sanguíneos con endotelio de origen mesodérmico. Los sistemas

circulatorios cerrados presentan siempre un órgano impulsor de sangre bien diferenciado.

Durante la embriogénesis de vertebrados los vasos sanguíneos no sólo poseen funciones nutritivas, sino también constituyen la forma de transporte de factores tróficos encargados de promover morfogénesis (Carmeliet & Jain, 2000). En los primeros estadios del desarrollo, los vasos sanguíneos se originan a partir de células precursoras endoteliales (angioblastos), que tienen su origen en progenitores hematopoyéticos. Los angioblastos proliferan y se ensamblan en un laberinto vascular primitivo o plexo vascular, a través de un proceso llamado **vasculogénesis** (Papetti & Herman, 2002; Risau, 1997) (**Figura 1.1**). Además de formar vasos sanguíneos en su lugar de origen, algunos angioblastos migran largas distancias, formando plexos vasculares en órganos lejanos (Folkman, 2006; Risau, 1997). Las moléculas de la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGFs) liberados por el mesodermo, y la señalización mediada por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y sus receptores (VEGFRs) son esenciales en la generación y mantenimiento de estas redes vasculares (Risau, 1997). Luego de la formación del plexo vascular primario, más células endoteliales son generadas o reclutadas con el objetivo de formar nuevos capilares a partir de los ya existentes por división o brote, mecanismo denominado **angiogénesis** (Folkman, 2006). Existen al menos dos tipos de angiogénesis: la propiamente dicha, o formada por brote de un vaso pre-existente, o la que no se origina por brote. En la primera, la degradación proteolítica de la matriz extracelular es secundada por la migración y proliferación de las células endoteliales (CEs), la formación del lumen vascular y la maduración del endotelio. La angiogénesis que no se origina a partir del brote de un vaso ya existente puede ocurrir por proliferación de CEs dentro del vaso, produciendo un ensanchamiento del lumen vascular que puede llevar a la división de los vasos capilares formando así nuevos vasos (Risau, 1997) (**Figura 1.1**). A través de la generación de ratones mutantes para diversos factores

angiogénicos se ha identificado a los factores de la familia de VEGF como esenciales en ambos tipos de angiogénesis (Carmeliet y col., 1996; Ferrara y col., 1996). También han sido asociados a estos procesos los receptores de tirosina quinasa de angiopoyetina (Tie-1 y 2) y el receptor del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β R) (Risau, 1996) (**Figura 1.1**). La red vascular en formación es rápidamente remodelada hasta llegar a formar un sistema maduro con vasos de distinto calibre y con un patrón estructural establecido, proceso llamado “poda” por la similitud del resultado a las ramas de un árbol. Finalmente, la vasculatura termina su maduración en función de las necesidades estructurales del órgano o tejido que irriga. En este proceso de maduración participan varios factores solubles como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- β o VEGF; proteínas como fibronectina e integrinas que juegan un papel crucial tanto en la vasculogénesis como en la angiogénesis; y células encargadas de dar soporte y proveer factores proangiogénicos como los pericitos (Folkman, 2006) (**Figura 1.1**).

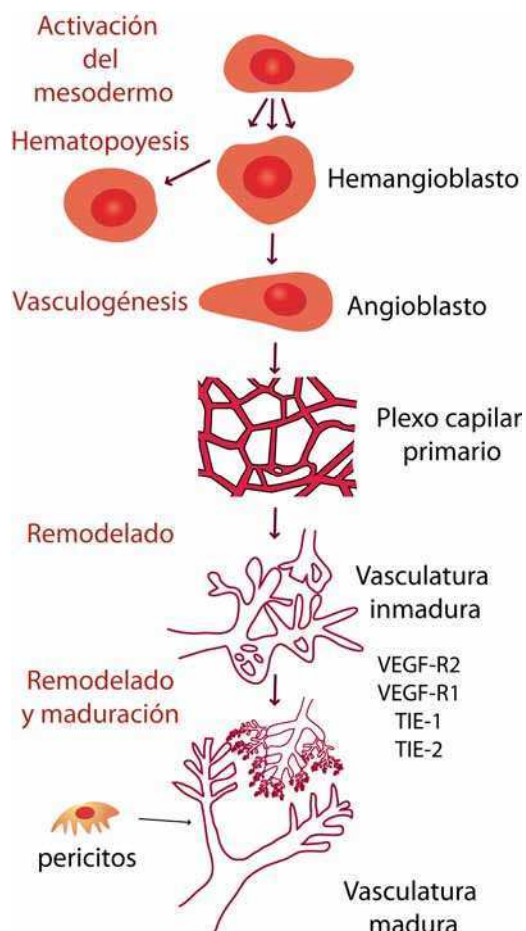


Figura 1.1. Mecanismos de angiogénesis normal. Procesos (rojo) y estructuras (negro) participantes del fenómeno de desarrollo de la vasculatura normal. En etapas tempranas de la embriogénesis se diferencian angioblastos a partir de precursores hemangioblasticos pluripotentes. Estas células migran a los órganos donde proliferan dando lugar a la formación de plexos vasculares que posteriormente maduran en vasos sanguíneos (**vasculogénesis**). Este proceso se halla estrictamente regulado por el balance entre factores de crecimiento y receptores en CE. El resultado final del remodelado y maduración depende del órgano donde se desarrolle la vasculatura y es coordinado por la producción de factores tróficos del órgano

1.1.1.2 MECANISMOS DE LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL

La historia, occidental al menos, del estudio de la neovascularización se remonta a los primeros tiempos de nuestra era; en el año 160 d.c. Galeno postuló que la sangre no circula por el organismo sino que se regenera *in situ* en función de su demanda en los órganos (Folkman, 2008). Recién en 1682, luego de la ruptura de los dogmas aristotélicos, Willian Harvey describió al corazón como una bomba que hace circular la sangre por el organismo a través de las arterias retornando por las venas. Unos años antes, en 1661 Marcelo Malphighi identificó a los capilares como los vasos más pequeños encargados de cerrar el circuito entre arterias y venas. Simultáneamente, Caspar Aselius descubrió otro tipo de vasos, los linfáticos, encargados de devolver el plasma que se escapa de los capilares nuevamente a la circulación (Risau, 1997).

El primer investigador en utilizar la expresión “angiogénesis tumoral” fue un cirujano inglés John Hunter, en el año 1787 mientras estudiaba necropsias de pacientes con cáncer. No obstante durante los siguientes 150 años, hubo muy pocos estudios sobre la vasculatura de los tumores (Folkman, 2008). Los primeros datos experimentales acerca de la angiogénesis tumoral datan hacia finales de la década de 1930, cuando Ide, Algire y sus colaboradores demostraron que una sustancia difusible producida por los tumores, estimulaba el crecimiento de nuevos vasos. Hasta fines de 1960 la creencia predominante establecía que la angiogénesis tumoral era un efecto secundario a la muerte de células tumorales (Folkman, 2008). En esa misma época, Folkman y sus colegas encontraron, mientras estudiaban la posibilidad de usar hemoglobina como sustituto de la sangre, que tumores implantados en glándulas tiroideas cultivadas *in vitro* y perfundidos con hemoglobina detenían su crecimiento cuando alcanzaban un volumen aproximado de 1 mm³. Cuando esos tumores eran trasplantados en ratones singeneicos, crecían hasta 1000 veces su volumen original. Los tumores resultantes, a diferencia de los que provenían de órganos aislados *in*

vitro, presentaban un alto grado de vascularización. Esta diferencia, sugirió que la ausencia de vascularización en los tumores detiene el crecimiento de los mismos (Folkman, 2008)

Hacia 1971 se postuló la hipótesis que propone que el crecimiento tumoral es dependiente de la angiogénesis (Folkman, 1971; Folkman y col., 1971). Esta hipótesis, sienta las bases del estudio actual de la angiogénesis tumoral y hace algunas predicciones que hoy son sustento de un gran número de líneas de investigación en todo el mundo. La hipótesis de Folkman establece que: **(1)** El crecimiento de virtualmente todos los tumores se limitaría a unos pocos milímetros en ausencia de angiogénesis; **(2)** Los tumores deberían secretar moléculas angiogénicas solubles; **(3)** Existe una fase de “latencia” debido al bloqueo de la angiogénesis. En función de estas evidencias Folkman propuso el término “anti-angiogénesis” y predijo la existencia de inhibidores “endógenos” de la angiogénesis fisiológica. Sin embargo, durante los primeros 10 a 15 años luego de su publicación, la hipótesis fue desestimada en función de la idea dominante que establecía que la angiogénesis tumoral era causada inespecíficamente por la inflamación (Coussens & Werb, 2002). Actualmente, la hipótesis de la inflamación como causa de la neovascularización se halla en debate y la teoría del crecimiento dependiente de la neovascularización es ampliamente aceptada y ha sido extensamente corroborada con evidencias genéticas y funcionales (Bergers & Hanahan, 2008; Carmeliet, 2005; Folkman, 2006).

“SWITCH ANGIOGÉNICO” Y PROGRESIÓN TUMORAL

Es fácil olvidar que el cáncer no es una, sino muchas enfermedades. En las últimas décadas, la complejidad del cáncer se ha vuelto más tangible gracias al creciente número de trabajos que identificaron los principios básicos de la patogénesis de esta enfermedad. La mayoría de los modelos proponen la teoría de los “multi-eventos” en la tumorigénesis, en la cual cambios secuenciales a nivel genético y

epigenético pueden explicar la transformación de una célula normal en una célula tumoral (Bergers & Benjamin, 2003). Sin embargo, estos cambios no son suficientes para el desarrollo de un tumor clínicamente detectable. Uno de los eventos “no genéticos” más importantes necesarios para que los tumores progresen y se propaguen, es la inducción de procesos de vascularización o “*switch angiogénico*” (Bergers & Benjamin, 2003; Hanahan & Weinberg, 2000). Este proceso depende del balance de señales pro-angiogénicas como VEGF, FGF, IL-8, TGF- β , PDGF, factor de crecimiento placentario (PlGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), pleiotropinas entre otros (Ribatti y col., 2007) y anti-angiogénicas como endostatina y angiostatina. Estos factores pueden provenir de las células tumorales, endoteliales o de la matriz extracelular (Carmeliet, 2005). La contribución relativa de cada una de estas moléculas al proceso de neovascularización, como así también su regulación temporal y espacial puede variar en función del tipo de tumor y del estado de progresión (Bergers & Benjamin, 2003). Sin embargo, cuál es la importancia relativa de cada factor y cómo el *switch angiogénico* puede afectar la progresión tumoral son algunos de los interrogantes claves a resolver en la actualidad.

Al igual que los tejidos normales, los tumores necesitan un constante suministro de oxígeno, nutrientes y una vía efectiva para eliminar productos de desecho metabólico (Papetti & Herman, 2002). De hecho, la tasa metabólica de las células transformadas es muchas veces mayor al de una célula normal. Por este motivo, para que un tumor progrese de un estado de latencia limitado a un tamaño de pocos milímetros a un tumor establecido es esencial que se produzca un desbalance entre factores pro y anti-angiogénicos y se genere el *switch angiogénico*. Una interesante observación clínica que confirma este concepto, es el hecho de que en autopsias realizadas a personas de 50-70 años de edad fallecidas por traumas, se encontró que el 98% de los individuos poseen carcinomas *in situ*; sin embargo sólo el 0,1% de los mismos se diagnostica durante la vida de los individuos (Ribatti and

Vacca, 2008). Esto indica que los tumores crecen más allá de un tamaño crítico de 1-2 mm sólo si son capaces producir el *switch angiogénico*.

Los tumores pueden obtener su propio suministro de oxígeno y nutrientes de diversas maneras. Pueden co-optar por los vasos pre-existentes y crecer alrededor de ellos (**Figura 1.2**) (Carmeliet & Jain, 2000) o pueden formar nuevos vasos a partir de los ya existentes a través de un proceso muy similar al de la angiogénesis normal (**Figura 1.2**) (Papetti & Herman, 2002). De hecho, la mayoría de los tumores expresan varios factores pro-angiogénicos, entre los cuales FGF y VEGF son los más importantes (Mc Donald, 2008). Además, los tumores son capaces de reclutar progenitores endoteliales de medula ósea (angioblastos) para inducir vasculogénesis a través de mecanismos que involucran la expresión de factores como VEGF, PlGF, y Ang1 (Hattori y col., 2001; Hattori y col., 2002). Otro proceso usado por los tumores es

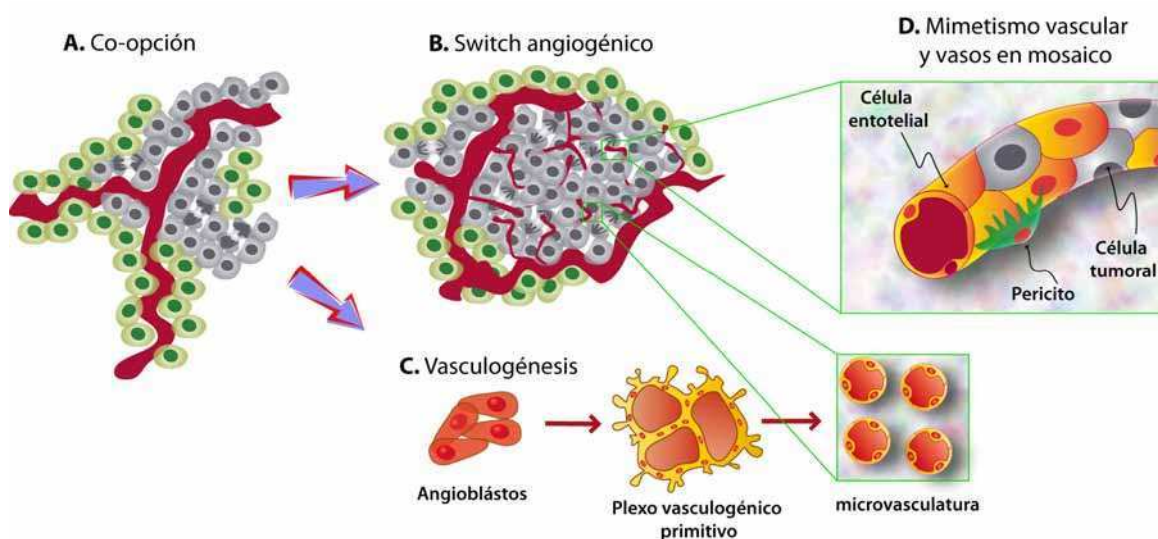


Figura 1.2. Mecanismos de la angiogénesis tumoral. Durante procesos de tumorigénesis, las células neoplásicas necesitan abastecerse de nutrientes y oxígeno para crecer. **A)** Los tumores pueden co-optar por los vasos normales presentes en el tejido adyacente y crecer alrededor de ellos. Cuando los tumores desarrollan un tamaño crítico donde la difusión de O_2 no alcanza a todas las células, deben generar sus propios vasos sanguíneos, proceso conocido como *switch angiogénico*. **B)** La angiogénesis (crecimiento de vasos a partir de otros ya existentes) es el proceso más común por el cual los tumores generan vasculatura. **C)** Los tumores también pueden reclutar precursores de células endoteliales y formar vasos a partir de ellos, proceso conocido como vasculogénesis. **D)** Algunas células tumorales como las de melanomas pueden formar vasos entremezclándose con las células endoteliales (vasos en mosaico) o generando canales por donde circula la sangre (mimetismo vascular).

el fenómeno de “mimetismo vascular”, a través del cual las células tumorales forman canales vasculares sin la participación del endotelio (Hendrix y col., 2003; Maniotis y col., 1999; Paulis y col., 2010). Otra posibilidad es que las células endoteliales que revisten los vasos sean parcialmente reemplazadas por células tumorales, dando como resultado vasos en “mosaico” donde células endoteliales y tumorales contribuyen a la formación de túbulos vasculares (Ribatti & Vacca, 2008).

No obstante, cualquiera sea el mecanismo a través del cual los tumores generan neovascularización, la vasculatura resultante es morfológica y fisiológicamente aberrante (Jain, 2005). Los vasos sanguíneos tumorales son irregulares, fenestrados, tortuosos, dilatados y las células endoteliales poseen morfología aberrante (Bergers & Benjamin, 2003). Los vasos no están organizados en vénulas, capilares y arteriolas como ocurre en los vasos normales y además las células perivasculares (pericitos), las cuales normalmente están en estrecho contacto con las células endoteliales, parecen estar menos asociadas y en menor cantidad en los vasos tumorales. (Morikawa y col., 2002) **(Figura 1.5)**. Estas anormalidades estructurales, causan una gran heterogeneidad temporal y espacial en el flujo sanguíneo, el cual se torna lento y a menudo oscilante provocando microambientes tumorales caracterizados por la hipoxia y la acidosis (Jain, 2005). En gran medida, las causas de esta irregularidad y tortuosidad vascular se deben a la ausencia de pericitos en los vasos asociados a los tumores. La vasculatura tumoral, al igual que la normal necesita que las paredes vasculares sufran eventos de estabilización y maduración (Helfrich y col., 2010); estos procesos son realizados en gran medida por los pericitos (Abramsson y col., 2003). Finalmente, durante los últimos años un creciente número de evidencias indica que los cambios morfológicos y estructurales en la vasculatura tumoral afectan la eficacia de terapias anti-tumorales al provocar un acceso ineficiente de drogas y oxígeno (requeridos por la quimioterapia) al tumor. (Helfrich et al., 2010). Por otro lado, la hipoxia y la disminución del pH provocados por el flujo sanguíneo

ineficiente, confieren a las células tumorales mayor resistencia a la radiación y a la mayoría de los agentes citotóxicos, induciendo inestabilidad genómica y afectando la funcionalidad de células efectoras de la inmunidad anti-tumoral (Jain, 2005). En esencia, la vasculatura aberrante de los tumores genera microambientes anormales lo cual constituye una formidable barrera para la distribución y eficacia de las terapias contra el cáncer.

ROL DE LA HIPOXIA EN LA NEOVASCULARIZACIÓN TUMORAL

Durante la progresión tumoral se genera un compromiso entre el tamaño del tumor y la capacidad de difusión del O_2 , lo cual conduce a situaciones de hipoxia (Pugh & Ratcliffe, 2003). La hipoxia tumoral, es el principal factor disparador de mecanismos que alteran el balance de factores pro- y anti-angiogénicos a favor de la generación de nuevos vasos sanguíneos que proveen O_2 , nutrientes y vías de escape a las células tumorales confiriéndoles mayor capacidad de crecimiento y metástasis (Bergers and Benjamin, 2003; Fong, 2009) (**Figura 1.3**). El mecanismo molecular mejor estudiado por el cual la hipoxia es capaz de regular la neovascularización tumoral, es el mediado por la acumulación del factor inducible por hipoxia (HIF). HIF es un factor de transcripción heterodimérico constituido principalmente por dos subunidades, HIF-1 α y HIF-1 β . Si bien la expresión de estos factores es constitutiva en todas las células, los factores α son altamente sensibles a los cambios en los niveles de O_2 (Pugh & Ratcliffe, 2003). En condiciones de O_2 normales (normoxia) HIF-1 α es rápidamente hidroxilado principalmente por prolin-hidroxilasas dependientes de O_2 (PHD) (Fong, 2009; Pugh & Ratcliffe, 2003) lo cual marca al factor de transcripción que es posteriormente ubiquitinado y degradado en el proteosoma. En condiciones de hipoxia, las PHD son inactivas lo cual permite la formación del dímero HIF-1 α/β ; esta molécula regula la expresión de numerosos genes a través de la unión a sitios de respuesta a hipoxia (HRE) en el ADN. Entre estos factores sobre-expresados en condiciones de hipoxia, se encuentran numerosos genes involucrados

en el metabolismo de azúcares, en la respuesta hacia el stress, en la glicólisis y en la angiogénesis. En este último proceso, la estabilización de HIF-1 α induce la expresión de VEGF, VEGFR1, PDGF, eritropoyetina, DLL4 (señalización vía Notch), TGF- α , TGF- β y metaloproteinasas (MMPs) entre otros (Charlesworth & Harris, 2008; Fong, 2009; Fraisl y col., 2009; Mizukami y col., 2007) (**Figura 1.3**).

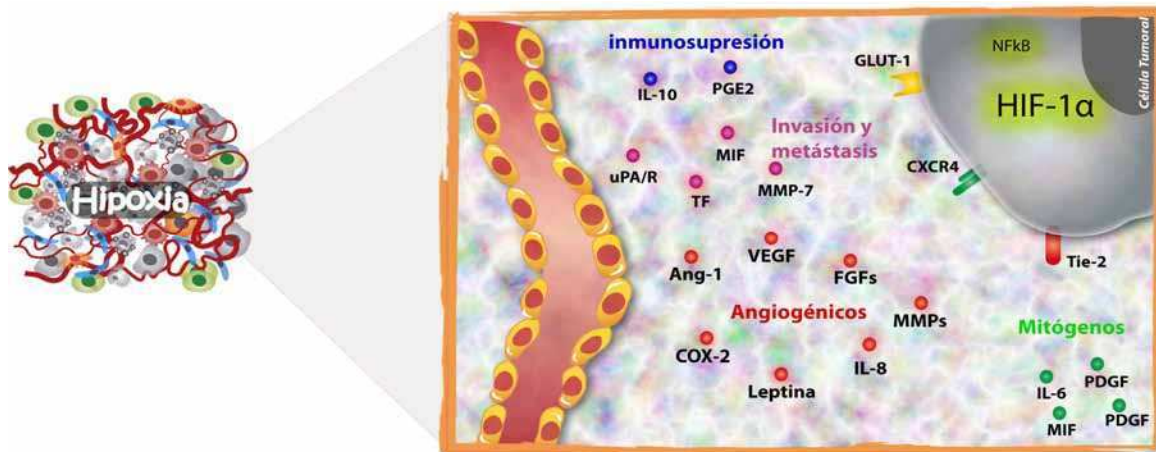


Figura 1.3. Rol de la hipoxia tumoral en la progresión tumoral y la neovascularización. La generación de zonas de baja presión de O₂ (hipoxia) en el tumor genera la activación de factores de transcripción (principalmente HIF-1 α y NF- κ B) que regulan la expresión de numerosos genes asociados a fenómenos de progresión tumoral. Entre ellos, genes asociados a eventos de proliferación (verde), inmunosupresión (azul), invasión y metástasis (violeta) y neovascularización (rojo).

No obstante la importancia que reviste la activación de HIF en fenómenos de neovascularización inducidos por hipoxia, estudios moleculares llevados a cabo en pacientes no siempre han demostrado una asociación directa entre la inducción de angiogénesis y la estabilización de HIF-1 α (Pugh & Ratcliffe, 2003). Es más, evidencias recientes sugieren que la hipoxia es capaz de promover neovascularización en ausencia de HIF-1 α . Estudios *in vivo* usando tumores HIF-1 α ^{-/-} mostraron que pese a una reducción parcial del crecimiento, no se observaron cambios en la neovascularización (Mizukami et al., 2005). Más aún, en este modelo, la expresión de VEGF no fue completamente revertida en tumores HIF1 α ^{-/-}, sugiriendo que HIF-1 α no es el único factor regulador de la respuesta angiogénica en hipoxia. Los mecanismos

moleculares que gobiernan la regulación de la expresión de VEGF independiente de HIF1- α permanecen oscuros. No obstante, varios mecanismos que involucran vías de señalización mediadas por RAS han sido propuestos como responsables de este fenómeno. Por ejemplo, la expresión de K-ras en combinación con hipoxia puede aumentar en forma sinérgica los niveles de VEGF (Mizukami y col., 2004). Por otro lado, la hipoxia es capaz de activar múltiples vías asociadas a RAS, incluyendo Erk 1/2, JNKs, p38 Akt y Rho (Mizukami y col., 2005).

Otro importante factor de transcripción activado por la hipoxia es el factor nuclear- κ B (NF- κ B); sin embargo los mecanismos que median esta activación aún no han sido completamente dilucidados. Se ha reportado que cambios en el potencial redox durante la hipoxia llevan a la generación de especies reactivas del O₂ (ROS) en la mitocondria las cuales podrían a su vez gatillar la activación de NF- κ B (Karin y col., 2002). Algunas evidencias sugieren que la activación de NF- κ B en hipoxia podría estar mediada por la inhibición de la activación de las PHDs. En este sentido, recientes evidencias identificaron una conexión recíproca entre la vía de NF- κ B y HIF-1 α en hipoxia (Rius y col., 2008).

Además de VEGF, otros factores pro angiogénicos incrementados durante la hipoxia a través de mecanismos independientes de HIF-1 α han sido reportados. Por ejemplo, en células de carcinoma de ovario, la hipoxia es capaz de inducir la expresión de interleuquina (IL)-8 a través de la activación de NF- κ B mediada por vías dependientes de Ras (Xu et al., 2004). Por otro lado, en cáncer de colon, un mecanismo mediado por ROS y NF- κ B controla la expresión de IL-8 inducida por hipoxia en ausencia de activación de HIF-1 α (Mizukami et al., 2005). Adicionalmente, la activación de cicloxigenasa-2 (COX-2), prostaglandina E2 (PGE2) y angiopoyetina-2 (Ang-2) son otros factores pro angiogénicos que pueden ser regulados por hipoxia a través de mecanismos que no requieren la activación de HIF-1 α (Mizukami et al.,

2005). En resumen, la hipoxia es uno de los principales estímulos activadores del *switch angiogénico*; sin embargo los mecanismos moleculares por los cuales la hipoxia es capaz de mediar este fenómeno son más complejos de lo previsto, por lo cual aun son necesarios estudios profundos tendientes a caracterizar nuevos mediadores que vinculen eventos de hipoxia y neovascularización tumoral.

1.1.3 TERAPIAS ANTIANGIOGÉNICAS: ÉXITOS, FRACASOS Y PERSPECTIVAS

Aunque la inducción de neovascularización tumoral no constituye el factor iniciador de la tumorigénesis, este fenómeno es clave a los fines de promover la progresión y metástasis del tejido tumoral. De todas la moléculas pro-angiogénicas conocidas, diversos estudios señalaron a VEGF como un blanco terapéutico excelente cuyo bloqueo podría inhibir la neovascularización tumoral (Ferrara y col., 2004). En este sentido, las terapias más avanzadas clínicamente están dirigidas hacia el bloqueo de VEGF, o de la señalización de VEGFR2 (**Tabla 1**).

Tabla 1. Estrategias clínicas tendientes a bloquear la vía VEGF/VEGFRs

DROGA	MECANISMO DE ACCIÓN CLÍNICA	APLICACIÓN/FASE
Bevacizumab (Avastin)	Anticuerpo monoclonal bloqueante anti-VEGF	En combinación con quimioterapia, incrementa la supervivencia de pacientes con varios tipos tumorales Aprobado por FDA
(PTK 787/ZK222584)	Inhibidor de la actividad quinasa de VEGFR1, 2, 3 y PDGFR β y c-Kit	Tumores sólidos Fase III
AE-941 (Neovastat)	Inhibe la unión de VEGF a VEGFR	Amplio espectro de tumores Fase III
Sorafenib (BAY-43-9006)	Inhibidor de amplio espectro de receptores tirosina quinasa (RTK)	Cáncer renal Fase III
Sunitinib (SU11248)	Inhibidor de amplio espectro de RTKs	Cáncer gastro-intestinal Aprobado por FDA
Pegaptanib (Macugen)	Aptamero neutralizante de VEGF	Degeneración macular asociada a la edad. Aprobado por FDA
Ranibizumab (Lucentis)	Fragmento Fab neutralizante de VEGF	Degeneración macular asociada a la edad. Aprobado por FDA

Adaptado de (Olsson y col., 2006)

Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal bloqueante de VEGF, es el agente anti-angiogénico aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) más usado para el tratamiento de cáncer de colon, mama, y carcinomas de células pequeñas de pulmón, en todos los casos en combinación con quimioterapia. Los inhibidores farmacológicos de la actividad de receptores RTKs, *Sorafenib* y *Sunitinib*, fueron aprobados para el tratamiento del carcinoma renal altamente vascularizado y hepatocarcinoma. No obstante, numerosos ensayos clínicos están buscando expandir las aplicaciones de estos agentes bloqueantes de la señalización VEGF a otros tipos de tumores. Sin embargo, un creciente número de evidencias demuestran que los tumores pueden evadir las terapias anti-VEGF (ver próxima sección) impulsando la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos tanto a nivel celular como molecular a los fines de bloquear la neovascularización tumoral.

INHIBICIÓN DE ANGIOGÉNESIS A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LA FISIOLÓGÍA DE CÉLULAS ENDOTELIALES

A diferencia de las células tumorales, las CEs asociadas a tumores son genéticamente estables, esto hace que sean menos propensas a desarrollar resistencia y por lo tanto las convierte en blanco ideal de las terapias anti-angiogénicas (Ferrara & Kerbel, 2005). En este sentido, la mayoría de los esfuerzos iniciales estuvieron enfocados en el desarrollo de agentes que bloqueen la proliferación y migración de dichas células. Los agentes que han mostrado mejores efectos en la clínica en este sentido son el anticuerpo monoclonal anti-VEGF (Bevacizumab) y varios inhibidores de receptores tipo tirosin-quinasa (RTK) incluidos los VEGFRs (Olsson y col., 2006). Esta clase de agentes no sólo inducen arresto de las CEs en proliferación, sino que además promueven la regresión de la vasculatura al inducir apoptosis del endotelio.

Más allá de los efectos sobre la biología de las CEs, los inhibidores de VEGF han mostrado efectos positivos como sensibilizadores a las quimioterapias (Jain, 2005) ya que al inducir la normalización de la vasculatura mejoran la llegada de las drogas al

sitio de crecimiento tumoral (ver sección 1.5). La modulación de otros factores pro-angiogénicos con potencial terapéutico en tumores, están siendo estudiados intensamente, entre ellos el bloqueo de PIGF mediante anticuerpos monoclonales reveló resultados alentadores en tumores resistentes al bloqueo de VEGFR2, sin embargo, algunos autores proponen que estos efectos son inespecíficos e independientes de la unión de PIGF a VEGFR1 en células endoteliales. Esto motivó un intenso debate aún no resuelto acerca del uso terapéutico del anticuerpo monoclonal anti-PIGF (Bais et al., 2010; Fischer et al., 2007).

INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LA FISIOLOGÍA DE CÉLULAS ESTROMALES Y PERICITOS

Las células del estromales no son simples espectadores del fenómeno de progresión tumoral; en realidad son protagonistas claves que contribuyen a procesos de malignización. Los fibroblastos asociados a los tumores, y las células del infiltrado tumoral son una importante fuente de factores pro-angiogénicos que promueven neovascularización (Coussens & Werb, 2002; Ferrara, 2010b; Pollard, 2004) . La vasculatura tumoral posee pericitos que presentan un fenotipo diferente al de aquéllos que recubren los endotelios normales. Estos pericitos caracterizados por la expresión de los marcadores fenotípicos c-Kit, VEGFR1, RGS5 y PDGFR- β son movilizados desde médula ósea en respuesta a PDGF (Song y col., 2005) y constituyen una fuente local importante de VEGF y Ang1 que promueven la estabilización vascular. La combinación de inhibidores de VEGFRs y PDGFR- β en tumores aumenta los beneficios terapéuticos en comparación a las monoterapias anti-VEGFRs, en parte a causa de un efecto inhibitorio sobre la función de los pericitos (Bergers y col., 2003).

INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LA FISIOLOGÍA DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

En 1863, Virchow postuló que la inflamación estimula la progresión tumoral. Poco más de un siglo después se reveló que las células tumorales y las estromales asociadas

son capaces de secretar numerosos factores quimioattractantes para macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (DCs), monocitos, células T y progenitores hematopoyéticos (Coussens & Werb, 2002). La mayoría de estas células fueron extensamente asociadas a fenómenos de neovascularización. Por ejemplo, macrófagos asociados a los tumores (TAM) que se acumulan en regiones hipóxicas son capaces de producir factores pro-angiogénicos como VEGF, IL-8 e IL-6 (Condeelis & Pollard, 2006; Pollard, 2004) en respuesta a la carencia de oxígeno, facilitando la neovascularización tumoral. Un subtipo de monocitos caracterizados por la presencia del receptor de angiopoyetina Tie2, participa activamente en la generación de angiogénesis tumoral (Coffelt y col., 2010; De Palma y col., 2005). La expresión en células mieloides CD11b⁺ Gr1⁺ de la proteína Bv8, un mitógeno de CEs, es clave para la movilización de las mismas al tumor y participa en la generación de neovascularización (Shojaei y col., 2007). Por otro lado, en modelos de carcinogénesis en cáncer pancreático, se demostró que los neutrófilos asociados al tumor son la principal fuente de MMP-9, una enzima clave en el proceso de activación de la vasculatura (Nozawa et al., 2006). Además, se observó en cáncer de mama que el bloqueo de la quimioquina SDF-1 (CXCL12) tanto como el de PlGF, ambas moléculas involucradas en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos al tumor, disminuye la neovascularización del mismo (Orimo y col., 2005).

En los últimos años, un creciente número de evidencias asignan a las células dendríticas (DCs) funciones claves en fenómenos de neovascularización (Sozzani y col., 2007). Entre ellas, se observó que DCs inmaduras son capaces de producir y liberar numerosas citoquinas pro-angiogénicas como VEGF (Riboldi et al., 2005), IL-8 y factor de necrosis tumoral (TNF) que actúan como moduladoras de la neovascularización tumoral (Curiel y col., 2004; Fainaru y col., 2008). Por otro lado, se observó que, a diferencia de las células inmaduras, las DCs maduras producen citoquinas anti-angiogénicas como IL-12 (Curiel y col., 2004; Sozzani y col., 2007)

sugiriendo que la modulación de la maduración de DCs en microambientes tumorales es un fenómeno clave no sólo en la regulación de la respuesta inmune, sino también en la neovascularización. En este sentido, se demostró que por un lado el bloqueo de PlGF y VEGFR1 mejora la funcionalidad de DCs maduras (Sozzani y col., 2007) y por el otro VEGF afecta la respuesta inmune anti-tumoral promoviendo la generación de microambientes tolerogénicos (Gabrilovich y col., 1996; Ohm y col., 2003; Rabinovich y col., 2007a). En suma, estas evidencias estimulan la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas que afecten a los compartimientos vascular e inmunológico simultáneamente (Jinushi & Dranoff, 2007) y señalan la importancia del estudio de la interfase tumor-endotelio-sistema inmune en la generación de las mismas.

INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LA FISIOLOGÍA DE CÉLULAS TUMORALES

Diversas estrategias terapéuticas tendientes a destruir las células tumorales, destruyen también, directa o indirectamente, la vasculatura. Ha sido demostrado que la disminución del volumen tumoral luego de terapias citotóxicas descomprime mecánicamente la vasculatura mejorando el flujo y la llegada de drogas al tumor (Carmeliet, 2005). Por otro lado, las células tumorales liberan numerosos factores pro-angiogénicos y receptores de factores de crecimiento (VEGF, VEGFRs, EGFRs, NRP-1, etc.) que pueden afectar la biología vascular. De este modo, el bloqueo de alguna de estas moléculas podría servir para inhibir la proliferación y crecimiento de ambos compartimientos, endotelial y tumoral, simultáneamente. En este sentido, el anticuerpo monoclonal bloqueante del receptor de EGF (Herceptin; Roche) normalmente utilizado para bloquear el crecimiento de tumores epiteliales, ha sido demostrado que actúa también como factor anti-angiogénico al desviar el balance de factores pro- y anti-angiogénicos que liberan las células tumorales hacia la inhibición de la angiogénesis (Izumi y col., 2002). Estos datos enfatizan la complejidad del sistema, con la participación de diversos factores involucrados en el proceso de angiogénesis, lo cual

reduce la eficacia de estrategias terapéuticas dirigidas hacia blancos moleculares únicos, sugiriendo la necesidad de integrar sistemas complejos a la hora de diseñar nuevas terapias anti-tumorales.

En resumen, la idea utópica de bloquear específicamente una molécula o vía de señalización, y afectar un solo compartimiento celular está siendo desplazada por la hipótesis que postula a los ‘agentes de acción múltiple’ como herramientas terapéuticas racionales para el tratamiento de tumores.

1.1.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNICA

Las vías de señalización de VEGF y sus receptores son, sin dudas, las más conocidas y mejor validadas en el proceso de angiogénesis (Ferrara, 2010a; Ferrara y col., 2003; Olsson y col., 2006). No obstante los agentes anti-angiogénicos tendientes a bloquear estas vías (**Tabla 1**), no prolongan la supervivencia de los pacientes como se esperaba y en muchos casos se han reportado efectos adversos serios durante el tratamiento (Chen & Cleck, 2009; Ebos y col., 2009; Paez-Ribes y col., 2009). La posibilidad de los tumores de co-optar por otras vías pro-angiogénicas puede inducir resistencia a la monoterapia con inhibidores de VEGF. En este sentido, se han descrito numerosos mecanismos a través de los cuales los tumores escapan a las terapias anti-angiogénicas (**Figura 1.4**) (Bergers & Hanahan, 2008). Entre ellos, la selección de variantes de células tumorales capaces de resistir la hipoxia (Ferrara, 2010a), el reclutamiento de progenitores de médula ósea (Ferrara, 2010b; Shojaei y col., 2007), la modulación de la maduración de los pericitos asociados a los vasos tumorales (Helfrich y col., 2010) y la capacidad de las células del tumor de suplantar la función de las CEs (Hendrix et al., 2003; Tang et al., 2009). Estos mecanismos de resistencia adaptativa que desarrollan los tumores para evadir las terapias anti-angiogénicas se resumen en la **Figura 1.4**.

En este contexto, resulta crucial la generación de nuevos conocimientos que nos permitan contrarrestar los mecanismos de resistencia a la terapia anti-angiogénica y ampliar el espectro de potenciales blancos terapéuticos, tanto a nivel celular como molecular, con el fin de desarrollar nuevas estrategias tendientes a bloquear la neovascularización tumoral.

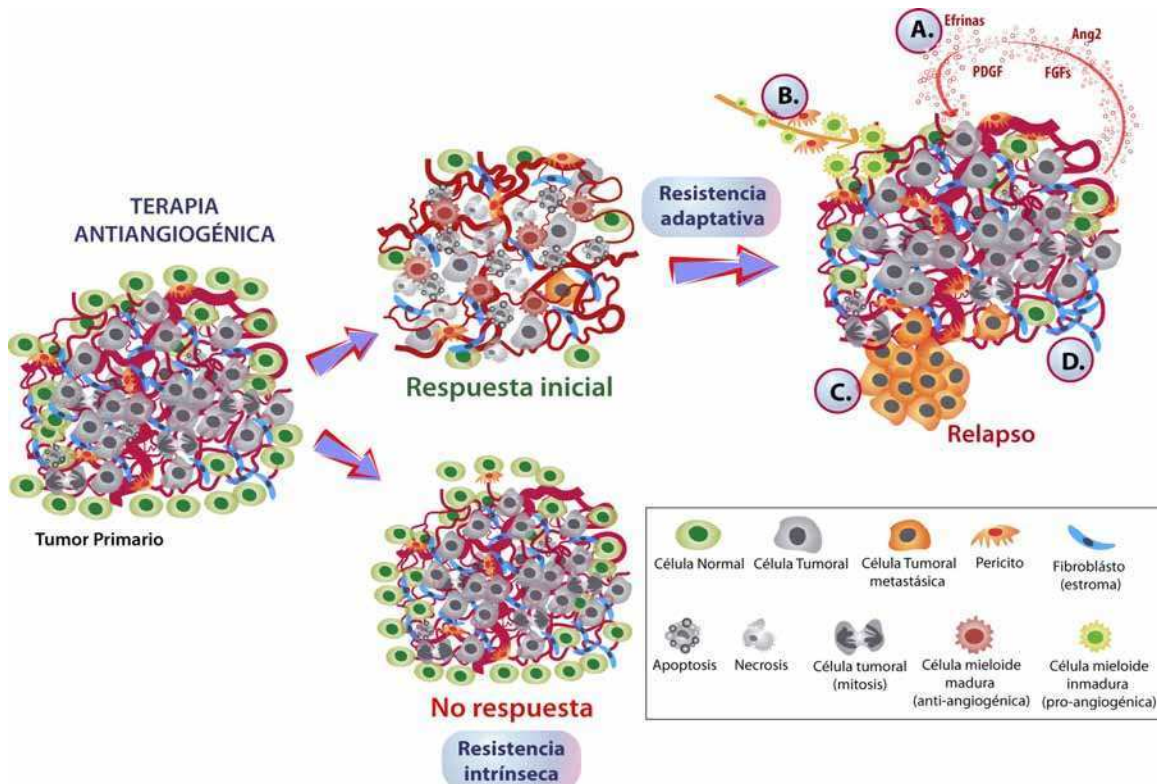


Figura 1.4. Mecanismos de resistencia a las terapias anti-angiogénicas. La mayoría de las terapias anti-angiogénicas son, en el mejor de los casos, parcialmente exitosas. Las causas radican en la capacidad de los tumores de ser refractarios a ellas (**resistencia intrínseca**) o de generar mecanismos de evasión de las mismas (**resistencia adquirida**). Dentro del segundo grupo han sido reportados diversos mecanismos responsables. **A)** La inducción de factores y vías pro-angiogénicas alternativas es el mecanismo de resistencia adquirida más común en la terapia anti-VEGF. **B)** El reclutamiento de progenitores endoteliales y células mieloides inmaduras con capacidad pro-angiogénica que sustentan la neovascularización tumoral fue reportado luego del tratamiento con anti-VEGFR2. **C)** La hipoxia generada luego de los tratamientos anti-angiogénicos actúa como factor de selección de variantes de células tumorales capaces de crecer en condiciones extremas, las cuales además, son generalmente más agresivas y metastásicas. **D)** Los tumores establecen una estrecha comunicación con las células del estroma. De hecho, en respuesta a factores del microambiente tumoral estas células son capaces de alterar su fenotipo y actuar como soporte del tumor induciendo activamente neovascularización.

1.1.5 NUEVOS ENFOQUES EN LA TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNICA: NORMALIZACIÓN VASCULAR

En los tejidos normales, un exquisito balance entre moléculas pro- y anti-angiogénicas mantiene a la vasculatura en un constante estado de quiescencia. La ruptura de este balance desencadena fenómenos de angiogénesis patológica al desviar el equilibrio de factores pro- y anti-angiogénicos en favor de la generación de nuevos vasos sanguíneos. La mayoría de las terapias actuales tienden a torcer este desbalance hacia el lado opuesto, generando microambientes con mayor volumen de factores anti-angiogénicos, a los fines de favorecer la regresión de la vasculatura y concomitantemente del tumor. Paradójicamente, en numerosas ocasiones la destrucción de la vasculatura compromete la terapia anti-tumoral al disminuir la distribución de oxígeno (esencial para la radioterapia), alterar la llegada de drogas al tumor y antagonizar los efectos de la quimioterapia. Con el fin de reconciliar las observaciones diametralmente opuestas de algunas terapias en ensayos clínicos y pre-clínicos, en el año 2005 Rakesh Jain postuló la teoría de la “Normalización vascular” la cual estipula que la administración regulada de agentes anti-angiogénicos puede, más que destruir, normalizar la vasculatura aberrante en los tumores mejorando y potenciando los efectos de las terapias convencionales (Jain, 2005) **(Figura 1.5)**. Por otro lado, la normalización de la vasculatura podría impedir la liberación de células del tumor a la circulación, ya que los vasos “normalizados” no están fenestrados y poseen además de una correcta distribución de la membrana basal y, una mejor organización y maduración de los pericitos asociados **(Figura 1.5)**. El sustento teórico de esta propuesta se basa en la naturaleza aberrante de la vasculatura tumoral la cual constituye una formidable barrera para la acción de agentes radio y quimioterapéuticos.

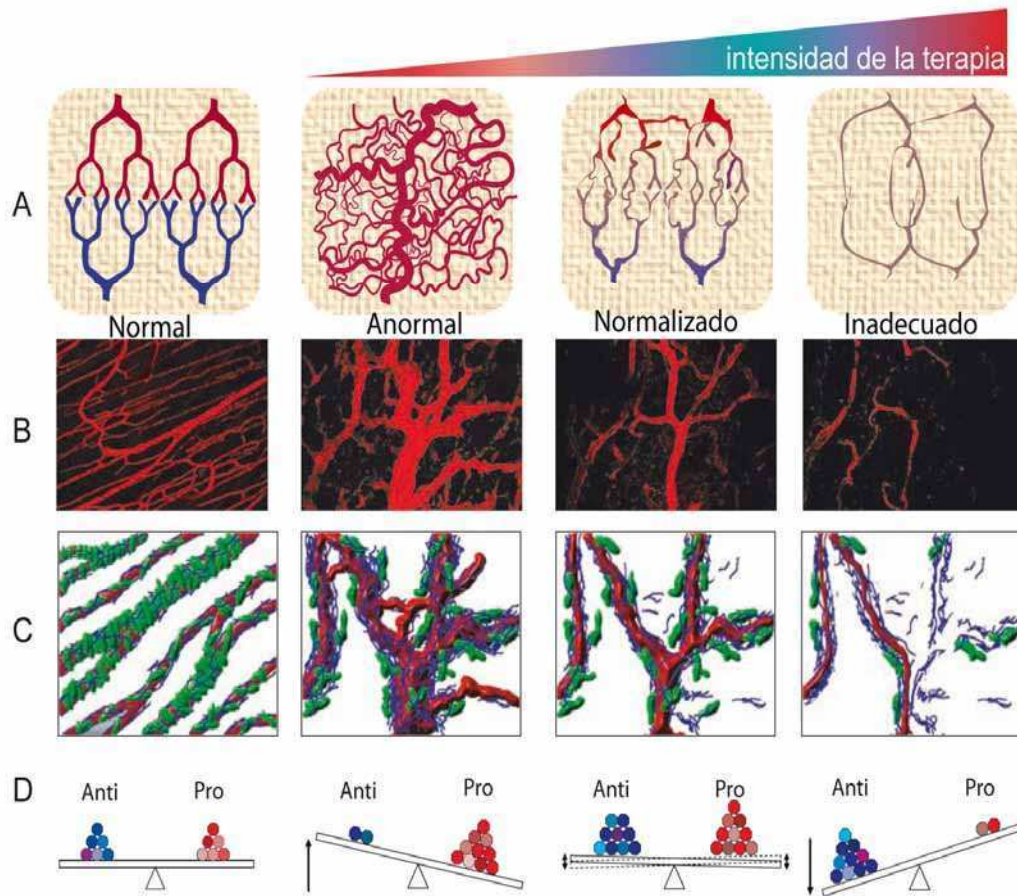
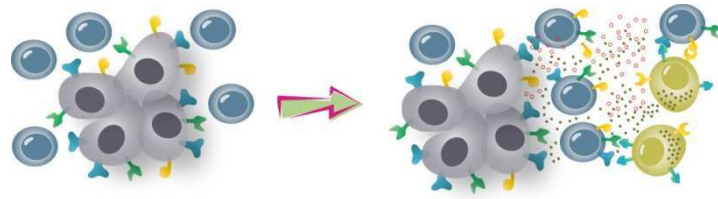


Figura 1.5. Teoría de la normalización vascular en la terapia anti-angiogénica. **A)** la vasculatura tumoral es estructural y funcionalmente aberrante. Ha sido propuesto que las terapias anti-angiogénicas inicialmente mejoran la estructura y función de los vasos. Sin embargo, los protocolos agresivos y/o sostenidos eventualmente pueden destruir los vasos lo que genera una vasculatura inadecuada que hace a los tumores resistentes a futuras terapias al obstaculizar la llegada de oxígeno y drogas al tumor. **B)** Imágenes de microscopía de dos fotones que muestra la dinámica de la normalización vascular inducida por el bloqueo de VEGFR2 en carcinoma de colon. Tomado de (Tong et al., 2004). **C)** Diagrama que representa los cambios en la cobertura de pericitos (rojo) y la membrana basal (azul) durante el proceso de normalización. **D)** Los cambios en la vasculatura se ven reflejados por cambios en el balance de factores pro- y anti-angiogénicos. Adaptado de (Jain, 2005).

En los últimos años, se ha incrementado sustancialmente la búsqueda de estrategias y mediadores tendientes a normalizar la vasculatura. En este sentido, el uso de bajas dosis de Bevacizumab mostró ser efectivo a los fines de incrementar la eficacia de la quimioterapia en pacientes con cáncer colorectal (Hurwitz et al., 2004). Más aún, se encontró que el bloqueo de VEGFR2 mediante el uso del anticuerpo monoclonal

DC.101 induce la normalización de la vasculatura en cáncer colorectal lo que provoca un aumento de la presión hidrostática en el tumor que permite un mayor influjo de moléculas (Tong y col., 2004). Otro interesante estudio del mismo grupo mostró que el bloqueo de VEGFR2 crea una “ventana de normalización” que mejora los efectos de la radioterapia en tumores cerebrales al aumentar la oxigenación del tumor, requerimiento clave para la eficacia de esta terapia (Winkler y col., 2004). Por otro lado, el bloqueo del factor de crecimiento placentario (PIGF) inhibe el crecimiento tumoral y la neovascularización en tumores resistentes al tratamiento anti-VEGFR2 al incrementar la eficacia de la quimioterapia y disminuir la hipoxia tumoral (Fischer y col., 2007). La búsqueda de blancos terapéuticos y mediadores responsables de los fenómenos de normalización trascendió las fronteras de los factores pro-angiogénicos y llegó hasta el estudio de proteínas intracelulares encargadas de llevar a cabo otras funciones independientes a la neovascularización. Por ejemplo, un exhaustivo estudio llevado a cabo por Hamzah y col. identificó a la proteína G reguladora de la señalización-5 (RGS5) como gen responsable del fenotipo aberrante de la vasculatura. En este sentido, la pérdida de RGS5 resulta en una marcada reducción de la hipoxia tumoral acompañada de un incremento en la presencia de pericitos maduros asociados a los vasos, y un mayor influjo de células efectoras de la respuesta inmunológica en el parénquima tumoral (Hamzah y col., 2008).

En resumen, la normalización de la vasculatura tumoral permite incrementar la eficacia de las terapias convencionales y ampliar el rango de posibilidades de utilización de las mismas. En este sentido, la teoría de la normalización vascular abre un nuevo espectro de posibilidades terapéuticas y reaviva la búsqueda de nuevos mediadores moleculares que permitan normalizar la vasculatura tumoral con el fin de mejorar la terapéutica de los tumores.



1.2 BIOLOGÍA TUMORAL Y RESPUESTA INMUNE

En la Argentina, así como en la mayoría de los países de Latinoamérica, el cáncer es la segunda causa de muerte por enfermedad luego de las patologías cardiovasculares. En los últimos años se ha reportado una tasa bruta de mortalidad por cáncer de 145,5 por cada 100.000 individuos (cifras informadas por el Ministerio de Salud de la Nación). Desde los estudios pioneros de Paul Ehrlich en los albores del siglo XX hasta la actualidad, una gran cantidad de evidencias sugieren que el sistema inmune juega un papel fundamental en la eliminación de cierto tipo de tumores. Sin embargo, una de las mayores paradojas de la Inmunología consiste en el crecimiento de tumores y establecimiento de metástasis, a pesar de la existencia de células T potencialmente capaces de reconocer antígenos tumorales y de erradicar dichos tumores (Dunn y col., 2004) Múltiples evidencias indican que la mayoría de los tumores han generado durante su desarrollo diversas estrategias para evadir o re-editar la respuesta inmune específica promoviendo la existencia de un microambiente tumoral inmunosupresor (Bui & Schreiber, 2007).

Diversos mecanismos han sido postulados para explicar el fenómeno de escape o evasión de la respuesta inmune anti-tumoral (Rabinovich y col., 2007a). Estos mecanismos incluyen defectos en la maquinaria de procesamiento y presentación de péptidos antigénicos (Crocí y col., 2007; Drake y col., 2006) (**Figura 1.6**) y la producción de factores inmunosupresores como el factor de crecimiento

transformante- β (TGF- β), IL-10 y Fas ligando los cuales imponen un bloqueo de la actividad y supervivencia de células T efectoras (**Figura 1.6**). Contribuyen a estos mecanismos, señales tolerogénicas características de microambientes tumoral tales como PD-L1 (Dong y col., 2002) la enzima indoleamina 2,3-deoxigenasa (IDO) (Uyttenhove y col., 2003) y el factor de transcripción STAT3 (Wang et al., 2004). Al conjunto de estos eventos tolerogénicos contribuyen procesos de inmunosupresión mediados por células T regulatorias naturales o inducibles capaces de silenciar la respuesta efectora anti-tumoral (Sakaguchi, 2004, Rabinovich y col., 2007) (**Figura 1.6**).

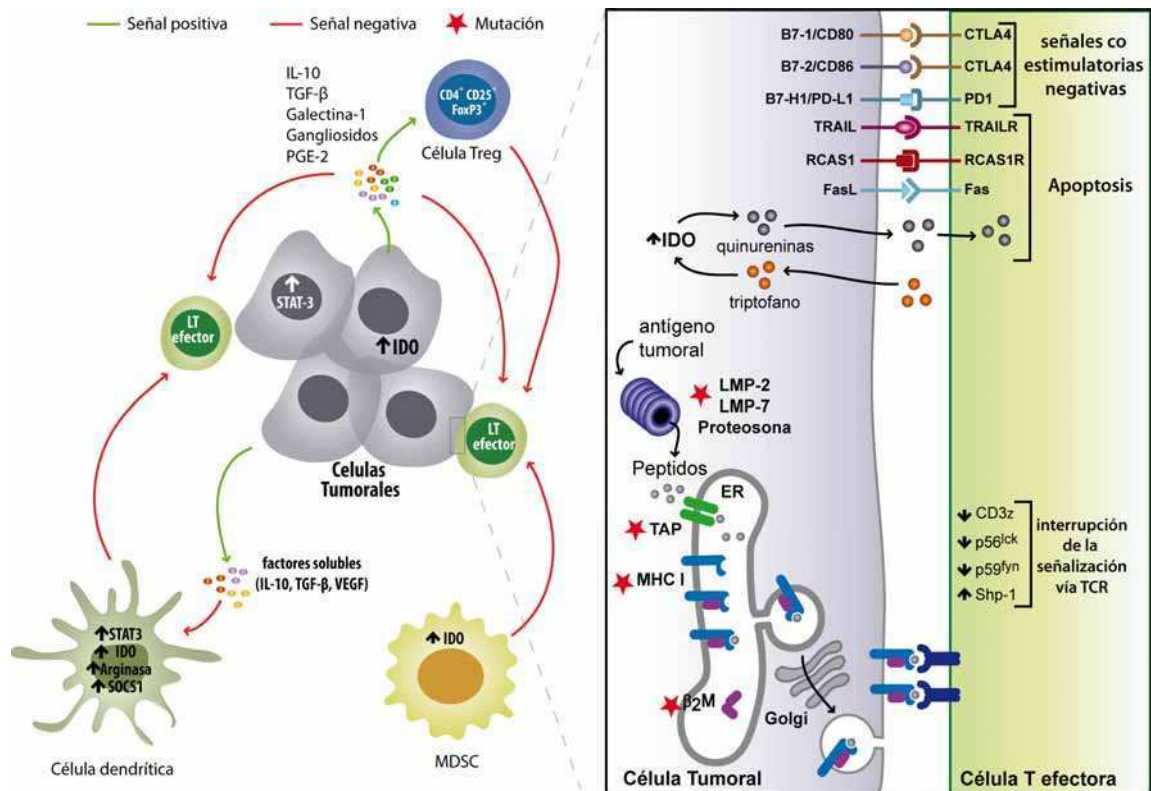


Figura 1.6. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune anti-tumoral. Los tumores desarrollan múltiples estrategias de inmunosupresión con el fin de frenar la respuesta inmune anti-tumoral y evadir la inmunovigilancia. Entre ellos, se destacan los defectos en la señalización del TCR y la maquinaria de presentación antigénica, que acompañado de la activación de señales co-estimuladoras negativas (CTLA-1/B7, PD-1/PD-L1), generan anergia y/ apoptosis de células T específicas contra el tumor. La producción de factores inmunosupresores (IL-10, TGF- β 1, PGE2, y Gal1), la activación de vías pro-apoptóticas (FAS-L, TRAIL, IDO, RCAS1), la inhibición de la citotoxicidad mediada por células NK y la inhibición de la diferenciación y maduración de DCs, son otras herramientas que utilizan los tumores para generar microambientes inmunosupresores. Por otro lado, el reclutamiento de células Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), DCs plasmocitoides (pDCs) y células mieloides supresoras (MDSC) ha mostrado ser estrategias frecuentes en fenómenos de escape tumoral.

La existencia de dichos circuitos tolerogénicos e inmunosupresores obstaculiza y limita la efectividad de estrategias de inmunoterapia y la generación de vacunas contra el cáncer, lo cual constituye uno de los mayores desafíos de la Ciencias Biomédicas de este milenio (Drake y col., 2006). Notablemente, varias de estas citoquinas y moléculas inhibitorias han sido asociadas en forma independiente a fenómenos de neovascularización, sugiriendo una íntima asociación entre fenómenos de tolerancia y angiogénesis (Kortylewski y col., 2005). Múltiples avances en los últimos años han demostrado que la inmunoterapia frente al cáncer no está lejos de ser una realidad tangible. Sin embargo, y a pesar de estos importantes avances un alto porcentaje de estrategias de vacunación e inmunoterapia han fracasado en ensayos clínicos. En este sentido, el diseño de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer deberá contemplar no sólo la potenciación de la respuesta inmune sino además el bloqueo de mecanismos de escape o contra-ataque tumoral.



1.3- GLICOSILACIÓN Y LECTINAS

La superficie de las células de mamíferos y las proteínas de la matriz extracelular con la cual interaccionan se hallan “decoradas” por diversos tipos de azúcares (glicanos) unidos a proteínas (glicoproteínas) y lípidos (glicolípidos) cuya composición varía de acuerdo al estado de diferenciación y activación de las células. El proceso de biosíntesis de glicoproteínas está mediado por glicosiltransferasas y glicosidasas que actúan en forma coordinada a medida que las proteínas son sintetizadas en el retículo endoplásmico y transportadas por el aparato de Golgi hacia la superficie celular (van Kooyk & Rabinovich, 2008; Rabinovich & Toscano, 2009). Las glicosiltransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un monosacárido de un nucleótido dador a un sustrato aceptor. Las glicosidasas catalizan la hidrólisis de un enlace glicosídico en un glicano precursor. Estas enzimas actúan en conjunto con chaperonas y cofactores en el retículo endoplásmico/ Golgi, a los fines de agregar y/o eliminar azúcares de una glicoproteína o glicolípidi y así determinar su estructura final (Bertozzi & Sasisekharan, 2009; Varki, 2009).

1.3.1 INTRODUCCIÓN A LAS DIFERENTES VÍAS DE GLICOSILACIÓN:

UNA PERSPECTIVA FUNCIONAL

La maquinaria de glicosilación representa un 1% del total del genoma y a la fecha se han clonado más de 100 glicosiltransferasas y glicosidasas (Ohtsubo & Marth, 2006). Curiosamente, el perfil de glicosiltransferasas que expresa una célula se halla altamente regulado y varía sensiblemente frente a numerosos estímulos externos. En

consecuencia, una misma célula en dos contextos diferentes puede presentar variaciones en el patrón de glicosilación que afectan y modulan la funcionalidad de las glicoproteínas de la membrana, constituyendo un nivel de regulación adicional de los procesos celulares. Es interesante destacar la complejidad del sistema, ya que debemos no sólo considerar la variabilidad a nivel de la estructura proteica (proteómica) sino a su vez la variabilidad creada a nivel del patrón de glicosilación (glicómica). En este sentido, durante el proceso de biosíntesis de un glicano, la diversidad de monosacáridos (fucosa, galactosa, *N*-acetilgalactosamina, glucosa, *N*-acetilglucosamina, ácido glucurónico, manosa, ácido siálico y xilosa), las distintas uniones posibles entre dos monosacáridos y la potencialidad de ramificaciones en la estructura sacarídica, resultan en una inmensa diversidad de estructuras de glicanos posibles (Bertozzi & Sasisekharan, 2009). Dentro de las distintas vías de glicosilación de mamíferos podemos destacar las vías de *N*-glicosilación y *O*-glicosilación. Los *N*-glicanos están covalentemente unidos al residuo asparragina de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr. Por el contrario los *O*-glicanos se hallan unidos covalentemente a un residuo Ser/Thr de la secuencia primaria y no están determinados por la presencia de secuencias consenso (Bertozzi & Kiessling, 2001).

Una de las funciones biológicas más relevantes de los *N*-glicanos está relacionada con la regulación y control del plegado de proteínas que se sintetizan en el RE. En este sentido, cabe destacar que todas las células eucarióticas sintetizan *N*-glicanos y que los primeros pasos de la vía de biosíntesis se hallan altamente conservados. No obstante, en las últimas etapas de su biosíntesis, los *N*-glicanos adquieren una gran diversidad estructural a medida que transitan por el aparato de Golgi. En los vertebrados, las proteínas secretadas o de la membrana plasmática pueden presentar *N*-glicanos del tipo alta manosa, híbridos o complejos, siendo estos últimos los más abundantes (**Figura 1.7**) (Paulson y col., 2006).

Las vías de O-glicosilación comienzan con la unión de un monosacárido como α -NAcGal a un residuo de serina o treonina. A partir de este monosacárido pueden sintetizarse diversas estructuras como los core 1, core 2, core 3 y core 4 O-glicanos. A su vez estos core O-glicanos pueden ser extendidos para formar estructuras más

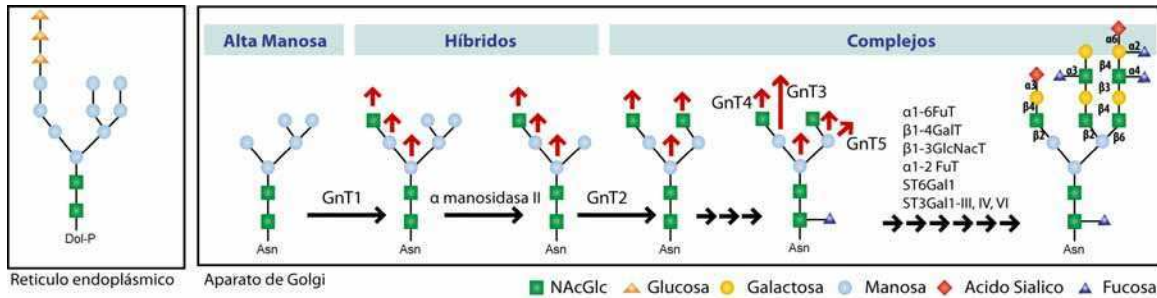


Figura 1.7. Biosíntesis y diversidad estructural de N-glicanos. Se esquematizan N-glicanos de alta manosa, híbridos y complejos. A su vez se detallan las distintas enzimas que participan en la síntesis. Adviértase, que en un N-glicano dado no se encuentran todos los productos de las enzimas detalladas ya que algunas compiten por un mismo sustrato.

complejas. Por lo tanto, el número de posibles sitios de N- y O-glicosilación en una secuencia primaria así como las enzimas presentes en el sistema RE/Golgi son elementos claves que determinan el grado y tipo de glicosilación de una proteína (Gagneux & Varki, 1999).

Considerando la amplia diversidad y distribución que poseen los glicoconjugados (glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos), resulta sencillo visualizar que estas estructuras median una amplia variedad de efectos biológicos. Estos efectos en general se pueden agrupar en dos tipos: (1) funciones estructurales del glicano en sí mismo o la modulación de la molécula a la cual están covalentemente unidos y (2) funciones relacionadas al reconocimiento de la estructura sacarídica por proteínas con dominios de reconocimiento de carbohidratos (lectinas). Se han descrito diversos tipos de lectinas involucradas en la regulación de múltiples procesos biológicos (ej., fertilización, embriogénesis y reconocimiento de patógenos). Respecto a su participación en procesos inmunológicos, se ha observado que diferentes familias de lectinas (ej: colectinas, selectinas, siglecs, galectinas) cumplen papeles críticos en procesos diversos como reconocimiento de patógenos, activación y

diferenciación linfocitaria y procesos de regulación homeostática. En el presente trabajo de tesis focalizaremos nuestra atención en la familia de las galectinas.

1.3.2 GALECTINAS

Las galectinas constituyen una familia de proteínas altamente conservadas a través de la evolución con capacidad de unir residuos sacarídicos presentes en diferentes glicoproteínas de la membrana plasmática y la matriz extracelular (Leffler y col., 2004). Estas proteínas reconocen en forma específica unidades repetitivas [Gal β 1-4-NAcGlc] o poli-LacNAc, presentes en *N*- y *O*-glicanos, a través de un dominio altamente conservado de 135 aminoácidos, denominado dominio de reconocimiento de carbohidratos (CDR) (Cooper, 2002). Se han identificado 15 galectinas en mamíferos, las cuales se clasifican de acuerdo a su estructura en galectinas “proto-tipo”, “tipo quimera” y “repeticiones en tándem” (**Figura 1.8**) (Yang y col., 2008).


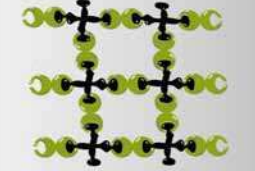

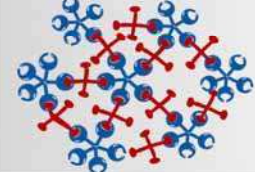

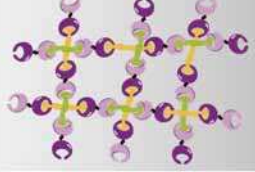
Clasificación (tipo)	Estructura	Interacción Galectina -Glicano (lattices)
Prototipo Galectina-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 y 15	 <p>un sitio CRD puede homodimerizar</p>	
Quimera Galectina-3	 <p>un sitio CRD conectado a un dominio BH3 no relacionado</p>	
Repeticiones en tándem Galectina-4, 6, 8, 9, 12	 <p>Dos CRDs distintos conectados por un péptido</p>	

Figura 1.8. Clasificación de estructural de las galectinas. De acuerdo a su estructura bioquímica las galectinas se clasifican en tres grupos diferentes. Las galectinas prototipo contienen un sitio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) por subunidad, a su vez, éstas pueden homodimerizar. Los dímeros a través de la unión a carbohidratos en las glicoproteínas de la membrana formarían estructuras complejas dando lugar a rearrreglos de la membrana (lattices) las cuales estarían implicadas en los efectos biológicos y la señalización disparada luego de la unión de las galectinas. Galectina-3 (la única tipo quimera) posee un CDR en el extremo C-terminal y un dominio no relacionado (BH3) en el extremo N-terminal. Este último es responsable de los efectos intracelulares de esta lectina. Las galectinas del tipo “repeticiones en tándem” son un grupo de galectinas bivalentes formadas por dos monómeros con CRDs de distinta afinidad unidos por un péptido conector.

Las galectinas pueden localizarse en diferentes tejidos y compartimientos celulares de diferentes especies animales y se han descrito para las mismas diversas funciones intracelulares y extracelulares (Rabinovich & Toscano, 2009; Rabinovich y col., 2007b) (**Figura 1.9**). Si bien estas proteínas se encuentran en el medio extracelular, en su secuencia primaria no poseen péptido líder lo cual impide su secreción por la vía clásica dependiente del RE y el aparato de Golgi; en cambio estas proteínas son liberadas al medio extracelular por un mecanismo atípico denominado ectocitosis

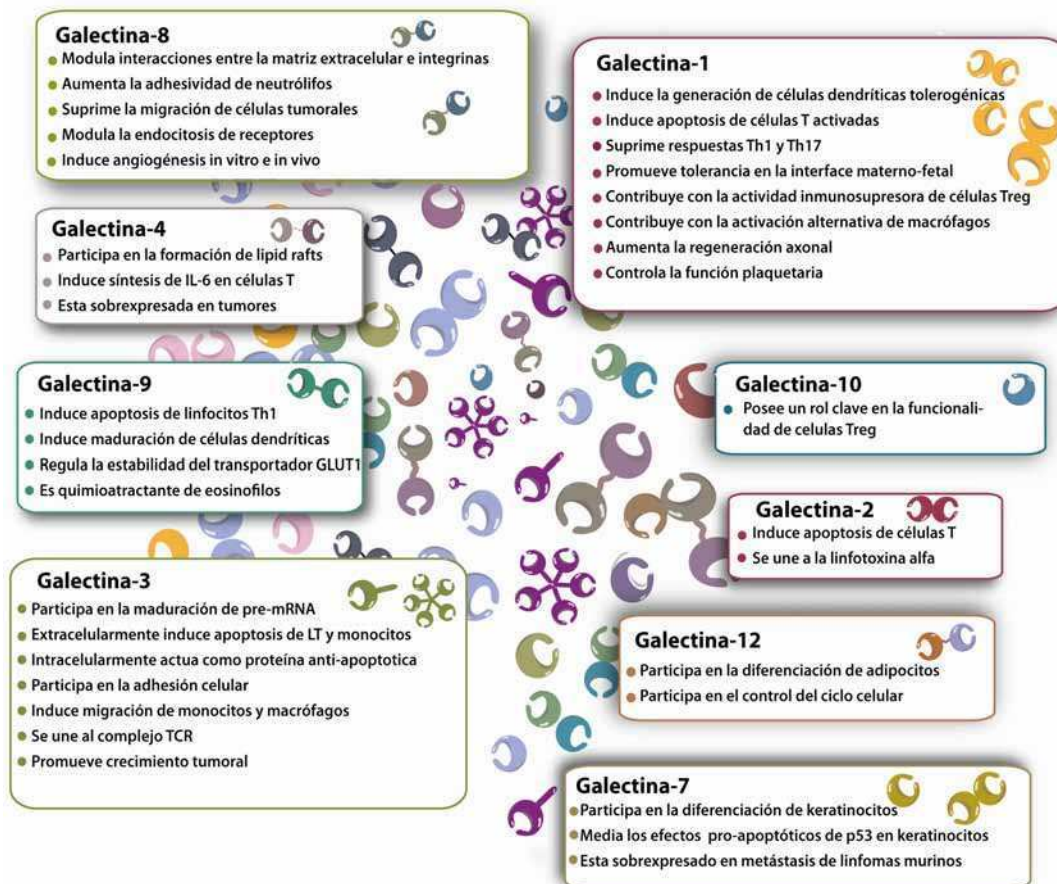


Figura 1.9. Efectos de diversas galectinas en la fisiología del sistema inmune y los tumores. Diferentes funciones han sido atribuidas a los diversos miembros de esta familia de proteínas de unión a carbohidratos, en esta figura se muestran algunas de las más relevantes. (Adaptado de Yang et al, 2008)

(Yang y col ., 2008).

Durante los últimos años se ha involucrado a esta familia de lectinas en diversos procesos biológicos como reguladores de la homeostasis de la respuesta inmune (Rabinovich & Toscano, 2009), de la progresión tumoral (Liu & Rabinovich, 2005) y la

neovascularización (Cardenas Delgado et al., 2011; Markowska et al., 2010; Thijssen et al., 2006). Algunas galectinas como galectina-1 y -3, se expresan en una amplia variedad de tejidos mientras que otras poseen un patrón de expresión más restringido como galectina-4 en el sistema gastrointestinal, galectina-10 en eosinófilos, galectina-12 en tejido adiposo y galectina-7 en queratinocitos (Cerliani y col., 2011).

GALECTINA-1 (Gal1)

Durante la última década numerosas evidencias asignan a galectina-1 (Gal1), un miembro 'proto-tipo' de la familia de galectinas, una función crítica en la homeostasis de la respuesta inmune (Rabinovich y col., 2007b; Yang y col., 2008). Esta proteína es capaz de inhibir la proliferación y expansión clonal de linfocitos T activados, mediante mecanismos que involucran bloqueo de la activación (Chung y col., 2000) , arresto del ciclo celular (Blaser y col., 1998; Rabinovich y col., 2007a) e inducción de apoptosis (He & Baum, 2004; Rabinovich y col., 2000; Rabinovich y col., 1998). A su vez se ha demostrado que esta proteína, a bajas concentraciones, posee propiedades inmunosupresoras independientes de su efecto pro-apoptótico ya que es capaz de inhibir la adhesión de linfocitos T activados a diferentes proteínas de la matriz extracelular, tales como laminina y fibronectina, y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IFN- γ (Rabinovich y col., 1999).

Las propiedades anti-inflamatorias de Gal1 han sido ampliamente demostradas en numerosos modelos experimentales de inflamación crónica y autoinmunidad como la artritis inducida por colágeno II, la colitis inducida por ácido sulfónico-trinitrobenzeno (TNBS), la hepatitis inducida por concanavalina A, la diabetes espontánea en ratones NOD y la uveítis autoinmune experimental entre otros (revisado en Rabinovich & Toscano, 2009). Más aún, recientemente se ha demostrado que Gal1 se expresa en forma incrementada en células T regulatorias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ contribuyendo a su potencial inmunosupresor (Garin y col., 2007). Sin embargo, uno de los hallazgos más consistentes en esta área de investigación se halla asociado a la expresión abundante

de Gal1 en diversos tipos de tumores tales como próstata, melanoma, ovario, y mama. Además en la mayoría de estos tumores la expresión de Gal1 se asocia a la malignidad y al potencial metastático de los mismos (Danguy y col., 2002; Liu & Rabinovich, 2005). En este contexto, en los últimos años en nuestro laboratorio demostramos que Gal1 juega un papel crítico en fenómenos de escape tumoral al modular la producción de citoquinas anti-inflamatorias y la supervivencia de células T (Rubinstein y col., 2004). En un modelo singéneo de melanoma, el bloqueo de la expresión génica de Gal1 generó un incremento de la respuesta inmune antitumoral mediada por células CD8 y CD4 del tipo T *helper* (Th)1 (Rubinstein y col., 2004). Este fenómeno fue confirmado en linfoma clásico Hodgkin donde observamos que Gal1, presente en células de *Reed-Sternberg*, confiere privilegio inmunológico a estas células a través de un mecanismo dependiente del factor de transcripción AP1 (Juszczynski y col., 2007). Por otro lado, en biopsias de pacientes con carcinoma de cabeza y cuello se logró establecer una conexión causal entre la expresión de Gal1 en sitios hipóxicos y el escape tumoral (Le y col., 2005). Recientemente Kuo y colaboradores confirmaron estos hallazgos demostrando que células de carcinoma de pulmón escapan de la respuesta inmunológica a través de la secreción de Gal1 la cual modula vías dependientes de IL-10 y del factor de transcripción Id3 (Kuo y col., 2011).

En búsqueda de mecanismos celulares y moleculares involucrados en la acción inmunosupresora de esta proteína, nuestro laboratorio demostró que Gal1 es capaz de unirse en forma diferencial a células T efectoras y ejercer en forma selectiva su actividad reguladora. Mientras que células Th1 y Th17 comparten el repertorio de glicanos específicos de Gal1, células Th2 son resistentes a la unión y acción pro-apoptótica de esta proteína debido a un glicofenotipo 'no permisivo' rico en ácido siálico en posición α 2-6 (SA α 2-6) (Toscano y col., 2007). Asimismo, en un modelo experimental de rechazo fetal inducido por *stress*, observamos que la administración de Gal1 restaura la tolerancia mediante el desvío de la respuesta inmune hacia un

perfil Th2 y la expansión de células T regulatorias (Blois y col., 2007). Por otro lado, recientes evidencias de nuestro laboratorio revelaron que Gal1 a través de su interacción con glicanos específicos es capaz de iniciar en DCs un circuito tolerogénico mediado por las citoquinas IL-27 e IL-10 (Ilarregui y col., 2009). Este circuito permitiría controlar procesos autoinmunes y neoplásicos, activando en forma jerárquica mecanismos de inmunosupresión (**Figura 1.10**).

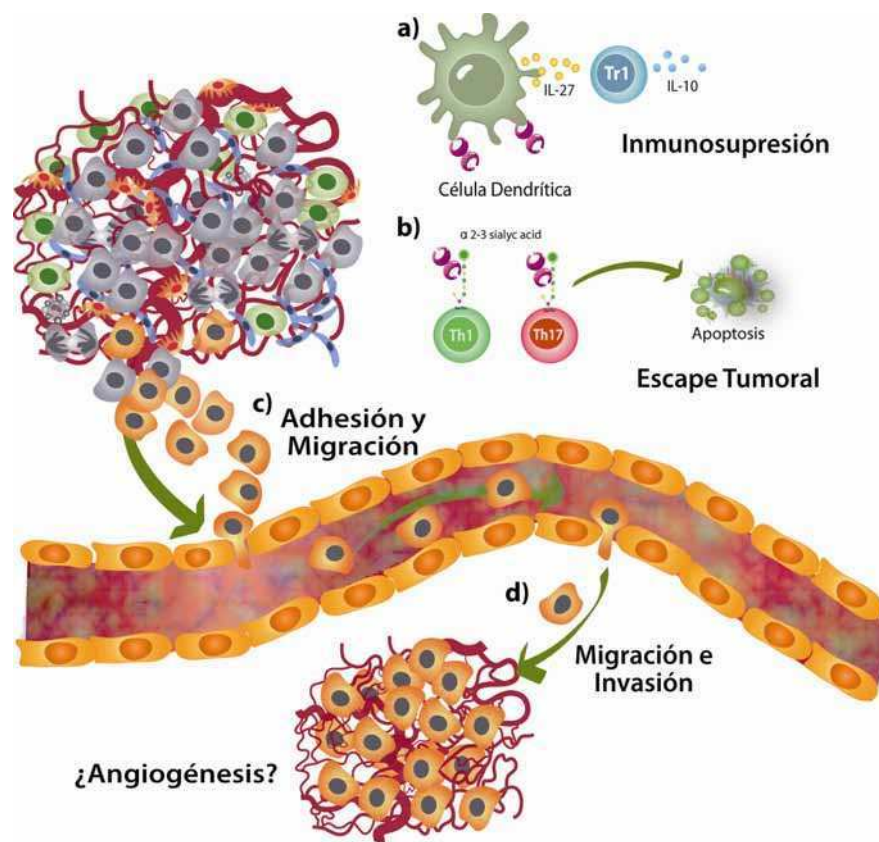


Figura 1.10. Rol de Gal1 en la progresión tumoral. La expresión de Gal1 ha sido reportada en numerosos tipos tumorales y se encontró asociada a numerosos eventos de la cascada que lleva a la progresión y metástasis de los mismos. **A)** la expresión de Gal1 en tumores puede desviar la respuesta inmune hacia perfiles tolerogénicos que frenan la respuesta anti-tumoral. En este sentido, Gal1 es capaz de inducir la generación de células dendríticas tolerogénicas que disparan una respuesta regulatoria mediada por IL-27 e IL10. Contribuyendo a la generación de inmunosupresión **B)** La presencia de Gal1 desvía la respuesta de células T hacia perfiles Th2 al inducir apoptosis específicamente a células Th1 y Th17. Esto lleva a fenómenos de escape a la respuesta inmune anti-tumoral. **C)** La expresión de Gal1 en células tumorales y en el estroma regula fenómenos de agregación homotípica y heterotípica además de promover la migración de células tumorales *in vitro*. **D)** Los efectos de Gal1 sobre la migración están acompañados de una mayor capacidad invasiva lo que hace a las células potencialmente metastásicas con capacidad de colonizar órganos distantes. No obstante el rol de Gal1 en la neovascularización, otro evento clave de la progresión tumoral, no ha sido extensamente explorado.

1.3.3 LECTINAS Y GLICANOS EN PROCESOS DE NEOVASCULARIZACIÓN

Una gran variedad de glicanos, decoran la superficie de las células de nuestro organismo (Ohtsubo & Marth, 2006). La glicosilación diferencial permite controlar procesos críticos de la respuesta inmune incluyendo la activación de células T (Demetriou y col., 2001), la migración linfocitaria (van Kooyk & Rabinovich, 2008) y la síntesis de citoquinas (Morgan y col., 2006) al crear o enmascarar ligandos para lectinas endógenas (Paulson y col., 2006; van Kooyk & Rabinovich, 2008). Recientemente estudios que involucraron manipulación genética de la vías de *N*- u *O*-glicosilación revelaron que las lectinas poseen importantes funciones en el control de la activación y señalización de receptores de factores de crecimiento (Dam & Brewer, 2010; Dennis y col., 2009; Ohtsubo & Marth, 2006). Interesantemente, estudios de Lau y col. identificaron un mecanismo de regulación metabólica que involucra la modulación de *N*-glicanos complejos en receptores de factores de crecimiento altamente *N*-glicosilados (EGFR, PDGFR, FGFR, IGFR) en respuesta a los niveles de hexosaminas, el cual determina si una célula entra en reposo o ingresa en una fase proliferativa (Lau y col., 2007). Estos hallazgos ponen en evidencia la capacidad del sistema lectina-glicanos de sintonizar respuestas celulares a través de la modulación de la actividad de receptores de membrana.

La regulación de la glicosilación también es capaz de modular fenómenos de neovascularización. La presencia de diferentes estructuras sacarídicas en el receptor Notch puede afectar la unión a sus ligandos Delta-like 4 (DLL4) o Jagged1 controlando en forma positiva o negativa procesos de angiogénesis (Benedito y col., 2009). También ha sido demostrado que la glicosilación del co-receptor de VEGFR2, neuropilina-1 (NRP-1) regula la unión del ligando VEGF. Más aun, modificaciones en glicosaminoglicanos de NRP1 modulan diferencialmente las funciones de VEGFR2 en CEs y en pericitos (Shintani y col., 2006). Recientes evidencias indican que la presencia de SA α 2-6 regula la agregación homotípica entre CEs al retener en

membrana la molécula de adhesión PECAM (Kitazume y col., 2010). Interesantemente, el glicoma de las CEs estaría sujeto a fluctuaciones en función de diferentes condiciones de cultivo (Garcia-Vallejo y col., 2006; Willhauck-Fleckenstein et al., 2010). En este sentido, un trabajo reciente estudió la expresión de genes relacionados a la modulación del glicoma en CEs activadas con VEGF o TNF. (Willhauck-Fleckenstein et al., 2010). Estos datos revelan una fina regulación de la glicosilación de CEs en diferentes condiciones microambientales, sugiriendo una activa participación de los glicanos en la regulación de la angiogénesis.

Recientemente se demostró que Gal1 se expresa en CEs activadas en respuesta a estímulos inflamatorios y en endotelios tumorales, pudiendo estar implicada en diversas etapas de la progresión tumoral (Thijssen y col., 2007). Otras evidencias sugieren un posible rol del Gal1 en la biología de CEs al vincular la expresión de esta lectina en las mismas con fenómenos de migración de estas células (Hsieh y col., 2008; Thijssen y col., 2006). Estudios transcripcionales en tumores de células pequeñas de cabeza y cuello identificaron a Gal1 como parte del transcriptoma inducido por hipoxia (Le y col., 2005). En este estudio, la expresión tumoral de Gal1 fue asociada en forma positiva a la expresión de CA IX (marcador de hipoxia) y negativamente a la presencia de células CD3⁺ (Le y col., 2005), poniendo en evidencia la posible vinculación entre la hipoxia tumoral y fenómenos de escape mediados por esta lectina. En este sentido, estudios recientes en cuatro líneas celulares de cáncer colorectal mostraron que la sobreexpresión ectópica de HIF-1 α incrementa los niveles de expresión de Gal1 (Zhao y col, 2010). Además, la sobreexpresión de Gal1 restaura la capacidad migratoria de líneas celulares deficientes en HIF-1 α (Zhao y col., 2010). Estos resultados sugieren un posible rol de HIF-1 α en la expresión hipóxica de Gal1. Más aún, en una serie de trabajos recientes, Thijssen y col. buscando receptores para un péptido con propiedades anti-angiogénicas (Anginex) identificaron a Gal1 como posible receptor del mismo en CEs (Thijssen y col., 2006). Más aún, estos autores

encontraron que las CEs pueden “captar” Gal1 proveniente de tumores la cual promueve específicamente la activación de la vía de señalización de H-Ras/Raf (Thijssen y col., 2010). Sin embargo, aún no se ha develado la relevancia biológica del ‘glicoma’ de CEs en fenómenos de neovascularización y el papel crítico de Gal1 y sus glicanos específicos en estos procesos. En este escenario, son necesarias mayores evidencias *in vitro* e *in vivo* acerca del mecanismo de acción de las galectinas y la importancia del reconocimiento sacarídico en relación a procesos de neovascularización tumoral e inmunosupresión a los fines de comprender el rol clave de la glicosilación de receptores de superficie en fenómenos de señalización celular y diseñar estrategias terapéuticas más racionales capaces de modular en forma simultánea compartimientos vasculares e inmunológicos.

El diseño de estrategias de inmunoterapia contra el cáncer deberá contemplar en un futuro, no sólo la potenciación de la respuesta inmune, sino además, el bloqueo de los mecanismos de escape y neovascularización de manera integrada (Jinushi & Dranoff, 2007). Dadas las propiedades inhibitorias de Gal1 en la respuesta inmune antitumoral (Juszczynski y col., 2007; Rubinstein y col., 2004; Salatino y col., 2008) y las observaciones acerca del posible rol de Gal1 en la biología vascular, nos propusimos en el transcurso de esta tesis, investigar por un lado el papel de Gal1 y sus glicanos específicos en fenómenos de neovascularización focalizando en las vías celulares y moleculares involucradas, y por el otro en el diseño de estrategias terapéuticas tendientes a inhibir la interacción entre Gal1 y glicanos en tumores a los fines de transferir nuestros hallazgos básicos generados en los últimos años a posibles ensayos clínicos.

De este modo, los resultados obtenidos en esta tesis permitirán aportar información crítica para el diseño racional de nuevas estrategias terapéuticas tendientes a inhibir la acción inmunosupresora y pro-angiogénica de Gal1 y sus glicanos en el microambiente tumoral. El bloqueo de Gal1 podría tener impacto

simultáneo a nivel de los compartimientos vascular e inmunológico inhibiendo la angiogénesis tumoral, promoviendo la normalización vascular y favoreciendo el desarrollo de la respuesta inmune anti-tumoral. Estos efectos determinarían a su vez disminución del crecimiento y la capacidad metastásica de los tumores, y contribuirían a la erradicación de los mismos por acción de las células y/o mecanismos efectores del sistema inmune.

2.OBJETIVOS

En función de los antecedentes expuestos los objetivos de la presente tesis doctoral

son:

1. Explorar la relevancia del 'glicoma' de células endoteliales focalizando en la regulación de la expresión de Gal₁ y sus ligandos sacarídicos en la interfase tumor-endotelio.
2. Estudiar la relevancia de Gal₁ y sus glicanos específicos en fenómenos de neovascularización tumoral e investigar los mecanismos celulares y moleculares involucrados.
3. Evaluar el efecto del silenciamiento génico de Gal₁ en el desarrollo de tumores humanos y murinos.
4. Desarrollar anticuerpos monoclonales bloqueantes de la interacción de Gal₁ y sus glicanos e investigar su potencial terapéutico en fenómenos de neovascularización y escape tumoral.
5. Evaluar la expresión de Gal₁ y su asociación con fenómenos de neovascularización en biopsias de pacientes con tumores de distintos orígenes.

3. RESULTADOS

3.1 LA GLICOSILACIÓN DIFERENCIAL REGULA PROCESOS DE BIOLOGÍA VASCULAR MODULANDO LA INTERACCIÓN ENTRE LECTINAS Y GLICANOS

3.1.1 GLICOSILACIÓN DIFERENCIAL DE CÉLULAS ENDOTELIALES EN MICROAMBIENTES TOLEROGÉNICOS O INFLAMATORIOS

A los fines de investigar si las interacciones entre galectinas y glicanos contribuyen a la angiogénesis, examinamos en primer lugar el perfil de glicosilación de cultivos primarios de células endoteliales humanas aisladas de cordón umbilical (HUVEC) bajo distintas condiciones experimentales que recapitulan las condiciones frecuentes en diferentes microambientes tumorales (proliferativos, tolerogénicos, inflamatorios o hipóxicos) relevantes en fenómenos de neovascularización. A fin de evaluar la presencia de glicanos en la superficie celular, utilizamos un panel de lectinas vegetales biotiniladas capaces de reconocer diferentes estructuras sacarídicas en *N* y *O* glicanos, el cual nos permitió trazar una “cartografía” de los glico-epitopes presentes en la superficie de CE. Las diferentes estructuras reconocidas por dichas lectinas se muestran en la **Figura 1A**

Tal como fue mencionado en la introducción, Gal1 reconoce unidades repetitivas de residuos de galactosa- β 1-4-N-acetilglucosamina (poli-LacNAc) las cuales pueden estar presentes en *N*- u *O*- glicanos (Hirabayashi y col., 2002). De este modo, la expresión de glicosiltransferasas y glicosidasas durante el remodelado vascular pueden servir de base para crear o enmascarar ligandos de poli-LacNAc y determinar la susceptibilidad de las células a la acción de Gal1. El análisis de la glicosilación de HUVEC en condiciones basales mostró una potente reactividad para la lectina L-fitohemaglutinina (L-PHA) (**Figura 1B**) capaz de reconocer ramificaciones en

N-glicanos generadas por la enzima *N*-acetil-glucosaminiltransferasa 5 (GnT5) y una alta reactividad de la lectina *Lycopersicon esculentum* (LEL) (**Figura 1B**) que reconoce residuos poli-LacNAc en *N*- y en *O*-glicanos. Teniendo en cuenta la participación protagónica de los residuos de ácido siálico (AS) en la regulación de la unión de Gal1 a diversos tipos celulares (Toscano y col., 2007), evaluamos la presencia de AS en posición α 2-6 y α 2-3 los cuales restringen o permiten la unión de Gal1 respectivamente. El análisis por citometría de flujo de células HUVEC reveló niveles bajos de AS α 2-6, evidenciados por la unión de la lectina *Sambucus nigra* (SNA) (**Figura 1B**), en contraste con los altos niveles de AS α 2-3 evaluados a través de la reactividad de la lectina *Maackia amurensis* (MAL II) (**Figura 1B**). Estos resultados demuestran que la expresión reducida de AS α 2-6 no representa una pérdida global de ácido siálico en la membrana de CEs, sino una regulación diferencial de la biosíntesis de los glicanos. Finalmente, estudiamos la presencia de estructuras específicas en *O*-glicanos por medio de las lectinas *Peanut agglutinin* (PNA) y *Helix pomatia* (HPA) que reconocen la ausencia del core 1 y la disponibilidad del sustrato para la enzima β 1-6-*N*-acetil-glucosaminiltransferasa-1 (GCNT1) que genera core 2, los cuales son susceptibles a la adición posterior de poli-LacNAc. El análisis de la unión de estas lectinas a *O*-glicanos reveló: alta unión de PNA y nula reactividad para HPA (**Figura 1B**), sugiriendo una amplia disponibilidad de estructuras del tipo core 2 en *O*-glicanos las cuales representan posibles sitios de unión para Gal1. En conjunto, estos datos indican que las CEs poseen un perfil de glicosilación permisivo para la unión de Gal1, con alto número de ramificaciones en *N*-glicanos, abundancia de residuos terminales de poli-LacNAc y presencia limitada de SA α 2-6.

A los fines de evaluar cambios en el perfil de glicosilación en respuesta a estímulos del microambiente, estudiamos el repertorio de glicanos específicos de Gal1 en CEs expuestas a la acción de diferentes citoquinas y factores de crecimiento. Notablemente, la exposición de HUVEC a IL-10 y/o TGF- β 1, ambas citoquinas capaces de disparar señales anti-inflamatorias o tolerogénicas provocó un incremento

significativo en la exposición de glicanos complejos tanto en posiciones *N*- como en *O*- , evidenciada por la mayor reactividad de las lectinas PNA, L-PHA y LEL (**Figura 1C**). Una tendencia similar fue observada luego del tratamiento de las células HUVEC con el potente estímulo proliferativo bFGF (**Figura 1C**). Por otro lado, observamos una reducción en la presencia de residuos de SA α 2-6 (disminución de la unión de SNA) en condiciones tolerogénicas y proliferativas, no observando cambios en la cantidad de residuos SA α 2-3 (unión de MAL II) (**Figura 1C**). En contraste, HUVEC tratadas con citoquinas pro-inflamatorias como TNF, IFN- γ (estímulo Th1), o IL17 (estímulo Th17), mostraron una significativa reducción en el número de glico-epítipes permisivos para la unión de Gal1 evidenciado por una menor reactividad para L-PHA y un aumento en los ligando de SNA (**Figura 1C**). En conjunto, estos resultados surgieron que señales pro-inflamatorias (IFN- γ , TNF, IL-17) o anti-inflamatorias (IL-10 y TGF- β 1) pueden enmascarar o desenmascarar secuencias de poli-LacNAc regulando así la unión de Gal1 a CEs. Más aún, los datos demuestran que, estímulos tolerogénicos, comúnmente encontrados en microambientes tumorales (particularmente durante estadios avanzados de escape tumoral) favorecen la exposición de glico-epítipes permisivos para Gal1, mientras que las señales pro-inflamatorias tienden a limitar la abundancia de los mismos, enfatizando el concepto de que la regulación del glicoma celular es dinámica y diferentes condiciones del microambiente pueden crear, modificar o interrumpir sitios de unión para lectinas endógenas.

Con el fin de determinar si esta remodelación del glicoma facilita la *interacción* entre Gal1 y glicanos, evaluamos la capacidad de unión de Gal1 a la superficie de HUVEC bajo diferentes condiciones experimentales. A estos fines, conjugamos Gal1 recombinante humana generada en nuestro laboratorio (Barrionuevo et al., 2007) con el fluorocromo DyLight488 (488-Gal1) y analizamos por citometría de flujo la unión de 488-Gal1 a CEs. Los datos obtenidos revelan que Gal1 se une a la superficie de células HUVEC de manera dosis y carbohidrato-dependientes ya que el disacárido específico lactosa pero no sacarosa es capaz

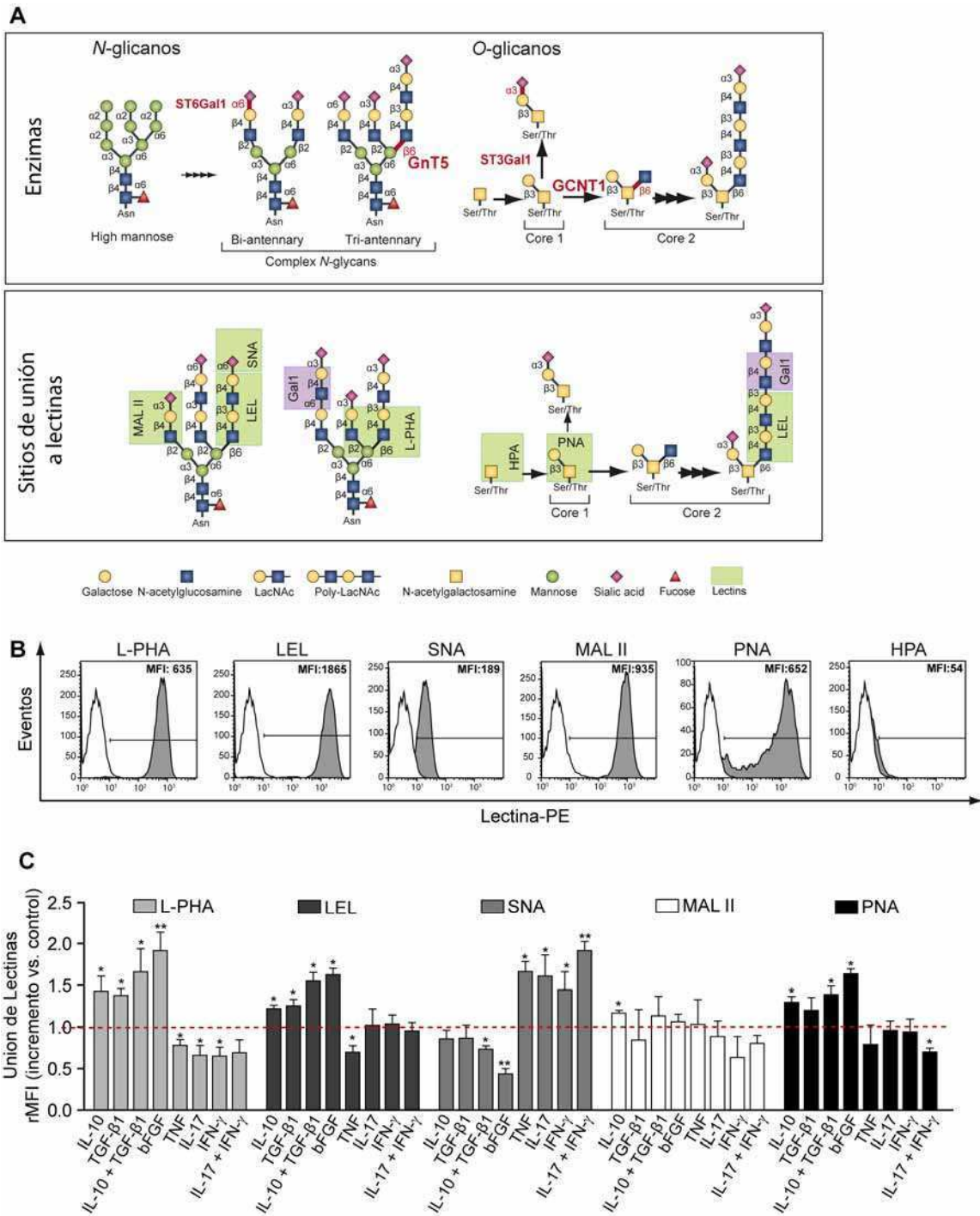
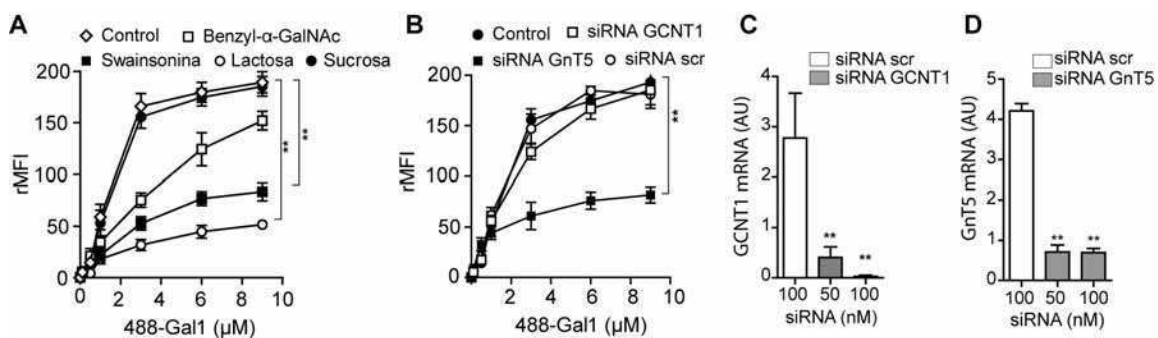


Figura 1. Diferentes estímulos regulan en forma diferencial el perfil de glicosilación de CE. (A) Representación esquemática (arriba) de la biosíntesis de *N*-y *O*- glicanos incluyendo las glicosiltransferasas relevantes como α 2,6 sialiltransferasa-1 (ST6Gal1), N-acetil-glucosaminiltransferasa 5 (GnT5), α 2,3 sialiltransferasa 1 (ST3Gal1) y core 2 N-acetilglucosaminiltransferasa 1 (GCNT1), (abajo) sitios de unión para las diferentes lectinas MAL II, LEL, SNA and L-PHA en *N*-glicanos complejos, y HPA, PNA y LEL en *O*-glicanos. Se indica además, el ligando glicosilado más relevante para la unión de Gal1 (LacNac). (B) Repertorio de glicanos en CE bajo condiciones de reposo (2/ FCS) determinada como la unión de lectinas biotiniladas L-PHA, LEL, SNA, MAL II, PNA and HPA (histogramas grises) o estreptavidina-PE sola como control (histogramas blancos). Los datos son representativos de 6 experimentos independientes. (C) Repertorio de glicanos en CE incubadas con estímulos proliferativos (bFGF), tolerogénicos (IL-10 y/o TGF- β ₁) o inflamatorios (TNF, IFN- γ y/o IL-17). rMFI (intensidad de fluorescencia media relativa) = (MFI con lectina – MFI sin lectina) / MFI sin lectina. Los datos representan el incremento de la rMFI relativa a condiciones de reposo (línea de puntos). Las barras representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ versus control.

de desplazar dicha interacción (**Figura 2A**). A los fines de determinar la contribución parcial de *N* y *O*-glicanos en la unión de Gal1 a CEs, analizamos la capacidad de esta lectina de unirse a células HUVEC tratadas con inhibidores selectivos de vías de *N*- y *O*-glicosilación. La presencia de swainsonina, un inhibidor de α -manosidasas que bloquea la biosíntesis de *N*-glicanos en etapas tempranas, eliminó completamente la unión de Gal1 a HUVEC mientras que la presencia del competidor metabólico de la elongación de *O*-glicanos, benzil- α -GalNAc, tiene un efecto parcial sobre la unión de Gal1 a estas células (**Figura 2A**). Dado que la inhibición de la glicosilación en etapas muy tempranas de la biosíntesis de proteínas puede también afectar el tráfico de las mismas hacia la membrana y por lo tanto disminuir el número de receptores en la superficie celular, decidimos entonces, realizar estrategias experimentales alternativas a los fines de descartar este efecto. Estas aproximaciones incluyeron experimentos de silenciamiento con RNAi a los fines de inhibir en forma selectiva la expresión de glicosiltransferasas claves para la generación de estructuras sacarídicas de unión a Gal1. Observamos que el silenciamiento de la enzima GnT5, responsable de generar ramificaciones de β 1,6-*N*-acetil-glucosamina en *N*-glicanos, elimina completamente la unión de Gal1 a CEs (**Figura 2B, D**) mientras que la inhibición de la síntesis de *O*-glicanos complejos por silenciamiento de la enzima GCNT1 no tuvo ningún efecto



(Figura 2B, C). Estos datos demuestran claramente no sólo la relevancia de los *N*-glicanos complejos en la unión de Gal1 a CEs sino además, denotan la especificidad de este efecto biológico.

Dada la creciente relevancia que ha cobrado el fenómeno de hipoxia tumoral como actor principal en la regulación de microambientes tumorales (Pugh & Ratcliffe, 2003) y teniendo en cuenta su papel crítico como fenómeno disparador de señales pro-angiogénicas, nos propusimos evaluar la capacidad de los microambientes hipóxicos de influenciar el perfil de glicosilación de CEs. La exposición de células HUVEC a condiciones de hipoxia (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) indujo un marcado incremento en las ramificaciones β1-6 en *N*-glicanos complejos (unión de L-PHA) y en el número de residuos poli-LacNAc (unión de LEL), además de una considerable reducción en la abundancia de ASα2-6 (reactividad de SNA) sin cambios apreciables en el número de asialo-core 2 O-glicanos (unión de PNA) o ASα2-3 (MAL II) **(Figura 3A)**. Estos datos, de manera similar a lo ocurrido en condiciones tolerogénicas y proliferativas, sugieren una modulación dinámica de la expresión de azúcares en la membrana de CEs en respuesta a hipoxia, lo que además redundó en un incremento de estructuras esenciales para la unión de Gal1. Finalmente, y en concordancia con el extensivo remodelado del glicoma en diferentes condiciones experimentales, encontramos que la unión de Gal1 a HUVEC se encuentra altamente regulada por estímulos del microambiente. De este modo, la unión de Gal1 fue mucho mayor en ambientes tolerogénicos y proliferativos en comparación con estímulos pro-inflamatorios **(Figura 3B)**. Más aún, la unión de Gal1 a HUVEC incrementó de manera considerable en condiciones hipóxicas respecto a ambientes con niveles normales de oxígeno (normoxia) **(Figura 3C, D)**. Estos resultados nos permitieron concluir que la frecuencia de exposición de *N*-glicanos complejos en la superficie celular puede influenciar la biología vascular a través de la formación de interacciones entre Gal1 y glicanos, los cuales se establecen preferencialmente en condiciones de proliferación, inmunosupresión, tolerancia inmunológica e hipoxia.

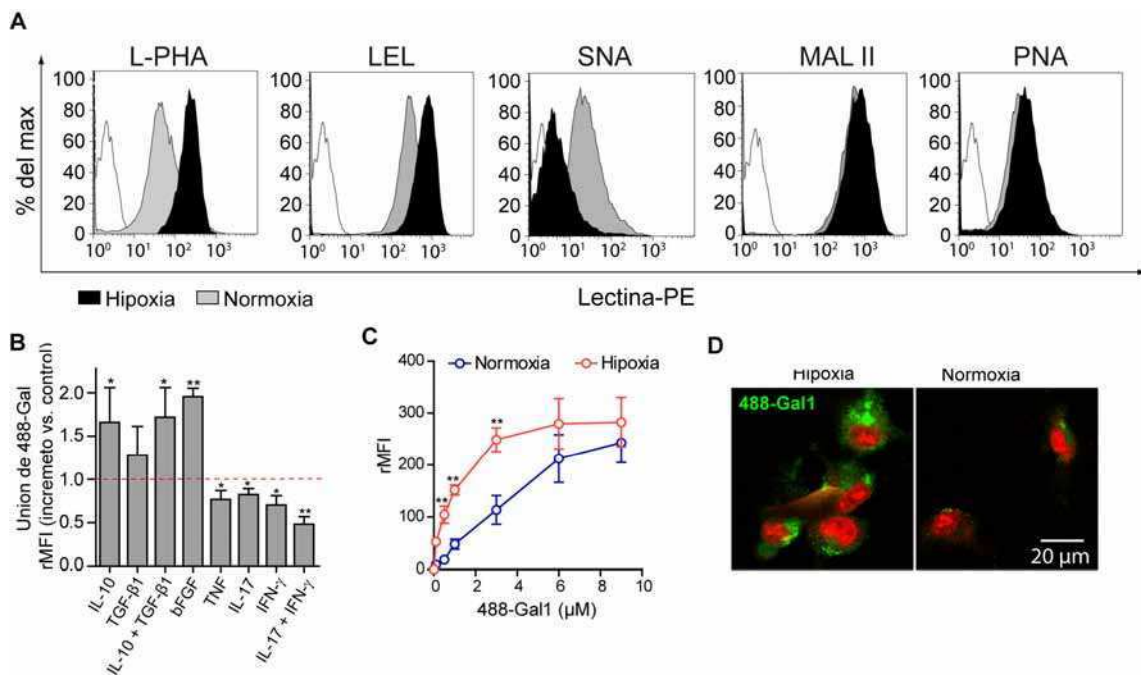


Figura 3. La hipoxia modula la glicosilación y la unión de Gal1 a CEs. (A) Repertorio de glicanos en CEs incubadas en condiciones de hipoxia (1/ O₂) (histogramas negros) o normoxia (20/ O₂) (histogramas grises) detectado con las lectinas biotiniladas L-PHA, LEL, SNA, MAL II, o PNA. Los datos son representativos de 5 experimentos independientes. (B) Unión de 488-Gal1 a CEs expuestas a estímulos proliferativos, tolerogénicos o inflamatorios. Los datos representan la rMFI relativa a condiciones de reposo (línea de puntos) versus control. (C) Citometría de flujo de la unión de distintas concentraciones de 488-Gal1 a CEs expuestas o no a hipoxia. Los datos representan la media ± SEM de cinco experimentos independientes * P < 0,05; ** P < 0,01 vs normoxia. (D) Microscopia confocal de la unión de 488-Gal1 a CEs en condiciones de normoxia o hipoxia.

3.1.2 GAL1 MODULA LA BIOLOGÍA DE CELULAS ENDOTELIALES A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN CON GLICANOS ESPECÍFICOS

Con el fin de examinar la relevancia funcional de la interacción entre Gal1 y glicanos, investigamos si Gal1, es capaz de modular la biología de células endoteliales a través de mecanismos dependientes de la glicosilación. En primer lugar examinamos la capacidad de Gal1 de inducir eventos asociados a fenómenos de neovascularización, observando que Gal1 es capaz de inducir *in vitro* migración, morfogénesis y proliferación de CEs (**Figura 4A-D**). En ensayos de tubulogénesis encontramos que el agregado exógeno de Gal1 a HUVEC sembradas sobre una capa de matriz extracelular (Matrigel) genera la formación de estructuras tubulares (tubulogénesis) de manera dosis- y carbohidrato-dependientes (**Figura 4A, B**). Del mismo modo, Gal1

logró inducir la migración de HUVEC a través de membranas con poros de 8 μm (**Figura 4A, C**). Notablemente, ambos efectos fueron similares a los observados luego del agregado de VEGF, el cual ha sido descrito como el principal factor disparador de angiogénesis (Ferrara y col., 2003). Más aún, el agregado de Gal1 logró estimular la proliferación de CEs de manera dependiente de la dosis y de la formación de *lattices* con glicanos específicos (**Figura 4D**).

El fenómeno de angiogénesis implica no sólo la proliferación sino además la migración de las células endoteliales (invasión); lo cual requiere que dichas células, además de migrar, degraden la matriz extracelular para abrirse paso a través del estroma. Para determinar *in vitro* si Gal1 confiere capacidad migratoria e invasiva a células HUVEC, utilizamos un sistema en el cual las células se depositan en membranas de 8 μm de poro embebidas en Matrigel a los fines de evaluar su migración. En forma notable, encontramos que Gal1 induce la invasión de las CEs en cultivo de manera dependiente de la dosis y la interacción con carbohidratos específicos (**Figura 4E**). En conjunto, los datos presentados demuestran que Gal1 es capaz de disparar señales celulares que confieren a las células el potencial de formar nuevos vasos sanguíneos.

Con el objetivo de confirmar la relevancia de *lattices* establecidos entre Gal1 y *N*-glicanos específicos sobre fenómenos de proliferación, migración y tubulogénesis de células HUVEC, evaluamos la capacidad de Gal1 de inducir estos fenómenos sobre CEs transfectadas con siRNAs bloqueantes de las enzimas responsables de la generación de glicanos necesarios para la unión de Gal1. Los efectos de Gal1 sobre la biología de HUVEC fueron totalmente suprimidos cuando la expresión de GnT5 fue silenciada; sin embargo no se observaron cambios significativos cuando utilizamos un siRNA dirigido hacia la enzima GCNT1 (**Figura 5A-C**), demostrando nuevamente el papel crítico de *N*-glicanos en los fenómenos inducidos por Gal1. Notablemente, a diferencia de Gal1, los efectos de VEGF sobre la tubulogénesis no se vieron afectados en absoluto por la ausencia de ramificaciones de *N*- u *O*-glicanos complejos. (**Figura**

5D). Estos datos demuestran que a pesar de las similitudes en los efectos finales, Gal1 induce neovascularización a través de mecanismos que dependen

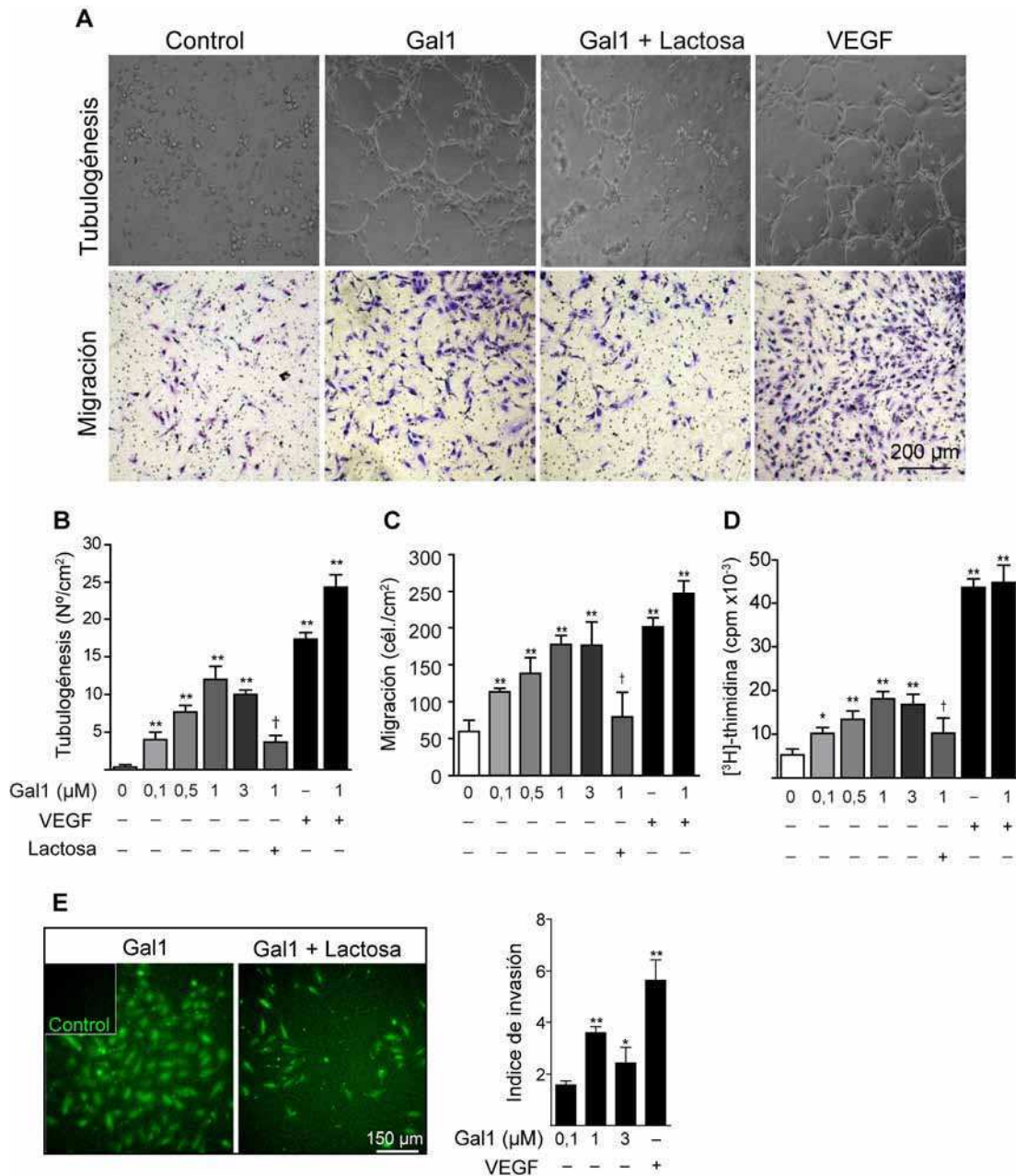


Figura 4. Gal1 activa procesos de angiogénesis en ECs de manera dependiente de glicanos. (A) Microfotografías en campo claro de: arriba, la formación de estructuras tubulares (tubulogénesis) de células HUVEC (CEs) en cultivo sobre Matrigel. Abajo migración de CEs a través de poros de en respuesta a Gal1. Las imágenes son representativas de al menos 4 experimentos. (B-D) Dosis respuesta de la proliferación (B) migración (C) y tubulogénesis (D) de ECs en respuesta a Gal1 (E) Ensayo de invasión a través de membranas de 8 µm de poro embebidas en matriz extracelular de EC marcadas con CFSE en presencia de Gal1. Panel derecho cuantificación de la invasión relativa al control sin Gal1. (A-E) VEGF (20 ng/ml) fue usado como control positivo; lactosa (30 mM) como control de inhibición de Gal1. Los datos representan la media ± SEM de cinco experimentos independientes * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs control sin Gal1; † $P < 0,05$ vs Gal1

exclusivamente de la presencia de *N*-glicanos complejos en la superficie de CEs y que son independientes de la acción del ligando canónico VEGF.

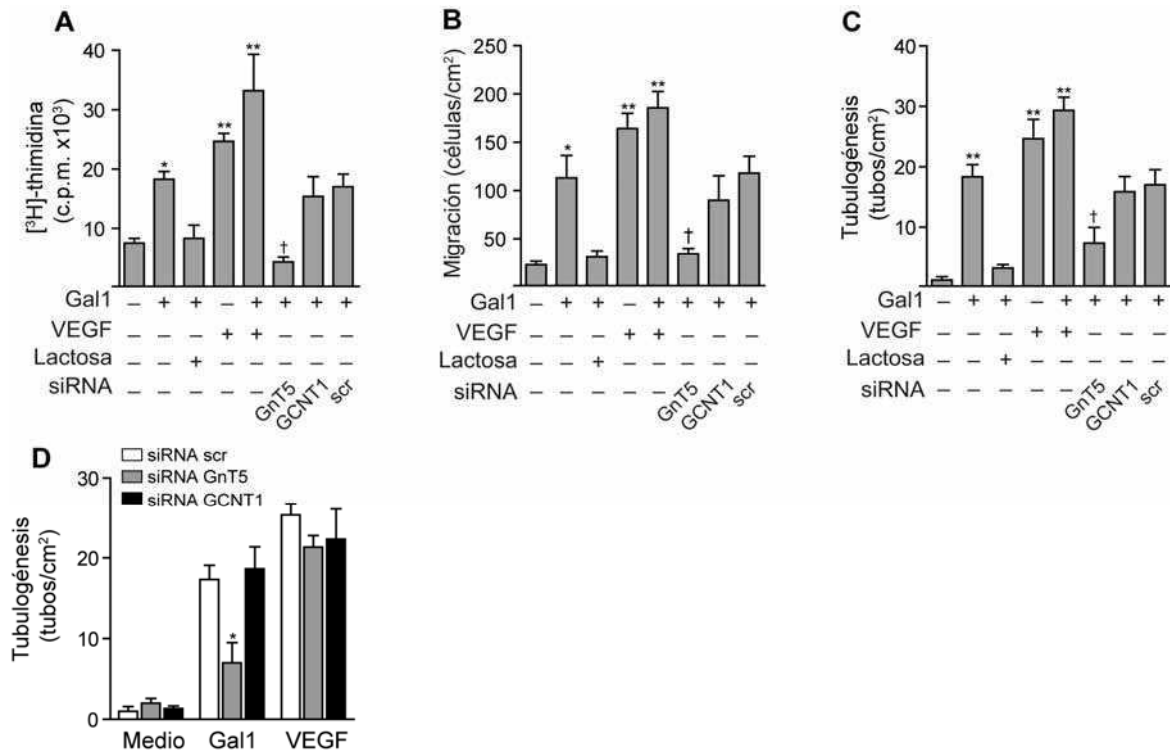


Figura 5. Gal1 promueve activación de ECs a través de mecanismos dependientes de la glicosilación. (A-C) incorporación de [³H]-timidina (A) migración (B) y tubulogénesis (C) de CEs transfectadas o no con siRNAs (100nM) contra GnT5, GCNT1 o control scr y tratadas con Gal1 (1µM). VEGF (20 ng/ml) fue usado como control positivo. Lactosa (30 mM) fue utilizada como control de inhibición de Gal1. Los datos representan la media ± SEM de cuatro experimentos independientes * *P* < 0,05; ** *P* < 0,01 vs control sin Gal1; †*P* < 0,05 vs Gal1. (D) Tubulogénesis inducida por Gal1 (1µM) y VEGF (20 ng/ml) o medio de cultivo 2/ SFB (medio) en CEs transfectadas o no con siRNAs (100nM) contra GnT5, GCNT1 o control scr. * *P* < 0,05 vs control siRNA scr.

3.1.3 CIRCUITOS TOLEROGÉNICOS, ANGIOGÉNESIS Y GAL1

Considerando que los microambientes pro-inflamatorios o anti-inflamatorios tienen la capacidad de determinar el potencial angiogénico de un tejido, que el microambiente es principalmente modelado por el perfil de citoquinas secretadas por células del sistema inmune (Grivennikov y col., 2010) y además, teniendo en cuenta que diversas células de origen mieloide han sido extensamente asociadas a fenómenos de vasculogénesis y tolerancia inmunológica (Murdoch y col., 2008), nos propusimos

evaluar si el compartimiento celular asociado a inmunosupresión es capaz de modular la neovascularización *in vitro* e *in vivo*.

Estudios previos de nuestro laboratorio identificaron a Gal1 como participante clave en la generación de circuitos inmunoregulatorios basados en la generación de DCs con propiedades tolerogénicas que tienen capacidad de frenar respuestas inflamatorias a través de mecanismos dependientes de IL-27 e IL-10 (Illarregui y col., 2009). Además, encontramos que estas células son potencialmente críticas en el desarrollo de microambientes inmunosupresores que operan a nivel tumoral. (Illarregui y col., 2009; Kuo y col., 2011; Steinman y col., 2003). Estas evidencias, sumadas a nuestros hallazgos que demuestran que los microambientes regulatorios amplifican la respuesta de CEs a Gal1, nos permitieron especular que DCs tolerogénicas podrían estar involucradas en la inducción de angiogénesis a través de mecanismos dependientes del diálogo entre Gal1 y sus glicanos específicos. A los fines de investigar si DCs tolerogénicas poseen algún efecto en la modulación de la angiogénesis mediada por Gal1, diferenciamos DCs a partir de precursores de médula ósea de ratones B6 *wt* o B6 *KO* para el gen de Gal1 (*Lgals1^{-/-}*) (DC WT ó DC KO). Por otro lado, DC WT fueron diferenciadas durante 6 días en presencia de GM-CSF y Gal1 (DC Gal1) o sin Gal1 (DC) (40 µg/ml) (**Figura 6A**). El fenotipo de las células obtenidas fue corroborado por citometría de flujo de acuerdo al procedimiento descrito (Illarregui y col., 2009). Para evaluar la capacidad angiogénica de éstas células realizamos ensayos de tubulogénesis en los cuales las distintas poblaciones de DCs diferenciadas se depositaron junto al Matrigel, de forma tal que quedasen retenidas en él una vez que gelifique. De esta manera, las DCs influenciarían directamente la respuesta de las CEs colocadas sobre la matriz formada por el Matrigel (**Figura 6B**). Luego de 24 h de incubación observamos un incremento marcado en fenómenos de morfogénesis en Matrigel conteniendo DC-Gal1 respecto a aquél que albergó DC WT. Notablemente las DC KO, deficientes en Gal1 endógena, mostraron una limitada capacidad de inducir la formación de túbulos respecto a DC

WT (**Figura 6C**) sugiriendo que las DCs tolerogénicas además de orquestar respuestas anti-inflamatorias, son capaces de inducir angiogénesis y que Gal1 podría estar mediando ambos fenómenos. Notablemente, DCs diferenciadas en presencia de otros estímulos tolerogénicos como 1,25-dihidroxitamina D3 (vit D3), péptido vasoactivo intestinal (VIP) o dexametasona (Dexa) también fueron capaces de promover neovascularización (**Figura 6D**). Sin embargo, este proceso biológico no ocurrió, cuando estas DCs se generaron a partir de precursores obtenidos de ratones deficientes en el gen de Gal1 demostrando un papel crítico para esta lectina tanto en la capacidad inmunosupresora como pro-angiogénica de DCs tolerogénicas. En conjunto, los datos indicarían que el efecto sobre la neovascularización no es exclusivo de las células diferenciadas en presencia de Gal1; sin embargo Gal1 producida por dichas DCs sería clave a los fines de preservar el potencial pro-angiogénico de estas células mieloides independientemente del estímulo que las genere. Para confirmar este efecto *in vivo*, inyectamos Matrigel conteniendo 1×10^6 DCs en ratones B6 *wt* y luego de 6 días los pellets fueron extraídos, pesados y fotografiados. En forma adicional, determinamos el contenido de hemoglobina en los mismos mediante técnicas colorimétricas. Los datos mostraron un marcado incremento en el contenido de hemoglobina (**Figura 6E**) acompañado por una mayor vascularización en pellets conteniendo DC Gal1 comparado con pellets conteniendo DC WT (**Figura 6F**). Nuevamente, la carencia de Gal1 en DCs logró suprimir en forma completa la formación de vasos (DC *KO* vs DC WT) (**figura 6E, F**) demostrando, por un lado que las DCs con propiedades inmunosupresoras son capaces de inducir angiogénesis y por el otro, reforzando el papel de Gal1 como mediador crítico de procesos de neovascularización inducida por estas células. Estos resultados, en su conjunto, sugieren otro nivel de complejidad en cuanto al microambiente tumoral y Gal1 ya que además de la formación de vasos sanguíneos a través de la unión específica a gliconconjugados de la membrana de CEs, Gal1 estaría participando en la

generación y actividad de DCs tolerogénicas que además de favorecer el escape tumoral estarían promoviendo neovascularización.

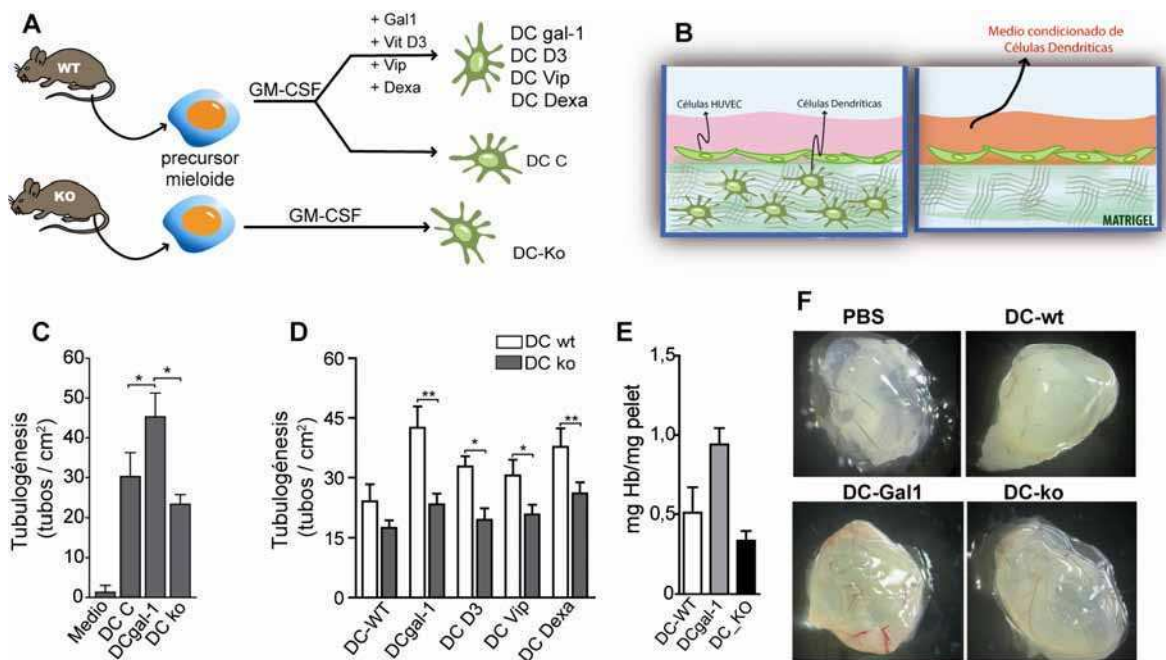


Figura 6: Gal1 genera DCs con potencial pro-angiogénico. (A) Modelo experimental de diferenciación de DCs inmaduras a partir de precursores de medula ósea de ratones B6 con fenotipo salvaje (WT) o deficientes (KO) para el gen *Lgals1*. Las DCs se diferenciaron en presencia de GM-CSF durante 6 días y el fenotipo fue confirmado por citometría de flujo. (B) Representación esquemática del modelo experimental de tubulogénesis inducido por DCs. (C-D) Tubulogénesis de CEs incubadas en presencia de distintas DCs (según esquema panel B) provenientes de ratones WT (C-D) o deficientes (KO) para el gen de Gal1 (D). Cada barra representa la media \pm SEM del número de túbulos por mm² de Matrigel de al menos cuatro experimentos independientes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. (E) Cuantificación del contenido de hemoglobina en pellets de Matrigel conteniendo las distintas DCs, inyectados durante 6 días en ratones B6 WT. La hemoglobina total se determinó por colorimetría usando un método estándar. Cada barra representa la media \pm SEM del contenido de Hemoglobina en los pellets de dos experimentos independientes. (F) Fotografías de los pellets de Matrigel obtenido luego de 6 días post inyección de 400 μ l de Matrigel conteniendo 1×10^6 DCs o PBS en ratones B6 WT.

3.2 GAL1 CO-OPTA POR LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN VEGFR2 (KDR) A TRAVÉS

DE LA UNIÓN A N-GLICANOS COMPLEJOS

3.2.1 GAL1 ACTIVA VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTES DE VEGFR2

Con el fin de investigar los mecanismos a través de los cuales la interacción entre Gal1 y N-glicanos complejos es capaz de mediar eventos celulares que llevan a la neovascularización nos propusimos caracterizar los receptores y señales activados luego de la unión de Gal1 a CEs.

En primer lugar, y con el fin de encontrar un posible glico-receptor para Gal1 realizamos un análisis global del nivel de activación de diferentes receptores del tipo tirosina-quinasa (RTKs) asociados a fenómenos de neovascularización. Para ello utilizamos un kit comercial (*Phospho-RTK signaling array*, Cell Signaling) a través del cual observamos que la presencia de Gal1 induce en forma selectiva la fosforilación del receptor VEGFR2 (KDR) en células HUVEC (**Figura 7A**). Este patrón de activación fue detectado a los 15 minutos de incubación y se mantuvo hasta los 60 min. Notablemente, también observamos un incremento en la fosforilación de las proteínas Akt (Thr308), Akt (Ser473) y Erk1/2 (**Figura 7A**), las cuales se encuentran “rio abajo” de la cascada de señalización disparada luego de la activación de VEGFR2 (Ferrara y col., 2003; Lemmon & Schlessinger, 2010). Estos datos nos permiten especular acerca de un escenario posible en el cual Gal1 estaría optando por la vía de señalización

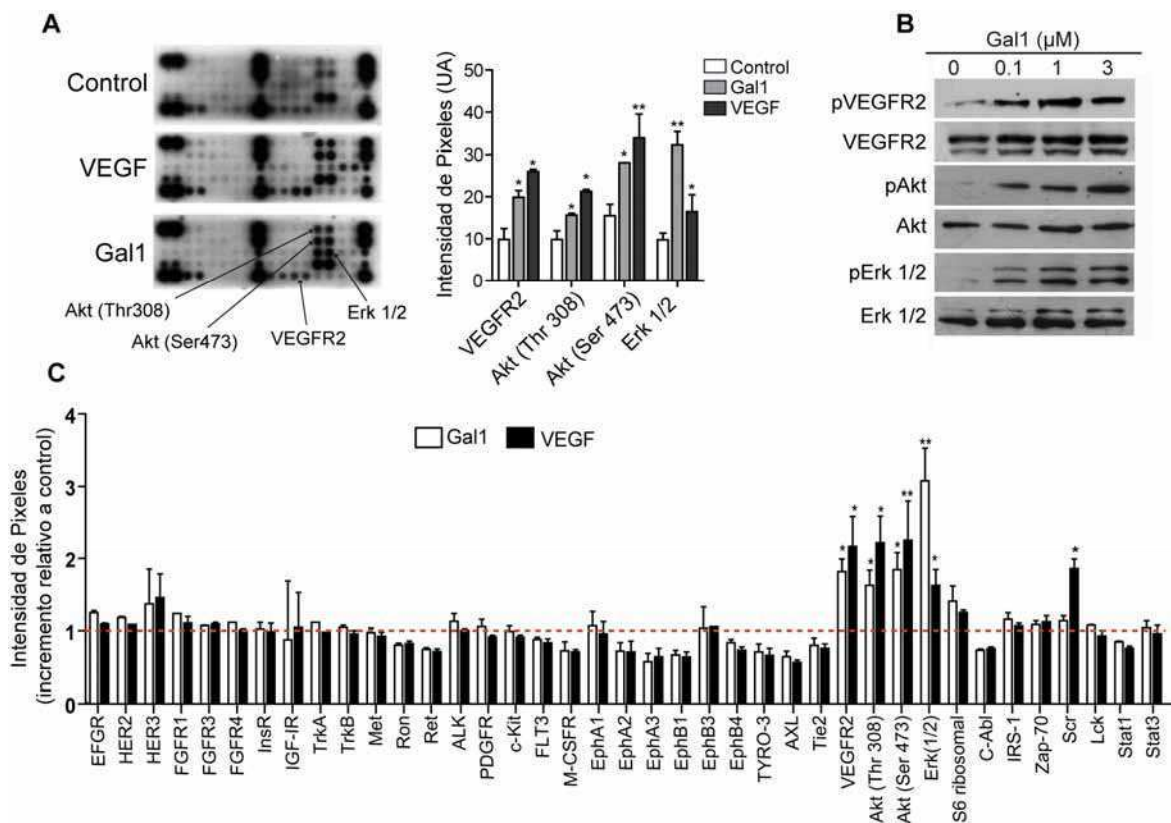


Figura 7. Gal1 induce la activación de vías de señalización de CEs a través de VEGFR2. (A) Análisis de la activación de señalización por medio del Phospho-RTK signaling array en CEs sin tratar (control), o tratadas con VEGF (20 ng/ml) o Gal1 (1 μM). Panel derecho, cuantificación de la intensidad de pixeles con diferencias respecto al control en los puntos del array (panel izquierdo). (B) Análisis por Western blot de CEs tratadas con diferentes concentraciones de Gal1. (C) Cuantificación de la intensidad de pixeles del array total. Los datos representan la media ± SEM de la intensidad de pixeles positivos relativizados a la intensidad del pixel del control para cada proteína contenida en el array. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ versus control

dependiente de VEGFR2 a los fines de inducir angiogénesis. De hecho, las proteínas que encontramos activadas por Gal1 recapitulan el patrón de fosforilación generado luego de la activación canónica de VEGFR2 por parte de su ligando clásico VEGF. Para confirmar este patrón de fosforilación, realizamos ensayos de Western blot (WB) en HUVECs tratadas con diferentes concentraciones de Gal1 donde pudimos observar una activación marcada de VEGFR2, Akt y Erk de manera dosis y tiempo dependiente (**Figura 7B**). En la **Figura 7C** se muestra el total de proteínas analizadas donde se observa la selectividad en la activación de la vía VEGFR2 inducida por Gal1. Con el fin de determinar si la activación observada en los ensayos previos es funcional y relevante en fenómenos celulares gatillados por Gal1, realizamos ensayos de proliferación, migración y tubulogénesis en presencia de inhibidores farmacológicos de diferentes vías de señalización (**Figura 8A-C**). La inhibición selectiva de las vías de PI3K-Akt y Erk lograron prevenir la inducción de proliferación (**Figura 8A**), migración (**Figura 8B**) y morfogénesis (**Figura 8C**) inducidos por Gal1, mientras que la inhibición de las vías de STAT3, JNKs, p38 o NF- κ B no mostró efectos significativos sobre estos eventos celulares. Cabe destacar una modesta pero significativa reducción en la morfogénesis cuando se inhibió JNK lo que podría indicar que más de una vía de señalización podría estar involucrada en los efectos de Gal1 sobre la morfogénesis de CEs.

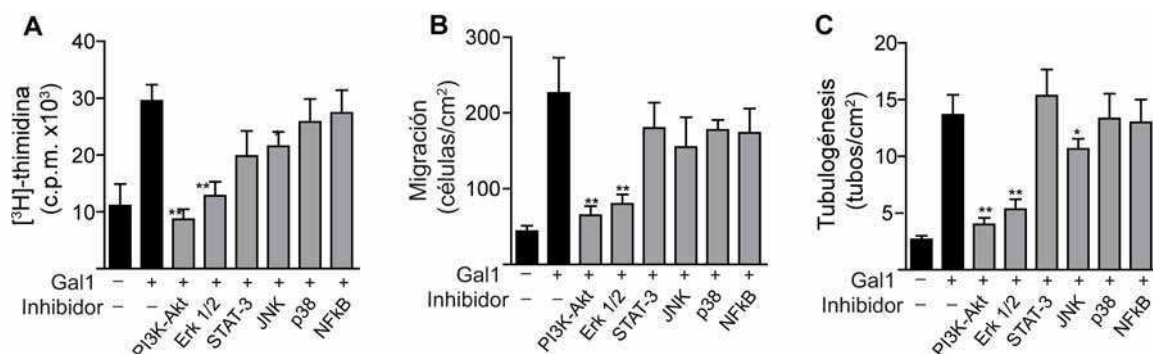


Figura 8. Gal1 induce la activación de CEs a través de mecanismos dependientes de las vías de Akt y Erk 1/2. (A-C) Proliferación (A), migración (B) y tubulogénesis (C) de CEs tratadas con Gal1 (1 μ M) pre-incubadas con inhibidores farmacológicos de las vías de PI(3)K/Akt (LY294002, 2 μ M), Erk1/2 (U0126, 5 μ M), JAK2-STAT3 (AG490 5, μ M), JNK/SAP (SP600125 20, μ M), p38 (SB202190, 10 μ M) o NF- κ B (BAY11-7082, 1 μ M). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ versus Gal1. Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes

3.2.2 GAL₁ MODULA PROCESOS DE ANGIOGÉNESIS A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN CON VEGFR₂ EN FORMA INDEPENDIENTE DE VEGF

En función de los resultados expuestos, y la relevancia de las interacciones entre Gal1 y *N*-glicanos sobre la neovascularización, nos propusimos caracterizar el papel de *N*-glicanos complejos en los fenómenos de señalización inducidos por esta lectina. Mediante experimentos de WB de células HUVEC transfectadas con siRNAs específicos de VEGFR2 o GnT5 observamos que el silenciamiento de VEGFR2 previene completamente la activación de Akt y Erk inducida tanto por Gal1 como por el ligando canónico VEGF (**Figura 9; panel central**). Dado que la generación de *N*-glicanos ramificados puede modular el umbral de activación de receptores de factores de crecimiento (Lau y col., 2007; Song y col., 2010) examinamos si el silenciamiento de GnT5 podía alterar la sensibilidad de VEGFR2 por su ligando VEGF. Notablemente la eliminación de ramificaciones en *N*-glicanos complejos logró eliminar en forma selectiva los efectos de Gal1 pero no de VEGF sobre CEs (**Figura 9A; panel derecho**). Estos datos sugieren que Gal1 y VEGFR2 pueden asociarse selectivamente a través de interacciones mediadas por *N*-glicanos a los fines de inducir la activación de la cascada de señalización de VEGFR2 de manera independiente de la presencia del ligando canónico VEGF. Para confirmar que los efectos observados se deban específicamente al silenciamiento de las proteínas en cuestión, corroboramos los niveles de expresión de VEGFR2 por WB (**Figura 9B**), la presencia de *N*-glicanos complejos ramificados por citometría de flujo utilizando L-PHA y la expresión de RNA mensajero de GnT5 por qPCR (**Figuras 2D y 9C**). Por otro lado, mediante análisis informático utilizando la base de datos provista por la *Universal Protein Resource* (UniProt; www.uniprot.org) confirmamos que VEGFR2 es un receptor que se encuentra *N*-glicosilado en forma marcada y posee 19 sitios putativos de *N*-glicosilación. Para confirmar que los efectos de Gal1 se deben a interacciones directas con VEGFR2, diseñamos experimentos de co-inmunoprecipitación con lisados de HUVEC tratados con Gal1 en los cuales observamos que Gal1 establece interacciones

directas con VEGFR2 (**Figura 9D**). Más aún, cuando se inmunoprecipitó NRP-1, un co-receptor de VEGFR2, también se detectó la presencia de Gal1 en el precipitado, lo cual indica que Gal1 podría estar formando complejos con estas proteínas para formar *clusters* de señalización que llevan a la inducción de angiogénesis. Finalmente, y con el objetivo de determinar la participación de *N*-glicanos complejos en la unión de Gal1 a VEGFR2, los extractos de HUVEC fueron tratados con PNGasa F, una endoglicosidasa que remueve *N*-glicanos de proteínas; de este modo logramos obtener inmunoprecipitados de VEGFR2 que carecen de *N*-glicanos. Notablemente, el tratamiento con PNGasa F logró inhibir la unión de Gal1 a VEGFR2 a niveles similares a los encontrados en células tratadas con siRNA específico de GnT5. Sin embargo el silenciamiento de GCNT1 no logró prevenir la unión de Gal1 a VEGFR2 (**Figura 9E**). Apoyando estos datos, y en concordancia con la teoría de formación de *lattices* (Dennis y col., 2009), la exposición de HUVEC a Gal1 logró inducir la segregación de VEGFR2 en microdominios en la membrana plasmática, efecto que se inhibió en forma completa cuando la enzima GnT5 fue silenciada en CEs (**Figura 9F**). En conjunto, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que Gal1 se une específicamente a *N*-glicanos en VEGFR2 a los fines de activar señales intracelulares que llevan a la inducción de proliferación, morfogénesis y migración de CEs. De este modo más que alterar la señalización de VEGF, Gal1 es capaz de optar directamente por la vía de VEGFR2 a través de la unión a residuos poli-LacNAc en *N*-glicanos complejos presentes en dicho receptor.

Dada la similitud funcional y estructural de distintos receptores RTK de la familia de los VEGFRs en la angiogénesis (Lemmon & Schlessinger, 2010) decidimos examinar la contribución parcial de cada uno de ellos a la angiogénesis inducida por Gal1. El silenciamiento de la expresión de VEGFR2 fue capaz de prevenir en forma completa los efectos de Gal1 y de VEGF (**Figura 10A**), confirmando la idea de que esta lectina utiliza esta vía de señalización a los fines de promover fenómenos de angiogénesis; no obstante, el silenciamiento de NRP-1 aunque no logró prevenir los

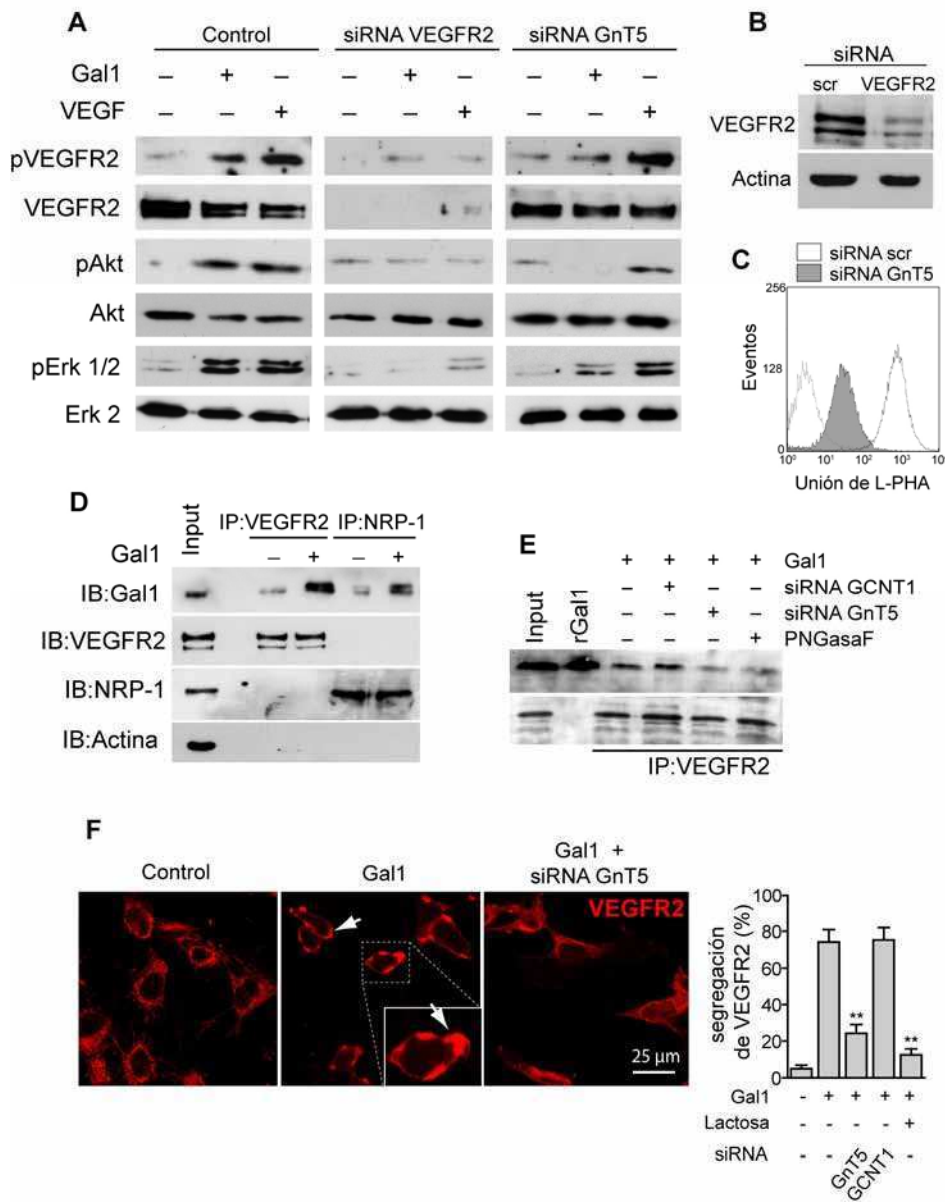


Figure 9. Gal1 induce la activación de vías de señalización a través de la unión a N-glicanos complejos en VEGFR2. (A) Análisis de WB de la activación de VEGFR2, Akt y Erk 1/2 en CEs transfectadas con siRNA contra VEGFR2 o GnT5. (B) WB de VEGFR2 en CEs transfectadas con siRNA contra VEGFR2. (C) Análisis de citometría de flujo utilizando la lectina L-PHA de CEs transfectadas con el siRNA específico de GnT5. (D) Co-inmunoprecipitación de VEGFR2 o NRP-1 y Gal1 en CEs células tratadas o no con Gal1 (1µM). (E) Co-inmunoprecipitación de VEGFR2 y Gal1 en CEs transfectadas con siRNA específico de GnT5, GCNT1 o expuestas a la endoglicosidasa FNGase F. (F) Microscopia confocal de VEGFR2 en CEs transfectadas o no con siRNA de GnT5 y tratadas con Gal1. DAPI=núcleo. Las imágenes son representativas de 4 experimentos independientes.

efectos de Gal1 inhibió la migración inducida por VEGF (**Figura 10A**) indicando que, si bien Gal1 y VEGF utilizan la misma vía de señalización, Gal1 no depende del co-receptor NRP-1 para ejercer sus efectos biológicos. Para descartar la posibilidad de que Gal1 estuviese de algún modo generando una interacción positiva elevando los

(Figura 10B) confirmando la independencia de ambos factores en su facultad de activar VEGFR2. Finalmente, mediante silenciamiento de VEGFR2, NRP-1 y VEGF confirmamos que Gal1 puede co-optar selectivamente por VEGFR2 a los fines de inducir morfogénesis de CEs **(Figura 10E)**. Notablemente, el bloqueo de VEGFR1 o VEGFR3 no demostró ningún efecto significativo sobre la inducción de angiogénesis por Gal1 **(Figura 10F)**, sugiriendo que sólo determinados glico-receptores son permisivos para la formación de *clusters* de señalización mediada por interacciones entre lectinas y glicanos. En conjunto estos datos aportan nuevas perspectivas acerca de la interacción ligando-receptor al demostrar que la interacción entre lectinas endógenas y glicanos anclados a receptores de factores de crecimiento pueden imitar a ligandos canónicos con el fin de preservar, en ausencia de los mismos, procesos críticos como la angiogénesis.

3.3 LA INTERACCIÓN ENTRE GAL1 Y GLICANOS ESPECÍFICOS VINCULA FENÓMENOS DE HIPOXIA Y NEOVASCULARIZACIÓN.

3.3.1 LA HIPOXIA REGULA LA EXPRESIÓN DE GAL₁ EN CÉLULAS TUMORALES POR MECANISMOS DEPENDIENTES DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO (ROS) Y NF- κ B E INDEPENDIENTES DE HIF-1 α .

Considerando la relevancia que la hipoxia posee en la generación de neovascularización y su capacidad de inducir variaciones considerables en el perfil de glicosilación de CEs, nos propusimos estudiar en detalle la regulación de la expresión de Gal1 en células bajo condiciones de privación de oxígeno con el objetivo de definir con mayor precisión el rol de la interacción entre galectinas y glicanos en la neovascularización. Para ello, expusimos líneas celulares derivadas de tumores de diferentes orígenes ontológicos a condiciones de hipoxia (1% O₂) o normoxia (20% O₂) durante 16-24 h y evaluamos los niveles de expresión de Gal1 en dichas condiciones. La exposición de las células de carcinoma mamario murino (4T1), melanoma murino (B16-FO); melanoma humano (A375N), carcinoma prostático humano (LNCaP) y sarcoma de Kaposi humano (KS-Imm) a condiciones de hipoxia, produjo un marcado incremento en la expresión de Gal1, tanto a nivel proteico (**Figura 11 A**) como a nivel de RNA mensajero (mRNA) (**Figura 11B**), sugiriendo una delicada regulación de la expresión de esta proteína en células tanto de origen mesenquimal como epitelial sometidas a condiciones de hipoxia.

A los fines de estudiar con mayor detalle los mecanismos moleculares que gobiernan la regulación de la expresión de Gal1 en condiciones de hipoxia, utilizamos la línea tumoral de Sarcoma de Kaposi (KS-Imm) como modelo, ya que estas células presentaron los mayores niveles de regulación de la expresión de Gal1 bajo condiciones de hipoxia (**Figura 11A-B**). Además, estas células son ampliamente usadas en modelos de neovascularización dado que se caracterizan por desarrollar

tumores agresivos con células de morfología fusiforme-epitelial acompañados de una densa vasculatura altamente desorganizada (Albini y col., 2001). La exposición de células KS-Imm (KS) a condiciones de hipoxia durante 18 h incrementó la expresión de Gal1 evaluada a distintos niveles. En primer lugar, mediante el uso de un sistema de gen reportero (pGL3_luciferasa) conteniendo un fragmento del promotor proximal de Gal1 (-473,+67 pb) pudimos observar que la hipoxia fue capaz de incrementar dos veces la actividad del promotor de Gal1 en células KS (**Figura 12A**).

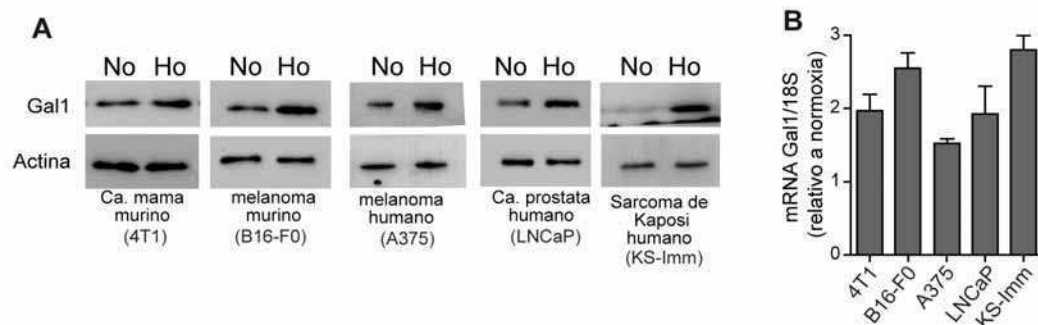


Figura 11. La hipoxia controla la expresión de Gal1 en células tumorales. Diferentes tipos de líneas tumorales humanas (A375N, LNCaP, KS-Imm) y murinas (4T1 y B16-F0) fueron cultivadas en presencia de hipoxia ($1/ O_2$; Ho) o normoxia ($20/ O_2$; No) durante 16-24 h. (A) Análisis por WB de la expresión de Gal1 y (B) Análisis cuantitativo de la presencia del mRNA de Gal1 por RT-PCR en tiempo real (qPCR). Los datos representan la media \pm SEM de los niveles de mRNA Gal1 / mRNA 18S relativizados a condiciones de normoxia.

Estas observaciones fueron corroboradas a nivel transcripcional, donde también observamos un marcado incremento en la cantidad de mRNA de Gal1 luego de la exposición a condiciones de hipoxia (**Figura 12B**). Dado que las funciones de Gal1 son ejercidas predominantemente en el espacio extracelular, realizamos análisis de WB y ELISA en células KS con el fin de evaluar la expresión proteica y la secreción de esta lectina en condiciones de hipoxia. Los datos revelan que tanto la expresión como la secreción de Gal1 (**Figuras 12 C,D**) se ven incrementadas en respuesta a bajas presiones parciales de O_2 , confirmando la fina regulación que ejerce la hipoxia sobre la expresión de Gal1 a distintos niveles. Sorprendentemente, observamos que el silenciamiento de HIF-1 α , el factor de transcripción ‘maestro’ en la regulación de este fenómeno, no logró impedir el incremento en la expresión de Gal1 (**Figura 12A-D**).

El factor de transcripción NF-κB ha sido recientemente descrito como responsable de la expresión de genes que llevan a angiogénesis en condiciones de hipoxia a través de mecanismos independientes de la activación de la vía clásica mediada por HIF-1α (Mizukamiy col., 2007; Rius y col., 2008). En este contexto, realizamos estudios a los fines de analizar el efecto de la inhibición de la activación de

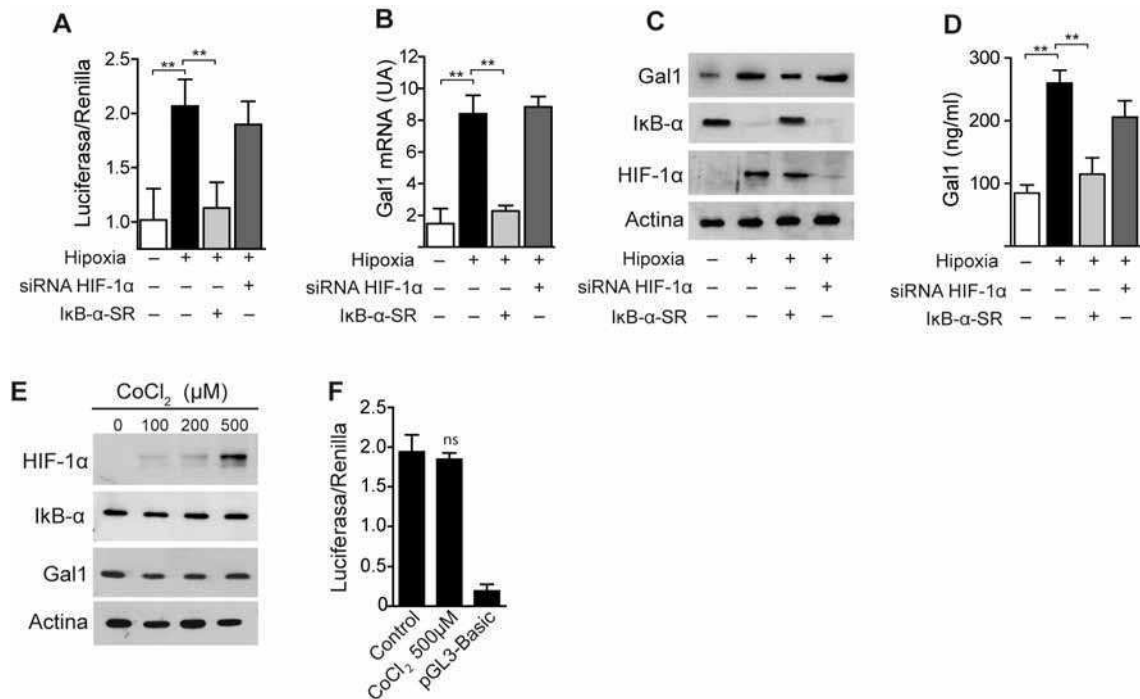


Figura 12. El factor de transcripción NF-κB controla la expresión de Gal1 inducida por hipoxia. (A-D) Expresión de Gal1 en células tumorales KS-Imm transfectadas o no con siRNA contra HIF-1α o con un vector de expresión conteniendo una forma súper-represora de IκB-α (IκB-α-SR), e incubadas en condiciones de hipoxia o normoxia. (A) Actividad de promotor de Gal1 evaluada mediante el ensayo de gen reportero, en el cual el gen de luciferasa está flanqueando la región del promotor de Gal1 (-473;+67) Los datos representan la media ± SEM de los niveles de actividad de luciferasa relativo al control de Renilla. (B) Análisis de los niveles de mRNA de Gal1 mediante la técnica de qPCR. Los datos representan la media de 5 experimentos y están expresados como unidades arbitrarias (UA) de mRNA Gal1 relativo al mRNA 18S. (C) Análisis de WB de la expresión de Gal1, la activación de NF-κB (evaluado como degradación del inhibidor IκB-α) y activación de HIF-1α. Se muestra un blot representativo de seis experimentos. (D) Secreción de Gal1 evaluado por ELISA. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. (A-D) ***P* < 0,01. (E-F) Expresión de Gal1 luego de la incubación de las células KS en presencia de CoCl₂ (inductor químico de la activación de HIF-1α). (E) Análisis de WB de la expresión de Gal1, IκB-α y HIF-1α (F) Actividad de promotor de Gal1 evaluada mediante el ensayo luciferasa. Los datos representan la media ± SEM de los niveles de actividad de luciferasa relativo a Renilla. pGL3-basic: vector vacío; ns: no significativo.

NF-κB sobre la expresión de Gal1 en condiciones de hipoxia. En este sentido, la expresión transiente de una forma constitutivamente activa del inhibidor de NF-κB, IκB-α (IκB-SR) en células KS logró prevenir en forma completa el incremento de Gal1 inducido por hipoxia tanto a nivel transcripcional como a nivel proteico (**Figura 12A-D**).

De acuerdo con estas observaciones, y a los fines de confirmar la falta de participación de HIF-1 α en la inducción de Gal1 por hipoxia, decidimos inducir artificialmente una situación de “pseudo-hipoxia” activando químicamente a HIF-1 mediante de la incubación de células tumorales en presencia de CoCl₂. Bajo estas condiciones experimentales, los análisis de WB y qPCR no revelaron cambios significativos en los niveles de activación de NF- κ B ni en los niveles expresión de Gal1 tanto a nivel del mRNA como de la expresión proteica (**Figura 12E**). Estos resultados indicarían que la expresión incrementada de Gal1 en condiciones de hipoxia se halla mediada por mecanismos de regulación no clásicos, que involucran la participación del factor de transcripción asociado a inflamación NF- κ B independientemente de la activación de HIF-1 α .

Dado que la activación de NF- κ B puede ser resultado del estrés oxidativo de las células hipóxicas debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS; Mizukami y col., 2005), nos propusimos estudiar si la hipoxia puede inducir la activación de NF- κ B a través de la producción de ROS. Para ello realizamos análisis de activación de NF- κ B y expresión de Gal1 en condiciones de hipoxia, en presencia de N-acetil-cisteína (NAC) un potente inhibidor de la producción de ROS. La eliminación de la producción de ROS en células KS cultivadas en condiciones de hipoxia fue capaz de prevenir la degradación de I κ B- α y la consecuente inducción de

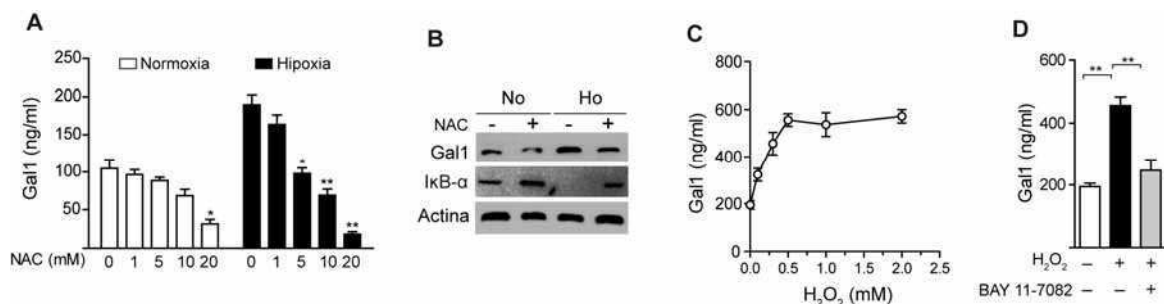


Figura 13. El sistema hipoxia - ROS – NF- κ B controla la expresión de Gal1. (A) Secreción de Gal1 por parte de células KS cultivadas en condiciones de hipoxia o normoxia en presencia de concentraciones crecientes de NAC, un inhibidor de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NAC 0 mM. (B) Ensayo de expresión de Gal1 y activación de NF- κ B por WB en células KS cultivadas en condiciones de hipoxia o normoxia en presencia de NAC (5 mM). (C) ELISA de Gal1 en sobrenadante de células KS incubadas con concentraciones crecientes de H₂O₂. (D) Secreción de Gal1 en presencia de H₂O₂ (0,5 mM) y en presencia o ausencia del inhibidor farmacológico de NF- κ B (BAY 11-7082; 1 μ M). (C y D) Los datos representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. (D) ** $P < 0,01$ vs. control.

la expresión y secreción de Gal1 (**Figura 13 A, B**). Además, la administración exógena del análogo de ROS, H_2O_2 logró inducir un incremento dosis-dependiente de la secreción de Gal1 (**Figura 13C**). Este efecto involucró la activación de NF- κ B, dado que la inhibición farmacológica de la degradación de $I\kappa$ B- α revirtió el efecto mediado por H_2O_2 en células KS.

Los resultados expuestos indican que la síntesis de ROS-dependiente de NF- κ B podría controlar independientemente de HIF-1 α la expresión de Gal1 en microambientes tumorales hipóxicos. Para corroborar esta hipótesis, realizamos estudios *in vivo* en un modelo tumoral de Sarcoma de Kaposi en ratones *nude*. En este modelo, ensayos de inmunohistoquímica revelaron que Gal1 se expresa preferentemente en regiones hipóxicas rodeando áreas de necrosis tumoral (**Figura**

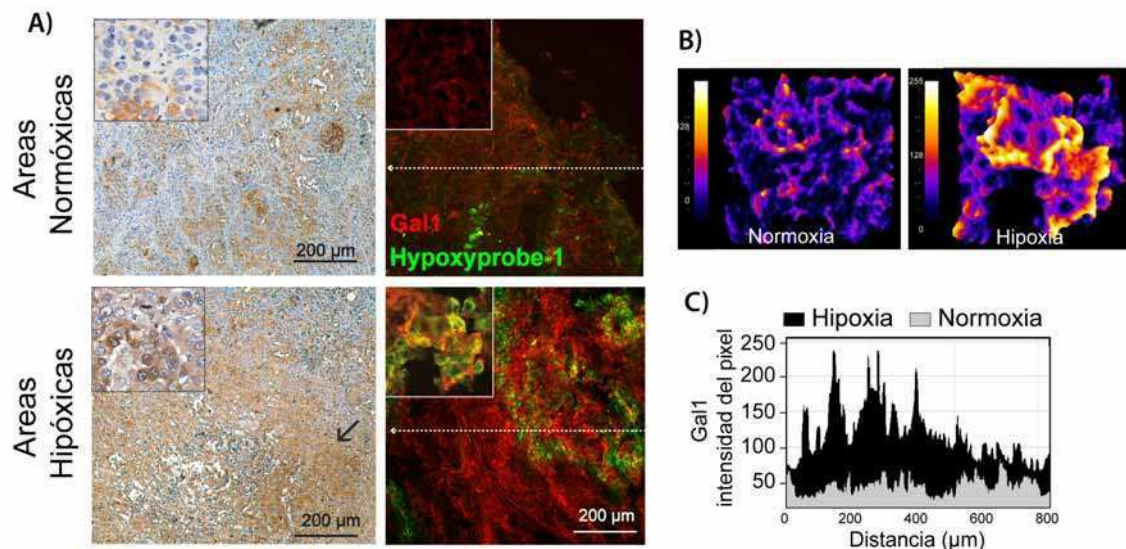


Figura 14. La expresión de Gal1 *in vivo* se halla asociada a la presencia de hipoxia. Inmunohistoquímica de Gal1 en tumores KS establecidos en ratones *Nude*. (A) Panel izquierdo, inmunohistoquímica de Gal1 en áreas hipóxicas y normóxicas del mismo tumor. Panel derecho microscopia confocal de Gal1 e hipoxia (Hpi, detectada por el kit comercial Hypoxyprobe-1). (B) Representación esquemática de intensidad de fluorescencia roja (Gal1) de los *Inset* de las imágenes del ítem a. (C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de cada pixel a través de la línea blanca representada en la imagen del panel A. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos con cuatro animales cada uno.

14). Para confirmar estas observaciones realizamos ensayos de co-localización de Gal1 en áreas de hipoxia mediante ensayos de detección de hipoxia tisular utilizando

Hypoxyprobe-1 el cual confirmó la estrecha asociación entre la presencia de hipoxia y la expresión de Gal1 en tumores (**Figura 14**).

3.3.2 LA INTERACCIÓN ENTRE GAL1 Y GLICANOS VINCULA FENÓMENOS DE HIPOXIA Y NEOVASCULARIZACIÓN EN LA INTERFASE TUMOR-ENDOTELIO

Habiendo definido las vías moleculares por las cuales la hipoxia es capaz de regular la presencia de glicanos en la superficie de CEs y la expresión de Gal1 en tumores, nos propusimos investigar si la interacción entre Gal1 y *N*-glicanos podría actuar como nexo molecular entre los fenómenos de hipoxia y neovascularización en la interfase tumor-endotelio. Para corroborar esta hipótesis, diseñamos una serie de experimentos *in vitro* e *in vivo* tendientes a interrumpir la formación de lattices ya sea bloqueando la expresión de Gal1 y/o impidiendo la generación de ramificaciones en *N*- u *O*-glicanos complejos. Con este objetivo células KS fueron infectadas con vectores retrovirales conteniendo shRNAs específicos contra Gal1 (gal1-shRNA) o transfectadas con siRNA específicos contra VEGF, a los fines de silenciar la expresión de Gal1 o de VEGF respectivamente. Posteriormente las células se cultivaron en condiciones de hipoxia o normoxia y se colectaron los medios condicionados libres de suero fetal (MC) de las distintas líneas para ser utilizados en experimentos de tubulogénesis *in vitro* o de neovascularización en pellets de Matrigel *in vivo*. En primer lugar se validó el diseño experimental determinando la secreción VEGF y Gal1 por técnicas de ELISA. Los datos mostraron que el incremento en la expresión de Gal1 causado por hipoxia fue completamente bloqueado mediante la expresión de shRNAs específicos de Gal1. Por el contrario, el silenciamiento de VEGF o la expresión de un shRNA no relacionado (scr-shRNA) no mostró efecto alguno (**Figura 15A**). En este sentido, al transfectar células KS con siRNA anti-VEGF (VEGF siRNA) la secreción de esta citoquina desapareció completamente tanto en hipoxia como en normoxia, mientras que su secreción no se vió afectada en células

transfectadas con siRNA controles (scr siRNA), o en células infectadas con vectores gal1-shRNA (**Figura 15B**). Estos datos confirman que ambos factores se expresan en forma independiente y permiten descartar cualquier tipo de regulación recíproca entre ellos. Los experimentos de tubulogénesis revelaron además que tanto el bloqueo de la expresión de Gal1 como de VEGF de manera independiente es capaz de prevenir la angiogénesis inducida por hipoxia (**Figura 15C**). En cambio, la tubulogénesis en condiciones normóxicas no se vió afectada por el bloqueo de Gal1 o de VEGF, lo cual sugiere la presencia de otros factores pro-angiogénicos adicionales actuando en estas condiciones (**Figura 15C**). Notablemente el doble silenciamiento de Gal1 y VEGF mostró un comportamiento similar al observado para cada una de los mediadores en forma separada, sugiriendo que si bien ambos factores son capaces de activar VEGFR2 actúan de manera independiente el uno del otro. Para corroborar estos datos *in vivo* inoculamos ratones B6 o B6-*Lgals1*^{-/-} deficientes en Gal1 con Matrigel

conteniendo MC de células KS gal1-shRNA o scr-shRNA expuestas o no a hipoxia. Luego de 7 días extrajimos los pellets y analizamos el grado de vascularización de los mismos por medio de la determinación del contenido de Hemoglobina. Los resultados mostraron que los pellets de Matrigel conteniendo MC hipóxicos reclutaron una mayor cantidad de hemoglobina respecto a MC de células normóxicas (**Figura 15D**). Nuevamente, el bloqueo de la expresión de Gal1 en células KS logró prevenir los efectos inducidos por la hipoxia. Notablemente, observamos que la expresión Gal1 en dichos tumores es suficiente para desencadenar los efectos de neovascularización, ya que los ratones *Lgals1^{-/-}* se comportaron de forma similar a los WT (**Figura 15D**). Estas observaciones demuestran también que la lectina liberada por el tumor tiene mayor potencial pro-angiogénico en relación a la contribución de Gal1 producida por el huésped.

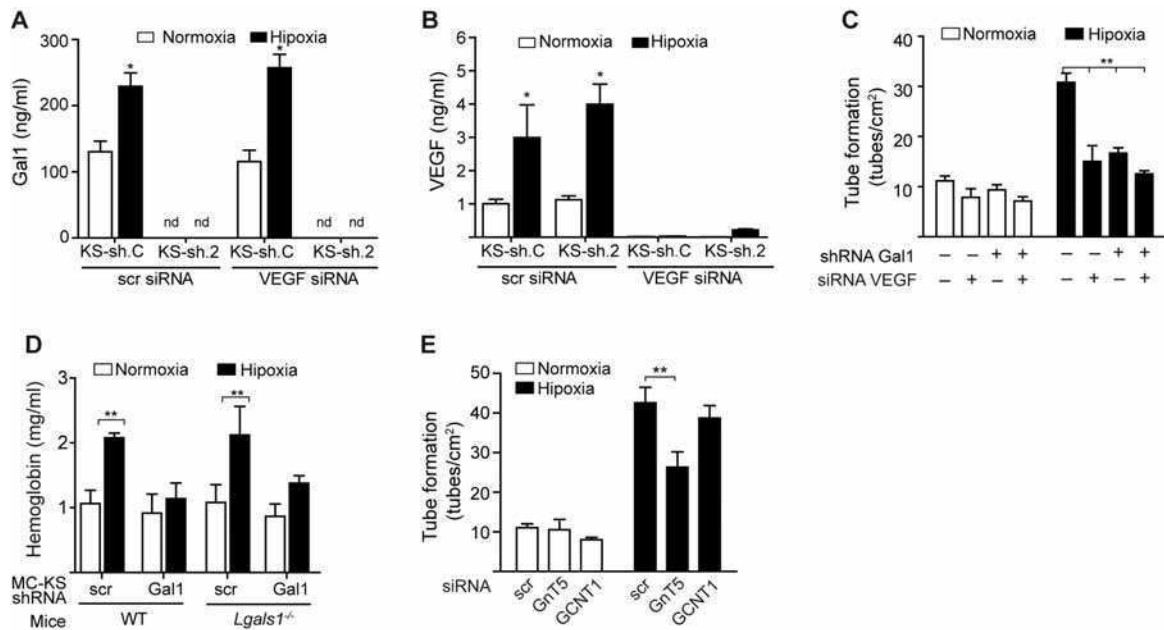


Figura 15. Gal1 vincula fenómenos de hipoxia y neovascularización. (A-B) Análisis de la secreción de Gal1 (A) o VEGF (B) por ELISA en condiciones de normoxia o hipoxia de células KS transfectadas con siRNA anti VEGF (100 nM; VEGF siRNA) y/o infectadas con vectores retrovirales codificantes de shRNA anti Gal1 (KS-sh.2) o controles scr. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes *P<0,05 vs normoxia. (C) Tubulogénesis de CE incubadas con medios condicionados (CM) de células KS hipóxicas o normóxicas transfectadas o no con los siRNA anti VEGF o los shRNA anti-Gal1. (D) contenido de hemoglobina de pellets de Matrigel conteniendo MC de células KS transfectadas o no con VEGF siRNA o MC de células KS-sh.2 cultivadas en normoxia o hipoxia e inyectadas en ratones B6 wt o B6 KO para el gen de Gal1. El contenido de hemoglobina se determinó 6 días después de la inoculación y los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. (E) Tubulogénesis de CE transfectadas con siRNA GnT5, GCNT1 o scr (100nM) e incubadas en presencia de MC de células KS normóxicas o hipóxicas. (C-E) ** P < 0,01.

Estos hallazgos indican que la expresión de Gal1 inducida por hipoxia en células tumorales cumple una función crítica en fenómenos de neovascularización en forma independiente de la expresión de VEGF; sin embargo son necesarios más estudios en modelos *in vivo* a largo plazo para evaluar de qué manera la carencia de uno de estos factores impacta en la presencia o funcionalidad del otro. Finalmente, a los efectos de sustentar en mayor medida la relevancia de las interacciones entre Gal1 y glicanos como nexo entre fenómenos de hipoxia y neovascularización, incubamos células HUVEC transfectadas con siRNA específico de GnT5 o CGNT1 en presencia de MC de células KS sometidas o no a condiciones de hipoxia. La interrupción en la generación de *N*-glicanos complejos pero no de *O*-glicanos logró prevenir en forma significativa la inducción de tubulogénesis por MC hipóxicos **(Figura 15E)** confirmando el papel fundamental de *N*-glicanos en la generación de angiogénesis inducida por hipoxia de manera independiente de HIF-1 α .

3.4 RELEVANCIA DEL BLOQUEO DE GAL1 Y SUS GLICANOS EN FENÓMENOS DE NEOVASCULARIZACIÓN.

3.4.1 EL SILENCIAMIENTO DE GAL1 *IN VIVO* PREVIENE EL CRECIMIENTO TUMORAL, DISMINUYE LA NEOVASCULARIZACIÓN Y POTENCIA LA RESPUESTA INMUNE ANTI TUMORAL.

Considerando la relevancia de Gal1 y sus glicanos específicos en fenómenos de neovascularización asociados a tumores y su vinculación con fenómenos de hipoxia, y a los fines de determinar el impacto fisiopatológico de este fenómeno, nos propusimos evaluar el papel de la interacción entre Gal1 y *N*-glicanos complejos en el crecimiento y neovascularización tumoral *in vivo*. A estos fines seleccionamos por técnicas de dilución límite clones de células KS capaces de expresar en forma estable shRNAs específicos de Gal1 (sh-Gal1.1, sh-Gal1.2, sh-Gal1.3) o control (sh-scr) **(Figura 16A)**. En primer lugar corroboramos que estas células no tuvieran diferencias intrínsecas en el crecimiento *in vitro* **(Figura 16B)**. La inoculación de células KS sh-RNA en ratones nude mostró que la tasa de crecimiento de los tumores cuya expresión de Gal1 había sido silenciada fue considerablemente menor respecto a los tumores provenientes de células KS WT (sh-Gal1.1: 51.2%; sh-Gal1.2: 60.6% al día 22 post-inoculación) **(Figura 16C)**. Teniendo en cuenta que el modelo KS en ratones *nude*, permite examinar las funciones de Gal1 en forma independiente al rol de esta lectina en el escape tumoral, podemos especular que estos efectos sobre el crecimiento tumoral son debidos al papel de Gal1 sobre la neovascularización. Para abordar esta hipótesis, extirpamos los tumores y evaluamos la frecuencia de CEs y la concentración de hemoglobina intratumorales en los diferentes clones. EL análisis por citometría de flujo mostró una franca disminución en el número de CEs CD34⁺ en tumores con baja expresión de Gal1 con respecto a aquellos tumores que recibieron el vector conteniendo shRNA control **(Figura 16D)**. Asimismo, tumores con baja expresión de

Gal1 evidenciaron una marcada reducción en el contenido de hemoglobina intratumoral (**Figura 16E**). Estos datos confirman la relevancia del sistema Gal1-glicanos en fenómenos de neovascularización *in vivo* en un sistema independiente de la respuesta inmune adaptativa.

En los últimos años ha cobrado renovado interés la identificación de terapias anti-tumorales que involucren agentes multifuncionales con capacidad de atacar los compartimentos inmune y vascular en forma simultánea (Jinushi & Dranoff, 2007). Con el objetivo de integrar las funciones individuales de Gal1 en fenómenos de neovascularización y la respuesta inmune, estudiamos los efectos de la inhibición de

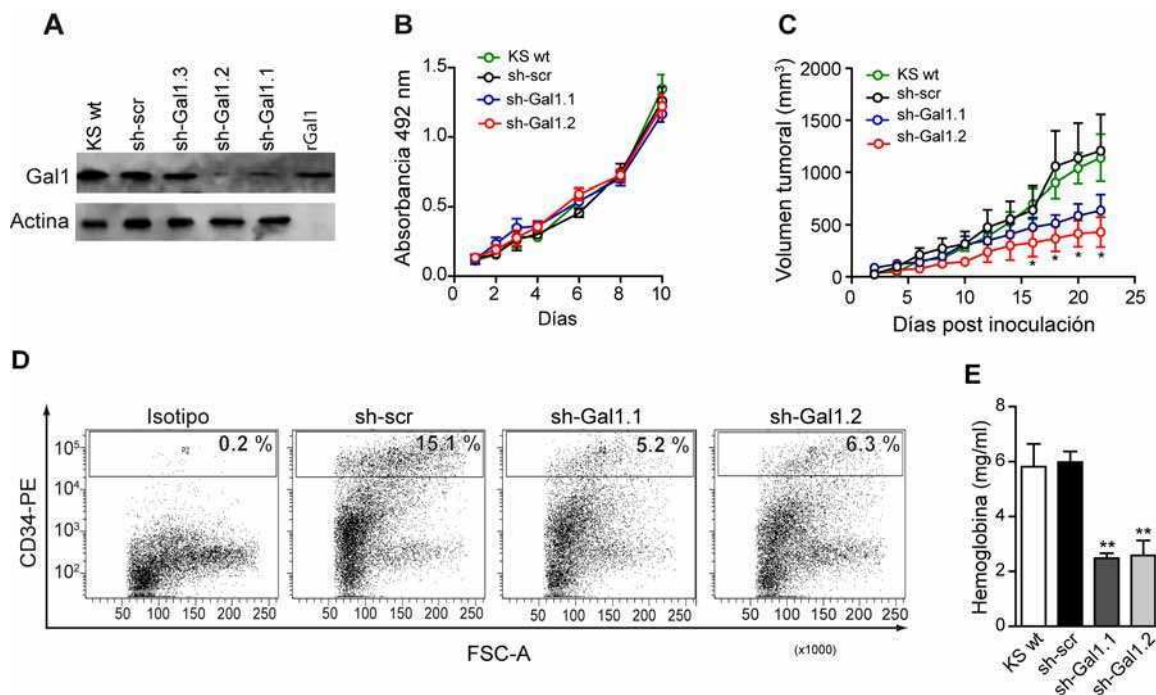


Figura 16. El bloqueo de la interacción entre Gal1 y glicanos previene el crecimiento tumoral y la neovascularización en modelos de xenotransplante de sarcoma de Kaposi humano. (A) Análisis de WB de Gal1 en células KS expresando establemente shRNA anti Gal1 (sh-Gal1.1, sh-Gal1.2, sh-Gal1.3) o el control scr (sh-scr). (B) Crecimiento *in vitro* de los clones KS. (C-E) Ratones *nude* fueron inoculados con 5×10^6 células KS (WT, sh-Gal1.1, sh-Gal1.2 o sh-scr) (C) Crecimiento de los tumores *in vivo*. (D) Contenido de hemoglobina en los tumores. (E) Análisis por citometría de flujo del contenido de ECs CD34⁺ en los tumores. El margen superior izquierdo de cada dot plot representa el porcentaje de células CD34⁺. Los datos representan la media \pm SEM de 4 experimentos con 6 animales por grupo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs. KS sh-scr

la expresión de Gal1 en un modelo singenico de melanoma murino (B16) en ratones inmunocompetentes B6. Para ello, generamos clones estables de células B16 infectadas con los vectores retrovirales codificantes de shRNA anti-Gal1 o control (sh-Gal1.1, sh-Gal1.2, sh-scr) y evaluamos el crecimiento y la neovascularización de los

mismos en ratones singeneicos B6. Previamente, confirmamos la efectividad del silenciamiento sobre la expresión de Gal1 y la capacidad proliferativa intrínseca de las células *in vitro* para descartar posibles efectos no deseados (**Figura 17A, B**). Al inocular los clones B16 en ratones B6 WT observamos una menor capacidad de crecimiento de los tumores sh-Gal1 respecto a tumores control o sh-scr (**Figura 17C**). Este efecto fue acompañado de una marcada reducción del número de CEs asociadas al tumor (**Figura 17D**) y un menor contenido de hemoglobina (**Figura 16E**). Más aún, la detección inmunohistoquímica de vasos sanguíneos con un anticuerpo anti-CD31 demostró que el silenciamiento de Gal1 se asocia a un menor número de vasos asociados al tumor (**Figura 17F**). Al evaluar el compartimento inmunológico en estos ratones encontramos que las células de ganglios drenantes al tumor (TDLN) provenientes de ratones con tumores sh-Gal1.1 exhibieron una mayor tasa de proliferación al ser re estimuladas *ex vivo* con células de melanoma B16 (**Figura 18A**). Además estas células fueron capaces de producir niveles superiores de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ e IL-17 asociadas a respuestas anti-tumorales luego de la re-estimulación con células B16 (**Figura 18B**). Notablemente, los TDLN presentaron mayor frecuencia de células T CD4⁺ productoras de IFN- γ , IL-17 y una marcada reducción en el número de células productoras de IL-10 (**Figura 18C**). Este efecto fue acompañado de una menor frecuencia de células T regulatorias CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (**Figura 18D**). En conjunto, estos resultados sugieren que el bloqueo de la interacción entre Gal1 y sus glicanos específicos es esencial a los fines de limitar el crecimiento tumoral al modular simultáneamente el compartimento vascular e inmunológico. Finalmente, y considerando las fluctuaciones en la expresión de glicanos en la superficie de CEs en respuesta a diferentes microambientes (**Figuras 1C y 3A**), nos propusimos evaluar en estudios *in vivo* si estos cambios ocurren a nivel fisiopatológico en tumores. Para ello comparamos el “glicofenotipo” de endotelios asociados a tumores con el de endotelios normales de la piel adyacente a melanoma mediante técnicas de lectin-histoquímica. El análisis por microscopía confocal reveló que los

endotelios asociados a piel normal exhibieron una alta frecuencia de ramificaciones en *N*-glicanos complejos (revelado como reactividad de la lectina L-PHA) y una alta frecuencia de residuos de SA α 2-6 (reactividad con SNA). En cambio, los endotelios asociados al tumor si bien muestran alta reactividad a L-PHA, llamativamente presentan muy baja reactividad contra SNA (**Figura 18E**). Estos resultados indican alta frecuencia de ramificaciones en *N*-glicanos complejos y baja presencia de SA α 2-6 en endotelios asociados a tumores. Adicionalmente, los datos sugieren que los endotelios de la piel normal estarían protegidos de la unión de Gal1, mientras que los vasos tumorales, presumiblemente a causa del microambiente en el cual se localizan, presentan una glicosilación permisiva a la acción de Gal1. De este modo, la glicosilación diferencial de las células del endotelio asociadas al tumor facilitaría la

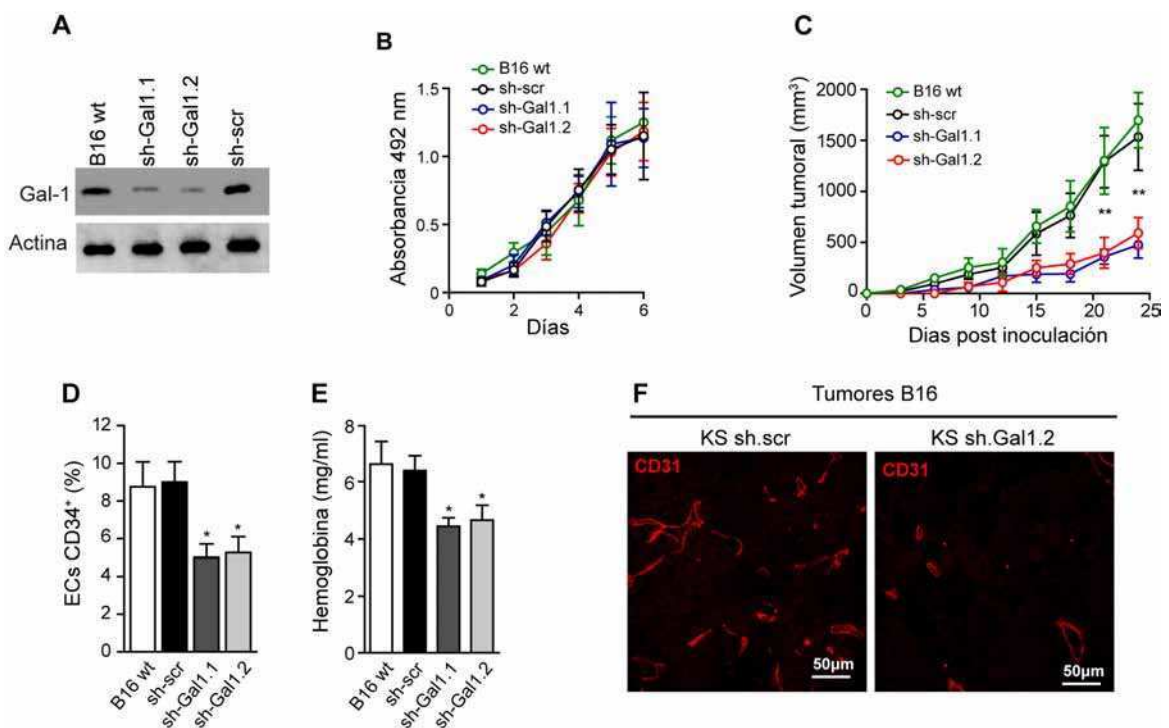


Figura 17. El bloqueo de la interacción entre Gal1 y glicanos previene el crecimiento tumoral y la neovascularización en modelos singeneicos de melanoma B16. (A) Análisis de WB de Gal1 en células B16F0 (B16) expresando establemente shRNA anti Gal1 (sh-Gal1.1, sh-Gal1.2) o el control scr (sh-scr). (B) Crecimiento *in vitro* de los clones B16. Los datos son representativos de cinco experimentos independientes. (C-F) Ratones B16 WT fueron inoculados con 2×10^5 células B16 (WT, sh-Gal1.1, sh-Gal1.2 o sh-scr). (C) Cinética del crecimiento tumoral. (D) Porcentaje de CE en el tumor evaluado por citometría de flujo. (E) Contenido de hemoglobina intratumoral en los distintos tumores. Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos con 6 animales por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. B16 sh-scr. (F) Análisis de microscopia confocal de la vasculatura en tumores evidenciado con el anticuerpo anti-CD31. Se muestran imágenes representativas.

formación de *lattices* entre Gal1 y *N*-glicanos promoviendo así fenómenos de neovascularización.

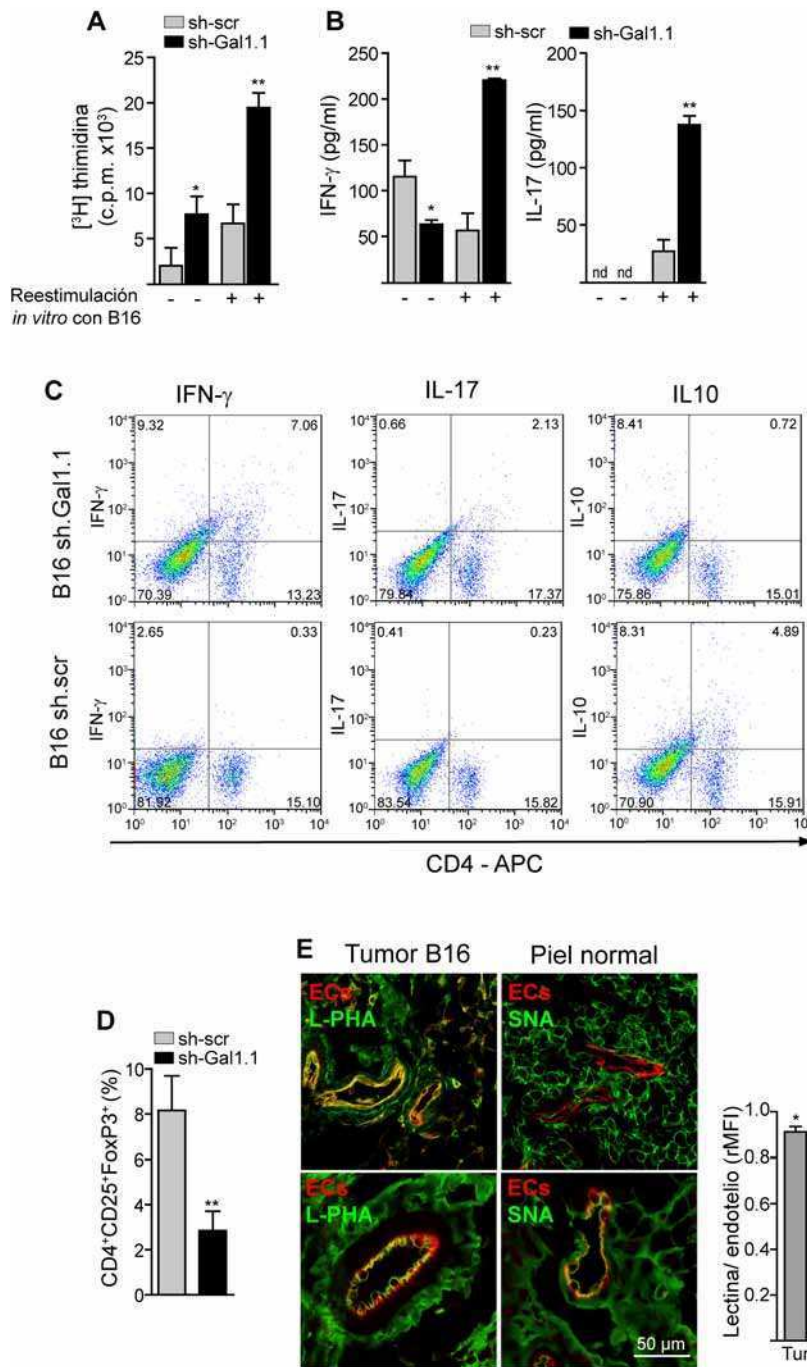


Figura 18. El bloqueo de la interacción entre Gal1 y glicanos potencia la respuesta inmune anti-tumoral. (A-C) Células de ganglios linfáticos drenantes fueron aisladas y re-estimuladas *ex vivo* con células tumorales B16 irradiadas. (A) Proliferación, (B) Producción de citoquinas como IFN- γ (derecha) e IL-17 (izquierda) (C) Porcentaje de células T CD4⁺ productoras de las citoquinas IFN- γ , IL-17 e IL-10. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos con 4 animales por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. B16 sh-scr. (D) Porcentaje de células T regulatorias FoxP3⁺ en ganglios linfáticos drenantes al tumor. ** $P < 0,01$ vs. B16 sh-scr. (E) Análisis por microscopia confocal de tumores WT y áreas de piel normal de ratones B6 marcados con anti-CD31 y lectinas (L-PHA y SNA). Panel derecho; Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de lectinas asociada a los endotelios (MFI lectina/MFI CD31 en áreas con MFI de CD31 positivas). Las barras representan la media \pm SEM de 3 experimentos con 3 animales por grupo. Se contaron 10 campos de 200X al azar por tumor.

3.4.2 DESARROLLO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES BLOQUEANTES DE LOS EFECTOS PRO ANGIOGÉNICOS DE GAL1

Dada la relevancia de la expresión de Gal1 y sus glicanos específicos en la generación de neovascularización tumoral, y teniendo en cuenta que el bloqueo de la expresión de Gal1 en tumores es suficiente para reducir el crecimiento tumoral a través de la disminución de la angiogénesis y el incremento de la respuesta inmune, nos propusimos desarrollar y evaluar una herramienta terapéutica racional basada en la generación de anticuerpos monoclonales (mAb) bloqueantes de la actividad de Gal1.

En una primera etapa, desarrollamos un panel de anticuerpos monoclonales que reconocen con alta afinidad Gal1 humana, murina y de simios (**Figura 19A**). En función de la afinidad de unión, se seleccionaron clones para continuar con los ensayos bioquímicos de reconocimiento (**Figura 19B**), los cuales fueron realizados mediante la técnica de mapeo de epítomos con diferentes fragmentos de Gal1 fusionados a GST (**Figura 19C**). La idea central del mapeo de epítomos fue determinar si los anticuerpos monoclonales eran capaces de reconocer porciones críticas de Gal1 asociadas a la unión a glicanos, como el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), el pre-CRD y/o el post CRD (**Figura 19D**). Los datos obtenidos demostraron que los tres clones seleccionados, y la mayoría de los ensayados (datos no mostrados) tienen en común la capacidad de reconocer una región post CRD, lo cual sugiere que esta región posee una alta inmunogenicidad y es clave para la unión de Gal1 a sus ligando glicosídicos. En colaboración con el laboratorio de la Dra. Margaret Shipp del Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston MA determinamos en primera instancia la capacidad bloqueante de estos anticuerpos en ensayos funcionales de apoptosis en células T específicas del virus de Epstein Barr (EBV) (Ouyang y col. 2011). El análisis de los resultados obtenidos permitió seleccionar el clon F8.G7 como el mejor candidato para realizar los ensayos de bloqueo de angiogénesis. A los fines de validar la actividad funcional de estos

anticuerpos monoclonales en nuestro sistema, determinamos en primer lugar la capacidad del clon F8.G7 de desplazar la unión de Gal1 a células HUVEC (**Figura**

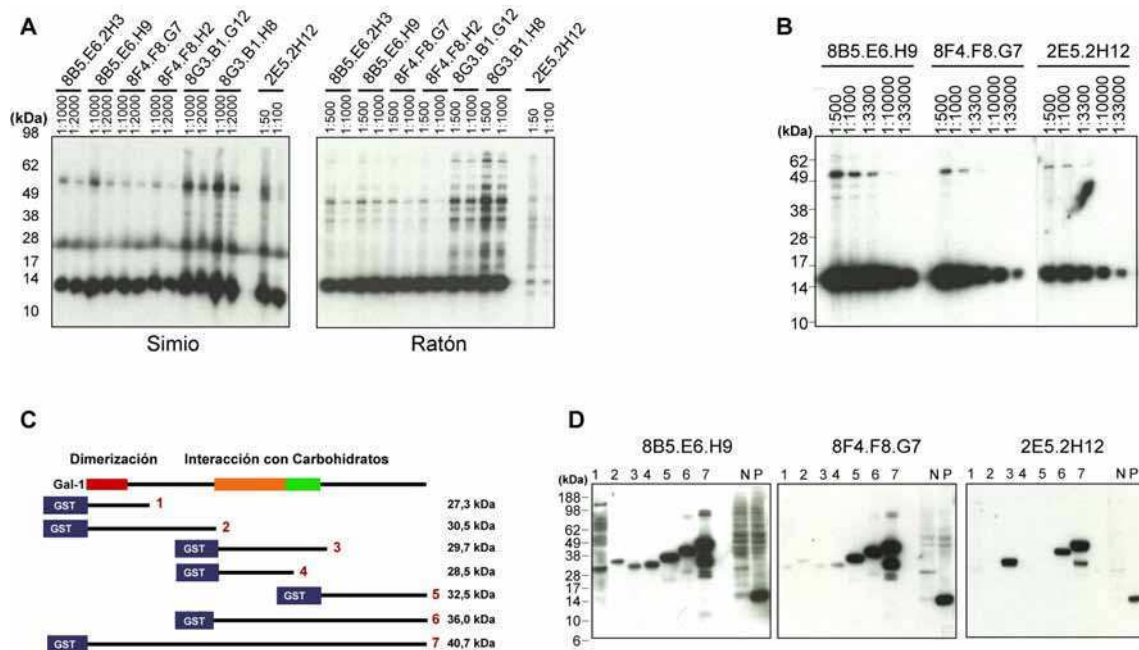


Figura 19. Caracterización de anticuerpos monoclonales anti Gal1 (mAbs). (A) Análisis de WB de los mAbs (8B5.E6.H9, 8F4.F8.G7 y 2E5.2H.12) en extractos celulares de origen murino y de simios. (B) Titulación por WB de los mAbs en muestras de origen humano. (C) Representación de los distintos fragmentos de Gal1-GST. Se muestra el número de fragmento (1 a 7) y el peso molecular de cada uno. (D) Análisis de mapeo de epitopes por WB. Evaluación del reconocimiento de los mAb de los fragmentos GST-Gal1. Los números en cada calle del WB representan el número de fragmento mostrado en B. las calles N y P muestran controles positivos y negativos de expresión de Gal1 respectivamente.

20A). Notablemente, encontramos que los otros clones (E6.H9 y 2H12) que reconocían Gal1, eran incapaces de desplazar la unión a HUVEC (**Figura 20B**) sugiriendo la delicada selectividad de los anticuerpos monoclonales generados en diferentes sistemas experimentales.

Por ensayos de citometría observamos además, que el clon F8.G7, no desplaza la unión de Gal3 ni de Gal8 a CEs, lo cual demuestra la especificidad de dicho anticuerpo por Gal1 y la ausencia de potenciales efectos 'off-target' (**Figura 20C**). En este sentido, el clon F8.G7 mostró una alta capacidad bloqueante de la actividad de Gal1 sobre la proliferación (**Figura 20D**), migración (**Figura 20E**) y morfogénesis (**Figura 20F**) de HUVEC *in vitro*. Notablemente, la pre-incubación de estas células con el anticuerpo F8.G7 fue suficiente para

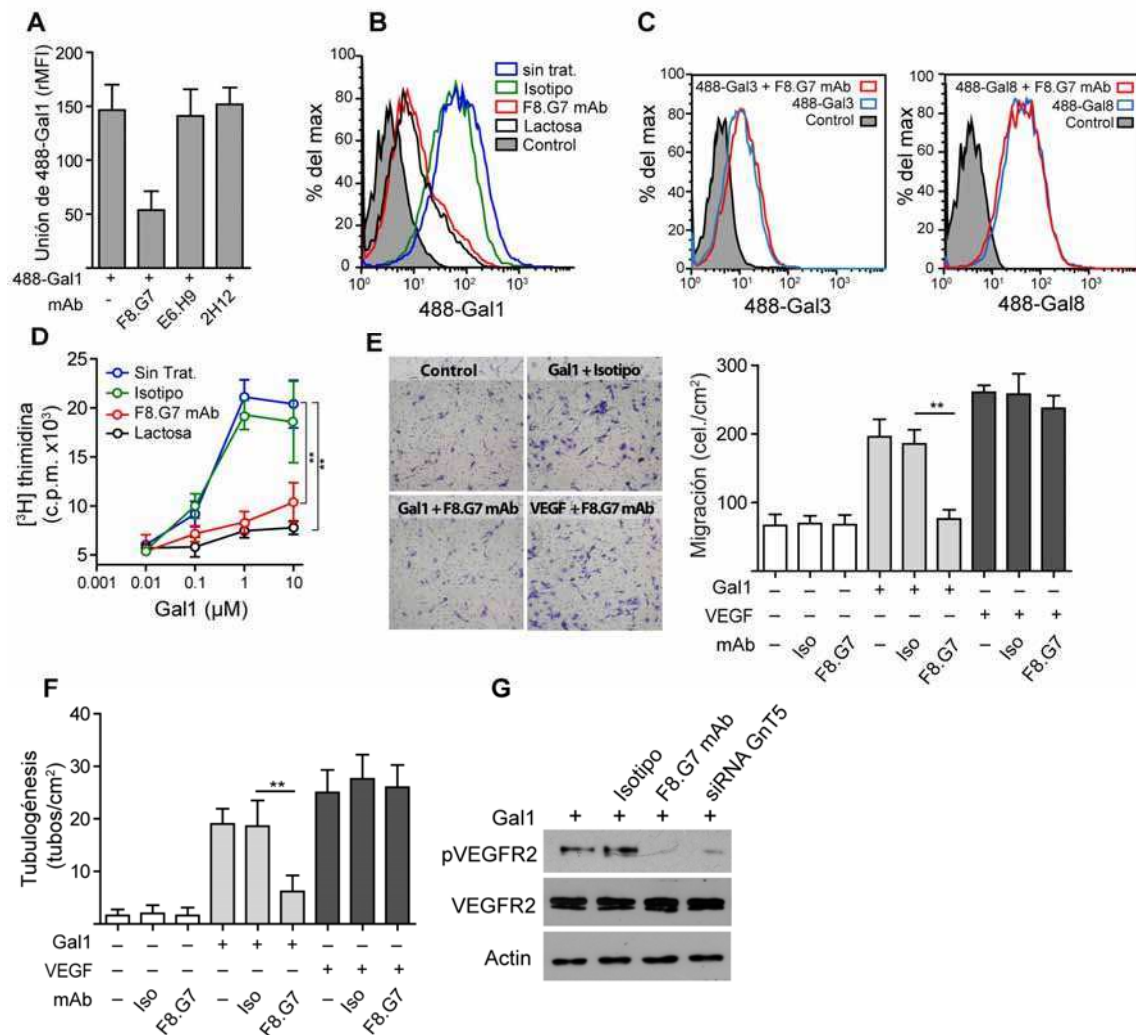


Figura 20. Caracterización funcional de anticuerpos monoclonales (mAb) anti Gal1: Bloqueo de la neovascularización *in vitro*. (A) Unión de 488-Gal1 (1 μ M) a CE en presencia o ausencia de los anticuerpos monoclonales anti Gal1 (0,5 μ M) (8B5.E6.H9, 8F4.F8.G7 y 2E5.2H.12). Las barras representan la intensidad de fluorescencia media relativa al isotipo \pm SEM de cinco experimentos independientes. $**P < 0,01$ vs. control sin mAb. (B) Análisis por citometría de flujo de la Unión de 488-Gal1 (1 μ M) a CE en presencia o ausencia de lactosa (30 mM), mAb F8.G7 o control de isotipo (IgG2B λ) (ambos a 0,5 μ M). (C) Unión de 488-Gal3 (20 μ g/ml, izquierda) o 488-Gal8 (20 μ g/ml, derecha) a CE en presencia o ausencia de mAb F8.G7 (0,5 μ M). (B-C) control, representa CE sin el agregado de galectina. (D) Proliferación de CE inducida por Gal1 (1 μ M) en presencia o ausencia de lactosa (30 mM), mAb F8.G7 o control de isotipo (IgG2B λ) (ambos a 0,5 μ M). (E) Migración inducida por Gal1 o VEGF en CE tratadas o no con mAb F8.G7 o control de isotipo (IgG2B λ). Izquierda, imágenes representativas; derecha: los datos representan la media del número de células migrantes \pm SEM de cinco experimentos independientes. $**P < 0,01$. (F) Tubulogénesis inducida por Gal1 o VEGF en CE tratadas o no con mAb F8.G7 o con control de isotipo (IgG2B λ). Los datos representan la media del número de estructuras tubulares por $\text{mm}^2 \pm$ SEM de al menos cuatro experimentos. $**P < 0,01$. (G) Análisis de WB de la fosforilación de VEGFR2 inducida por Gal1 en CE tratadas con mAb F8.G7 (0,5 μ M) o en células transfectadas con siRNA contra Gnt5.

bloquear la activación de VEGFR2 inducida por Gal1 a niveles similares a los encontrados con el siRNA específico de Gnt5. **(Figura 20G)**. Estos datos, sugieren que el bloqueo de Gal1 mediado por anticuerpos monoclonales es suficiente para impedir la unión a *N*-glicanos específicos y la activación de las vías de señalización

que llevan a la inducción de angiogénesis, indicando que esta herramienta podría ser útil a los fines de generar una respuesta anti-tumoral efectiva en diversos tipos de tumores.

3.4.3 EFECTO TERAPÉUTICO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GAL₁ SOBRE LA ANGIOGÉNESIS *IN VIVO*

Con el fin de evaluar la capacidad del anticuerpo F8.G7 de bloquear los efectos pro-angiogénicos de Gal1 *in vivo*, inoculamos ratones B6 ó *nude* con células B16 ó KS respectivamente y evaluamos la eficacia del tratamiento sobre la angiogénesis tumoral. Utilizamos un protocolo terapéutico en el cual el anticuerpo monoclonal o su control de isotipo fueron inyectados en el momento en que el tumor alcanzó un volumen aproximado de 100 mm³ en dosis crecientes de 2,5 7,5 y 15 mg/Kg de peso cada 3 días durante el transcurso del experimento. El bloqueo de la acción de Gal1 por F8.G7 (pero no su control de isotipo) fue suficiente para inhibir el crecimiento de los tumores KS inoculados en ratones *nude* (**Figura 21A**). Concomitantemente, el número de células endoteliales CD34⁺ (**Figura 21B**) y el contenido de hemoglobina (**Figura 21C**) en este modelo se vió considerablemente disminuido respecto a ratones tratados con el anticuerpo control IgG2b λ (isotipo) o inyectados con PBS. Estos resultados confirman el papel central de Gal1 en el crecimiento tumoral dependiente de la inducción de angiogénesis e independiente del efecto sobre el escape tumoral. Sin embargo, y pese a que el mAb F8.G7 fue capaz de inhibir drásticamente el crecimiento tumoral en un modelo singeneico de melanoma B16 en ratones B6 (**Figura 21D**), no pudimos observar cambios significativos en los parámetros asociados a la reducción de la neovascularización. En este sentido, y sorpresivamente no se observaron cambios en el número de CEs (**Figura 21 E**) ni en el contenido de hemoglobina (**Figura 21F**) en los tumores B16 tratados con el anticuerpo F8G7 respecto a los tumores tratados con control de isotipo o PBS. Estos datos, sugieren

una interrelación estrecha entre el compartimiento inmunológico y el vascular mediada por Gal1 y sus glicanos. Por otro lado, los resultados obtenidos sugieren que los efectos observados sobre la regulación de la neovascularización en modelos singeneicos son de mayor complejidad que lo anticipado.

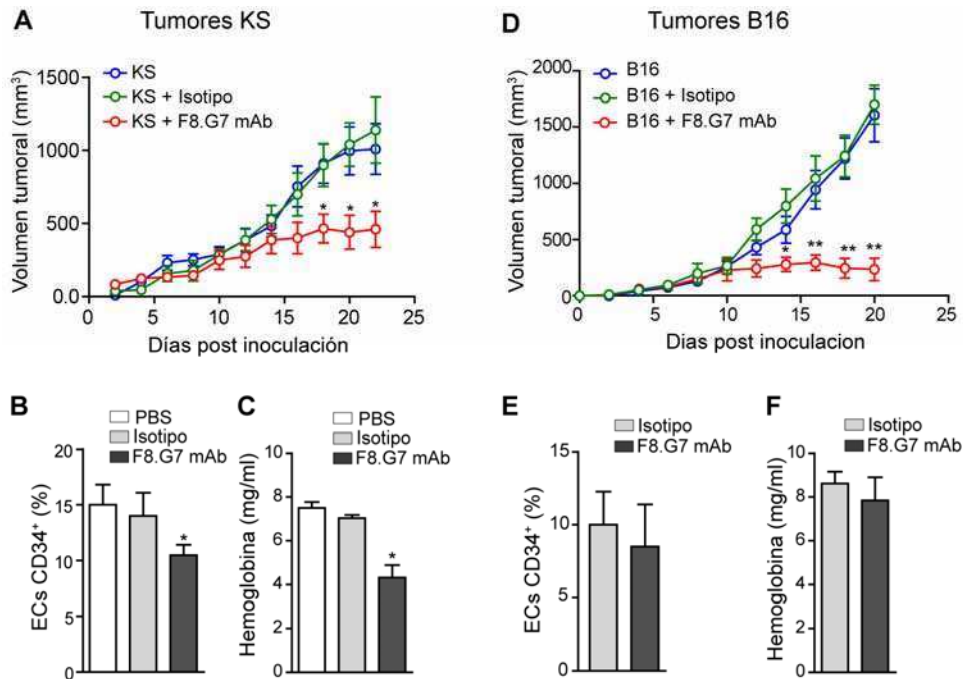


Figura 21. El Bloqueo terapéutico de Gal1 mediado por anticuerpos monoclonales (mAb) inhibe el crecimiento y regula la neovascularización tumoral. (A-C) Ratones nude inoculados con 5×10^6 células KS fueron tratados con mAb F8.G7 o control de isotipo (IgG2B λ) (ambos 7,5 mg/Kg) cada tres días a partir de que los tumores alcanzaron los 100 mm³. (A) Cinética de crecimiento tumoral. (B) Análisis de por citometría de flujo del porcentaje de ECs CEs CD34⁺ intratumorales. (C) Contenido de hemoglobina tumoral. Los datos representan la media \pm SEM de cinco experimentos independientes. *P< 0,05 Vs. isotipo. (D-E) Ratones B6 inoculados con 2×10^5 células de melanoma B16 fueron tratados con el mAb F8.G7 o isotipo (7,5 mg/Kg) cada tres días a partir de que los tumores alcanzaron los 100 mm³. (D) cinética de crecimiento de los tumores (E) Porcentaje de CEs CD34⁺ intratumorales. (F) Contenido de hemoglobina tumoral. Los datos representan la media \pm SEM de cinco experimentos independientes. *p<0,05, **p<0,01 vs. B16.

3.4.4 EFECTO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GAL₁ SOBRE LA NORMALIZACIÓN DEL ENDOTELIO TUMORAL *IN VIVO*.

Con el fin de investigar con mayor profundidad el potencial terapéutico de anticuerpos monoclonales anti-Gal1I, nos propusimos estudiar su efecto sobre la morfología y funcionalidad del endotelio asociado a tumores. Para ello, realizamos ensayos de marcación y visualización de la red vascular *in vivo* mediante la administración intravenosa de la lectina *Griffonia simplicifolia* (GLS-1B4) marcada fluorescentemente. Ratones B6 tratados con F8.G7 o con el control de isotipo fueron anestesiados e

inyectados con 100 μg de la lectina. Luego de 10 min los tejidos fueron fijados por perfusión cardiaca con PFA 4% y los tumores cortados en criostato en secciones de al menos 40 μm de espesor. Esta estrategia, permite observar en detalle la morfología vascular, y en asociación con el estudio de los pericitos asociados al endotelio, permite determinar el estado de maduración de los vasos sanguíneos (Mc Donald, 2008). La visualización de la vasculatura mostró que los tumores tratados con el mAb F8.G7 presentan un fenotipo vascular con mayor grado de organización estructural con una red vascular menos caótica, menor número de vasos ramificados, menos tortuosos y con un menor diámetro vascular medio (**Figura 22A, B**). Además, observamos un incremento en el número de pericitos que expresan el marcador αSMA asociados a los vasos tratados con F8.G7 (**Figura 22C**), lo que indica un mayor grado de normalización vascular en estos tumores respecto a los tratados con isotipo. El análisis detallado del fenotipo de pericitos asociados a la vasculatura tumoral, mediante la tinción inmunohistoquímica con marcadores específicos, mostró una menor expresión de los marcadores RGS5 y PDGFR- β en las células asociadas a vasos sanguíneos en tumores tratados con el mAb F8.G7 comparado con aquellas presentes tumores tratados con control de isotipo. En cambio los niveles de desmina no se mostraron alterados por los tratamientos (**Figura 22D**). Estas diferencias en la distribución de marcadores de pericitos de tumores tratados con F8.G7 típicamente marcan la transición de pericitos con fenotipo inmaduro (asociados a vasculaturas malignas) a pericitos con fenotipo maduro o diferenciado (asociados a vasculaturas normales). Estos resultados sugieren un efecto inesperado del anticuerpo bloqueante anti-Gal1 sobre la normalización y madurez del endotelio asociado a tumores.

Por último, y para confirmar la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti- Gal1 de normalizar la vasculatura tumoral evaluamos, mediante el uso del kit Hypoxiprobe-1, los niveles de hipoxia en tumores *in vivo* a través de la determinación de la presencia de aductos de pimonidazole (presentes en zonas hipóxicas). El análisis por microscopia confocal reveló una marcada reducción del número y tamaño

de áreas con bajo contenido de oxígeno en tumores tratados con el anticuerpo F8.G7 respecto tumores tratados con el control de isotipo, indicando una mejor oxigenación

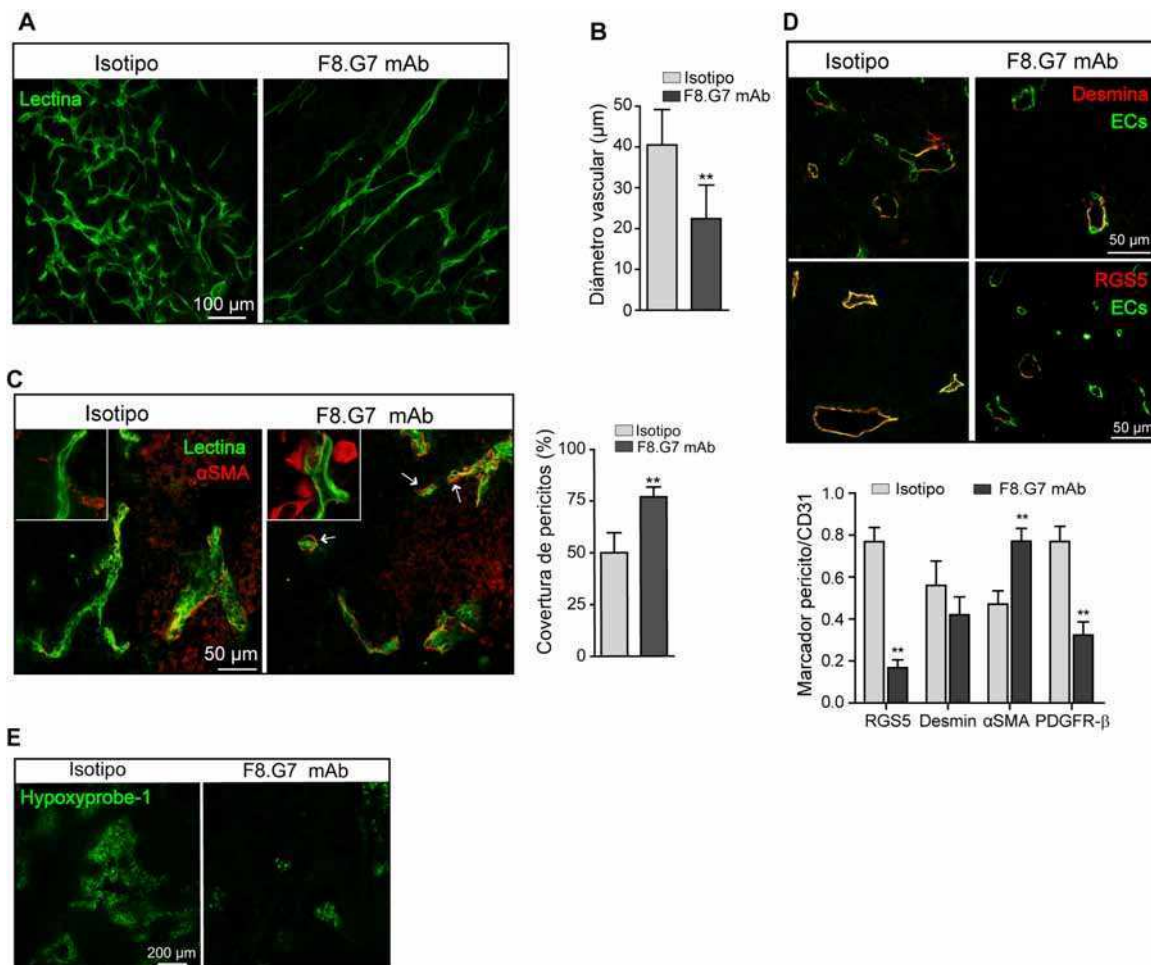


Figura 22 La administración terapéutica del anticuerpo monoclonal (mAb) F8.G7 anti-Gal1 promueve el remodelado vascular en melanoma murino. (A-E) Ratones B6 inoculados con 2×10^5 células de melanoma B16 fueron tratados con el mAb F8.G7 o control de isotipo (7,5 mg/Kg) cada tres días a partir de que los tumores alcanzaron los 100 mm^3 . (A) Microscopia confocal de la red vascular visualizada mediante la perfusión de ratones B6 con la lectina GLS-1_{B4} (B) Cuantificación del diámetro vascular. Las barras representan la media \pm SEM del diámetro medio vascular calculado midiendo 10 campos de 200 X por tumor en tres experimentos independientes. (C) Microscopia de vasos perfundidos con GLS-1_{B4}-FITC y teñidos con el marcador de pericitos α SMA. Las flechas indican pericitos asociados a la vasculatura. Panel izquierdo, cálculo del porcentaje de pericitos asociados a los vasos sanguíneos estudiados. (D) Microscopia confocal de la vasculatura tumoral marcada con anticuerpos anti-CD31, anti-desmina o anti-RGS5. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos. Panel inferior, Cuantificación de la relación de vasos sanguíneos con presencia de pericitos que expresan RGS5, desmina, α SMA o PDGFR β . Las barras representan la relación media entre vasos CD31⁺ vs los diferentes marcadores. (B-D) **p<0,01 vs. isotipo. (E) Microscopia confocal zonas hipóxicas en tumores B16 marcados con Hypoxyprobe-1. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

en estos tumores (**Figura 22E**), evento que se asocia fuertemente al fenómeno de normalización vascular.

De este modo, el bloqueo terapéutico de Gal1 en tumores es capaz de inhibir su crecimiento y de generar cambios morfológicos y fenotípicos en la vasculatura promoviendo su restauración y normalización. Este fenómeno tiene importantes

implicancias clínicas dada la relevancia que ha cobrado en los últimos años la normalización vascular como alternativa para mejorar la accesibilidad de drogas a los tumores y hacerlos más sensibles a los tratamientos convencionales (Jain, 2005).

3.4.5 EFECTO INTEGRADO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GAL-1 SOBRE PROGRAMAS VASCULARES Y DE ESCAPE TUMORAL

Considerando la participación de Gal1 en fenómenos de escape tumoral (Rabinovich & Toscano, 2009; Rubinstein y col., 2004), nos propusimos investigar si el tratamiento con este anticuerpo bloqueante, era capaz, de potenciar la respuesta inmune anti-tumoral y verificar si los efectos sobre la biología vascular y el sistema inmune estaban interconectados. Notablemente la administración terapéutica del anticuerpo monoclonal F8.G7 logró estimular la proliferación y la liberación de IFN- γ e IL-17 por parte de células T de ganglios drenantes al tumor al ser re-estimuladas *in vitro* con células de melanoma B16 (**Figura 23 A, B**). En este sentido, el bloqueo de Gal1 logró reducir la producción de IL-10 por parte de células T CD4⁺ (**Figura 23 D**) y disminuir la frecuencia de células T_{reg} CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ en TDLN (**Figura 23 C**). Más aún, el tratamiento con el anticuerpo F8.G7 logró incrementar el infiltrado de células T CD8⁺ productoras de IFN- γ , efectoras de la inmunidad anti-tumoral, en el parénquima de tumores estudiados (**Figura 23E**). En conjunto los resultados expuestos demuestran una potente inducción de la respuesta inmune anti-tumoral inducida por el bloqueo de Gal1 mediante el uso de anticuerpo monoclonales, evidenciando de esta manera las implicancias terapéuticas de estos hallazgos.

Finalmente, con el fin de determinar si el incremento en la respuesta inmune se debe, al menos en parte, a la normalización de la vasculatura, diseñamos experimentos de transferencia adoptiva de células T en ratones con tumores tratados con el anticuerpo monoclonal anti-Gal1 o su control de isotipo. A tal fin, se aislaron células de bazo de ratones con tumores establecidos, se marcaron con CFSE y se

transfirieron por inyección intravenosa a ratones portadores de tumores tratados con el anticuerpo monoclonal F8.G7 o con control de isotipo. Luego de 24 h los tumores

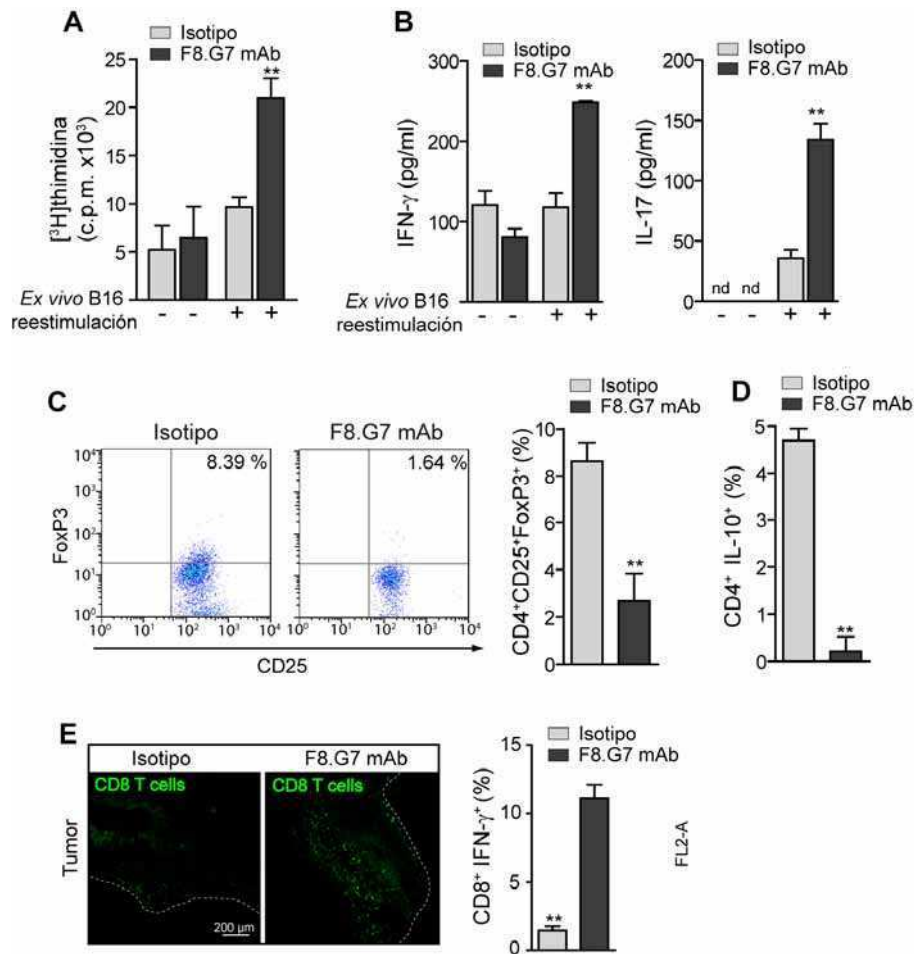


Figura 23. La administración terapéutica del anticuerpo monoclonal (mAb) F8.G7 anti-Gal1 potencia la respuesta inmune anti.tumoral. (A) Proliferación y (B) Secreción de IFN- γ e IL-17 por parte de células T de ganglios linfáticos drenantes al tumor (TDLN) de ratones tratados con F8.G7 o isotipo en respuesta a la re-estimulación *in vitro* con células B16. (C) Izquierda, citometría de flujo; derecha, porcentaje de células T_{reg} CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ en TDLN de ratones tratados con mAb F8.G7 o control de isotipo. (D) Porcentaje de células T CD4⁺ productoras de IL-10 en TDLN de ratones tratados con mAb F8.G7 o control de isotipo. (E) Panel izquierdo: microscopia confocal de células T CD8⁺ infiltrando los tumores; panel derecho, citometría de flujo de células T CD8⁺ productoras de IFN- γ en el tumor. (A-E) **p<0,01 vs. isotipo.

fueron removidos, disgregados y analizados por citometría de flujo. Los datos revelaron un incremento en el número de células CFSE⁺ en los tumores tratados con F8.G7 respecto al control (**Figura 24A**), sugiriendo un mayor influjo de células T en los ratones portadores de una vasculatura normalizada. Interesantemente, no observamos diferencias en el número de células T fluorescentes en el bazo de estos ratones, lo que sugiere que el fenómeno es selectivo de los tumores donde la vasculatura aberrante está sujeta a la acción de Gal1.

Con el fin de confirmar que estos datos se deben a normalización de la vasculatura y descartar posibles interferencias causadas por fenómenos de quimiotaxis relacionados con la administración del anticuerpo monoclonal anti-Gal1, desarrollamos una estrategia similar a la anterior pero en lugar de inyectar células T inoculamos perlas fluorescentes de tamaño similar a los linfocitos. El rastreo *in vivo* de dichas perlas fluorescentes mediante citometría de flujo reveló un número

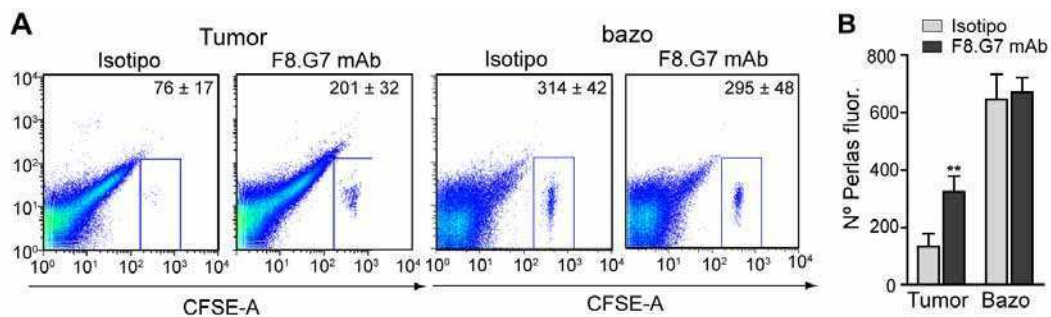


Figura 24. La administración terapéutica del anticuerpo monoclonal (mAb) F8.G7 anti-Gal1 promueve el influjo de células inmunes al parénquima tumoral. Esplenocitos de bazo de ratones con tumores B16 fueron marcados con CFSE e inoculadas (5×10^6) en ratones con tumores B16 establecidos y tratados con Isotipo o mAb F8.G7. (A) Análisis por citometría de flujo de la cantidad de células CFSE⁺ infiltrando tumores o bazo de ratones tratados con isotipo o F8.G7. El número de células CFSE⁺ se calculó como el número de eventos por cada 0.1 cm^3 de tumor. (B) Número de perlas fluorescentes intra-tumorales 15 min luego de la inoculación. El número de perlas se calculó como número de eventos por $0,1 \text{ cm}^3$ de tejido. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

incrementado de las mismas en tumores tratados con el anticuerpo monoclonal anti-Gal1 respecto a tumores tratados con el control de isotipo. Nuevamente el número de perlas presentes en órganos normales con la vasculatura quiescente, no mostró diferencias entre los tratamientos (**Figura 24B**). En conjunto, estas evidencias nos permiten postular a los anticuerpos bloquenes anti-Gal1 como el primer agente multifuncional capaz de generar beneficios terapéuticos atenuando la angiogénesis patológica, facilitando la normalización del endotelio y, consecuentemente, mejorando el influjo y la acción de células T efectoras, las que en ausencia del efecto inmunosupresor de Gal1, son más competentes a los fines de limitar el crecimiento tumoral.

3.5 RELEVANCIA CLÍNICA DE LA EXPRESIÓN DE GAL1 EN TUMORES HUMANOS

3.5.1 LA EXPRESIÓN DE GAL1 SE ASOCIA A LA MALIGNIDAD Y CAPACIDAD PRO-ANGIOGÉNICA DE TUMORES HUMANOS

Considerando las potenciales implicancias terapéuticas de los resultados obtenidos en los ensayos pre-clínicos de bloqueo de la actividad de Gal1 en tumores, decidimos evaluar la importancia de la expresión de Gal1 en la transición de fenotipos benignos a malignos en patologías de origen vascular y en la neovascularización de patologías humanas donde se ha demostrado que la expresión de Gal1 se asocia a la malignidad de dichos tumores (van den Brule y col., 2004; Liu & Rabinovich, 2005). En primer lugar analizamos la expresión global de genes en modelos murinos de sarcoma de Kaposi (mECK36 y RacCA) (Mutlu y col., 2007) en los cuales observamos que Gal1 forma parte de la “firma genética” de dichos tumores ya que se expresa exclusivamente en tejido tumoral y no en piel normal (**Figura 25A**). Estas observaciones fueron validadas mediante estudios de inmunohistoquímica de Gal1 y el marcador fenotípico de Kaposi LANA en tumores establecidos (**Figura 25B**), y confirmadas por análisis de qPCR de células mECK36 (**Figura 25C**).

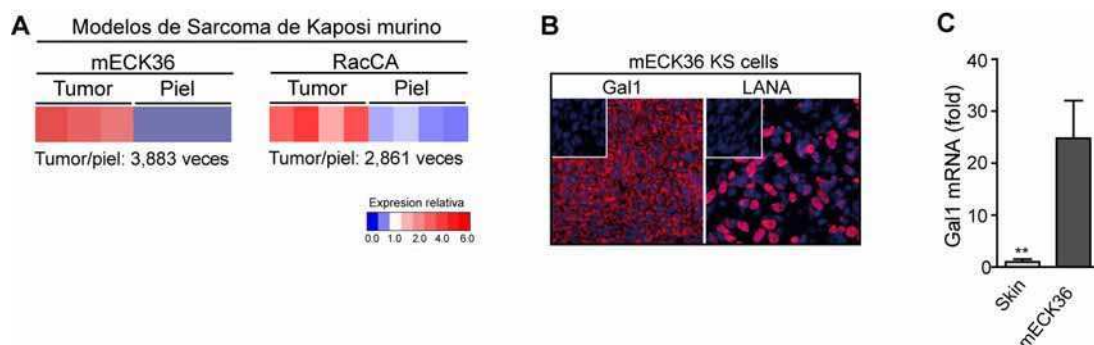


Figura 25. Expresión de Gal1 en Sarcoma de Kaposi murino. (A) Análisis de la expresión de Gal1 en microarreglos de genes de modelos de sarcoma de Kaposi murinos mECK36 y RacCA. (B) Microscopía confocal de la expresión de Gal1 y LANA en tumores mECK36 (C) Análisis del gen de Gal1 por qPCR en tumores mECK36 vs. piel normal. Los datos representan la media de la expresión del mRNA de Gal1 relativizado a mRNA 18S \pm SEM de tres experimentos independientes.

Posteriormente, estudiamos muestras aisladas de biopsias de sarcomas de Kaposi humanos en las cuales pudimos observar un perfil transcripcional similar a las muestras murinas donde Gal1 se expresa casi exclusivamente en tejidos tumorales respecto a la piel normal (**Figura 26A**). Estas observaciones fueron corroboradas y ampliadas mediante el estudio de un panel mayor de biopsias de pacientes afectados con diferentes patologías vasculares tanto de origen maligno como benigno. El estudio por inmunohistoquímica de estas biopsias mostró una fuerte marcación citoplasmática de Gal1 asociada exclusivamente a células fusiformes en lesiones de origen maligno (sarcoma de Kaposi) (**Figura 26B**). En cambio raramente detectamos reactividad contra Gal1 en lesiones vasculares benignas (**Figura 26B; Tabla 3.1**), en las cuales la expresión de Gal1 se circunscribió exclusivamente a algunas células del infiltrado inflamatorio característico de esas lesiones. En este sentido, la cuantificación de la expresión de Gal1 mostró una fuerte asociación entre la presencia de esta lectina y el fenotipo maligno de dichas patologías vasculares (**Figura 26C**). Estos datos ponen en relieve la importancia funcional y patológica de las interacciones

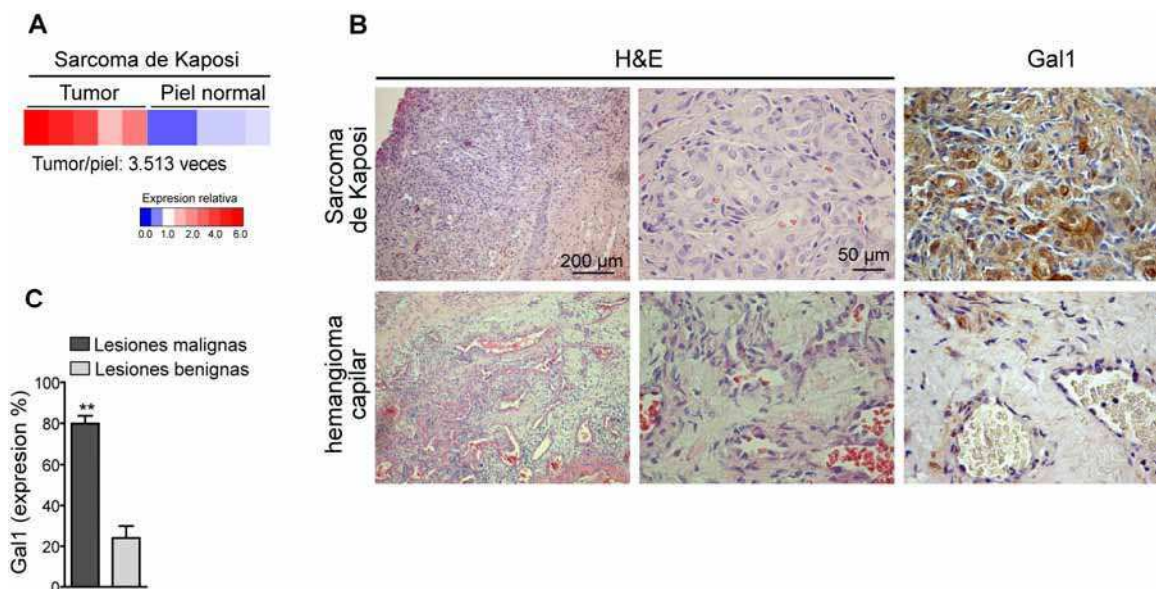


Figura 26. Expresión de Gal1 en patologías vasculares humanas. (A) Análisis de microarreglos de la expresión de Gal1 en sarcoma de Kaposi humano y piel normal. (B-C) Biopsias de lesiones vasculares benignas y tumores de sarcoma de Kaposi teñidas con H&E o con anticuerpo anti-Gal1. (B) Microfotografías representativas de patologías vasculares benignas y de Sarcoma de Kaposi. (C) Cuantificación del porcentaje de células reactivas para Gal1 en patologías vasculares malignas y benignas. (10 campos 200X) Los datos representan la media de la expresión de Gal1 de \pm SD. ** $p < 0,01$ vs. Patología benigna.

entre Gal1 y *N*-glicanos en patologías de origen vascular. Además los datos sugieren un papel adicional para Gal1 como posible marcador diagnóstico independiente de patologías vasculares, capaz de diferenciar tumores malignos de patologías benignas.

Finalmente, con el fin de expandir nuestras conclusiones a otros tumores humanos, realizamos estudios por inmunohistoquímica de melanoma y carcinoma de próstata. La marcación de Gal1 en biopsias de melanomas primarios (n=19) reveló abundante reactividad asociada positivamente al grado de vascularización de los tumores determinado como el número de micro vasos positivos para CD31 (**Figura 27 A, B**). Más aún, el análisis del perfil de expresión de Gal1 y la presencia de CEs CD34⁺ en una serie de carcinomas prostáticos humanos mediante el uso de un “*tissue array*” comercial, mostró una asociación altamente significativa entre ambos parámetros. (**Figura 27 C, D**). En conjunto, estos datos demuestran la relevancia clínica de las interacciones entre galectinas y glicanos en la vascularización de tumores y validan su potencial uso como blanco terapéutico y/o marcador diagnóstico en un amplio rango de tumores.

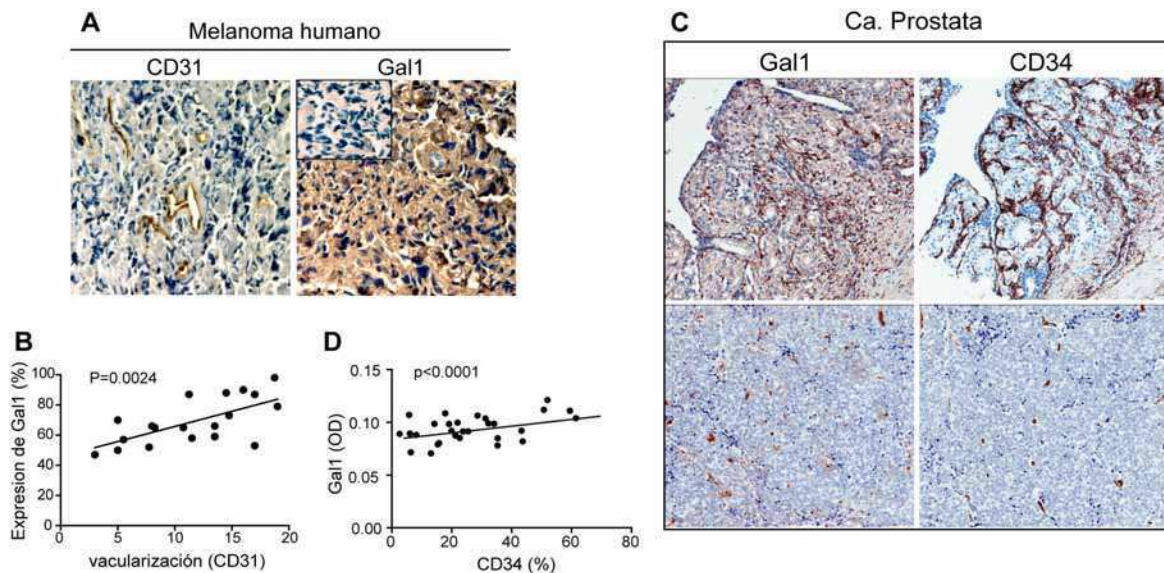


Figura 27. Expresión de Gal1 en melanomas y carcinoma de próstata humano (A-B) Marcación inmunohistoquímica de CD31 y Gal1 en biopsias de melanomas primarios (A) Imágenes representativas. (B) Cuantificación de la expresión de Gal1 y análisis de asociación lineal. (C-D) marcación inmunohistoquímica de CD34 y Gal1 *tissue array* de biopsias de carcinomas de próstata. (C) Imágenes representativas. (D) Cuantificación de la expresión y análisis de asociación lineal

TABLA 3.1 Expresión de Gal1 en patologías vasculares

Caso	Patología	Clasificación	Expresión de Gal1
1	Proliferación vascular reactiva	Benigna	+
2	Sarcoma de Kaposi ulcerado	Maligna	+++
3	Hemangioma telangiectático	Benigna	-
4	Sarcoma de Kaposi en placa	Maligna	++
5	Hemangioma cavernoso	Benigna	+
6	Proliferación vascular reactiva	Benigna	+
7	Granuloma piógeno	Benigna	+
8	Sarcoma de Kaposi ulcerado	Maligna	+++
9	Sarcoma de Kaposi en placa	Maligna	+++
10	Hemangioma capilar lobulado	Benigna	+
11	Proliferación vascular reactiva	Benigna	+
12	Hemangioma juvenil	Maligna	+++
13	Granuloma piógeno	Benigna	++
14	Hemangioma de células fusiformes	Benigna	+
15	Sarcoma de Kaposi ulcerado	Maligna	+++
16	Sarcoma de Kaposi ulcerado	Maligna	++
17	Hemangioma juvenil	Maligna	++
18	Hemangioma papilar	Benigna	-
19	Hemangioma telangiectático	Benigna	-
20	Granuloma piógeno	Benigna	+
21	Hemangioma cavernoso	Benigna	-
22	Sarcoma de Kaposi en placa	Maligna	+++
23	Hemangioma de células fusiformes	Benigna	-
24	Sarcoma de Kaposi ulcerado	Maligna	+++
25	Hemangioma de células fusiformes	Benigna	+
26	Proliferación vascular reactiva	Benigna	+
27	Sarcoma de Kaposi ulcerado	Maligna	+++
28	Hemangioma de células fusiformes	Benigna	-
29	Proliferación vascular reactiva	Benigna	-
30	Proliferación vascular reactiva	Benigna	-
31	Sarcoma de Kaposi ulcerado	Maligna	+++
32	Hemangioma telangiectático	Benigna	++
33	Sarcoma de Kaposi en placa	Maligna	++
34	Hemangioma papilar	Benigna	-
35	Proliferación vascular reactiva	Benigna	-
36	Sarcoma de Kaposi ulcerado	Maligna	+++
37	Hemangioma cavernoso	Benigna	+
38	Hemangioma telangiectático	Benigna	-
39	Sarcoma de Kaposi ulcerado	Maligna	++
40	Hemangioma de células fusiformes	Benigna	+
41	Sarcoma de Kaposi ulcerado	Maligna	+++
41	Hemangioma cavernoso	Benigna	-

4. DISCUSIÓN

La interacción entre lectinas endógenas multivalentes y glicanos específicos, presentes en glicoproteínas de la membrana celular, es capaz de decodificar información biológica clave a través de la formación de estructuras tipo microdominios, también llamadas '*lattices*'. Estos arreglos moleculares disparan cascadas de señalización intracelular que median efectos biológicos diversos regulados por un repertorio extenso de glicanos de superficie (Paulson y col., 2006). Recientes hallazgos han revelado cambios sustanciales en el repertorio de *N*- y *O*-glicanos en la transición entre tejidos normales, inflamados y neoplásicos, lo que posicionó al estudio del 'glicoma' en el centro de la escena científica y abrió nuevas puertas para la exploración de herramientas diagnósticas y de intervención terapéutica (Dube & Bertozzi, 2005; van Kooyk & Rabinovich, 2008). En este sentido, durante el transcurso de este trabajo de tesis doctoral, pudimos identificar y caracterizar tanto a nivel celular como molecular, un circuito vascular comandado por lectinas y glicanos, que vincula episodios de hipoxia con fenómenos de neovascularización y escape tumoral.

Los datos obtenidos en este estudio revelaron un nuevo mecanismo de regulación de la funcionalidad vascular, en el cual los microambientes que gobiernan el crecimiento y desarrollo de los tumores, regulan también la glicosilación diferencial del endotelio haciéndolo más susceptible a la acción de Gal1. En cambio, en microambientes inflamatorios (Th1 y Th17) observados frecuentemente en sitios de regresión tumoral o inflamación crónica, las CEs mostraron patrones de glicosilación restrictivos para la unión y funcionalidad de Gal1. De este modo, los datos nos permiten especular con un nuevo nivel de regulación de las respuestas fisiológicas, en el cual los azúcares a través de la interacción diferencial con diferentes lectinas endógenas, podrían determinar las respuestas celulares de acuerdo a las necesidades

del sistema en el cual se encuentren. En forma similar, Lau y col, describieron un sistema de regulación de receptores de factores de crecimiento en función de la cantidad de *N*-glicanos que los decoran y el metabolismo celular (Lau y col., 2007). De este modo, no es descabellado pensar en un mecanismo de selección natural que operó en el transcurso de la evolución determinando que las CEs tengan la capacidad de “decidir”, a través del repertorio de azúcares que expresan en su membrana, la acción de lectinas endógenas sobre su fisiología.

En el presente estudio observamos que Gal1, un miembro proto-tipo de la familia de las galectinas, es capaz de activar mecanismos moleculares dependientes del receptor acoplado a tirosina quinasa (VEGFR2) por una vía no clásica e independiente de la unión del ligando canónico VEGF (**Figura 4.1**). Así, las lectinas podrían sustituir a los ligandos clásicos y servir para modular la biología de las CEs, de modo tal de preservar el fenotipo angiogénico. Estas evidencias no son menores teniendo en cuenta que uno de los mayores obstáculos de las terapias anti-angiogénicas tendientes a bloquear la acción de VEGF consiste en la generación de mecanismos compensatorios que hacen a los tumores ignorar la falta de VEGF y los vuelve más agresivos e invasivos (Bergers & Hanahan, 2008; Ferrara, 2010; Helfrich y col., 2010).

El concepto de que la glicosilación de receptores de membrana puede afectar la señalización intracelular ha sido estudiada recientemente (Lau y col., 2007; Marth & Grewal, 2008; van Kooyk & Rabinovich, 2008); no obstante los mecanismos moleculares que median estos efectos no se hallan completamente dilucidados. La visión actual contempla la idea de que las ramificaciones en *N*-glicanos complejos adheridos a receptores de factores de crecimiento pueden influenciar procesos biológicos a través de la sintonización fina de los umbrales de activación de dichos receptores, su retención en la superficie y su distribución diferencial. (Lau y col, 2007; Markowska y col., 2010; Song y col., 2010). En algunos receptores de factores de crecimiento, se encontró que la interacción entre lectinas y glicanos regula la unión de

sus ligandos (Dennis y col., 2009). En el presente trabajo, proponemos una mirada algo diferente, en la cual la interacción entre lectinas y *N*-glicanos complejos regulada por el microambiente en el cual estas moléculas se encuentran, es capaz de crear *clusters* de señalización que imitan a los ligandos canónicos reemplazándolos o compensando por su ausencia. De este modo, la interacción entre Gal1 y *N*-glicanos podría promover fenómenos de ‘resistencia evasiva’ a las terapias anti- VEGF al co-optar por la vía de VEGFR2.

En nuestro estudio, describimos además, un mecanismo por el cual la hipoxia tumoral es capaz de amplificar el circuito de neovascularización de dos maneras distintas, pero ambas acopladas y complementarias. Por un lado la hipoxia altera la glicosilación de las CEs, las cuales exponen, en situaciones de baja tensión de O₂, un mayor número de glico-epitopes permisivos para la unión de Gal1 (**Figura 4.1**). Por el otro, la hipoxia es capaz de modular la expresión de Gal1 en células tumorales a través de mecanismos que son independientes del factor de transcripción HIF-1 α pero dependientes de la generación de especies reactivas del oxígeno ROS y de la activación del factor de transcripción NF- κ B (**Figura 4.1**). Estos datos son concordantes con la idea de que NF- κ B es el principal mediador en procesos de inflamación asociados a hipoxia (Karin & Greten, 2005), eventos en los cuales este factor actúa regulando la expresión de moléculas responsables de frenar la inflamación luego de la resolución de la respuesta inmune. Considerando además, que Gal1 es principalmente una lectina con propiedades anti-inflamatorias (Rabinovich & Toscano, 2009), resulta interesante especular con la posibilidad de que la razón evolutiva de la sobreexpresión de Gal1 durante la hipoxia sea la resolución de la inflamación, y que los tumores usurpan este mecanismo fisiológico a los fines de incrementar la vascularización y escapar del ataque del sistema inmune simultáneamente.

Si bien, un estudio reciente sugiere que Gal1 es blanco transcripcional de HIF-1 α en cáncer de colon (Zhao y col., 2010) en el presente estudio encontramos que la

hipoxia es capaz de inducir sobreexpresión de Gal1 aún en ausencia de ese factor de transcripción a través de un mecanismo que depende de la activación de NF- κ B mediada por ROS.

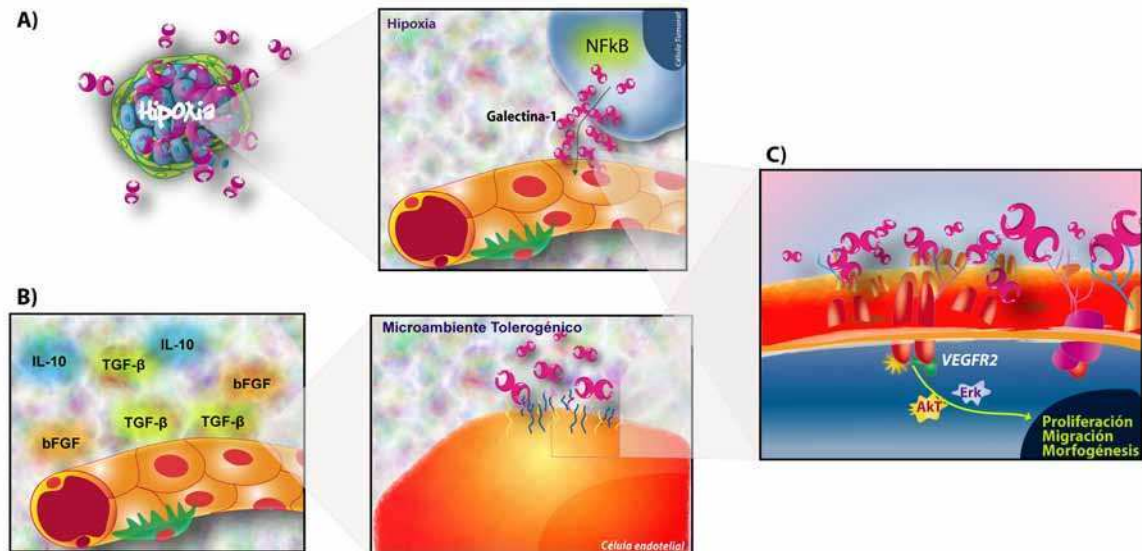


Figura 4.1. Modelo esquemático que representa cómo las interacciones entre Gal1 y sus glicanos se hallan regulados por microambientes hipóxicos y tolerogénicos. A) la hipoxia incrementa los niveles de expresión y secreción de Gal1 por parte de células tumorales a través de mecanismos dependientes de NF- κ B que aumentan la disponibilidad de glicanos permisivos para la unión de Gal1 a la superficie de CEs. **B)** La presencia de citoquinas anti-inflamatorias típicas de microambientes tumorales modula la exposición de glicanos en CEs incrementando la capacidad de unión de Gal1 a dichas células. **C)** El incremento de la exposición de glicanos como así también el incremento en la expresión de Gal1, crean en los microambientes tumorales un circuito que amplifica la unión de Gal1 a VEGFR2 de manera independiente de la presencia de VEGF. Esta unión, activa la cascada de señalización dependiente de VEGFR2, Akt y Erk modulando así la biología del endotelio a favor de la promoción de fenómenos de neovascularización.

Estos hallazgos contemplan la posibilidad de que ambos mecanismos, dependientes e independientes de HIF-1, puedan controlar la expresión de Gal1 mediada por hipoxia en diferentes tejidos durante procesos de neovascularización inducida por bajas tensiones de oxígeno. No obstante, cabe destacar que nosotros, utilizando herramientas informáticas, no pudimos encontrar regiones consenso para la unión de HIF en el promotor de Gal1, lo que hace pensar en un sistema más complejo de regulación de la expresión de esta proteína en situaciones de privación de oxígeno.

A pesar de que HIF-1 α ha sido propuesto como blanco universal de varias terapias anti-angiogénicas y es el principal regulador de la respuesta a hipoxia, crecientes evidencias indican la existencia de mecanismos alternativos capaces de

vincular fenómenos de hipoxia y neovascularización. En este sentido, varios factores expresados en hipoxia con capacidad de regular la neovascularización, han sido reportados por otros autores. Trabajos elegantes demostraron que tanto IL-8 como la proil-hidroxilasa PHD2 son capaces de controlar la angiogénesis tumoral a través de mecanismos que son independientes de HIF-1 α , pero que dependen de la activación de NF- κ B (Chan y col., 2009; Mizukami y col., 2005). Estos resultados sugieren que en microambientes hipóxicos la activación de NF- κ B sería crítica independientemente de HIF-1 a los fines de amplificar la expresión de genes pro-apoptóticos e inmunosupresores.

Evidencias emergentes los últimos años sugieren íntimas conexiones y sorprendentes similitudes entre los programas vasculares e inmunológicos que operan en la tumorigénesis (Ferrara, 2010; Jinushi & Dranoff, 2007). En concordancia con esta línea de pensamiento, nuestros resultados demuestran que las interacciones entre galectinas y glicanos pueden controlar la neovascularización tumoral creando simultáneamente efectos inmunosupresores que determinan el destino fatal de células T efectoras, favorecen la expansión de DCs tolerogénicas y pro-angiogénicas, y promueven la diferenciación de células T regulatorias. En forma similar, VEGF contribuye a la inmunodeficiencia asociada a los tumores al limitar la competencia de DCs y promover la expansión de células T regulatorias (Gabrilovich, 2004). En general estos resultados sugieren que, además de compartir la vía de señalización de VEGFR2, VEGF y Gal1 pueden tener comportamientos similares en cuanto a sus propiedades pro-angiogénicas e inmunosupresoras. Similarmente, el receptor Notch, regula la angiogénesis y es capaz de influenciar la diferenciación de células T hacia perfiles Th2 y facilitar la expansión de células T regulatorias, cuando se une al ligando Jagged1, pero inhibe la angiogénesis y promueve respuestas pro-inflamatorias de tipo Th17 al unirse al ligando alternativo Dll4 (Benedito y col., 2009; Yuan y col., 2010). Estos datos, sugieren que los tumores pueden usar la misma vía para crear circuitos tolerogénicos y promover neovascularización. Más aún, y apoyando esta idea, se ha

reportado que la hipoxia no sólo influencia procesos de angiogénesis, sino que además constituye una de las mayores fuerzas que dirigen las redes inmunosupresoras (Sitkovsky, 2009). En este sentido, en el presente trabajo encontramos cambios sustanciales en el perfil de glicosilación de CEs expuestas a condiciones tolerogénicas, proliferativas o hipóxicas, en las cuales la ausencia de ácido siálico terminal en posición α 2-6 (AS α 2-6) facilita la acción pro-angiogénica de Gal1 liberada por tumores. Paradójicamente, ha sido demostrado que, además de regular la funcionalidad de Gal1, la sialilación en posición α 2-6, puede influenciar la angiogénesis al aumentar la retención de PECAM-1 en la superficie de CEs (Kitazume 2010). Estos datos, aparentemente en conflicto, confirman la hipótesis sobre la complejidad de factores y vías de señalización involucrados en las respuestas pro-angiogénicas. En su conjunto estas evidencias indican que lo que dictaría la señalización vascular y la respuesta final de las células, es el glicoma celular de manera global, y no la presencia de una estructura glicosídica particular.

Existen diversos mecanismos propuestos para explicar las funciones de distintas galectinas en la biología vascular. Estos incluyen la inducción de otros genes regulados por hipoxia en presencia de Gal1 (Le Mercier y col., 2008), la adquisición de Gal1 de origen tumoral por parte de CEs para modular la vía de señalización de H-Ras (Thijssen y col., 2010) y la modulación de la señalización de VEGF e integrinas mediada por Gal3 (Markowska y col., 2010). Por otro lado, recientemente hemos reportado que Gal8, un miembro de la familia de galectinas de tipo tándem, es capaz de modular la biología vascular al unirse a la molécula de adhesión activada por leucocitos (ALCAM) (Cardenas Delgado y col., 2011). Más aún, Gal3 fue inicialmente reportada como una proteína capaz de modular la migración y morfogénesis de CEs (Nangia-Makker y col., 2000).

A pesar de formar parte del repertorio estándar de herramientas terapéuticas en el cáncer, la terapia anti-angiogénica aún enfrenta desafíos y obstáculos que no han sido superados con éxito. Estos incluyen la búsqueda de terapias independientes

del sistema HIF/VEGF que puedan atenuar la vasculatura aberrante del tumor y superar la resistencia a las terapias convencionales sin afectar las redes vasculares normales (Bais y col., 2010; Bergers & Hanahan, 2008; Fischer y col., 2007). En este sentido, nosotros reportamos en este trabajo que el bloqueo específico de las interacciones entre Gal-1 y *N*-glicanos complejos mediante estrategias de silenciamiento génico ó anticuerpos bloqueantes, limita el crecimiento tumoral, atenuando la hipoxia y promoviendo una reorganización de la vasculatura que permite un mejor acceso del sistema inmune al parénquima tumoral. Por otro lado, y en la misma línea de pensamiento, el bloqueo de Gal1 en el tumor impide la generación de mecanismos de escape tumoral desviando la respuesta inmune hacia perfiles inflamatorios del tipo Th1 y Th17 que son más efectivos para erradicar tumores. Más precisamente, y en busca de nuevos enfoques terapéuticos, diseñamos y validamos el primer anticuerpo monoclonal neutralizante de Gal1, capaz de atenuar la angiogénesis patológica, promover el remodelado de la vasculatura e incrementar la cantidad y maduración de pericitos asociados a los endotelios. Estos efectos, se traducen en un alivio de la hipoxia tumoral, y facilitan el ingreso de células del sistema inmune, las cuales en ausencia de Gal1 pueden expandirse y generar respuestas T capaces de limitar el crecimiento tumoral. Este proceso de normalización vascular, refuerza evidencias encontradas con otros mediadores pro-angiogénicos, los cuales pueden remodelar la vasculatura tumoral haciéndola más eficiente para la administración de drogas quimioterapéuticas y para el influjo de células del sistema inmune (Hamzah y col., 2008; Manning y col., 2007; Shrimali y col., 2010).

En los últimos años, han sido desarrollados varios inhibidores de galectinas basados en su habilidad para bloquear el sitio de reconocimiento a carbohidratos (Ingrassia y col., 2006; Stannard y col., 2010, Rabinovich y col., 2006). Si bien son prometedores y efectivos, la mayoría de ellos no posee especificidad por los diferentes miembros de esta familia de lectinas o poseen muy baja afinidad por el ligando y pobre biodisponibilidad. Estas deficiencias que dificultan la llegada a la clínica de estos

compuestos, constituyeron el punto de partida en la generación de nuestro anticuerpo monoclonal el cual neutraliza específicamente a Gal1 y es eficaz para afectar tanto el compartimento inmunológico como el vascular. Por otro lado, un péptido sintético anti-angiogénico (anginex) modelado en función de estructuras de hoja- β de proteínas angiogénicas, fue capaz de unir Gal1 (Thijssen y col., 2006) y promover remodelado vascular (Dings y col., 2007). Con respecto a agentes anti-angiogénicos dependientes de la interacción entre proteínas y glicanos, en forma paralela al estudio de la señalización de glectinas, pudimos observar que polisacáridos sulfatados (fucoidanos) aislados del alga *Laminaria saccharina* exhiben un potente efecto anti-angiogénico *in vivo* sobre diferentes programas vasculares (Crocì y col., 2011).

Con el fin de vincular nuestros datos a estudios clínicos, evaluamos la expresión de Gal1 en una colección de tumores humanos. Particularmente en biopsias de patologías vasculares, encontramos una fuerte asociación entre la expresión de Gal1 y la transición de patologías benignas a angiosarcomas malignos incluidos el Sarcoma de Kaposi. Estos resultados sugieren que la expresión de Gal1 podría potencialmente ser utilizada como marcador diagnóstico en patologías vasculares las cuales hasta este momento carecen de un biomarcador que diferencie estadios benignos de sarcomas malignos. Más aún, encontramos en una colección de melanomas humanos y carcinomas de próstata una asociación positiva entre la expresión de Gal1 y la vascularización de estos tumores, poniendo en relieve la importancia de la expresión de esta lectina en la biología de tumores humanos. Estos datos, tienen una implicancia adicional en tumores de origen vascular (sarcomas de Kaposi) los cuales están fuertemente asociados a infección con HIV (Mesri y col., 2010). En este sentido, el bloqueo de Gal1 no sólo sería efectivo a los fines de limitar la angiogénesis aberrante y restaurar la respuesta inmune anti-tumoral, sino que también, al restaurar el balance entre las poblaciones celulares Th1 y Th17, sería efectivo para limitar el crecimiento y expansión de la inmunodeficiencia asociada a la infección por HIV (Favre y col., 2009).

En conclusión, nuestros resultados identifican un circuito regulatorio, dependiente de la glicosilación y mediado por lectinas, que conecta la hipoxia tumoral con el remodelado vascular y la respuesta inmune. Adicionalmente, los datos proveen la primera prueba de principio de la eficacia de una terapia multipropósito basada en el bloqueo de Gal1 mediante anticuerpos monoclonales, los cuales poseen un gran potencial terapéutico, en combinación con otras terapias anti-angiogénicas, quimioterapia o inmunoterapia.

Finalmente, los resultados expuestos en esta tesis, en conjunto a datos anteriores de nuestro laboratorio (Blois y col., 2007; Ilarregui y col., 2009; Rubinstein y col., 2004; Toscano y col., 2007), nos permiten postular un modelo hipotético en el cual la expresión de Gal1 regulada por la hipoxia tumoral es capaz de mimetizar la vía de señalización inducida por VEGF y promover el crecimiento aberrante y caótico de la vasculatura característico de microambientes tumorales. A su vez, el bloqueo terapéutico de la interacción Gal1-*N*-glicanos complejos presentes en VEGFR2 es suficiente a los fines de promover un proceso de remodelado de la vasculatura que restaura los niveles de O₂ del tumor y amplifica la respuesta inmune anti-tumoral al permitir el ingreso de células T efectoras, limitar la generación de células T regulatorias y bloquear la apoptosis de células T efectoras CD8⁺ y CD4⁺ del tipo Th1 y Th17 (**Figura 4.2**).

Los datos expuestos en esta tesis podrían, además, tener implicancias en otros entornos clínicos que involucren desregulación de la angiogénesis tales como retinopatías, diabetes, psoriasis y enfermedades cardiovasculares entre otras.

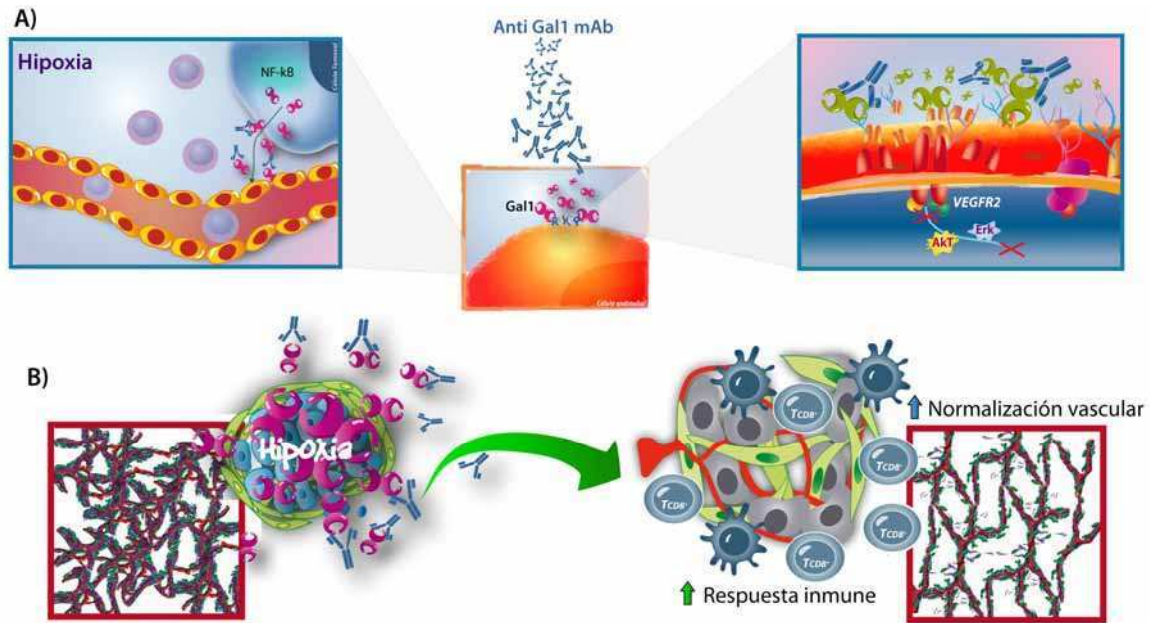


Figura 4.2. Modelo de acción de los mAb anti Gal1. Durante la tumorigénesis los tumores generan una vasculatura que es aberrante y caótica. El bloqueo de Gal1 mediante el uso del anticuerpo monoclonal revierte este estado y aumenta la calidad y cantidad de respuesta inmune anti tumoral. **A)** El bloqueo de Gal1 con el mAb F8.G7 revierte los efectos de Gal1 sobre la migración y proliferación de células endoteliales al impedir la unión de esta lectina a VEGFR2 bloqueando así la señalización inducida por Gal1. **B)** El tratamiento terapéutico de Tumores con F8.G7 disminuye el crecimiento de los mismos al mejorar el estado de la vasculatura, normalizándola e incrementando el número de células infiltrantes del tumor. Además, estas células presentan un fenotipo pro-inflamatorio más efectivo para montar respuestas anti tumorales.

5. CONCLUSIÓN FINAL

A lo largo de este trabajo de tesis identificamos un circuito regulatorio vascular basado en la glicosilación diferencial de CEs, que promueve la formación de *clusters* a través de la interacción entre lectinas y glicanos específicos en receptores de membrana. Estas interacciones son capaces de vincular fenómenos de hipoxia y neovascularización a través de mecanismos no clásicos, dependientes de la activación de VEGFR2 e independientes de HIF-1 α y VEGF. Además, mostramos que la glicosilación de CEs puede ser alterada selectivamente por estímulos tolerogénicos, inflamatorios, proliferativos e hipóxicos, generando o enmascarando ligandos para lectinas endógenas y modulando así la formación de *lattices* y fenómenos de neovascularización.

Por otro lado, demostramos que la interrupción de la interacción entre Gal1 y *N*-glicanos específicos en VEGFR2, a través del bloqueo de Gal1 o impidiendo la formación de *N*-glicanos complejos, atenúa procesos de angiogénesis inducida por hipoxia y promueve la normalización de la vasculatura tumoral contribuyendo a un mejor acceso de células T al parénquima tumoral, que en ausencia de Gal1, son aún más eficaces para montar respuestas anti-tumorales. En este sentido, el bloqueo de Gal1 en tumores generó un incremento tanto en la cantidad como en la calidad de respuesta inflamatoria contribuyendo así a una disminución del crecimiento tumoral.

Finalmente, validamos la relevancia del sistema Gal1-*N*-glicanos en la neovascularización tumoral. A través del estudio de patologías de origen vascular y de melanomas humanos, demostramos que la expresión de Gal1 es relevante en la neovascularización tumoral, pudiendo estar relacionada con el 'switch angiogénico'. Los datos obtenidos nos indican que los modelos tumorales empleados en ratones se acercan al comportamiento de patologías humanas, otorgándole validez y relevancia a esta primera 'prueba de principio' de una terapia anti-tumoral multipropósito basada en

la disrupción de la interacción entre lectinas y glicanos mediante el uso de anticuerpos monoclonales. En conjunto, los resultados del presente trabajo de tesis revelan la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas tendientes a afectar en forma simultánea el compartimiento vascular e inmunológico. Estas terapias podrían ser relevantes además, en otras patologías con alteraciones en ambos compartimentos como las retinopatías, la psoriasis y afecciones cardiovasculares entre otras.

Por lo tanto el presente trabajo ofrece: a) **a nivel celular** una nueva visión de la importancia de procesos de glicosilación de receptores en eventos de señalización a partir de la cual la disponibilidad de *N*-glicanos complejos permitiría la exposición de glicoeptopes activos para la acción de lectinas endógenas que mimetizarían y reemplazarían la acción de ligandos canónicos (ej. VEGF); b) **desde una perspectiva fisiológica** la interacción entre Gal1 y *N*-glicanos complejos constituiría un vínculo esencial entre fenómenos de hipoxia y neovascularización independientes de las vías clásicas de VEGF y HIF-1 α ; c) **desde un punto de vista terapéutico** proponemos el primer anticuerpo monoclonal bloqueante de la acción de Gal1 como agente multifuncional capaz de bloquear procesos de escape tumoral y promover normalización del endotelio tumoral; e) **desde un punto de vista clínico** validamos la importancia diagnóstica de Gal1 como marcador de malignidad en sarcoma de Kaposi e indicador de vascularización anormal en melanoma y cáncer de próstata.

6. METODOLOGÍAS

ANIMALES, CÉLULAS Y CLONES

Para este estudio se utilizaron ratones swiss N:NIH(S)un (*nude*) obtenidos del bioterio de la Universidad Nacional de La Plata, ratones WT C57BL/6 (B6), ratones *Lgals1*^{-/-} B6 deficientes en el gen de Gal1 provistos por la Dra Françoise Porier (Institute Jacques Monod, Paris) y ratones *B6.Rag1*^{-/-} adquiridos en los laboratorios Jackson. Todos los animales fueron usados a las 6-8 semanas de edad y fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental IBYME-CONICET de acuerdo a las normas de bioética de la Institución. Los protocolos (IRB) fueron aprobados por el Comité de Bioética del IBYME. Las CEs derivadas de venas de cordón umbilical HUVEC, generosamente cedidas por la Dra Mirta Shattner de la Academia Nacional de Medicina, fueron mantenidas en medio M199 (Gibco) suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB; Gibco) y mezcla de factores (VEGF 10 ng/ml, bFGF 10 ng/ml, EGF 5 ng/ml) todos de R&D. Las células se mantuvieron en atmósfera de 37°C y 5% CO₂. Las células tumorales humanas (KS-Imm, A375N, LNCaP) fueron mantenidas en RPMI-1640 10% SFB, antibiótico y antimicótico (GIBCO) a 37°C 5% CO₂. Las células murinas (4T1, B16-FO) se mantuvieron en DMEN 5% SFB, antibiótico y antimicótico (GIBCO) a 37°C y 5% CO₂.

Las líneas KS y B16 fueron infectadas en forma estable con vectores retrovirales que expresan secuencias de RNAi contra distintas regiones del gen *Lgals1* diseñadas mediante el programa SiRNA Selection Program (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext>). Las secuencias fueron sintetizadas e insertadas en el vector pSIREN-RetroQ retroviral vector (BD Clontech) (Juszczynski y col., 2007) Las infecciones con vectores retrovirales fueron realizadas mediante el uso de la línea celular empaquetadora "RetroPack" PT67 (BD Clontech) mantenidas en medio DMEN 5% SFB. Brevemente, las células (pasajes 3-10) fueron transfectadas con los vectores pSIREN usando el reactivo FuGene HD (Roche). Luego de 24-48 h las partículas

virales fueron colectadas del medio condicionado de las células y filtradas con filtros de 0,45 μm de poro. Posteriormente se alicuotaron y congelaron a -70°C hasta su uso. Para la infección de las líneas, las células KS o B16F0 fueron incubadas con los virus durante 24 h y sujetas a selección con el antibiótico puromicina (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las células resistentes fueron sub-clonadas por dilución límite y se les evaluó la expresión de Gal1 por WB.

REACTIVOS Y ANTICUERPOS

Los inhibidores farmacológicos de JAK2-STAT3 (AG490), JNK/SAP (SP600125), p38 (SB202190), el inhibidor de HIF-1 y el inhibidor competitivo de O-glicanos (benzyl- α -GalNAc) fueron adquiridos en Calbiochem. Los inhibidores de ERK1-2 (U0126), NF- κ B (BAY 11-7082), PI3K-AKT (LY294002), swainsonine y N-acetilcisteína (NAC) fueron adquiridos a Sigma. La endoglicosidasa PNGase F (25 U/ μg proteína) fue obtenida de New England Biolabs. Las citoquinas recombinantes IL-10 (50 ng/ml), IL-17 (5 ng/ml), TGF- β_1 (3 ng/ml), IFN- γ (50 ng/ml), VEGF (20 ng/ml), bFGF (10 ng/ml) fueron de R&D y el TNF (20 ng/ml) fue de Sigma.

Los anticuerpos usados incluídos el anti- I κ B α , anti-phospho-Erk1/2 (E-4), anti-Erk1/2 (C-14), y anti-actina (I-19) fueron adquiridos a Santa Cruz Biotechnol. Los anticuerpos anti-phospho-AKT (Ser 473), anti-total AKT, anti-pVEGFR2 y anti-VEGFR2 fueron obtenidos de Cell Signaling. El anticuerpo anti HIF-1a fue de ABR-affinity. Los anticuerpos bloqueantes VEGFR1 (AP-MAB0702) y VEGFR3 (AB89501) fueron de Abcam. Los anticuerpos anti-VEGFR2 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (AF357), y anti-VEGF 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (MAB293) fueron obtenidos de R&D. Para microscopía confocal utilizamos los siguientes anticuerpos: anti- α SMA (1A4), anti-desmin (D33), anti-human CD31 (JC/70A) todos de Dako. El anticuerpo anti-PDGFR β (APB5; Biolegend), anti-Rgs5 (Prestige Sigma), anti-CD31 (Mec13.3; BD Biosciences), anti-VEGFR2 (55B11; Cell Signaling), anti-CD8 (H35-17.2; eBioscience) y anti-LANA (Advanced Biotechnol;

1:1000). Los anticuerpos secundarios fueron: anti-ratón IgG-FITC (BD Biosciences), anti-ratón IgG-Cy3, anti-rata IgG-FITC y anti-rata IgG-Texas Red (todos de Vector) y anti-conejo IgG-Alexa Fluor-555 (Cell Signaling).

Los anticuerpos monoclonales conjugado a fluoroforos utilizados para citometría fueron: el anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ (XMG1.2; BD Biosciences), anti-IL-17 (TC11-18H10; BD Biosciences), anti-IL-10 (JES5-16E3; eBioscience), anti-CD4 (GK1.5; BD Biosciences), anti-CD8 (H35-17.2; eBioscience). Anti-FoxP3 (FJK-16s, eBioscience). El anticuerpo anti-Gal1 fue generado por nuestro laboratorio tal como fue descrito (Ilarregui y col, 2009; Barrionuevo y col, 2007). Los anticuerpos secundarios conjugados a HRP fueron todos de BioRad.

Las lectinas biotiniladas L-PHA (L-PHA: *Phaseolus vulgaris* lectin), LEL (*Lycopersicon esculentum* lectin), SNA (*Sambucus nigra* agglutinin), MAL II (*Maackia amurensis* lectin), PNA (Peanut agglutinin) y HPA (*Helix pomatia* agglutinin) fueron obtenidas de Vector. La streptavidina conjugada a PE fue de Santa Cruz y la conjugada a FITC fue de Pierce.

Los siRNA ON-TARGETplus SMART siRNA pools contra GnT5, GCNT1, VEGFR2, NRP-1, VEGF, HIF-1 α y el control scrambled fueron obtenidos en Dharmacon. Las transfecciones fueron realizadas usando los reactivos Lipofectamine-RNAiMAX (Invitrogen) o FuGene HD (Roche).

ENSAYOS DE UNIÓN DE LECTINAS

Células HUVEC (ECs) tratadas o no con siRNA contra las glicosiltransferasas GCNT1 y GnT5 o con inhibidores de N- u O-glicosilación, fueron desprendidas por medio de solución no enzimática (Sigma). Luego las células fueron lavadas con buffer de 'lectinas' (NaCl 150 mM 10mM HEPES pH 7,4) 1% BSA. Posteriormente se incubaron las células 1 h en 100ul de buffer 'lectinas' conteniendo las diferentes lectinas L-PHA (2 μ g/ml); LEL (1 μ g/ml); SNA (2 μ g/ml) ; MALII (10 μ g/ml) ; PNA (10 μ g/ml) y HPA (20 μ g/ml). Posteriormente las células se lavaron y fueron incubadas con streptavidina-

PE (Sigma) 1/100 30 min a TA. Luego se lavó el exceso de Streptavidina y se fijaron las células con 1% PFA y se guardaron a 4° C hasta su análisis por citometría de flujo. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSaria utilizando el software FlowJo. Definimos intensidad de fluorescencia media relativa como: [(IFM de la lectina específica – IFM del control negativo) / IFM del control negativo].

ENSAYOS DE MIGRACIÓN E INVASIÓN EN *TRANSWELLS*

Células HUVEC (CEs) fueron resuspendidas con solución no enzimática (Sigma) a una densidad de 4×10^4 células/ml en medio RPMI 2% SFB y colocadas en la parte superior del Inserto de 8 μm de poro (Milipore). En la parte inferior de la placa se colocó 500 μl de medio con rGal1 en concentraciones crecientes (0,1 a 3 μM), rGal1 + lactosa (30 mM) o anticuerpos bloqueantes anti-Gal1 0,5 μM (F8.G7 mAb) o control de isotipo (IgG1 κ). En otro set de experimentos las CEs fueron preincubadas con inhibidores farmacológicos de las vías JAK2-STAT3 (25 μM), JNK/SAP (20 μM), ERK1-2 (5 μM), NF- κB (1.5 μM), PI3K-AKT (2 μM) y p38 (10 μM) o con anticuerpos bloqueantes de VEGFR1 5 $\mu\text{g/ml}$ (AP-MAB0702), VEGFR2 2 $\mu\text{g/ml}$ (AF357), VEGFR3 10 $\mu\text{g/ml}$ (AB89501) o VEGF 10 $\mu\text{g/ml}$ (MAB293).

Posteriormente, las células se incubaron a 37° C durante 24 h. y luego de la incubación, los insertos fueron removidos del *well*, lavados y las células incapaces de migrar fueron eliminadas de la parte superior del inserto con un hisopo de algodón. Las células que migraron (ubicadas en la parte inferior del inserto) fueron fijadas y teñidas con Cristal violeta 0,1% (Sigma) en metanol 20 %. Luego del lavado con H₂O se tomaron imágenes digitales en el microscopio invertido (Nikon E100). Posteriormente se cuantificó la migración como el número de células que migraron por mm^2 mediante el software ImageJ software v1.34 (NIH). Como control positivo se usó VEGF (20 ng/ml).

Para los ensayos de invasión se usaron placas con insertos con Matrigel (BioCoat, BD Bioscience) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En los

casos requeridos, las células fueron pre-incubadas con inhibidores de las vías de señalización 1 h antes del ensayo.

ENSAYO DE TUBULOGÉNESIS

La formación de estructuras capilares de tipo-túbulos se realizó en placas cubiertas con una capa de Matrigel (matriz extracelular; BD Biosciences). Se agregaron 150 μ l de Matrigel frío libre de factores de crecimiento en placas de 48 wells y se dejó solidificar el gel a 37°C por 30 min. Posteriormente, células HUVEC fueron agregadas a la capa de Matrigel polimerizado a una densidad de 30.000 células/ well durante un período de 24 h. Para evaluar el efecto de Gal1 sobre la formación de túbulos, las HUVEC se trataron con rGal1 a las concentraciones indicadas con o sin el pre-tratamiento de inhibidores farmacológicos JAK2-STAT3 (25 μ M), JNK/SAP (20 μ M), ERK1-2 (5 μ M), NF- κ B (1.5 μ M), PI3K-AKT (2 μ M) and p38 (10 μ M) o con lactosa o sacarosa (30 mM). En otro set de experimentos las CEs se transfectaron con diferentes siRNAs (GCNT1, Gnt5, VEGFR2, NRP-1) usando el reactivo Lipofectamina siRNA MAX 48 h antes del agregado al Matrigel. Incubamos en presencia de medios condicionados de células KS infectadas con shRNA anti-Gal1 y/o siRNA anti-VEGF. Como control positivo se usó VEGF (20 ng/ml). Las estructuras capilares se cuantificaron contando el número de áreas cerradas (túbulos) por well en un microscopio de contraste de fase (Nikon E100) y las imágenes digitales fueron tomadas cada 4 h y analizadas mediante el software ImageJ software v1.34 (NIH). La formación de túbulos se expresó como el número de tubos por cm^2 . Cada muestra fue testeada por cuadruplicado, y cada experimento fue repetido al menos tres veces

ENSAYOS DE HIPOXIA

Células KS-Imm, B16F0, 4T1, LNCaP o A375N se cultivaron en presencia de 1% O_2 (hipoxia) en una incubadora modular (Billups-Rothenberg, Del Mar, CA) con atmósfera controlada (1 % O_2 , 5% CO_2 , N_2). La atmósfera se crea haciendo circular una mezcla

de gases a 2 psi durante 10 min. Luego la cámara es cerrada herméticamente y las células fueron incubadas durante 18-36 h a 37°C. Las células controles (normoxia) fueron incubadas en la misma estufa a 5% CO₂ fuera del incubadora. Para inducir la activación química de HIF-1 ('pseudo-hipoxia') las distintas líneas celulares se trataron en presencia de distintas concentraciones de CoCl₂ en medio de cultivo durante 12-16 h. La presencia de zonas hipóxicas *in vivo* fue determinada utilizamos el kit Hypoxyprobe-1 plus (Natural Pharmacia) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente, los ratones fueron inyectados en forma intraperitoneal con 60 mg/Kg de peso de pimonidazole-HCl 30 min antes del sacrificio. Posteriormente los tumores fueron fijados y congelados. Cortes de 30 µm de espesor fueron marcados con el anticuerpo monoclonal de ratón conjugado a FITC (FITC-Mab1 clon 4.3.11.3) que detecta específicamente los aductos proteicos originados a raíz de la activación reductiva del pimonidazole-HCl en células expuestas a hipoxia. Esta activación promueve la adición de grupos sulfhidrilo a proteínas y péptidos, lo cual es reconocido por el anticuerpo FITC-MAb1.

PRODUCCIÓN DE GAL1 RECOMBINANTE

La Gal1 recombinante humana (rGal1) se obtuvo de acuerdo al procedimiento descrito (Lutomski y col, 2004; Pace y col, 2003; Barrionuevo y col, 2007). Brevemente, el plásmido de expresión pT7IML-1 se utilizó para transformar cepas de bacterias de *E. coli* BL21(DE3) Luego se incubó en medio LB líquido con ampicilina una colonia de células transformadas durante toda la noche. Una alícuota se repicó en medio líquido (750 ml) y cuando la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de 0,5 se indujo la expresión de Gal1 con IPTG 100nM. Luego de 4 h las bacterias se centrifugaron y lisaron en buffer B-Per (Promega) y el sobrenadante se sembró en un columna de Lactosil sefarosa preparada y activada según el procedimiento descrito (Pace y col., 2003). Luego de una incubación ON en la columna de cromatografía de afinidad, la Gal1 retenida fue eluída con buffer PBS 0,1M Lactosa. La proteína

purificada fue concentrada y sembrada en una columna de filtración molecular (Sephacryl S-100, Amersham-Pharmacia) con el objetivo de obtener una fracción de Gal1 con una pureza mayor al 99%. Finalmente la lactosa fue removida por diálisis y se eliminó el contenido de endotoxinas utilizando una columna de Agtarosa-Polimixina B. El contenido de endotoxina en la muestra se determinó a través del test de Limulus, y la pureza fue determinada por WB y espectrometría de masa (LANAIS-UBA). Las galectinas recombinantes Gal3 and Gal8 fueron obtenidas y purificadas tal como se describió previamente (Acosta-Rodriguez y col., 2004; Cardenas Delgado y col., 2010).

A los fines de obtener Gal1 marcada fluorescentemente (488-Gal1) se utilizó el kit DyLight™ 488 Labeling Kit (Pierce) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizaron 1-2 mg de rGal1 liofilizada, por cada reacción de adición de fluoroforo. La proteína se reconstituyó con 0,5 ml de buffer de reacción conteniendo los ésteres NHS-DyLight en solución de borato 0,05 M. La mezcla se incubó durante 1h a TA. Finalmente, la proteína se purificó por medio de una columna de purificación posterior micro diálisis contra PBS/1mM β -Mercapto-etanol a 4° C a fin de eliminar el excedente de reactivo. La muestra purificada se alicuotó a -20° C hasta su uso en ensayos de unión a CEs. La relación fluoroforo/ proteína fue calculada mediante la técnica de absorbancia a longitud de onda de 280 nm (A_{280}) según instrucciones del proveedor obteniendo un promedio de 3,2 moléculas de fluoroforo por molécula de rGal1.

ENSAYOS DE UNIÓN DE 488-GAL-1

Células HUVEC (5×10^5) se incubaron con distintas concentraciones de 488-Gal1 (0,1–10 μ M) en un volumen final de 50 μ l en buffer PBS/1% BSA durante 1 h a TA. A su vez, se realizaron estos ensayos incubando 488-Gal1 (3 μ M) en presencia de lactosa (30 mM), sacarosa (30 mM) o inhibidores de la O-glicosilación (Benzil- α -GALNAC) o de la N-glicosilación (swainsonina). La detección de los niveles de Gal1 fluorescente unida se realizó por incubación con una dilución 1:50 de stravidin™-PE (Sigma) en

buffer PBS/1% BSA por 30 min a TA. Las células se lavaron extensamente y se fijaron con una solución al 1% de paraformaldehído. Posteriormente, los niveles de Gal1 fluorescente fueron analizados por citometría de flujo (FACS DIVA, BD Biosciences) y los histogramas se evaluaron mediante el software FlowJo.

ENSAYO DE SEGREGACIÓN DE VEGFR2

Células HUVEC transfectadas o no con siRNA específico de GnT5, y cultivadas en presencia de EGF 10 ng/ml en RPMI 10% SFB se lavaron con PBS 1% SFB y se fijaron con solución 2% PFA /sacarosa por 20 min a TA. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-VEGFR2 (2 µg/ml; 55B11) en PBS 1% SFB durante toda la noche a 4° C. Luego de tres lavados con PBS, las CEs se incubaron 1 h en presencia del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a Alexa-Fluor 555 (1/1000). Finalmente la células se lavaron exhaustivamente y se procedió al montaje de las muestras con medio *antifade* [0,1% 1,4-Diazabicyclo (2.2.2) octano (DABCO), 90% glicerol, 10% PBS, pH 9] en presencia de DAPI. Los preparados se guardaron a -20° C en oscuridad. Las imágenes se tomaron utilizando el microscopio confocal Nikon C1.

MODELOS TUMORALES *IN VIVO*

Células KS WT o clones que expresan establemente shRNA específicos de Gal1 (shGal1.1, shGal1.2 o shGal1.3) fueron inyectadas (5×10^6) subcutáneamente en ratones *nude* de 6-8 semanas de edad. Las células B16 WT o los clones shGal1 fueron inyectadas subcutáneamente (2×10^5) en ratones singeneicos B6 WT o *B6.Rag1^{-/-}*, incapaces de montar respuestas inmunes adaptativas, o en ratones deficientes en el gen de Gal1 *B6.Lgals1^{-/-}*. Los tumores fueron monitoreados cada tres días y el volumen tumoral se evaluó según la fórmula ($A \times B \times 0,5$), donde A es el diámetro mayor y B es el diámetro menor (Rubinstein y col, 2004). Los tumores fueron

removidos y procesados para citometría de flujo, o fijados y congelados para posteriores análisis de microscopia en cortes en crióstato a 25 días post inoculación.

En el caso de ratones tratados con anticuerpos monoclonales (F8.G7 o isotipo) se administraron dosis de 2,5, 7,5 o 15 mg/Kg inyectadas por vía intraperitoneal cada tres días a partir de que los tumores llegaron a un volumen de 100 mm³. Los ratones fueron monitoreados por 25 días o hasta que los tumores alcanzaran 2000 mm³. Dos semanas después del desafío con las células tumorales, los ganglios linfáticos drenantes del tumor fueron removidos y las células re-estimuladas durante 72 h con 1×10^4 células B16 irradiadas (4000 rads). Posteriormente se evaluó la proliferación y la producción de citoquinas por parte de estas células, por medio de técnicas de ELISA y citometría de flujo. Para los experimentos de transferencia adoptiva, células de bazo de ratones portadores de tumor (5×10^6) fueron marcadas con el colorante fluorescente CFSE (Invitrogen) según instrucciones. Posteriormente se inyectaron las células CFSE⁺ por la vena de la cola a ratones que portaban tumores y que estaban siendo tratados con anticuerpos monoclonales F8.G7 o control de isotipo (IgG2b λ). En determinados ensayos en lugar de células marcadas, inyectamos perlas fluorescentes (BD Bioscience) en ratones con tumores tratados con los diferentes anticuerpos 24 h (células) o 15 min (perlas fluorescentes). Luego de las inyecciones, los ratones fueron sacrificados y se evaluó por citometría de flujo la presencia y número de células CFSE⁺ o perlas fluorescentes en el parénquima tumoral y en bazo.

GENERACIÓN y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES BLOQUEANTES ANTI-GAL1

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) anti Gal1 fueron generados según el procedimiento tradicional de producción de hibridomas. Brevemente, Los anticuerpos anti Gal1 fueron obtenidos por inmunización de ratones B6-Cg-Tg (BCL2)22 wehi-J (Jackson Labs) con Gal1 recombinante humana acoplada a glutatión transferasa (GST)-Gal1. Se generaron hibridomas anti-Gal1 mediante métodos estándar y se

purificaron los anticuerpos anti-Gal1 y los controles de isotipo (IgG2b λ) por cromatografía de afinidad. La especificidad de los mAbs fue testada mediante técnicas de ELISA con GST-Gal1 y His-Gal1 y por métodos de WB contra Gal1 recombinante y Gal1 endógena de diferentes líneas celulares murinas y humanas. Los clones obtenidos, se clasificaron de acuerdo a su capacidad para bloquear la apoptosis de células T activadas inducida por Gal1 (Ouyang y col., 2011).

VISUALIZACION DE LA VASCULATURA *IN VIVO* Y FENOTIPO DE PERICITOS

Para los análisis de inmunomarcación, los ratones fueron anestesiados y perfundidos por vía cardiaca con paraformaldehído al 4% en PBS. Los tumores fueron removidos, embebidos en sacarosa y congelados en solución de OCT. Para visualizar la vasculatura, los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con la lectina *Griffonia simplicifolia* Lectin-1 (GLS-1_{B4}; Vector) conjugada al fluoróforo FITC 5 min antes del sacrificio de los animales. Esta lectina, reconoce estructuras comunes en CEs quedando adherida a las paredes vasculares lo cual permite una fácil identificación por microscopía de fluorescencia de dichas estructuras celulares. En otros experimentos, los vasos asociados al tumor se evaluaron como el porcentaje de CEs CD34⁺ por citometría de flujo usando el anticuerpo específico anti-CD34 conjugado a AlexaFluor-647 (RAM34; eBioscience).

El grado de maduración de los pericitos fue calculado usando anticuerpos específicos contra los marcadores α SMA (1A4; Dako), desmina (D33; Dako), PDGFR- β (APB5; Biolegend) y Rgs5 (HPA001821; Sigma). La cobertura de pericitos se calculó como la relación entre el número de píxeles (o área) positivos para α SMA vs los píxeles (o área) positivos para endotelio, evaluado por GLS-1_{B4}-FITC o con el anticuerpo anti-CD31 (MEC13.3; BD Biosciences).

Para la determinación de microdensidad vascular MDV (Nº de vasos CD31⁺ campo de 200 aumentos) en muestras de tumores humanos embebidos en parafina, utilizamos el anticuerpo anti-CD31 (JC/70A; Dako). Los ensayos de

inmunohistoquímica para Gal1 fueron desarrollados tal como lo describió (Juszczynski y col, 2007) usando en ambos casos el kit Vectastain Elite ABC (Vector).

ELISAS

Las citoquinas de ratón IFN- γ e IL-10 se determinaron mediante ELISA sets (BD Biosciences). La determinación de IL-17 de ratón y VEGF humano se realizó mediante los kits Duo Set (R&D) según instrucciones de los proveedores. Gal1 soluble se determinó a través de un ELISA desarrollado en nuestro laboratorio. Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 reservorios (Costar) con el anticuerpo de captura (2 μ g/ml IgG purificada de conejo anti-Gal1) diluido en buffer de sensibilización (0,1 M Na₂CO₃ pH 9,6) durante toda la noche a 4° C. Luego las placas se lavaron 3 veces con buffer de lavado (PBS pH 7,4; 0,01% Tween-20) y se incubaron con buffer de bloqueo (2% BSA in PBS) durante 1 h a TA. Posteriormente, se incubaron las muestras y la curva estándar (100 μ l) durante 18 h a 4° C, seguido de 4 lavados. Una vez finalizados los lavados, se agregó la solución de detección conteniendo el anticuerpo secundario biotinilado 100 ng/ml durante 1 h seguido de la solución de estreptavidina-HRP (0.33 μ g/ml; Sigma) durante 30 min a TA. Finalmente se realizaron 3 lavados y se procedió al revelado con una solución de sustrato TMB (0.1 mg/ml de tetramethylbenzidine y 0.06 % H₂O₂ en buffer fosfato-citrato (0,1 M Ac. Cítrico; 0,1 M Na₂PO₄H). La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2N y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro de placa Multiskan MS microplate reader (Thermo Electron Corporation). Paralelamente se corrió una curva estándar de Gal1 recombinante (2,5 a 320 ng/ml).

ENSAYO DE WESTERN BLOT

Determinación de la concentración de proteínas: Los extractos proteicos se prepararon en buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10mM EDTA y 1% NP-40) con cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma). El lisado se

incubó en hielo durante 1 h y luego se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4° C. El sobrenadante obtenido representa el extracto proteico total. La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el kit Micro BCA (Pierce) según instrucciones del proveedor. La concentración de proteínas se determinó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro de placa (Labysystems Multiskan). Para cuantificar la absorbancia se realizó el mismo procedimiento con una curva estándar (0,5-100 µg/ml) de albúmina sérica bovina (BSA).

Ensayo de WB: Las muestras se prepararon en buffer de siembra 2X (Laemmli Sample Buffer; Bio-Rad) y la desnaturalización de las proteínas se realizó por incubación a 100°C por 3 min. Se prepararon geles de poliacrilamida (SDS -PAGE). al 10%-15% de 1,5 mm de espesor. Luego de sembrar las muestras, la corrida electroforética fue realizada en una cuba de electroforesis (Bio-Rad) a 150 V constante, en buffer de electroforesis (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glicina; 0,1% SDS) durante 1 h aproximadamente. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas del gel a membranas de nitrocelulosa: Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron utilizando un equipo Mini transblot (Bio-Rad) a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) a 200 mA constantes durante 40-110 min. Luego, las membranas se incubaron con buffer de bloqueo (0,15 M NaCl; 50 mM Tris; 0,1% Tween-20 y 5% leche descremada) durante 18 h a 4°C.

Ensayo inmunoquímico: Las membranas, previamente bloqueadas, se lavaron con buffer T.TBS (0,15 M NaCl, 50 mM Tris, 0,1% Tween-20) y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario diluido en T.TBS. anti-IκB-α (1/500), anti-Erk1/2 (1/2000), anti-phospho-Erk1/2 (1/2000) o anti-actina (1/2000); anti-Akt (1/1000), anti-phospho-Akt (1/1000), anti-VEGFR2 (1/1000), anti-phospho-VEGFR2 (1/1000) y anti-HIF-1α (1/200) o policlonal de conejo anti-Gal1 IgG (1.5 µg/ml). Luego las membranas se lavaron con buffer T.TBS y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario

conjugado con peroxidasa anti-ratón (1/2000), anti-conejo (1/3000) o anti-cabra (1/3000) (todos de BioRad) en T.TBS 1% leche durante 1 h. El revelado se realizó con el Kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences).

ENSAYO DE *PHOSPHO-RTK SIGNALING ARRAY* Y CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

CEs tratadas con diferentes concentraciones de Gal1 o VEGF, fueron lisadas y 150 µg de los lisados fueron incubados y analizados para detectar las vías de señalización activadas mediante el kit Human PathScan® RTK Signaling Antibody Array (Cell Signaling) según las instrucciones del proveedor. Para los ensayos de co-inmunoprecipitación, 500 µg de lisados de ECs tratadas o no con Gal1 y transfectadas con siRNA específico de GnT5 o incubados por 1 h con la endoglicosidasa PNGasa F que remueve los *N*-glicanos de las proteínas fueron incubados con 2 µg de anti-VEGFR2 (55B11) o con 10 µg de anti-NRP-1 (C-19). Los inmunocomplejos fueron capturados con Proteína G PLUS-Agarosa (Santa Cruz Biotechnol) y procesados para WB tal como se describió previamente.

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

Para determinar la proliferación de CEs en respuesta al agregado de Gal1 o VEGF, se sembraron 2×10^5 HUVEC en 200 µl de medio RPMI (10% SFB, 2 mM glutamina) en microplacas de 96 pocillos por triplicado. Los cultivos se incubaron en estufa a 37°C y una atmósfera de 5% CO₂. Luego de 24 h se agregó 1 µCi de [³H]-timidina (50 Ci/mmol de actividad específica) por pocillo durante las últimas 18 h. Al término de ese tiempo se recuperaron las células utilizando un cosechador semiautomático, durante este proceso el ADN de cada cultivo fue recuperado en un papel de filtro y posteriormente embebido en líquido de centelleo (Optiphase). Finalmente se determinó la incorporación de timidina en un contador β de centelleo líquido (Packard Instruments).

ANÁLISIS DEL PROMOTOR *LGALS1* Y ENSAYO DE LUCIFERASA

Para evaluar la actividad del promotor de Gal1 usamos el ensayo de luciferasa en células co-transfectadas con 500 ng del vector pGL3-Gal1 que contiene la región -473 a +67 pb del promotor *LGALS1* ligada a el gen de luciferasa (Promega) y 20 ng del vector reportero control Renilla (pRL-TK, Promega), usando el reactivo FuGene HD de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Luego de 24 h las células fueron sometidas a los tratamientos requeridos y 18 h después se realizó la lisis celular y se evaluó la actividad Luciferasa de los lisados mediante quimioluminiscencia utilizando el kit dual *Luciferase assay kit* (Promega) en un luminómetro 20/20ⁿ (Turner Biosystem).

El análisis computacional de los sitios putativos para los factores de transcripción NF- κ B y HIF-1 α en el locus *LGALS1* correspondiente a \pm 2400 pb de sitio de inicio del gen *Lgals1*, fue realizado mediante el software MatInspector (www.genomatix.de). Los múltiples sitios de unión para κ B identificados se hallan representados en la **Figura 6.1**. No fueron hallados sitios para HIF-1 α en nuestro análisis *in silico*.

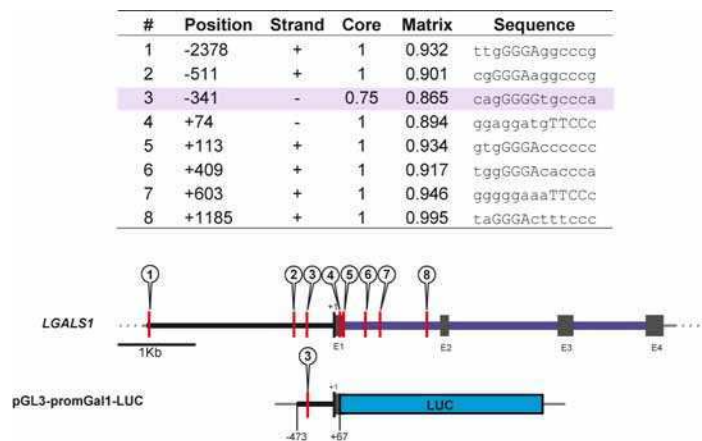


Figura 6.1. Análisis *in silico* del promotor de Gal1. Arriba, análisis de los sitios putativos de unión κ B en la región proximal de promotor de Gal1. Abajo, representación esquemática del gen *Lgals1* y del vector pGL3-gal1-Luc usado en el ensayo que incluye uno de los sitios.

MARCACION INTRACELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para la detección intracelular de citoquinas, linfocitos aislados de ganglios drenantes al tumor fueron permeabilizados con la solución Perm2 (BD Bioscience) y marcados con distintos anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos: anti-IFN- γ (XMG1.2), anti-IL-17 (TC11-18H10), anti-IL-10 (JES5-16E3), anti-CD4 (GK1.5) o anti-CD8 (H35-17.2). La presencia de células T regulatorias (T_{reg}) fue determinada

mediante el kit de detección '*Mouse Treg staining kit*' (eBioscience). Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSAria (BD Biosciences) y los datos se procesaron usando el programa FlowJO.

ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTO DE GAL1 POR MICROARRAYS EN TUMORES KS

Para examinar los niveles de expresión de Gal1 en tumores humanos y murinos asociados a sarcoma de Kaposi utilizamos los *arrays* de genoma humano total Hg-U133A (Affymetrix) y el *array* murino 430 2.0 (Affymetrix) tal como se describió (Mutlu y col., 2007; Wang y col, 2004). Los datos (intensidad de fluorescencia de las celdas y análisis estadístico) fueron analizados usando el programa GeneSpring 7 (Agilent) con el fin de representar los datos normalizados.

ANÁLISIS DE RT-PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)

Para los análisis de RNA mensajero de los distintos genes, utilizamos la técnica de qPCR en muestras de cDNA generado a partir de RNA total aislado de las células usando Tryzol (Invitrogen) según instrucciones del proveedor. Para los ensayos usamos el Kit "*Cyber green PCR master mix*" y el equipo *ABI Prism 7500 sequence detection software* (Applied Biosystem) según instrucciones del proveedor y de acuerdo al procedimiento descrito (Iarregui y col., 2009). Los *primers* humanos usados fueron:

GAL1 forward: 5'-GAACCTGGGTAAAGACA-3'; reverse: 5'-TTGGCCTGGTCGAAGGTGAT-3';

RNA18S1 forward: 5'GCCGGGGGCATTCGTATT-3'; reverse: 5'-TCGCTCTGGTCCGTCTTGCG-3';

GCNT1 forward: 5'CTCCTGAGACTCCGGGGTCAGA-3'; reverse: 5'-CTAGGCGGTCCGTGCCCTAGC-3';

GNT5 forward: 5'TGCCCTGCCGGGACTTCAT-3'; reverse: 5'- CAGCAGCATGGTGCAGGGCT-3'.

PATOLOGÍAS HUMANAS E INMUNOHISTOQUIMICA

Para el análisis de expresión de Gal1 en patologías humanas, utilizamos muestras de 41 patologías vasculares, 16 melanomas humanos y un *tissue array* comercial de cáncer prostático. A tal fin, cortes de 5 µm de las biopsias de pacientes cedidas por el

laboratorio de Anatomía Patológica del Centro de Medicina Integral del Comahue (CMIC), Universidad Nacional de Comahue (Neuquén, Argentina), bajo consentimiento expreso de los pacientes y acorde a las normas de bioética del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) y del Hospital de Clínicas 'José de San Martín' (UBA). Los estudios de inmunomarcación de las biopsias se realizaron tal como fue descripto (Juszczynski y col., 2007). Brevemente, los cortes incluidos en parafina fueron desparafinados en xilol durante 15 min e hidratados por sucesivos pasajes de 10 min por alcohol de graduaciones decrecientes, alcohol/xilol 1:1; etanol 100°; etanol 95°; etanol 70° y PBS. La actividad peroxidasa intrínseca del tejido, se inhibió con 3 % de H₂O₂ en H₂O 30 min. a TA en oscuridad. Posteriormente se realizó la recuperación antigénica en una solución de buffer citrato pH=6 0,01 M en microondas (800W). Seguidamente se bloqueó la muestra con suero de caballo diluido 1/100 en PBS (Vector; Burlinghame) durante 40 min a TA y la muestra se incubó con los anticuerpos primarios anti-Gal1 (1/500), anti-CD31 (1/100) o anti-CD34 (1/200) toda la noche a 4° C en cámara húmeda. Al día siguiente los cortes fueron incubados 1 h en cámara húmeda con anticuerpo secundario anti-IgG biotinilado 1/100 en PBS (Vector) seguido de dos lavados de 5 min en PBS. Luego, se agregó el complejo ABC (Vectastain ABC Kit elite) según instrucciones del proveedor (Vector), La solución cromógena de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) se preparó según las instrucciones del proveedor (Dako,) y la reacción se detuvo con H₂O a los 5 min. Posteriormente, se realizó tinción de contraste con hematoxilina de Mayer (Biopur) y los vidrios se montaron en solución de montaje DEPEX (Biopore). Las observaciones se realizaron en un microscopio de campo claro bajo aumento de 100-400X (Nikkon E200) y las imágenes capturadas con cámara digital (Nikkon E5) montada al microscopio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significancia estadística de los resultados se determinó utilizando el test estadístico *t* de Student, ANOVA o análisis no paramétricos de Kruskal Wallis utilizando el software GraphPad Prism. Valores de *P* < 0,05 fueron considerados significativos.

7. REFERENCIAS

Abramsson, A., Lindblom, P., and Betsholtz, C. (2003). Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest* *112*, 1142-1151.

Acosta-Rodriguez, E.V., Montes, C.L., Motran, C.C., Zuniga, E.I., Liu, F.T., Rabinovich, G.A., and Gruppi, A. (2004). Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* *172*, 493-502.

Albini, A., Morini, M., D'Agostini, F., Ferrari, N., Campelli, F., Arena, G., Noonan, D.M., Pesce, C., and De Flora, S. (2001). Inhibition of angiogenesis-driven Kaposi's sarcoma tumor growth in nude mice by oral N-acetylcysteine. *Cancer Res* *61*, 8171-8178.

Bais, C., Wu, X., Yao, J., Yang, S., Crawford, Y., McCutcheon, K., Tan, C., Kolumam, G., Vernes, J.M., Eastham-Anderson, J., *et al.* (2010). PIGF blockade does not inhibit angiogenesis during primary tumor growth. *Cell* *141*, 166-177.

Barrionuevo, P., Beigier-Bompadre, M., Ilarregui, J.M., Toscano, M.A., Bianco, G.A., Isturiz, M.A., and Rabinovich, G.A. (2007). A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. *J Immunol* *178*, 436-445.

Benedito, R., Roca, C., Sorensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., and Adams, R.H. (2009). The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* *137*, 1124-1135.

Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* *3*, 401-410.

Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* *8*, 592-603.

Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E., and Hanahan, D. (2003). Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* *111*, 1287-1295.

Bertozzi, C.R., and Kiessling, L.L. (2001). Chemical glycobiology. *Science* *291*, 2357-2364.

Bertozzi, C.R., and Sasisekharan, R. (2009). Glycomics. In *Essentials of Glycobiology*, A.C. Varki, R.D. Esko, J.D. Freeze, H. Stanley, P. Bertozzi, C.R. Hart, G.W. Etzler, M.E., ed. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Blaser, C., Kaufmann, M., Muller, C., Zimmermann, C., Wells, V., Mallucci, L., and Pircher, H. (1998). Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol* *28*, 2311-2319.

Blois, S.M., Ilarregui, J.M., Tometten, M., Garcia, M., Orsal, A.S., Cordo-Russo, R., Toscano, M.A., Bianco, G.A., Kobelt, P., Handjiski, B., *et al.* (2007). A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* *13*, 1450-1457.

Bui, J.D., and Schreiber, R.D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol* *19*, 203-208.

Cardenas Delgado, V.M., Nugnes, L.G., Colombo, L.L., Troncoso, M.F., Fernandez, M.M., Malchiodi, E.L., Frahm, I., Croci, D.O., Compagno, D., Rabinovich, G.A., *et al.* (2011). Modulation of endothelial cell migration and angiogenesis: a novel function for the "tandem-repeat" lectin galectin-8. *FASEB J* *25*, 242-254.

Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* *438*, 932-936.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., *et al.* (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* *380*, 435-439.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* *407*, 249-257.

Cerliani, J.P., Stowell, S.R., Mascanfroni, I.D., Arthur, C.M., Cummings, R.D., and Rabinovich, G.A. (2010). Expanding the Universe of Cytokines and Pattern Recognition Receptors: Galectins and Glycans in Innate Immunity. *J Clin Immunol*.

Coffelt, S.B., Tal, A.O., Scholz, A., De Palma, M., Patel, S., Urbich, C., Biswas, S.K., Murdoch, C., Plate, K.H., Reiss, Y., *et al.* (2010). Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. *Cancer Res* *70*, 5270-5280.

Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* *124*, 263-266.

Cooper, D.N. (2002). Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta* *1572*, 209-231.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* *420*, 860-867.

Croci, D.O., Zacarias Fluck, M.F., Rico, M.J., Matar, P., Rabinovich, G.A., and Scharovsky, O.G. (2007). Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in

orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* *56*, 1687-1700.

Croci, D.O., Cumashi, A., Usakova, N.A., Prebrazhenskaya, M.E., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, G.E., Berman, A.E., Bilan, M.I., Ustyuzhanina N.E., Grachev, A., Iacobelli, S., Rabinovich G.A., and Nifantiev N.E. (2011) sulfated fucans, but not sulfated fucomannoglucuronans, determine the anti-inflammatory, anti-coagulant, anti-angiogenic and anti-tumoral activities of fucoidans from laminaria saccharina brown seaweed. *Plos One* – in press

Curiel, T.J., Cheng, P., Mottram, P., Alvarez, X., Moons, L., Evdemon-Hogan, M., Wei, S., Zou, L., Kryczek, I., Hoyle, G., *et al.* (2004). Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* *64*, 5535-5538.

Chan, D.A., Kawahara, T.L., Sutphin, P.D., Chang, H.Y., Chi, J.T., and Giaccia, A.J. (2009). Tumor vasculature is regulated by PHD2-mediated angiogenesis and bone marrow-derived cell recruitment. *Cancer Cell* *15*, 527-538.

Charlesworth, P., and Harris, A. (2008). Hypoxic Regulation of Angiogenesis by HIF-1. In *Angiogenesis: An Integrative Approach From Science to Medicine*, W. Figg, and J. Folkman, eds. (New York, Springer Science), pp. 169-179.

Chen, H.X., and Cleck, J.N. (2009). Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nat Rev Clin Oncol* *6*, 465-477.

Chung, C.D., Patel, V.P., Moran, M., Lewis, L.A., and Miceli, M.C. (2000). Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol* *165*, 3722-3729.

Dam, T.K., and Brewer, F.C. (2010). Maintenance of cell surface glycan density by lectin-glycan interactions: a homeostatic and innate immune regulatory mechanism. *Glycobiology* *20*, 1061-1064.

Danguy, A., Camby, I., and Kiss, R. (2002). Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta* *1572*, 285-293.

De Palma, M., Venneri, M.A., Galli, R., Sergi Sergi, L., Politi, L.S., Sampaolesi, M., and Naldini, L. (2005). Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* *8*, 211-226.

Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S., and Dennis, J.W. (2001). Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* *409*, 733-739.

Dennis, J.W., Nabi, I.R., and Demetriou, M. (2009). Metabolism, cell surface organization, and disease. *Cell* *139*, 1229-1241.

Dings, R.P., Loren, M., Heun, H., McNeil, E., Griffioen, A.W., Mayo, K.H., and Griffin, R.J. (2007). Scheduling of radiation with angiogenesis inhibitors anginex and Avastin improves therapeutic outcome via vessel normalization. *Clin Cancer Res* *13*, 3395-3402.

Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* *8*, 793-800.

Drake, C.G., Jaffee, E., and Pardoll, D.M. (2006). Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* *90*, 51-81.

Dube, D.H., and Bertozzi, C.R. (2005). Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* *4*, 477-488.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* *22*, 329-360.

Ebos, J.M., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen, J.G., and Kerbel, R.S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* *15*, 232-239.

Fainaru, O., Adini, A., Benny, O., Adini, I., Short, S., Bazinet, L., Nakai, K., Pravda, E., Hornstein, M.D., D'Amato, R.J., *et al.* (2008). Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis. *FASEB J* *22*, 522-529.

Favre, D., Lederer, S., Kanwar, B., Ma, Z.M., Proll, S., Kasakow, Z., Mold, J., Swainson, L., Barbour, J.D., Baskin, C.R., *et al.* (2009). Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathog* *5*, e1000295.

Ferrara, N. (2010a). Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* *21*, 21-26.

Ferrara, N. (2010b). Role of myeloid cells in vascular endothelial growth factor-independent tumor angiogenesis. *Curr Opin Hematol* *17*, 219-224.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* *380*, 439-442.

Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* *9*, 669-676.

Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P., and Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3, 391-400.

Ferrara, N., and Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-974.

Fischer, C., Jonckx, B., Mazzone, M., Zacchigna, S., Loges, S., Pattarini, L., Chorianopoulos, E., Liesenborghs, L., Koch, M., De Mol, M., *et al.* (2007). Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 131, 463-475.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-1186.

Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med* 57, 1-18.

Folkman, J. (2008). History of Angiogenesis. In *Angiogenesis: An Integrative Approach From Science to Medicine*, W. Figg, and J. Folkman, eds. (New York, Springer Science), pp. 1-14.

Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., and Williams, G. (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133, 275-288.

Fong, G.H. (2009). Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms. *J Mol Med* 87, 549-560.

Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T., and Carmeliet, P. (2009). Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell* 16, 167-179.

Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4, 941-952.

Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells [published erratum appears in *Nat Med* 1996 Nov;2(11):1267]. *Nat Med* 2, 1096-1103.

Gagneux, P., and Varki, A. (1999). Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* 9, 747-755.

Garcia-Vallejo, J.J., Van Dijk, W., Van Het Hof, B., Van Die, I., Engelse, M.A., Van Hinsbergh, V.W., and Gringhuis, S.I. (2006). Activation of human endothelial cells by tumor necrosis factor- α results in profound changes in the expression of glycosylation-related genes. *J Cell Physiol* 206, 203-210.

Garin, M.I., Chu, C.C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R., and Lechler, R.I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* *109*, 2058-2065.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* *140*, 883-899.

Hamzah, J., Jugold, M., Kiessling, F., Rigby, P., Manzur, M., Marti, H.H., Rabie, T., Kaden, S., Grone, H.J., Hammerling, G.J., *et al.* (2008). Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature* *453*, 410-414.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.

Hattori, K., Dias, S., Heissig, B., Hackett, N.R., Lyden, D., Tatenos, M., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Witte, L., Crystal, R.G., *et al.* (2001). Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* *193*, 1005-1014.

Hattori, K., Heissig, B., Wu, Y., Dias, S., Tejada, R., Ferris, B., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Bohlen, P., Witte, L., *et al.* (2002). Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* *8*, 841-849.

He, J., and Baum, L.G. (2004). Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J Biol Chem* *279*, 4705-4712.

Helfrich, I., Scheffrahn, I., Bartling, S., Weis, J., von Felbert, V., Middleton, M., Kato, M., Ergun, S., and Schadendorf, D. (2010). Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma. *J Exp Med* *207*, 491-503.

Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Hess, A.R., and Seftor, R.E. (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* *3*, 411-421.

Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W.E., *et al.* (2002). Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* *1572*, 232-254.

Hsieh, S.H., Ying, N.W., Wu, M.H., Chiang, W.F., Hsu, C.L., Wong, T.Y., Jin, Y.T., Hong, T.M., and Chen, Y.L. (2008). Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* *27*, 3746-3753.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., *et al.* (2004). Bevacizumab plus

irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* *350*, 2335-2342.

Ilarregui, J.M., Croci, D.O., Bianco, G.A., Toscano, M.A., Salatino, M., Vermeulen, M.E., Geffner, J.R., and Rabinovich, G.A. (2009). Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* *10*, 981-991.

Ingrassia, L., Camby, I., Lefranc, F., Mathieu, V., Nshimyumukiza, P., Darro, F., and Kiss, R. (2006). Anti-galectin compounds as potential anti-cancer drugs. *Curr Med Chem* *13*, 3513-3527.

Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso, E., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2002). Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* *416*, 279-280.

Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* *307*, 58-62.

Jinushi, M., and Dranoff, G. (2007). Triggering tumor immunity through angiogenesis targeting. *Clin Cancer Res* *13*, 3762-3764.

Juszczynski, P., Ouyang, J., Monti, S., Rodig, S.J., Takeyama, K., Abramson, J., Chen, W., Kutok, J.L., Rabinovich, G.A., and Shipp, M.A. (2007). The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 13134-13139.

Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., and Li, Z.W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* *2*, 301-310.

Karin, M., and Greten, F.R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* *5*, 749-759.

Kitazume, S., Imamaki, R., Ogawa, K., Komi, Y., Futakawa, S., Kojima, S., Hashimoto, Y., Marth, J.D., Paulson, J.C., and Taniguchi, N. (2010). Alpha2,6-sialic acid on platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) regulates its homophilic interactions and downstream antiapoptotic signaling. *J Biol Chem* *285*, 6515-6521.

Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., Wei, S., Zhang, S., Pilon-Thomas, S., Niu, G., Kay, H., Mule, J., Kerr, W.G., *et al.* (2005). Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* *11*, 1314-1321.

Kuo, P.L., Hung, J.Y., Huang, S.K., Chou, S.H., Cheng, D.E., Jong, Y.J., Hung, C.H., Yang, C.J., Tsai, Y.M., Hsu, Y.L., *et al.* (2011). Lung Cancer-Derived Galectin-1 Mediates Dendritic Cell Anergy through Inhibitor of DNA Binding 3/IL-10 Signaling Pathway. *J Immunol* *186*, 1521-1530.

Lau, K.S., Partridge, E.A., Grigorian, A., Silvescu, C.I., Reinhold, V.N., Demetriou, M., and Dennis, J.W. (2007). Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* *129*, 123-134.

Le Mercier, M., Mathieu, V., Haibe-Kains, B., Bontempi, G., Mijatovic, T., Decaestecker, C., Kiss, R., and Lefranc, F. (2008). Knocking down galectin 1 in human hs683 glioblastoma cells impairs both angiogenesis and endoplasmic reticulum stress responses. *J Neuropathol Exp Neurol* *67*, 456-469.

Le, Q.T., Shi, G., Cao, H., Nelson, D.W., Wang, Y., Chen, E.Y., Zhao, S., Kong, C., Richardson, D., O'Byrne, K.J., *et al.* (2005). Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *J Clin Oncol* *23*, 8932-8941.

Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., and Poirier, F. (2004). Introduction to galectins. *Glycoconj J* *19*, 433-440.

Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* *141*, 1117-1134.

Liu, F., and Rabinovich, G. (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Rev Cancer* *5*.

Lutomski, D., Imam-Sghiouar, N., Blondeau, K., Caron, M., and Joubert-Caron, R. (2004). Purification of human galectin-1 produced in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*: a comparison with classic shake flask cultivation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* *808*, 105-109.

Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E.A., Gardner, L.M., Pe'er, J., Trent, J.M., Meltzer, P.S., and Hendrix, M.J. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* *155*, 739-752.

Manning, E.A., Ullman, J.G., Leatherman, J.M., Asquith, J.M., Hansen, T.R., Armstrong, T.D., Hicklin, D.J., Jaffee, E.M., and Emens, L.A. (2007). A vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor enhances antitumor immunity through an immune-based mechanism. *Clin Cancer Res* *13*, 3951-3959.

Markowska, A.I., Liu, F.T., and Panjwani, N. (2010). Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med* *207*, 1981-1993.

Marth, J.D., and Grewal, P.K. (2008). Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* *8*, 874-887.

Mc Donald, D. (2008). Angiogenesis and Vascular Remodeling in Inflammation and Cancer: Biology and Architecture of the Vasculature. In *Angiogenesis: An Integrative*

Approach From Science to Medicine, W. Figg, and J. Folkman, eds. (New York, Springer Science), pp. 17-33.

Mesri, E.A., Cesarman, E., and Boshoff, C. (2010). Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer* *10*, 707-719.

Mizukami, Y., Jo, W.S., Duerr, E.M., Gala, M., Li, J., Zhang, X., Zimmer, M.A., Iliopoulos, O., Zukerberg, L.R., Kohgo, Y., *et al.* (2005). Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1 α -deficient colon cancer cells. *Nat Med* *11*, 992-997.

Mizukami, Y., Kohgo, Y., and Chung, D.C. (2007). Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* *13*, 5670-5674.

Mizukami, Y., Li, J., Zhang, X., Zimmer, M.A., Iliopoulos, O., and Chung, D.C. (2004). Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer Res* *64*, 1765-1772.

Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P., *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* *314*, 126-129.

Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R.K., and McDonald, D.M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* *160*, 985-1000.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* *8*, 618-631.

Mutlu, A.D., Cavallin, L.E., Vincent, L., Chiozzini, C., Eroles, P., Duran, E.M., Asgari, Z., Hooper, A.T., La Perle, K.M., Hilsher, C., *et al.* (2007). In vivo-restricted and reversible malignancy induced by human herpesvirus-8 KSHV: a cell and animal model of virally induced Kaposi's sarcoma. *Cancer Cell* *11*, 245-258.

Nangia-Makker, P., Honjo, Y., Sarvis, R., Akahani, S., Hogan, V., Pienta, K.J., and Raz, A. (2000). Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol* *156*, 899-909.

Nozawa, H., Chiu, C., and Hanahan, D. (2006). Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 12493-12498.

Ohm, J.E., Gabrilovich, D.I., Sempowski, G.D., Kisseleva, E., Parman, K.S., Nadaf, S., and Carbone, D.P. (2003). VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* *101*, 4878-4886.

Ohtsubo, K., and Marth, J.D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126, 855-867.

Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 359-371.

Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335-348.

Ouyang, J., Juszczynski, P., Rodig, S.J., Green, M.R., O'Donnell O., Currie T., Armant M., Takeyama K., Monti S., Rabinovich G.A., Ritz J., Kutok J.L., Shipp, M.A. (2011). Expression and Targeted Inhibition of the Immunoregulatory Carbohydrate-binding Lectin, Galectin 1, in EBV-driven Post-transplant Lymphoproliferative Disorders. *Blood*, in press

Pace, K.E., Hahn, H.P., and Baum, L.G. (2003). Preparation of recombinant human galectin-1 and use in T-cell death assays. *Methods Enzymol* 363, 499-518.

Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15, 220-231.

Papetti, M., and Herman, I.M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C947-970.

Paulis, Y.W., Soetekouw, P.M., Verheul, H.M., Tjan-Heijnen, V.C., and Griffioen, A.W. (2010). Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochim Biophys Acta* 1806, 18-28.

Paulson, J.C., Blixt, O., and Collins, B.E. (2006). Sweet spots in functional glycomics. *Nat Chem Biol* 2, 238-248.

Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4, 71-78.

Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9, 677-684.

Rabinovich, G.A., Alonso, C.R., Sotomayor, C.E., Durand, S., Bocco, J.L., and Riera, C.M. (2000). Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. *Cell Death Differ* 7, 747-753.

Rabinovich, G.A., Ariel, A., Hershkoviz, R., Hirabayashi, J., Kasai, K.I., and Lider, O. (1999). Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* *97*, 100-106.

Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D., and Sotomayor, E.M. (2007a). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* *25*, 267-296.

Rabinovich, G.A., Iglesias, M.M., Modesti, N.M., Castagna, L.F., Wolfenstein-Todel, C., Riera, C.M., and Sotomayor, C.E. (1998). Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol* *160*, 4831-4840.

Rabinovich, G.A., and Toscano, M.A. (2009). Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol* *9*, 338-352.

Rabinovich, G.A., Toscano, M.A., Jackson, S.S., and Vasta, G.R. (2007b). Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol* *17*, 513-520.

Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., Roccaro, A.M., and Vacca, A. (2007). The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia* *21*, 44-52.

Ribatti, D., and Vacca, A. (2008). Overview of angiogenesis during tumor growth. In *Angiogenesis: An Integrative Approach From Science to Medicine*, W. Figg, and J. Folkman, eds. (New York, Springer Science), pp. 161-168.

Riboldi, E., Musso, T., Moroni, E., Urbinati, C., Bernasconi, S., Rusnati, M., Adorini, L., Presta, M., and Sozzani, S. (2005). Cutting edge: proangiogenic properties of alternatively activated dendritic cells. *J Immunol* *175*, 2788-2792.

Risau, W. (1996). What, if anything, is an angiogenic factor? *Cancer Metastasis Rev* *15*, 149-151.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* *386*, 671-674.

Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A.S., Nizet, V., Johnson, R.S., Haddad, G.G., and Karin, M. (2008). NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* *453*, 807-811.

Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N.W., Toscano, M.A., Ilarregui, J.M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O.L., and Rabinovich, G.A. (2004). Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* *5*, 241-251.

Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22, 531-562.

Salatino, M., Croci, D.O., Bianco, G.A., Ilarregui, J.M., Toscano, M.A., and Rabinovich, G.A. (2008). Galectin-1 as a potential therapeutic target in autoimmune disorders and cancer. *Expert Opin Biol Ther* 8, 45-57.

Seaman, S., Stevens, J., Yang, M.Y., Logsdon, D., Graff-Cherry, C., and St Croix, B. (2007). Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell* 11, 539-554.

Shintani, Y., Takashima, S., Asano, Y., Kato, H., Liao, Y., Yamazaki, S., Tsukamoto, O., Seguchi, O., Yamamoto, H., Fukushima, T., *et al.* (2006). Glycosaminoglycan modification of neuropilin-1 modulates VEGFR2 signaling. *EMBO J* 25, 3045-3055.

Shojaei, F., Wu, X., Malik, A.K., Zhong, C., Baldwin, M.E., Schanz, S., Fuh, G., Gerber, H.P., and Ferrara, N. (2007). Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b⁺Gr1⁺ myeloid cells. *Nat Biotechnol* 25, 911-920.

Shrimali, R.K., Yu, Z., Theoret, M.R., Chinnasamy, D., Restifo, N.P., and Rosenberg, S.A. (2010). Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res* 70, 6171-6180.

Sitkovsky, M.V. (2009). T regulatory cells: hypoxia-adenosinergic suppression and redirection of the immune response. *Trends Immunol* 30, 102-108.

Song, S., Ewald, A.J., Stallcup, W., Werb, Z., and Bergers, G. (2005). PDGFRbeta⁺ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol* 7, 870-879.

Song, Y., Aglipay, J.A., Bernstein, J.D., Goswami, S., and Stanley, P. (2010). The bisecting GlcNAc on N-glycans inhibits growth factor signaling and retards mammary tumor progression. *Cancer Res* 70, 3361-3371.

Sozzani, S., Rusnati, M., Riboldi, E., Mitola, S., and Presta, M. (2007). Dendritic cell-endothelial cell cross-talk in angiogenesis. *Trends Immunol* 28, 385-392.

Stannard, K.A., Collins, P.M., Ito, K., Sullivan, E.M., Scott, S.A., Gabutero, E., Darren Grice, I., Low, P., Nilsson, U.J., Leffler, H., *et al.* (2010). Galectin inhibitory disaccharides promote tumour immunity in a breast cancer model. *Cancer Lett.*

Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21, 685-711.

Tang, H.S., Feng, Y.J., and Yao, L.Q. (2009). Angiogenesis, vasculogenesis, and vasculogenic mimicry in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 19, 605-610.

Thijssen, V.L., Barkan, B., Shoji, H., Aries, I.M., Mathieu, V., Deltour, L., Hackeng, T.M., Kiss, R., Kloog, Y., Poirier, F., *et al.* (2010). Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res* 70, 6216-6224.

Thijssen, V.L., Poirier, F., Baum, L.G., and Griffioen, A.W. (2007). Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *Blood* 110, 2819-2827.

Thijssen, V.L., Postel, R., Brandwijk, R.J., Dings, R.P., Nesmelova, I., Satijn, S., Verhofstad, N., Nakabeppu, Y., Baum, L.G., Bakkers, J., *et al.* (2006). Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15975-15980.

Tong, R.T., Boucher, Y., Kozin, S.V., Winkler, F., Hicklin, D.J., and Jain, R.K. (2004). Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res* 64, 3731-3736.

Toscano, M.A., Bianco, G.A., Ilarregui, J.M., Croci, D.O., Correale, J., Hernandez, J.D., Zwirner, N.W., Poirier, F., Riley, E.M., Baum, L.G., *et al.* (2007). Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 8, 825-834.

Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9, 1269-1274.

van den Brule, F., Califice, S., and Castronovo, V. (2004). Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J* 19, 537-542.

van Kooyk, Y., and Rabinovich, G.A. (2008). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 9, 593-601.

Varki, A., Kannagi, R., Toole, B.P. (2009). Glycosylation Changes in Cancer. In *Essentials of Glycobiology*, A.C. Varki, R.D. Esko, J.D. Freeze, H.H. Stanley, P. Bertozzi, C.R. Hart, G.W. Etzler, M.E., ed. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Wang, H.W., Trotter, M.W., Lagos, D., Bourboulia, D., Henderson, S., Makinen, T., Elliman, S., Flanagan, A.M., Alitalo, K., and Boshoff, C. (2004a). Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat Genet* 36, 687-693.

Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., *et al.* (2004b). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* *10*, 48-54.

Willhauck-Fleckenstein, M., Moehler, T.M., Merling, A., Pusunc, S., Goldschmidt, H., and Schwartz-Albiez, R. (2010). Transcriptional regulation of the vascular endothelial glycome by angiogenic and inflammatory signalling. *Angiogenesis* *13*, 25-42.

Winkler, F., Kozin, S.V., Tong, R.T., Chae, S.S., Booth, M.F., Garkavtsev, I., Xu, L., Hicklin, D.J., Fukumura, D., di Tomaso, E., *et al.* (2004). Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* *6*, 553-563.

Xu, L., Pathak, P.S., and Fukumura, D. (2004). Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* *10*, 701-707.

Yang, R.Y., Rabinovich, G.A., and Liu, F.T. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* *10*, e17.

Yuan, J.S., Kousis, P.C., Suliman, S., Visan, I., and Guidos, C.J. (2010). Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annu Rev Immunol* *28*, 343-365.

Zhao, X.Y., Chen, T.T., Xia, L., Guo, M., Xu, Y., Yue, F., Jiang, Y., Chen, G.Q., and Zhao, K.W. (2010). Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* *31*, 1367-1375.

8. ABREVIATURAS

Para la mayoría de las abreviaturas usadas en esta tesis, optamos por la sigla en inglés a los fines de evitar confusiones dado que la mayoría de éstas son extensamente usadas en la bibliografía esta forma.

488-Gal1	Galectina-1 marcada fluorescentemente
Ang1	Angiopoyetina1
Ang2	Angiopoyetina2
AS	Acido siálico (ácido <i>N</i> -acetilneuramínico)
αSMA	α-actina de musculo liso (α- <i>smooth</i> muscle actin)
CD	Cluster de diferenciación
CEs	Células endoteliales
CFSE	Ester de succinimidyl carboxifluoresceína (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)
COX-2	ciclooxigenasa-2
DC	Célula dendrítica (<i>Dendritic cell</i>)
EGF	Factor de crecimiento epidermal (<i>Epidermal growth factor</i>)
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares (<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>)
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico (<i>Fibroblast growth factor</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gal1	Galectina-1
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GCNT1	α-1-6 <i>N</i> -acetilglucoaminiltransferasa 1 (α1-6- <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase-1)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
Gnt5	<i>N</i> -Acetilglucoaminiltrasferasa 5 (<i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase 5)
GSL-1B4	<i>Griffonia simplicifolia</i> isotipo B4
HIF-1α	Factor de transcripción inducido por hipoxia 1α
HPA	<i>Helix pomatia</i> agglutinin
Hpi-1	Hypoxiprobe-1

IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
IFN	Interferon
IL	Interleuquina
JNK	c-Jun quinasa (c-Jun N-terminal kinase)
LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i> lectin
L-HPA	<i>Phaseolus vulgaris</i> lectin
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAL II	<i>Maackia amurensis</i> lectin
MC	Medio condicionado libre de suero
MIF	Factor inductor de mitosis
MMPs	Metaloproteasas de la matriz
NAC	<i>N-acetil-cisteína</i>
NF.κB	Factor nuclear κB
NRP1	Neuropilina-1
PD-1	Molécula asociada a la muerte programada tipo 1 (<i>Programmed death-1</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR-β	Receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PD-L1	Ligando de PD-1
PGE2	Prostaglandina E2
PHD	Prolil-hidroxilasa
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PNA	<i>Peanut agglutinin</i> (Aglutinina del maní)
qPCR	PCR cuantitativa (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)
RGS5	Regulador de la señalización de proteínas G 5 (<i>Regulator of G-protein signaling 5</i>).
RNAi	RNA de interferencia
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RTKs	Receptores de tirosina quinasa
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin
TA	Temperatura ambiente

TAM	Macrófago asociado a tumores
TCR	Receptor de antígeno de células T
TDLN	Ganglios linfáticos drenantes al tumor
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Célula T helper
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
Tr1	Células T regulatorias productoras de IL-10
Treg	Células T regulatorias CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR2	Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular

9. PUBLICACIONES

PUBLICACIONES QUE SURGIERON DE RESULTADOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

TARGETING GLYCOSYLATION-DEPENDENT NON-CANONICAL VEGFR2 SIGNALING PROMOTES VASCULAR REMODELING AND AUGMENTS ANTI-TUMOR IMMUNITY.

Diego O. Croci, Mariana Salatino, Jing Ouyang, Natalia Rubinstein, Iván D. Mascanfroni, Juan P. Cerliani, Juan M. Ilarregui, Lucas E. Cavallin, Victoria Sundblad, Marta A. Toscano, Carolina I. Domaica, Sebastián Dergan-Dylon, María C. Croci, Enrique A. Mesri, Adriana Albini, Margaret A. Shipp and Gabriel A. Rabinovich.

Enviado a publicar nov. 2010, recibido con correcciones enero. 2011. Actualmente en proceso de correcciones para ser re-enviado

SULFATED FUCANS, BUT NOT SULFATED FUCOMANNOGLUCURONANS, DETERMINE THE ANTI-INFLAMMATORY, ANTI-COAGULANT, ANTI-ANGIOGENIC AND ANTI-TUMORAL ACTIVITIES OF FUCOIDANS FROM LAMINARIA SACCHARINA BROWN SEAWEED.

Diego O. Croci, Albana Cumashi, Natalia A. Usakova, Marina E. Prebrazhenskaya, Antonio Piccoli, Licia Totani, Nicola Tinari, Galina E. Morozevich, Albert E. Berman, Maria I. Bilan, Nadezhda E. Ustyuzhanina Alexey A. Grachev, Stefano Iacobelli, Gabriel A. Rabinovich and Nikolay E. Nifantiev (*GAR y NEN comparten última autoría).

PLos One – En prensa 2011

PUBLICACIONES COMO CO-AUTOR DURANTE EL TRANCURSO DEL DOCTORADO

MODULATION OF ENDOTHELIAL CELL MIGRATION AND ANGIOGENESIS: A NOVEL FUNCTION FOR THE TANDEM-REPEAT LECTIN GALECTIN-8.

Cárdenas Delgado VM, Colombo L, Troncoso MF, Nugnes LG, Fernandez MF, Malchiodi EL, Frahm I, **Croci DO**, Compagno D, Rabinovich GA, Wolfenstein-Todel C, Elola M.

FASEB J. 2011.25:242-54. ISSN 0892-6638

LINKING STRUCTURE AND THERMAL STABILITY TO LIGAND BINDING AND DIMERIZATION EQUILIBRIUM OF GALECTIN-1, A MULTIFUNCTIONAL BETA-GALACTOSIDE-BINDING PROTEIN.

Di Lella S, Marti MA, **Croci DO**, Guardia C, Díaz Ricci JC, Rabinovich GA, Caramello JJ, Estrin DA.

Biochemistry 2010.47(35):7652-8. ISSN 1520-4995

"TIME SWEET TIME": CIRCADIAN CHARACTERIZATION OF GALECTIN-1 NULL MICE.

Casiraghi LP, **Croci DO**, Poirier F, Rabinovich GA, Golombek DA.

J Circadian Rhythms. 2010. 19;8:4. ISSN 1740-3392

TOLEROGENIC SIGNALS DELIVERED BY DENDRITIC CELLS TO T CELLS THROUGH A GALECTIN-1-DRIVEN IMMUNOREGULATORY CIRCUIT INVOLVING INTERLEUKIN 27 AND INTERLEUKIN 10.

Juan M Illarregui, **Diego O Croci**, Germán A Bianco, Marta A Toscano, Mariana Salatino, Mónica E Vermeulen, Jorge R Geffner & Gabriel A Rabinovich.

Nature Immunol; 2009.10, 981-991 ISSN 1529-2908

SILENCING SURVIVIN GENE EXPRESSION PROMOTES APOPTOSIS OF HUMAN BREAST CANCER CELLS THROUGH A CASPASE-INDEPENDENT PATHWAY.

Diego O. Croci, Ingrid S. Cogno, Natalia B. Rumie Vittar, Edgardo Salvatierra, Felipe Trajtenberg Osvaldo L. Podhajcer, Eduardo Osinaga, Gabriel A. Rabinovich and Viviana A. Rivarola

J Cell Biochem. 2008.Jun 13; 105(2):381-390. ISSN 0730-2312

APOPTOSIS RESISTANCE IN HIV-1 PERSISTENTLY INFECTED CELLS IS INDEPENDENT OF ACTIVE VIRAL REPLICATION AND INVOLVES MODULATION OF MITOCHONDRIAL PATHWAY

Pablo N. Fernández Larrosa, **Diego O. Croci**, Diego Riva, Mariel Bibini, Renata Luzzi, Mónica Saracco, Susana Mersich, Gabriel A. Rabinovich, Liliana Martínez Peralta.

Retrovirology. 2008.Feb. 8; 5(1):19 ISSN 1742-4690

CRITICAL ROLE OF GALECTIN-1 IN THE CONTROL OF PLATELET ACTIVATION.

Natalia Pacienza, Roberto G Pozner , Germán A. Bianco, ,Lina Paola D'Atri, **Diego O. Croci**, Soledad Negrotto, Elisa Malaver, Ricardo M. Gómez, Mirta Schattner and Gabriel A. Rabinovich. (MS y GAR comparten última autoría)

FASEB J. 2008.Apr; 22(4):1113-23. ISSN 0892-6638

DIFFERENTIAL GLYCOSYLATION OF T HELPER CELL SUBSETS SELECTIVELY REGULATES SUSCEPTIBILITY TO CELL DEATH.

Marta A. Toscano, Germán A. Bianco, Juan M. Illarregui, **Diego O. Croci**, Jorge Correale, Joseph Hernandez, Norberto W. Zwirner, Francoise Poirier, Eleanor Riley, Linda G. Baum, Gabriel A. Rabinovich.

Nature Immunol; 2007.8, 825-834 ISSN 1529-2908

ENDOGENOUS LECTINS SHAPE THE FUNCTION OF DENDRITIC CELLS AND TAILOR ADAPTIVE IMMUNITY: MECHANISMS AND BIOMEDICAL APPLICATIONS.

Iván D. Mascanfroni, Juan P. Cerliani, Sebastián Dergan-Dylon, **Diego O. Croci**, Juan M. Illarregui and Gabriel A. Rabinovich

Int Immunopharmacol, 2011; en prensa.

REGULATED EXPRESSION OF GALECTIN-3, A MULTIFUNCTIONAL GLYCAN-BINDING PROTEIN, IN HAEMATOPOIETIC AND NON-HAEMATOPOIETIC TISSUES.

Sundblad V, **Croci DO**, Rabinovich GA.

Histol Histopathol. 2011. 26:247-65.

INTEGRATING THE UNIVERSE OF EFFECTOR AND REGULATORY IMMUNE CELL SUBSETS: AN EMERGING ROLE OF PROTEIN-GLYCAN INTERACTIONS.

S.A. Pesoa, **D.O. Croci**, G.A. Rabinovich.

Curr Immunol Rev 2010, 6:364-356

DISSECTING THE SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS TRIGGERED BY GALECTIN-GLYCAN INTERACTIONS IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL SETTINGS.

Diego J. Laderach, Daniel Compagno, Marta A. Toscano, **Diego O. Croci**, Sebastián Dergan-Dylon, Mariana Salatino, Gabriel A. Rabinovich.

IUBMB Life. 2010 Jan; 62(1):1-13. ISSN 1521-6551

OVERCOMING THE HURDLES OF TUMOR IMMUNITY BY TARGETING REGULATORY PATHWAYS IN INNATE AND ADAPTIVE IMMUNE CELLS.

Norberto W. Zwirner, **Diego O. Croci**, Carolina I. Domaica and Gabriel A. Rabinovich.

Curr Pharm Des. 201016, 255-267. ISSN 1873-4286

GALECTIN-1 AS THERAPEUTIC TARGET IN INFLAMMATORY DISEASES AND CANCER.

Mariana Salatino, **Diego O. Croci**, Germán A. Bianco, Juan M. Ilarregui, Marta A. Toscano, Gabriel A. Rabinovich.

Expert Opin Biol Ther. 2008. 8(1):45-57. ISSN 1471-2598

INTEGRATING THE UNIVERSE OF REGULATORY CELLS IN CANCER: A MAJOR HURDLE FOR SUCCESSFUL IMMUNOTHERAPY.

J. M. Ilarregui, **D.O. Croci**, M. Salatino, G.A. Bianco, M.A. Toscano and G.A. Rabinovich.

Medicina; 2007 67,(2) 25-31. ISSN 0025-7680

DYNAMIC CROSS-TALK BETWEEN TUMOR, STROMAL AND IMMUNE CELLS IN ORCHESTRATING THE IMMUNOSUPPRESSIVE NETWORK AT THE TUMOR MICROENVIRONMENT.

Diego O. Croci, Mariano Zacarías Fluck, María J. Rico, Pablo Matar, Gabriel A. Rabinovich, and O. Graciela Scharovsky.

Cancer Immunol. Immunother. 2007.; 56(11):1687-1700. ISSN 0340-7004

DISSECTING THE PATHOPHYSIOLOGIC ROLE OF ENDOGENOUS LECTINS: GLYCAN-BINDING PROTEINS WITH CYTOKINE-LIKE ACTIVITY?

Toscano MA, Ilarregui JM, Bianco GA, Campagna L, **Croci DO**, Salatino M, Rabinovich GA.

Cytokine Growth Factor Rev. 2007.18(1-2):57-71. ISSN 1359-6101

CAPÍTULOS EN LIBROS**MULTIPLE FUNCTIONAL TARGETS OF THE IMMUNOREGULATORY POTENTIAL OF GALECTIN-1: CONTROL OF IMMUNE CELL TRAFFICKING, DENDRITIC CELL PHYSIOLOGY AND T CELL FATE.**

Dianne Cooper, Juan Ilarregui, Susana Pesoa, **Diego O. Croci**, Mauro Perretti, and Gabriel Rabinovich.

Methods in Enzymology. 2010. Cap. 11, Vol 480: 199-244 . Elsevier Inc. ISSN 0076-6879

AVANCES EN INMUNOBIOLOGÍA E INTEGRACIÓN DEL UNIVERSO DE CÉLULAS EFECTORAS Y REGULADORAS.

Gabriel A. Rabinovich, Susana A. Pesoa y **Diego O. Croci**.

Neuroinmunología Clínica. 2011. Cap 1: 3-13. Ed. Médica Panamericana. ISBN 987-950-06-0156-6

OTROSTRABAJOS EN ETAPA DE CORRECCION LUEGO DEL ENVIO**GALECTIN-1 PROMOTES HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELL ADHESION AND POLARIZATION: A NOVEL ROLE FOR THIS ENDOGENOUS LECTIN AT THE INTERFACE OF LIVER PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY.**

María V. Espelt, Pablo Carabias, Malena Manzi, María T. Elola, **Diego O Croci**, Marina C. Muñoz, Fernando P. Dominici, Gabriel A. Rabinovich, Carlota Wolfenstein-Todel, and María F. Troncoso.

Hepatology – En corrección 2011

GALECTIN-3-GLYCAN LATTICES DRIVE OLIGODENDROCYTE DIFFERENTIATION TO CONTROL MYELIN INTEGRITY AND FUNCTION.

Laura A. Pasquini, Violeta Millet, Hernán C. Hoyos, Juan P.Giannoni, **Diego O.Croci**, Fu T. Liu, Gabriel A. Rabinovich and Juana M. Pasquini.

Cell Death and Diff. – Re-enviado con correcciones 2011.

GALECTIN-1 DEACTIVATES CLASSICALLY-ACTIVATED MICROGLIA AND PROTECTS FROM INFLAMMATION-INDUCED NEURODEGENERATION

S.C. Starossom, I. Mascanfroni, J. Imitola, **D.O. Croci**, K. Raddassi, W. Elyaman, S.J. Khoury*, G.A. Rabinovich*, (*SJK y GAR comparten última autoría)

Nature Neuroscience. En corrección 2011

10. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer particularmente a unos pocos que hicieron mucho para que esta tesis sea posible, también a agradezco a los muchos que ayudaron desde el anonimato o que por motivos de espacio/tiempo no he podido o sabido agradecer.

A Gabriel, querido Gaby, Gracias por hacer mis sueños realidad, ni más ni menos que eso. Gracias también por dejarme ser parte de un proyecto tan hermoso y ser parte integral de un grupo tan lindo de gente. Gracias por enseñarme que ésta profesión sin pasión no es nada. Por las ideas, las palabras, los viajes, la gente, y sobre todo los hechos. Por mostrarme que siempre es mejor decir lo que se piensa y hacer lo que se siente. Gracias por querer hacer siempre la mejor ciencia posible, y enseñarme que esa es la única forma de hacer ciencia. Gracias por estar siempre, por la extrema generosidad en lo laboral y en lo personal, por el permanente apoyo y estímulo sin importar cuando ni como. Gracias por la amistad tan hermosa y genuina. Y claro, Gracias por la dirección tan a conciencia de mi formación doctoral, rigurosa, honesta y pasional. Nunca hubiese soñado estar en un lugar mejor y formarme con alguien tan integro, y sin embargo vos lo cumpliste. Gracias por todo!.

A los jurados de esta tesis, Gracias por la lectura a conciencia y las sugerencias. Por aceptar tan amablemente la no sencilla tarea de evaluar un trabajo de tesis. Por el tiempo que invirtieron es eso y por la discusión científica que seguramente se desprenderá.

A mis compañeros de laboratorio, con quienes compartí muchos momentos en estos últimos años de mi vida. Gracias a todos por hacer de la tarea diaria, a veces muy frustrante, una alegría constante, por aportar la cuota de diversión tan necesaria en esta profesión. **A la vieja guardia**, Gracias Marta por tantas discusiones, risas y la ayuda que siempre estuvo ahí esperando que la necesite. Y sobre todo, gracias por Illustrator!. Yoni, Gracias por la honestidad extrema, por el humor, por los consejos y apoyo. Marian, gracias por compartir tantos consejos, charlas y ayudas. Por escucharme, criticarme tan duramente y hacerme reír tanto. **A la nueva trova**, gracias por hacer lo mejor cada día mejor, gracias por llenar de humor el trabajo, por no poner condiciones y estar siempre ahí cuando los necesité. Pelado, mil gracias por tus charlas, tus bromas, sentencias contundentes y por la ayuda. Gracias por el imaging y esas ganas contagiosas de hacer ciencia de alto vuelo. Toti, Gracias por la invaluable ayuda que me diste, por el apoyo constante y sostenido y por el humor cordobés!. Sebas, Gracias por la ayuda, las bromas, y por hacer todas las discusiones más ricas en todo sentido. Vicky, Gracias por tu ejemplo, por mostrarme que nada es impedimento cuando se ama lo que se hace. Susy, Mil gracias por el apoyo, la dedicación con la que solucionaste cualquier problema que pudiéramos tener y por los consejos que nunca faltan. Juan K, gracias por toda la ayuda que tuve de tu parte en todo momento, por la sinceridad y la amistad. Por ser un gran apoyo siempre y por la gran ayuda experimental. A los más nuevitos, Tommy y Vero Gracias por la diversión y por ser tan dignos targets de las mejores.

A los externos físicamente pero cercanos afectivamente. Diego y Dani, Gracias por las discusiones, y por poner a disposición su experiencia. Laura y Lucas, Gracias por el apoyo y la buena onda.

A los químicos! Santi y Charly, gracias por compartir días tan largo de muchas horas de trabajo con tanta alegría y por la dedicación con la cual tratan de sobrepasar las estadías entre nosotros y nuestras bromas. Gracias tucu, Claudia y Sabri por el apoyo la ayuda y por las enseñanzas que cada uno hizo para hacer posible este trabajo.

Al grupo de Norberto, gracias a todos por compartir tantas horas de risas, enojos y discusiones y bromas durante más de 1000 almuerzos juntos. Gracias por las opiniones, el compañerismo y las experiencias compartidas, todo eso de una u otra se vio reflejado en mi trabajo. Gracias Mer, Caro, Viky y Andre por ser tan lindas compañeras en todo sentido. Lucas, Damián y Germán Gracias por la buena onda con la que me enfrentaron todos los días y por compartir las tantas charlas acerca de aspectos “estéticos” de la ciencia y de las científicas.

Al Instituto de Biología y medicina experimental (IByME) y su gente. Gracias por recibirnos tan calurosamente y hacernos sentir como en casa desde el primer día. Desde La Directora hasta los chicos de seguridad (“chicos” es figurativo). Fueron muchos los que de varias maneras contribuyeron concretamente a la elaboración de esta tesis, espero habérselos hecho saber y espero seguir colaborando para hacer nuestra ciencia más interdisciplinaria, participativa

A la Universidad de Buenos Aires, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y a la Fundación Sales por el apoyo económico recibido durante el transcurso de la tesis.

A la Dra Margaret Shipp y su grupo, Gracias por la invaluable ayuda tanto desde lo intelectual como lo experimental. Particularmente a prezmeck y Jing quienes me ayudaron muchísimo en diferentes aspectos del trabajo con su experiencia en biología molecular.

A la Dra. Cecilia Croci, un agradecimiento especial por dos motivos. Uno académico, gracias por la predisposición a colaborar con el material necesario y por las discusiones e interpretaciones imposibles que me permitieron entender a la patología desde un lugar mucho más importante que desde dentro de la membrana celular, los pacientes. “Y como hermana, mil gracias por estar siempre pendiente de mí, mi familia, y mi bienestar. Gracias por ser una gran compañera, por disfrutar mis logros y sufrir mis frustraciones como tuyas.

A mi familia biológica, mi vieja, mis hermanos y mi sobrino, por entenderme, más allá de todo por entenderme y por quererme así, sin más. Ma, gracias por el apoyo incondicional que tuve siempre y por la libertad infinita que me dieron vos y papa, les agradezco mucho eso. Mis hermanos Cecilia, Ana, Virginia y Santiago Gracias por quererme tanto pese a que a veces no me lo merecía, por el apoyo y por la ayuda que tuve de cada uno de ustedes en distintos momentos y aspectos de mi vida. Sobre todo, gracias por el altruismo con el cual se comportaron hacia mí en momentos difíciles, Estoy muy feliz de ser hermanito de ustedes, y muy orgulloso de cada uno de ustedes.

A mi familia política, Rodolfo, Mary y Diego. Gracias por la inmensa ayuda que siempre nos dan y la compañía constante. Daniel, mi cuñado más cercano (simplemente por acumulación de horas) gracias por el apoyo y por compartir tanto.

Dante, ¡el gran amor de mi vida! Masso querido, que decirte, gracias por los remedios para células que con tanta dedicación preparabas los largos sábados y domingos en el laboratorio. Gracias por ayudarme a darles de comer a las células, y cuidar a los pipes. Pero por sobre todo, y más importante, te agradezco inmensamente porque me diste algo que no hoy entenderías pero que me cambió la vida y me hizo la persona más feliz del mundo. Amor incondicional y desinteresado, gracias por esperarme hasta tarde y por enseñarme tanto de la vida. Gracias por entrar en mi vida y llenarla de luz para siempre. Te quiero hasta el Big bang! (que en marzo de 2011 debe andar por los 13.730.879.200 años luz de distancia, y creciendo...)

Nati... me es muy difícil pensar en vos disociadamente de mí, porque yo no soy sin vos. Gracias por el amor, el compañerismo, la comprensión, por saber cuándo escucharme y cuando no, por entender mis silencios y por bancarme siempre. Sin vos hubiese sido imposible emprender cualquier proyecto de vida. Gracias por todo lo que hiciste estos años para que yo pueda estar hoy acá, nosotros sabemos cuán importante sos en todo esto. Gran parte de nuestros sueños, nuestra vida y nuestros proyectos hoy cumplen una etapa, y empiezan otra hermosa. Gracias a vos, y al inmenso amor que sentí de tu parte todo este tiempo tuve fuerzas para sobrepasar cualquier obstáculo. Y lo más importante, gracias por la hermosa familia que creamos, y gracias por volver a compartir la mitad de tu genoma para darme por segunda vez la mayor alegría de la vida. Lucio. Sin ustedes (vos, Dante y Lucio) todo esto no tendría sentido.