

Revisión

La glicosilación diferencial de vasos sanguíneos regula la sensibilidad de tumores al tratamiento anti-angiogénico (Differential glycosylation of tumor-associated vessels dictates sensitivity to anti-angiogenic treatment)

Por **Diego Omar Croci** y **Gabriel Adrián Rabinovich**

gabyrabi@gmail.com

Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET.

Resumen:

Existe actualmente un debate intenso acerca de los mecanismos moleculares que limitan la eficacia de terapias anti-angiogénicas en cáncer. Resultados recientes de nuestro laboratorio demostraron que las interacciones entre Galectina-1 (Gal1) y N-glicanos complejos presentes en el receptor de crecimiento endotelial tipo 2 (VEGFR2) compensan por la ausencia del factor de crecimiento endotelial (VEGF) y preservan la angiogenesis tumoral durante las terapias de bloqueo de este factor. De este modo, la interrupción de dichas interacciones contribuye a incrementar la sensibilidad a la terapia anti-VEGF y permite potenciar la respuesta inmune a través de la normalización de la vasculatura tumoral.

Abstract:

There is currently an intense debate on the mechanisms that contribute to limit the efficacy of anti-angiogenic therapies in cancer. Recent findings from our laboratory revealed that interactions between Galectin-1 (Gal-1) and complex N-glycans present in vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) compensate for the absence of vascular endothelial growth factor (VEGF) and preserve tumor angiogenesis in VEGF-targeted therapies. Thus, interruption of Gal1-N-glycan interactions may contribute to increase the efficacy of anti-VEGF therapies and to potentiate immune responses through normalization of tumor-associated blood vessels

Palabras clave

Galectina-1; Angiogenesis; Glicosilación; Cáncer

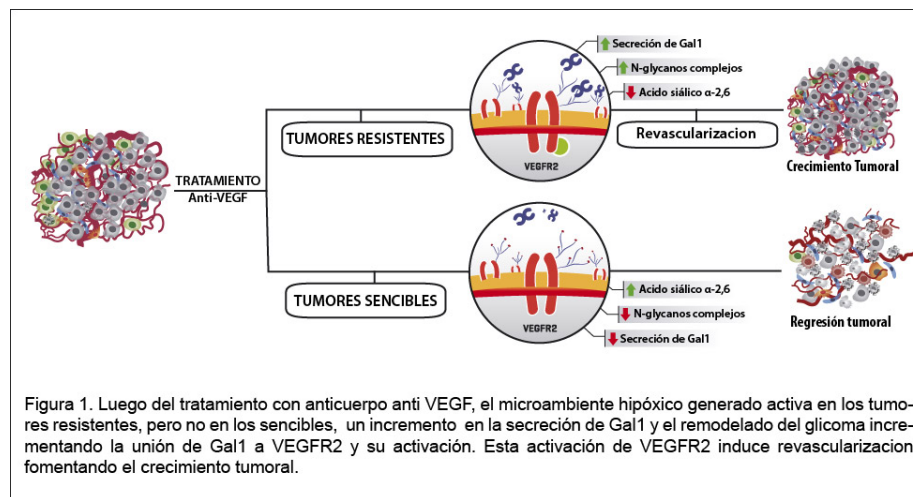


Figura 1. Luego del tratamiento con anticuerpo anti VEGF, el microambiente hipóxico generado activa en los tumores resistentes, pero no en los sensibles, un incremento en la secreción de Gal1 y el remodelado del glicoma incrementando la unión de Gal1 a VEGFR2 y su activación. Esta activación de VEGFR2 induce revascularización fomentando el crecimiento tumoral.

En la década de 1970, Judah Folkman, hoy considerado padre de la angiogénesis tumoral, postuló la hipótesis que sentencia que virtualmente todos los tumores sólidos necesitan generar vasos sanguíneos (angiogénesis) para progresar y crecer más allá de unos pocos milímetros (1). Esta idea, retomada en los años 80 inspiró una extensa búsqueda de mediadores moleculares involucrados en la generación de angiogénesis con el fin de bloquearlos para generar una efectiva terapia antitumoral. La idea era simple pero muy robusta, y en 2004 tuvo su punto culmine cuando la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos aprobó la utilización del primer agente antitumoral basado en el bloqueo de la angiogénesis: el anticuerpo bloqueante del factor de crecimiento endotelial (VEGF) ó Bevacizumab (2).

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor VEGFR2 son los principales actores de la vía de señalización y sobrevida más importante en células endoteliales (CE) y en conjunto con otros mediadores orquestan la angiogénesis tanto fisiológica como patológica (2).

El bloqueo de la señalización de VEGFR2 demostró importantes beneficios terapéuticos en una variedad de tumores como carcinoma colorectal, carcinoma renal y hepatocarcinoma (2). No obstante, los beneficios terapéuticos son variables y eventualmente los tumores desarrollan resistencia al tratamiento reiniciando el crecimiento de tumores o desarrollando metástasis agresivas, sugiriendo la presencia de mecanismos compensatorios que de algún modo frustran el bloqueo de VEGF limitando la eficacia de dicha terapia (3).

La glicosilación es un proceso enzimático altamente regulado responsable de la creación de estructuras de glicanos ancladas a proteínas (glicoproteínas) o lípidos (glicolípidos) (3). Hoy sabemos que estas estructuras sacarídicas, lejos de ser decorativas, codifican información crítica para la supervivencia, señalización y homeostasis celular (4). La responsabilidad de decodificar esta información recae en las lectinas – proteínas que reconocen carbohidratos- las cuales traducen la información estructural de glicanos de superficie en información biológica. Recientes hallazgos revelan que el constante “remodelado” de los glicanos de la superficie celular controla una gran variedad de procesos fisiológicos al crear o eliminar estructuras que son ligandos específicos de diferentes lectinas

(5) actuando como sintonizadores de respuestas biológicas.

Galectina-1 (Gal1) es una lectina proto-típica de la familia de las galectinas, muy conservadas evolutivamente, y caracterizadas por su capacidad de reconocer unidades múltiples de N-acetilactosamina [LacNAc; Gal β 1-4GlcNAc] (4). La expresión de Gal1 predomina en una gran variedad de tumores humanos y murinos y su expresión se halla regulada por la disminución de la concentración de oxígeno (hipoxia) que controla el ambiente tumoral (6). La presencia de esta lectina endógena ha sido asociada a diversos procesos involucrados en la progresión tumoral incluidos el escape del sistema inmune (7,8), la migración tumoral y metástasis (9) y la angiogénesis (10).

En un reciente volumen de la revista *Cell* (11) identificamos un nuevo mecanismo de escape a la terapia anti-angiogénica basado en la glicosilación diferencial de vasos sanguíneos asociados a tumores refractarios o sensibles a la terapia anti-VEGF. Este mecanismo mimetiza la señalización de VEGF y preserva la angiogénesis tumoral en tumores refractarios a la terapia anti-VEGF. Puntualmente encontramos que Gal1 se une a N-glicanos complejos anclados a VEGFR2 en los dominios Ig3, Ig4 e Ig7 responsables de la estabilización, activación y dimerización del receptor. Esta unión, favorecida en situaciones de inmunosupresión e hipoxia, desencadena la activación de la vía de señalización intracelular de VEGFR2 (incluyendo las vías dependientes de Erk1/2 y PI3K/Akt) e induce proliferación y morfogénesis endotelial, promoviendo angiogénesis aberrante en el microambiente tumoral.

En una serie de experimentos *in vivo* en ratones inoculados con tumores resistentes o no al tratamiento anti-VEGF observamos que este tratamiento modula la glicosilación de células endoteliales asociadas a dichos tumores. Particularmente, vasos sanguíneos asociados a tumores refractarios a la terapia anti-VEGF presentaron niveles incrementados de estructuras sacarídicas ricas en N-glicanos complejos y niveles reducidos de ácido siálico en posición α 2,6, favoreciendo de este modo una mayor exposición de ligandos para Gal1. Por el contrario, en tumores sensibles, el tratamiento indujo un aumento de la presencia de ácido siálico terminal en glicanos complejos, lo cual logró suprimir la unión de Gal1. Más aún, tumores refractarios secretaron niveles superiores de Gal1 *in vivo* en respuesta al tratamiento anti-VEGF. Esta reprogramación del glicoma de células endoteliales en situaciones de

hipoxia o tratamiento anti-VEGF, favorecería la interacción de galectina-1 con ligandos específicos en VEGFR2 favoreciendo la revascularización y promoviendo así mecanismos de resistencia a terapias anti-angiogénicas.

En este sentido, cuando inoculamos tumores refractarios en ratones deficientes genéticamente para la enzima MGAT5, responsable de crear ligandos para Gal1, dichos tumores incrementaron la sensibilidad al tratamiento anti-VEGF. Del mismo modo, el silenciamiento de Gal1 en tumores mediante estrategias de shRNA, logró eliminar la resistencia de estos tumores a dichas terapias. Por otro lado, la deficiencia en ST6GAL1, enzima capaz de transferir ácido siálico en posición $\alpha 2,6$ en células endoteliales logró convertir tumores sensibles en refractarios a la terapia anti-VEGF. En resumen, demostramos que la glicosilación diferencial del endotelio vascular modula en forma selectiva la sensibilidad de tumores a la terapia anti-VEGF.

A los fines de extrapolar nuestros resultados al escenario clínico, validamos los beneficios terapéuticos de un anticuerpo monoclonal bloqueante de la interacción entre Gal1 y N-glicanos (F8.G7 mAb) (10). En este sentido, nos interesó explorar la capacidad de este anticuerpo de prevenir la angiogénesis compensatoria en aquellos tumores en los cuales la eficacia del tratamiento anti-VEGF era limitada. La disrupción de las interacciones entre Gal1 y N-glicanos *in vivo* indujo no sólo un efecto anti-angiogénico clásico al día 6-7 post-tratamiento, pero además generó un marcado remodelado de la vasculatura tumoral en periodos más tempranos (día 4-5 post-tratamiento). Este efecto fue evidenciado principalmente por una reducción del diámetro vascular medio, una mayor presencia de pericitos maduros y una menor heterogeneidad de la red vascular en tumores tratados con el F8.G7 mAb respecto al tratamiento con el anticuerpo control de isotipo. Estos cambios morfológicos y funcionales de la vasculatura tumoral inducidos por el bloqueo de Gal1 o por la disrupción de N-glicanos complejos influyeron en forma causal en la disminución de fenómenos de hipoxia y mayor influjo de células T antitumorales al microambiente tumoral. Más aún, la administración terapéutica del anticuerpo monoclonal anti-Gal1 a ratones portadores de tumores logró inducir una mayor activación de células T, incrementar la secreción de citoquinas antitumorales como IFN- γ e IL-17 y disminuir la secreción de la citoquina tolerogénica IL-10 en ganglios drenantes al tumor.

Este efecto, que redundó en una disminución del crecimiento tumoral, se reprodujo en ratones deficientes en la glicosiltransferasa MGAT5 poniendo en relieve la importancia de N-glicanos complejos en este proceso.

En resumen, los resultados obtenidos ponen en evidencia los efectos duales del bloqueo de las interacciones entre Gal1 y N-glicanos complejos, actuando simultáneamente y en forma interconectada sobre programas inmunológicos y vasculares. Los datos revelados prometen un escenario clínico en el cual el bloqueo de Gal1 contribuya a incrementar la sensibilidad a terapias anti-VEGF, eliminar la angiogénesis compensatoria, normalizar la vasculatura tumoral y potenciar la respuesta anti-tumoral específica.

Referencias

1. Carmeliet P, and Jain RK. Nature 2011; 473:298-307.
2. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber P, Novotny W. Nat. Rev. Drug Disc. 2004; 3:391-40
2. Bergers G and Hanahan D. Nat Rev Cancer 2008; 8:592-603.
3. Dalziel M, Crispin M, Scanlan CN, Zitzmann N, Dwek RA. Science. 2014; 343:12356811-8
4. Rabinovich GA, and Croci DO. Immunity 2012; 36:322-335.
5. Dennis JW, Nabi IR and Demetriou M. Cell 2009; 139:1229-1241.
6. ThijssenVL, Rabinovich GA, and Griffioen AW. Cytokine Growth Factor Rev. 2013; 24:547-558.
7. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL and Rabinovich GA. Cancer Cell 2005; 5:241-251.
8. Banh A, Zhang J, Cao H, Bouley DM, Kwok S, Kong C, et al. Cancer Res 2011; 71:4423-4431.
9. Dalotto-MorenoT, Croci DO, Cerliani JP, Martinez-Allo VC, Dergan-Dylon S, Méndez-Huergo SP, Stupirski JC, Mazal D, Osinaga E, Toscano MA, Sundblad V, Rabinovich GA, Salatino M. Cancer Res 2013; 73:1107-1117.
10. Croci DO, Salatino M, Rubinstein N, Cerliani JP, Cavallin LE, Leung HJ, Ouyang J, Ilarregui JM, Toscano MA, Domaica CI, Croci MC, Shipp MA, Mesri EA, Albini A, Rabinovich GA. J Exp Med 2012; 209:1985-2000;

11. Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Méndez-Huergo SP, Mascanfroni ID, Dergan-Dylon S Toscano MA, Caramelo JJ, García-Vallejo JJ, Ouyang J, Mesri EA, Junttila MR, Bais C, Shipp MA, Salatino M, Rabinovich GA. Cell. 2014; 156:744-58.