



## GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

DISEÑO, EXPRESIÓN  
EN CÉLULAS DE  
MAMÍFERO Y ANÁLISIS  
DE SUS GLICANOS

BIOT

# GLICO- PROTEÍNAS TERAPÉU- TICAS

Guillermina Forno  
Marcos Oggero  
(EDITORES)



## **Glicoproteínas terapéuticas**

**UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL LITORAL**

Rector

**Enrique Mammarella**

Secretario de Planeamiento  
Institucional y Académico

**Miguel Irigoyen**

Decana Facultad de Bioquímica  
y Ciencias Biológicas

**Adriana Ortolani**



Consejo Asesor

Colección Cátedra

**Miguel Irigoyen**

**Bárbara Mántaras**

**Gustavo Martínez**

**Isabel Molinas**

**Héctor Odetti**

**Ivana Tosti**

Dirección editorial

**Ivana Tosti**

Coordinación editorial

**María Alejandra Sedrán**

Coordinación diseño

**Alina Hill**

Coordinación comercial

**José Díaz**

Corrección

**Laura Prati**

Diagramación interior y tapa

**Nicolás Vasallo**

© Ediciones UNL, 2021.

—

Sugerencias y comentarios

[editorial@unl.edu.ar](mailto:editorial@unl.edu.ar)

[www.unl.edu.ar/editorial](http://www.unl.edu.ar/editorial)

Glicoproteínas terapéuticas : diseño, expresión en células de mamífero y análisis de sus glicanos / Guillermina Forno ... [et al.] ; editado por Guillermina Forno; Marcos Oggero. – 1a ed – Santa Fe : Ediciones UNL, 2021.

Libro digital, PDF – (Cátedra)

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-749-322-1

1. Ciencias Naturales. 2. Biología.  
3. Biotecnología. I. Forno, Guillermina, ed. II.  
Oggero, Marcos, ed.

CDD 570.28

---

© Amadeo, Arévalo, Attallah, Bertoncini, Bollati-Fogolín, Bürgi, Ceaglio, Couto, Crispo, Cutine, Etcheverrigaray, Fontana, Forno, Gugliotta, Kratje, Mariño, Masin, Mauro, Mohana-Borges, Montesino, Mufarrege, Oggero, Perelmuter, Prieto, Rodríguez, 2021.



# **Glicoproteínas terapéuticas**

**Diseño, expresión  
en células de mamífero  
y análisis de sus glicanos**

*Guillermina Forno*

*Marcos Oggero*

EDITORES

**ediciones UNL**

CÁTEDRA

# Índice

**AGRADECIMIENTOS / 8**

**PREFACIO / 9**

**1. GLICOBIOLOGÍA / 11**

1.1. Introducción / 11

1.2. Monosacáridos que componen los glicanos / 13

1.3. Glicoconjugados: proteoglicanos, glicolípidos y glicoproteínas / 14

1.4. Estudio de la composición y estructura de las cadenas de hidratos de carbono / 18

1.5. Glicoconjugados de interés biofarmacéutico / 21

1.6. Humanización de la glicosilación / 22

**2. GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS. BIOSÍNTESIS / 27**

2.1. Introducción / 27

2.2. Diversidad de glicoproteínas / 27

2.3. Organización celular de la glicosilación / 28

2.4. N-glicosilación / 30

2.5. O-glicosilación / 37

2.6. Otros tipos de glicosilación / 40

2.7. Conclusiones / 43

**3. ROL BIOLÓGICO DE LOS GLICANOS / 48**

3.1. Introducción / 48

3.2. Consideraciones generales y clasificación del rol biológico de los glicanos / 49

3.3. Funciones biológicas de los glicanos: una pequeña compilación de ejemplos para ilustrar la amplitud de roles de los oligosacáridos en diversos procesos biológicos / 51

3.4. Rol biológico de los glicanos en glicoproteínas terapéuticas / 61

**4. LOS CARBOHIDRATOS COMO MEDIADORES CLAVES EN PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS / 77**

4.1. Introducción / 77

4.2. Antígenos carbohidratos asociados a tumores (tacas): glicosilación aberrante como sello distintivo del proceso neoplásico / 78

4.3. El sistema intestinal como muestra de la importancia del eje glicanos-lectinas en la tolerancia inmunológica / 82

4.4. Resumen / 93

- 5. INGENIERÍA DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS MEDIANTE HIPERGLICOSILACIÓN EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS / 97**
  - 5.1. Introducción / 97
  - 5.2. Modificación de glicanos / 98
  - 5.3. Glicoingeniería mediante la adición de glicanos. hiperglicosilación de proteínas / 101
  - 5.4. Bioterapéuticos obtenidos mediante glicoingeniería por hiperglicosilación / 110
  - 5.5. Conclusión / 112
  
- 6. EXPRESIÓN DE GLICOPROTEÍNAS RECOMBINANTES EN DIFERENTES SISTEMAS / 121**
  - 6.1. Introducción / 121
  - 6.2. Glicoproteínas recombinantes como productos biológicos / 122
  - 6.3. plataformas de producción de glicoproteínas terapéuticas / 124
  
- 7. PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA DE GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS: UPSTREAM PROCESSING / 151**
  - 7.1. Introducción / 151
  - 7.2. Consideraciones generales de los cultivos celulares en biorreactores / 152
  - 7.3. Escalamiento de los cultivos en biorreactores / 165
  - 7.4. Conclusiones / 177
  
- 8. PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA DE GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS: DOWNSTREAM PROCESSING / 185**
  - 8.1. Introducción / 185
  - 8.2. Abordajes para el desarrollo del dsp / 186
  - 8.3. Estrategias de purificación para gp sin etiqueta / 189
  - 8.4. Idoneidad del sistema (*system suitability*) / 195
  - 8.5. Depuración (*clearance*) de partículas virales / 196
  - 8.6. Técnicas separativas / 199
  
- 9. FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN DE INTERCAMBIO ANIÓNICO (HPAEC-PAD) / 207**
  - 9.1. Introducción / 207
  - 9.2. Fundamentos de la separación / 210
  - 9.3. Columnas / 211
  - 9.4. Eluyentes / 213
  - 9.5. Bombas / 214
  - 9.6. Preparación de la muestra / 214
  - 9.7. Detector / 215
  - 9.8. Supresor (neutralizador) / 219

9.9. Algunos ejemplos de análisis / 222

9.10. Conclusiones / 224

**10. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS PARA EL ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS / 228**

10.1. introducción / 228

10.2. Estructura de proteínas y el proceso de plegamiento / 229

10.3. métodos biofísicos en el estudio de glicoproteínas / 231

10.4. metodologías espectroscópicas para el estudio de proteínas / 232

10.5. perspectivas a futuro de las metodologías analíticas / 247

10.6. Conclusiones / 249

**11. ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS / 254**

11.1. Introducción / 254

11.2. Configuración general de los espectrómetros de masas / 255

11.3. Principales formas de ionización de macromoléculas / 256

11.4. principales analizadores de masas / 260

11.5. identificación de secuencia y caracterización estructural de biomoléculas por espectrometría de masas / 270

**12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE GLICOPROTEÍNAS: MODELOS CELULARES Y ANIMALES / 281**

12.1. Introducción / 281

12.2. Generalidades de los bioensayos / 281

12.3. Validación de bioensayos / 282

12.4. Tipos de modelos empleados en los bioensayos / 283

12.5. Anexo / 291

**13. INMUNOGENICIDAD DE GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS / 300**

13.1. Introducción / 300

13.2. Procesamiento y presentación antigénica de las glicoproteínas terapéuticas / 302

13.3. Herramientas para la evaluación de la inmunogenicidad de glicoproteínas de uso terapéutico / 306

13.4. Inmunogenicidad mediada por azúcares exógenos / 310

13.5. Estrategias para reducir la inmunogenicidad de glicoproteínas terapéuticas / 312

13.6. Conclusión / 314

**14. CALIDAD DE PRODUCTOS BIOTERAPÉUTICOS / 319**

14.1. Introducción / 319

14.2. Guías internacionales de calidad de medicamentos / 320

14.3. Especificaciones / 325

14.4. Estándares y sustancias de referencia / 330

|                                                                                                                                                                                                   |              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>15. COMPARABILIDAD Y SIMILITUD DE GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS</b>                                                                                                                              | <b>/ 335</b> |
| 15.1. Genéricos y biosimilares                                                                                                                                                                    | / 335        |
| 15.2. Pasos para el desarrollo de un bioterapéutico                                                                                                                                               | / 339        |
| 15.3. Mecanismo de aprobación de un biosimilar. Demostración de biosimilitud                                                                                                                      | / 341        |
| 15.4. ¿cuán parecido debe ser un biosimilar al producto de referencia?                                                                                                                            | / 346        |
| 15.5. para finalizar                                                                                                                                                                              | / 347        |
| <br>                                                                                                                                                                                              |              |
| <b>16. GLICOPROTEÍNAS EN EL MERCADO BIOFARMACÉUTICO</b>                                                                                                                                           | <b>/ 349</b> |
| 16.1. Introducción                                                                                                                                                                                | / 349        |
| 16.2. Drogas convencionales <i>versus</i> bioterapéuticos                                                                                                                                         | / 349        |
| 16.3. medicamentos biológicos y biotecnológicos                                                                                                                                                   | / 350        |
| 16.4. Evolución de los biofarmacéuticos                                                                                                                                                           | / 352        |
| 16.5. Producción de proteínas terapéuticas                                                                                                                                                        | / 356        |
| 16.6. Segunda generación de bioterapéuticos: estrategias de modificación                                                                                                                          | / 358        |
| 16.7. Nueva generación de bioterapéuticos                                                                                                                                                         | / 362        |
| 16.8. Conclusiones                                                                                                                                                                                | / 366        |
| <br>                                                                                                                                                                                              |              |
| <b>17. ESTUDIO DE CASO DE PRODUCCIÓN DE UNA NUEVA GLICOPROTEÍNA TERAPÉUTICA: GLICOINGENIERÍA, EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE VARIANTES HIPERGLICOSILADAS DE hIFN-<math>\alpha</math>2b</b> | <b>/ 371</b> |
| 17.1. Interferón                                                                                                                                                                                  | / 371        |
| 17.2. Glicoingeniería del hIFN- $\alpha$ 2b: IFN4N                                                                                                                                                | / 374        |
| 17.3. Producción de IFN4N en células CHO-K1 y HEK293                                                                                                                                              | / 375        |
| 17.4. Caracterización del IFN4N <sub>CHO</sub> e IFN4N <sub>HEK</sub>                                                                                                                             | / 378        |
| <br>                                                                                                                                                                                              |              |
| <b>SOBRE LAS AUTORAS Y LOS AUTORES</b>                                                                                                                                                            | <b>/ 393</b> |

- WADHWA, M., MEAGER, A., DILGER, P., BIRD, C., DOLMAN, C., DAS, R. G. & THORPE, R.** (2000). Neutralizing antibodies to granulocyte macrophage colony stimulating factor, interleukin 1 alpha and interferon alpha but not other cytokines in human immunoglobulin preparations. *Immunology*, 99(1), 113–123.
- WANG, C., EUFEMI, M., TURANO, C. & GIARTOSIO, A.** (1996). Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry*, 35(23), 7299–7307. 10.1021/bi9517704
- WASIK, B. R., BARNARD, K. N., PARRISH, C. R.** (2016). Effects of Sialic Acid Modifications on Virus Binding and Infection. *Trends Microbiol.*, 13(11), 2944–2960. 10.1074/mcp.M114.039875
- WITTWER, A.J. & HOWARD, S.C.** (1990). Glycosylation at Asn-184 inhibits the conversion of single chain to two chain tissue type plasminogen activator by plasmin. *Biochemistry*, 29, 4175–4180.
- XIONG, X., MCCAULEY, J. W. & STEINHAEUER, D. A.** (2014). Receptor binding properties of the influenza virus hemagglutinin as a determinant of host range. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 385, 63–91. 10.1007/82\_2014\_423
- YU, Y., LASANAJAK, Y., SONG, X., HU, L., RAMANI, S., MICKUM, M. L., ASHLINE, D. J., PRASAD, B. V., ESTES, M. K., REINHOLD, V. N., CUMMINGS, R. D. & SMITH, D. F.** HUMAN MILK CONTAINS NOVEL GLYCANS THAT ARE POTENTIAL DECOY RECEPTORS FOR NEONATAL ROTAVIRUSES. *MOL. CELL. PROTEOMICS*, 13(11), 2944–2960. 10.1074/mcp.M114.039875

# 4 Los carbohidratos como mediadores claves en procesos fisiológicos y patológicos

KARINA V. MARIÑO Y ANABELA M. CUTINE

## 4.1. INTRODUCCIÓN

El estudio funcional de los glicoconjugados (macromoléculas que contienen hidratos de carbono en su estructura) permaneció históricamente relegado frente al de los ácidos nucleicos y las proteínas debido al concepto central que establece que el flujo de información celular va desde el ADN al ARN y luego a proteínas, relegando a los hidratos de carbono a funciones tradicionalmente metabólicas o de estabilidad biofísica. A esto se le suma la alta complejidad estructural de los glicanos, directamente relacionada a su biosíntesis sin molde (su capacidad de ramificarse, su estereoquímica, su natural variabilidad, la que hizo que el estudio analítico del glicoma (perfil de glicanos presente en una célula o tejido) fuera encarado en profundidad tan solo recientemente. Con el desarrollo de nuevas tecnologías nació el área denominada Glicómica Funcional, la que permite correlacionar la estructura de los glicanos con su funcionalidad biológica.

El glicoma celular es mucho más fácilmente modulado que los genes o el RNA, siendo influenciado por diversos factores tanto ambientales como genéticos, y haciendo que el perfil de glicanos expuesto por la célula funcione como una carta de presentación para interactuar dinámicamente con su entorno. Esta comunicación muchas veces es mediada por proteínas específicamente evolucionadas para reconocer glicoeptopes particulares, denominadas lectinas, las que poseen un dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) con afinidad característica y que marca la familia a la que pertenecen. Estas proteínas están ampliamente distribuidas y conservadas en la naturaleza: en mamíferos se han descrito más de 80 lectinas divididas en 12 familias diferentes, pero también se expresan en bacterias y microorganismos.

La función principal del sistema inmune es reconocer y atacar aquello que no nos es propio, como microorganismos invasores. En un proceso de aprendizaje esencial para el mantenimiento de la salud, este sistema debe aprender a identificar lo propio (para así generar tolerancia y mantener la homeostasis), y a la vez educarse en el reconocimiento de aquellas señales que revelan lo «no propio» (por ejemplo, los patógenos), con el objeto de atacar y eliminar los peligros de manera eficiente. El equilibrio inmune es delicado, y la disrupción del mismo puede provocar diversas enfermedades: cuando el sistema inmune falla y reconoce algo propio como ajeno se producen las

conocidas como enfermedades autoinmunes; cuando la reacción inmune no es debidamente controlada puede generarse un proceso inflamatorio crónico; cuando lo ajeno no es reconocido la respuesta inmune no se dispara, y no hay defensa frente a lo no propio o ajeno.

Es así como los glicoconjugados están involucrados en todos estos procesos: muchas toxinas bacterianas son glicosidasas que degradan el glicoma de las células del huésped, y muchas proteínas mediadoras de la adhesión e invasión de patógenos son lectinas que reconocen glicanos específicos en las células del huésped. El glicoma de superficie es también esencial en el proceso de iniciación, desarrollo y resolución de la respuesta inmune: la funcionalidad de los glicanos en la inmunidad va más allá del reconocimiento y activación de la respuesta, incluyendo funciones importantes como la maduración y activación de diferentes tipos celulares, su tráfico celular y el control de su actividad.

Hoy en día podemos clasificar también a las células tumorales como pertenecientes a lo ajeno o no propio. Alteradas en su expresión génica, durante muchos años se creyó que la inmunidad no podía reconocer un tumor en desarrollo, pero hoy sabemos que sí es capaz de hacerlo y que en muchos casos el tumor regula o inhibe la respuesta inmune para sobrevivir y expandirse. Entre las diferencias que presentan las células neoplásicas, el glicoma de superficie se ha demostrado alterado; este glicoma aberrante las diferencia de las células normales, y asiste en procesos como la migración y la metástasis tumoral.

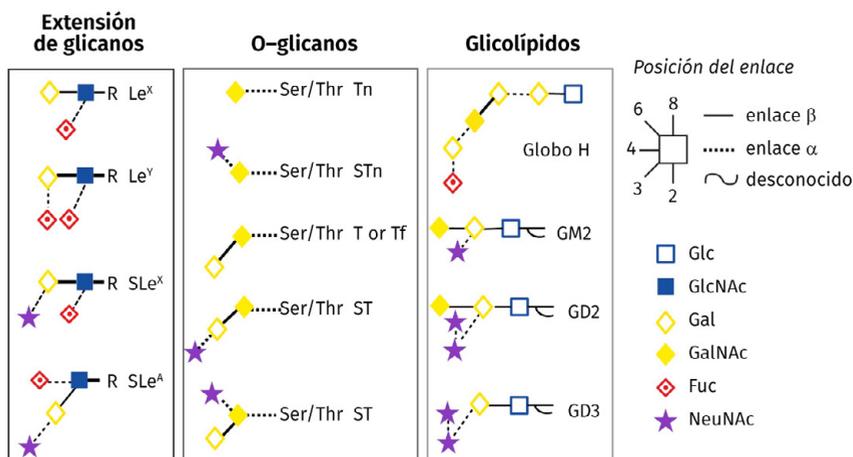
En este capítulo describiremos algunos ejemplos de cómo las interacciones entre carbohidratos y lectinas influyen y modelan la respuesta inmune en contextos fisiológicos y patológicos, incluyendo interacciones huésped-patógeno y enfermedades neoplásicas.

#### **4.2. ANTÍGENOS CARBOHIDRATOS ASOCIADOS A TUMORES (TACAS): GLICOSILACIÓN ABERRANTE COMO SELLO DISTINTIVO DEL PROCESO NEOPLÁSICO**

Más allá de la diversidad estructural que presenta el glicoma celular y su dinámica capacidad de adaptación frente al entorno, para cada tipo celular puede definirse una firma de glicanos o glicoma de manera reproducible en condiciones fisiológicas. Lo mismo puede ser dicho del glicoma de suero, el que se define en base a las glicoproteínas circulantes y el rango de glicofomas presentes para las mismas. Sin embargo, los procesos neoplásicos producen alteraciones en las estructuras de los glicanos tanto para glicoconjugados de membrana tumoral como para glicoproteínas de suero en pacientes con estas enfermedades. De hecho, y como se describirá más adelante, muchos de los biomarcadores utilizados hoy en la clínica para diferentes tipos de tumores son macromoléculas con glicosilación aberrante.

Es importante resaltar que, de todos los cambios estructurales posibles en glicosilación, solamente un grupo limitado se correlaciona con la transformación maligna de la célula y con la progresión del tumor, probablemente consecuencia de la selección hacia aquellas modificaciones útiles para la supervivencia de la célula neoplásica. Si bien las alteraciones en el perfil de glicosilación varían según el tipo de tumor, a partir de la caracterización estructural del perfil de glicanos se han podido definir los conocidos como «antígenos carbohidratos asociados a tumores» (en inglés, *Tumor Associated Carbohydrate Antigens*, TACAS), marcadores moleculares de células tumorales que implican tanto la sub- o sobreexpresión de ciertos glicopeptidos comunes a células no malignizadas, como la neoexpresión de estructuras específicas. Esta alteración del glicoma desencadena diferentes procesos biológicos, que repercuten en el propio tumor (su capacidad de desarrollo, migración y metástasis) y en procesos inmunológicos asociados (como programas de regulación celular y escape tumoral). Si bien el glicoma tumoral varía según el tipo de célula (por ejemplo, no es lo mismo el glicoma de superficie de una célula tumoral de mama que el de una de páncreas), los cambios más frecuentemente observados en los N-glicanos están asociados a una mayor ramificación y complejización. En este sentido, se observa un aumento en las estructuras multiantenarias, mayor cantidad de N-glicanos  $\beta(1,6)$ -ramificados y/o fucosilados, un aumento en la síntesis de cadenas de polilactosamina y en la sialilación y finalmente, mayor proporción de antígenos tipo Lewis (Lewis X o Le<sup>x</sup>, Lewis Y o Le<sup>y</sup>, sialil Lewis X o SLe<sup>x</sup>, sialil Lewis A o SLe<sup>a</sup>). En tanto, los O-glicanos se presentan truncados y con estructuras inmaduras como el antígeno Tn (GalNAc- $\alpha$ -O-Ser/Thr) o el antígeno T (también conocido como Core 1 O-glicano, Gal  $\beta(1,3)$ GalNAc- $\alpha$ -O-Ser/Thr). Estos TACAS incluyen también estructuras tipo sialilTn (sTn), y entre los glicolípidos con glicosilación alterada, glicoesfingolípidos Globo H y gangliósidos GM2 y GD2/GD3 (Figura 4.1). Este O-glicoma aberrante asiste en la movilidad celular y adhesión contribuyendo a un fenotipo invasivo y consecuentemente, a la promoción de metástasis.

Muchos de los TACAS expresados diferencialmente en la célula tumoral se pueden detectar también a nivel sérico, como consecuencia de la sobreexpresión de los glicoproteínas que los contienen. Un ejemplo clásico es MUC1, una mucina transmembrana altamente O-glicosilada detectable en suero de pacientes con neoplasia de origen epitelial, que asiste al crecimiento y desarrollo metastásico, así como a la resistencia a las terapias. Como consecuencia de la transformación neoplásica y la pérdida de polaridad celular, MUC1 entra en circulación. Su O-glicosilación está alterada y su expresión correlaciona con invasión, metástasis y pobre supervivencia del paciente. Los cambios en el glicoma de suero también se producen como consecuencia de las alteraciones en glicoproteínas séricas de origen no tumoral; si bien los mecanismos moleculares asociados aún no han sido del todo elucidados, se ha propuesto que las glicoproteínas séricas con glicosilación aberrante podrían estar asociadas a la inflamación antitumoral. Este concepto surge



**FIGURA 4.1.** ANTÍGENOS CARBOHIDRATOS ASOCIADOS A TUMOR (TACAS). LAS ALTERACIONES EN EL PERFIL DE GLICOSILACIÓN VARÍAN SEGÚN EL TIPO DE TUMOR. EN EL CASO DE LOS N-GLICANOS, ÉSTAS PUEDEN INCLUIR LA SOBREENPRESIÓN DE COMPLEJOS MULTIANTENARIOS, ALTAMENTE FUCOSILADOS Y/O SIALILADOS Y LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ANTÍGENOS COMO LEWIS X (LEX), LEWIS Y (LEY), SIALIL LEWIS X (SLEX), O SIALIL LEWIS A (SLEA). EN OPOSICIÓN, LOS O-GLICANOS SE ACORTAN, PRESENTANDO ESTRUCTURAS COMO GALNAC (TN), SIALIL TN (STN), ANTÍGENO DE THOMSEN...FRIEDENREICH (TF). FINALMENTE, EN EL CASO DE GLICOLÍPIDOS, LOS TACAS MEJOR ESTUDIADOS SON GLOBO H, GM2, GD2 Y GD3 (ADAPTADO DE CAGNONI ET AL, 2016)

de la observación de alteraciones similares en el suero de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoidea. Hoy en día, buena parte de los biomarcadores utilizados para diagnóstico y pronóstico en enfermedades neoplásicas son glicoproteínas, y muchas de ellas con glicosilación alterada (Tabla 4.1). A nivel sérico, entre los biomarcadores de origen tumoral en aplicación clínica se encuentra CA19-9, un nombre alternativo para el glicopeptido SLe<sup>A</sup> presente en glicoproteínas y glicolípidos circulantes cuyas altas concentraciones se han asociado con mala prognosis en cáncer gástrico y de colon. Este marcador serológico es utilizado en pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal, gástrico, pancreático o biliar, y es esencial para monitorear respuesta clínica a terapia. En tanto MUC1, antes mencionada, se cuantifica en el ensayo conocido como determinación de CA15-3 en pacientes de cáncer de mama para monitorear respuesta a terapia y también detectar recurrencia de manera temprana.

Algunos de estos TACAS han sido utilizados en vacunas terapéuticas con el objeto de despertar la respuesta inmune antitumoral. Entre ellas se incluyen vacunas para cáncer de mama con blanco en O-glicanos truncados como Tn, STn y antígeno T presentes en mucinas, para el tratamiento de melanoma utilizando GM2 y GD3, y finalmente para cáncer de próstata basadas en el glicoesfingolípido Globo H. Las alteraciones en glicosilación observadas en glicoproteínas de origen

**TABLA 4.1.** LISTA DE BIOMARCADORES APROBADOS POR LA FDA USADOS ACTUALMENTE EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

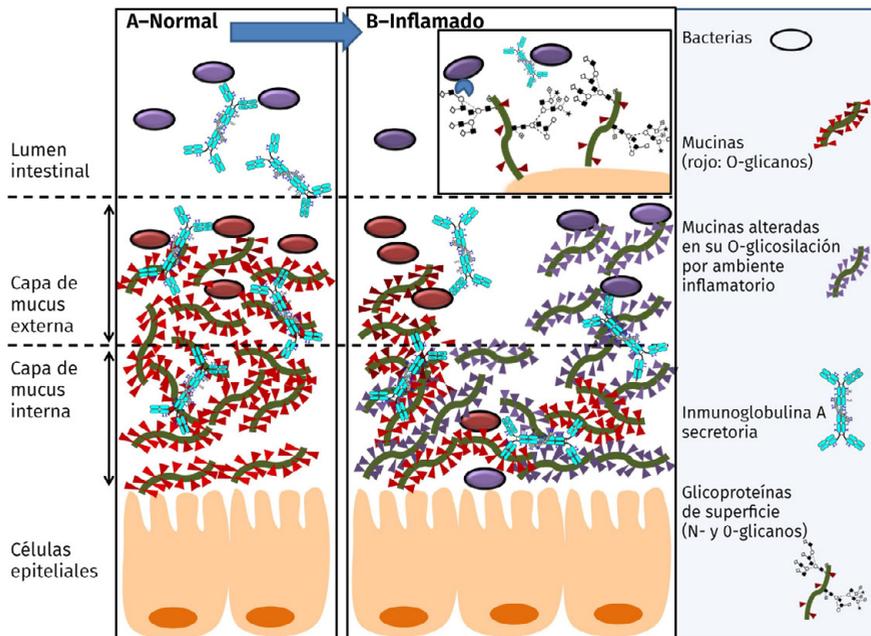
| <b>Marcador</b>              | <b>Nombre</b>                                                                                      | <b>Tipo de cáncer</b>                    | <b>Tipo de detección</b>                                         | <b>Aplicación clínica</b>                                         | <b>Año de aprobación por la FDA</b> |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| AFP                          | $\alpha$ -Fetoproteína                                                                             | Hígado                                   | Concentración de proteínas y fucosilación del core (para AFP-L3) | Diagnóstico, estadificación, detección de recurrencia y monitoreo | 1992/<br>2008                       |
| PSA, Pro2PSA                 | Antígeno prostático específico                                                                     | Próstata                                 | Concentración de proteínas                                       | Screening, discriminación de cáncer y enfermedad benigna          | 1986/<br>1994/<br>2012              |
| CA125 (MUC16)                | Antígeno de cáncer                                                                                 | Ovario                                   | Concentración de proteínas                                       | Detección de recurrencia y monitoreo                              | 1997/<br>2011                       |
| HE4 (FDC2)                   | Proteína epididimal humana 4                                                                       | Ovario                                   | Concentración de proteínas                                       | Detección de recurrencia y monitoreo                              | 2008                                |
| test OVA1 (varias proteínas) | $\beta$ -2 Microglobulina + CA12511 (sube), apolipoproteína A1 + prealbúmina + transferrina (baja) | Ovario                                   | Concentración de proteínas                                       | Predicción                                                        | 2009                                |
| Test ROMA                    | HE4 + CA125                                                                                        | Ovario                                   | Concentración de proteínas                                       | Predicción                                                        | 2011                                |
| CA15-3 (MUC1)                | Antígeno de cáncer 15-3                                                                            | Mama                                     | Oligosacáridos sialilados de unión O en MUC1                     | Monitoreo                                                         | 1997                                |
| CA27-29                      | Antígeno de cáncer 27-29                                                                           | Mama                                     | Concentración de MUC1                                            | Monitoreo                                                         | 2002                                |
| CA19-9                       | Antígeno de carbohidratos 19-9 o antígeno de cáncer 19-9                                           | Páncreas, ovario                         | SLe <sup>a</sup> en mucinas de glicoproteínas y gangliósidos     | Monitoreo                                                         | 2002                                |
| CEA                          | Antígeno carcinoembrionario                                                                        | Colon, estómago, páncreas, pulmón y mama | Concentración de proteínas                                       | Detección de recurrencia y monitoreo                              | 1985                                |
| HER2/neu                     | Receptor 2 del factor de crecimiento humano epidermal                                              | Mama                                     | Concentración de proteínas                                       | Elección de la terapia                                            | 1998                                |
| Tg                           | Tiroglobulina                                                                                      | Tiroides                                 | Concentración de proteínas                                       | Monitoreo                                                         | 1997                                |

no tumoral también han resultado en biomarcadores útiles para la clínica: un ejemplo paradigmático es la detección del aumento en *core*  $\alpha$ -1,6-fucosilación (1,6)-fucosilación sérica en pacientes con hepatocarcinoma celular, basada principalmente en el aumento de los N-glicanos *core*-fucosilados producido en -fetoproteína-L3 (AFP-L3). Esta glicofoma altamente (-1,6)-fucosilada está selectivamente asociada al tumor, y su detección por kit comercial en suero fue aprobado por la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos para el diagnóstico de esta enfermedad neoplásica; su uso se expandió rápidamente como alternativa o complemento al diagnóstico por imágenes.

Finalmente, diversos autores han postulado el uso de lectinas vegetales capaces de reconocer este glicoma aberrante para el diagnóstico temprano de neoplasia por imágenes, y posteriormente, para el delivery selectivo de terapias antitumorales. Un ejemplo es el uso de la lectina de *Sambucus nigra* inmovilizada en nanopartículas fluorescentes, ya que reconoce el siálico (-2,6) altamente expresado en células tumorales. Esta opción fue propuesta para cáncer de mama y para cáncer colorrectal.

#### **4.3. EL SISTEMA INTESTINAL COMO MUESTRA DE LA IMPORTANCIA DEL EJE GLICANOS-LECTINAS EN LA TOLERANCIA INMUNOLÓGICA**

El intestino es, sin duda, uno de los órganos con mayor complejidad a nivel glicobiológico. En el mismo encontramos no solo derivados de carbohidratos que provienen de nuestra dieta (polisacáridos como el almidón de origen vegetal, condroitín sulfato proveniente de la carne animal, y los oligosacáridos libres de leche, para nombrar algunos), sino también glicanos propios de las células intestinales, glicoconjugados que conforman el mucus que recubre el lado luminal del intestino (mucinas, inmunoglobulina A secretoria, etc.) y finalmente, aquellos glicoconjugados bacterianos que se exponen en la superficie de la microbiota intestinal (ya sean bacterias comensales o patogénicas, Figura 4.2). El sistema intestinal es dinámico e intrincado, y su constante exposición a antígenos externos requiere que el sistema inmune asociado a mucosas esté finamente regulado. Por un lado, debe inducir tolerancia contra antígenos alimentarios inocuos y microbiota comensal, pero por el otro y simultáneamente, montar respuestas adecuadas contra posibles patógenos para evitar enfermedades. La gruesa capa de mucus que recubre el tracto intestinal está compuesta mayoritariamente por mucinas, glicoproteínas que están compuestas por carbohidratos en un 80 % de su peso. Estos O-glicanos, de estructura X-GalNAc- $\alpha$ -O-Ser/Thr (donde X pueden ser diversos monosacáridos que dan lugar a diferentes estructuras *core* (ver Capítulo 2 y 6) son tan abundantes en mucinas que, de hecho, la clasificación estructural de los mismos responde al nombre O-glicanos *tipo mucina*. Es tal



**FIGURA 4.2.** GLICOBIOLOGÍA DEL COLON, Y SU ALTERACIÓN DURANTE EL PROCESO DE INFLAMACIÓN. A. ESQUEMA DEL COLON EN HOMEOSTASIS LAS CÉLULAS EPITELIALES ESTÁN RECUBIERTAS POR MUCUS, PRINCIPALMENTE COMPUESTO POR PROTEÍNAS ALTAMENTE O-GLICOSILADAS (MUCINAS) QUE ACTÚAN NO SOLO COMO BARRERA FÍSICA DE PROTECCIÓN FRENTE A BACTERIAS SINO COMO FUENTE DE CARBOHIDRATOS PARA AQUELLOS MICROORGANISMOS QUE PUEDEN COLONIZARLAS (ÓVALO ROJO). ALGUNAS BACTERIAS (ÓVALO VIOLETA) NO PUEDEN COLONIZAR, Y CONTINÚAN POR EL TRACTO INTESTINAL PARA LUEGO SER ELIMINADAS. SIGA, LA INMUNOGLOBULINA PREDOMINANTE EN MUCOSAS RECONOCE TANTO BACTERIAS COMENSALES COMO PATOGENICAS, DESATANDO UNA REACCIÓN INMUNE INFLAMATORIA SOLO EN EL CASO DE LAS ÚLTIMAS. B.- ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL COLON EN PROCESO INFLAMATORIO. LA BARRERA FÍSICA DE MUCUS DISMINUYE COMO CONSECUENCIA DE LA INFLAMACIÓN, PERMITIENDO QUE CIERTAS BACTERIAS LLEGUEN A CONTACTAR CON LAS CÉLULAS EPITELIALES Y DESATANDO EN CONSECUENCIA UNA RESPUESTA INMUNE. A SU VEZ, EL PROCESO INFLAMATORIO PUEDE MODIFICAR EL REPERTORIO DE MICROBIOTA INTESTINAL AL PRODUCIR ALTERACIONES EN LA GLICOSILACIÓN DE MUCINAS. EN EL RECUADRO SE OBSERVAN BACTERIAS UNIENDO LOS GLICANOS DEL HUÉSPED A TRAVÉS DE LECTINAS Y OTRAS INTERACTUANDO CON SIGA A TRAVÉS DE SUS GLICANOS

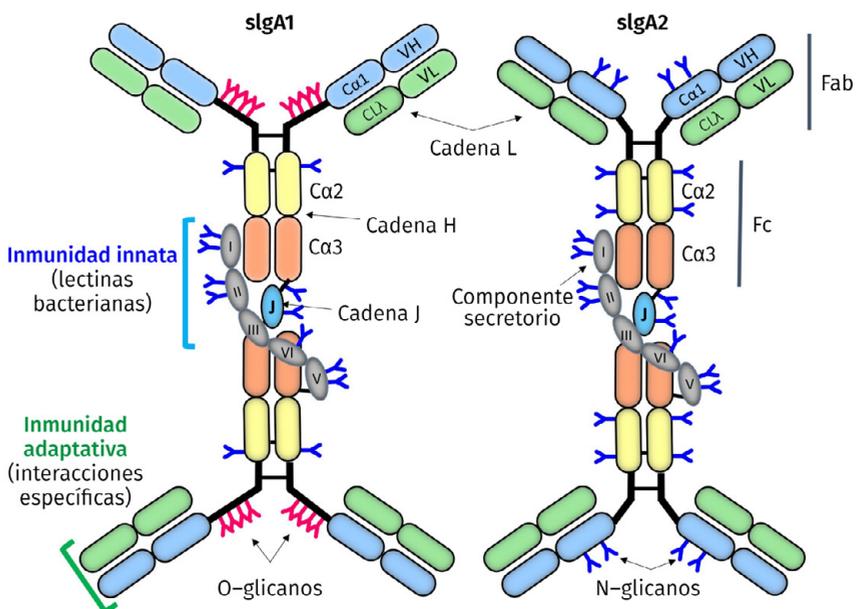
la importancia de esta barrera biofísica de mucus que se ha propuesto el concepto de *legislación por carbohidratos*, donde las estructuras de glicanos presentes en las mucinas del intestino determinan la capacidad de colonización de ciertas bacterias, y en consecuencia la composición de la microbiota intestinal. A su vez, los microorganismos también son parte de la renovación y degradación de esta barrera de mucus, ya que muchas bacterias poseen enzimas glicolíticas que degradan estos glicoconjugados en su beneficio.

En enfermedades inflamatorias intestinales (EII), como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, la función de las mucinas y su glicosilación ha sido ampliamente estudiada. Se ha demostrado que en mucinas intestinales de pacientes con colitis ulcerosa hay una expresión aumentada de O-glicanos inmaduros como STn, y que las formas de O-glicanos más extendidas, sulfatadas o sialiladas prácticamente desaparecen. Ya sea como causa o consecuencia de estas alteraciones estructurales en las mucinas, la microbiota de pacientes con EII se ve profundamente modificada por el proceso inflamatorio intestinal.

En estos pacientes no solo la estructura de los O-glicanos de mucinas se encuentra modificada: la barrera física que presenta el mucus es mucho más fina, y consecuentemente menos eficaz en evitar el contacto con la microbiota, la que puede entonces llegar hasta el epitelio y generar una respuesta inmune no deseada (Figura 4.2B). Como componente central del sistema inmune en mucosas se encuentra también la IgA secretoria (SIgA), el anticuerpo más abundante en el lumen intestinal y cuya función protectora se basa en el reconocimiento de patógenos entéricos y su discriminación de bacterias comensales. La SIgA es una macromolécula altamente glicosilada (Figura 4.3), y se ha postulado que mientras interacciona con microorganismos patógenos mediante su porción variable (Fab), la interacción con las comensales se daría mediante el reconocimiento de sus glicanos en la porción constante (Fc) o en el componente secretorio por lectinas de origen bacteriano. El recubrimiento de microorganismos comensales por SIgA en el intestino es parte de la educación del sistema inmune que se desarrolla en el neonato, asistiendo en el reconocimiento selectivo de los patógenos y favoreciendo la colonización de los comensales beneficiosos para el huésped como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. En neonatos donde el sistema inmune aún no está del todo desarrollado, la SIgA es proveída por la leche materna (Figura 4.3).

#### **4.3.1. Lectinas bacterianas: adhesinas como factores clave en adhesión e invasión**

La adherencia al mucus es una propiedad esencial para que las bacterias comensales puedan colonizar el intestino, y también el primer paso en la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas. Para asegurar su supervivencia, la mayor parte de los microorganismos que colonizan el intestino presentan varios mecanismos de adhesión mediados por factores bacterianos denominados adhesinas, muchos de los cuales son lectinas que se unen a glicoproteínas, glicolípidos o glicosaminoglicanos presentes en la superficie celular del huésped. Los factores de adhesión bacteriana suelen ser parte de los pili o fimbriae, finos apéndices similares a cabellos que recubren la superficie de las bacterias. Normalmente se componen de una unidad proteica repetitiva, y en su extremo más alejado de la superficie celular presentan una



**FIGURA 4.3.** ESTRUCTURA DE LAS DOS VARIANTES DE SIgA PRESENTES EN HUMANOS AMBAS SON HOMODÍMEROS, CON DOS CADENAS PESADAS (H) Y DOS CADENAS LIVIANAS (L) UNIDAS POR UNA CADENA J Y UN COMPONENTE SECRETORIO. CONTIENEN VARIOS SITIOS DE N-GLICOSILACIÓN EN LA CADENA PESADA Y EL COMPONENTE SECRETORIO. SIgA1 ES MAYORITARIA EN LA LUZ INTESTINAL A NIVEL DEL COLON Y POSEE UNA REGIÓN BISAGRA ENTRE LA PORCIÓN CONSTANTE (Fc) Y LA PORCIÓN VARIABLE (Fab) MÁS EXTENSA QUE SIgA2, PRESENTANDO ADEMÁS 5 SITIOS POSIBLES DE O-GLICOSILACIÓN. SE POSTULA QUE MIENTRAS EL FAB ESTÁ DIRECTAMENTE RELACIONADO CON LA INMUNIDAD ADAPTATIVA MEDIANTE EL RECONOCIMIENTO ESPECÍFICO DE ANTÍGENOS, LOS GLICANOS PRESENTES EN AMBAS ESTRUCTURAS ESTARÍAN INVOLUCRADOS EN LA INMUNIDAD INNATA POR EL RECONOCIMIENTO DE ESTOS A TRAVÉS DE LECTINAS DE ORIGEN BACTERIANO

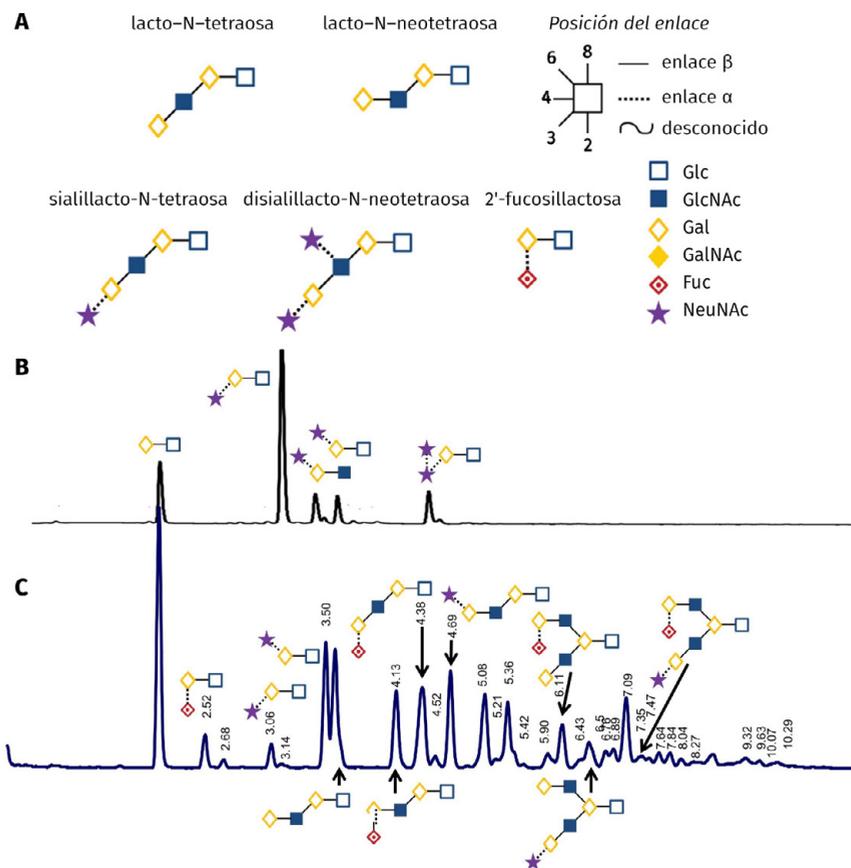
adhesina que media las interacciones con el huésped. Por ejemplo, ciertas cepas patógenas de *Salmonella* presentan pili que facilitan su adherencia a la mucosa intestinal humana, causando diarrea infecciosa. Los ligandos específicos a los que se unen las bacterias en las células animales se conocen como receptores de adhesina y son bastante variables; de hecho, el tropismo de ciertas bacterias por tejidos específicos (por ejemplo, sistema respiratorio versus sistema gastrointestinal) se define por el repertorio de pares receptor-adhesina expresados. En algunos casos, las bacterias expresan adhesinas que unen mucinas o glicoproteínas de matriz extracelular como fibronectina. En otros, la adhesión puede estar mediada por carbohidratos terminales o motivos internos en la estructura glicosídica, que pueden ser expuestos a

las adhesinas por la acción de glicosidasas específicas. También es posible encontrar lectinas bacterianas ancladas a membrana, como es el caso de *S. enterica serovar Typhi*, causante de la fiebre tifoidea en humanos: este microorganismo comienza su proceso de infección por invasión intracelular de células intestinales epiteliales, y el núcleo (*core*) externo del lipopolisacárido (LPS) de esta bacteria es esencial para el proceso de internalización en células epiteliales. La eliminación de carbohidratos clave en el núcleo de LPS reduce marcadamente la eficiencia de la invasión. Otro ejemplo es *Helicobacter pylori*, la causa de úlceras gástricas más común en humanos: su reconocimiento de glicopeptidos tipo Lewis B a través de la adhesina BabA hizo que recientemente se postulase la utilización de nanopartículas decoradas con estas glicoestructuras como terapia para la eliminación de este patógeno.

La SIgA, mencionada anteriormente, también es capaz de prevenir la adhesión de patógenos a las superficies epiteliales por competencia de interacción con sus propios glicanos, ya que en ambas isoformas humanas tanto la cadena pesada de SIgA como el componente secretorio de la misma están altamente glicosilados (Figura 4.3). Como estos glicanos son similares estructuralmente a aquellos en la cara luminal de las células epiteliales, se ha propuesto que la SIgA tanto libre como unida a bacterias puede actuar como inhibidor competitivo de la unión bacteria-epitelio. Por ejemplo, SIgA en concentraciones similares a las encontradas en leche materna humana inhibe la unión de la toxina A de *Clostridium difficile* a sus receptores epiteliales por interacción con los residuos de galactosa y ácido siálico presentes en el componente secretorio (Figura 4.3). Además, y si bien es lógico pensar que la SIgA ha evolucionado con la función de reconocer los microorganismos patógenos a través de la región variable, en los últimos años se ha demostrado que más del 70 % de las bacterias comensales se encuentran recubiertas por SIgA, pero su interacción en muchos casos es vía glicanos. En este sentido, se ha propuesto que las interacciones entre los glicanos de SIgA y las bacterias comensales son uno de los mecanismos por los que controla la homeostasis intestinal (Figura 4.3).

#### **4.3.2 Oligosacáridos libres en leche materna en la colonización intestinal temprana y en el control del establecimiento de microbiota en neonatos**

En el desarrollo neonatal de mamíferos, la madre provee una parte importante del estímulo ambiental en la forma de leche materna, uno de los fluidos biológicos más complejos que provee nutrientes, compuestos protectores y factores de desarrollo y crecimiento. El efecto protector de la leche materna va más allá del período de lactancia, por lo que se ha postulado que modula las funciones de inmunidad y barrera de mucosas a largo plazo, pero con un mecanismo aún en estudio. Claramente, la primera diferencia es el



**FIGURA 4.4.** COMPARACIÓN ESTRUCTURAL ENTRE LOS OLIGOSACÁRIDOS LIBRES EN LECHE MATERNA Y LECHE BOVINA ESTRUCTURAS DE OLIGOSACÁRIDOS REPRESENTATIVOS PRESENTES EN LECHE, INCLUYENDO LACTO-N-TETRAOSA Y LACTO-N-NEOTETRAOSA (NEUTROS), 2'-FUCOSILLACTOSA (NEUTRO FUCOSILADO), SIALILLACTO-N-TETRAOSA Y DISIALILLACTO-N-NEOTETRAOSA (SIALILADOS CON UNA O DOS CARGAS NEGATIVAS, RESPECTIVAMENTE). **B.** CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LA EXTRACCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS LIBRES EN LECHE BOVINA, DERIVATIZACIÓN CON 2-AMINOENZAMIDA Y SEPARACIÓN POR MATRIZ HIDROFÍLICA (HILIC-FLR). SE IDENTIFICAN EN CADA PICO LAS ESTRUCTURAS MAYORITARIAS PRESENTES. **C.** CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LA EXTRACCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS LIBRES EN LECHE MATERNA, DERIVATIZACIÓN CON 2-AMINOENZAMIDA Y SEPARACIÓN POR MATRIZ HIDROFÍLICA (HILIC-FLR). SE SIMBOLIZAN SOLO ALGUNAS DE LAS 100 ESTRUCTURAS IDENTIFICADAS EN LECHE MATERNA. EN ESTE PANEL SE PUEDE OBSERVAR COMO, COMPARADO AL CROMATOGRAMA B, LAS ESTRUCTURAS PRESENTES EN LECHE MATERNA SON MUCHO MÁS COMPLEJAS Y VARIADAS

establecimiento de la microbiota intestinal, que se ha demostrado distinta entre niños alimentados con leche materna y con formulaciones artificiales a partir de leche bovina comercial.

Dentro de la compleja composición de la leche, una buena proporción son los oligosacáridos libres en leche (oLL), donde cada especie de mamífero a través de un proceso evolutivo ha seleccionado estructuras de glicanos libres que resultan de la adaptación a las necesidades de cada animal. En leche materna humana, estos oligosacáridos se encuentran en una concentración aproximada de 10–15 g/L lo que, considerando su bajo peso molecular, los hace extremadamente abundantes. Generalmente las estructuras presentes son derivados del disacárido lactosa, con considerable variación estructural dependiente de la especie animal y particularmente en el caso de la leche materna humana, con dependencia del background genético y étnico, incluyendo la expresión de grupos sanguíneos. Los oligosacáridos se pueden clasificar en neutros no fucosilados, neutros fucosilados y cargados sialilados, donde los últimos contienen estructuras neutras y neutras fucosiladas decoradas con ácido siálico en diferentes proporciones (Figura 4.4A). En leche humana materna todos estos grupos están representados, mientras que la leche de animales domésticos (bovina, de cabra, de oveja) presenta estructuras más simples y menos fucosiladas (Figuras 4.4B y 4.4C).

Al ser carbohidratos, inicialmente se creyó que tenían propiedades nutricionales, pero se ha demostrado que la mayoría de los mismos prácticamente no se degradan en su pasaje por el tracto intestinal. El perfil de oLL se demostró muy similar en leche materna y en heces de infantes, salvo por pequeñas diferencias en porcentaje de abundancia. Sin embargo, esto parece depender de la estructura específica de los oLL, ya que por ejemplo la lacto-N-tetraosa disminuye considerablemente en heces, y 50 % de las heces de infantes analizadas no presentan sialilacto-N-tetraosa o disialilacto-N-neotetraosa (Figura 4.4A). Se ha postulado que del total de los oLL ingeridos y no recuperados en heces, una buena parte es fermentada por microbiota, mientras que otra parte pasaría a nivel sistémico vía la barrera epitelial y con una potencial función inmunomoduladora, pero los estudios a este nivel son aún escasos. Hoy sabemos que los oLL son un factor clave de protección innata. Los oLL controlan de manera indirecta el establecimiento de la microbiota intestinal en el neonato, favoreciendo ciertas especies bacterianas comensales necesarias para degradar los alimentos en favor de la nutrición del neonato. Un ejemplo es el género *Bifidobacterium*, ya que las bacterias de este grupo fermentan estos oligosacáridos como parte de su proceso metabólico natural. Estas bacterias lácticas son una de las primeras en colonizar el tracto gastrointestinal humano, y su genoma contiene un arreglo de genes muy abundante para el metabolismo de carbohidratos. Es más: algunas especies muestran un genoma especializado para la degradación de oligosacáridos libres en leche. De hecho, los oLLs con N-acetilglucosamina en

su estructura fueron inicialmente conocidos como «factor bifidus», un factor clave para la colonización del tracto intestinal por Bifidobacteria. Estos datos sugieren que los OLL promueven determinadas especies de *Bifidobacterium* liberando N-acetilglucosamina, ácido siálico y fucosa, y que estos monosacáridos no solo sirven al huésped como fuente de carbono sino también a otras bacterias de la microbiota intestinal, ayudando a un balance en las poblaciones que componen el microbioma del huésped.

Desde hace varias décadas estudios independientes demostraron una fuerte asociación entre el amamantamiento y la disminución en los casos de diarrea y enfermedades respiratorias, hecho que puede ser parcialmente atribuido a la potencial acción competitiva de los OLL. Estos glicanos libres, cuyas estructuras se asemejan a aquellas con las que microorganismos patógenos interactúan, compiten con los glicanos naturales del sistema intestinal en los procesos de adhesión, colonización y/o invasión. Al ser oligosacáridos solubles, los microorganismos no pueden adherirse a las mucinas o a la superficie celular y son eliminados. Particularmente, las estructuras derivadas de la 2'-fucosilactosa (Figura 4.4) han demostrado ser un factor de protección innato transmitido al infante vía la leche materna, siendo eficaz en la disminución de la invasión de células epiteliales humanas por *Campylobacter jejuni*, agente causante de diarrea. Diversos OLL fucosilados también disminuyen la adherencia de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), uno de los microorganismos causantes de diarreas severas en infantes. La lacto-N-neotetraosa (Figura 4.4A) demostró poseer una actividad biológica similar.

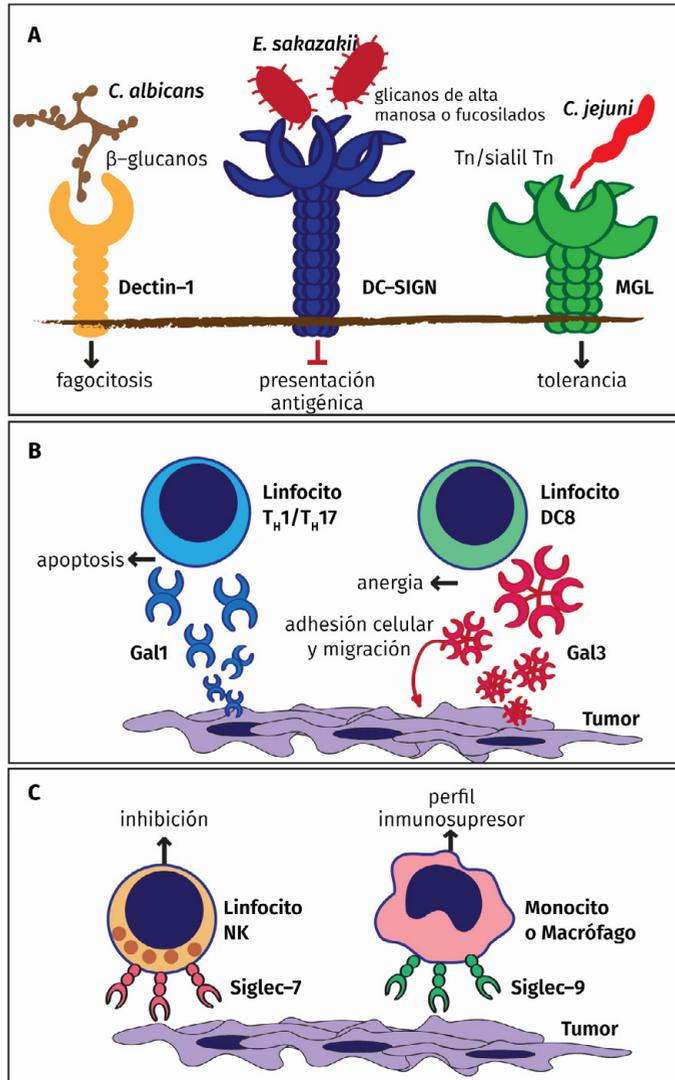
#### **4.3.3. El otro lado de la moneda: las lectinas del huésped como factor clave en la regulación de la respuesta inmune**

Las familias de lectinas en humanos se dividen en tres grandes grupos: Lectinas de tipo C (debido a que son calciodependientes), Galectinas (lectinas solubles con afinidad por derivados de lactosa, Gal(1,4)-Glc) y Siglecs (del inglés, *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*, lectinas tipo inmunoglobulina que unen ácido siálico). Las familias de lectinas se clasifican según la estructura primaria y secundaria del dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC), aunque pueden variar en la estructura glicosídica por la que presentan afinidad. Su funcionalidad también es muy variada, y en esta sección describiremos algunas de ellas focalizando en sus funciones en el sistema inmune en respuesta a microorganismos intestinales (lectinas de tipo C) y al desarrollo tumoral (Siglecs/Galectinas).

#### 4.3.4. Inducción de la respuesta inmune por Lectinas de tipo C: ¿ataque o tolerancia?

Las lectinas tipo C poseen funciones muy relevantes a nivel inmune, actuando como receptores de adhesión y señalización. DC-SIGN (del inglés *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule -3- Grabbing Nonintegrin*) es una lectina presente en la superficie de células inmunes que reconoce glicanos de alta Man o fucosilados presentes en microorganismos patógenos (por ejemplo, *Enterobacter sakazakii*, cuya presencia en fórmulas de leche para neonatos es una de las causas más frecuentes de meningitis y enterocolitis necrotizante). Si bien se esperaría que el reconocimiento de estas estructuras por DC-SIGN en las células dendríticas (células especializadas en la captura, procesamiento y presentación de antígeno a linfocitos T) provoque la activación de la respuesta inmunológica y la eliminación de los microorganismos patógenos, *E. sakazakii* es un ejemplo de cómo una bacteria puede tomar ventaja de la actividad inmunomoduladora de DC-SIGN y utilizarla para su propio beneficio. Esta bacteria evita la presentación de antígenos a las células T y de ese modo asegura su supervivencia dentro de las células dendríticas, asegurando un nicho de reproducción y la bacteremia suficiente para luego cruzar la barrera hematocefálica, causando meningitis (Figura 4.5A). Las interacciones de DC-SIGN no se limitan al reconocimiento de microorganismos patógenos, sino que también involucra probióticos. Los efectos beneficiosos de los probióticos incluyen el control de la inflamación intestinal, como la que se observa en enfermedades como Crohn o colitis ulcerosa, pero los mecanismos no han sido del todo esclarecidos. En el caso de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus casei*, dos probióticos de amplio uso, se ha demostrado que los mismos inducen la producción de linfocitos T regulatorios (una población linfocitaria que controla la inflamación) vía unión a DC-SIGN, generando un estado de tolerancia e inmunomodulación positiva. Finalmente, DC-SIGN funciona como receptor clave de la SIgA, asistiendo a la vigilancia inmunológica en mucosas.

Otro miembro de esta familia es Dectin-1, una lectina con afinidad por  $\beta$ -glucanos producidos por hongos, por ejemplo, *Candida albicans*, un hongo presente en el fungoma intestinal de manera corriente en humanos, pero que frente a un estado de inmunosupresión como el que se presenta en personas transplantadas o pacientes con cáncer puede tornarse patógeno (Figura 4.5A). La unión de esta lectina a su ligando en la superficie del patógeno provoca la fagocitosis de este, y se ha demostrado que ratones deficientes en Dectin-1 tienen menor sobrevivencia y mayor cantidad de órganos infectados después de ser inyectados con *C. albicans*, remarcando su importancia. Además, se ha demostrado que Dectin-1 es un receptor que reconoce los glicanos de la cadena pesada de SIgA para su transcitosis reversa, un proceso por el cual este anticuerpo unido a bacterias es transportado desde la luz intestinal a través del epitelio proveyendo información



**FIGURA 4.5.** EJEMPLOS DE INTERACCIONES CLAVE PARA LECTINAS DE TIPO C, SIGLECS Y GALECTINAS. **A.** LECTINAS TIPO C. DC-SIGN SE EXPRESA EN LA SUPERFICIE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y RECONOCE GLICOEPITOPES DE AGENTES INFECCIOSOS COMO *E. SAKAZAKII*, EN ESTE CASO LA BACTERIA IMPIDE LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA POR PARTE DE LA CÉLULA DENDRÍTICA. DECTIN-1 UNE ESPECÍFICAMENTE B-GLUCANOS PRESENTES EN LAS PAREDES CELULARES DE HONGOS COMO *C. ALBICANS* Y PROMUEVE LA LA FAGOSITOSIS DE LOS MISMOS. MGL RECONOCE A *C. JEJUNI* A TRAVÉS DE LAS TERMINALES N-ACETILGALACTOSAMINA DEL LPS FAVORECIENDO LA DIFERENCIACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA HACIA UN PERFIL TOLEROGÉNICO. **B.** GALECTINAS. GAL1 INDUCE LA APOPTOSIS SELECTIVA DE LINFOCITOS T EFECTORES DE LAS SUBPOBLACIONES  $T_H1$  Y  $T_H17$ . GAL3 TAMBIÉN CONTRIBUYE A FAVORECER UN MICROAMBIENTE TUMORAL INMUNOTOLERANTE FAVORECIENDO LA ANERGIA DE LINFOCITOS T CD8 QUE INFILTRAN TUMORES. **C.** SIGLECS. SIGLEC-7 EJERCE UN ROL CRUCIAL EN EL ESCAPE TUMORAL POR INHIBICIÓN DE CÉLULAS NK. SIGLEC-9 GENERA LA POLARIZACIÓN DE MONOCITOS Y MACRÓFAGOS HACIA UN PERFIL INMUNOSUPRESOR

a las células presentadoras de antígeno, que activan la respuesta inmune en caso de ser necesario. De este modo, los glicanos de SIgA son clave en el proceso de desencadenamiento de la respuesta inmune (en el caso de patógenos) o mantenimiento de la tolerancia (en el caso de comensales). Finalmente, otra lectina que pertenece a esta familia es MGL (del inglés, *Macrophage Galactose-type C-type Lectin*). Esta lectina presenta afinidad por estructuras truncadas de O-glicanos, Tn y STn. La funcionalidad inmunológica de MGL es muy diversa, e incluye el reconocimiento de microorganismos patógenos como *Campylobacter jejuni*, pero en vez de desencadenar una respuesta antimicroorganismo *C. jejuni* aprovecha la actividad inmunomoduladora de MGL, produciendo una respuesta inmunológica tolerogénica y favoreciendo su supervivencia (Figura 4.5A).

#### **4.3.5. Siglecs y Galectinas como agentes proescape tumoral**

Las galectinas son proteínas capaces de reconocer residuos de N-acetilacetilactosamina (Gal (1,4)GlcNAc, LacNAc) presentes en diferentes glicoconjugados de la superficie celular. Si bien los miembros de esta familia comparten propiedades estructurales y funcionales que los unen, entre los mismos se han descrito sutiles preferencias de afinidad por diversos derivados de LacNAc según los mismos se encuentren decorados con fucosa o siálico, entre otros. Las galectinas han demostrado un papel clave en la modulación del sistema inmune a distintos niveles, y particularmente en el caso de enfermedades neoplásicas, su papel modulador en eventos como la tumorigénesis y/o metástasis las han hecho atractivos blancos terapéuticos. Por ejemplo, estas lectinas son capaces de inducir la apoptosis de linfocitos T efectores, contribuyendo al ambiente tolerogénico y al escape tumoral. Entre los miembros de esta familia, dos de los más estudiados son Galectina-1 (Gal1) y Galectina-3 (Gal3).

Gal1 es una lectina con afinidad por unidades de LacNAc terminales que no se encuentren (2,6)-sialiladas. Esta galectina se encuentra sobre-expresada en casi todos los tipos tumorales y posee un papel clave en el escape tumoral, ya que media la apoptosis de linfocitos T efectores  $T_H1$  y  $T_H17$  a partir su unión selectiva al glicoma de superficie de los mismos. De este modo, Gal-1 promueve el desarrollo neoplásico, ya que al eliminar los linfocitos T responsables de reconocer y atacar el tumor, esta lectina asiste al ambiente de tolerancia requerido para su desarrollo (Figura 4.5B).

De manera similar a Gal1, Gal-3 favorece distintos aspectos de la biología tumoral como la adhesión celular, la migración, e inclusive puede mediar la resistencia a apoptosis tumoral inducida por agentes quimioterapéuticos. Si bien posee afinidad por diversos glicoantígenos, Gal3 reconoce Gal $\beta$ (1,3)GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr (antígeno T, Figura 4.1) con alta afinidad, uno de los TACAS con más frecuencia de expresión en diversos tumores. Esta interacción

Gal3- antígeno T ejerce roles importantes en el proceso metastásico ya que afecta los estadios iniciales de la adhesión endotelio-célula tumoral. Además, Gal3 también puede contribuir a la tolerancia necesaria para el desarrollo del tumor ya que modula la actividad inmune antitumoral mediante diversos mecanismos, entre ellos, el control de los linfocitos T CD8 antitumorales (Figura 4.5C).

Finalmente, el incremento de sialilación se ha descrito como una característica de la célula tumoral (ver sección 2 de este capítulo). Las siglecs, también conocidas como lectinas de tipo I, son proteínas de membrana afines a ácido siálico. Las Siglecs son capaces de inhibir la respuesta inmune tanto por unión a sialoglicoconjugados expresados en las mismas células inmunes que las producen, como por respuesta a ligandos exógenos. Con funciones tanto en inmunidad innata como adaptativa, su interacción con glicanos sialilados en el microambiente tumoral ha sido solo parcialmente estudiada, pero generalmente presentan un papel protumorigénico ya que inhiben la respuesta antitumoral. A modo de ejemplo, Siglec-7 es capaz de evitar el ataque de células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killers*) al tumor, favoreciendo el desarrollo neoplásico. Finalmente, Siglec-9, una lectina con afinidad preferencial por glicopeptidos de ácido siálico con unión 2,3 a Gal, puede interactuar con MUC1 (una mucina de membrana altamente O-glicosilada, sobreexpresada en tumores y glicosilada de manera aberrante en los mismos (ver sección 2 de este capítulo) y de este modo, promover un ambiente protumorigénico. Siglec-9 es expresada en monocitos y macrófagos, y al interactuar con las formas de MUC1 altamente sialiladas producidas por las células tumorales, educa a estas células en un perfil inmunosupresor para así inducir la inhibición de la respuesta inmune y en consecuencia, el desarrollo tumoral (Figura 4.5C).

En síntesis, y como se ha detallado mediante diversos ejemplos en este capítulo, la glicobiología es una disciplina científica transversal que puede aportar no solo al conocimiento general, sino a la comprensión de los mecanismos de modulación de la respuesta inmune, las interacciones huésped-patógeno y el desarrollo neoplásico. Su exploración requiere de un abordaje multidisciplinario que involucra la utilización de las nuevas tecnologías estructurales desarrolladas para la caracterización de glicoconjugados, y la interpretación funcional de esos datos en un contexto fisiopatológico. Sin dudas, la glicobiología como campo de estudio seguramente se expandirá y realizará grandes aportes al área clínica en los años venideros.

#### **4.4. RESUMEN**

La caracterización estructural y funcional de la glicosilación como proceso celular de modificación postraduccional de proteínas ha surgido como área de alto interés industrial, principalmente a partir del cambio de paradigma

que se produjo con la producción recombinante de bioterapéuticos. Sin embargo, la funcionalidad biológica del glicoma (conjunto de glicoconjugados presentes en un determinado tipo celular, tejido u organismo) lleva ya muchos años en estudio, y ha demostrado ser clave en el contexto de salud y enfermedad humana. La variabilidad estructural del glicoma es controlada y exquisitamente regulada por factores genéticos y ambientales y, en consecuencia, este funciona como una carta de presentación y comunicación celular, donde las alteraciones del mismo (ya sean causa o consecuencia de un proceso patológico) pueden desencadenar diversas respuestas biológicas. La evolución ha generado familias de proteínas con dominios de reconocimiento de carbohidratos (lectinas) que se especializan en la decodificación de la información contenida en el glicoma, haciendo que el eje lectinas-glicoma participe en una amplia variedad de procesos de comunicación célula-célula. La doble vía de comunicación que se establece como consecuencia del reconocimiento de glicanos es decisiva para el funcionamiento del sistema inmune: en un modelo simplificado, la respuesta inmunológica puede entenderse como el resultado del reconocimiento y discriminación de aquello que es propio y debe ser tolerado, en oposición a aquello que es ajeno y debe ser controlado o eliminado. El papel del glicoma como mediador clave en procesos fisiológicos y patológicos es justamente el centro de atención de este capítulo.

Centralizaremos el análisis en dos áreas de estudio: en primer lugar, se discutirá la glicosilación aberrante como una característica distintiva de la célula tumoral, y se demostrará su asociación con diferentes procesos biológicos e inmunológicos que, en líneas generales, promueven el crecimiento y escape tumoral. En segundo lugar, se describirán ejemplos de cómo funciona el eje lectinas-glicoma en el sistema intestinal, y su influencia sobre el establecimiento de la microbiota y la homeostasis inmune.

## Referencias bibliográficas

- CAGNONI, A. J., PÉREZ SÁEZ, J. M., RABINOVICH, G. A., & MARIÑO, K. V.** (2016). Turning-off signaling by siglecs, selectins, and galectins: chemical inhibition of glycan-dependent interactions in cancer. *Front. Oncol*, 6, 109. 10.3389/fonc.2016.00109
- FRASCHILLA, I. & PILLAI, S.** (2017). Viewing Siglecs through the lens of tumor immunology. *Immunol. Rev.*, 276(1), 178–191. 10.1111/imr.12526
- HARVEY, D. J., MERRY, A. H., ROYLE, L., CAMPBELL, M. P., DWEK, R. A. & RUDD, P. M.** (2009) Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of N- and O-linked carbohydrates and related compounds. *Proteomics*, 9(15), 3796–801. 10.1002/pmic.200900096
- KIRWAN, A., UTRATNA, M., O'DWYER, M. E., JOSHI L. & KILCOYNE M.** (2015). Glycosylation-Based Serum Biomarkers for Cancer Diagnostics and Prognostics. *Biomed. Res. Int.*, 490531. 10.1155/2015/490531
- MANTIS, N. J., ROL, N. & CORTHÉSY, B.** (2011). Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunology*, 4, 603–611. 10.1038/mi.2011.41
- MARIÑO, K. V., SALDOVA, R., ADAMCZYK, B. & RUDD, P. M.** (2012). Changes in Serum N-Glycosylation Profiles: Functional Significance and Potential for Diagnostics. *Carbohydr. Chem.*, 37, 57–93.
- MARIÑO K., BONES J., KATTLA J. J. & RUDD P. M.** (2010). A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nature Chemical Biology*, 6, 713–23. 10.1038/nchembio.437
- MAYER, S., RAULF, M. R. & LEPENIES, B.** (2017) C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity. *Histochem Cell Biol*, 147(2), 223–237. 10.1007/s00418-016-1523-7
- MÉNDEZ-HUERGO, S. P., BLIDNER, A. G. & RABINOVICH, G. A.** (2017). Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. *Curr. Opin. Immunol.*, 45, 8–15. 10.1016/j.coi.2016.12.003
- PINHO, S. S. & REIS, C. A.** (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15, 540–555. 10.1038/nrc3982
- POOLE, J., DAY, C. J., VON ITZSTEIN, M., PATON, J. M. & JENNINGS, M. P.** (2018). Glycointeractions in bacterial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 440–452. 10.1038/s41579-018-0007-2
- VARKI, A.** (2017) Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27(1), 3–49. 10.1093/glycob/cww086
- VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., ET AL.** (2015–2017). *Essentials of Glycobiology* [online]. 3rd. edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.