

Tesis de Posgrado

Caracterización del anticuerpo monoclonal FC-2.15, dirigido contra carcinomas humanos y reactivo con LewisX : Estudio de sus propiedades funcionales in vitro y ex vivo

Capurro, Mariana Isabel

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

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:

Capurro, Mariana Isabel. (1999). Caracterización del anticuerpo monoclonal FC-2.15, dirigido contra carcinomas humanos y reactivo con LewisX : Estudio de sus propiedades funcionales in vitro y ex vivo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3153_Capurro.pdf

Cita tipo Chicago:

Capurro, Mariana Isabel. "Caracterización del anticuerpo monoclonal FC-2.15, dirigido contra carcinomas humanos y reactivo con LewisX : Estudio de sus propiedades funcionales in vitro y ex vivo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3153_Capurro.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

FCE y N BIBLIOTECA

**Caracterización del anticuerpo monoclonal
FC-2.15, dirigido contra carcinomas humanos
y reactivo con Lewis^x. Estudio de sus
propiedades funcionales in vitro y ex vivo.**

**Tesis para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires**

Autor: Lic. Mariana Isabel Capurro

Director: Dr. José Mordoh

Nº 3153

**Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones
Bioquímicas "Fundación Campomar"**

1999

RESUMEN

Este trabajo de Tesis se ha basado en la producción de anticuerpos monoclonales (AMC) dirigidos contra las células troncales de carcinoma mamario humano, la caracterización e identificación de los antígenos (Ag) reconocidos por los mismos y la evaluación de la posible utilidad diagnóstica y terapéutica de dichos AMCs. Para su obtención, se inmunizaron ratones Balb/c con células provenientes de un paciente con un carcinoma de mama agresivo y altamente indiferenciado, negativo para la expresión de ER y PgR, estrategia seguida con la idea de minimizar la producción de AMCs dirigidos contra Ags asociados a la diferenciación celular.

De los hibridomas obtenidos fue seleccionado el AMC FC-2.15, de isotipo IgM, el cual reacciona con la mayoría de los carcinomas mamarios humanos, independientemente de su tipo histológico y grado de diferenciación, reconociendo en los mismos al 80 % de las células tumorales y al 90 % de las células proliferantes del tumor, entre las que se encuentran las células troncales. El AMC FC-2.15 reconoce otras neoplasias, como carcinoma de colon y leucemia mieloide crónica y presenta escasa reactividad con la mayoría de los tejidos normales, siendo la principal reacción cruzada con los leucocitos polimorfonucleares (PMN).

En cuanto al Ag FC-2.15, la caracterización bioquímica inicial indicó un Ag de naturaleza glicoproteica, residiendo el epítopo en la parte hidrocarbonada del mismo. Posteriores experimentos demostraron que el AMC FC-2.15 reconoce específicamente al trisacárido Lewis^x o CD15, terminalmente expuesto. Esta conclusión está basada tanto en el reconocimiento específico del AMC FC-2.15 por diferentes estructuras conteniendo Lewis^x como en la inhibición observada en un ELISA realizado utilizando un AMC comercial anti-CD15 como inhibidor. Asimismo, se determinó que el AMC FC-2.15 no presenta reacción cruzada con el tetrasacárido sialil Lewis^x, ni con su isómero Lewis^a, así como tampoco con antígenos de grupo sanguíneo A o B.

La reactividad del AMC FC-2.15 en los diferentes tejidos FC-2.15 -positivos fue analizada por Western Blot sobre extractos de membrana y caracterizada determinando el efecto de digestiones enzimáticas (con PNGasaF y Neuraminidasa) en la persistencia del Ag. Los resultados obtenidos revelaron que Lewis^x puede estar formando parte tanto de N-glicoproteínas como de O-mucinas. Según el tipo celular estudiado, Lewis^x está presente en N-glicoproteínas exclusivamente (bandas de 250,

185 y 105 kDa en muestras de PMN y leucemia), predominantemente en N-glicoproteínas (bandas de 155 y 135 kDa, acompañadas con mucinas de mayor peso molecular, en células de carcinoma de colon T-84) o predominantemente en O-mucinas (células de carcinoma de mama MCF-7). También puede variar la cantidad de lactosaminoglicanos portando sialil Lewis^x, desde la ausencia (MCF-7), pasando por una baja proporción respecto de los Lewis^x-lactosaminoglicanos (PMN) hasta llegar a un gran predominio de los mismos en leucemias y T-84.

Puede concluirse, por lo tanto, que PMN normales y diferentes células tumorales pueden expresar residuos Lewis^x y sialil Lewis^x en muy diferente proporción y unidos a diferentes proteínas, aunque la relevancia de Lewis^x en condiciones normales y patológicas tiene que ser aún establecida.

En cuanto a las propiedades funcionales del AMC FC-2.15, numerosos experimentos se han realizado en esta Tesis tendientes a caracterizar la interacción del AMC FC-2.15 con PMN y con MCF-7, tanto *in vitro* como en un sistema *ex vivo* de circulación sanguínea (SEVCS).

Ensayos de aglutinación han demostrado que el AMC FC-2.15 induce la agregación homotípica de PMN *in vitro* y forma agregados heterotípicos entre PMN y células tumorales Lewis^x-positivas. Ensayos de liberación de [⁵¹Cr] han revelado que el AMC FC-2.15 ejerce un fuerte efecto citotóxico sobre los PMN y células MCF-7 por fijación de complemento humano. Posteriormente, con la idea de aproximar a las condiciones en las que el AMC FC-2.15 interacciona *in vivo*, el ensayo de liberación de [⁵¹Cr] fue realizado en sangre entera en circulación en un SEVCS. Contrariamente a lo esperado, el AMC FC-2.15 aglutina, pero no lisa, a los PMN mientras que la lisis de MCF-7 en dicho sistema es prácticamente normal.

Estas observaciones permitieron plantear la posibilidad de que en el SEVCS los PMN serían inducidos a agregarse mas rápidamente por la suma de dos mecanismos distintos: el AMC FC-2.15 que activa a los PMN y el flujo aplicado. En la medida que los agregados van siendo formados, habría un impedimento estérico progresivo para el acceso de los factores del sistema de complemento a la porción Fc del AMC FC-2.15 y por ende los grumos de PMN formados no serían lisados.

Los experimentos realizados posteriormente validaron esta hipótesis puesto que demostraron que el AMC FC-2.15 no lisa agregados homotípicos de PMN preformados en ensayos *in vitro* por un lado y que el AMC FC-2.15 es capaz de lisar a los PMN en

el SEVCS, cuando la aglutinación de los mismos se impide por pretratamiento con colchicina, por otro.

La lisis de MCF-7 en el SEVCS tendría lugar de todas formas debido a su incompleta agregación con los PMN.

Puede concluirse entonces que la falta de lisis de los PMN por el AMC FC-2.15 en circulación y, que por el contrario, las células tumorales Lewis^x-positivas sean eficientemente lisadas, son dos características importantes que avalan el uso del AMC FC-2.15 en el tratamiento de tumores Lewis^x-positivos, sin riesgo de producir una lisis masiva de los PMN circulantes.

Los resultados presentados indican que el AMC FC-2.15 podría ser útil en la inmunoterapia pasiva de pacientes con carcinomas Lewis^x-positivos, sin necesidad de conjugarlo con drogas ni toxinas.

Palabras claves: anticuerpo monoclonal FC-2.15; Lewis^x; carcinomas, leucocitos polimorfonucleares; inmunoterapia; neutropenia.

Los resultados presentados en esta Tesis fueron parcialmente publicados en:

- Mordoh J, Leis S, Bravo AI, Podhajcer OP, Ballaré C, **Capurro M**, Kairiyama C, Bover L. "Description of a new monoclonal antibody, FC-2.15, reactive with human breast cancer and other human neoplasias" *The International Journal of Biological Markers* 1994, 9: 125 – 134.
- **Capurro M**, Bover L, Portela P, Livingston P, Mordoh M. "FC-2.15, a monoclonal antibody active against human breast cancer, specifically recognizes Lewis^x hapten". *Cancer Immunology – Immunotherapy* 1998, 45: 334 – 339.
- **Capurro M**, Ballaré C, Bover L, Portela P, Mordoh J. "Differential lytic and agglutinating activity of the anti-Lewis^x monoclonal antibody FC-2.15 on human polymorphonuclear neutrophils and MCF-7 breast tumor cells. In vitro and ex vivo studies" *Cancer Immunology – Immunotherapy* 1999 (en prensa).

TITLE: Characterization of monoclonal antibody FC-2.15, active against human carcinomas and reactive with Lewis^x. In vitro and ex vivo functional properties studies.

AUTHOR: Mariana Isabel Capurro

DIRECTOR: Dr. José Mordoh

INSTITUTION: Instituto de Investigaciones Bioquímicas, FCE y N y
"Fundación Campomar"

ABSTRACT

In order to produce monoclonal antibodies (mAb) against antigens (Ags) expressed by breast carcinoma stem cells, nude mice were immunized with tumor epithelial cells from a human undifferentiated primary breast carcinoma. This strategy was followed in order to minimize the production of mAb directed against differentiation-associated Ags.

A mAb designated FC-2.15 (IgM) was selected. FC-2.15 reacts with the majority of human breast primary tumors, independently of their histology and hormone receptor content. Moreover, FC-2.15 reacts with 80% of total breast malignant tumor cells and with 90% of proliferating tumor cells. It recognizes other neoplasia such as colon carcinoma and chronic myeloid leukemia and, among the normal tissues examined, strong cross reactivity was found principally with peripheral granulocytes (PMN).

Biochemical studies indicate that FC-2.15 recognizes the carbohydrate moiety of different glycoproteins. Analysis of epitope specificity has demonstrated that FC-2.15 specifically recognizes terminally exposed Lewis^x (Lex) (CD15) trisaccharide, but not sialyl Lex, Lewis^a, trifucosylated Lewis^y, blood group Ags A and B, globo H and gangliosides.

FC-2.15 reactivity with different FC-2.15-positive tissues was analyzed by Western blot and characterized by enzymatic digestions (PNGaseF and Neuraminidase). In PMN, myeloid leukemic cells and colon carcinoma T-84 cells, Lewis^x was found to be almost exclusively N-linked to the protein core, whereas in breast carcinoma MCF-7 cells, Lewis^x appears to be mostly O-linked. Treatment with Neuraminidase increased detection by FC-2.15 in normal PMN, myeloid leukemic cells and T-84 cells but not in MCF-7 cells.

It may be concluded that normal PMN and different tumor cells may express Lex and sialyl Lex residues in quite different proportions and be bound to different proteins. The relevance of Lex in normal and pathological conditions remains to be established.

Several experiments were performed in order to characterize the interaction of FC-2.15 with PMN and MCF-7 cells both *in vitro* and in *ex vivo* circulating blood (EVCB), as an approach to *in vivo* conditions.

In vitro, the binding of Lex-epitopes by FC-2.15 induces PMN homotypic aggregation. When PMN and Lex-positive MCF-7 cells are co-incubated, FC-2.15 induces heterotypic aggregation. In ⁵¹Cr-release assays employing human complement, FC-2.15 exerts a rapid and strong cytotoxic effect against PMN. However, when the effect of FC-2.15 was tested in EVCB, no lytic activity against PMN was detected, whereas MCF-7 cells were still lysed. Blood smears demonstrated that FC-2.15 induced PMN agglutination and heterotypic aggregates when MCF-7 cells were present.

A pre-treatment of PMN with colchicine impaired PMN agglutination both *in vitro* and in EVCB. In the latter conditions FC-2.15 lytic activity was restored, suggesting that PMN homotypic aggregation by FC-2.15, but not lysis is dependent of microtubules integrity and that PMN agglutination hinders their lysis. Moreover, when the ⁵¹Cr-release assays were performed following agglutination, FC-2.15-cytotoxicity was restricted to isolated PMN.

It may be concluded the lack of PMN lysis by FC-2.15 in circulation is reassuring, and since Lex-positive tumor cells are efficiently lysed, FC-2.15 could be useful to eliminate circulating Lex-positive tumor cells.

References

- Mordoh J, Leis S, Bravo AI, Podhajcer OP, Ballaré C, **Capurro M**, Kairiyama C, Bover L. "Description of a new monoclonal antibody, FC-2.15, reactive with human breast cancer and other human neoplasias" *The International Journal of Biological Markers* 1994, 9: 125 – 134.
- **Capurro M**, Bover L, Portela P, Livingston P, Mordoh M. "FC-2.15, a monoclonal antibody active against human breast cancer, specifically recognizes Lewis^x hapten". *Cancer Immunology – Immunotherapy* 1998, 45: 334 – 339.

- **Capurro M**, Ballaré C, Bover L, Portela P, Mordoh J. "Differential lytic and agglutinating activity of the anti-Lewis^x monoclonal antibody FC-2.15 on human polymorphonuclear neutrophils and MCF-7 breast tumor cells. In vitro and ex vivo studies" *Cancer Immunology – Immunotherapy* 1999 (in press).

Key words: Monoclonal antibody FC-2.15, Lewis^x, carcinomas, neutrophils, neutropenia, immunotherapy.

INDICE

• INTRODUCCION GENERAL

<i>I. Cáncer</i>	1
I-1. Progresión tumoral.....	2
I-2. Moléculas de adhesión involucradas en la progresión tumoral.....	4
• Integrinas.....	4
• Caderinas.....	6
• Selectinas.....	7
• Superfamilia de las inmunoglobulinas.....	8
<i>II. Cáncer de mama</i>	11
II-1. Heterogeneidad tumoral.....	13
<i>III. Antígenos asociados a tumor</i>	15
• Antígenos oncofetales.....	16
• Marcadores específicos de tejido o de diferenciación.....	17
• Glicoproteínas y glicolípidos de membrana aberrantemente glicosilados..	18
• Oncogenes.....	22
• Genes supresores de tumor.....	23
• Receptores hormonales.....	25
<i>IV. Anticuerpos monoclonales</i>	26
IV-1. Utilización de AMC en el diagnóstico y terapia del cáncer.....	27
• <u>OBJETIVOS</u>	32

• CAPÍTULO I: Descripción del AMC FC-2.15

<i>Introducción</i>	34
<i>Resultados</i>	35
I-1. Obtención del AMC FC-2.15.....	35
I-2. Reactividad del AMC FC-2.15 con carcinomas mamarios.....	36
I-3. Reactividad del AMC FC-2.15 con otras neoplasias.....	37
I-4. Reactividad del AMC FC-2.15 con tejidos normales.....	37
I-5. Reactividad del AMC FC-2.15 con líneas celulares de carcinoma de mama humano.....	40

I-6. Reactividad del AMC FC-2.15 con carcinoma de colon y leucemias humanas.	41
--	----

Discusión	45
------------------	----

- **CAPÍTULO II: Identificación y caracterización de los antígenos reconocidos por el AMC FC-2.15**

Introducción	48
---------------------	----

Resultados	48
-------------------	----

II-1. Identificación del Ag FC-2.15 en carcinoma mamario humano y PMN.	48
--	----

II-2. Determinación de la naturaleza bioquímica de los Ags FC-2.15 en carcinoma mamario humano y PMN.	54
---	----

II-3. Caracterización de la parte glicosídica reconocida por el AMC FC-2.15.	58
--	----

II-4. FC-2.15 reconoce al trisacárido Lewis ^x terminalmente expuesto.	60
--	----

II-5. Caracterización de la reactividad en PMN y células de leucemia mieloide crónica.	64
--	----

II-6. Caracterización de la reactividad células de carcinoma de colon T-84 y células de carcinoma de mama MCF-7.	67
--	----

Discusión	69
------------------	----

- **CAPÍTULO III: Propiedades funcionales del AMC FC-2.15. Estudios *in vitro* y *ex vivo*.**

Introducción	74
---------------------	----

Resultados	75
-------------------	----

III-1. Caracterización de la reactividad del AMC FC-2.15 con PMN.	75
---	----

III-2. El AMC FC-2.15 aglutina a los PMN <i>in vitro</i> y forma agregados heterotípicos entre PMN y células tumorales Lewis ^x -positivas.	77
---	----

III-3. El AMC FC-2.15 lisa a los PMN en ensayos <i>in vitro</i> .	81
---	----

III-4. El AMC FC-2.15 aglutina, pero no lisa, a los PMN en experimentos <i>ex vivo</i> de circulación sanguínea.	82
--	----

III-5. El AMC FC-2.15 no lisa agregados homotípicos de PMN.	91
---	----

III-6. FC-2.15 lisa a los PMN en el SEVCS si la aglutinación de los mismos se bloquea.	92
--	----

Discusión	95
------------------	----

• <u>CONCLUSIONES</u>	100
• <u>MATERIALES Y METODOS</u>	
<i>I. Células</i>	103
I-1. Líneas celulares.....	103
I-2. Leucocitos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos humanos.....	104
I-3. Células de leucemia mieloide crónica.....	104
I-4. Procesamiento de leucemias.....	105
<i>II. Anticuerpos utilizados</i>	105
II-1. Iodinación del AMC FC-2.15.....	106
II-2. Biotinilación del AMC FC-2.15.....	106
<i>III. Complemento humano</i>	106
<i>IV. Reactividad del AMC FC-2.15</i>	107
IV-1. Inmunohistoquímica (IH) sobre cortes de tejidos humanos normales y tumorales.....	107
IV-2. Inmunocitoquímica.....	107
IV-3. Inmunofluorescencia indirecta.....	107
<i>V. Extracción antigénica</i>	108
<i>VI. Caracterización antigénica</i>	109
VI-1. Dot blot.....	109
VI-2. Técnica de ELISA.....	109
VI-3. Ensayo de inhibición de binding.....	110
VI-4. Técnicas electroforéticas.....	110
VI-5. Técnica de Western Blot.....	111
VI-6. Digestión antigénica con Péptido N-glicosidasa F y Neuraminidasa.....	111
VI-7. Tratamientos enzimáticos.....	112
<i>VII. Citometría de flujo</i>	112
<i>VIII. Análisis de Scatchard</i>	113
<i>IX. Ensayo de aglutinación in vitro del AMC FC-2.15</i>	113

X. Microscopía electrónica.....	114
XI. Citotoxicidad mediada por complemento anticuerpo-dependiente...	114
XII. Sistema ex vivo de circulación.....	116
XIII. Análisis de imágenes.....	116

• **ANEXOS**

Anexo I: Abreviaturas.....	117
Anexo II: Integrinas y sus ligandos.....	119
Anexo III: Estructura y función de las Selectinas.....	120
Anexo IV: Fórmula y biosíntesis de antígenos del grupo Lewis.....	121
Anexo V: Leucemias.....	122

• **BIBLIOGRAFIA.....**124

• **AGRADECIMIENTOS.....**142

INTRODUCCION GENERAL

INTRODUCCION GENERAL

I. Cáncer

El desarrollo tumoral es el resultado de múltiples alteraciones genéticas que conducen a la proliferación descontrolada de las células neoplásicas y la capacidad de invadir tejidos adyacentes y colonizar otros órganos [Stetler-Stevenson WG y col. 1993; Klein G y Klein E, 1985; Vogelstein B y Kinzler KW, 1993; Hoskins K y Weber BL, 1994; Fearon ER y Vogelstein B, 1990].

Las alteraciones genéticas mencionadas incluyen tanto la activación de proto-oncogenes (genes regulatorios involucrados en el control de la proliferación cuya expresión estimula un incremento en el número de células) a oncogenes, como la pérdida o inactivación de anti-oncogenes o genes supresores de tumor (genes cuyos productos contribuyen a disminuir el número de células). Dichas alteraciones o mutaciones pueden ocurrir en un orden aleatorio siendo la tumorigenicidad resultante la suma de las mismas [Stetler-Stevenson WG y col. 1993].

El crecimiento y renovación normal de los tejidos de un organismo está homeostáticamente controlado, manteniéndose los diversos tipos celulares ya diferenciados en cantidad y posiciones relativas correctas. Si una célula pierde el control de la proliferación originará por lo tanto un **tumor o neoplasia**.

- Si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una única masa tumoral en su lugar de origen, sin invadir tejidos adyacentes, se considera que el tumor es **benigno**. Estos tumores son generalmente de crecimiento lento, pudiendo alcanzar volúmenes muy grandes y el tejido normal circundante está siempre bien demarcado. No suelen representar un peligro para la vida del paciente obteniéndose generalmente una completa cura por remoción quirúrgica del tumor.
- En los tumores **malignos o cancerosos**, en cambio, sus células tienen la capacidad de invadir los tejidos adyacentes, ingresar al espacio vascular o linfático, y migrar hacia otros órganos donde proliferan formando un tumor secundario o metástasis.

Cuando las neoplasias malignas surgen a partir del tejido epitelial son llamadas carcinomas. Estos representan más del 90 % de los cánceres humanos, siendo los más frecuentes los de pulmón, mama y colon. El resto de las neoplasias incluyen las

de origen mesenquimático (hueso, músculo, vasos sanguíneos, fibroblastos), denominadas sarcomas; las derivadas de células hematopoyéticas, llamadas leucemias y linfomas y los tumores originados en tejido nervioso.

I-1. Progresión tumoral

Distintas observaciones han demostrado que una única mutación no es suficiente para el desarrollo de un tumor maligno, sino que la transformación neoplásica es un proceso con múltiples etapas e involucra una acumulación de diversos cambios secuenciales [Nowell PC, 1976; Vogelstein B y Kinzler KW, 1993; Fearon ER y Vogelstein B, 1990; Hoskins K y Weber BL, 1994]. Si bien una primera célula sufriría alguna mutación somática que le confiera una ventaja en el crecimiento iniciándose así la transformación, la progenie de ésta debe experimentar posteriores cambios – probablemente varias mutaciones adicionales – para que se desarrolle un cáncer. Este proceso, conocido como **progresión tumoral**, viene acompañado por profundos cambios del estroma que incluyen la producción de una matriz extracelular alterada e intensa angiogénesis [Glukhova M y col. 1995].

Para metastatizar, las células cancerosas deben, secuencialmente, desprenderse del nido tumoral y movilizarse a través del estroma hasta alcanzar vasos sanguíneos o linfáticos, proceso llamado intravasación. Una vez que entran en el torrente circulatorio, las células cancerosas que escapan a la vigilancia inmune, deben pasar nuevamente a través del endotelio (extravasación) e interactuar tanto con las células del órgano blanco como con la matriz extracelular para implantarse y proliferar formando un nuevo foco metastásico. **Así, la progresión tumoral comprende una secuencia de interacciones célula – célula y célula – matriz extracelular.** [Glukhova M y col. 1995].

La membrana basal separa los tejidos epiteliales del estroma adyacente formando una barrera que bloquea el pasaje de células y macromoléculas [Albini A y col. 1987]. Está compuesta predominantemente por una gran glicoproteína multifuncional llamada laminina, colágeno IV y el proteoglicano heparan sulfato, de forma tal que la penetración de células tumorales a través de la misma no es fenómeno sencillo e involucra diferentes eventos: la unión de la célula tumoral a la membrana basal vía receptores de superficie celular [Rao CN y col. 1983; Malinoff HL y Wicha MS, 1983], la secreción de enzimas por el tumor para causar su degradación [Kramer RH y Vogel

KJ, 1984; Turpeenniemi-Hujanen T y col. 1986] y la migración de la célula en el tejido blanco llevada a cabo en respuesta a un estímulo quimiotáctico específico *[McCarthy JB y col. 1985]*.

Es actualmente aceptado que este comportamiento invasivo es también compartido por un número de tipos celulares normales y ocurre, en grado limitado, en condiciones fisiológicas *[Mareel MM y col. 1990]*. Por ejemplo, las células endoteliales deben invadir la membrana basal y el estroma intersticial durante la angiogénesis y los trofoblastos invaden el estroma endometrial y los vasos sanguíneos para establecer contacto con la circulación materna durante el desarrollo de la placenta hemocorial.

Es mas, se considera que el proceso de metástasis tumoral es reminiscente del proceso de adhesión leucocitaria en lo sitios de inflamación *[Fukuda M, 1996]*. Brevemente, en un estado no-estimulado los granulocitos circulan rápidamente por los vasos sanguíneos. Cuando las células endoteliales son activadas por agentes inflamatorios, las moléculas de adhesión E- y P-selectinas son transportadas a la superficie celular y establecen contacto (vía el ligando sialil-Lewis^x) con los granulocitos, resultando en el enlentecimiento del movimiento de los mismos a lo largo de la pared endotelial o "efecto rolling". Esto permite que los leucocitos tengan suficiente acceso a los quimioattractantes de las células endoteliales, los cuales activan (vía proteína G) las β_2 -integrinas de la superficie de los granulocitos estableciendo una firme unión al endotelio (vía el ligando ICAM-1). Esta firme unión conduce finalmente a la extravasación a través de la interacción homofílica de PECAM-1 *[Springer TA, 1994; Fukuda M, 1996]*. Del mecanismo explicado, se infiere que la interacción E-selectinas – sialil-Lewis^x juega un rol fundamental en el comienzo de la inflamación, resultando en el reclutamiento de los leucocitos en los sitios de injuria.

Apoyando la antedicho, se ha descripto la presencia de determinantes sialil-Lewis^x en la superficie de células tumorales *[Fukushima K y col. 1984; Kim YS y col. 1988; Ogawa J y col. 1996; Yamaguchi A y col. 1998]*, se ha probado que actúan como ligandos de las E-selectinas de las células endoteliales *[Rice GE y Bevilacqua MP, 1989; Hession C y col. 1990]*, se los ha relacionado con el potencial metastásico de dichas células *[Saitoh O y col. 1992; Nakamori S y col. 1997; Okazaki K y col. 1998; Martin-Satue M y col. 1998]* y se ha determinado que mayores niveles de expresión de sialil-Lewis^x en la superficie de tumores correlacionan con peor pronóstico para los pacientes *[Nakamori S y col. 1993; Shimodaira K y col. 1997]*.

I-2. Moléculas de adhesión involucradas en la progresión tumoral

Las moléculas de membrana plasmática que median la adhesión célula – célula o célula - matriz extracelular son de fundamental importancia en procesos de embriogénesis, en el control de la hemostasis, en la circulación de linfocitos y en el comportamiento metastásico de células malignas [Rosales C y col. 1995].

Durante la cascada metastásica, las células tumorales deben presentar una adhesión célula – célula y célula – matriz tanto disminuida como aumentada, dependiendo de la etapa del proceso [Stetler-Stevenson WG y col. 1993]. El escape de células neoplásicas a partir del tumor primario requiere una disminución en la adhesividad de estas células, tanto con otras células tumorales como con la matriz del estroma. Sin embargo, la interacción de las células tumorales con el órgano blanco, que resulta en patrones de metástasis específicos del tumor, requiere de mecanismos de adhesión entre las células neoplásicas y el estroma de dicho órgano.

Varias familias de receptores de adhesión han sido identificadas y caracterizadas: éstas incluyen las integrinas, las caderinas, las selectinas y miembros de la superfamilia de las Inmunoglobulinas. El rol de estas moléculas en los procesos de crecimiento tumoral, invasión y metástasis se encuentra todavía en activa investigación.

- **Integrinas:** [Revisiones en: Rosales C y col. 1995; Juliano RL y Varner JA, 1993; Glukhova M y col. 1995]

Las integrinas son una familia de glicoproteínas de superficie celular que actúan principalmente como receptores para proteínas de matriz extracelular, aunque algunas integrinas pueden reconocer proteínas de membrana y están involucradas en las interacciones célula – célula. Cada integrina es un heterodímero que contiene una subunidad α y una β , ambas glicoproteínas de transmembrana. Han sido identificadas quince subunidades α y ocho o más subunidades β , las cuales pueden asociarse para formar al menos 21 integrinas distintas conocidas. Una subunidad β puede asociarse a varias subunidades α y una subunidad α con más de una β . Además, la mayoría de las integrinas interaccionan con más de un ligando y un mismo ligando puede ser reconocido por varias integrinas. Las células a menudo poseen múltiples integrinas capaces de interaccionar con una dada proteína de matriz, así que la expresión de integrinas resulta aparentemente redundante.

La mayoría de los ligandos son proteínas de matriz extracelular, entre los que se encuentran fibronectina (reconocido por $\alpha_5\beta_1$), colágeno y laminina, aunque algunas integrinas pueden reconocer proteínas de membrana, como las caderinas y algunos miembros de la familia de las Ig (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1) y mediar de este modo la interacción directa célula – célula [Ver Anexo II: Integrinas y sus ligandos].

Los cationes divalentes son esenciales para la función del receptor y necesarios para la asociación α - β de algunas integrinas. Estas proteínas pueden presentarse en dos estados: activado o desactivado, los cuales se diferencian por un cambio conformacional, por lo que las células pueden regular su adhesividad a diferentes sustratos regulando tanto el nivel de expresión como la activación de estas moléculas.

Es importante mencionar que las funciones de las integrinas no están restringidas a la adhesión, sino que constituyen verdaderos receptores que median procesos de transducción de señales que influyen tanto el control del crecimiento celular como la expresión génica.

Los tejidos diferenciados normales expresan un conjunto característico de integrinas y puesto que las alteraciones en la expresión de integrinas observadas en cáncer son tejido-específicos [Glukhova M y col. 1995], nos centraremos en esta Introducción en los datos disponibles para carcinomas. De los mismos puede concluirse principalmente: **1) una tendencia a la “hipo-regulación” de las integrinas usualmente expresadas en el tejido de origen y 2) falta de organización espacial de las integrinas expresadas** [Juliano RL y Varner JA, 1993].

En epitelios normales, las integrinas que unen colágeno IV, laminina u otros componentes de la membrana basal están expresadas principalmente en la superficie basolateral, en proximidad a la membrana basal. Contrariamente, en carcinomas el rearrreglo espacial de estas integrinas es más desordenado con una distribución intracelular difusa y menos abundante. Estos cambios se correlacionan con una desorganización de la estructura de la membrana basal en si misma [Juliano RL y Varner JA, 1993].

En cuanto a los reportes de niveles reducidos de expresión de integrinas en carcinomas, las principales observaciones fueron con las subunidades α_5 , α_3 y α_2 [Juliano RL y Varner JA, 1993]. Además, en carcinoma mamario invasivo, los constituyentes citoplasmáticos tales como vinculina, α -actinina, talina y ppFAK¹²⁵ fueron indetectables o expresados en muy bajos niveles, sugiriendo que las

interacciones entre integrinas y el citoesqueleto están impedidas [Glukhova M y col. 1995].

- **Caderinas:** [Revisiones en: Glukhova M y col. 1995; Rosales C. y col. 1995; Takeichi M, 1993]

Las caderinas pertenecen a una familia de receptores de adhesión dependiente de calcio involucrados en la adhesión homotípica célula – célula. La estructura de una caderina típica consiste de un dominio amino-terminal externo compuesto por 5 repeticiones en tandem, un único segmento transmembrana y un dominio carboxilo-terminal citoplasmático de aproximadamente 150 residuos. La repetición en tandem amino-terminal posee el sitio de binding mientras que las otras repeticiones contienen los sitios putativos de unión al calcio. Generalmente interaccionan en forma intercitoplasmática (a través del dominio carboxilo-terminal) con un conjunto de proteínas, conocidas como cateninas, que a su vez interaccionan con el citoesqueleto [Hynes RO, 1994].

Las caderinas juegan un rol crítico en la determinación de la organización del tejido y son especialmente importantes en algunas facetas de la morfogénesis durante el desarrollo. En tejidos adultos, la pérdida de expresión de caderinas en tejidos epiteliales es asociada con un fenotipo maligno y más invasivo [Rosales C y col. 1995]. Experimentos *in vitro* revelaron que las células que no expresan caderinas o donde las mismas están inhibidas son más invasivas que células con actividad de caderinas normal [Frixen UH y col. 1991; Vleminckx K y col. 1991; Chen WC y Obrink B, 1991]. Es más, la introducción de E-caderina en líneas celulares invasivas reduce o elimina la invasividad *in vitro* [Hedrick L y col. 1993].

La expresión de caderinas ha sido estudiada en varios cánceres humanos, como carcinoma gástrico, hepatoma, carcinoma prostático, cáncer de mama y otros [Takeichi M, 1993]. Se puede describir una tendencia de los tumores con morfología epitelial o más diferenciados, que poseen bajo potencial metastásico, a mantener altos niveles de caderinas mientras que tumores pobremente diferenciados, altamente invasivos o carcinomas metastásicos expresan niveles de caderinas muy reducidos. En este último caso, si los niveles de caderinas son detectables, se observa un patrón de distribución difusa e irregular indicando adhesiones célula – célula desorganizadas. Sin embargo, la pérdida de E-caderina está relacionada con las primeras etapas del desarrollo tumoral [Stetler-Stevenson WG y col. 1993]. La reducción en el nivel de las caderinas pueden aumentar la infiltración de células tumorales en ganglios linfáticos

como en tejidos vecinos pero esta actividad no siempre confiere potencial de metastatizar a distancia a dichas células [Takeichi M, 1993].

- **Selectinas**

Las selectinas comprenden una familia recientemente descubierta de receptores de adhesión tipo lectinas [Lasky LA, 1992]. La estructura de una selectina incluye un dominio N-terminal homólogo a las lectinas animales calcio-dependientes o CRD (Carbohydrate- Recognition Domain) seguido de un dominio de tipo EGF (Epidermal Growth Factor), una secuencia repetitiva consenso (cuyo número varía en las distintas selectinas), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta [Bevilacqua MP, 1993]. La familia de las selectinas está compuesta por tres proteínas que median interacciones heterotípicas a través del reconocimiento dependiente de calcio de glicanos sialilados [Rosales C y col. 1995]: **E-selectina**, expresada en células endoteliales en respuesta a citoquinas inflamatorias; **P-selectina**, presente en forma latente en gránulos de células endoteliales y cuerpos de Weibel-Palade de plaquetas y rápidamente translocada a la superficie post-activación celular, y **L-selectina**, constitutivamente expresada por leucocitos [Ver Anexo III: Estructura y función de las selectinas].

Las tres selectinas pueden unir lactosaminoglicanos fucosilados y sialilados, particularmente el motivo sialil Lewis^x [Ver Anexo IV: Fórmula y biosíntesis de antígenos del grupo Lewis], el cual está presente tanto en glicolípidos como glicoproteínas (N-glicoproteínas y mucinas). Otros ligandos tales como el CD15 o Lewis^x y formas sulfatadas de Lewis^x también presentan actividad de binding de selectinas, pero el significado fisiológico de estas interacciones debe aun ser investigado [Lasky LA, 1995].

Las selectinas, en especial E-selectina, están recibiendo especial atención en estudios de progresión tumoral y metástasis. Normalmente expresada en células endoteliales post-estimulación de las mismas por agentes inflamatorios, interviene en la primera etapa de la inflamación uniendo el motivo sialil Lewis^x presente en la superficie de los leucocitos y dando como resultado el enlentecimiento del movimiento de los mismos a lo largo de la pared endotelial o "efecto rolling". Esto permite que los leucocitos tengan suficiente acceso a los factores quimiotácticos y se activen conduciendo a la firme unión a endotelio (vía interacción integrinas-moléculas de la superfamilia de Inmunoglobulinas) y extravasación [Revisiones en: Lasky LA. 1992; Lasky LA 1995; Zimmerman GA y col. 1992; Springer TA, 1994].

Determinantes glicosídicos del tipo sialil Lewis^x se expresan en forma constitutiva en la superficie de los leucocitos polimorfonucleares (tanto en glicolípidos como en glicoproteínas) y células sanguíneas del linaje mieloide [Phillips ML y col. 1990]. Pero entre las alteraciones en los patrones de glicosilación observadas en diversos tumores (principalmente carcinoma de colon, mama y pulmón y en algunas leucemias) se ha descrito la presencia de determinantes sialil-Lewis^x en la superficie de células neoplásicas [Fukushima K y col. 1984; Kim YS y col. 1988; Ogawa J y col. 1996; Majuri ML y col. 1995; Hanish F-G y col. 1992; Yamaguchi A y col. 1998].

Numerosos reportes han determinado que el Sialil Lewis^x expresado en tumores actúa como ligando de las E-selectinas de las células endoteliales [Rice GE y Bevilacqua MP, 1989; Walz G y col. 1990; Hession C y col. 1990; Yago K y col. 1993], permitiendo la adhesión de las células tumorales a endotelio activado. Consecuentemente, la expresión de sialil Lewis^x se ha relacionado con el potencial metastásico de dichas células [Saitoh O y col. 1992; Nakamori S y col. 1997; Okazaki K y col. 1998; Martin-Satue M y col. 1998] y las observaciones clínicas han determinado que mayores niveles de expresión de sialil-Lewis^x en la superficie de tumores correlacionan con peor pronóstico para los pacientes con carcinoma de mama, colon o pulmón [Ogawa J y col. 1996; Nakamori S y col. 1993; Shimodaira K y col. 1997].

- **Superfamilia de las inmunoglobulinas**

Diversos receptores de adhesión celular son incluidos en esta superfamilia de Inmunoglobulinas (Ig). Las proteínas agrupadas en esta familia poseen uno o mas dominios de plegamiento tipo inmunoglobulina, el que consiste de una estructura compacta de 60 – 100 aminoácidos formada por dos hojas β , cada una compuesta a su vez por 3 – 5 cadenas β antiparalelas, y estabilizada por aminoácidos hidrofóbicos y puentes disulfuro intercatenarios que forman un vuelta de 55 a 75 residuos. Además de este dominio extracelular, los miembros de esta familia también poseen un único dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta [Rosales C y col. 1995].

La mayoría de los miembros de esta familia están involucrados en eventos de adhesión celular y son denominados CAMs (Cellular Adhesion Molecules). Estas moléculas participan en reconocimientos homofílicos o heterofílicos, dependiendo del tipo de CAM. Por ejemplo, los linfocitos T expresan una gran variedad de receptores pertenecientes a esta familia, como CD2, CD4 o CD8, ICAM-1, ICAM-2 y el receptor de células T (TCR), los cuales juegan importantes roles en el reconocimiento del antígeno, funciones T-citotóxicas y recirculación de linfocitos [Dustin ML y Springer TA, 1991]. El CD2 de células T interacciona con LFA-3 (otro miembro de esta familia)

presente en las células blanco; el TCR interacciona con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II), también miembros de esta familia; mientras que las ICAMs expresadas en células endoteliales son reconocidas por las β_2 -integrinas de los leucocitos [Rosales C y col. 1995].

Dado el rol de las CAMs en las interacciones célula – célula, es muy factible que alteraciones en las funciones de estas moléculas estén involucradas en la progresión tumoral. De hecho, la expresión de distintos miembros de esta superfamilia, como ser **ICAM-1** [Johnson JP y col. 1989; Harning R y col. 1991; Banks RE y col 1993], **MUC1** [Regimbald LH y col. 1996; Hilkens J y col. 1995], **VCAM-1** [Taichman DB y col. 1991; Gearing AJH y Newman W, 1993], **PECAM1** [Tang DG y col. 1993] y **CEA** [Zhou H y col. 1993; Fearon ER y Vogelstein B, 1990] han sido correlacionadas con la progresión tumoral.

ICAM-1 es una proteína transmembrana de 80 - 114 kDa con 5 dominios de Ig extracelulares. Esta glicoproteína es expresada por diversos tipos celulares, como linfocitos B y T, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales, y el nivel de expresión en estas células puede ser aumentado por mediadores inflamatorios, como IL-1, TNF- α e interferón- γ [Springer TA, 1990]. Los ligandos para ICAM-1 son las β_2 -integrinas, como $\alpha_1\beta_2$, presentes en neutrófilos, monocitos, linfocitos y células NK (Natural Killer), y $\alpha_m\beta_2$ expresada por neutrófilos, monocitos y células NK [Bevilacqua MP, 1993]. La interacción de ICAM-1, presente en las células endoteliales, con β_2 -integrinas, presentes en los granulocitos, es responsable de la adhesión firme de neutrófilos a endotelio vascular en sitios de inflamación [Springer TA, 1990].

Se ha descrito que ICAM-1 es liberado por melanomas y células de carcinoma de ovario [Giavazzi R y col. 1992] y se han correlacionado los niveles circulantes de ICAM-1 con metástasis hepáticas en una variedad de tumores y con la progresión de la enfermedad en melanoma [Johnson JP y col. 1989; Harning R y col. 1991; Banks RE y col. 1993].

La mucina **MUC1** es una glicoproteína de transmembrana expresada en epitelio de mama normal. Sin embargo, se ha descrito que mas del 90 % de los carcinomas mamarios presentan mayores niveles de expresión de una forma sub-glicosilada [Regimbald LH y col. 1996]. La expresión de MUC-1 en carcinomas ha sido relacionada con la progresión tumoral ya que, por un lado, en carcinoma colónico

MUC1 adquiere determinantes sialil Lewis^x y sialil Lewis^a, los que intervienen en la unión a E-selectinas [Zhang K y col. 1994] y por otro, debido al menor grado de glicosilación de MUC1 observado en carcinomas mamarios, quedan expuestos epitopes crípticos del "core" proteico que actúan como ligando de ICAM-1 del endotelio, potenciando así la adhesión de las células tumorales al mismo [Regimbald LH y col. 1996].

VCAM-1 (también denominada INCAM-110), proteína transmembrana de 110 kDa que posee 6 dominios de Ig, es expresada por endotelio vascular activado con IL-1 o TNF- α y es responsable, a través de su interacción con VLA-4 (integrina $\alpha_4\beta_1$) [Rüegg C y col. 1992] de la adhesión de linfocitos y monocitos al endotelio vascular y su posterior extravasación en sitios de inflamación. Se han descrito niveles aumentados de expresión de VCAM-1 y VCAM-1 circulante en carcinoma de ovario, de vejiga y renal y en linfoma no Hodgkin [Gearing AJH y Newman W, 1993].

PECAM-1 es una glicoproteína de transmembrana de aproximadamente 130 kDa con seis dominios de Ig. La proteína está compuesta por un dominio extracelular de 574 aminoácidos, una región transmembrana simple de 19 residuos hidrofóbicos y un dominio citoplasmático de 118 aminoácidos. En el dominio extracelular existen 9 sitios de N-glicosilación y los hidratos de carbono constituyen el 40 % de la masa de la glicoproteína. PECAM-1 es expresado por plaquetas, células endoteliales, monocitos, neutrófilos y linfocitos T CD8⁺ [DeLiser HM y col. 1994; Newman PJ, 1994], y es responsable de adhesión celular de tipo homofílico y heterofílico. La expresión de PECAM-1 por células endoteliales se encuentra regionalizada y concentrada en las uniones gap, sugiriendo que la interacción homofílica puede tener un rol en la adhesión entre células endoteliales [Albelda SL y col. 1991]. Dicho rol fue confirmado por Fawcett J. y col. [Fawcett J y col. 1995], quien mediante PECAM-1 soluble y fragmentos Fab de anticuerpos anti PECAM-1 inhibió el crecimiento de células endoteliales *in vitro* y logró disociar tanto los contactos interendoteliales como la integridad de la monocapa durante su formación. PECAM-1 cumple un papel crucial en el proceso de migración de leucocitos a través del endotelio vascular. Anticuerpos anti-PECAM-1 o PECAM-1 soluble bloquean la migración de monocitos y neutrófilos a través de monocapas de células endoteliales *in vitro* sin bloquear la quimiotaxis ni la adhesión [Muller WA y col. 1993]. Además, anticuerpos anti-PECAM-1 bloquean la infiltración de neutrófilos en sitios de inflamación *in vivo* [Vaporciyan AA y col. 1993].

La presencia de PECAM-1 en tumores sólidos ha sido descrita y se lo ha involucrado en la adhesión de células tumorales a endotelio [Tang DG y col. 1993].

El estudio de la expresión y función de las moléculas de adhesión ha ampliado de manera significativa el conocimiento sobre los mecanismos de adhesión célula – célula y célula – matriz extracelular. Dicho conocimiento resulta fundamental para la comprensión y estudio de los procesos de progresión tumoral.

II. Cáncer de mama

El carcinoma mamario invasivo es el tipo de cáncer más común entre las mujeres, afectando en la actualidad aproximadamente una mujer de cada nueve [Lippman ME, 1993]. Luego del carcinoma pulmonar, es también el más letal [Marshall E, 1993]. A pesar de los importantes avances realizados en los últimos años en la detección y tratamiento del carcinoma de mama localizado, poco se ha progresado en el manejo terapéutico de la enfermedad cuando ésta es detectada en estadios avanzados. Los mecanismos básicos involucrados en la iniciación y desarrollo del cáncer de mama humano y su progresión maligna, son hasta el momento pobremente comprendidos.

Diversos factores de riesgo fueron identificados, incluyendo: historia menstrual y reproductiva (menarca a edad temprana, menopausia tardía, edad avanzada al nacimiento del primer hijo), historia familiar de carcinoma mamario, tratamientos hormonales, exposición a radiación, etc. Mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* han sido asociadas a susceptibilidad hereditaria a cáncer de mama. Sin embargo, aproximadamente 70 % de las mujeres que desarrollan esta enfermedad no poseen factores de riesgo identificables [Harris JR, 1993; Kelsey JL, 1996].

Por otra parte, existe gran diversidad en el comportamiento de los carcinomas mamarios, observándose patrones de evolución muy diferentes: cuando la enfermedad se manifiesta como carcinoma invasivo, algunas veces metastatiza rápidamente mientras que otras pasan de 10 a 30 años antes de que la metástasis proliferen [Smith HS y col. 1984]. Muchos cánceres humanos presentan una evolución más uniforme; por ejemplo en el carcinoma de pulmón a células pequeñas, sin quimioterapia aproximadamente 70 % de los pacientes con enfermedad en estadio I mueren en un

año y menos del 10 % sobreviven luego de dos años [Smith HS y col. 1984]. Sin embargo, el carcinoma de mama se comporta en forma más variable; mientras que ciertos tumores alcanzan gran tamaño en la mama sin invasión vascular ni linfática, en otros casos aparecen metástasis a distancia antes que se produzca un importante crecimiento del tumor primario.

Muy poco se sabe de las diferencias intrínsecas de las células de cáncer de mama que puedan explicar por si mismas este diverso comportamiento, pero los reportes concuerdan en que los tumores con mayor aneuploidía y niveles de ploidía aberrantes tienden a ser más indiferenciados, receptor-estrogénico negativos e indican peor pronóstico para la paciente [Bichel P y col. 1982].

La determinación del estadio clínico de los pacientes según la extensión de la enfermedad, el análisis histopatológico de los tumores, así como la detección de receptores de estrógeno y progesterona en el tumor, constituyen indicadores pronósticos tradicionales y representan uno de los métodos más confiables disponibles hasta el momento para predecir la evolución de la enfermedad. No obstante, es frecuentemente observado que pacientes correspondientes a un mismo estadio clínico, con igual diagnóstico histopatológico y contenido de receptores hormonales, evolucionan en forma diferente. Es por esto que grandes esfuerzos en la investigación en cáncer mamario están destinados a la búsqueda de nuevos indicadores que permitan predecir con mayor certeza la marcha de la enfermedad, y en lo posible provean información acerca de la capacidad del tumor de responder a determinadas terapias antineoplásicas.

Existe actualmente una gran variedad de drogas para el tratamiento del cáncer mamario, incluyendo agentes citotóxicos, hormonales, modificadores de la respuesta biológica, etc. La clínica oncológica cuenta con una amplia gama de tratamientos disponibles: distintos esquemas quimioterápicos, diversas modalidades de hormonoterapia, así como regímenes que contienen combinaciones de agentes que pueden actuar sinérgicamente sobre las células tumorales. No obstante, a pesar de esta creciente complejidad en las terapias del cáncer mamario, la supervivencia de las pacientes con enfermedad metastásica no ha mejorado consistentemente en las últimas décadas [Marshall E, 1993], evidenciando la necesidad de profundizar las investigaciones sobre la biología del cáncer de mama y desarrollar nuevos enfoques terapéuticos.

II-1. Heterogeneidad celular

En los carcinomas mamarios numerosos trabajos reportaron la coexistencia de subpoblaciones celulares que difieren en sus propiedades. Esta diversidad celular ha podido observarse cuando se analizaron muestras obtenidas a partir de tumores humanos con respecto a distintos parámetros, tales como: expresión de antígenos tumorales, capacidad proliferativa, presencia de receptores hormonales, sensibilidad a distintos tratamientos, ploidía, rearrreglos cromosómicos, mutaciones que activan o inactivan genes específicos, etc. [Meyer JS y Wittliff JL, 1991; Podhajcer OL y col. 1986; Szollosi J y col. 1995; Teixeira MR y col. 1995; Pavelic ZP y col. 1992; Fujii H y col. 1996 (1); Chen LC y col. 1992; Ro J y col. 1990]. **Esta heterogeneidad celular intratumoral es en gran medida responsable de los fracasos en las terapias antineoplásicas.**

La mayoría de los tumores surgen en tejidos en los que la renovación celular es permanente. En estos tejidos las células funcionales, diferenciadas, normalmente se van perdiendo y son reemplazadas por la proliferación de células más primitivas. Algunos ejemplos de tejidos basados en la renovación celular han sido muy bien descritos, como médula ósea, epidermis, mucosa intestinal o epitelio seminífero. Sin embargo, aunque en ciertos casos la renovación no resulte tan evidente, todos los epitelios mantienen su estado estacionario en esta forma, si bien sus tasas proliferativas difieren ampliamente entre ellos dependiendo de las pérdidas celulares [Potten CJ y col. 1979].

Estos tejidos contienen células primitivas, indiferenciadas, denominadas **células troncales** con capacidad de auto-renovación, manteniendo así constante su propia población, y con capacidad de originar una progenie de células que alcanzarán la diferenciación funcional, compensando las pérdidas fisiológicas [Buick RN, 1984; Buick RN y Pollak MN, 1984]. De esta forma se establece en la población celular total una jerarquía donde las células presentan propiedades que van cambiando gradualmente en forma unidireccional. Así, a medida que las células avanzan en esta jerarquía irán perdiendo progresivamente la capacidad proliferativa y adquiriendo características de diferenciación asociadas con la función específica del tejido [Buick RN, 1984; Buick RN y Pollak MN, 1984]. Por lo tanto, en tejidos normales en renovación pueden distinguirse tres categorías celulares principales:

- 1- células **troncales**, con el máximo potencial proliferativo, indiferenciadas, con capacidad de auto-renovarse y de dar origen a toda la descendencia celular;
- 2- células **transicionales** en vías de diferenciación, con capacidad proliferativa limitada dependiendo de su posición relativa en la jerarquía;
- 3- células **diferenciadas** o terminales, no proliferantes.

Estas dos últimas subpoblaciones predominan en número ampliamente respecto de las células troncales. En estos tejidos el estado estacionario es mantenido por un balance estrictamente controlado entre proliferación, diferenciación, muerte y renovación celular a partir de células troncales.

Distintas evidencias señalan que en los tumores malignos esta jerarquía celular continúa funcionando y que las neoplasias se originarían a partir de un evento carcinogénico a nivel de las células troncales del tejido [Mackillop WJ y col. 1983; Buick RN, 1984; Buick RN y Pollak MN, 1984]. Este evento alteraría los controles naturales que rigen los mecanismos por los cuales una célula troncal opta por auto-renovarse o entrar en proceso de diferenciación. El incremento de la población celular podría ocurrir por exceso de proliferación, bloqueo de la diferenciación celular, inadecuada remoción de células por el proceso normal de pérdida celular, o un desbalance entre los eventos de auto-renovación y expansión clonal en la población de células troncales [Buick RN y Pollak MN, 1984; Mackillop WJ y col. 1983; Selby P y col. 1983].

Al respecto, trabajos previos de nuestro laboratorio realizados sobre muestras de carcinomas primarios de mama humanos y la línea celular de carcinoma mamario humano MCF-7 permitieron el aislamiento de distintos tipos celulares que difieren en su índice de proliferación y expresión de marcadores tumorales [Podhajcer OL y col. 1986; Resnicoff M y col. 1987]. En dichos trabajos fue posible identificar células con características correspondientes a las tres sub-poblaciones mencionadas: troncales, transicionales y diferenciadas.

El concepto de que las células tumorales son heterogéneas con respecto a su potencial proliferativo y que existe una subpoblación de células troncales con capacidad de proliferación ilimitada, que puede originar todas las subpoblaciones restantes, tiene fundamental relevancia en el tratamiento del cáncer: Siendo las células troncales las responsables del crecimiento tumoral,

deberían ser el blanco esencial de las terapias antineoplásicas para lograr la erradicación del tumor.

III. Antígenos asociados a tumor

Como hemos discutido en la primer sección, numerosas alteraciones ocurren en las células tumorales durante la progresión neoplásica, originando la expresión anormal de diversos genes. Esto se manifiesta tanto por la aparición de productos mutados, como por la desregulación de la expresión de genes normales, expresión de genes en etapas del desarrollo inadecuadas, etc. Las células cancerosas presentarán entonces moléculas normalmente ausentes, o existentes en bajas concentraciones, en células normales. La identificación de estos productos puede resultar de gran valor en la clínica oncológica ya que representan “marcadores tumorales”.

Los “marcadores tumorales” son moléculas de muy diversas clases, presentes en el tejido tumoral o en fluidos corporales de pacientes con cáncer, cuya detección resulta de utilidad para establecer o precisar el diagnóstico, como indicador pronóstico de la evolución de la enfermedad, o para orientar o monitorear terapias.

Esta definición incluye entonces una gran cantidad de moléculas “asociadas al tumor”, ya sean propias de un tipo de tumor o de un estadio particular, o indicadoras de ciertas características como agresividad, potencial metastásico, sensibilidad o resistencia a determinados tratamientos, etc. Estas moléculas pueden estar presentes en la membrana de células tumorales, intracelularmente, en la matriz extracelular, o ser liberadas a sangre u otros fluidos corporales. Debido a la distinta naturaleza química y localización de los marcadores tumorales, las técnicas de detección serán también muy diversas, incluyendo métodos bioquímicos, inmunológicos, histoquímicos, moleculares, etc.

Una gran proporción de estas moléculas han sido identificadas mediante el uso de técnicas inmunológicas. En muchos casos fueron detectadas a través de anticuerpos xenogeneicos, es decir producidos en otras especies animales, luego de la inmunización con células de un tumor. De ahí que estos marcadores sean frecuentemente llamados “**antígenos tumorales**”, a pesar de que en la gran mayoría de los casos no despiertan una respuesta inmune específica en el paciente.

Siendo los marcadores tumorales moléculas de naturaleza tan heterogénea, resulta difícil establecer una clasificación estricta de los mismos. Sin embargo, no es el objetivo presentar aquí una revisión de los múltiples marcadores tumorales, sino describir brevemente ciertos grupos de particular relevancia, especialmente en carcinomas mamarios, y ejemplificar como éstos pueden contribuir en el diagnóstico, pronóstico y/o terapia del cáncer.

- **Antígenos oncofetales :**

Se han denominado así a moléculas que normalmente se expresan en determinados tejidos durante el desarrollo fetal, dejan de expresarse (o lo hacen en cantidades mínimas) en tejidos del adulto, y son re-expresadas en células cancerosas. Dado que estos marcadores son moléculas normales en estadios fetales, no resultan inmunogénicas cuando reaparecen en el tumor, pero pueden ser marcadores de importancia para el diagnóstico y seguimiento de tumores.

El “**antígeno carcinoembrionario**” (CEA) fue de los primeros en describirse [*Gold P y Freedman SO, 1965 (1); (2)*]. Se expresa normalmente durante los dos primeros trimestres de gestación en mucosa del tracto gastrointestinal y es re-expresado en diversos carcinomas (gastrointestinales, mama, pulmón, etc.) [*Thompson JA y col. 1991; Robbins PF y col. 1993*]. El CEA es una glicoproteína presente en la membrana plasmática, que también se libera al fluido extracelular, siendo habitualmente detectada en el suero de pacientes con carcinomas. Actualmente representa uno de los marcadores tumorales de mayor importancia clínica:

- Dado que la concentración de CEA en el suero correlaciona con el estadio de la enfermedad y particularmente con la masa tumoral, es ampliamente utilizado como marcador para diagnóstico y seguimiento de los pacientes con cáncer [*Wagener C y col. 1981; Go VLW y Zamcheck N, 1982; Seregni E y col. 1992; Bravo AI y col. 1985*].
- AMC anti-CEA son utilizados exitosamente para radioinmunolocalización de tumores que expresan CEA (CEA-positivos) [*Hertel A y col. 1990; Goldenberg DM y col. 1990*].
- Recientemente se han comenzado a desarrollar métodos de detección de micrometástasis en médula ósea y nódulos linfáticos de pacientes con carcinoma gastrointestinal o mamario, basados en la identificación de células CEA⁺ mediante la amplificación del ARNm-CEA por RT-PCR (“reverse transcriptase-polymerase chain reaction”) [*Gerhard M y col. 1994; Mori M y col. 1995*].

Como mencionamos anteriormente, el CEA pertenece a un grupo de glicoproteínas estrechamente relacionadas que constituyen una familia génica, que a su vez pertenece a la superfamilia de las Inmunoglobulinas [Khan WN y col. 1992; Thompson JA, 1995]. Aproximadamente 30 genes han sido descritos en la familia del CEA, y alguno de sus miembros, (NCA-50/90, NCA-95 y NCA-160) se expresan normalmente en membrana de granulocitos [Arakawa F y col. 1990; Audette M y col. 1987 Berling B y col. 1990]. Al igual que otros miembros de la superfamilia de las Inmunoglobulinas, ha sido descrito para varios miembros de la familia del CEA funciones en procesos de reconocimiento o adhesión celular [Benchimol S y col. 1989; Zhou H y col. 1990; McCuaig K y col. 1992] y ha sido demostrado, en modelos de metástasis experimental con ratones nude, que el CEA funciona como factor de adhesión aumentando las metástasis hepáticas por células de carcinoma colorectal [Hostetter RB y col. 1990].

En este trabajo de Tesis se utilizaron como control para diversos experimentos: el AMC B1.1 (IgM) que reconoce a la sección proteica del CEA y presenta reacción cruzada con otros miembros de la familia, como el NCA [Colcher D y col. 1983] y el AMC B6.2 (IgG1) que reconoce específicamente un epítopo proteico del NCA-90 y no presenta reacción cruzada con el CEA [Colcher D y col. 1981; Kufe DW y col. 1983; Robbins PF y col. 1993].

• **Marcadores específicos de tejido o de diferenciación:**

Son moléculas que se expresan comunmente en un determinado tejido, en cierto estadio de la diferenciación celular normal. Las células tumorales suelen presentar marcadores de diferenciación propios del tejido del cual se originan. Siendo estas moléculas normales para el organismo, evidentemente no inducirán respuesta inmunológica al ser expresadas en los tumores.

Estos marcadores, si bien no son específicos de tumor, resultan de suma importancia para establecer o precisar diagnósticos. Corrientemente, el examen de una muestra tumoral por el patólogo se basa en el análisis macro- y microscópico de rasgos arquitecturales, histológicos y citológicos. Esto, en muchos casos, permite concluir un diagnóstico certero. Sin embargo, con frecuencia la escasés o complejidad de la muestra hacen que este análisis no sea suficiente para permitir una precisa determinación del origen de la neoplasia. En estos casos resulta particularmente útil el estudio de marcadores específicos de tejido. Numerosos AMC han sido desarrollados contra distintos marcadores, y estos en general son evaluados por técnicas de inmunohistoquímica o citometría de flujo.

Estos estudios son especialmente útiles en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas, para establecer el linaje celular y estadio específico. También se utilizan habitualmente para determinar el origen de una metástasis en casos donde el tumor primario no ha sido identificado, o para detectar micrometástasis en ganglios linfáticos o médula ósea. En algunos tumores indiferenciados de origen incierto, es necesario utilizar una batería de AMC contra marcadores específicos de tejido [Batifora H, 1988]. Un ejemplo de este tipo de marcadores, ampliamente utilizado en la detección de metástasis ocultas en médula ósea, son las citoqueratinas, características de células de origen epitelial [Ellis G y col. 1989; Schlimok G y col. 1990; Azumi N y Batifora H, 1987].

• **Glicoproteínas y glicolípidos de membrana aberrantemente glicosilados:**

La mayoría de los tumores presentan en su superficie glicoproteínas y glicolípidos anormales como resultado de alteraciones en la adición secuencial de carbohidratos al "core" proteico o a la molécula lipídica [Hakomori S, 1985; Kim YS, 1992; Kim YS, 1990; Ho SB y Kim YS, 1991]. Entre los ejemplos más comunes se pueden mencionar gangliósidos aberrantes, expresados frecuentemente en melanomas humanos [Pukel CS y col. 1982] y Ags de grupos sanguíneos modificados en varios carcinomas. Puesto que los glicoconjugados presentes en la membrana plasmática están involucrados en múltiples fenómenos de reconocimiento celular, adhesión célula-célula, etc., estos cambios estructurales en los carbohidratos pueden afectar importantes propiedades de las células, y estarían estrechamente relacionados con el proceso de invasión de tejidos y comportamiento metastásico [Hakomori S, 1985; Taki T, 1996; Imai K y Makiguchi Y, 1996]. Como consecuencia de esta glicosilación aberrante pueden generarse epitopes nuevos o producirse cambios conformacionales en las moléculas y exponerse epitopes normalmente ocultos o crípticos en la estructura normal. Por lo tanto estos glicoconjugados modificados pueden servir como marcadores tumorales.

Un grupo particularmente importante dentro de este tipo de marcadores son las **mucinas**. Las mucinas son proteínas de peso molecular elevado (mayor a 200.000 Da), altamente glicosiladas, presentes en la membrana o secretadas, sintetizadas por una variedad de tejidos epiteliales. En los epitelios normales su localización está restringida a la superficie apical de células secretoras. Varias mucinas se encuentran también expresadas abundantemente en cánceres de origen epitelial. En las células tumorales las mucinas suelen presentar alteraciones en el patrón de glicosilación, lo

que provoca la exposición de regiones crípticas de la porción proteica de la molécula [Ho JJ y Kim YS, 1994; Verma M, 1994; Kim YS, 1992; Ho SB y Kim YS, 1991].

Un ejemplo muy estudiado es la mucina codificada por el gen **MUC1**, expresada y secretada en diversos epitelios normales. Esta mucina, denominada MUC1 o muy frecuentemente "mucina epitelial polimórfica" (PEM) o episalina, es una glicoproteína integral de membrana cuya porción extra-citoplasmática contiene un número variable (entre 21 y 125) de repeticiones "en tandem" de una secuencia de 20 aminoácidos, rica en serina y treonina que constituyen sitios potenciales de O-glicosilación. En el 90 % de los carcinomas mamarios, PEM se encuentra sobre-expresada y glicosilada en forma anormal (incompletamente glicosilada), lo que determina que ciertas secuencias de la unidad repetitiva, normalmente enmascaradas, queden expuestas y resulten particularmente antigénicas [Gendler SJ y col. 1990; Brockhausen I y col. 1995; Patton S y col. 1995; Girling A y col. 1989]. La expresión de PEM o MUC-1 en carcinomas ha sido relacionada con la progresión tumoral debido a observaciones realizadas tanto en carcinomas de colon, donde PEM adquiere determinantes sialil Lewis^x y sialil Lewis^a que intervienen en la unión a E-selectinas [Zhang K y col. 1994], como en carcinomas mamarios, donde debido al menor grado de glicosilación de MUC-1, quedan expuestos epítopes crípticos del "core" proteico que actúan como ligando de ICAM-1 presente en el endotelio, potenciando así la adhesión de las células tumorales al mismo [Regimbald LH y col. 1996].

Varios AMC producidos contra carcinomas mamarios humanos reconocen determinantes antigénicos de PEM y, en especial, un epítopo de 3 a 5 aminoácidos dentro de la secuencia hidrofílica "P D T R P A P" contenida en la unidad repetitiva [Briggs S y col. 1993; Burchell J y col. 1989; Nuti M y col. 1992]. Puesto que estos AMC no reconocen células de epitelios normales donde PEM es expresada correctamente, resultan de utilidad clínica para establecer diagnóstico, radiolocalizar tumores y focos metastásicos, y potencialmente para inmunoterapia [Sivolapenko GB y col. 1995; Verma M, 1994; Peterson JA y col. 1995].

Uno de ellos, el AMC 436, utilizado en este trabajo como control de diversos ensayos, fue desarrollado usando como inmunógeno un extracto celular (fracción enriquecida en membrana) preparado a partir de un conjunto de tumores metastásicos de carcinomas mamarios humanos. El epítopo reconocido fue identificado como una corta secuencia de aminoácidos en la unidad repetitiva del "core": arg-pro-ala-pro. El AMC 436 reconoce carcinomas mamarios primarios y metastásicos, así como distintas líneas

celulares de cáncer de mama, sin reaccionar con tejido mamario normal [Nuti M y col. 1992].

Otro AMC utilizado como control en este trabajo de Tesis es el AMC **MBr1**, el cual reconoce un antígeno (CaMBr1) expresado en la membrana plasmática de células de carcinoma de mama y epitelio mamario normal [Menard S y col. 1983]. El epítipo específico reconocido corresponde a un carbohidrato, el cual en tejido mamario normal en reposo y tumores benignos se encuentra sólo unido a proteínas mientras que en carcinomas se encuentra formando parte de glicoproteínas y glicolípidos [Miotti S y col. 1989]. Si bien el AMC **MBr1** reconoce este epítipo tanto en glicoproteínas como en glicolípidos, tiene preferencial reactividad con los glicolípidos [Canevari S y col. 1983; Bremer EG y col. 1984; Viale G y col. 1989]. El AMC **MBr1** ha sido acoplado a toxinas, obteniéndose distintos inmunoconjugados con propósitos terapéuticos [Orlandi R y col. 1988] y también ha sido generado un anticuerpo quimérico murino/humano, con capacidad de mediar reacciones de citotoxicidad celular (ADCC) y lisis por complemento [Orlandi R y col. 1992].

Entre las glicosilaciones aberrantes también es relevante mencionar la expresión en diversos carcinomas (colon y mama principalmente; y en menor grado pulmón) y en algunas leucemias, de determinantes del grupo Lewis: Lewis^a, Lewis^x, sialil Lewis^a, sialil Lewis^x [Ver Anexo IV: Fórmula y biosíntesis de antígenos del grupo Lewis].

De éstos determinantes, el más exhaustivamente investigado es el tetrasacárido sialil Lewis^x: constitutivamente expresado en glicoproteínas de membrana de granulocitos, actúa como ligando de las E- y P- selectinas expresadas por el endotelio en respuesta a un estímulo inflamatorio. Como mencionamos anteriormente, el reconocimiento selectinas – sialil Lewis^x produce una disminución en la velocidad de movimiento de los granulocitos a lo largo de la pared endotelial o “efecto rolling”, que constituye el primer paso en el proceso de extravascularización [Revisiones: Zimmerman GA y col. 1992; Springer TA, 1994; Lasky LA, 1995]. Este rolling permite que los granulocitos tengan contacto con quimiotractantes de las células endoteliales, los cuales activan (vía proteína G) a las β_2 -integrinas, que a su vez reconocen a las ICAM-1 de las células endoteliales, estableciendo una fuerte unión granulocito – endotelio. El último paso comprende la penetración de los granulocitos entre las uniones celulares inter-endoteliales (resultado de interacciones homotípicas de PECAM-1), finalizando así con

la extravascularización [Zimmerman GA y col. 1992; Springer TA, 1994; Fukuda M, 1996].

De estos tres pasos, el rolling constituye el paso crítico, puesto que si el mismo es inhibido por anticuerpos anti-sialil Lewis^x o anti-selectinas o por oligosacáridos o glicolípidos conteniendo sialil Lewis^x se obtiene la inhibición de todo el proceso de extravasación [Fukuda M, 1994; Mulligan MS y col. 1993].

Entre las alteraciones descritas en células tumorales que afectan al patrón de glicosilación, se ha descrito la up-regulación o aumento en los niveles de expresión de α 1-3 fucosiltransferasas (FTs) (enzimas normalmente presentes sólo en granulocitos y encargadas de fucosilar los lactosaminoglicanos para formar los determinantes Lewis^x. [Ver Anexo IV: Fórmula y biosíntesis de antígenos del grupo Lewis]) tanto en carcinoma de colon [Kudo T y col. 1998; Majuri ML y col 1995], de pulmón [Martin-Satue M y col. 1998; Ogawa J y col. 1996] y de mama. Debido a las mencionadas alteraciones es posible obtener, expresados en la superficie de las células tumorales, determinantes del grupo Lewis, entre los que se encuentra sialil Lewis^x.

Puesto que, como mencionamos anteriormente, se plantea un paralelismo entre el proceso de extravasación de los granulocitos en respuesta a agentes inflamatorios y el comportamiento de las células de un carcinoma invasivo en el proceso de la metástasis [Fukuda M, 1996], la adquisición de éstos determinantes fucosilados en la membrana de las células neoplásicas se ha relacionado con el potencial invasivo de las mismas [Okazaki K y col. 1998; Nakamori S y col. 1997; Saitoh O y col. 1992; Martin-Satue M y col. 1998]. Además, ha sido reportado que mayores niveles de expresión de sialil Lewis^x en los tumores correlacionan con peor pronóstico para los pacientes [Nakamori S y col. 1993; Shimodaira K y col. 1997].

Por consiguiente, muchos AMC han sido producidos contra sialil Lewis^x con la idea de estudiar su uso en el bloqueo de los pasos iniciales de la progresión tumoral y determinar su potencial aplicación en la terapéutica del cancer. También están en activa investigación estrategias anti-cáncer basadas en la down-regulación de la expresión de sialil Lewis^x, vía inhibición de la actividad de las FTs [Ogawa J y col. 1996].

• Oncogenes :

Los proto-oncogenes codifican para proteínas que actúan normalmente como factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señales, reguladores transcripcionales y reguladores de funciones nucleares. Este sistema integrado juega un rol fundamental en el control de la proliferación celular. Distintas alteraciones en estos genes pueden conducir a su activación, transformándolos en **oncogenes**. Los oncogenes pueden codificar para proteínas cuya expresión en las células tumorales sea sólo cuantitativamente diferente a la de las células normales (por amplificación genética o sobre-expresión), o para productos cualitativamente diferentes (por mutaciones en la secuencia codificante). En ambos casos la identificación de estos oncogenes o sus productos resulta importante, ya que pueden servir como marcadores tumorales de valor pronóstico, diagnóstico, y aún terapéutico.

Uno de los oncogenes más frecuentemente alterados en cáncer y por lo tanto más investigados como marcador tumoral es el ***erbB-2***, también llamado ***HER-2/neu***. Este gen codifica para un receptor transmembrana de 185 kDa con actividad de tirosina kinasa, altamente homólogo al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [Bargmann CI y col. 1986; Yamamoto T y col. 1986]. *erbB-2* es un miembro de una familia de genes relacionados que incluye además a *erbB-1* (gen del EGFR), *erbB-3* y *erbB-4*; los cuatro genes son generalmente co-expresados en distintas combinaciones, en diversos tejidos humanos. Una variedad de péptidos ligandos con capacidad de estimular al receptor *erbB-2* han sido descritos, llamados en conjunto neuregulinas (NRGs). Distintos estudios mostraron que estos no se unen directamente a *erbB-2*, sino que *erbB-3* y *erbB-4* actúan como coreceptores: las NRGs se unen a *erbB-3* y *erbB-4* y la heterodimerización de los receptores permite la activación de *erbB-2* [Hynes NE y Stern DF, 1994]. Se ha demostrado que las NRGs pueden inducir crecimiento y diferenciación en células epiteliales, gliales y musculares, y cumplen roles esenciales durante el desarrollo embrionario [Meyer D y Birchmeier C, 1995].

Distintos mecanismos pueden llevar a la activación de *erbB-2* transformándolo en oncogénico, básicamente: 1) sobre-expresión de la proteína normal, ya sea por amplificación genética y/o alteraciones en la transcripción y 2) mutaciones puntuales en el dominio transmembrana [Hynes NE y Stern DF, 1994]. *erbB-2* se encuentra amplificado y/o sobre-expresado en diversos cánceres humanos, principalmente carcinomas de mama, ovario, gástrico y de pulmón [Hung M-C y col. 1995; Hynes NE y Stern DF, 1994]. En carcinoma mamario, en particular, estudios clínicos han reportado que *erbB-2* está amplificado/sobre-expresado en aproximadamente un 30 %

de los mismos y que los elevados niveles de expresión de *erbB-2* correlacionan con pobre pronóstico. Esta observación ha impulsado importantes áreas de investigación, tratando de determinar su rol en la progresión neoplásica, su utilidad como marcador pronóstico y/o predictivo de respuestas a terapias y su potencial uso como un blanco terapéutico.

Distintas estrategias han sido descritas, y su posible aplicación clínica es aún objeto de estudio. Diversos AMC generados contra el dominio extracelular de la proteína *erbB-2* inhiben el crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo* al ser utilizados solos [Hartwerth IM y col. 1992; Hudziak RM y col. 1987; Kasprzyk PG y col. 1992] o acoplados a drogas quimioterapéuticas o radioisótopos [Hancock MC y col. 1991; De Santes K y col. 1992]. En modelos animales, la sobre-expresión de *erbB-2* en células tumorales aumentó la malignidad y el potencial metastásico; mientras que la inhibición de la expresión de este gen suprimió el fenotipo maligno [Hung M-C y col. 1995]. Ciertos inhibidores de la transcripción del promotor *erbB-2* fueron administrados a ratones portadores de tumor (mediante liposomas o vectores adecuados), lográndose suprimir el crecimiento tumoral y aumentar la sobrevida [Hung M-C y col. 1995]. Estos resultados son alentadores en cuanto al posible desarrollo de terapias anti-tumorales dirigidas a *erbB-2* en humanos.

• **Genes supresores de tumor :**

Otro grupo de genes que juegan un rol esencial en la regulación de la proliferación celular son los “supresores de tumor”. Estos genes codifican para proteínas que actúan normalmente limitando la proliferación; por lo tanto su inactivación puede provocar la pérdida del control de la división celular, resultando en una proliferación descontrolada. Deleciones o mutaciones que inactiven a estos genes pueden ser críticas en la iniciación y progresión neoplásica. La identificación de estas alteraciones –tanto a nivel de ADN, ARN o proteína– puede resultar de gran valor para el diagnóstico, pronóstico, monitoreo y tratamiento del cáncer.

Un ejemplo interesante es el gen *p53*. La inactivación de este gen es el evento genético más frecuentemente detectado en cánceres humanos. *p53* está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica para una proteína nuclear de 53 kDa que funciona como un regulador negativo de la proliferación y se expresa en la mayoría de las células del organismo [Revisiones: Hinds PW y Weinberg RA, 1994; Malkin D, 1994; Donehower LA y Bradley A, 1993]. La proteína *p53* actúa como factor transcripcional, regulando la expresión de otros genes. Entre ellos induce la

transcripción del gen *WAF1* (= *CIP1* = *p21*) cuyo producto se une al complejo de ciclina G₁- Cdk2 (Cdk2: proteína kinasa dependiente de ciclina) que normalmente permite a la célula atravesar la transición G₁/S del ciclo celular. La unión del producto de *WAF1* inhibe la actividad de este complejo, bloqueando así el pasaje a fase S.

En células normales los niveles de p53 son bajos y están regulados durante el ciclo celular: p53 aumenta en fase G₁ tardía y es degradada rápidamente (vida media: 30 a 60 minutos). Estos niveles se incrementan en respuesta a la presencia de daños en el ADN, determinando la detención del ciclo celular antes de la transición G₁/S. Esto permite a la célula reparar su ADN, de lo contrario entra en proceso de apoptosis [Hinds PW y Weinberg RA, 1994; Malkin D, 1994]. En aquellas células donde p53 está inactivada la detención en G₁ no ocurre y el ADN alterado se replica, fijándose la mutación. Esto puede representar uno de los pasos importantes en la iniciación del cáncer: al no estar p53 o estar inactiva, se pierde un sistema que podría bloquear la proliferación de células que han sufrido una mutación carcinogénica. A su vez, esto permite la generación y fijación de posteriores mutaciones importantes en la progresión neoplásica [Lane DP, 1992; Malkin D, 1994].

Distintos tipos de mutaciones en *p53* han sido detectadas en múltiples cánceres humanos (mama, colon, gástrico, tumores de sistema nervioso, etc.). Cuando estas alteraciones fueron analizadas, el patrón más frecuentemente observado resultó ser: una mutación puntual (generalmente sustitución de un aminoácido por otro) en uno de los alelos de *p53*, acompañada por pérdida del otro alelo. Sin embargo, en algunos casos pudo identificarse un tipo particular de mutantes que presentaba: un alelo salvaje y el otro con una mutación dominante que codifica para una proteína inactiva, cuya conformación se encuentra alterada. En estos mutantes la oligomerización entre proteínas salvajes y mutantes (*p53* normalmente se agrega formando oligómeros) determina que el complejo adopte una conformación alterada y sea inactivo [Donehower LA y Bradley A, 1993; Malkin D, 1994].

Un análisis detallado de las mutaciones de *p53* detectadas en tumores mostró que la gran mayoría ocurren en determinados "puntos calientes" localizados en regiones muy conservadas en la evolución. En carcinomas de colon y mama más del 90 % de las mutaciones observadas mapean en cuatro "puntos calientes". En contraste con la proteína *p53* salvaje, estas formas mutantes resultan ser más estables y acumularse intracelularmente; por lo tanto pueden ser fácilmente detectadas por inmunohistoquímica [Donehower LA y Bradley A, 1993; Finlay CA y col. 1988].

Diversos trabajos han demostrado que la determinación de estas alteraciones de p53 en el tejido tumoral puede ser un buen indicador pronóstico de la sobrevida y evolución del paciente [Donehower LA y Bradley A, 1993]. En general, la presencia de altos niveles de p53 determinados por inmunohistoquímica, o la detección directa de mutaciones por técnicas moleculares, han sido asociadas con mal pronóstico. Esto fue especialmente demostrado en carcinomas mamarios, en los que se ha propuesto que p53 puede servir como marcador, contribuyendo a identificar aquellos pacientes sin metástasis en ganglios linfáticos regionales, pero cuyos tumores son de crecimiento agresivo, y en los cuales es necesario una quimio- u hormono-terapia adyuvante [Allred DC, 1993; Silvestrini R y col. 1993 (2); Patel DD y col. 1996; Bergh J y col. 1995]. Si bien hay aún algunos resultados controversiales respecto del uso de p53 como marcador, la discusión está básicamente centrada en la técnica utilizada para detectar las mutaciones y no en el valor pronóstico de éstas [Sjogren S y col. 1996; Kovach JS y col. 1996; Chen YH y col. 1995; Lohmann D y col. 1993].

• **Receptores hormonales :**

Algunos tumores, como el carcinoma mamario, son especialmente influenciados en su comportamiento por la acción de distintas hormonas. En estos casos la determinación de la presencia de receptores hormonales en el tumor representa un marcador de gran valor. En carcinomas mamarios por ejemplo, la evaluación de receptores de estrógeno (RE) y de progesterona (RPg) resulta doblemente importante: permite predecir la respuesta clínica a tratamientos endócrinos, ya que se ha demostrado que la capacidad de responder a hormonoterapia está asociada con la presencia en el tumor de RE y RPg, y tiene valor a nivel pronóstico, ya que se ha determinado que pacientes cuyos tumores presentan RE y RPg evolucionan más favorable que aquellos que carecen de estos receptores. Cabe señalar, sin embargo, que la respuesta a terapias hormonales suele ser transitoria, observándose frecuentemente una evolución hacia la hormono-resistencia. Los mecanismos por los cuales tumores inicialmente respondedores se vuelven hormono-resistentes no son aún comprendidos, pero se lo relaciona con la heterogeneidad celular característica de los carcinomas mamarios, ya que la expresión de estos receptores no es uniforme en todas las células del tumor, sino que se expresan en células diferenciadas [Ballaré C y col 1989; Ballaré C y col. 1991] y están ausentes en las células troncales, que serían resistentes a la terapia.

Numerosos estudios, realizados tanto en tumores primarios como en líneas celulares de carcinoma mamario humano, han demostrado que los estrógenos actúan como agentes mitogénicos, induciendo la proliferación celular. De ahí que la terapia

hormonal más ampliamente aceptada se base en el uso de antagonistas de estrógenos, como el tamoxifeno [Chalbos D y col. 1982; Kung WM y col. 1986; Osborne CK y Arteaga CL, 1990; Jeng MH y col. 1993].

Diversos autores demostraron que la progesterona ejerce un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular en cáncer de mama humano [Sutherland RL y col. 1988; Musgrove EA y col. 1991; Gill PG y col. 1991] e inhibe el efecto mitogénico del estradiol. Mas aún, las progestinas son utilizadas con éxito en el tratamiento del cáncer mamario, siendo la segunda opción en terapias endócrinas [Hissom JR y Moore MR, 1987; Chalbos D y Galtier F, 1994; Harris JF y col. 1993].

IV. Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos son inmunoglobulinas producidas por el organismo en respuesta a la presencia de sustancias extrañas, denominadas antígenos. Los anticuerpos poseen una región de unión específica que reconoce un determinante antigénico o epítope, en la molécula de antígeno. La unión Ag-Ac es de naturaleza física y, en determinados casos, inicia una serie de procesos biológicos que resultan en la destrucción y eliminación del antígeno, o de la célula portadora del mismo.

Durante muchos años se han realizado investigaciones tendientes a desarrollar anticuerpos que reconozcan moléculas diferencialmente expresadas en tumores, con el fin de utilizarlos en diagnóstico y terapias antitumorales. Los primeros trabajos se llevaron a cabo inmunizando animales con células tumorales o extractos de las mismas y esto permitió obtener anticuerpos con cierto grado de especificidad hacia el tejido tumoral, pero simultáneamente se obtenían otros dirigidos contra diversas moléculas comunes a tejidos normales. La purificación de los anticuerpos de interés a partir del suero del animal, con la idea de obtener mayor especificidad, requería de múltiples adsorciones que acarrearaban una disminución de la potencia y concentración del anticuerpo. Posteriormente, y con la idea de disminuir la producción de anticuerpos inespecíficos, en algunos trabajos se usaron como inmunógenos antígenos purificados en lugar de extractos celulares, lo cual a su vez restringía el número de anticuerpos disponibles en la práctica.

Utilizando estos **anticuerpos policlonales** se desarrollaron técnicas inmunológicas que posibilitaron la identificación de células tumorales o moléculas secretadas por

éstas, sobre muestras de tejido (biopsias) o suero de los pacientes con cáncer. Estas técnicas (como la inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, el uso de anticuerpos unidos a isótopos radioactivos, etc.) contribuyeron significativamente en el diagnóstico y tipificación de tumores. Sin embargo, estos anticuerpos reaccionan frecuentemente en forma cruzada con moléculas propias de tejidos normales, afectando la interpretación de los resultados.

A los fines terapéuticos su utilización ha sido muy limitada por diversos factores, incluyendo: la necesidad de inyectar altos niveles de proteína (con el consecuente riesgo de anafilaxis al no ser el suero de origen humano), la reactividad cruzada con tejidos normales y la dificultad de normalizar los distintos lotes de un anticuerpo.

En 1975 Köhler y Milstein reportaron la producción de anticuerpos homogéneos denominados **anticuerpos monoclonales**, lo que representó un extraordinario avance que permitió superar en gran medida los problemas antes mencionados. Estos AMC poseían una especificidad única y eran producidos a partir de células híbridas resultantes de la fusión de una célula productora de anticuerpos (linfocito B) sensibilizada contra un determinado antígeno y una célula proveniente de un mieloma. Esta célula híbrida o **hibridoma** secretaba anticuerpos cuya especificidad estaba determinada por el linfocito B y era a su vez virtualmente inmortal debido a la naturaleza maligna del mieloma [Köhler G y Milstein C, 1975]. La técnica evolucionó rápidamente eliminándose la contaminación con anticuerpos derivados del mieloma (utilizando una línea celular de mieloma no secretora) [Galfre G y Milstein C, 1981].

Desde entonces una inmensa variedad de AMC han sido desarrollados contra diversos tipos de antígenos tumorales.

La posibilidad de producir en gran escala AMC contra marcadores tumorales ha generado grandes expectativas en cuanto a su uso para lograr diagnósticos y tratamientos antitumorales más efectivos y selectivos. Además, esta tecnología también permite generar AMC contra antígenos tumorales todavía no conocidos, permitiendo así identificarlos y estudiarlos.

IV-1. Utilización de AMC en el diagnóstico y terapia del cáncer

El advenimiento de la tecnología de hibridoma representó un importante salto en el campo de la inmunología tumoral [Schlom J y col. 1991]. Como resultado de la misma,

gran número de AMC han sido producidos contra cáncer de mama humano [Devine PL y col. 1991; Annibali NV y col. 1994; Blottiere HM y col. 1991; Larocca D y col. 1991; Keydar I y col. 1989; Nuti M y col. 1992; Canevari S y col. 1983; Pancino GF y col. 1987] con la idea de identificar y caracterizar antígenos asociados a tumor, estudiar su uso como marcadores tumorales y sus posibles aplicaciones en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer.

Las aplicaciones actuales de los AMCs en oncología se resumen en la siguiente Tabla.

Aplicaciones actuales de AMCs en oncología

Diagnóstico y detección
• Inmunohistoquímica para detectar y clasificar tipos celulares por presencia o ausencia de marcadores en muestras de tumores o extendidos celulares • Análisis de fluídos corporales (suero, orina, derrames pleurales, etc.) para la detección de sustancias marcadoras por inmunoensayos • Imágenes con AMCs radiomarcados (RID), incluyendo linfocentellografía • Detección y intraoperatoria con AMCs radiomarcados como sondas
Tratamiento
• Citotoxicidad directa de AMCs (mediada por Complemento o ADCC) • Inhibición de receptores de factores de crecimiento • Inmunoconjugados (radioisótopos, drogas, toxinas) • Purga de células tumorales (<i>ex vivo</i>) de médula ósea almacenada para autotransplante • Vacunas anti-idiotípicas

[Adaptado de Goldenberg DM, 1993]

- A los fines **diagnósticos** los AMC han resultado de suma utilidad tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*:

In vitro se utilizan de rutina en una gran variedad de determinaciones sobre muestras tumorales o fluídos corporales, ya sea para establecer diagnósticos más precisos, determinar el origen de un tumor o metástasis, evaluar el grado de avance de la enfermedad y pronóstico, predecir respuestas a terapias, etc. En la actualidad es

posible evaluar la gran mayoría de los marcadores descriptos previamente (antígenos oncofetales, marcadores de diferenciación, oncogenes, genes supresores de tumor, presencia de receptores hormonales, etc.) mediante el empleo de AMC.

Las primeras aplicaciones de anticuerpos *in vivo* en el diagnóstico de pacientes con cáncer se realizaron con el fin de detectar la presencia y localización de tumores primarios o focos metastásicos, utilizándose para ello anticuerpos conjugados con radioisótopos. Por medio del monitoreo visual externo es posible detectar el radioinmunoconjugado que, dada su especificidad por algún marcador tumoral, deberá localizarse mayoritariamente en la zona del tumor. Este método de diagnóstico por imágenes, denominado radioinmuno-detección, se ha perfeccionado mucho y su uso se ha extendido ampliamente en los últimos años. Inicialmente varios estudios fueron realizados utilizando anticuerpos policlonales antitumorales en modelos animales y luego en pacientes [Goldenberg DM y col. 1974; Goldemberg DM y col. 1978; Mach JP y col. 1974; Mach JP y col. 1980; Ford CHJ y Casson AG, 1986]. Con el desarrollo de los AMC los radioinmunoconjugados resultaron herramientas ideales para detectar metástasis ocultas, realizar monitoreo post-quirúrgico y detectar recurrencias tempranamente [Colcher D y col. 1987; Esteban JM y col. 1987; Goldenberg DM y col. 1990; Hertel A y col. 1990; Gallinger S y col. 1993; Doerr RJ y col. 1991]. Para esto se requieren AMC que reconozcan con alta especificidad antígenos expresados en las células tumorales, ya que la reactividad del AMC con células normales podría conducir –por mecanismos inmunológicos– a daños en el tejido.

Una gran variedad de AMCs se ha utilizado en radioinmunodetección de carcinomas de colon, recto, mama, vejiga, y páncreas, así como también de sarcomas, melanoma y leucemias [Perkins AC y Pimm MV, 1991]. Entre ellos podemos citar AMCs anti-CEA para detectar tumores de colon y mama [Goldemberg DM y col. 1990; Goldemberg DM y Larson SM, 1992], anti-AFP para tumores de línea germinal e hígado, [Baum RP y col. 1991] y AMC LL2 para localización y estadificación de linfoma no-Hodgkin [Blend MJ y col. 1995].

- Por otra parte el **uso terapéutico** en pacientes con cáncer de AMC dirigidos contra marcadores tumorales es actualmente un área de intensa investigación. Distintas estrategias de aplicación han sido desarrolladas, dependiendo de las propiedades del AMC y de la naturaleza y localización celular del antígeno que éste reconoce. Estos AMC pueden utilizarse solos (no modificados) o conjugados con agentes citotóxicos.

La aplicación del **AMC no conjugado** requiere que su unión al antígeno específico pueda desencadenar alguna reacción de citotoxicidad directa hacia la célula blanco, o bien interferir con la proliferación y diferenciación celular. Aquellos AMC con capacidad de mediar reacciones inmunológicas de citotoxicidad celular (ADCC = citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo), o bien lisis a través del sistema de complemento humano, pueden en principio ser utilizados sin modificaciones. Además, es necesario que el antígeno correspondiente sea expresado en la superficie celular, y que el complejo antígeno-AMC no sea rápidamente internalizado, sino que permanezca en la membrana celular el tiempo suficiente para permitir que ocurra la reacción de citotoxicidad. Es también importante que el antígeno esté presente en la gran mayoría de las células tumorales, o al menos en la subpoblación de células troncales, responsables de la proliferación celular en el tumor.

Por otra parte, diversos agentes citotóxicos como toxinas, drogas o radioisótopos, han sido conjugados a AMC con propósitos terapéuticos. El uso de AMC como vehículos para dirigir drogas citotóxicas o prodrogas [Kerr DE y col. 1995], radioisótopos o toxinas [Pagliaro LC y col. 1998] requiere el reconocimiento de un antígeno en la superficie de las células cancerosas, seguido generalmente de la endocitosis del conjugado AMC-droga o toxina. También en este caso es importante tener en cuenta qué población celular dentro del tumor expresa el antígeno, y será por lo tanto blanco de la terapia. Con respecto al empleo de radioinmunoconjugados, la heterogeneidad antigénica es en principio menos problemática, puesto que se requieren algunas células que expresen el antígeno para dirigir los radioisótopos al tumor, donde el efecto tóxico sería ejercido sobre las células vecinas independientemente de la expresión antigénica, puesto que los isótopos asesinos (emisores α o β) pueden matar a distancias de hasta 50 diámetros celulares [Schlom J, 1986].

En los últimos años se han desarrollado múltiples estrategias terapéuticas, incluyendo:

- el acoplamiento de AMC a diferentes drogas, toxinas o radioisótopos, y la utilización de distintas técnicas de conjugación.
- el uso de diversos protocolos de tratamiento, terapias combinadas de AMC con citoquinas o con agentes quimioterapéuticos.
- la construcción de AMC quiméricos recombinantes humano/murinos para disminuir la formación de anticuerpos humanos anti-inmunoglobulinas de ratón (HAMA).
- la utilización de fragmentos de AMC [Fab o F(ab')₂] para aumentar la difusión y penetración del AMC en el tumor.

Varias de estas estrategias han sido probadas en modelos animales con resultados alentadores y actualmente se están ensayando en humanos [*George A y col. 1994; Riethmuller G y col. 1994; Bajorin D y col. 1990; Orlandi R y col. 1992; Wawrzynczac EJ y Derbyshire EJ, 1992; Trail PA y col. 1993; Carrasquillo JA y col. 1986; Bast RC y col. 1985; Nadler LM y col. 1984; Myklebust AT y col. 1993*]. También podemos citar el anti-CD20 quimérico para linfoma no-Hodgkin de bajo grado [*Shan D y col. 1998*], el anti-pl185^{HER2} para cáncer de mama [*Pegram MD y col. 1998*]

Tratamientos con AMC, ya sea en conjunción con complemento o conjugados con agentes citotóxicos, se utilizan exitosamente para eliminar in vitro células tumorales a partir de médula ósea, en pacientes sometidos a trasplantes autólogos [*Hammert LC y col. 1997; Mehta J y col. 1997*].

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que:

- el carcinoma de mama invasivo es el más frecuente en las mujeres
- luego del carcinoma pulmonar, es el que presenta mayor índice de mortalidad
- la sobrevida de las pacientes con cáncer de mama no ha aumentado significativamente en los últimos 20 años, pese a los avances realizados en la detección y tratamiento de carcinomas localizados

se hace evidente la necesidad de desarrollar terapias alternativas, entre la cuales la inmunoterapia con AMCs, dirigidos específicamente contra antígenos asociados a tumor, parece ser un buen candidato.

Sin embargo, los ensayos clínicos realizados en los últimos años usando AMCs en el tratamiento de tumores sólidos han producido resultados modestos sin que se evidencien importantes mejoras en la sobrevida. Entre las causas argumentadas para explicar estas fallas terapéuticas se encuentra la heterogeneidad en la expresión de antígenos en las células tumorales.

Como mencionamos en la Introducción, existe una gran heterogeneidad celular en los tumores sólidos. De hecho, en el carcinoma de mama se han identificado subpoblaciones celulares correspondientes a distintos estadios de diferenciación. Entre las mismas, de particular relevancia resultan las células troncales tumorales puesto que poseen capacidad ilimitada de proliferación y son las responsables del crecimiento y diseminación del tumor. Por lo tanto esta subpoblación debería ser el blanco principal de las terapias antineoplásicas, y en particular de la inmunoterapia, para lograr la erradicación el tumor.

En base a lo expuesto, el objetivo principal de este trabajo de Tesis es la obtención de AMCs dirigidos, en forma exclusiva o no, contra células troncales de carcinoma mamario humano, caracterizar e identificar los antígenos reconocidos por los mismos y evaluar la posible utilidad diagnóstica y/o terapéutica de dichos AMCs.

Puesto que las células troncales predominan en los tumores humanos más indiferenciados, para lograr este fin se usó como inmunógeno células aisladas de un cáncer de mama humano, primario, indiferenciado y negativo para receptores hormonales. De todos los clones de hibridoma producidos, uno resultó especialmente interesante por su características: **el AMC FC-2.15** y se prosiguió con su estudio.

En el **Capítulo I** se resumen los datos de obtención y reactividad del AMC FC-2.15 contra cáncer y tejidos normales.

En el **Capítulo II** se presenta la identificación y caracterización de los antígenos reconocidos por el AMC FC-2.15, tanto en las neoplasias FC-2.15-positivas como en leucocitos polimorfonucleares (PMN), principal reacción cruzada del AMC FC-2.15.

Desde el punto de vista funcional, en el **Capítulo III** se estudió la interacción del AMC FC-2.15 con células de carcinoma mamario humano MCF-7 y con PMN tanto en estudios *in vitro* como en un sistema *ex vivo* de circulación sanguínea.

CAPITULO I

Capítulo I: Descripción del AMC FC-2.15

Introducción

El cáncer de mama es el mas común entre las mujeres, afectando aproximadamente a una de cada nueve mujeres en la actualidad [Lippman ME, 1993] y luego del cáncer de pulmón es también el más letal [Marshall E, 1993]. Pese a los enormes progresos realizados en la detección y tratamiento de los carcinomas mamarios localizados, la sobrevida de las pacientes con cáncer de mama no ha aumentado significativamente en los ultimos quince años [Marshall E, 1992; Marshall E, 1993] evidenciando la necesidad de desarrollar distintos enfoques terapéuticos.

La inmunoterapia adoptiva con anticuerpos monoclonales (AMC) posibilitaría, en caso de reconocer antígenos (Ag) expresados preponderantemente por las células tumorales, una acción selectiva sobre las mismas, ya sea de los AMC no conjugados (en caso de mediar efectos citotóxicos por fijación de complemento (C') o citotoxicidad celular (ADCC)) o bien unidos a alguna sustancia tóxica (radioisótopos, drogas quimioterápicas o toxinas). En los últimos años se han realizado diversos ensayos clínicos usando AMC en la terapia del cáncer. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos llevados a cabo en pacientes con tumores sólidos han producido resultados modestos, sin que se evidencie un patrón consistente de respuesta o importantes mejoras en la sobrevida [LoBuglio A y col. 1988; Bajorin D y col. 1990; Saleh M y col. 1992, Saleh M y col. 1993; Alpaugh RK y col. 1998], y sólo recientemente algunos reportes alentadores han comenzado a aparecer [Riethmüller G y col. 1994; George A y col. 1994; Adkins JC y Spencer CM, 1998; Cheung NK y col. 1998]. Algunas causas argumentadas para explicar estas limitaciones terapéuticas han sido la heterogeneidad en la expresión de Ags en las células tumorales y la unión del AMC a Ags irrelevantes.

Resulta entonces de particular importancia el estudio de las características biológicas de las células tumorales y los antígenos asociados a tumor (AAT) con el fin de desarrollar AMC específicos contra los mismos.

Diversos estudios han demostrado la existencia de una gran heterogeneidad celular en tumores sólidos, siendo la diferenciación celular una de las causas de tal diversidad. En los carcinomas de mama se han identificado subpoblaciones celulares

correspondientes a distintos estadios de diferenciación, como ser: células "stem" o troncales, altamente indiferenciadas y con el mayor potencial proliferativo, células semidiferenciadas y células diferenciadas que han perdido su capacidad de proliferar [Buick RN y Pollak MM, 1984; Podhajcer OL y col. 1986]. Siendo las células troncales las responsables del crecimiento y diseminación tumoral, deberían ser el blanco principal de las terapias antineoplásicas, y en particular de la inmunoterapia, para lograr la erradicación del tumor.

En nuestro Laboratorio se han descripto distintas subpoblaciones celulares en cáncer de mama humano y se ha trabajado en la identificación y caracterización de las mismas, con la idea de encontrar antígenos específicos "marcadores" de cada una de ellas [Podhajcer OL y col. 1986; Ballaré C y col. 1991; Ballaré C y col. 1993] y pudo ser establecida una secuencia de expresión antigénica a través de la diferenciación celular. Así, las células troncales se caracterizaron, además de por su alta tasa proliferativa, por la baja expresión de marcadores tales como antígeno carcinoembrionario (CEA) [Podhajcer OL y col. 1986; Resnicoff M y col. 1987; Podhajcer OL y col. 1988; Sorin I y col. 1988], receptor de estrógeno (ER) [Ballaré C y col. 1989] y receptor de progesterona (PgR) [Ballaré C y col. 1991].

Con la idea de obtener AMC que reconocieran Ags expresados en células troncales de carcinoma mamario, se inmunizaron ratones Balb/c con células intactas obtenidas de un paciente con un carcinoma de mama agresivo y altamente indiferenciado, negativo para la expresión de ER y PgR.

Se obtuvieron una variedad de AMC contra cáncer de mama humano, seleccionándose principalmente aquellos con capacidad de reaccionar contra células troncales. Entre éstos, el AMC FC-2.15 presentó características particularmente interesantes que justificaron proseguir su estudio. En el presente capítulo se resumen los datos de obtención y reactividad del AMC FC-2.15 contra tejidos neoplásicos y normales.

Resultados

I-1. Obtención del AMC FC-2.15

Para la obtención de AMC dirigidos preponderantemente contra células troncales de cáncer de mama humano, se inmunizaron ratones Balb/c con células de

un carcinoma mamario humano altamente indiferenciado. Luego de la fusión de los esplenocitos murinos con células del mieloma murino NS0/1, los hibridomas resultantes fueron seleccionados en primera instancia por la fuerte reactividad contra las células del tumor utilizado para la inmunización y por la ausencia de reactividad contra linfocitos humanos, establecidas ambas por inmunocitoquímica (ICQ). Dieciseis hibridomas resultaron elegidos, y 6 de ellos fueron posteriormente seleccionados basados en su crecimiento vigoroso y su reactividad contra carcinomas mamarios. El AMC descrito en este trabajo de Tesis, el AMC FC-2.15, de isotipo IgM, resultó el más interesante y por lo tanto se prosiguió con su estudio.

I-2. Reactividad del AMC FC-2.15 con carcinomas mamarios

La reactividad del AMC FC-2.15 contra 33 carcinomas mamarios primarios de diverso tipo histológico fue ensayada por la técnica de inmunohistoquímica (IH). El AMC FC-2.15 reaccionó con la mayoría (31/33, 93,9%) de los carcinomas, independientemente de su tipo histológico y su grado de diferenciación (expresión de ER y PgR). Reconoció en los mismos, en promedio, al 80 % de las células tumorales y con una intensidad moderada-alta.

Con la idea de determinar si el AMC FC-2.15 reconoce a las células proliferantes del tumor (entre las que se encontrarían las células troncales), se realizó la determinación simultánea de síntesis de ADN (por incorporación de [³H] timidina) y reactividad del AMC FC-2.15 (por IH) en 16 carcinomas mamarios primarios. El AMC FC-2.15 reaccionó con el 100 % de los mismos, reconociendo en ellos, en promedio, a casi el 90 % de las células proliferantes.

En la **Figura I.1** se muestra, a modo de ejemplo, la reactividad del AMC FC-2.15 con 2 carcinomas primarios de mama que fueron utilizados posteriormente para la preparación de extracto antigénico.

En cuanto a patologías mamarias benignas, es importante mencionar que el AMC FC-2.15 reconoce débilmente y en un bajo porcentaje celular, muestras de adenosis y quistes benignos de mama, mientras que en fibroadenomas se observa una fuerte reactividad con los ductos hiperplásicos.

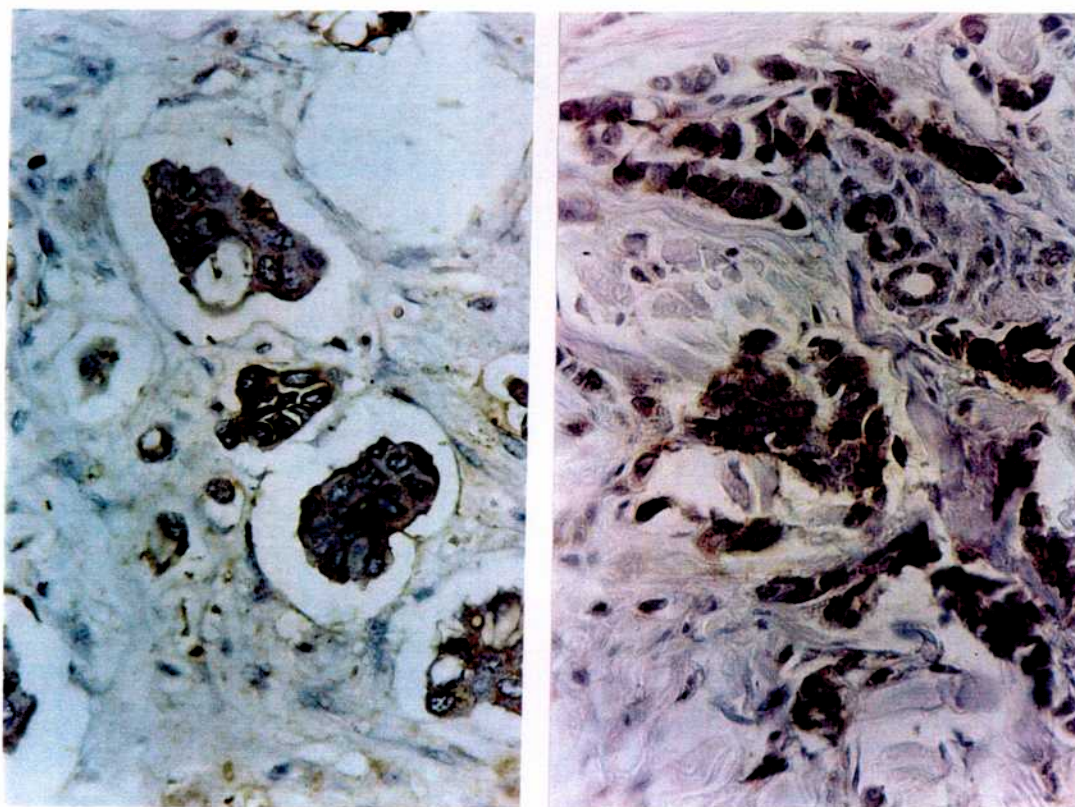


Figura I.1: *Reactividad del AMC FC-2.15 con carcinomas primarios de mama.*

Inmunohistoquímica realizada con el AMC FC-2.15 (50 µg/ml) sobre carcinomas de mama primarios. Aumento: 400 X

I-3. Reactividad del AMC FC-2.15 con otras neoplasias

La reactividad del AMC FC-2.15 con otras neoplasias fue probada por la técnica de IH. De los resultados obtenidos, mostrados en la **Tabla I.1**, es importante destacar que el AMC FC-2.15 también reacciona fuertemente con carcinoma de colon, próstata y células Sternberg de linfoma de Hodgkin.

I-4. Reactividad del AMC FC-2.15 con tejidos normales

La reactividad del AMC FC-2.15 contra tejidos normales fue ensayada por IH y los resultados obtenidos están resumidos en la **Tabla I.2**. De los mismos, es relevante

mencionar que el AMC FC-2.15 presenta escaso reconocimiento de los siguientes tejidos humanos normales: no fue detectada reacción alguna con mama normal, ganglios linfáticos, pulmón, pulpa blanca del bazo, hígado, neuronas cerebrales y cerebelares y tiroides. Una débil positividad fue observada en testículo, ovario, intestino delgado, acinos pancreáticos, axones cerebrales y cerebelares, epidermis, músculo esquelético y glándulas sebáceas. Fuerte reactividad fue detectada sólo en intestino grueso, pulpa roja del bazo, túbulos proximales de riñón, progenie mieloide de médula ósea y leucocitos polimorfonucleares (PMN).

NEOPLASIA	POSITIVIDAD		
	Tumores ^a	Células ^b	Intensidad ^c
Carcinomas			
Colon	2/2	67-100%	+++
Piel (squamous)	1/1	67-100%	+
Laringe	1/1	1-33%	+
Utero	1/1	67-100%	+
Tiroides	1/1	67-100%	+++
Ovario	1/1	1-33%	++
Prostate	1/1	67-100%	+
Riñón (células claras)	1/1	34-66%	+
Otros			
Melanoma metastásico	4/12	67-100%	+
Epitelioma basocelular	1/1	1-33%	+
Linfoma de Hodgkin (células Sternberg)	1/1	67-100%	+++
Fibrohistiocitoma	1/1	1-33%	+
Leiomioma	0/1	-	-
Liposarcoma	0/1	-	-

Tabla I.1: Reactividad del AMC FC-2.15 con neoplasias humanas

La reactividad del AMC FC-2.15 (50µg/ml) contra diferentes neoplasias fue ensayada por IH. ^a Número de tumores positivos/tumores totales; ^b los porcentajes de células tumorales positivas se expresan en 3 categorías: 1-33%, 34-66%, 67-100%. El total de las células tumorales fue considerado como 100%; ^c La intensidad de reacción fue evaluada como: + = débilmente positiva, ++ = moderadamente positiva, +++ = fuertemente positiva.

TEJIDO	POSITIVIDAD		
	Casos ^a	Células ^b	Intensidad ^c
Patologías benignas			
Mama			
Enfermedad quística	1/1	1-33%	+
Adenosis	3/3	1-33%	+
Fibroadenoma (ductos hiperplásicos)	4/4	67-100%	+++
Tejidos normales			
Riñón (túbulos cont. proximales)	1/1	67-100%	+++
Médula ósea mieloide	8/8	67-100%	+++
Granulocitos periféricos	7/7	67-100%	+++
Bazo	1/1		
Pulpa blanca		-	-
Pulpa roja		67-100%	+++
Intestino grueso	1/1	67-100%	+++
Estómago	1/1	34-66%	+
Endocervix	1/1	34-66%	+
Endometrio	1/1	34-66%	+
Glándula adrenal	1/1	1-33%	+
Músculo esquelético	1/1	1-33%	+
Testículo	1/1	1-33%	+
Ovario	1/1	1-33%	+
Intestino delgado	1/1	1-33%	++
Epidermis	1/1	1-33%	+
Glándula sebacea	1/1	1-33%	+
Acinos pancreáticos	1/1	1-33%	+
Cerebro	1/1		
Neuronas		-	-
Axones		1-33%	+
Cerebelo	1/1		
Neuronas		-	-
Axones		1-33%	+
Hígado	0/1	-	-
Pulmón	0/1	-	-
Mama	0/2	-	-
Tiroides	0/1	-	-
Ganglios linfáticos	0/1	-	-

Tabla I.2: Reactividad del AMC FC-2.15 con patologías benignas de mama y tejidos normales.

La reactividad del AMC FC-2.15 (50µg/ml) contra diferentes patologías benignas y tejidos normales fue ensayada por IH. ^a Número de casos positivos/casos totales; ^b los porcentajes de células positivas se expresan en 3 categorías: 1-33%, 34-66%, 67-100%. ^c La intensidad de reacción fue evaluada como: + = débilmente positiva, ++ = moderadamente positiva, +++ = fuertemente positiva.

I-5. Reactividad del AMC FC-2.15 con líneas celulares de carcinoma de mama humano

Para estudiar la reactividad del AMC FC-2.15 contra las diferentes líneas celulares de carcinoma mamario humano que disponemos en el Laboratorio fueron realizadas tanto inmunocitoquímica (ICQ) como inmunofluorescencia (IF) indirecta sobre células fijadas o en suspensión (según se indica en cada caso) con el AMC FC-2.15, según se especifica en Materiales y Métodos, secciones IV-2 y IV-3.

En primera instancia se realizó una ICQ sobre las líneas celulares MCF-7, T47D, MDA-231 y IIB-BR-G fijadas tanto con formaldehído 4 % como con acetona fría. Los resultados obtenidos fueron diferentes para cada una de las líneas. Como se muestra en la **Figura I.2**, las células MCF-7 resultaron muy positivas, mientras que las células T47D presentaron una gran heterogeneidad en su positividad, observándose desde células muy reactivas hasta células negativas. Por el contrario, las líneas celulares IIB-BR-G y MDA-231 fueron negativas.

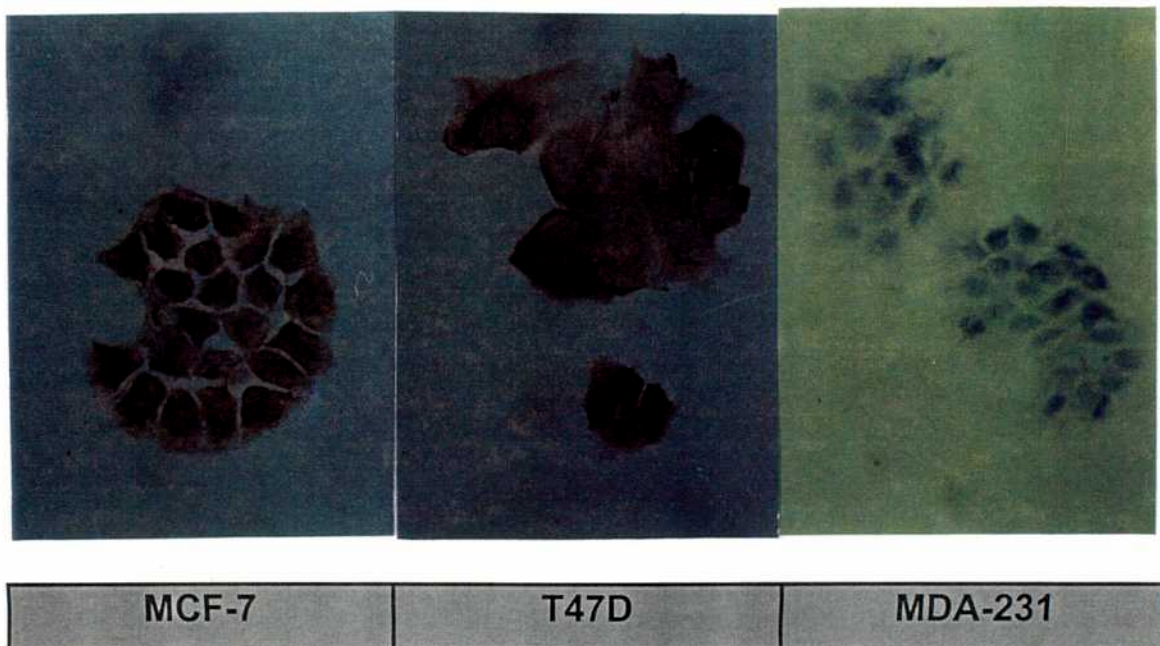


Figura I.2: Reactividad del AMC FC-2.15 con líneas celulares de carcinoma mamario humano.

Inmunocitoquímica realizada con el AMC FC-2.15 (50 µg/ml) sobre distintas líneas celulares de cáncer de mama humano. Aumento: 400 X

Con respecto a la estabilidad del Ag FC-2.15, el mismo fue bien preservado tanto en las fijaciones con formaldehído como con acetona. Para determinar la localización del mismo, fueron realizadas IF de células MCF-7 vivas en suspensión a 4 °C o bien crecidas sobre portaobjetos y los resultados obtenidos, mostrados en la **Figura I.3A**, permiten observar claramente un fuerte reforzamiento en la membrana plasmática, indicando que el Ag FC-2.15 está expresado en la superficie celular, datos coherentes con lo observado en las ICQ realizadas sobre PMN aislados de sangre periférica (**Figura I.3B**) y células aisladas de médula ósea normal.

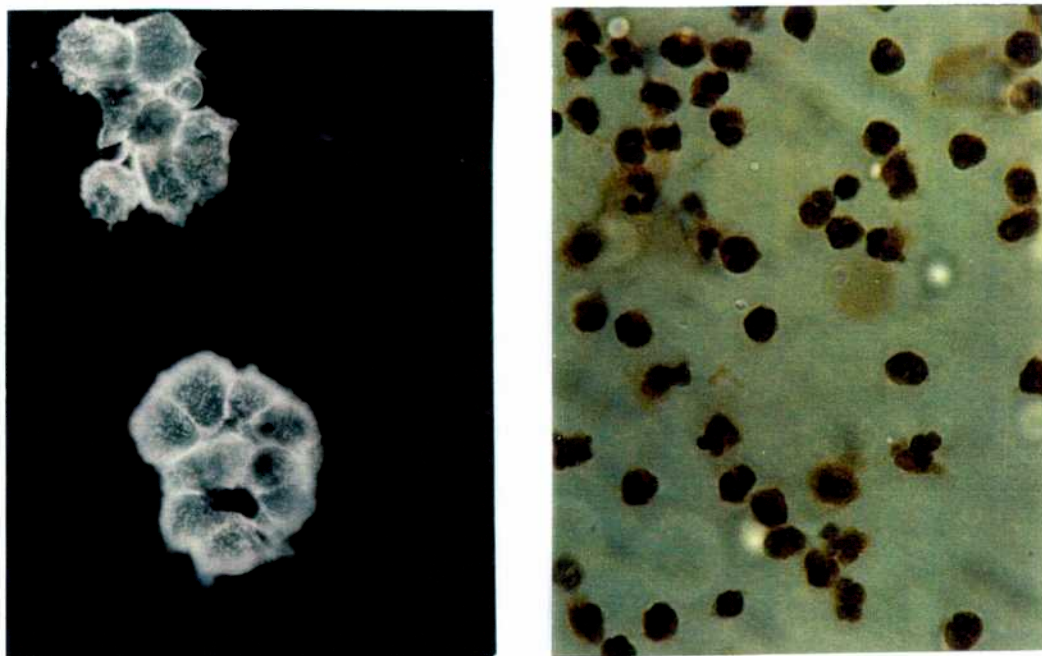


Figura I.3: Localización del Ag FC-2.15

Se observa una fuerte reacción del AMC FC-2.15 (50 µg/ml) con la membrana plasmática tanto en la IF realizada sobre células MCF-7 vivas, a 4 °C, como en la IH realizada sobre PMN.

I-6. Reactividad del AMC FC-2.15 con carcinoma de colon y leucemias humanas

En base a los resultados mencionados hasta ahora, resultó de sumo interés la fuerte reactividad del AMC contra carcinoma de colon humano y su principal reacción cruzada con los PMN. Por lo tanto, fueron realizados experimentos posteriores tendientes a profundizar la caracterización del AMC FC-2.15 en cuanto a su

reactividad, analizando mayor número de líneas celulares y carcinomas de colon humano y determinando su reactividad con leucemias humanas.

Fue llevado a cabo, en primera instancia, IF indirecta sobre las líneas de carcinoma de colon humano que disponemos en el Laboratorio: HCT-116, HT-29, CACO-2, T-84 y DLD-1. Los resultados revelaron gran heterogeneidad en cuanto a la expresión del Ag FC-2.15, observándose para las diferentes líneas distinto porcentaje de células positivas con variada intensidad. Las más reactivas resultaron las DLD-1 y T-84, en las que puede observarse un bajo porcentaje de células reactivas (aproximadamente el 30%) pero con alta intensidad; en CACO-2 y HT-29 el porcentaje de células muy reactivas es aún menor (7%) y HCT-116 es negativa. Igual a lo observado con las células MCF-7, la reacción del AMC FC-2.15 es netamente de membrana plasmática. También se realizó ICQ sobre las líneas de melanoma que disponemos en el laboratorio, fijadas con formaldehído, y las mismas resultaron negativas para la expresión del Ag FC-2.15.

En cuanto a la reactividad con carcinomas de colon humano, el AMC FC-2.15 reaccionó con el 95,8 % (23/24) de los carcinomas analizados. En la mayoría de ellos (14/24) reconoció un gran porcentaje (> 70 %) de las células tumorales y con intensidad moderada-marcada. En el resto de los carcinomas (10/24), el AMC FC-2.15 fue reactivo con 10% - 40% de células tumorales y con intensidad leve. Es interesante mencionar que los PMN presentes tanto en los infiltrados inflamatorios como adyacentes al endotelio fueron fuertemente positivos.

La **Figura I.4** muestra, a modo de ejemplo, imágenes de la IF realizada sobre las células DLD-1 y T-84 y de la IH sobre 2 carcinomas de colon humanos fuertemente positivos. La tinción de peroxidasa se detectó principalmente en la membrana plasmática, tanto en las células tumorales como en los PMN infiltrantes.

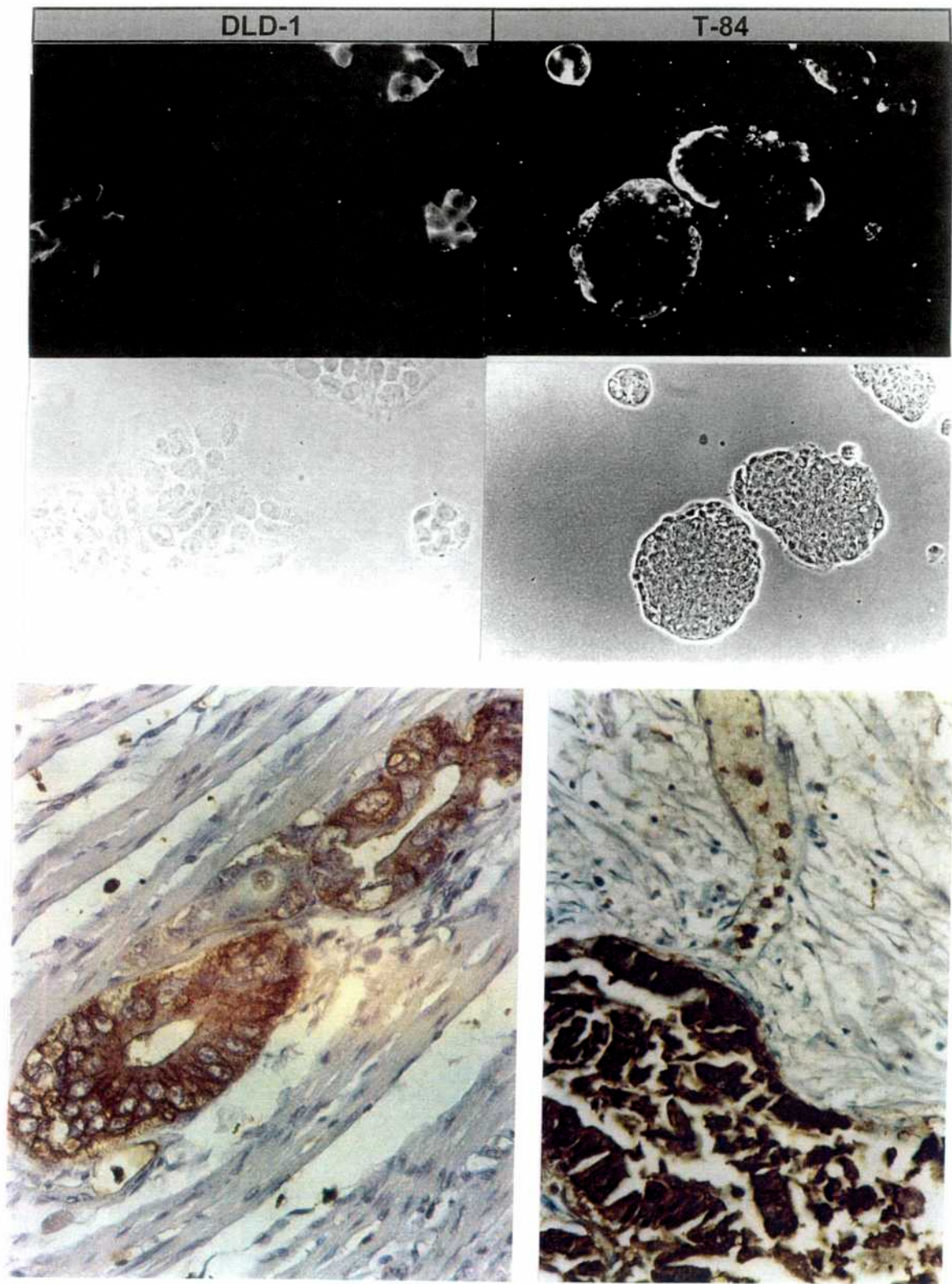


Figura I.4: Reactividad del AMC FC-2.15 con carcinoma de colon humano

Inmufluorescencia realizada sobre las líneas celulares DLD-1 y T-84 crecidas en placas de 35 mm de diámetro con el AMC FC-2.15 a 50 $\mu\text{g/ml}$ (panel superior); IH sobre cortes histológicos de carcinomas de colon humano con el AMC FC-2.15 a igual concentración (panel inferior).

Como se mencionó anteriormente, debido a la reacción cruzada del AMC FC-2.15 con PMN periféricos, se quiso determinar si el AMC FC-2.15 es capaz de reaccionar también con células de leucemias humanas. Por lo tanto, a partir de muestras disponibles de sangre periférica, punciones de médula ósea o plasmaferesis de pacientes con diferentes tipos de leucemias, se realizó la extracción de células blanco como se describe en Materiales y Métodos, sección . Para determinar la reactividad del AMC FC-2.15 con las mismas, fueron realizadas IF utilizando PBS como control negativo. Los datos obtenidos, especificando el tipo de leucemia y el porcentaje de células positivas, se resumen en la **Tabla I.3**.

LEUCEMIA	CLASIFICACION	REACTIVIDAD CON AMC FC-2.15
1 (L.I.)	LLC	NEG.
2 (B.)	LMA-M2	11 %
3 (K.)	LMC	73 %
4 (C.B.)	LMA-PM	13 %
5 (C.B.)	LMA-PM	12,5 %
6 (J.C.G.)	?	19,1 %
7 (A.S.)	LL	NEG:
8 (J.A.)	LMA-M2	21,25 %
9 (J.P)	LMA-PM	NEG.
10 (F.C.)	LMA-M3	NEG
11 (R.M.)	?	5 %
12 (A.M.)	LMC	83 %

Tabla I.3: Reactividad del AMC FC-2.15 con células de leucemia humanas

La reactividad del AMC FC-2.15 con células aisladas de leucemias humanas fue determinada por IF con AMC FC-2.15, 50 µg/ml. Los datos se expresan como porcentaje de células positivas/células totales, promedio del recuento en por lo menos 10 campos al azar.

LLC: Leucemia linfoide crónica; LMA: Leucemia mieloide aguda; LMC: Leucemia mieloide crónica; PM: promielocítica; LL: Leucemia linfoide; NEG: negativo.

En base a los datos obtenidos puede destacarse que las leucemias linfoides analizadas son negativas, resultado esperado ya que el AMC FC-2.15 reacciona con granulocitos de sangre periférica sin presentar reacción cruzada con la serie linfoide. En cuanto a las leucemias de la serie mieloide, puede concluirse que a mayor grado

de diferenciación aumenta el porcentaje de células reactivas con el AMC FC-2.15, siendo éste del 73% - 83% en las leucemias mieloides crónicas (LMC) analizadas, donde las células son principalmente granulocitos maduros.

La técnica de IF nos brinda información sobre el número de células positivas, pero debido a la falta de tinción nuclear es difícil saber de que tipo celular se trata. Fueron realizadas entonces IH sobre frotis que se prepararon para cada leucemia, fijados tanto con formol como con metanol. Esta técnica permitió, debido a que se realizó tinción nuclear de contraste con hematoxilina de Harris, la determinación del tipo celular positivo. Fueron analizados los frotis de los pacientes para el AMC FC-2.15, realizándose controles en ausencia de anticuerpo (PBS) o con un anticuerpo comercial anti CD34, marcador de diferenciación temprano del linaje mieloide.

Los resultados obtenidos indican que, a medida que la leucemia es más diferenciada hay mayor porcentaje de células positivas para el AMC FC-2.15, y el Ag FC-2.15 parece comenzar a expresarse en células que ya han segmentado su núcleo. También es interesante notar que el anticuerpo anti CD34 es levemente positivo en células mas indiferenciadas, no reconocidas por el AMC FC-2.15.

Discusión

Muchos AMC dirigidos contra cáncer de mama humano se han descrito en los últimos años, pero su reactividad contra las diferentes poblaciones subcelulares ha recibido poca atención. Su aplicación en la clínica ha producido resultados modestos sin lograr importantes mejoras en la sobrevida de los pacientes. Estas limitaciones terapéuticas han sido explicadas, en parte, debido a la heterogeneidad en la expresión de los diferentes Ags por las células tumorales.

Puesto que la eliminación de la subpoblación de células troncales es probablemente esencial para lograr respuestas clínicas superiores a remisiones temporarias, el objetivo de esta primera etapa del trabajo fue la obtención de un AMC dirigido preponderantemente contra las células troncales de cáncer de mama humano.

En este capítulo se describió entonces la obtención y reactividad del AMC FC-2.15, el cual reconoce la gran mayoría de las células proliferantes de un alto porcentaje de los carcinomas mamarios. Para su obtención, fueron inmunizados ratones Balb/c con células provenientes de un paciente con un agresivo carcinoma mamario indiferenciado, negativo para ER y PgR, estrategia seguida con la idea de minimizar la producción de AMC dirigidos contra antígenos asociados a la diferenciación celular.

El AMC FC-2.15 seleccionado cumple con los requisitos propuestos, puesto que reacciona con el 93,9 % de los carcinomas mamarios, reconociendo en ellos, en promedio, al 80 % de las células tumorales y al 90 % de las células proliferantes, entre las que se encuentran las células troncales del tumor. Además, dicho AMC presenta, en general, escaso reconocimiento con tejidos humanos normales, a excepción de intestino grueso, pulpa roja del bazo, progenie mieloide de médula ósea y PMN.

El AMC FC-2.15 es también reactivo, aunque en diferente grado, con una variedad de otras neoplasias, entre las que se destacan por su fuerte reactividad, los carcinomas de colon, próstata y las células Sternberg de linfoma de Hodgkin. Debido a la fuerte reactividad del AMC con PMN, se estudió también el mismo con leucemias humanas, y es relevante mencionar el fuerte reconocimiento del AMC FC-2.15 contra LMC, donde el número de PMN maduros se encuentra aumentado. A diferencia de lo observado en carcinomas mamarios, donde el Ag FC-2.15 se expresaría en células indiferenciadas y diferenciadas, los resultados obtenidos indicarían que el Ag FC-2.15 se adquiriría tarde en la maduración de la serie mieloide. Esto se corrobora puesto que en las leucemias mieloides más indiferenciadas, el AMC FC-2.15 reconoce un bajo porcentaje de las células, las que ya tienen el núcleo segmentado y son negativas para la expresión de CD34, un marcador de diferenciación temprano de la serie mieloide.

En cuanto al Ag FC-2.15, el mismo es bien preservado tanto en las fijaciones con formaldehído como con acetona, y las IF indirectas realizadas con las líneas celulares vivas y a 4°C estarían indicando una localización en superficie celular.

Para que un AMC pueda ser usado en el tratamiento del cáncer de mama, es esencial que reconozca Ag de membrana presentes en la gran mayoría de los carcinomas mamarios y expresados por las células proliferantes. Si se reúnen estas condiciones, AMC no conjugados podrían eventualmente llevar a la erradicación del tumor ya sea por mecanismos citotóxicos de fijación de C' o citotoxicidad celular. Considerando los resultados aquí expuestos, el AMC FC-2.15 es un buen candidato para la inmunoterapia, puesto que reconoce Ag presentes en la membrana plasmática de la mayoría de las células tumorales, incluyendo las células proliferantes del tumor. Mayores estudios, tendientes tanto a la caracterización e identificación de los Ags reconocidos como a sus propiedades funcionales, son entonces justificados. También

resulta importante profundizar la caracterización de la reactividad del AMC FC-2.15 tanto en carcinomas de colon como en LMC, donde el AMC FC-2.15 también podría tener una aplicación clínica.

CAPITULO II

Capítulo II: Identificación y caracterización de los antígenos reconocidos por el AMC FC-2.15

Introducción

Como se describió en el Capítulo anterior, el AMC FC-2.15 reacciona con la mayoría de los carcinomas mamarios humanos, reconociendo Ag presentes en la membrana plasmática de la mayoría de las células proliferantes del tumor. Además, el AMC FC-2.15 presenta escaso reconocimiento con tejidos humanos normales, siendo la principal reacción cruzada con PMN y progenie mieloide de la médula ósea.

Los datos arriba mencionados, junto con el hecho de que el AMC FC-2.15 presenta un potente efecto citotóxico contra células de carcinoma mamario mediado por fijación de complemento (C') humano [Ballaré C y col. 1995], hacen de nuestro AMC un buen candidato para la inmunoterapia del cáncer de mama.

Mayores estudios tendientes a la caracterización e identificación de los Ags reconocidos por el AMC FC-2.15, tanto en carcinomas mamarios como en tejidos normales (PMN) son entonces justificados. Debido a la fuerte reactividad del AMC FC-2.15 con carcinomas de colon y con leucemias mieloides crónicas (LMC), la caracterización antigénica en estas patologías será también estudiada.

La identificación de los Ags reconocidos por el AMC FC-2.15 resulta de gran importancia porque aportará datos sobre un, no sabemos si nuevo o ya descrito, marcador tumoral. Esto permitirá, en parte, mayor conocimiento sobre la fisiología de la célula tumoral en cuanto a su expresión diferencial de Ags, permitirá estudiar la expresión antigénica durante la progresión tumoral (tanto en tumores sólidos como leucemias) y determinar su uso como factores de diagnóstico y pronóstico.

Resultados

II-1. Identificación del Ag FC-2.15 en carcinoma mamario humano y PMN

En base a lo expuesto, se realizaron una serie de experimentos tendientes a la identificación de los Ags reconocidos por el AMC FC-2.15. En primera instancia se

quiso identificarlos en carcinoma mamario, para lo cual se utilizó como modelo la línea celular MCF-7. Por lo tanto fueron realizados Western Blot sobre lisados celulares de MCF-7 utilizando distintos métodos (proteína A iodada, segundo anticuerpo (anti-IgM murina) conjugado con peroxidasa o con fosfatasa alcalina), pero los resultados obtenidos no fueron concluyentes puesto que la positividad de las bandas no era significativa contra un fondo considerablemente alto y los resultados no eran reproducibles (datos no mostrados).

Debido a los mencionados intentos fallidos, se cambió la estrategia y se decidió usar como fuente de Ag biopsias de tumores humanos por presentar las siguientes ventajas: a) disponibilidad de mayor variedad de los mismos que de líneas celulares para la elección de alguno con alta expresión antigénica y b) factibilidad de trabajar con mayor masa para la preparación de extractos.

Se realizó entonces un screening por la técnica de inmunohistoquímica (IH) entre tumores primarios de mama de pacientes y tumores de las distintas líneas celulares AMC FC-2.15-positivas desarrollados en ratones nude. Se seleccionaron para la identificación del Ag FC-2.15 tanto tumores de la línea celular MCF-7 como tumores de mama de 2 pacientes (EG y ZG). A partir de los mismos se preparó extracto antigénico (fracción enriquecida en membrana y en citoplasma) y la presencia de antígeno en las mismas fue analizada por Western Blot en condiciones reductoras y desnaturalizantes, como se describe en Materiales y Métodos, sección VI-5, utilizando el AMC FC-2.15 a 50 µg/ml, PBS como control negativo e IgM total murina (50 µg/ml) como control inespecífico. El AMC FC-2.15 reconoció en los extractos de membrana probados 3 bandas correspondientes a 160 kDa, 130 kDa y 115 kDa. En la **Figura II.1**, se muestra el resultado obtenido para el extracto de membrana de MCF-7 y, a modo de ejemplo, para uno de los tumores primarios humanos. Es importante mencionar que no hubo reactividad con los extractos citoplasmáticos y que no se detectaron bandas en los controles negativo e inespecífico (no mostrado).

Se quiso determinar también los Ags reconocidos en los PMN, para lo cual extractos enriquecidos en membrana de PMN fueron preparados y analizados por Western Blot. La fracción citoplasmática resultó ser negativa, mientras que en la fracción enriquecida en membranas fueron reconocidas bandas de 250 kDa, 185 kDa y 105 kDa (**Figura II.1, calle C**).

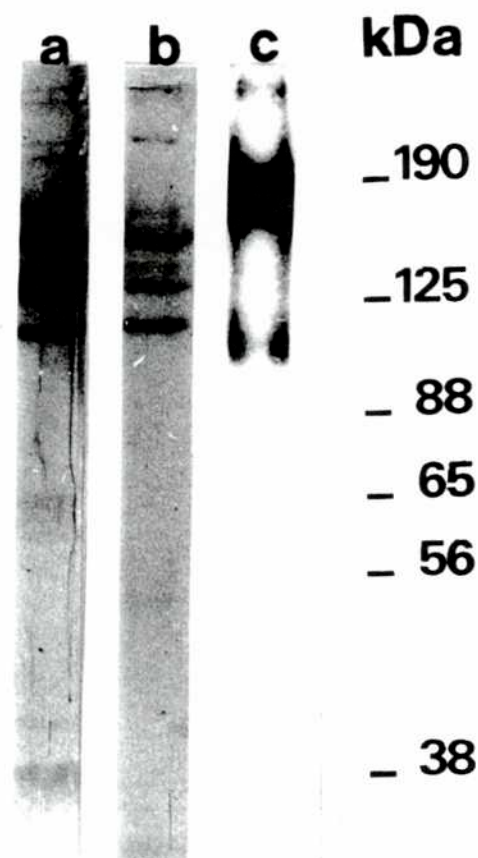


Figura II.1: Análisis de la reactividad del FC-2.15

Extractos de membrana preparados como se indica en Materiales y Métodos fueron analizados por Western Blot. a) tumor MCF-7 desarrollado en ratones nude, b) tumor de mama primario, c) PMN periféricos. El AMC FC-2.15 fue utilizado a 50 μ g/ml. Los marcadores de peso molecular se indican a la derecha.

Para corroborar la especificidad de este reconocimiento, se realizaron Western Blot controles, tanto en ausencia del primer anticuerpo (adicionando PBS en lugar del AMC FC-2.15) donde no se detectó banda alguna, como un control de tejido negativo, para lo que se eligió (como tejido más similar y con posibilidad de utilizar iguales técnicas de aislamiento y preparación de extracto que las usadas para PMN) linfocitos aislados de sangre periférica de donadores normales. En este último caso, y como puede verse en la **Figura II.2A**, el AMC FC-2.15 no reconoció ninguna banda en extracto de linfocitos, mientras que reaccionó con las tres bandas anteriormente descritas cuando se analizó, como comparación, el extracto de membranas de PMN.

Debido a la semejanza de pesos moleculares existente entre los Ags reconocidos por el AMC FC-2.15 y Ags previamente descriptos presentes tanto en membrana de PMN como de diversos tumores (entre los que se encuentra el carcinoma mamario y de colon), como son el antígeno carcinoembrionario (CEA) [Cournoyer D y col. 1988] y el antígeno NCA (nonspecific cross-reactive antigen) [Allard WJ y col. 1994; Kuroki M y col. 1990], se decidió realizar controles adicionales. Por lo tanto fueron realizados Western Blot utilizando como primer Ac el AMC **B1.1** (reactivo con el CEA y otras glicoproteínas (gp) miembros de la familia del CEA) [Colcher D y col. 1983] o el AMC **B6.2** (reactivo con el NCA) [Kufe DW y col. 1983]. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura II.2B** donde puede verse que las bandas reconocidas por ambos AMC controles difieren de las reconocidas por el AMC FC-2.15. El AMC B1.1 detecta 2 bandas de 180 kDa y 90 kDa mientras que el AMC B6.2 detecta sólo la banda de 90 kDa, indicando que los Ags en estudio serían diferentes de las formas de CEA y NCA reconocidas por los AMC controles.

Con la idea de realizar una mayor caracterización antigénica se llevaron a cabo análisis de Western Blot sobre geles desnaturalizantes, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, obteniéndose en ambos casos idénticos resultados como se muestra en la **Figura II.3A**. Ello indica que para ninguna de las tres bandas la integridad del epítopo depende de puentes disulfuro.

También se llevaron a cabo Western Blot sobre geles nativos (condiciones reductoras y no reductoras). En la **Figura II.3B** se observa la región de positividad como un chorreado de poca movilidad electroforética, que prácticamente no penetra en el gel resolutivo, lo que indicaría poca carga en los Ags o que los mismos estarían formando un complejo multimérico de alto peso molecular. Los resultados nuevamente son idénticos para condiciones reductoras y no reductoras.

Es importante mencionar que similares resultados se obtuvieron al analizar en estas condiciones extractos de tumor de MCF-7 desarrollado en ratones nude (datos no mostrados).

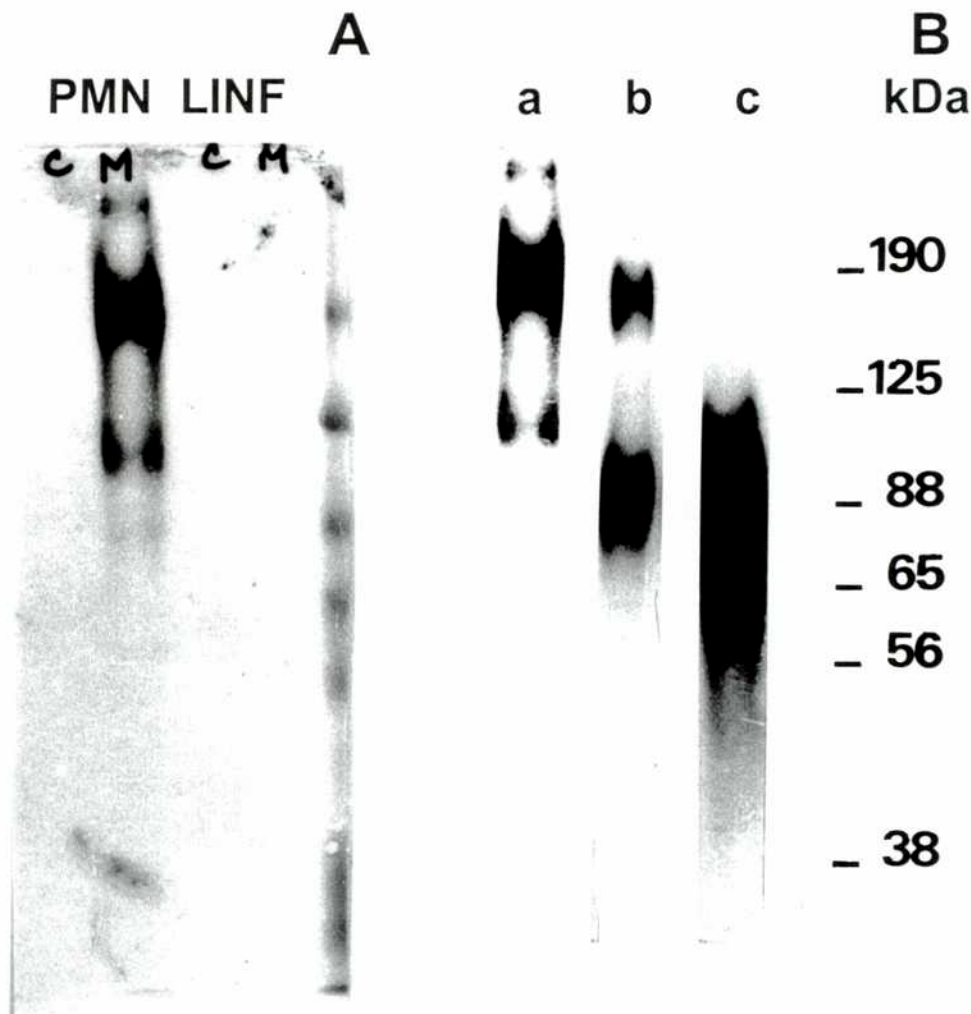


Figura II.2: Reactividad del AMC FC-2.15 con PMN. Controles realizados.

A) Western Blot realizado sobre extracto de citoplasma (C) y membrana (M) tanto de linfocitos como de PMN purificados de sangre periférica de dadores normales. B) Extractos de membrana de PMN fueron analizados por Western Blot. Calle a: AMC FC-2.15 (50 μ g/ml), calle b: AMC B1.1 (ascitis, 1/100), calle c: AMC B6.2 (ascitis, 1/100). Los marcadores de peso molecular se indican a la derecha.

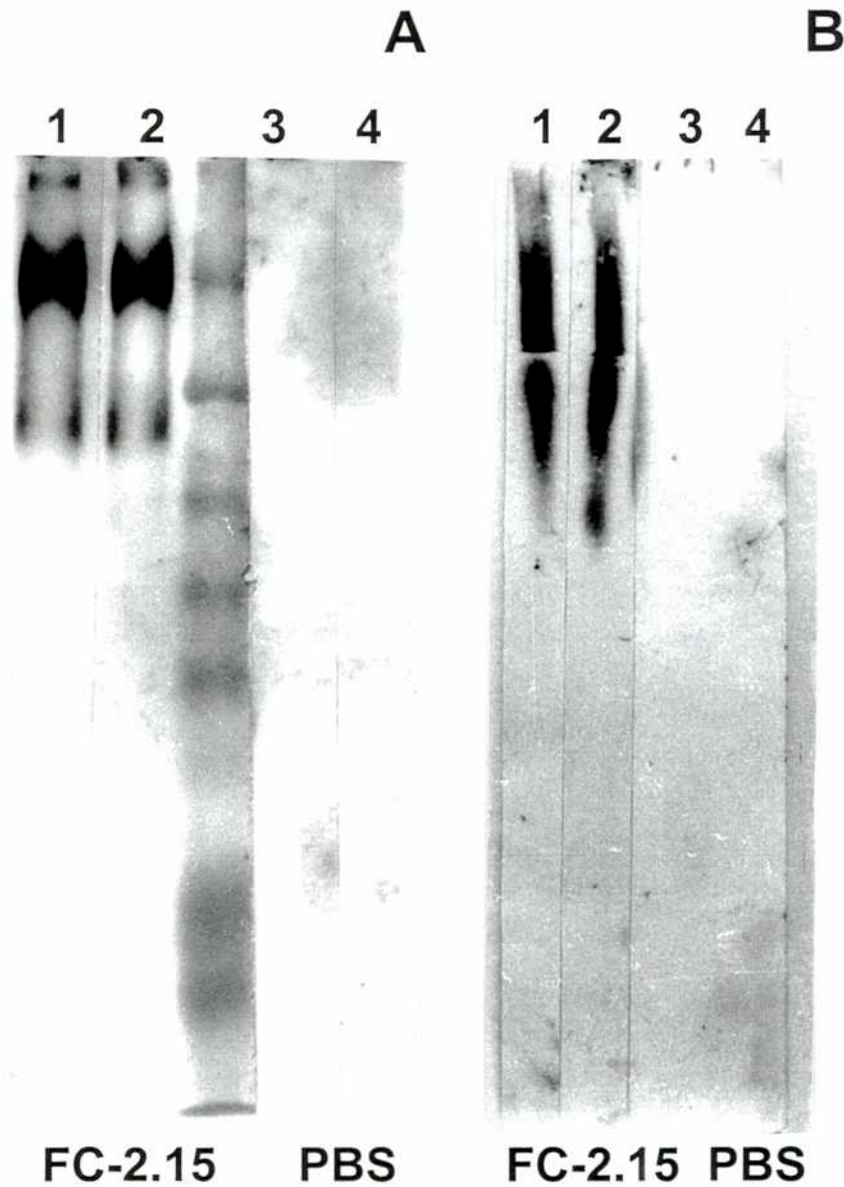


Figura II.3: Análisis de la reactividad del FC-2.15 en condiciones nativas y desnaturalizantes, reductoras y no reductoras.

Western Blot realizado sobre extracto de membrana de PMN en condiciones desnaturalizantes (A) o nativas (B). Calles 1 y 3: condiciones reductoras; calles 2 y 4: condiciones no reductoras. En las calles 1 y 2 el AMC FC-2.15 fue agregado a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mientras que en las calles 3 y 4 fue utilizado PBS como control negativo. Los marcadores de peso molecular son idénticos a los de la Figura II.2.

Geles bidimensionales fueron realizados con la idea de conocer el punto isoeléctrico (pI) de los antígenos en caracterización. Las tres bandas resultaron ser de naturaleza ácida, con pI menor o igual a 5.5 unidades para las bandas de 250 kDa y 185 kDa y un pI entre 6.15 - 6.4 unidades para la banda de menor peso molecular (no mostrado).

II-2. Determinación de la naturaleza bioquímica de los Ags FC-2.15 en carcinoma mamario humano y PMN

Con la idea de determinar la naturaleza bioquímica de los Ags, se sometió el extracto antigénico a diferentes tratamientos físicos, químicos y enzimáticos, analizando luego la persistencia del Ag por el método de ELISA y comparándose con un control en el cual los tratamientos antedichos fueron omitidos. El tratamiento que produzca una reducción significativa en la reactividad del Ac estará indicando la alteración del epítopo reconocido por el mismo. Para comprobar la efectividad de los tratamientos se utilizaron AMC controles como se indica a continuación.

Los tratamientos se realizaron sobre multiplacas de 96 pocillos donde se sembraron previamente 5 µg/pocillo de extracto de membrana de MCF-7 o 2 µg/pocillo de extracto de membrana de PMN y secado durante la noche a 37 °C. Fueron utilizadas proteasas (tripsina y proteinasa K), calor como agente desnaturalizante y metanol (como disolvente de lípidos) en las condiciones detalladas en Materiales y Métodos, sección VI-7.

Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura II.4**. Los mismos sugieren un Ag FC-2.15 de naturaleza proteica, puesto que la reactividad disminuye significativamente con el tratamiento con proteasas (tripsina y proteinasa K). Asimismo, el epítopo no sería conformacional puesto que el calor no altera la reactividad, ni estaría formando parte de un glicolípido ya que la disolución de lípidos con metanol no afectan la unión del AMC FC-2.15. Como puede observarse, el mismo efecto de los tratamientos fue obtenido tanto en extractos de membrana de MCF-7 como de PMN.

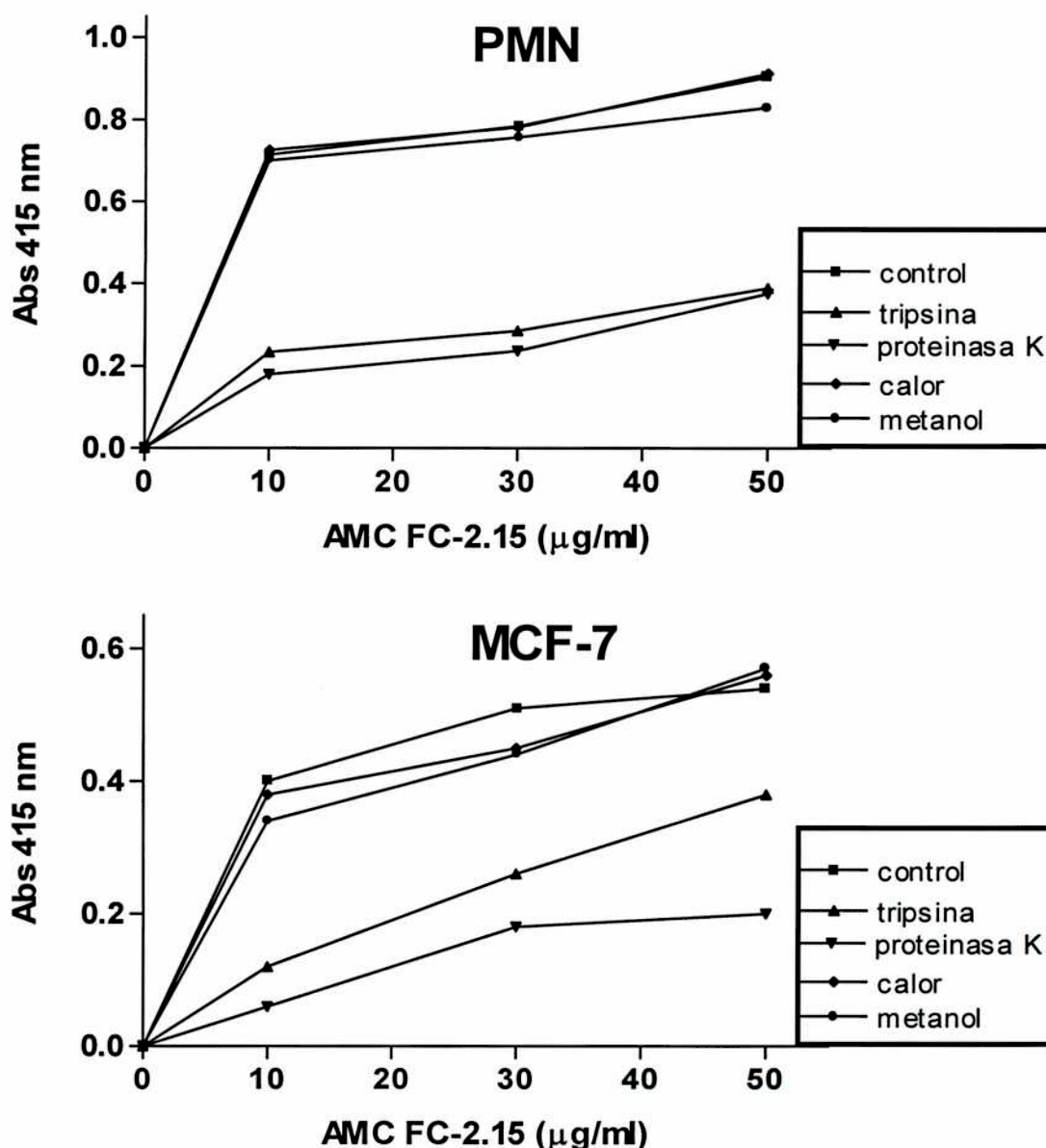


Figura II.4: Efecto de diversos tratamientos realizados sobre extracto antigénico en la reactividad del FC-2.15

Diferentes tratamientos (enzimáticos, físicos o químicos) fueron realizados sobre extracto antigénico de PMN o MCF-7 y la persistencia del antígeno fue evaluada por ELISA. Cada uno de los estudios fue realizado por triplicado.

Como controles de la efectividad de los tratamientos se analizó: i) el efecto de la digestión del extracto de MCF-7 con proteasas en la reactividad del AMC 4.36 (reconoce el "core" proteico de la mucina epitelial polimórfica [Nuti M y col. 1992]), la cual se vió afectada en un $68 \% \pm 7,2 \%$ y ii) el efecto del tratamiento con metanol

sobre extracto de MCF-7 en la reactividad del AMC **MBr1** (reconoce un epítopo glicolipídico [Menard S y col. 1983]) la cual fue inhibida en un $66,5 \% \pm 10,6 \%$. La reactividad del AMC **MBr1**, por el contrario, no fue afectada por tratamiento con calor [Menard S y col. 1983].

Los experimentos hasta ahora realizados sugieren que el AMC FC-2.15 reconocería Ags de naturaleza proteica tanto en carcinomas mamarios (modelo utilizado: tumor de MCF-7 desarrollado en ratones nude) como en PMN. El próximo paso a determinar fue si el epítope reactivo contenía carbohidratos. Por lo tanto, el efecto de una suave oxidación de los hidratos de carbono con periodato de sodio fue analizado sobre células MCF-7 y extracto de membrana de PMN, determinándose nuevamente la persistencia del epítope reactivo por el método de ELISA (Materiales y Métodos, sección VI-7). Como control de la efectividad de la oxidación de carbohidratos con el método utilizado, fue también analizado el efecto de dicho tratamiento en la reactividad del AMC **MBr1** sobre células MCF-7. Como control negativo, el efecto del tratamiento sobre la reactividad del AMC **4.36** con células MCF-7 fue también determinado.

En la **Figura II.5A** se muestran los resultados obtenidos para células MCF-7. Se grafica el porcentaje de inhibición con respecto al control del mismo AMC en el cual se omitió la oxidación con periodato de sodio. Puede verse que mientras el AMC **MBr1** presenta una inhibición del $73 \% \pm 17 \%$ y el AMC **4.36** no presenta ningún cambio en su reactividad, el AMC FC-2.15 presentó una inhibición del $47,1 \% \pm 7 \%$. Estos resultados indican, en principio, que el epítope reconocido por el AMC FC-2.15 sería un carbohidrato. Si bien la inhibición obtenida fue parcial, lo mismo puede decirse de la oxidación de hidratos de carbono, ya que las condiciones elegidas (periodato de sodio 10 mM durante 1 hora a temperatura ambiente (Ta)) fueron sumamente suaves para evitar el más mínimo daño proteico.

En base a lo expuesto, fueron realizados entonces tratamientos más intensos (10, 30, 50 mM de periodato de sodio durante 2 hs) sobre extractos de membrana de PMN (**Figura II.5B**). Los resultados claramente indican una disminución significativa en la reactividad con el AMC FC-2.15 (70 % para 10 mM de periodato de sodio y 80 % para 30 mM y 50 mM) confirmando que el epítope reconocido por el mismo es de naturaleza glicosídica.

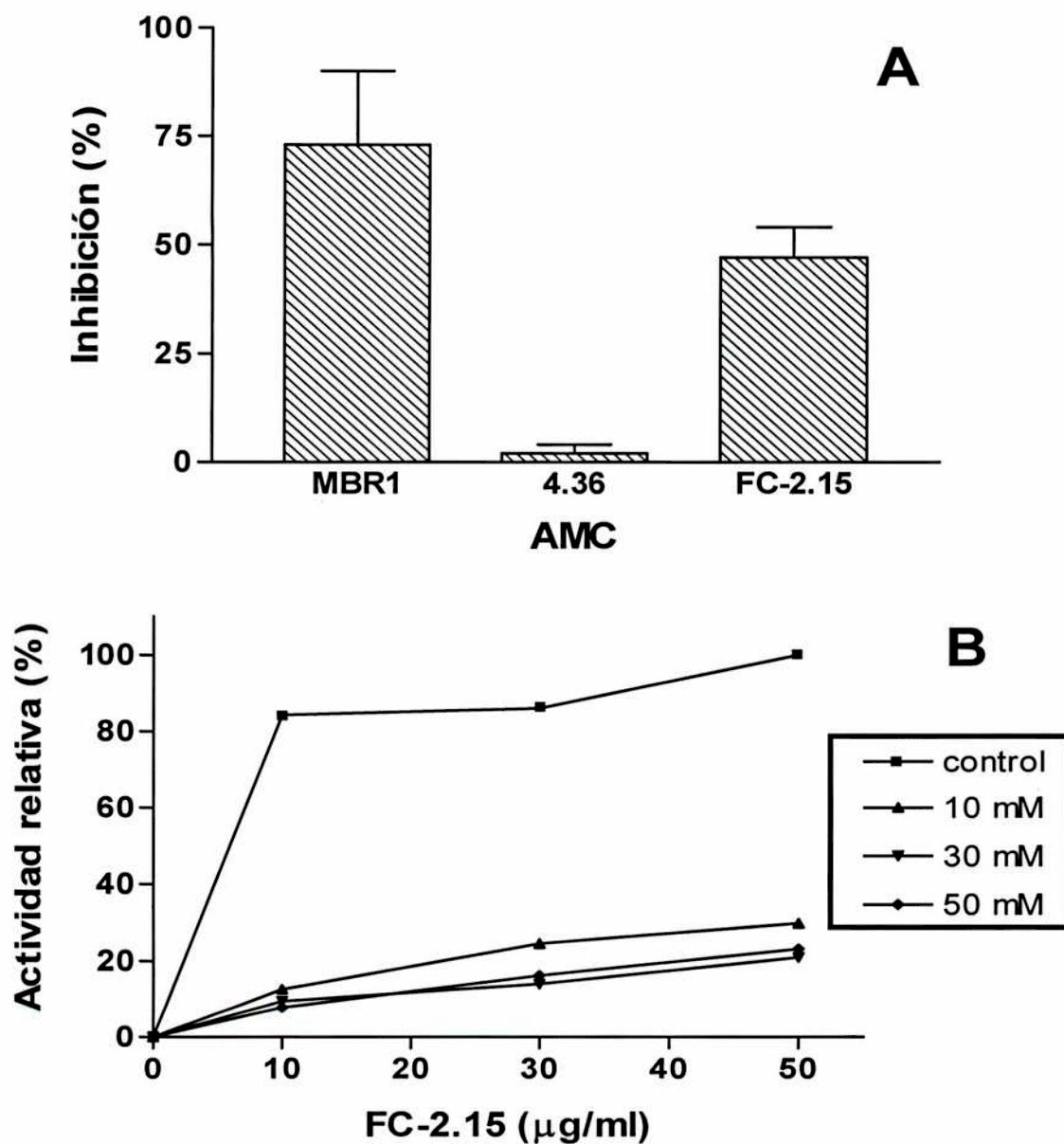


Figura II.5: Efecto de la oxidación con periodato de sodio sobre células MCF-7 (A) y extracto antigénico de PMN (B) en la reactividad del AMC FC-2.15

Incubaciones con periodato de sodio sobre células MCF-7 (A) y sobre extracto de membrana de PMN (B) fueron realizadas según se especifica en Materiales y Métodos, sección VI-7. (A) El AMC FC-2.15 fue utilizado a 50 μg/ml mientras que los AMC control (436 y MBr1, ascitis) fueron utilizados 1/100. Los datos graficados corresponden al promedio de dos experimentos realizados, los que fueron llevados a cabo por triplicado.

Los experimentos hasta ahora mostrados permiten concluir, en conjunto, que el AMC FC-2.15 reconoce Ags de naturaleza glicoproteica, residiendo el epítipo en la parte hidrocarbonada.

II-3. Caracterización de la parte glicosídica reconocida por el AMC FC-2.15

Debido a las evidencias que se acaban de mostrar indicando que el epítipo del AMC FC-2.15 estaría presente en la parte hidrocarbonada de las gps, se decidió corroborar estos resultados y caracterizar la parte glicosídica de las mismas.

Como primer paso se decidió tratar al extracto de membrana de MCF-7 y PMN con la enzima PNGasaF (Péptido N-glicosidasa F), enzima que cliva la unión amida entre el residuo de asparagina y la N-Acetil-Glucosamina de todas las N-gps (ya sean sus azúcares alta manosa, híbridos o complejos). Posteriormente a dicho tratamiento, la persistencia del antígeno fue analizada por Western Blot.

Los resultados se muestran en la **Figura II.6**, donde puede verse en el caso de extracto de PMN que tanto el extracto control (C) (no tratado) como el tratado con el buffer de reacción de la enzima (B) presentan las tres bandas ya descritas de 250 kDa, 185 kDa y 105 kDa, mientras que el tratado con la enzima (E) no presenta banda alguna lo que indica que, en efecto, **el AMC FC-2.15 se une a la parte hidrocarbonada de las 3 N-gp** y por ende, clivada ésta, es incapaz de reaccionar con el Ag (**Figura II.6A**). Paralelamente, como control positivo de la reacción de la enzima, se realizó un Western Blot con el AMC **B1.1**, que reconoce el CEA y da reacción cruzada con NCA y otras gp de la familia del CEA, uniéndose a epítopos residentes en la parte proteica de las mismas [Nuti M y col. 1992]. Este AMC reconoce las bandas ya descritas en el extracto control (C) y tratado con buffer (B), mientras que reacciona con bandas de 48 kDa y 39 kDa en el extracto que fue previamente digerido con la enzima (E), pesos moleculares esperados para la parte proteica de estas moléculas [Kuroki M y col. 1991].

También se realizó un control negativo incubando con PBS, en lugar de los Ac mencionados, en el cual no se detecta ninguna banda, lo que indica la especificidad de los reconocimientos descriptos.

Por el contrario, en el caso de extracto de tumor de MCF-7 se observaron resultados completamente diferentes. En la **Figura II.6B** puede verse que el tratamiento con la PNGasaF no altera en lo más mínimo ni la posición ni la intensidad de las bandas reactivas con el AMC FC-2.15. Estos datos sugieren, en principio, **que el epítipo**

reactivo con el AMC FC-2.15 estaría portado, en MCF-7, en O-glicoproteínas. Se quiso corroborar éste resultado descartando, por ejemplo, la presencia en el extracto de MCF-7 de algún inhibidor que afecte a la PNGasaF. Por lo tanto, se realizó una digestión con la enzima de una mezcla de ambos extractos (100 µg de MCF-7 + 20 µg de PMN, observándose desaparición de las bandas correspondientes a PMN mientras que las correspondientes a MCF-7 permanecen inalteradas (no mostrado).

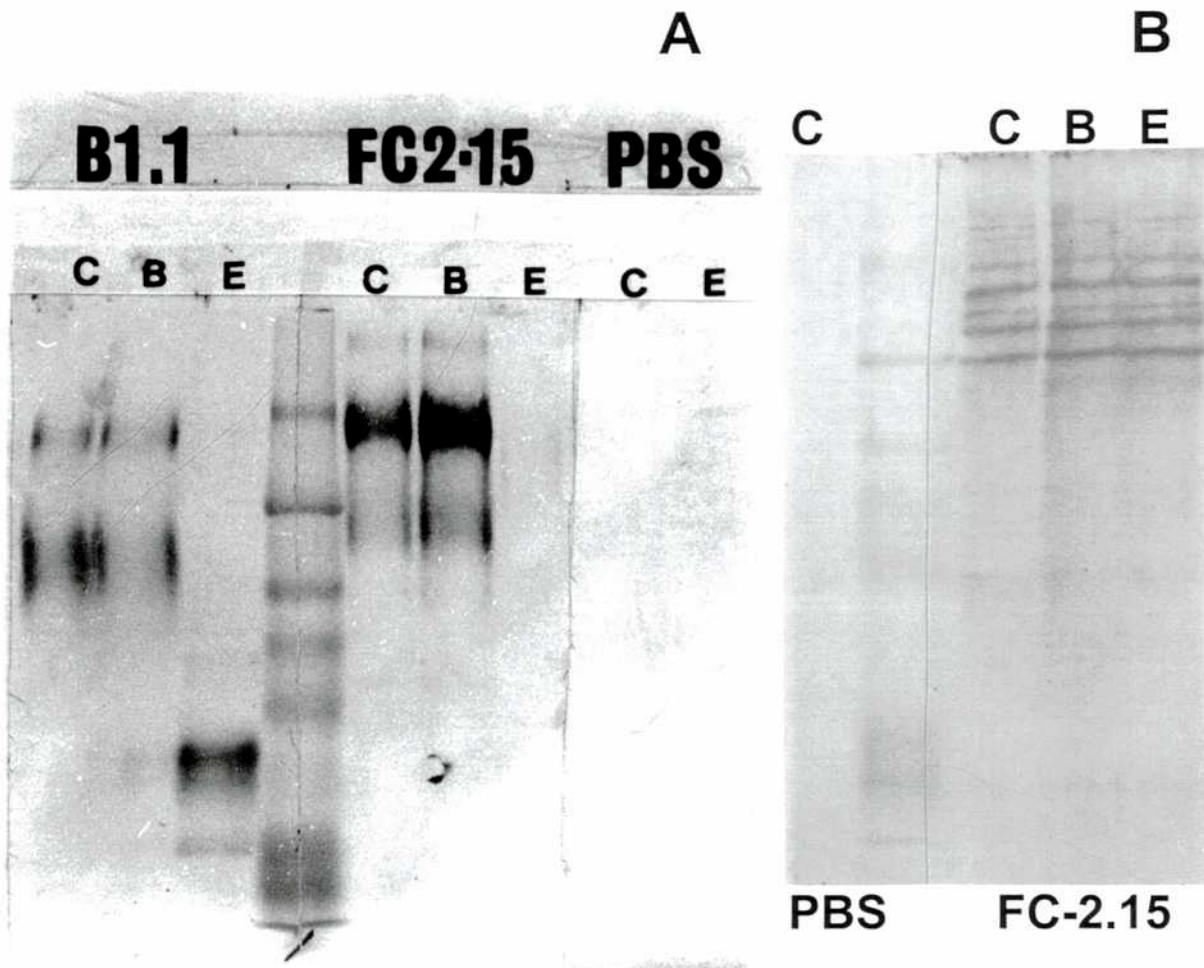


Figura II.6: Efecto de la digestión con PNGasaF de los extractos antígenicos sobre la reactividad del AMC FC-2.15

Muestras de membrana de PMN(A) y MCF-7 (B) controles (C), tratados con el buffer de reacción de PNGasa F (B) y tratados en presencia de la enzima (E) fueron analizados por Western Blot, revelando con los anticuerpos FC-2.15 (50 µg/ml), B1.1 (ascitis, 1/100) o en ausencia de anticuerpo (PBS) como control negativo. Los marcadores de peso molecular son de 190, 125, 88, 65, 56, 38 y 33 kDa.

En conjunto, los experimentos hasta ahora realizados indican que **el AMC FC-2.15 reconoce la sección oligosacáridica de gps, las cuales estarían N-ligadas en PMN y O-ligadas en MCF-7.**

II-4. FC-2.15 reconoce al trisacárido Lewis^x (Le^x) terminalmente expuesto

Los resultados previos indicando que la reactividad del AMC FC-2.15 se pierde por incubación de los extractos antigénicos con proteasas y post-oxidación de los hidratos de carbono con periodato de sodio, sugieren un Ag de naturaleza glicoproteica, residiendo el epítopo en la parte hibrocarbonada. Con la idea de determinar cuál es el carbohidrato que el AMC FC-2.15 está reconociendo, es decir el epítopo reactivo, realizamos entonces los siguientes experimentos:

a) En primera instancia, y gracias a la colaboración del Dr. P. O. Livingston (Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre, New York, U.S.A.) se analizó la reactividad del AMC FC-2.15 contra una variedad de Ags carbohidratos (incluyendo mucinas, gangliósidos, globósidos, determinantes antigénicos de grupos sanguíneos, etc.) por Dot-Blot. Brevemente, Ags carbohidratos naturales y sintéticos fueron sembrados en tiritas de nitrocelulosa, incubados con el AMC FC-2.15 (5 µg/ml) y revelados usando un antisuero anti-IgM murina conjugado con peroxidasa. (Ver Materiales y Métodos, sección VI-1). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla II.1**, donde puede verse que entre todos los carbohidratos analizados, sólo la mucina de quiste de ovario conteniendo el Le^x/Lewis^a (Le^a) y el trisacárido Le^x conjugado a poliacrilamida (PAA) fueron positivos, mientras que todos los otros Ags resultaron negativos. Puede concluirse, por lo tanto, que el AMC FC-2.15 reacciona específicamente con epítopos Le^x y que los mismos deben estar terminalmente expuestos puesto que: a) sólo las mucinas que contienen Le^x/Le^a, pero no las que contienen Lewis^y (Le^y)/Lewis^b (Le^b) reaccionan con el AMC FC-2.15; b) el epítopo Le^x interno (Le^y/Le^x neo-glicolípidos) no fue reconocido por el Ac; c) Le^x unido a PAA, pero no Le^a-PAA fue reactivo con el AMC FC-2.15.

Antígeno	Reacción de Dot Blot
Antígenos naturales	
Mucinas de quiste de ovario	
Le ^x /Le ^a	3 +
Le ^y /Le ^b	Neg
Le ^y trifucosilado (Le ^y /Le ^x)	Neg
Antígeno de grupo sanguíneo A	Neg
Antígeno de grupo sanguíneo B	Neg
OG (precursor no fucosilado)	Neg
GM3	Neg
GM2	Neg
GM1	Neg
GD3	Neg
GD2	Neg
Antígenos sintéticos	
Le ^x -PAA	3 +
Le ^a -PAA	Neg
STn-KLH	Neg
STn-c-KLH	1 +
TF-KLH	Neg
Muc-KLH	Neg
KLH	1 +
Globo H	Neg

**Tabla II.1: Reactividad del AMC FC-2.15 con distintos antígenos
carbohidratos**

Antígenos naturales y sintéticos fueron sembrados sobre nitrocelulosa y la reactividad del AMC FC-2.15 (5 µg/ml) determinada por Dot Blot. Los resultados fueron graduados como Neg (no reactivo), 1+ (levemente reactivo), 2 + (moderadamente reactivo) y 3 + (fuertemente reactivo) por inspección visual.

b) Con la idea de confirmar estos resultados y para determinar si el AMC FC-2.15 reacciona solamente con el Le^x o es también capaz de reconocer al tetrasacárido relacionado Sialil-Le^x (SLe^x) o a su isómero Le^a, se ensayó la reactividad del AMC FC-2.15 (5 µg/ml) por la técnica de ELISA sobre los siguientes antígenos: Le^x-BSA, SLe^x-BSA, Le^x-mucina, Le^a-mucina y BSA.

Los resultados se grafican en la **Figura II.7**, y de los mismos puede concluirse nuevamente la especificidad del FC-2.15 por el Le^x, ya que es capaz de unirse tanto al Le^x conjugado con BSA como al presente en la Le^x-mucina sin reconocer ni al SLe^x-BSA ni a la mucina conteniendo Le^a.

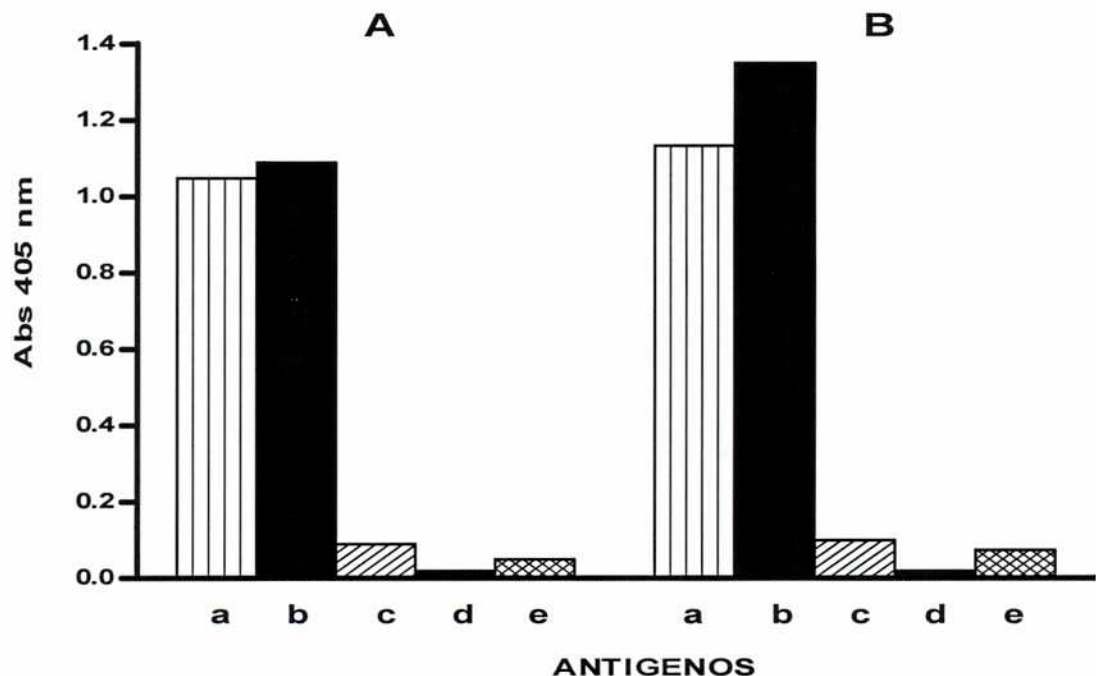


Figura II.7: Reactividad del AMC FC-2.15 con diferentes antígenos
La reactividad del AMC FC-2.15 con diferentes antígenos fue ensayada por ELISA. a: Le^x-BSA; b: Le^x-mucina; c: Le^a-mucina; d: SLe^x-BSA; e: BSA. (A): 0,5 µg de Le^x-BSA, SLe^x-BSA y BSA; 0,75 µg de Le^x-mucina y de Le^a-mucina. (B): 1,0 µg de Le^x-BSA, SLe^x-BSA y BSA; 1,5 µg de Le^x-mucina y de Le^a-mucina

c) Como confirmación final de la reactividad del AMC FC-2.15 contra Le^x, realizamos un ensayo de inhibición de "binding" usando como inhibidor a un AMC murino comercial, dirigido contra Le^x: el AMC NCL-CD15 de Novocastra Laboratories.

Como los AMC comerciales disponibles son sobrenadantes de cultivo (no purificados) y se venden en mínimas cantidades (ya que se usan normalmente en diagnóstico por IH), no se pudo hacer un ensayo de inhibición de “binding” convencional y se adaptó al protocolo descrito en Materiales y Métodos, sección VI-3. Brevemente, 6 µg de extracto de membrana de MCF-7 fueron sembrados en multiplacas de 96 pocillos, bloqueado con BSA 1% en PBS y preincubado con NCL-CD15 (dil 1/7.5) o BSA (10 µg) por 4 hs a Ta. Luego se agregaron diferentes cantidades (0-50 µg/ml) de ^{Biot}FC-2.15 o ^{Biot}BSA durante toda la noche a 4°C y se reveló (para visualizar solo la unión del 2° Ac) con Streptavidina conjugada con peroxidasa.

El resultado se muestra en la **Figura II.8**, donde los puntos de preincubación con BSA y ^{Biot}FC-2.15 como segundo Ac indican el 100% de unión para cada concentración de ^{Biot}FC-2.15 (control positivo), mientras que los puntos de preincubación con NCL-CD15 utilizando ^{Biot}BSA en diferentes concentraciones indican la mínima unión de una proteína inespecífica biotinilada (control negativo). Ahora bien, los puntos de preincubación con NCL-CD15 utilizando las diferentes concentraciones de ^{Biot}FC-2.15 como segundo Ac son los que nos van a indicar si existe o no una inhibición de “binding”. Como puede verse, la preincubación de extractos de membrana de MCF-7 con NCL-CD15 inhibe significativamente el binding del AMC FC-2.15, concluyendo finalmente que FC-2.15 reconoce, al igual que NCL-CD15, al trisacárido Le^x. La diferencia entre ambas curvas resultó altamente significativa (p=0.002).

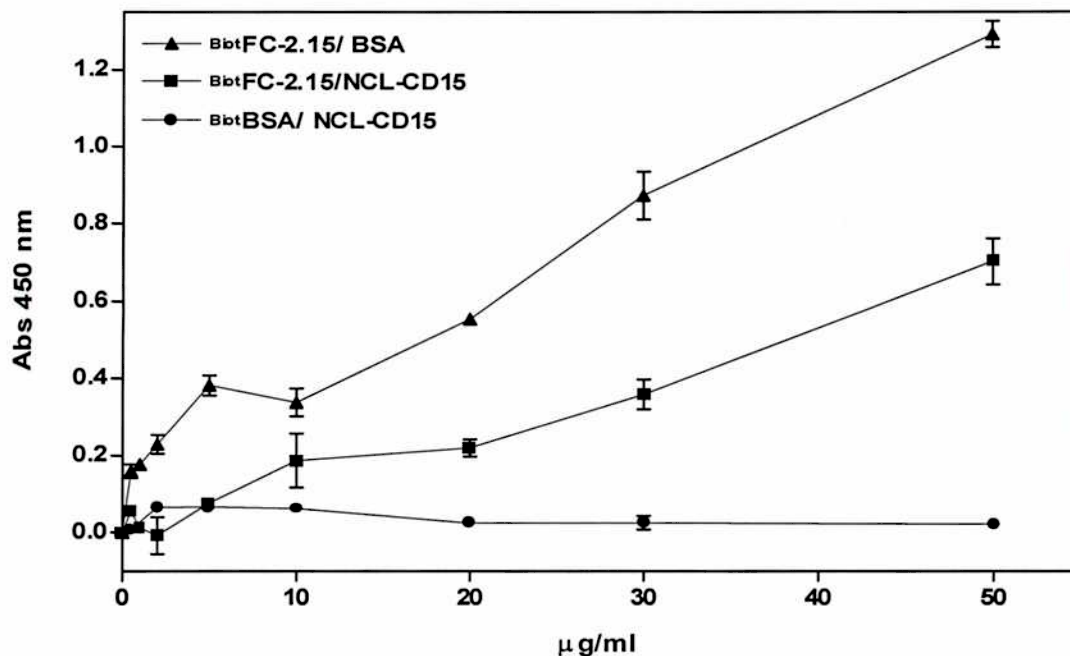


Figura II.8: Ensayo de inhibición de "binding" del AMC FC-2.15 con el AMC NCL-CD15

Extractos de membrana de MCF-7 sembrados en multiplacas de 96 pocillos fueron preincubados con NCL-CD15 o BSA. Posteriormente diferentes cantidades del AMC FC-2.15 o BSA biotiniladas fueron agregadas y finalmente la reacción fue revelada con streptoavidina conjugada con peroxidasa. Cada punto representa el promedio de determinaciones realizadas por triplicado (barras = $\pm$ SD). Análisis estadístico (test t no apareado) demostró que las diferencias entre $\text{Biot}^{\text{FC-2.15}}/\text{BSA}$ y $\text{Biot}^{\text{FC-2.15}}/\text{NCL-CD15}$ son altamente significativas ($P = 0.002$).

Los resultados obtenidos permiten concluir que el epítopo con el cual el AMC FC-2.15 reacciona es el trisacárido Le^x ($\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc } \alpha 1-3)\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$), el cual debe estar terminalmente expuesto. Además, el AMC FC-2.15 no presenta reacción cruzada ni con el isómero Le^a ni con el tetrasacárido SLe^x .

II-5. Caracterización de la reactividad en PMN y células de Leucemia mieloide crónica (LMC):

Ya reportamos que el AMC FC-2.15 reacciona con PMN humanos, reconociendo en extractos de membrana de los mismos 3 N-glicoproteínas (gp) de 250

kDa, 185 kDa y 105 kDa, presentes en diferente proporción ($250 \text{ kDa} \ll 105 \text{ kDa} < 185 \text{ kDa}$). También describimos que el AMC FC-2.15 reacciona con la gran mayoría de los leucocitos obtenidos de pacientes con LMC.

Quisimos identificar entonces los antígenos presentes en células de LMC y compararlos con los datos disponibles para los PMN. Por lo tanto preparamos un extracto enriquecido en membrana de ambos tipos celulares y lo analizamos por Western Blot, según se describe en Materiales y Métodos, secciones V y VI-5. Los resultados se muestran en la **Figura II.9** y puede observarse que el AMC FC-2.15 reconoce en extractos de membrana de LMC las mismas 3 gp de 205, 185 y 105 kDa, presentes idéntica proporción ($250 \text{ kDa} \ll 105 \text{ kDa} < 185 \text{ kDa}$), que en extractos de PMN; pero es relevante mencionar que la densidad de antígeno en la membrana de los PMN es mucho mayor que la observada en la membrana de las células de LMC, puesto que para obtener una intensidad de bandas similares hubo que sembrar cinco veces más extracto de LMC que de PMN.

Para caracterizar estos Ags, estudiamos el efecto del tratamiento con PNGasa F y con Neuraminidasa (enzima que cliva los residuos de ácido siálico terminales) sobre la reactividad del AMC FC-2.15 en extractos de membrana de PMN y LMC.

Brevemente, muestras de extracto de membrana conteniendo una cantidad de proteína adecuada ($20 \mu\text{g}$ de PMN y $100 \mu\text{g}$ de LMC) son tratados con las enzimas PNGasa F por 1 hora a 37°C o Neuraminidasa durante 2 hs a 37°C en sus correspondientes buffers de reacción, previamente a ser sometidas a la electroforesis. Como controles se siembran muestras tal cual (sin tratamiento alguno) y muestras tratadas solamente con el buffer de reacción de la enzima.

Como ha sido descripto que los PMN contienen oligosacáridos portando tanto Le^x como SLe^x unido a N-gp [Sponcer E y col. 1984; Fukuda M y col. 1984; Fukuda M. 1996], era de esperar que el tratamiento con Neuraminidasa aumente la intensidad y/o el número de bandas detectadas en el Western Blot (al hacer visibles nuevos Le^x terminalmente expuestos) y que el tratamiento con PNGasaF elimine completamente la reactividad (al eliminar todos los oligosacáridos unidos a N-gp). Como puede verse en la **Figura II.9** para PMN no se observa cambio en la intensidad de las principales especies reactivas pero se detectan nuevas especies de menor peso molecular al tratar con Neuraminidasa mientras que para células de LMC puede verse tanto un aumento en la intensidad como la aparición de nuevas especies reactivas. Como era esperado, puede observarse que en ambos extractos desaparece completamente la reactividad al tratar con PNGasaF.

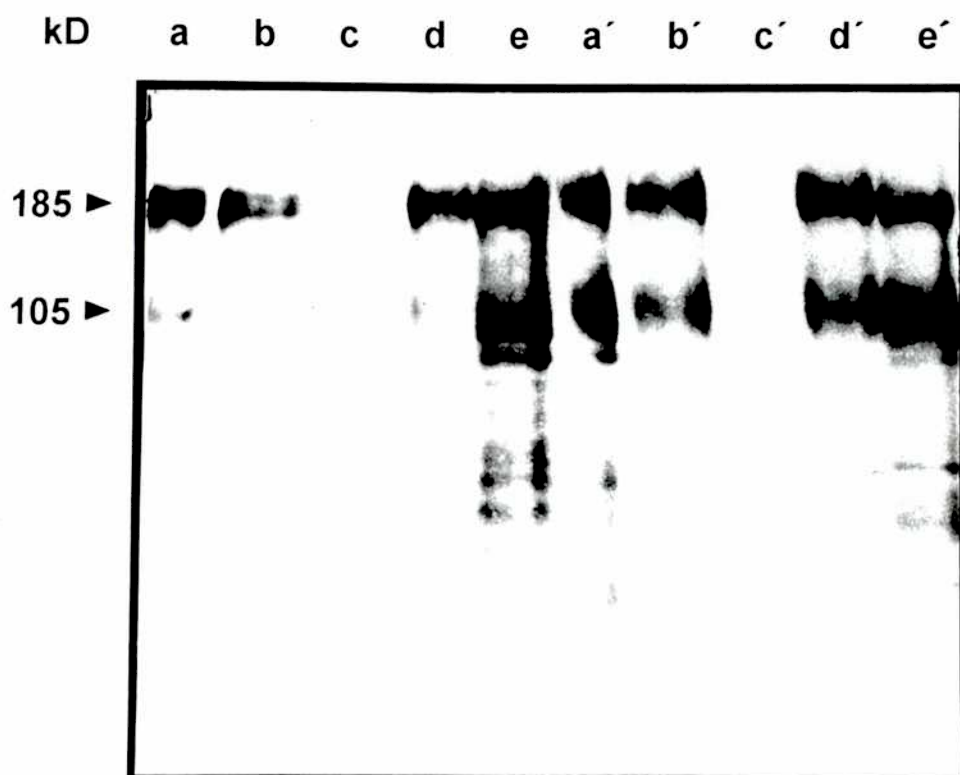


Figura II.9: Tratamiento con Neuraminidasa y PNGasaF de los Ags de PMN y LMC

Extractos de membrana de LMC (calles a - e) y de PMN (a' - e') fueron tratados con PNGasaF durante 60 min a 37 °C o Neuraminidasa por 2 hs a 37 °C. Las muestras fueron luego corridas en un gel de poliacrilamida 7,5 %, transferidas a nitrocelulosa y la reactividad con el AMC FC-2.15 (50 µg/ml) fue analizada por Western Blot. Calles a-a': control sin tratamiento enzimático; c-c': PNGasaF; e-e': Neuraminidasa. Extractos de membrana fueron incubados sólo con el buffer de PNGasaF en b-b' y con el buffer de Neuraminidasa en d-d'.

Esto permite concluir que las 3 bandas detectadas por el AMC FC-2.15 en membrana de ambos tipos celulares corresponden a 3 N-gp portando Le^x terminales en sus oligosacáridos y, mientras en PMN las especies portando SLe^x son una proporción menor del total de las lactosaminas, lo contrario ocurre en LMC donde hay mucha mayor expresión de especies sializadas en membrana.

II-6. Caracterización de la reactividad en células de carcinoma de colon T-84 y células de carcinoma de mama MCF-7:

Como se mencionó anteriormente, el AMC FC-2.15 reacciona fuertemente con la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 y es capaz de lisar dichas células en presencia de C' humano.

Cuando quisimos identificar los Ags en extractos de membrana de MCF-7 por Western Blot, no detectamos reactividad alguna en las condiciones habituales de trabajo (con geles de poliacrilamida de 10% o 7,5% y descartando el gel separador). Recurrimos entonces a la estrategia de partir de extracto de tumores de MCF-7 desarrollados en ratones nude y describimos en ellos la presencia de 3 bandas. Pero conociendo ya la identidad del epítipo del AMC como el trisacárido Le^x, y debido a datos bibliográficos que describen la presencia de Le^x y otros oligosacáridos relacionados en mucinas de alto peso molecular, tanto en carcinoma de mama [Sikut R y col. 1996] como de colon [Fukuda M. 1996; Capon C y col. 1997], pensamos que la reactividad descrita es en realidad minoritaria y que nos estaríamos perdiendo, por el tipo de electroforesis realizada, de analizar a las mucinas. Se prepararon por lo tanto extractos de células MCF-7 y se analizaron realizando las electroforesis en las condiciones en las que se separan mucinas de alto peso molecular: geles de poliacrilamida en gradientes entre 3 y 12%, con un gel espaciador de 3% [Holden KG y col. 1971]. En éstas condiciones, como puede verse en la **Figura II.10**, detectamos un amplio rango de moléculas reactivas (entre 90 kDa y >300 kDa) sin poder identificar bandas definidas. También quisimos estudiar el efecto del tratamiento con PNGasaF y Neuraminidasa, y puede verse que con Neuraminidasa no hay aumento ni en la intensidad ni en el número de bandas y que con PNGasaF se elimina sólo parcialmente la reactividad correspondiente a las especies reactivas de menor peso molecular. **Estos datos sugieren, por un lado, que la mayoría de epítopos Le^x están en MCF-7 portados en moléculas tipo O-mucinas y por otro, la ausencia en MCF-7 de lactosaminoglicanos portando SLe^x.** Es importante mencionar que el tratamiento con PNGasaF se realizó a mayores tiempos (3 y 5 hs de incubación) sin alterarse el patrón observado (datos no mostrados), confirmando los resultados mencionados y concordando con datos recientes de bibliografía que describen la ausencia de SLe^x en la línea celular MCF-7 [Kumamoto K y col. 1998].

Cuando quisimos estudiar qué sucedía en la línea de carcinoma de colon humano T-84, observamos en Western Blot realizados sobre extractos de membrana 2 bandas principales de 155 kDa y 135 kDa, más un amplio rango de positividad de mayor peso molecular sin bandas definidas. Al tratar con Neuraminidasa, se observa un gran aumento en la reactividad del AMC FC-2.15, indicando la presencia de gran número de especies portando SLe^x en carcinoma de colon. El tratamiento con PNGasaF elimina casi completamente la reactividad desapareciendo las dos bandas netas y permaneciendo la reactividad correspondiente a mayor peso molecular. Esto sugiere que las dos bandas netas corresponderían a 2 N-gp portando Le^x en su porción oligosacarídica y que las mismas co-existirían con O-mucinas de mayor peso molecular portando también Le^x en su porción hidrocarbonada.

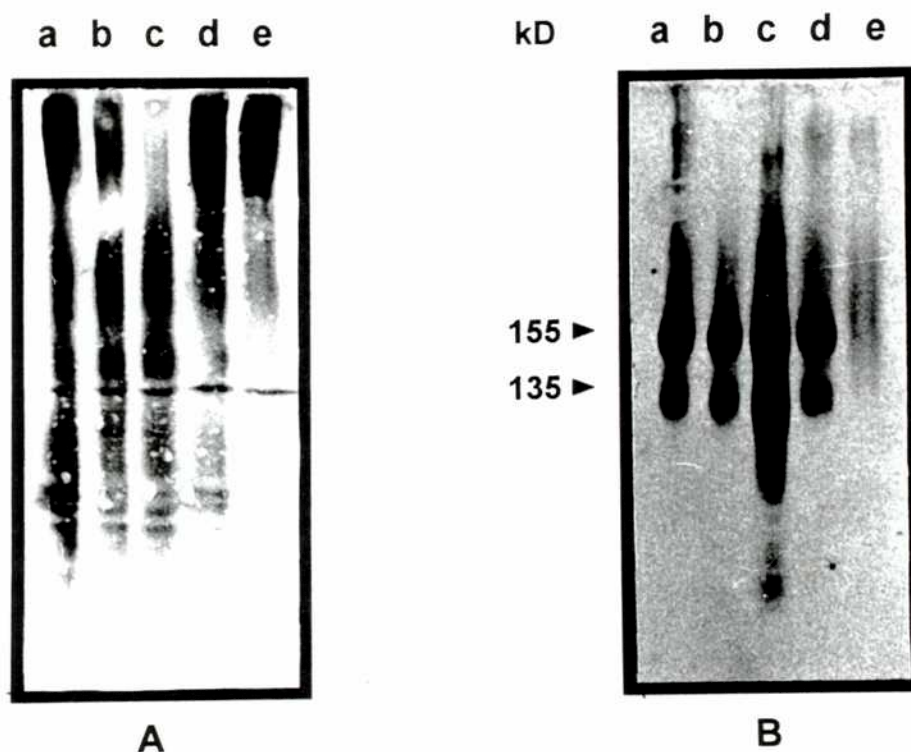


Figura II.10: Tratamiento con Neuraminidasa y PNGasaF de los Ags de células MCF-7 y T-84

Extractos de membrana de MCF-7 (A) y de T-84 (B) fueron tratados con PNGasaF durante 60 min a 37 °C o Neuraminidasa por 2 hs a 37 °C. Las muestras fueron luego corridas en un gel gradiente de poliacrilamida (3%-12%), transferidas a nitrocelulosa y la reactividad con el AMC FC-2.15 (50 µg/ml) analizada por Western Blot. Calles a: control sin tratamiento enzimático; c: Neuraminidasa; e: PNGasaF. Extractos de membrana fueron incubados sólo con el buffer de Neuraminidas en b y con el buffer de PNGasaF en d.

Es importante mencionar que la identificación de los Ags fue extendida a carcinomas de colon humanos. Extractos de membrana de dos adenocarcinomas de colon fuertemente positivos para el AMC FC-2.15 fueron preparados y analizados por Western Blot. El patrón de reactividad fue indistinguible del descripto para la línea celular T-84, observándose las 2 bandas de 155 kDa y 135 kDa junto con una región de positividad de mayor peso molecular. El aumento en la reactividad post-tratamiento con neuraminidasa, indica también la presencia de abundante SLe^x en los carcinomas de colon humano analizados (datos no mostrados).

Discusión

Se han reportado en este capítulo los experimentos realizados tendientes a la identificación y caracterización de los Ags reconocidos por el AMC FC-2.15 en los tejidos FC-2.15-positivos, sean éstos tumorales (mama, colon, leucemias) o normales (PMN). Ensayos de ELISA sobre muestras antigénicas sometidas a distintos tratamientos enzimáticos, químicos y físicos sugirieron un Ag de naturaleza glicoproteica, residiendo el epítopo en la sección hidrocarbonada.

Posteriormente experimentos fueron realizados para identificar el oligosacárido reconocido y **los resultados presentados en este Capítulo demuestran claramente que el AMC FC-2.15 reconoce al epítopo Le^x (CD15)**, pero no al SLe^x, Le^a, o antígenos del grupo sanguíneo A o B. Esta conclusión está basada tanto en el reconocimiento específico del AMC FC-2.15 por diferentes estructuras conteniendo Le^x, como en la inhibición observada en el ELISA realizado utilizando un AMC comercial anti-CD15 como inhibidor.

Varios AMC anti Le^x han sido descriptos, tales como el anti-SSEA-1, el cual reconoce teratocarcinoma indiferenciado y células embrionarias tempranas murinas [Solter D y Knowles B, 1978]; el VEP8 y VEP9, que reconocen la línea celular promielocítica humana HL60 y PMN humanos [Gooi HC y col. 1983]; el IG10 que reconoce el hapteno X presente en glicolípidos y gp de la línea HL60 [Urdal DL y col. 1983]; el ANTI-My-1, que reacciona con granulocitos y precursores granulocíticos reconociendo el antígeno My-1 [Huang LC y col. 1983], etc. Al igual que el AMC FC-2.15, la mayoría de los AMC dirigidos contra Le^x pertenecen al isotipo IgM. Contrariamente a otros AMC dirigidos contra carbohidratos, los cuales se caracterizan por tener constantes de

afinidad (K_a) del orden de $10^3 - 10^5 \text{ M}^{-1}$, para el AMC FC-2.15 fue descripta una K_a de $6,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ en la línea celular MCF-7 [Ballaré C y col. 1995].

Diversos estudios han reportado que los PMN contienen el hapteno Le^x [$\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}\rightarrow\text{R}$] y SLe^x [$\text{NeuNAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}\rightarrow\text{R}$] en lactosaminoglicanos neutros y ácidos unidos a *asparagina* [Sponcer E y col. 1984; Fukuda M y col. 1984]. Además ha sido descripto que las E- y P- selectinas juegan un rol fundamental en el comienzo de la inflamación, ya que la unión de éstas a neutrófilos y monocitos resulta en el reclutamiento de dichos leucocitos en el sitio de inflamación [Springer TA, 1994]. Tanto la E- como la P- selectina se unen al SLe^x , componente minoritario de los PMN [Lowe JB y col. 1990; Walz G y col. 1990; Phillips ML y col. 1990] sin unirse a Le^x . Esta unión de las E- y P-selectinas aminora el movimiento de los PMN a lo largo de la pared endotelial, permitiendo que los leucocitos tengan suficiente acceso a las quemoquinas, las cuales, vía activación de la proteína G, activan las integrinas de la superficie de los PMN, estableciendo una firme unión al endotelio [Fukuda M. 1996]. Esta firme unión conduce a la extravasación, posiblemente a través de la interacción homofílica de PECAM 1 (molécula de adhesión celular plaqueta-endotelio 1).

Las células tumorales, en particular células de carcinoma y de leucemias, están enriquecidas en SLe^x [Fukuda M. 1996]. Células de carcinoma también adquieren Sialil Lewis^a (SLe^a), isómero de SLe^x [Fukushima K y col. 1984], el cual une a E-selectinas tan potentemente como SLe^x [Berg EL y col. 1991; Takada A y col. 1993].

Debido a que las células tumorales y los PMN contienen SLe^x en su superficie celular, se plantea la hipótesis de que las células tumorales usan la misma interacción selectina-carbohidrato durante la metástasis [Fukuda M. 1996]. Cuando las células tumorales se diseminan, son conducidas por el torrente sanguíneo y deben adherirse a las células endoteliales en los sitios metastásicos [Nicolson GL, 1989], penetrar a través de las mismas y moverse dentro del tejido subendotelial. Una vez que la célula tumoral crece por debajo del endotelio, la metástasis es establecida.

Fundamentando a la hipótesis planteada, los reportes que mencionamos a continuación sugieren fuertemente que uno de los factores claves en la diseminación metastásica es la abundancia de SLe^x , y posiblemente de SLe^a , en la superficie de las células tumorales:

- a) células de carcinoma de colon altamente metastásico, se unen más fuertemente a las E-selectinas de endotelio activado que sus contrapartes de bajo potencial metastásico [Sawada R y col. 1994].

- b) Células tumorales de bajo potencial metastásico y de baja expresión de SLe^x son modificadas genéticamente para una alta expresión de SLe^x obteniéndose células que se adhieren más fuertemente a E-selectinas [Sawada R y col. 1993].
- c) La cantidad de SLe^x en células de carcinoma colónico correlaciona directamente con el pronóstico de los pacientes [Nakamori S y col. 1993], aunque otros criterios histológicos sean similares.

Hemos demostrado claramente que el AMC FC-2.15 reconoce al trisacárido Le^x, el cual puede estar portado tanto en N-gp como en O-gp (mucinas) en las células tumorales, sin presentar reacción cruzada con el SLe^x.

Diversas evidencias, mencionadas a continuación, sugieren para Le^x, al igual que para SLe^x, un rol en el reconocimiento intercelular:

- a) Le^x se expresa en esperma humano que ha sufrido la pérdida acrosomal, localizándose en la cabeza del esperma [Dacruz OJ y col. 1997] y ha sido reportado que AMC anti Le^x inhiben significativamente la penetración de la zona pelúcida humana, sugiriendo que la interacción esperma-óvulo puede estar mediada, en parte, por Le^x [Dacruz OJ y col. 1997].
- b) Gooi y col. [Gooi HC y col. 1981] sugieren que el SSEA-1 (contiene al Le^x), un Ag embrionario murino, estadio-específico, participaría de un sistema de reconocimiento mediado por Le^x involucrado en el proceso de compactación (fuerte asociación de los blastómeros que tiene lugar en el estadio de ocho células, en la cual sufren cambios sustanciales en su organización durante la diferenciación).
- c) Datos de microscopía electrónica revelan una muy alta expresión de Le^x tanto en la membrana plasmática como en el espacio intercelular de células de metástasis hepáticas de carcinoma de colon murino (línea celular C26) y una baja y heterogénea expresión de Le^x en el foco tumoral del bazo y espacio subcutáneo. Esto permite sugerir que los azúcares portando Le^x estarían involucrados en las interacciones entre las células colon 26 y células hepáticas en el proceso de metástasis hepática [Kawakami H y col. 1994].
- d) La expresión tipo celular-específica observada para Le^x en células gliales fetales humanas sugieren un rol para el trisacárido en el reconocimiento intercelular entre distintos tipos celulares durante el desarrollo del sistema nervioso central humano [Sato J y Kim SU, 1994].

Más aun, estudios inmunohistoquímicos muestran que el patrón de expresión de Le^x en los carcinomas de mama está frecuentemente asociado con el borde de ataque en los tumores invasivos y con el límite exterior del bolo en los carcinomas *in situ*. Esto sugiere un rol en la invasividad para Le^x [Brooks SA y Leatham AJ, 1995]. La asociación de la expresión de Le^x con las células cancerosas atrapadas intravascularmente también permite sugerir un rol en la metástasis [Brooks SA y Leatham AJ, 1995].

Pese a todas estas evidencias mencionadas, los roles para Le^x y SLe^x parecen ser diferentes. Es más, su nivel de expresión difiere tanto en células neurales en cultivo [Sato J y Kim SU, 1994] como en varios tejidos [Kawakami H y col. 1994; Nakagoe T y col. 1994].

En base a lo explicado, y tratando de aportar nuevas evidencias acerca de los posibles roles de Le^x, caracterizamos la reactividad del AMC FC-2.15 en los diferentes tejidos, determinando si los lactosaminoglicanos portando Le^x pertenecen a N-gp o O-mucinas y poniendo especial atención en el nivel de SLe^x presente.

En PMN hemos descrito que el AMC FC-2.15 reacciona con 3 N-gp, y el pequeño aumento de la reactividad del AMC FC-2.15 hacia PMN observado post-tratamiento con Neuraminidasa, sugiere que las estructuras conteniendo SLe^x son una proporción menor del total de lactosaminoglicanos, lo que confirma previos resultados [Sponcer E y col. 1984; Fukuda M y col. 1984].

En cuanto a la distinta distribución de Le^x y SLe^x tanto en N-gp como en O-mucinas, los datos hasta ahora aportados pueden resumirse en la **Figura II.11**. Puede observarse tanto en PMN como en células de LMC la presencia de las 3 N-gp mencionadas portando Le^x y SLe^x, con mayor proporción de SLe^x en LMC que en PMN y la presencia de N-gp de menor peso molecular portando exclusivamente SLe^x, que corresponden a las bandas que aparecen post-tratamiento con Neuraminidasa. En el caso de MCF-7, vemos exclusivamente la presencia de Le^x, el cual es portado por O-mucinas de alto PM y en el caso de T-84 probamos la coexistencia de 2-Ngp y de O-mucinas portando ambos Le^x y SLe^x, ya que su intensidad aumenta muchísimo por el tratamiento con Neuraminidasa.

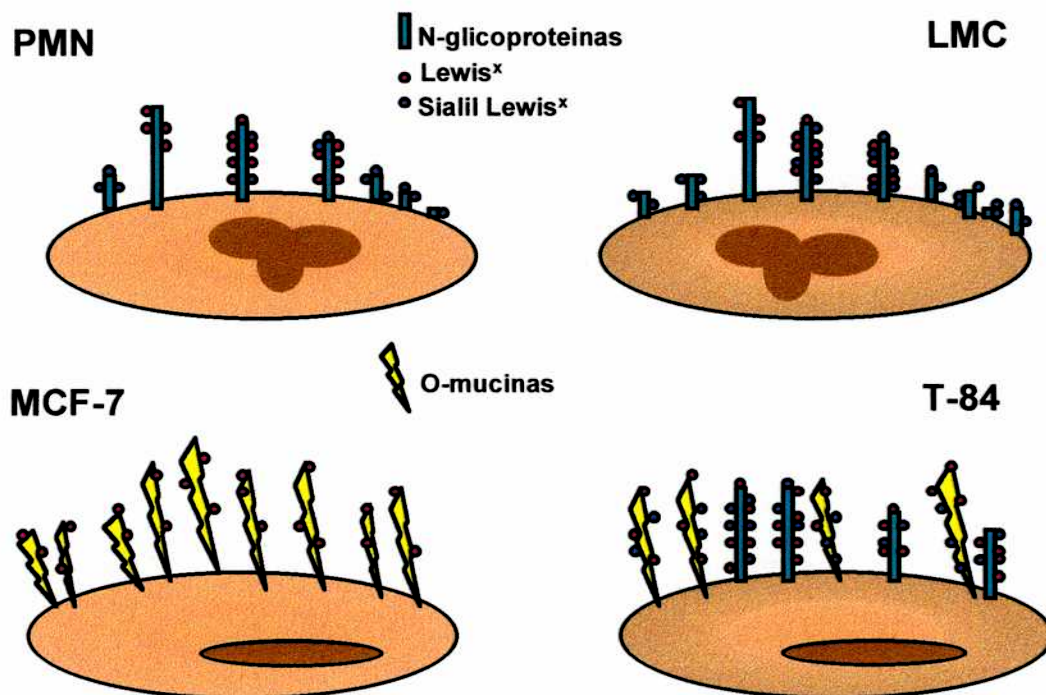


Figura II.11: Esquema representativo de la expresión de residuos Le^x y SLe^x en PMN, LMC, T-84 y MCF-7.

Resumiendo, prácticamente se dan todas las combinaciones: Le^x puede estar formando parte tanto de N-gp como de O-mucinas. Según el tipo celular estudiado, Le^x está en N-gp exclusivamente (PMN y LMC), predominantemente en N-gp (T-84) o predominantemente en O-mucinas (MCF-7). También puede variar la cantidad de lactosaminoglicanos portando SLe^x , desde la ausencia (MCF-7), pasando por una baja proporción con respecto a Le^x -lactosaminoglicanos (PMN) hasta llegar a un gran predominio de los mismos en LMC y T-84.

Puede ser concluído que PMN normales y diferentes células tumorales expresan residuos Le^x y SLe^x en muy diferente proporción y unidos a diferentes proteínas. Si bien el rol de SLe^x ya ha sido descrito, la relevancia de Le^x en condiciones normales y patológicas tiene que ser aún establecida.

CAPITULO III

Capítulo III: Propiedades funcionales del AMC FC-2.15. Estudios *in vitro* y *ex vivo*.

Introducción

Como fue descrito en los Capítulos anteriores, el anticuerpo monoclonal (AMC) FC-2.15 reacciona con la mayoría de los carcinomas mamarios y digestivos y con leucemias mieloides crónicas (LMC), uniéndose específicamente a trisacáridos Lewis^x (Le^x) terminalmente expuestos. Por lo tanto, el AMC FC-2.15 presenta reacción cruzada con las células y tejidos normales que expresan Le^x, principalmente leucocitos polimorfonucleares (PMN) y la progenie mieloide de médula ósea.

Resultados previos del laboratorio han demostrado que el AMC FC-2.15 es capaz de lisar, en ensayos *in vitro*, las células Le^x-positivas por fijación de complemento (C') humano [Ballaré C y col. 1995].

En un estudio clínico en Fase I, llevado a cabo utilizando el AMC FC-2.15 en 11 pacientes con cáncer avanzado [Mordoh J y col. 1995], se observó una remisión objetiva de una metástasis hepática de carcinoma mamario, sugiriendo que el AMC FC-2.15 podría lisar eficientemente las células tumorales *in situ*. La principal toxicidad evaluada fue una profunda pero rápidamente reversible neutropenia, observada durante la infusión del AMC, frecuentemente acompañada con fiebre y escalofríos pero sin presentar ninguna sintomatología clínica significativa.

Dado que los PMN, como mencionamos anteriormente, expresan el Ag Le^x, entre las posibles causas de la neutropenia descrita podrían postularse: a) que los PMN, reconocidos por el AMC FC-2.15 sean lisados por fijación de C' humano; b) que los PMN sean aglutinados y marginados de circulación; c) que los PMN sean opsonizados por el AMC FC-2.15 y secuestrados, probablemente por el sistema retículo endotelial [Thakur ML y col. 1996].

El hecho de que el AMC FC-2.15 sea capaz de lisar las células Le^x-positivas *in vitro* en presencia de C' humano [Ballaré C y col. 1995] favorecería la primer posibilidad. Sin embargo, a esta hipótesis se opone la levedad de los síntomas observados durante la infusión del AMC, mucho menores que los esperados si más del 90% de los PMN fueran lisados en circulación. En base a esta observación, la neutropenia podría ser adjudicada a la marginación de los PMN de circulación.

Debido a estos resultados, se consideró de sumo interés profundizar la caracterización de la interacción del AMC FC-2.15 con los PMN y con un modelo tumoral como la línea celular de carcinoma mamario humano MCF-7, fuertemente reactiva con el AMC FC-2.15. En este capítulo se describen los resultados obtenidos en la evaluación de la interacción del AMC FC-2.15 con PMN y células MCF-7 tanto en estudios *in vitro* como en un sistema *ex vivo* de circulación sanguínea (SEVCS), con la idea de aproximar las condiciones en las cuales el AMC FC-2.15 reacciona *in vivo*.

Resultados

III-1. Caracterización de la reactividad del AMC FC-2.15 con los PMN

Ya fue descrito en los capítulos I y II respectivamente que el AMC FC-2.15 reacciona con PMN periféricos y la naturaleza de los antígenos reconocidos por el mismo en la membrana de PMN.

Con la idea de cuantificar dicha reactividad se realizó una citometría de flujo sobre PMN aislados de sangre periférica según se describe en Materiales y Métodos (sección VII). Como se observa en la **Figura III.1**, el 99,9% de los PMN fueron fuertemente positivos con el AMC FC-2.15 en comparación con el experimento control llevado a cabo utilizando PBS (en lugar del AMC FC-2.15) donde solo 0,4% de los PMN resultaron positivos.

Posteriormente se llevó a cabo un análisis de Scatchard para determinar la constante de afinidad (K_a) del AMC FC-2.15 y el número de sitios antigénicos presentes en PMN (Materiales y Métodos, sección VIII). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura III.2**, donde la relación lineal obtenida, considerando una relación estequiométrica 1/1 para la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), indica la presencia de una población homogénea de sitios de unión, con una K_a de $5.14 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y una capacidad de unión de 1.11×10^6 sitios antigénicos por célula. Es interesante mencionar que la afinidad del AMC FC-2.15 por los PMN es mayor que por las células MCF-7, puesto que la K_a obtenida es considerablemente menor que la descrita para el AMC FC-2.15 en la línea celular MCF-7 ($6.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ [Ballaré C y col. 1995]). Además, si bien el número de sitios antigénicos por célula está en el mismo orden que el obtenido para MCF-7, debido a la diferencia de superficie de ambos tipos celulares,

mucho mayor para las MCF-7, la densidad de sitios antigénicos en membrana de PMN es también considerablemente mayor que en membrana de MCF-7.

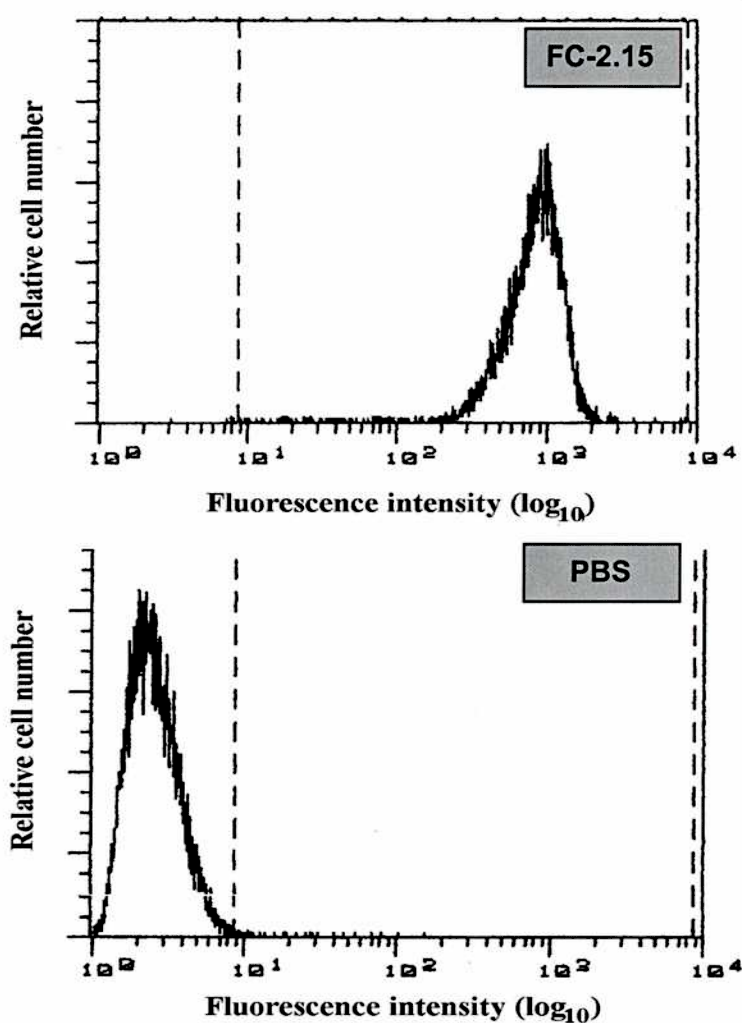


Figura III.1: Análisis de citometría de flujo de PMN con el AMC FC-2.15

PMN aislados de sangre periférica fueron incubados en presencia de FC-2.15 (50 µg/ml) o PBS durante 1 hora a 4 °C, lavados con PBS y post-incubados con F(ab)₂ hecho en cabra anti IgM murina. La intensidad de fluorescencia fue analizada por citometría de flujo.

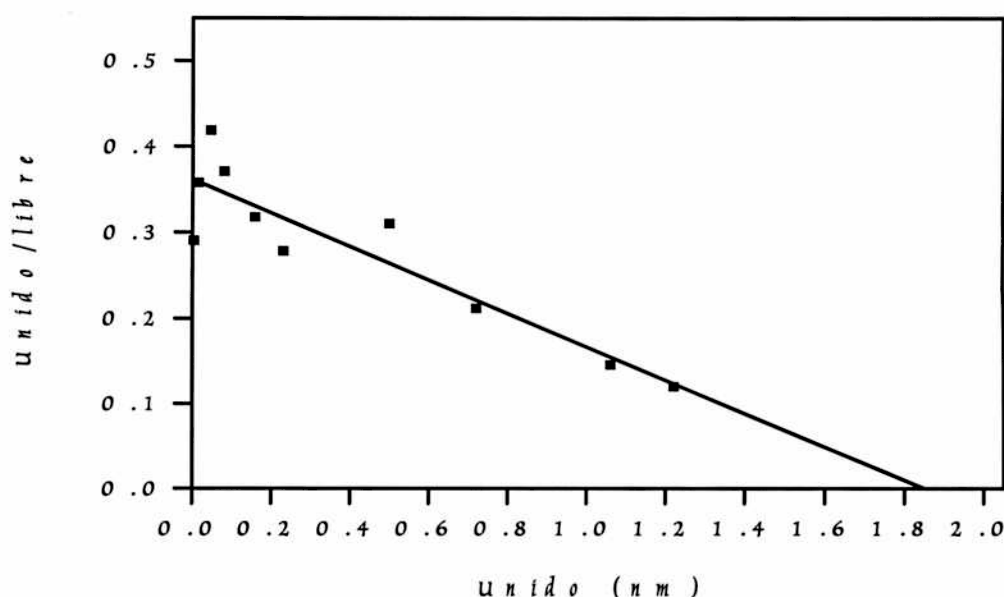


Figura III.2: Análisis de Scatchard del AMC FC-2.15 realizado sobre PMN aislados de sangre periférica.

La figura muestra un gráfico representativo de dos experimentos diferentes y cada punto corresponde al promedio de determinaciones realizadas por triplicado.

III-2. El AMC FC-2.15 aglutina a los PMN *in vitro* y forma agregados heterotípicos entre PMN y células tumorales Lewis^x-positivas

Una de las posibilidades planteadas para explicar la neutropenia observada en los pacientes tratados con el AMC FC-2.15 es que los PMN sean aglutinados y marginados de circulación. Esta hipótesis se basa en datos bibliográficos que reportan que los PMN son normalmente aglutinables por lectinas como concanavalina A (conA) o fitohemoaglutinina [Berlin RD y Ukena TE, 1972; Simchowitz L y Schur PH, 1976; Badenoch-Jones P, 1982] o por algunos anticuerpos [Galea-Lauri J y col. 1993; Madyastha PR y Glassman AB, 1989; Madyastha PR y Glassman AB, 1988].

En base a lo expuesto se estudió si el AMC FC-2.15 era capaz de aglutinar a los PMN *in vitro*, para lo que se realizó el ensayo de aglutinación descrito en Materiales y Métodos (sección IX). Brevemente, suspensiones de PMN fueron incubadas en presencia del AMC FC-2.15 durante 1 hora a 37°C con agitación suave y posteriormente observadas en un microscopio de contraste de fase. El porcentaje total de células que permanecieron aisladas fue calculado considerando como 100% el

número de células aisladas observado en un experimento control llevado a cabo en ausencia de AMC.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla III.1**, donde puede verse que el AMC FC-2.15 (50 µg/ml) induce la formación de agregados homotípicos de PMN permaneciendo aislados sólo el $28,4\% \pm 4,1\%$ de los mismos al cabo de la incubación mencionada. Con el objeto de determinar si este efecto era también observado en células tumorales Le^x-positivas, se repitió el ensayo con las células MCF-7. Como puede verse en la **Tabla III.1**, FC-2.15 fue incapaz de aglutinar las células MCF-7 (células aisladas = $96,0\% \pm 4,7\%$). Por el contrario, cuando PMN y MCF-7 fueron co-incubados en presencia del AMC FC-2.15, éste indujo la formación de agregados heterotípicos permaneciendo aislados solo el $27,0\% \pm 5,3\%$ de los PMN y el $35,1\% \pm 7,4\%$ de las células MCF-7.

Células incubadas	AMC agregado	Células aisladas (%)
PMN	-	100
PMN	FC-2.15	$28,4 \pm 4,1$
MCF-7	-	100
MCF-7	FC-2.15	$96,0 \pm 4,7$
PMN + MCF-7	FC-2.15	$27,0 \pm 5,3$ (PMN) $35,1 \pm 7,4$ (MCF-7)
IIB-BR-G	FC-2.15	100
IIB-BR-G + PMN	FC-2.15	$90,3 \pm 4,3$ (IIB-BR-G) $15,6 \pm 3,3$ (PMN)
MCF-7	436	$53,3 \pm 6,1$
PMN	436	$91,4 \pm 6,3$
MCF-7 + PMN	436	$48,5 \pm 9,5$ (MCF-7) $96,4 \pm 6,3$ (PMN)
MCF-7	B1.1	$108,2 \pm 12,9$
PMN	B1.1	$61,4 \pm 10,6$
MCF-7 + PMN	B1.1	$111,2 \pm 14,3$ (MCF-7) $54,7 \pm 16,7$ (PMN)

Tabla III.1: Ensayo de aglutinación in vitro

Células blanco (PMN, MCF-7, IIB-BR-G o combinación de ellas) fueron incubadas con FC-2.15 (50 µg/ml) o los anticuerpos control 436 (ascitis 1/100) o B1.1 (ascitis 1/100) durante 1 hora a 37°C. El porcentaje de células que permanecieron aisladas fue calculado para cada incubación. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Diversos experimentos control fueron llevados a cabo utilizando tanto la línea celular IIB-BR-G (negativa para la expresión de Le^x) en lugar de MCF-7 en las co-incubaciones, como el AMC 436 (reactivo con MCF-7 pero no con PMN) o el AMC B1.1 (reactivo con PMN pero no con MCF-7) en lugar de FC-2.15. Ninguna de éstas condiciones reprodujo el efecto descrito, el cual resultó específico para el AMC FC-2.15 sobre PMN y PMN-MCF-7 (**Tabla III.1**).

En la **Figura III.3** se muestran fotografías de algunos de los resultados antes mencionados. En el panel superior pueden verse PMN aislados o formando agregados homotípicos, cuando éstos fueron incubados en ausencia o presencia del AMC FC-2.15 respectivamente. En el panel inferior se muestran los agregados heterotípicos formados cuando PMN y células MCF-7 fueron co-incubados en presencia del AMC FC-2.15 y, agregados de PMN excluyendo las células IIB-BR-G cuando ambos tipos celulares fueron co-incubados en presencia del AMC FC-2.15.

En la **Figura III.4** se se observa por microscopía electrónica de transmisión un agregado heterotípico obtenido luego de la incubación de PMN y células MCF-7 en presencia de 50 µg/ml de FC-2.15. Puede observarse una fuerte unión entre ambos tipos celulares.

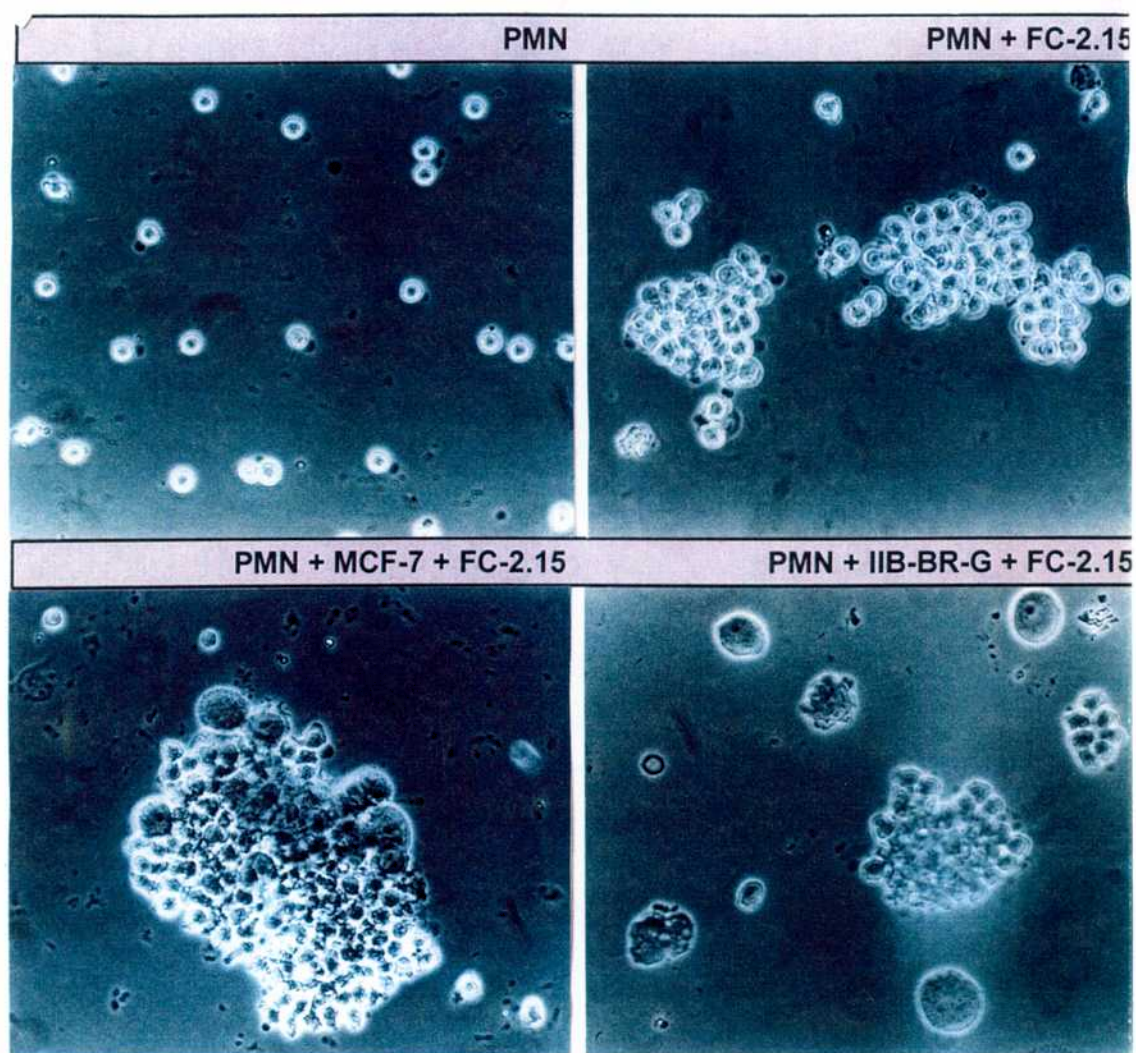


Figura III.3: *Ensayo de aglutinación in vitro realizado con el AMC FC-2.15 sobre diferentes tipos celulares.*

Fotografías representativas del ensayo de aglutinación *in vitro* realizado.

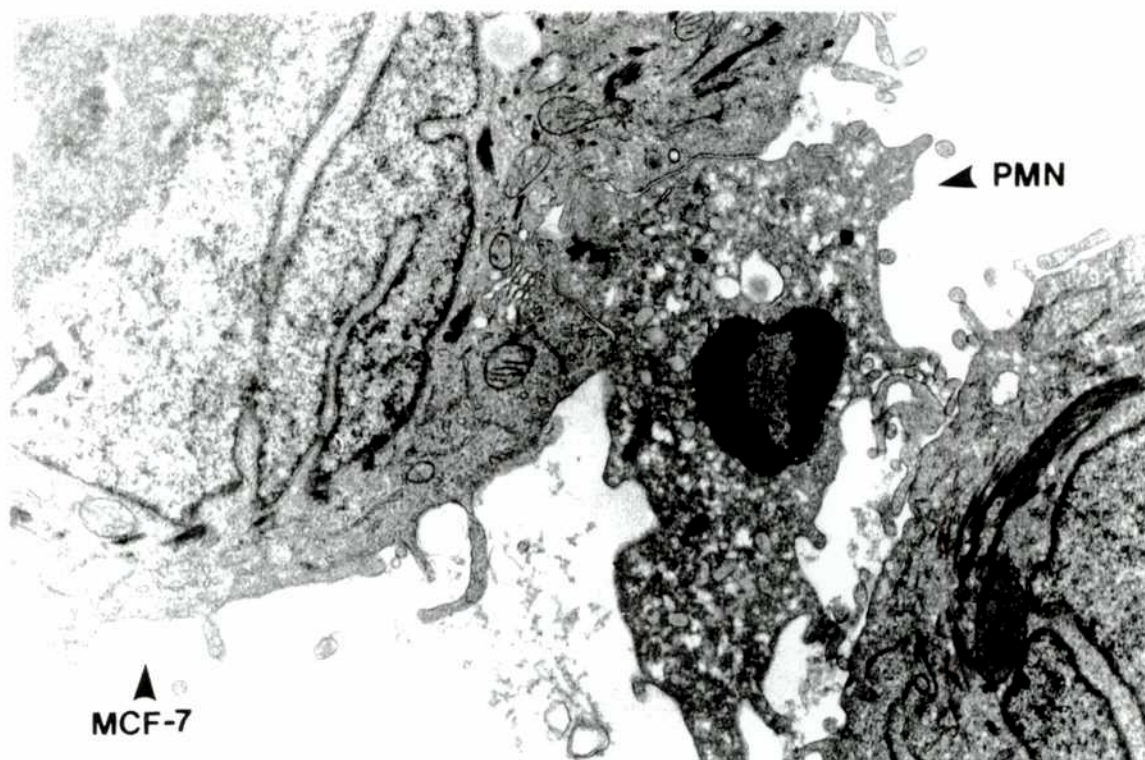


Figura III.4: *Microscopía electrónica de un agregado heterotípico PMN - MCF-7.*

Microfotografía electrónica de transmisión de un agregado heterotípico formado cuando PMN y células MCF-7 fueron co-incubados en presencia de FC-2.15. El material fue procesado según se indica en Materiales y Métodos (sección). Aumento: 10.000 X.

III-3. El AMC FC-2.15 lisa a los PMN en ensayos *in vitro*

Trabajos previos del laboratorio demostraron que el AMC FC-2.15 ejerce un rápido y fuerte efecto citotóxico sobre las células MCF-7 en presencia de suero humano como fuente de C'. Con el objeto de analizar el efecto citotóxico sobre los PMN se realizaron ensayos *in vitro* de liberación de [^{51}Cr] (Materiales y Métodos, sección XI). Brevemente, los PMN fueron marcados con [^{51}Cr] y posteriormente incubados con diferentes concentraciones de AMC FC-2.15 (5-20 $\mu\text{g/ml}$) durante distintos intervalos de tiempo (0, 30, 60, 90 minutos (min)) en presencia de suero humano como fuente de C'. Finalizado el período de incubación se cuantificó la radioactividad en los sobrenadantes y se calculó el porcentaje de citólisis específica.

Como control positivo, el mismo experimento fue realizado con células MCF-7 marcadas con [^{51}Cr].

La **Figura III.5** muestra los resultados obtenidos. Puede observarse que el AMC FC-2.15 ejerce un potente efecto citotóxico sobre los PMN en presencia de suero humano. Una lisis máxima de $93.4\% \pm 7.9\%$ fue obtenida con $20 \mu\text{g/ml}$ de FC-2.15 y 90 min de incubación aunque también una lisis considerable ($59.8\% \pm 11.7\%$) fue detectada con $5 \mu\text{g/ml}$ de FC-2.15 luego de 30 min de incubación. Es importante destacar que a mayores tiempos de incubación no se incrementó el efecto citotóxico y que los valores de lisis obtenidos con la línea celular MCF-7 fueron similares a los reportados previamente [Ballaré C y col. 1995].

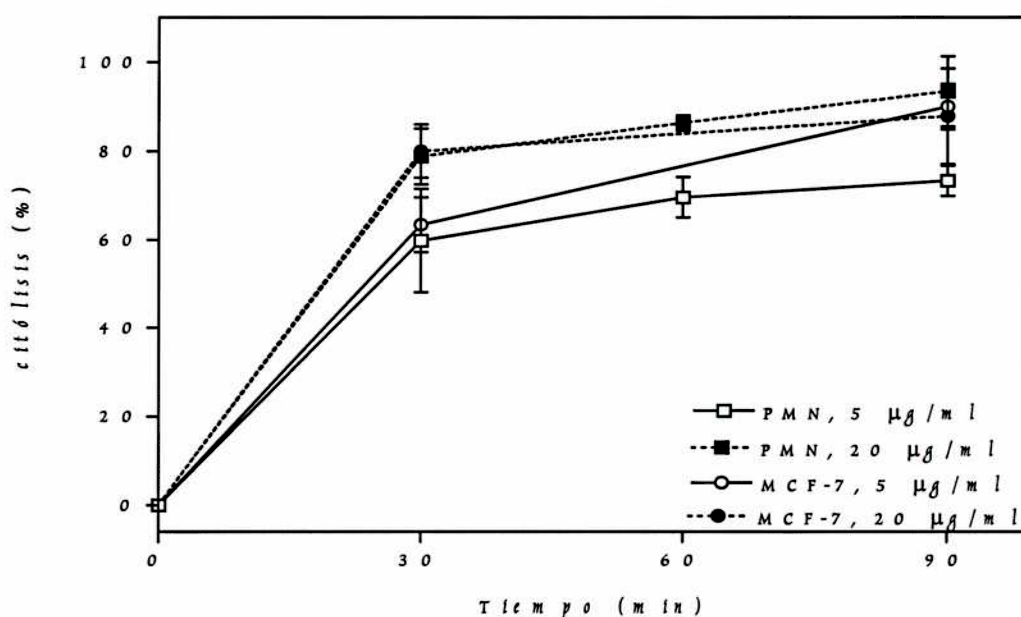


Figura III.5: Citotoxicidad mediada por C' FC-2.15-dependiente sobre PMN aislados y células MCF-7.

PMN o células MCF-7 marcados con [^{51}Cr] fueron incubados por diferentes tiempos a 37°C con suero humano (diluído 1/2) en presencia de FC-2.15 a 5 ó $20 \mu\text{g/ml}$. Luego de centrifugar, la radioactividad del sobrenadante fue determinada y el porcentaje de citólisis específico calculado. Cada punto representa el promedio de determinaciones realizadas por triplicado (barra = $\pm$ SD).

III-4. El AMC FC-2.15 aglutina, pero no lisa, a los PMN en experimentos *ex vivo* de circulación sanguínea

En la sección anterior se demostró que el FC-2.15 ejerce un fuerte efecto citotóxico contra los PMN en ensayos *in vitro*. Con la idea de aproximar las

condiciones de ensayo a lo que sucede en los ensayos clínicos, cuando el AMC FC-2.15 es inyectado por vía endovenosa a los pacientes, se desarrolló un sistema *ex vivo* de circulación sanguínea. El mismo permite estudiar el efecto del AMC sobre los PMN y/o células tumorales en sangre entera anticoagulada sometida a condiciones controladas de flujo (ver Materiales y Métodos, sección XII).

En primera instancia se estudió si las condiciones de flujo aplicadas alteraban *per se* los glóbulos blancos totales y la fórmula sanguínea. Por lo tanto, se puso a circular en el SEVCS sangre entera heparinizada durante 120 min y a diferentes tiempos se tomaron muestras, determinando el número de glóbulos blancos totales y la fórmula sanguínea según se especifica en Materiales y Métodos, sección XII. Como puede verse en la **Figura III.6**, no hay una disminución significativa de los blancos totales (la pendiente de la recta no es significativamente diferente de cero), ni tampoco ninguna alteración en la fórmula sanguínea durante los 120 min de circulación como consecuencia de las condiciones de flujo aplicadas.

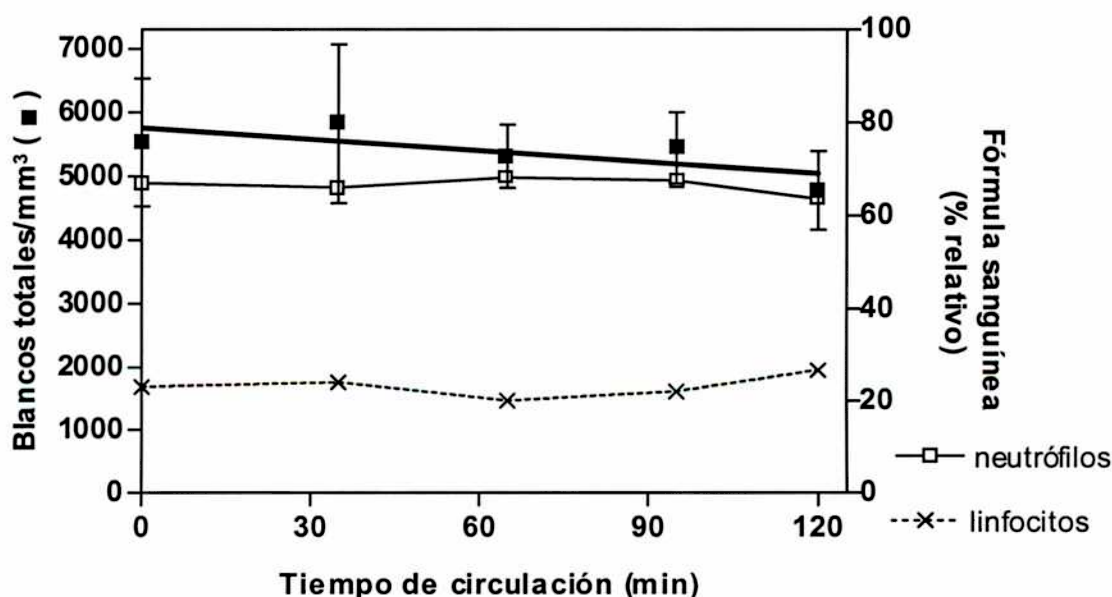


Figura III.6: *Sangre entera circulando durante 120 minutos en el SEVCS.*
Determinación del número de glóbulos blancos totales/mm³ y de la fórmula sanguínea, a diferentes tiempos de circulación.

Posteriormente se determinó el porcentaje de hemólisis espontánea causada por las condiciones de flujo aplicadas a diferentes tiempos de circulación (entre 0 y 24 horas

(hs)) según se especifica en Materiales y Métodos, sección XII. En la **Figura III.7** puede observarse que los valores de hemólisis obtenidos no superaron el 10% durante las dos primeras hs de circulación aumentando luego considerablemente hasta alcanzar valores superiores al 80% a las 24 hs de circulación.

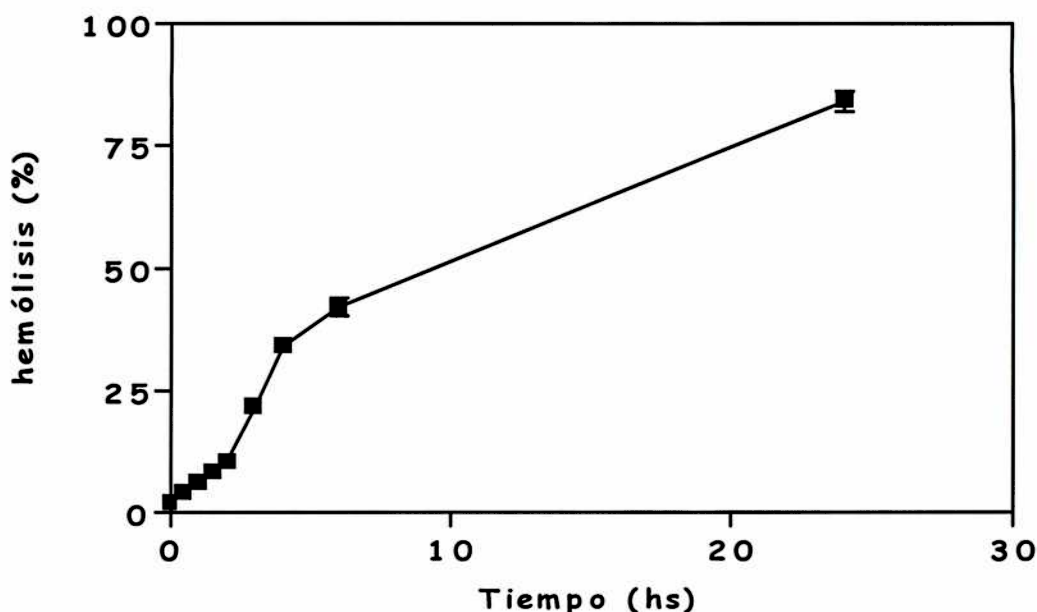


Figura III.7: Porcentaje de hemólisis espontáneo en función del tiempo de circulación en el SEVCS.

En base a éstos dos últimos resultados obtenidos, se concluyó que para estudiar el efecto del AMC FC-2.15 en el SEVCS, pueden realizarse los ensayos durante 90 min de circulación (tiempo al cual se logra el mayor efecto citotóxico en los ensayos *in vitro*) sin que se produzca interferencia en los resultados, debido a alteración sanguínea causada por el flujo aplicado.

Por consiguiente, con el fin de estudiar el efecto citotóxico del AMC FC-2.15 sobre los PMN en condiciones similares a las *in vivo*, se realizó un experimento en el SEVCS en el cual, a sangre entera heparinizada circulante, se le adicionaron 5 $\mu\text{g/ml}$ de AMC FC-2.15. Esta concentración se eligió de acuerdo a los valores máximos obtenidos para el AMC FC-2.15 (7,5 $\mu\text{g/ml}$) en el suero de los pacientes sometidos al ensayo clínico en Fase I. A diferentes tiempos de circulación se determinó el número de glóbulos blancos totales y la fórmula sanguínea (ver Materiales y Métodos, sección XII).

Sorprendentemente, los resultados obtenidos fueron totalmente diferentes a los del ensayo *in vitro* previamente realizado. En este experimento (**Figura III.8**) pudo observarse que no hay disminución significativa del número de glóbulos blancos totales, pero fue notoria en el recuento realizado, la presencia de numerosos agregados de entre 3 y 30 células aproximadamente. La observación de los frotis teñidos con May Grünwald - Giemsa corroboró dicho resultado: mientras que a tiempo cero, previo al agregado del AMC FC-2.15, se observó un frotis normal con los datos de fórmula sanguínea esperados, para los frotis preparados a diferentes tiempos post-agregado del AMC FC-2.15 se observaron linfocitos aislados en toda la superficie del mismo y numerosos grumos de PMN (de mayor tamaño a mayores tiempos de circulación en presencia del AMC FC-2.15), confinados a los bordes y la sección final del frotis, de forma tal que no es posible realizar el conteo de la fórmula sanguínea.

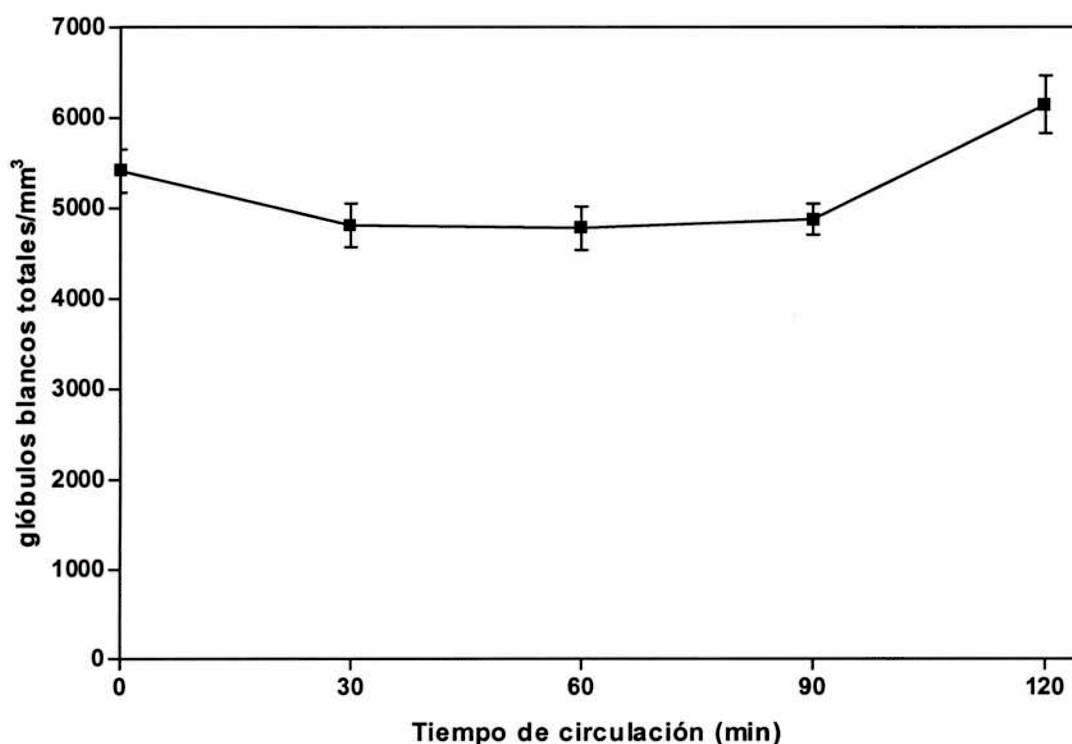


Figura III.8: Sangre entera circulando en el SEVCS en presencia de FC-2.15 (5 µg/ml)
Determinación de los glóbulos blancos totales/mm³ en función del tiempo de circulación en SEVCS.

Estos resultados estarían indicando que en nuestro sistema de sangre entera en circulación, el AMC FC-2.15 induciría la agregación homotípica de PMN en lugar de

lisar los mismos por fijación de C' humano, datos totalmente contrapuestos con lo observado en los ensayos *in vitro* previamente realizados, donde el AMC FC-2.15 mediaba la agregación de PMN en ausencia de C' humano, pero producía lisis en presencia del mismo.

Con la idea de corroborar estos resultados y poder determinar con seguridad la viabilidad de los PMN presentes en los agregados descriptos, se adaptó el ensayo de liberación de [^{51}Cr] al SEVCS. Brevemente, se aislaron PMN a partir de sangre periférica de un dador normal, se marcaron con [^{51}Cr] y se resuspendieron en sangre fresca del mismo dador. Posteriormente se introdujo la sangre así preparada en el SEVCS, se agregó el AMC FC-2.15 a diferentes concentraciones (0, 5, 20 $\mu\text{g/ml}$) y se estudió a diferentes tiempos la liberación de [^{51}Cr] (ver Materiales y Métodos, sección XI).

En la **Figura III.9** se muestran los resultados obtenidos. Puede observarse que no existe ningún efecto citotóxico del AMC FC-2.15 a 5 $\mu\text{g/ml}$ sobre los PMN y sólo un débil efecto lítico es observado a 20 $\mu\text{g/ml}$, luego de 90 min de incubación (lisis = $21.87\% \pm 6.5\%$). El experimento control llevado a cabo en ausencia de AMC FC-2.15 demostró que no existe lisis espontánea de los [^{51}Cr]-PMN durante la incubación, causada por las condiciones de flujo aplicadas. El experimento no se extendió a tiempos superiores a 90 min debido a que, como se demostró anteriormente, a mayores tiempos de circulación la hemólisis espontánea es considerable pudiendo distorsionar los resultados obtenidos. Además dicho lapso resultó ser suficiente para alcanzar en los ensayos *in vitro* el efecto lítico máximo.

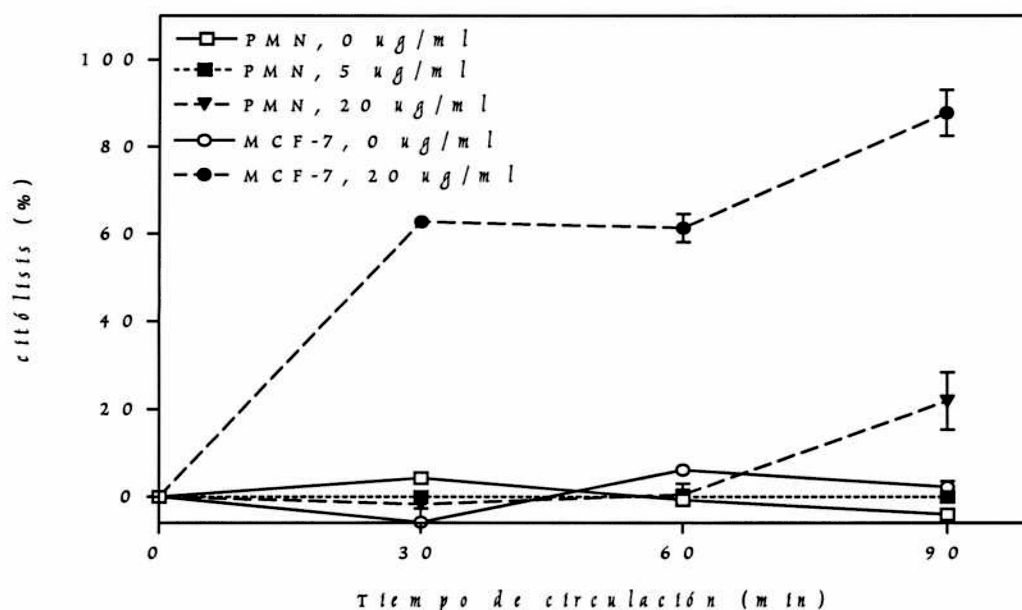


Figura III.9: Citotoxicidad mediada por C' FC-2.15 - dependiente sobre PMN y células MCF-7 en el SEVCS.

PMN aislados o células MCF-7 marcados con $[^{51}\text{Cr}]$ fueron resuspendidos en sangre entera, cargados en el SEVCS y la citólisis específica para diferentes concentraciones de FC-2.15 (0, 5, 20 µg/ml) fue calculada luego de diferentes tiempos de circulación. Cada punto representa el promedio de dos experimentos llevados a cabo por duplicado.

Con el objeto de descartar que la ausencia de efecto citotóxico sobre los PMN observada en sangre entera en circulación fuera debida a la heparina (10 U/ml) utilizada como anticoagulante, se realizó un experimento de liberación de $[^{51}\text{Cr}]$ *in vitro*, en el cual se adicionaron diferentes concentraciones de heparina (rango 10X - 1/100) a las incubaciones de $[^{51}\text{Cr}]$ -PMN con 20 µg/ml de FC-2.15 en presencia de suero humano.

Los resultados, mostrados en la **Figura III.10**, indican que la heparina no ejerce ningún tipo de inhibición sobre la lisis mediada por fijación de C' llevada a cabo por el AMC FC-2.15 sobre los PMN, ya que pueden observarse, para todas las concentraciones de heparina testeadas, los mismos niveles de citólisis específica que los obtenidos en ausencia de la misma.

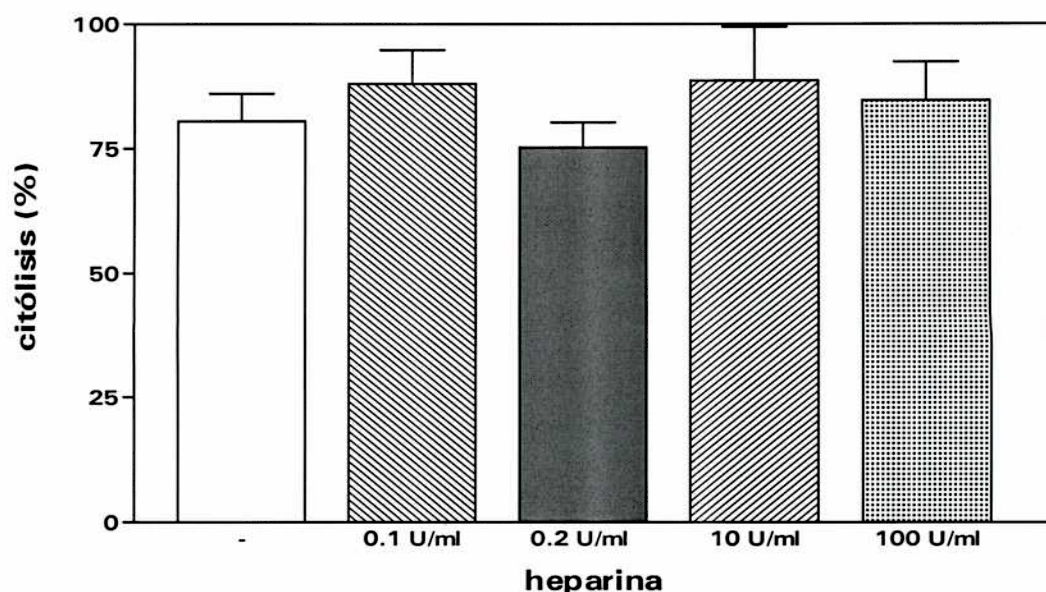


Figura III.10: Efecto de la presencia de heparina en la lisis por fijación de C' de PMN por el FC-2.15

[⁵¹Cr]-PMN fueron incubados con FC-2.15 (20 µg/ml) en la presencia de suero humano como fuente de C' y diferentes concentraciones de heparina durante 90 minutos a 37 °C. Posteriormente, la liberación de [⁵¹Cr] fue determinada en el sobrenadante y el porcentaje de citólisis calculado.

El paso siguiente fue determinar si la falta de efecto citotóxico observado en el SEVCS corresponde a un fenómeno restringido a los PMN o se trata de un fenómeno más general extendible a otras células Le^x-positivas. Se llevó a cabo entonces un experimento en el cual células MCF-7 marcadas con [⁵¹Cr] fueron resuspendidas en sangre entera heparinizada y el efecto lítico del AMC FC-2.15 fue estudiado en el SEVCS. Puede observarse en la **Figura III.9** que, contrariamente a lo observado para los PMN, las células MCF-7 fueron lisadas por el AMC FC-2.15 a los 90 min de circulación al igual que en los ensayos *in vitro* convencionales, aunque los valores de lisis obtenidos a los tiempos más cortos (30 y 60 min de circulación) fueron aproximadamente un 30% menores que los respectivos del ensayo *in vitro*.

El análisis de los frotis preparados en ambos experimentos de circulación (PMN o células MCF-7 marcadas) demostró que el AMC FC-2.15 indujo a los PMN a formar agregados homotípicos en el primer caso, y agregados homotípicos y heterotípicos (PMN - MCF-7) en el segundo caso (tal como fue observado en el ensayo *in vitro* de aglutinación llevado a cabo en ausencia de C' humano). En ambos experimentos el tamaño de los agregados se incrementó con el tiempo de circulación: grumos de 4 - 8

PMN fueron observados en todo el frotis y los grandes agregados se acumularon en los bordes del mismo.

Las áreas de 45 agregados representativos de PMN para cada tiempo fueron determinadas utilizando el analizador de imágenes Kontron KS300 y el promedio de las mismas representado en función del tiempo de circulación. Los resultados, mostrados en la **Figura III.11**, indican que el promedio del área de los agregados aumenta en forma constante con el tiempo, llegando aproximadamente a 900 μm^2 (alrededor de 113 PMN) a los 90 min de circulación.

En base a los resultados obtenidos: i) FC-2.15 induce *in vitro* la agregación homotípica de los PMN; ii) FC-2.15 lisa *in vitro* a los PMN en presencia de C' humano y iii) FC-2.15 aglutina pero no lisa a los PMN en SEVCS (aun en presencia de C' humano), se planteó en primera instancia la siguiente hipótesis: en sangre entera en circulación se vería favorecida la aglutinación de PMN, o bien la velocidad de aglutinación de los mismos sería mayor que la velocidad de lisis por fijación de C'. Por lo tanto, al adicionar el AMC FC-2.15, los PMN se agrupan y una vez ocurrido esto, por impedimento estérico se evitaría el acceso de los factores de C' a la porción Fc del AMC FC-2.15 y la lisis no tendría lugar.

De ser cierta esta hipótesis, agregados homotípicos de PMN no deberían ser lisados *in vitro* por el AMC FC-2.15 en presencia de C' humano. Además, inhibiendo de alguna forma la agrupación de los PMN en sangre entera en circulación, deberían los mismos ser blanco del efecto citotóxico del AMC FC-2.15.

III-5. El AMC FC-2.15 no lisa agregados homotípicos de PMN

Para testear la hipótesis mencionada, el ensayo de liberación de [^{51}Cr] fue realizado *a posteriori* de un ensayo de aglutinación. Brevemente, [^{51}Cr]-PMN fueron primero agregados con AMC FC-2.15 durante 1 hora a 37 °C y se calculó el porcentaje de PMN que permanecieron aislados. Posteriormente, fue agregado suero humano como fuente de C' y la citólisis específica calculada luego de 90 min a 37 °C con AMC FC-2.15 a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura III.12**, donde puede verse que existe una fuerte correlación entre el porcentaje de PMN que permanecen aislados y el porcentaje de lisis observado, sugiriendo que sólo los PMN aislados serían lisados. Este supuesto fue confirmado pues por observación de las muestras en un microscopio de contraste de fase se corroboró que los PMN agregados permanecían viables mientras que los PMN aislados no.

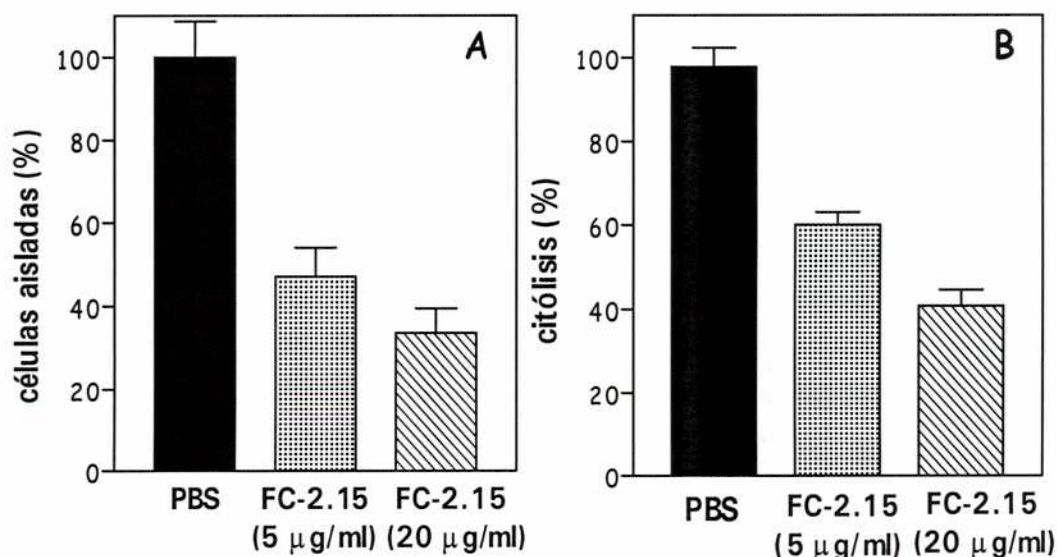


Figura III.12: Citotoxicidad mediada por C' FC-2.15-dependiente sobre agregados homotípicos de PMN.

Suspensiones de 5×10^6 [^{51}Cr]-PMN/ml fueron incubadas con FC-2.15 (0, 5, 20 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 hora a 37 °C y el porcentaje de células aisladas calculado (A). Luego de agregar suero humano (1:1, v:v) y FC-2.15 a una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$ durante 90 min a 37 °C, el porcentaje de citólisis fue determinado (B). Cada punto representa el promedio de determinaciones realizadas por triplicado.

Este resultado obtenido apoya la hipótesis planteada, ya que el AMC FC-2.15 no ejerce efecto citotóxico *in vitro* sobre agregados homotípicos preformados de PMN.

III-6. FC-2.15 lisa a los PMN en el SEVCS si la aglutinación de los mismos se bloquea

Con la idea de testear la hipótesis arriba mencionada, y basados en datos de bibliografía que reportan que drogas que desarman o desorganizan la estructura microtubular, tales como colchicina o vinblastina, inhiben la aglutinación de los PMN inducida por conA [Berlin RD y Ukena TE, 1972; Simchowicz L y Schur PH, 1976; Badenoch-Jones P, 1982], se determinó el efecto de dichas drogas en la agrupación de PMN inducida por el AMC FC-2.15 para su ulterior utilización en el SEVCS.

En primer lugar fue realizado un ensayo de agregación *in vitro* tratando a los PMN aislados con $2,5 \times 10^{-6}$ M colchicina durante 1 hora a 37 °C previamente al agregado del AMC FC-2.15 (20 µg/ml). En estas condiciones (**Figura III.13A**), el efecto del FC-2.15 en la agregación homotípica de PMN fue significativamente menor, permaneciendo aislados el $81,1\% \pm 4,3\%$ de PMN luego de la incubación con el FC-2.15 en lugar de los 28,4% de PMN que permanecieron aislados cuando la colchicina fue omitida. Puede concluirse entonces, que la preincubación con colchicina inhibió, al menos parcialmente, la agregación de los PMN inducida por el AMC FC-2.15 y por ende que la agregación de los PMN es dependiente de los microtúbulos.

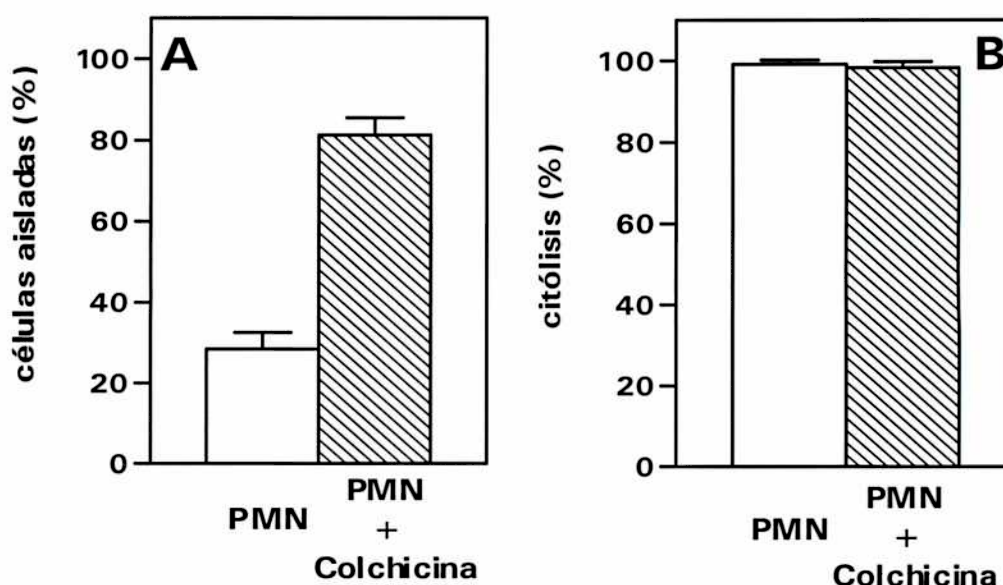


Figura III.13: Efecto del pretratamiento con colchicina sobre la aglutinación de PMN por FC-2.15 (A) y sobre la actividad lítica del FC-2.15 sobre PMN (B).

PMN aislados fueron pretratados con PBS (control) o con 2.5×10^{-6} M colchicina, incubados con FC-2.15 (20 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 hora a 37°C y el porcentaje de células aisladas calculado (A) o incubados con 20 $\mu\text{g/ml}$ FC-2.15 en la presencia de 50% suero humano durante 90 minutos a 37°C y el porcentaje de citólisis calculado (B). Cada punto representa el promedio de determinaciones realizadas por triplicado.

En segundo lugar quiso descartarse que la preincubación de los PMN con colchicina interfiriera en la lisis por fijación de C' para lo que se llevó a cabo un ensayo de liberación de ^{51}Cr *in vitro* en el cual los PMN marcados fueron preincubados con colchicina en las mismas condiciones mencionadas anteriormente previo al agregado de FC-2.15 y suero humano. Como puede verse en la **Figura III.13B**, los valores de citólisis obtenidos no se vieron afectados por la preincubación con la colchicina, permitiendo concluir que la integridad de los microtúbulos no es necesaria para la lisis por fijación de C' y que por ende los fenómenos de aglutinación y lisis son independientes.

En base a los resultados previos fue realizado un ensayo de liberación de ^{51}Cr utilizando PMN marcados pretratados con colchicina y resuspendidos en sangre entera (también pretratada con colchicina) en el SEVCS. Los resultados se muestran en la **Figura III.14** donde puede observarse que en estas condiciones el AMC FC-2.15

fue capaz de lisar a los [^{51}Cr]-PMN, siendo la máxima citólisis obtenida $78,0 \% \pm 1,1 \%$ con $20 \mu\text{g/ml}$ de FC-2.15, luego de 90 min de circulación. Es importante destacar que, si bien el efecto citotóxico fue un poco menor al obtenido en los ensayos de lisis *in vitro* ($93,4\% \pm 7,9 \%$, **Figura III.5**), el efecto inhibitorio de la colchicina sobre la agregación homotípica de PMN no fue total (aproximadamente 20 % de PMN se encuentran agregados aún en presencia de la droga).

Los resultados obtenidos serían coherentes entonces con la hipótesis planteada, ya que si se bloquea la aglutinación de los PMN en el SEVCS, los mismos son blanco del efecto citotóxico del AMC FC-2.15 por fijación ce C' humano.

Cuando se llevó a cabo un experimento en el cual [^{51}Cr]-MCF-7 pretratadas con colchicina fueron resuspendidas en sangre entera, también pretratada con colchicina y cargadas en el SEVCS, se observa (**Figura III.14**) que el AMC FC-2.15 es capaz de lisar las células en la misma proporción que lo hace en los ensayos *in vitro* desde los 30 min de circulación.

Los experimentos control llevados a cabo con células marcadas con [^{51}Cr] en ausencia de FC-2.15 demostraron que estas células no son lisadas espontáneamente durante la circulación como consecuencia de las condiciones de flujo aplicadas.

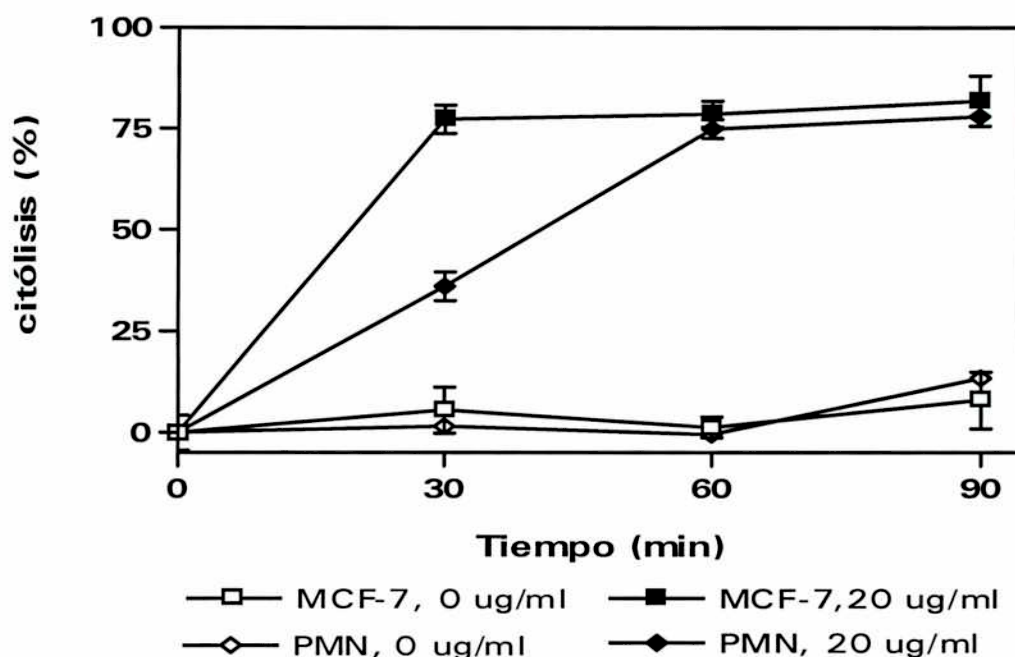


Figura III.14: Efecto del pretratamiento con colchicina sobre la citotoxicidad mediada por fijación de C' FC-2.15-dependiente sobre PMN y células MCF-7 en el SEVCS.

Células marcadas con ^{51}Cr fueron pretratadas con $2,5 \times 10^{-6}$ M colchicina durante 1 hora y resuspendidas en sangre entera también pretratada con colchicina. La citólisis específica FC-2.15-dependiente fue calculada a diferentes tiempos de circulación. Cada punto representa el promedio de determinaciones realizadas por duplicado.

Discusión

Como mencionamos en la Introducción, el primer uso clínico del AMC FC-2.15 en el ensayo de Fase I [Mordoh J y col. 1995] permitió realizar dos principales observaciones: 1) como principal toxicidad se observa una intensa neutropenia, la cual revierte rápidamente luego de finalizar con la infusión del AMC FC-2.15 con la aparición de formas juveniles de PMN en mayor proporción luego de cada ciclo de AMC; 2) se observaron respuestas clínicas, lo que sugiere que el AMC FC-2.15 estaría llegando eficientemente a los focos tumorales.

Del efecto de AMC FC-2.15 sobre células tumorales Le^x-positivas, ya fue reportado que ejerce un fuerte efecto citotóxico sobre las mismas [Ballaré C y col. 1995] y los

experimentos de liberación de [⁵¹Cr] realizados en este Capítulo con la línea celular MCF-7, confirmaron dicho efecto

Del efecto del AMC FC-2.15 sobre los PMN. como dijimos anteriormente, la neutropenia podría resultar de la lisis de los PMN, de su marginación periférica o de la eliminación de los mismos opsonizados de la sangre periférica.

En base a las observaciones mencionadas, en esta sección se llevaron a cabo estudios tendientes a caracterizar la interacción del AMC FC-2.15 con PMN y con células MCF-7 tanto *in vitro* como en un SEVCS.

En primera instancia, **hemos demostrado que el AMC FC-2.15 reacciona fuertemente con prácticamente el 100% de los PMN periféricos por los cuales presenta una alta afinidad** ($K_a = 5.14 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$).

Por otro lado, en este capítulo se ha demostrado que existe una diferencia clara cuando los PMN son tratados con el AMC FC-2.15 *in vitro* o en sangre entera en el SEVCS. *In vitro*, el AMC FC-2.15 induce la agregación homotípica de PMN, pero si se agrega C' humano, la lisis de PMN es prácticamente total. Sin embargo, en el SEVCS, la lisis es prácticamente nula y los PMN se encuentran aglutinados. Por el contrario, FC-2.15 lisa eficientemente a las células MCF-7 en ambas condiciones aunque se observa la formación de algunos agregados heterotípicos en el SEVCS.

Ya es bien conocido que la agregación de PMN requiere una estimulación previa con quimioattractantes (fMLP, TNF- α , LPS, GM-CSF) necesaria para la activación del camino de adhesión celular dependiente de las β -2 integrinas (CD11b/CD18) [Bennett TA y col. 1995; Rieu P y col. 1992; von den Driesch P y col. 1997]. También ha sido reportado que: a) el "crosslinking" del Ag de superficie CD43 por el AMC BS1 activa a los PMN promoviendo su agregación [Kuijpers TW y col. 1992]; b) algunos AMC anti-Le^x estimulan a los PMN a formar agregados homotípicos en forma activa asociada con la activación de las β -2 integrinas [Stockl J y col. 1993]; c) AMC del isotipo IgM dirigidos contra Le^x disparan un aumento del calcio intracelular en PMN [Mackenzie SJ y Kerr MA 1995], d) los PMN de un paciente con neutropenia persistente mostraban una adhesión aumentada β -2 integrina dependiente [Biasi D y col. 1994], e) PMN estimulados con quimiotractantes en sangre entera heparinizada incorporan en sus agregados células de tumor mamario humano [Orr F.W. y Mokashi S. 1985].

Basados en lo expuesto, los experimentos reportados en este capítulo sugieren que el “crosslinking” de epitopes Le^x con el AMC FC-2.15 estimula a los PMN, pero no a las células tumorales Le^x-positivas tales como las MCF-7, a formar agregados. Sin embargo, cuando los PMN y las MCF-7 son incubadas con el AMC FC-2.15, los PMN activados incorporan a las MCF-7 en agregados mixtos.

Es importante mencionar que no todos los AMC anti-Le^x testeados estimulan a los PMN a formar agregados homotípicos. Este efecto fue reportado para 3 de 12 AMC anti-Le^x probados [Stockl J y col. 1993]. El hecho de que la afinidad del AMC FC-2.15 por los PMN sea considerablemente mayor que la de otros AMC descriptos ($K_a = 5.14 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ versus K_a del orden de $10^3 - 10^5 \text{ M}^{-1}$) [Quang D y col. 1996] probablemente explique su efecto activante sobre los PMN.

¿Por qué los PMN son lisados *in vitro* pero no en el SEVCS? Por el momento sólo podemos especular. Cuando los PMN son sometidos a rangos fisiológicos de “shear stress” se induce la agregación homotípica de los mismos. El mecanismo involucrado (diferente al descripto post-activación con quimioattractantes) es dependiente de la interacción de LFA-1 (CD11a) - ICAM-3 [Okuyama M y col. 1996¹] y de la polimerización de actina en las regiones de contacto célula-célula [Okuyama M y col. 1996²]. Teniendo en cuenta este hecho, una posible explicación a la pregunta planteada es que, en el SEVCS utilizado en este trabajo, la circulación sanguínea podría favorecer una tasa de aglutinación mayor, inducida por la adición de los dos mecanismos: el AMC FC-2.15 que activa a los PMN y el flujo aplicado. En la medida que los agregados van siendo formados, habría un impedimento estérico progresivo al acceso de los factores de C’ al CR del AMC FC-2.15 y por ende los grumos de PMN formados no serían lisados. Así, en el SEVCS, la aglutinación se vería favorecida sobre la lisis.

Los resultados que demuestran que agregados de PMN preformados no son lisados por el AMC FC-2.15 en experimentos *in vitro* de liberación de [⁵¹Cr] y que el efecto lítico del AMC FC-2.15 en el SEVCS es restaurado si la aglutinación de PMN se impide por un pretratamiento con colchicina, validan la hipótesis planteada. El hecho de que las células MCF-7 sean lisadas de todas formas en el SEVCS se podría deber a su incompleta agregación con los PMN.

Los datos obtenidos sugieren también que la agregación homotípica de los PMN por el AMC FC-2.15 es altamente dependiente de la integridad de los microtúbulos (puesto que es inhibida por colchicina), mientras que la lisis de PMN por el AMC FC-2.15 tiene

lugar por un mecanismo independiente, que no requiere la previa aglutinación, puesto que no se ve afectada por la presencia de la droga.

De acuerdo al modelo propuesto, puede especularse que cuando el AMC FC-2.15 se inyecta *in vivo*, los PMN rápidamente forman agregados y son secuestrados de circulación, probablemente aumentando el pool normal de PMN marginados. La localización y destino de estos agregados es actualmente ignorado, pero no producen ninguna sintomatología clínica significativa. Tan pronto como la infusión del AMC finaliza, los PMN liberados de médula ósea podrían explicar la rápida recuperación de los mismos en sangre periférica y la aparición de formas juveniles en circulación. Este modelo es coherente con datos obtenidos en un estudio experimental de neutropenia causada por la administración de AMC [Thakur ML y col. 1996].

La inducción de neutropenia seguida a la administración de AMC ha sido previamente reportada en pacientes que recibieron un AMC anti-CEA el cual fue utilizado para inmunodetección [Dillman RO y col. 1984]. Fenómenos de neutropenia pueden producirse también espontáneamente debido a la presencia de anticuerpos anti-PMN. Carr y col. reportaron [Carr ME y col. 1996] el caso de un paciente con cáncer de colon que presentaba una neutropenia intermitente debida a una aglutinación de PMN IgM dependiente. También fueron reportados pacientes con esquistosomiasis que sufren neutropenia y que desarrollaron altos títulos de anticuerpos IgM específicos contra Ag catódico circulante que cross-reaccionan con unidades Le^x repetitivas presentes en la membrana de los PMN [van Damm GJ y col. 1996].

De lo observado en este capítulo puede concluirse que la falta de lisis de los PMN por el AMC FC-2.15 en circulación y por el contrario que las células tumorales Le^x-positivas sean eficientemente lisadas, son dos características importantes que avalan el uso del AMC FC-2.15 en el tratamiento de tumores Le^x-positivos, sin riesgo de producir una lisis masiva de PMN.

Por último, es importante comentar que para poder extrapolar las conclusiones del efecto del AMC FC-2.15 a células tumorales Le^x-positivas, mas allá de lo observado para MCF-7, los mismos experimentos fueron realizados utilizando las líneas celulares de carcinoma de colon que disponemos en el Laboratorio. Por lo tanto el efecto citotóxico del AMC FC-2.15, en presencia de C' humano, fue ensayado obteniendo en todos los casos un porcentaje de lisis coincidente con el porcentaje de células Le^x-

positivas en dichas líneas (27,25 % $\pm$ 10,21 % de lisis para T-84, 35,11 % $\pm$ 4,79 % para DLD-1, 3,89 % $\pm$ 3,86 % para CACO-2, 0 % $\pm$ 2,7 % para HT-29 y 0 % $\pm$ 6,8 % para HCT-116)(Ver Capítulo I, sección I-6).

El efecto del AMC FC-2.15 sobre células tumorales en el SEVCS fue confirmado utilizando como modelo a la línea celular de carcinoma de colon DLD-1, la cual fue lisada en el SEVCS en un 20,3 % $\pm$ 0,13%, observándose también en este caso la formación de agregados heterotípicos (datos no mostrados).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Este trabajo de Tesis se ha basado en la producción y caracterización de AMCs dirigidos contra las células troncales de carcinoma mamario humano. Para esto se inmunizaron ratones Balb/c con células intactas obtenidas de un paciente con un carcinoma de mama agresivo y altamente indiferenciado, negativo para la expresión de ER y PgR.

♦ **De los hibridomas obtenidos fue seleccionado el AMC FC-2.15, de isotipo IgM, que cumple con los requisitos deseados, puesto que:**

- ⇒ reacciona con la mayoría (93,9 %) de los carcinomas mamarios humanos, independientemente de su tipo histológico y grado de diferenciación.
- ⇒ Reconoce en ellos al 80 % de las células tumorales y al 90 % de las células proliferantes del tumor, entre las que se encuentran las células troncales.
- ⇒ reconoce otras neoplasias como carcinoma de colon y LMC principalmente.
- ⇒ presenta escaso reconocimiento con tejidos normales, siendo la principal reacción cruzada con los PMN.
- ⇒ Reacciona con antígenos de superficie celular.

♦ **En cuanto al Ag FC-2.15**, la caracterización bioquímica inicial indicó un antígeno de **naturaleza glicoproteica, residiendo el epítipo en la parte hidrocarbonada** y posteriores experimentos determinaron que **el AMC FC-2.15 reconoce específicamente al trisacárido Lewis^x o CD15 terminalmente expuesto.**

Se determinó que **el AMC FC-2.15 no presenta reacción cruzada con la contraparte sialil Lewis^x**, conocido ligando de E- y P-selectinas con roles en la adhesión PMN-endotelio activado durante la inflamación y células tumorales-endotelio activado durante la invasión tumoral. Aunque numerosas evidencias le asignan a Lewis^x roles en la interacción célula-célula y sugieren un rol en la invasividad, la función de Lewis^x parece ser diferente a la de sialil Lewis^x y aún permanece oscura.

La caracterización de la reactividad del AMC FC-2.15 en los diferentes tejidos reveló que Lewis^x puede estar formando parte tanto de N-glicoproteínas como de O-mucinas. Según el tipo celular estudiado, Lewis^x está en N-glicoproteínas exclusivamente (PMN y LMC), predominantemente en N-glicoproteínas (células T-84)

o predominantemente en O-mucinas (células MCF-7). También puede variar la cantidad de lactosaminoglicanos portando sialil Lewis^x, desde la ausencia (MCF-7), pasando por una baja proporción respecto de los Lewis^x-lactosaminoglicanos (PMN) hasta llegar a un gran predominio de los mismos en LMC y T-84.

Puede ser concluído, por lo tanto, que PMN normales y diferentes células tumorales expresan residuos Lewis^x y sialil Lewis^x en muy diferente proporción y unidos a diferentes proteínas, aunque la relevancia de Lewis^x en condiciones normales y patológicas tiene que ser aún establecida.

♦ **En cuanto a las propiedades funcionales del AMC FC-2.15**, trabajos del Laboratorio reportaron que el AMC FC-2.15 ejerce efecto citotóxico por fijación de complemento humano, y la remisión objetiva de una metástasis hepática observada en un ensayo clínico en Fase I, sugirió que el AMC FC-2.15 podría lisar eficientemente las células tumorales *in situ*. En este mismo ensayo se observó, como principal toxicidad, una profunda pero rápidamente reversible neutropenia que no estuvo acompañada por ninguna sintomatología clínica significativa.

Numerosos experimentos se han realizado en esta Tesis tendientes a caracterizar la interacción del AMC FC-2.15 con PMN y con MCF-7, tanto *in vitro* como en un sistema *ex vivo* de circulación sanguínea (SEVCS). De los mismos se ha podido concluir que:

- ⇒ El AMC FC-2.15 induce la agregación homotípica de PMN *in vitro* y forma agregados heterotípicos entre PMN y células tumorales Lewis^x-positivas.
- ⇒ El AMC FC-2.15 lisa a los PMN y células MCF-7 por fijación de complemento humano en ensayos *in vitro*.
- ⇒ Contrariamente a lo esperado, el AMC FC-2.15 aglutina, pero no lisa, a los PMN en experimentos *ex vivo* de circulación sanguínea, mientras que la lisis de MCF-7 en dicho sistema es prácticamente similar a la observada *in vitro*.

En base a estos resultados se planteó la posibilidad de que en el SEVCS los PMN sean inducidos a agregarse más rápidamente por la suma de dos mecanismos distintos: el AMC FC-2.15 que activa a los PMN y el flujo aplicado. En la medida que los agregados van siendo formados, habría un impedimento estérico progresivo al acceso de los factores de complemento al Fc del AMC FC-2.15 y por ende los grumos de PMN formados no serían lisados.

Los experimentos realizados posteriormente validaron esta hipótesis puesto que demostraron que:

- ⇒ El AMC FC-2.15 no lisa agregados homotípicos de PMN preformados en ensayos *in vitro*.
- ⇒ El AMC FC-2.15 es capaz de lisar a los PMN en el SEVCS, si la aglutinación de los mismos se impide por un pretratamiento con colchicina.

La lisis de MCF-7 en el SEVCS tendría lugar de todas formas debido a su incompleta agregación con los PMN.

Puede concluirse que la falta de lisis de los PMN por el AMC FC-2.15 en circulación y por el contrario que las células tumorales Lewis^x-positivas sean eficientemente lisadas, son dos características importantes que avalan el uso del AMC FC-2.15 en el tratamiento de tumores Lewis^x-positivos sin riesgo de producir una lisis masiva de PMN.

En síntesis,

- Obtuvimos el AMC FC-2.15 que reacciona con la mayoría de las células proliferantes de la gran parte de los carcinomas mamarios, reconociendo en su superficie el determinante Lewis^x.
- El AMC FC-2.15 ejerce efecto citotóxico por fijación de complemento humano sobre células tumorales tanto en ensayos *in vitro* como en sangre entera en circulación.
- Posee escaso reconocimiento de tejidos normales, a excepción de los PMN, sobre los que no se ha descrito una toxicidad importante *in vivo*.

Los resultados mencionados indican que el AMC FC-2.15 podría ser útil en la inmunoterapia pasiva de pacientes con carcinomas Lewis^x-positivos, sin necesidad de conjugarlo con drogas ni toxinas. Su aplicación en un ensayo clínico en Fase II está actualmente bajo experimentación.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

I. Células

I-1. Líneas celulares:

Para la realización de este trabajo de Tesis se utilizaron las siguientes líneas celulares cultivadas en atmósfera humidificada con 95 % aire, 5% CO₂ a 37 °C.

Carcinoma mamario humano: Las células **MCF-7** [Soule HD y col. 1973] y la línea celular **T47-D** [Keydar I y col. 1979] se mantuvieron en cultivo continuo en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium)/mezcla de nutrientes de Ham F12 (1:1) suplementado con 10 % suero fetal bovino (FBS) (Gibco), 2 mM glutamina, 10 µg/ml insulina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. Para el desarrollo de tumores de MCF-7, ratones atímicos nu/nu NIH de ocho semanas, suplementados con un pellet de estradiol (Collaborative Research), fueron inoculados subcutáneamente en un flanco con 5 x 10⁶ células viables. Aproximadamente un mes después, los tumores obtenidos (1 cm de diámetro) fueron extraídos y procesados para ser utilizados como fuente de antígeno (Ag).

La línea celular **IIB-BR-G**, establecida en nuestro laboratorio por la Dra. L. Bover y col. [Bover L y col. 1991], fue crecida en el medio de cultivo ya descrito suplementado con 20 nM selenito de sodio, 100 µM ácido ascórbico, 5 ng/ml factor de crecimiento epidérmico, 5 µg/ml prolactina, 1,4 µM hidrocortisona y 0,1 nM 17 β-estradiol.

La línea celular **MDA-231** [Cailleau R y col. 1974] fue mantenida en DMEM suplementado con 10 % FBS, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina.

Carcinoma de colon humano: La línea celular **T-84** [Guarino A y col. 1987] fue mantenida en medio DMEM/mezcla de nutrientes de Ham F12 (1:1) suplementado con 5 % FBS (Gibco), 2 mM glutamina, 1,2 g/l glucosa, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. El desarrollo de tumores se llevó a cabo como se mencionó anteriormente, a excepción del suplemento de estradiol.

Las líneas celulares **HT-29**, **DLD-1**, **CACO-2** [Fogh J y col. 1977] y **HCT-116** fueron cultivadas en DMEM suplementado con 3,8 g/l glucosa, 10 % FBS, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina.

Para los distintos experimentos las células fueron cosechadas por incubación durante 10 minutos (min) a 37 °C con una solución 15 mM citrato de sodio - 135 mM KCl y lavadas posteriormente con buffer fosfato salino de Dulbecco (PBS).

I-2. Leucocitos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos humanos:

Los PMN fueron obtenidos de sangre periférica humana fresca proveniente de dadores normales. A partir de sangre heparinizada se realizó primero una sedimentación de eritrocitos con dextrán (concentración final 0,6 %) en NaCl 0,15 M durante 1 hora a temperatura ambiente (Ta). Seguidamente, 15 ml del sobrenadante (sbn) obtenido fueron sembrados sobre 10 ml de un gradiente de Ficoll 9 % : Hypaque 33,9 % (24:10 v:v) y se centrifugó 30 minutos (min) a 1500 rpm. Los PMN fueron recuperados en el pellet y los eritrocitos remanentes se lisaron mediante una incubación de 10 min a Ta en una solución de lisis de eritrocitos (0,1 mM EDTA - 10 mM KCO₃H - 155 mM NH₄Cl). Finalmente los PMN fueron lavados con PBS y resuspendidos en el mismo buffer para los ensayos.

Los linfocitos fueron aislados a partir de la interfase del gradiente de Ficoll : Hypaque, se lavaron tres veces con PBS y se congelaron hasta la preparación del extracto antigénico.

I-3. Células de leucemias mieloide crónica:

Dichas células fueron obtenidas a partir de un concentrado leucoforético de un paciente con leucemia mieloide crónica (LMC) (A.M., 20 años) del Servicio de Hematología del Hospital de Clínicas. La muestra fue centrifugada durante 20 min a 1500 rpm en tubos cónicos para decantar los eritrocitos. La interfase (buffy coat) fue recuperada y los leucocitos lavados una vez con PBS. Los eritrocitos remanentes fueron lisados por incubación con la solución de lisis como se describió previamente. Finalmente los leucocitos se lavaron con PBS y resuspendieron en el mismo buffer para los ensayos.

I-4. Procesamiento de leucemias:

Muestras de sangre periférica, buffy coats o punciones de médula ósea obtenidas de pacientes con leucemia fueron procesadas de diferente manera, dependiendo de la cantidad de muestra disponible.

Primero fueron realizados frotis para la posterior realización de IH. Posteriormente las muestras fueron incubadas con Dextran 10% en CNa 0,9% (50:3, v:v) por 1 hora a Ta para la extracción del sbn consistente de plasma y glóbulos blancos. Dicho sbn fue centrifugado a 1500 rpm durante 30 min y en el pellet celular obtenido los eritrocitos contaminantes fueron lisados con solución de lisis de eritrocitos como ya fue explicado para los PMN (sección I-2). Las células blancas obtenidas fueron utilizadas para IF, y si la cantidad lo permitió, parte de ellas fueron criopreservadas en nitrógeno líquido en 90% FBS-10% DMSO o congeladas a -70 °C para su posterior utilización en la preparación de extracto antigénico.

II. Anticuerpos utilizados

El anticuerpo monoclonal (AMC) murino **FC-2.15** (IgM) desarrollado en nuestro laboratorio utilizado en este estudio, fue purificado a partir de fluido ascítico generado en ratones Balb/c según se describe en *Mordoh J y col. 1995*. Otros anticuerpos usados como control fueron: AMC murino **4.36** (IgM, ascitis), que reconoce el "core" proteico de la mucina epitelial polimórfica (PEM) en carcinoma mamario humano [*Nuti M y col. 1992*]; el AMC murino **B1.1** (IgM, ascitis), que reconoce la sección proteica del antígeno carcinoembrionario (CEA) [*Colcher D y col. 1983*]; AMC murino **B6.2** (IgG1, ascitis) que reacciona con un epítopo proteico del NCA-90 (nonspecific crossreacting antigen), glicoproteína miembro de la familia del CEA [*Kufe DW y col. 1983*] y el AMC murino **MBr1** (IgM, ascitis), que reconoce un carbohidrato presente tanto en glicolípidos como glicoproteínas de membrana plasmática de células de carcinoma mamario y epitelio de mama normal [*Menard S y col. 1983*; *Canevari S y col. 1983*]. El AMC comercial anti-Le^x utilizado, **NCL-CD15**, fue adquirido de Novocastra Laboratories, el AMC comercial **anti-CD34** (TUK 3) de Dako Corporations y la IgM murina control, **TEPC183**, de Sigma (inmunoglobulinas purificadas).

II-1. Iodinación del AMC FC-2.15

FC-2.15 fue radiomarcado con ^{125}I (Na^{125}I , New England Nuclear, 368 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) usando el método de iodogen [Franker PJ y Speck JC 1978]. Básicamente, 100 μg de AMC FC-2.15 en un volumen de 100 μl de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.4, fueron agregados a 1 mCi de Na^{125}I en un tubo de vidrio previamente cubierto con 40 μg de reactivo de iodogen (Pierce) e incubados por 10 min a temperatura ambiente (Ta), con agitación ocasional. El Na^{125}I libre fue separado de la proteína marcada por filtración en gel a través de una columna de Sephadex G-50. Las fracciones eluidas fueron analizadas en un contador γ , y aquellas conteniendo [^{125}I]-FC-2.15 fueron reunidas y conservadas a 4°C. La actividad específica del [^{125}I]-FC-2.15 fue aproximadamente de 2,4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

II-2. Biotinilación del AMC FC-2.15:

La biotinilación del AMC FC-2.15 y de la BSA fue realizada usando un succinimidil-éster de biotina [Bayer EA, Wilchek M, 1980]. Soluciones de proteína de al menos 1-3 mg/ml en borato de sodio 0,1 M pH 8,8 fueron mezcladas con sulfosuccinimidobiotina en una relación 150 μg de éster/mg de proteína e incubados durante 4 hs a Ta. Posteriormente la reacción fue detenida por agregado de 20 μl de NH_4Cl 1 M/250 μg de éster durante 10 min a Ta y la biotina no acoplada fue removida mediante diálisis extensiva de las soluciones proteicas contra PBS.

III. Complemento humano

Como fuente de complemento (C') se utilizó suero humano obtenido de dadores normales.

IV. Reactividad del AMC FC-2.15

IV-1. Inmunohistoquímica (IH) sobre cortes de tejidos humanos normales y tumorales:

La reactividad del AMC FC-2.15 con tejidos normales y tumorales se determinó sobre muestras de carcinomas de mama, de colon, patologías benignas y otras neoplasias obtenidas inmediatamente después de la cirugía. Los tejidos normales se obtuvieron de necropsias antes de las 6 hs de la muerte. Los tejidos fueron fijados en formol 3.7%, envueltos en intestino de conejo y embebidos en parafina como describe Battifora H [Battifora H, 1986]. La IH fue realizada con el método de biotina-avidin-peroxidasa [Bravo AI y col. 1985]. Brevemente, la peroxidasa endógena fue bloqueada por medio de una incubación con metanol conteniendo agua oxigenada durante 30 min y posteriormente, luego de la rehidratación del tejido, los cortes fueron bloqueados con suero normal de caballo 2,5%, 20 min a Ta en cámara húmeda. Los anticuerpos a ensayar (AMC FC-2.15, IgM total murina (50 µg/ml) o PBS como control negativo) fueron agregados durante toda la noche y al día siguiente se procedió según las indicaciones del kit ABC Vectastain (Vector). La reacción positiva es detectada por el precipitado marrón formado en el lugar donde se produjo la reacción antígeno-anticuerpo contra el fondo celeste de las células teñidas con Hematoxilina de Harris (colorante de contraste).

IV-2. Inmunocitoquímica:

Células de las distintas líneas celulares utilizadas fueron crecidas sobre portaobjetos tratados previamente con FBS puestos en placas de Petri de 100 mm de diámetro por dos días y fijadas con 3,7 % formol en PBS durante 10 min o acetona fría (5 min), realizándose posteriormente 3 lavados con PBS. La expresión del Ag FC-2.15 se determinó incubando las células fijadas y bloqueadas (suero de caballo 2,5 %) con 50 µg/ml de AMC FC-2.15 y la visualización de la reactividad se realizó con el conjugado biotina-avidin-peroxidasa como se explicó anteriormente (sección III-1).

IV-3. Inmunofluorescencia indirecta:

La inmunofluorescencia (IF) indirecta se realizó sobre células vivas ya sea crecidas en placas de Petri de 35 mm de diámetro o sobre células en suspensión. Luego del bloqueo con suero de cabra al 10 % por 15 min, las células se incubaron en tubos

ependorf ($5-10 \times 10^5$ células/tubo) con AMC FC-2.15 ($50 \mu\text{g/ml}$) por 1 hora. Luego de dos lavados con PBS, la unión del AMC se reveló incubando con un antisuero de cabra anti-Igs de ratón conjugado con FITC, diluido 1/50 (Sigma) por 30-45 min. Se lavaron con PBS y se montaron en N-propil-galato al 5%, Permafluor (Immunon). Todas las incubaciones y los lavados se realizaron a $0^\circ\text{C} - 4^\circ\text{C}$ (temperatura a la cual se minimiza la internalización del AMC, en caso de que se produjera, observándose la reactividad en la superficie celular). Los preparados se observaron en un fotomicroscopio Zeiss equipado con un dispositivo de epifluorescencia con filtro para fluoresceína. En los experimentos control, las células son incubadas con PBS o IgM total murina, en lugar del AMC FC-2.15. También se realizaron IF sobre PMN aislados de sangre periférica (sección I-2) o glóbulos blancos aislados de las leucemias (sección I-4), utilizando 10^6 células/100 μl por punto y siguiendo el protocolo anteriormente explicado.

V. Extracción antigénica

Diferentes fuentes de antígeno fueron utilizadas: Células MCF-7 crecidas en cultivo, PMN o linfocitos aislados de sangre periférica, células de LMC y células de tumores MCF-7 o T-84 crecidos en ratones atímicos (nu/nu NIH). Los extractos antigénicos se prepararon a partir de suspensiones de $5-10 \times 10^7$ células (líneas celulares), o bien a partir de tumores murinos o humanos (1-2 gr) obtenidos de intervenciones quirúrgicas o biopsias, conservadas a -70°C . Luego de una pulverización bajo nitrógeno líquido, la muestra se resuspende en 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1,5 mM EDTA, 0,5 mM ditioneitol, 1 mM PMSF y se homogeneiza con un homogenizador Politrón (dos series de 30 segundos separadas por un intervalo de 2 min). El homogenato obtenido fue centrifugado durante 10 min a 1000 g en frío para descartar el pellet de restos celulares y núcleos y el sobn obtenido ultracentrifugado durante 2 hs a 100.000 g. El sobn de alta velocidad constituye el "extracto citoplasmático" y el pellet, solubilizado durante 15 min a 4°C con 1% NP40 en 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM KCl, 1 mM PMSF, constituye el "extracto de membranas". La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry [Lowry OH y col. 1951] y muestras de estos extractos se utilizaron en ELISA y Western Blot.

VI. Caracterización antigénica

VI-1. Dot blot:

El Dot-Blot fue realizado sembrando las muestras sobre una membrana de nitrocelulosa [Hawkes R y col. 1982; Livingston PO y col. 1994]. El AMC FC-2.15 se ensayó a 5 µg/ml y un anticuerpo de cabra anti-IgM murina conjugado con peroxidasa (Tago) fue utilizado como segundo anticuerpo. Las muestras a analizar incluyeron a) Mucinas de quiste de ovario (0,05 µg/punto) conteniendo 1) Le^x y Le^a, o 2) Le^y y Le^b, o 3) antígenos de grupos sanguíneos A o B, o 4) precursor OG no-fucosilado provistas por Kenneth Lloyd [Lloyd KO y col. 1996], que junto con los gangliósidos (0,5 µg/siembra) GM3, GM2, GM1, GD3 y GD2 (Matreya Inc.) fueron utilizados como antígenos naturales; y b) sTn o sTn trímeros sobre un esqueleto de serinas (sTn(c)) (Biomira Inc.), Thomsom-Freidenreich antigen (TF) y un péptido de 32 aminoácidos de la mucina Muc 1 (todos 0,5 ug) todos conjugados a keyhole limpet haemocyanin (KLH) o KLH sola (Perimmune Inc.) y el hexasacárido Globo H con una cola de ceramida [Ragupathi G y col. 1997] fueron usados como antígenos sintéticos. Le^x-trisacárido y Le^a-trisacárido conjugados con poliacrilamida (Glyco Tech Inc.) fueron testeados a 0,5 µg/punto. Los resultados fueron determinados como negativo, 1+, 2+ o 3+ por inspección visual.

VI-2. Técnica de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) [Engwall, 1980]

5 µg de extracto antigénico en 30 µl de buffer 1% NP40 fueron sembrados por pocillo en multipocillos de polivinilo (Corning) y dejados secar durante la noche a 37 °C. Luego las multiplacas fueron bloqueadas con seroalbúmina bovina (BSA) 10 mg/ml en PBS, durante 1 hora a Ta e incubadas durante toda la noche a 4 °C con las diluciones de los anticuerpos a ensayar o PBS como control negativo. Al día siguiente fueron realizados 6 lavados con BSA 1 mg/ml en PBS y se agregó como segundo anticuerpo uno hecho en conejo anti-Ig de raton conjugado con peroxidasa (Dako Corporation)(1/250 en BSA 1 mg/ml) durante 90 min a Ta. Se repitieron los lavados con BSA 1 mg/ml y la unión del segundo Ac fue revelada con o-fenilendiamina (OPDA) 1mg/ml en buffer citrato 0,1M pH 4,5 - 0,012 % H₂O₂ durante 30 min en oscuridad, deteniéndose la reacción con ácido sulfúrico 8 N y cuantificándose por medición de la absorbancia a 415 nm en un lector de ELISA (Microplate Reader, BIORAD).

En otros experimentos, en los multipocillos de 96 fueron sembradas diferentes cantidades de BSA, Le^x-BSA, sialil Le^x-BSA, Le^x-mucina o Le^a-mucina en 50 µl de buffer de siembra (15 mMCO₃Na₂ - 35 mM HNaCO₃ – 0,02 % NaN₃, pH 9,6) y secados durante la noche a 37 °C. Posteriormente, el ELISA se realiza como fue anteriormente explicado.

VI-3. Ensayo de inhibición de binding:

Para testear si el AMC comercial NCL-CD15 (Novocastra Laboratories Ltd.) anti Le^x compite con el AMC FC-2.15 en la unión a extractos de membrana de MCF-7 fue realizado un ensayo de inhibición de binding [Demetrick DJ y col. 1992]. Brevemente, una cantidad preseleccionada (6 µg proteína/pocillo) de extracto de membrana de MCF-7 fue adsorbida a los pocillos durante la noche a 37 °C. Luego los pocillos fueron bloqueados durante 2 hs con BSA 1 % en PBS e incubados con 50 µl de NCL-CD15 (1/7.5) o 50 µl de BSA (10µg/ml) por 4 hs a Ta. Posteriormente, diferentes concentraciones (0-50 µg/ml) de AMC FC-2.15 biotinilado o BSA biotinilada fueron agregadas durante la noche a 4 °C, los pocillos lavados 6 veces con 0,1 % BSA en PBS, incubados con Streptoavidina conjugada con peroxidasa 1/300 (Life Technologies) por 3 hs a Ta y lavados como se mencionó anteriormente. Finalmente, la reacción se revela como se indicó en el ensayo de ELISA.

VI-4. Técnicas electroforéticas:

Se llevaron a cabo electroforesis en geles de poliacrilamida en diferentes condiciones, según se aclara en cada caso. Las corridas en condiciones desnaturalizantes se realizaron según describe Laemmli [Laemmli UK, 1971] mientras que las electroforesis en condiciones nativas se llevaron a cabo siguiendo los protocolos de Blackshear [Blackshear PJ, 1984]. Cuando se realizan los geles gradiente 3%-12%, el gel separador utilizado es 3%. En todas las condiciones de electroforesis explicadas, las muestras fueron analizadas tanto en condiciones reductoras como no reductoras.

VI-5. Técnica de Western Blot: [Burnette WN, 1981]

Muestras de extracto antigénico fueron corridas en electroforesis en gel de poliacrilamida (porcentaje y tipo de gel son aclarados en cada caso) a 34 volts

durante la noche y la transferidas a un filtro de nitrocelulosa (0.45 μ m) (Sigma) a 4 °C a 95 volts durante 3 hs con un buffer de transferencia conteniendo 20 mM Tris - 150 mM glicina - 20% metanol. El filtro fue bloqueado mediante una incubación con 3% de leche en polvo en PBS, 1 hora a Ta, e incubado durante toda la noche a 4 °C con el AMC FC-2.15 (50 μ g/ml) o ascitis control (1/150) en PBS-3% leche descremada. Al día siguiente, 3 lavados con PBS-0,05% Tween 20 fueron realizados, y los filtros incubados durante 2 hs a Ta con F(ab')₂ cabra anti-Ig de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 1/10000. Se repitieron los tres lavados con PBS-Tween 20 y la reacción fue revelada en presencia de BCIP-NBT (Gibco,BRL) como sustrato de la enzima.

VI-6. Digestión antigénica con Péptido N-glicosidasa F (PNGasa F) y Neuraminidasa:

Muestras de extracto de membrana (20 μ g de PMN o 100 μ g de LMC, células MCF-7 o tumores de T-84 desarrollados en ratones nude) se sometieron a tratamiento con la enzima PNGasa F (Biolabs) según se describe en Tarentino,1990 [Tarentino A y col. 1990] durante 1 hora a 37 °C o se digirieron con Neuraminidasa de *Cl. Perfringens* (BioLabs), 15 U/mg de extracto, en buffer citrato de sodio 5 mM pH 4,5 durante 2 hs a 37 °C. Alternativamente se realizaron controles de muestras no tratadas y tratadas en iguales condiciones pero en ausencia de enzima. Las reacciones se detuvieron por agregado de buffer de muestra, se corrieron en geles de poliacrilamida y la persistencia del antígeno fue analizada mediante la técnica de Western Blot.

Cuando se digirieron con Neuraminidasa células en cultivo (crecidas sobre P-35), la enzima fue utilizada en una concentración 100 X a la habitual, puesto que las digestiones (para que sean compatibles con la viabilidad celular) debieron hacerse en PBS, buffer de pH 7,4, condiciones muy lejanas a las óptimas para la mayor actividad enzimática. La digestión se realizó durante 2 hs en estufa a 37 °C. Se realizaron en todos los casos los controles de células sin tratar.

VI-7. Tratamientos enzimáticos:

2 μ g (PMN) o 5 μ g (MCF-7) de extracto de membrana/pocillo se plaquearon en multiplacas de 96 pocillos y se dejaron secar durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente los pocillos se rehidrataron con PBS durante 5 minutos y se sometieron,

según corresponda, a los siguientes tratamientos: a) metanol frío, durante 30 minutos a 0°C [Canevari et al, 1983]; b) tripsina 2.5 mg/ml y Proteinasa K 2 mg/ml en buffer Tris-HCl 10 mM pH 8, 2 mM Cl_2Ca durante 1 hora a 37°C [Pancino et al., 1989]; c) tratamiento con calor 100°C durante 30 minutos, el cual se llevó a cabo con el extracto en suspensión previo a ser sembrado [Canevari et al, 1983]; d) oxidación con periodato de sodio a 4°C durante dos horas en oscuridad, adicionando a los pocillos buffer fosfato 10 mM pH 7.2 conteniendo diferentes cantidades de periodato de sodio entre 0 y 50 mM [Canevari et al, 1983] y e) PBS como control. Posteriormente se lavan las placas con PBS tres veces, 5 minutos cada vez y se bloquean con BSA 1% en PBS durante una hora a temperatura ambiente, determinando luego la persistencia del epítopo por el método de ELISA previamente descrito.

La oxidación con periodato de sodio sobre células MCF-7 fue realizada solo con 10 mM y durante 1 hora a Ta.

VII. Citometría de flujo

PMN aislados fueron incubados durante 60 min a 4°C con FC-2.15 (50 $\mu\text{g/ml}$) en PBS, lavados tres veces con PBS e incubados con F(ab)₂ de cabra anti-IgM murina conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Zymed, dilución 1/50 en PBS) por 60 min a 4°C. Finalmente se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con 2% formaldehído y la intensidad de fluorescencia fue analizada con un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson). En experimentos control se utilizó PBS en lugar de FC-2.15.

VIII. Análisis de Scatchard

PMN aislados de sangre periférica fueron usados como antígeno blanco. Se incubaron 3×10^5 células en 100 μl de PBS conteniendo cantidades crecientes de FC-2.15 (rango: 0,05 - 30 $\mu\text{g/ml}$) durante 3 horas (hs) a 4°C. Para determinar la captación inespecífica, se realizaron incubaciones control en presencia de un

exceso de 100 veces de AMC FC-2.15 frío. Al finalizar el período de incubación, se efectuaron dos lavados con PBS y se cuantificó la radioactividad unida a las células en un contador γ . Se utilizó el análisis de Scatchard [Scatchard G. 1949] para calcular la constante de afinidad (K_a) del AMC FC-2.15 y el número promedio de sitios antigénicos por célula.

IX. Ensayo de aglutinación in vitro del AMC FC-2.15

Suspensiones de PMN de 3×10^6 células/ml de PBS fueron incubadas con el AMC FC-2.15 (concentración indicada en cada experimento) durante 1 hora a 37 °C con agitación suave. Posteriormente las suspensiones fueron observadas en un microscopio de contraste de fase (Axioplan, Carl Zeiss) y el porcentaje de células que permanecen aisladas fue calculado considerando como 100% el número de células aisladas de un experimento control llevado a cabo en ausencia de FC-2.15. Cuando se indica, fue llevado a cabo un pretratamiento de los PMN con colchicina ($2,5 \times 10^{-6}$ M) durante 1 hora a 37 °C, manteniéndose la misma durante el ensayo de aglutinación.

Experimentos similares fueron realizados con suspensiones mixtas de PMN y células MCF-7 (Lewis^x (Le^x)-positivas) o IIB-BR-G (Le^x-negativas) [Ballaré C y col. 1995] (3×10^6 : 3×10^5 células/ml PBS). Como anticuerpos control fueron utilizados el AMC B1.1 [Colcher D y col. 1983] (ascitis 1/100), reactivo con PMN pero no con células MCF-7 y el AMC 4.36 [Nuti M y col. 1992] (ascitis 1/100), reactivo con MCF-7 pero no con PMN.

X. Microscopía electrónica

Para la realización de la microscopía electrónica las células fueron fijadas con 10% glutaraldehído en PBS durante 1 hora a Ta, post-fijadas en 1% tetróxido de osmio en buffer veronal acetato pH 7,4 por 2 hs a 4 °C, teñidas con acetato de uranilo (5 mg/ml), deshidratadas en acetona y finalmente embebidas en Epon 812.

XI. Citotoxicidad mediada por complemento anticuerpo-dependiente

Un ensayo de liberación de [^{51}Cr] fue utilizado para analizar la capacidad del AMC FC-2.15 de mediar lisis por C'. Como células blanco se utilizaron PMN humanos y células MCF-7. Para el ensayo, las células blanco ($2,5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron marcadas con [^{51}Cr] ($150 \mu\text{Ci}/\text{ml}$) ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, actividad específica $550 \text{ mCi}/\text{mg}$, New England Nuclear) por 2 hs a 37°C , y lavadas tres veces con PBS o medio de cultivo. Células marcadas con [^{51}Cr] (10^5 células por punto) fueron incubadas en $100 \mu\text{l}$ DMEM con el agregado de $100 \mu\text{l}$ de suero humano como fuente de C', en presencia de diferentes concentraciones del AMC FC-2.15 (rango entre 0 y $20 \mu\text{g}/\text{ml}$) y durante diferentes intervalos de tiempo a 37°C . Paralelamente se efectuaron incubaciones de células blanco resuspendidas en medio solo, o con $0,1 \text{ N HCl}$ para evaluar la liberación espontánea y máxima de [^{51}Cr], respectivamente. Cada ensayo fue llevado a cabo por triplicado. Al final del período de incubación, las células fueron centrifugadas a 1200 rpm por 10 min y la radioactividad en los sobrenadantes cuantificada en un contador γ . El porcentaje de citólisis específica fue calculado de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ lisis específica} = \frac{\text{liberación experimental (cpm)} - \text{liberación espontánea (cpm)}}{\text{liberación máxima (cpm)} - \text{liberación espontánea (cpm)}} \times 100$$

Cuando es indicado, diferentes concentraciones de heparina fueron adicionadas al medio de incubación y la citólisis específica calculada como se mencionó previamente. En algunos experimentos, se realizó un tratamiento de los PMN marcados radioactivamente con $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ colchicina durante 1 hora a 37°C , previamente a que tenga lugar el ensayo de lisis.

Para estudiar la citotoxicidad mediada por C' FC-2.15 - dependiente en sangre entera en circulación, las células marcadas con [^{51}Cr] ($450.000 \text{ PMN}/\text{ml}$ o $150.000 \text{ MCF-7}/\text{ml}$) fueron resuspendidas en sangre entera heparinizada ($10 \text{ U}/\text{ml}$) y la misma, cargada en un set de infusión, fue sometida a condiciones de flujo controladas mediante una bomba peristáltica (ver Materiales y Métodos, sección XII). Cuando se indica, fueron agregados diferentes concentraciones de AMC FC-2.15 y a los tiempos especificados, se tomaron muestras de sangre de $500 \mu\text{l}$ con una jeringa de 1.0 ml de volumen. Para determinar la liberación de [^{51}Cr]

experimental, la sangre fue diluída 1:2 con PBS y centrifugada a 2.000 rpm durante 20 min. La liberación total de [^{51}Cr] fue medida diluyendo 1:2 la sangre con 0.15 N HCl y centrifugando como se indicó anteriormente. En ambos casos, la radioactividad del sbn fue cuantificada en un contador γ . La liberación espontánea de [^{51}Cr] fue determinada sólo a tiempo cero, previamente al agregado de FC-2.15. Para cada tiempo ensayado, fueron preparados frotis y los mismos fueron teñidos con May Grünwald - Giemsa. Cuando es indicado, fue realizado un tratamiento con $2,5 \times 10^{-6}$ M colchicina durante 1 hora a 37 °C tanto de las células (PMN o MCF-7) marcadas con [^{51}Cr] como de la sangre entera heparinizada, previo a la realización del ensayo de liberación de [^{51}Cr].

Para estudiar la citotoxicidad mediada por C' FC-2.15-dependiente sobre agregados homotípicos de PMN, suspensiones de 5×10^6 [^{51}Cr]-PMN fueron primero incubadas con diferentes concentraciones de FC-2.15 (0, 5, 20 $\mu\text{g/ml}$ PBS) durante 1 hora a 37 °C con agitación suave y el porcentaje de células que permanecieron aisladas, calculado como se mencionó anteriormente. Seguidamente se agregó suero humano como fuente de C' (1:1, v:v) y la citólisis calculada luego de una incubación de 90 min a 37 °C en presencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ de FC-2.15, concentración final.

XII. Sistema ex vivo de circulación sanguínea (SEVCS):

Sangre heparinizada (10 U/ml) fue obtenida de dadores normales. Las condiciones de flujo fueron establecidas introduciendo dicha sangre en un set de infusión (BIOM, B14) de 4 mm de diámetro conectado a una bomba peristáltica (LKB-Pump P1, Pharmacia) la cual permite aplicar una tasa de flujo controlada de 730 ml h^{-1} (1,61 cm/seg). El sistema entero fue mantenido a 37 °C y la oxigenación durante la circulación fue lograda mediante una aguja de 25G insertada en el puerto de acceso del set de infusión. A través de ese mismo puerto de acceso se tomaron las muestras de sangre con una jeringa de 1.0 ml (aguja de 25G) a los tiempos indicados.

El número de glóbulos blancos totales/mm³ fue determinado por recuento en cámara de Neubauer luego de una lisis de eritrocitos con 2% ácido acético (1:20, sangre: ácido acético 2%) y la fórmula sanguínea calculada a partir de frotis teñidos con May Grünwald - Giemsa.

El porcentaje de hemólisis espontánea a distintos tiempos de circulación fue determinada de la siguiente manera: 50 µl de sangre diluída 1:1 con PBS fueron incubados durante 10 min a Ta, centrifugados a 2.000 rpm por 10 min y la absorbancia del sbn (diluído 30:500 con agua destilada) a 416 nm fue medida como indicativo de la cantidad de hemoglobina liberada. Para calcular la hemólisis total, 50 µl de sangre fueron diluídos 1:1 con solución de lisis de eritrocitos e incubados, centrifugados y medidos como se mencionó anteriormente.

XIII. Análisis de imágenes:

El tamaño de los grumos fue determinado usando un microscopio Axioplan (Carl Zeiss, Alemania) y un analizador de imágenes Kontron KS300 (Kontron Elektronik, Alemania).

ANEXOS

ANEXO I: ABREVIATURAS

AAT	Antígeno Asociado a Tumor
Ac	anticuerpo
ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Acticuerpo
Ag	antígeno
AMC	anticuerpo monoclonal
^{Biot}BSA	BSA biotinilada
^{Biot}FC-2.15	FC-2.15 biotinilado
BSA	seroalbúmina bovina
C'	complemento
CAM	Moléculas de Adhesión Celular
CEA	antígeno carcinoembrionario
conA	concanavalina A
cpm	cuentas por minuto
CRD	Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	receptor de estrógeno
FBS	suero fetal bovino
FITC	isotiocianato de fluoresceína
fMLP	formil-metionina-leucina-fenilalanina
GMCSF	factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos
gp	glicoproteínas
hs	horas
ICQ	inmunocitoquímica
IF	inmunofluorescencia
Ig	inmunoglobulina
IH	inmunohistoquímica
Ka	constante de afinidad
kDa	kiloDalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin

Le^a	Lewis ^a
Le^b	Lewis ^b
Le^x	Lewis ^x
Le^y	Lewis ^y
LMC	Leucemia mieloide crónica
LPS	lipopolisacárido
min	minutos
NCA	nonspecific cross-reactive antigen
NK	Natural Killer
OPDA	ortofenilenediamina
PAA	poliacrilamida
PBS	buffer salino de fosfatos
PECAM	molécula de adhesión celular endotelio-plaqueta
PEM	Mucina Epitelial Polimórfica
PgR	receptor de progesterona
pl	punto isoeléctrico
PM	peso molecular
PMN	leucocitos polimorfonucleares
PNGasaF	Péptido N-glicosidasa F
sbn	sobrenadante
SD	desviación estándar
SEVCS	sistema <i>ex vivo</i> de circulación sanguínea
SLe^x	sialil Lewis ^x
Ta	temperatura ambiente
TcR	receptor de células T
TF	Thomson-Freidenreich antigen
TNF-α	factor de necrosis tumoral- α

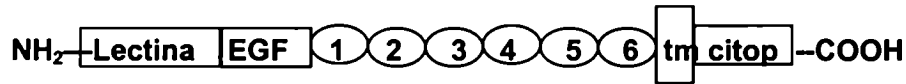
ANEXO II: Integrinas y sus ligandos

Subunidad		Otra denominación	Ligando
β_1	α_1	VLA-1 (CD49aCD29)	Colágeno, laminina
	α_2	VLA-2 (CD49bCD29)	Colágeno, laminina
	α_3	VLA-3 (CD49cCD29)	Colágeno, laminina, fibronectina, entactina
	α_4	VLA-4 (CD49dCD29)	Fibronectina, VCAM-1
	α_5	VLA-5 (CD49eCD29)	Fibronectina
	α_6	VLA-6 (CD49fCD29)	Laminina
	α_7		Laminina
β_2	α_L	LFA-1 (CD11aCD18)	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	α_M	MAC-1, CR3 (CD11bCD18)	iC3b, fibrinógeno, factor X, ICAM-1
	α_X	P150,95; CR4 (CD11cCD18)	iC3b, fibrinógeno
β_3	α_V	CD51CD61	Vitronectina, fibrinógeno, factor de Von Willebrand, trombospondina, fibronectina, osteopontina, colágeno, PECAM-1
	α_{IIb}		Fibronectina, fibrinógeno, factor de Von Willebrand, vitronectina, trombospondina
β_4	α_6	CD49fCD104)	Laminina
β_5	α_V		Vitronectina
β_6	α_V		Fibronectina
β_7	α_4		Fibronectina, VCAM-1, MadCAM
	α_V		Fibronectina
	α_E		E-caderinas

[Hynes RO, 1992; Springer TA, 1994; Karcela PI y col. 1995]

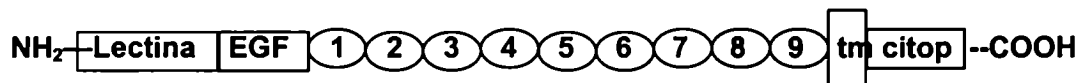
ANEXO III: Estructura y función de las Selectinas

E-Selectina



- Localización: Endotelio (activadas transcripcionalmente)
- Expresión: Aumenta con la inflamación (IL-1, TNF, LPS)
- Adhiere a: monocitos, neutrófilos (rolling), subconjunto de células T
- Función propuesta: Inflamación

P-Selectina



- Localización: Plaquetas (α -gránulos); Endotelio (cuerpos de Weibel-Palade)
- Expresión: Aumenta con trombina, histamina, peróxidos
- Adhiere a: monocitos, neutrófilos (rolling), subconjunto de células T
- Función propuesta: inflamación

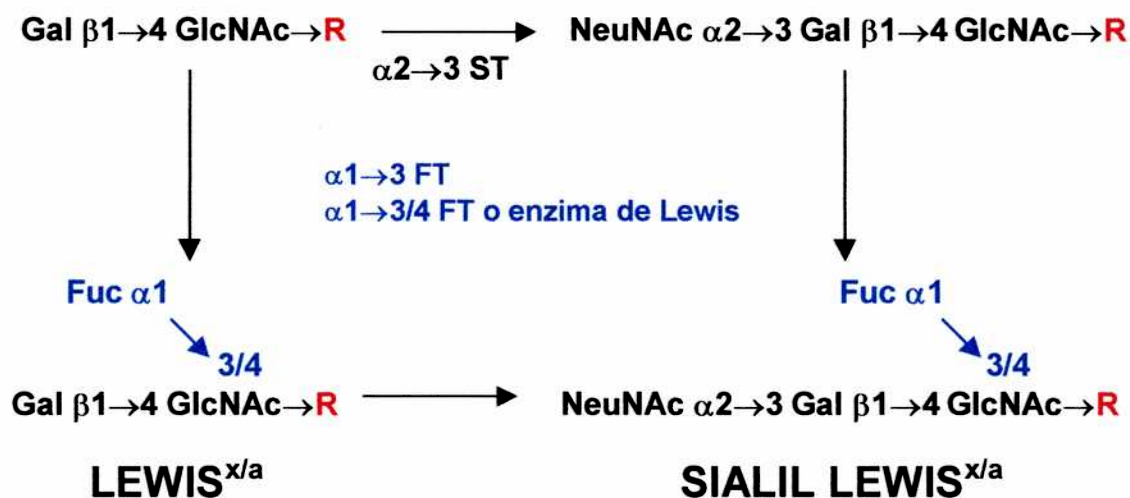
L-Selectina



- Localización: Leucocitos (constitutiva)
- Expresión: Disminuye con la activación celular
- Adhiere a: endotelio de ganglios linfáticos periféricos / endotelio adyacente a sitios de inflamación (rolling)
- Función propuesta: recirculación de linfocitos a través de los ganglios linfáticos periféricos / inflamación

La estructura de las selectinas consta de: Un dominio de tipo lectina o Carbohydrate recognition domain (CRD), un dominio tipo EGF o factor de crecimiento epidérmico, un número variable de secuencias repetitiva consenso (O), un dominio transmembrana (tm) y un dominio citoplasmático (citop). [Lasky LA, 1992].

ANEXO IV: Fórmula y biosíntesis de antígenos del grupo Lewis



R = Poli-NAclactosaminas → **N-glicoproteínas complejas**
 → **O-mucinas**
 → **Glicolípidos**

$\alpha 2 \rightarrow 3 \text{ ST}$ = $\alpha 2 \rightarrow 3$ Sialil Transferasa

$\alpha 1 \rightarrow 3 \text{ FT}$ = $\alpha 1 \rightarrow 3$ Fucosil Transferasa

Enzima normalmente expresada en PMN y monocitos, encargada de la síntesis de determinantes Lewis^x y sialil Lewis^x expresados en N-glicoproteínas y glicolípidos de membrana.

$\alpha 1 \rightarrow 3/4 \text{ FT o enzima de Lewis}$ = $\alpha 1 \rightarrow 3/4$ Fucosil Transferasa

Enzima normalmente expresada en tejido gastrointestinal, encargada de la síntesis de determinantes Lewis^x, sialil Lewis^x, Lewis^a y sialil Lewis^a presentes en la superficie del mismo.

Ha sido descrito, entre las alteraciones que afectan al patrón de glicosilación de las células tumorales, la up-regulación o aumentos en los niveles de expresión de diversas fucosil-transferasas, con la consecuente expresión de determinantes del grupo Lewis en su superficie. Los principales reportes son en carcinomas de colon, mama y pulmón.

ANEXO V: Leucemias

Como mencionamos en la Introducción, la característica fundamental de las células cancerosas es la pérdida de la capacidad de controlar su crecimiento y división, resultando en una excesiva proliferación y en la expansión clonal de la progenie de la célula afectada.

Cuando ésta enfermedad ocurre en el sistema linfoide, reciben el nombre de **enfermedades linfoproliferativas**. Si la excesiva proliferación ocurre en un órgano tal como nodos linfáticos o timo se denomina **linfoma** mientras que si se manifiesta como un aumento en el número de células de la sangre recibe el nombre de **leucemia** [Golub ES, 1987].

La leucemia es, entonces, la acumulación de células blancas en la circulación. Se clasifican en agudas o crónicas en base al curso clínico de la enfermedad y a las características hematológicas que la misma presenta, especialmente la maduración de las células acumuladas. Las leucemias, tanto agudas como crónicas, pueden ser tanto del linaje linfoide como mieloide [Golub ES, 1987].

Básicamente, la **leucemia aguda** se caracteriza por un bloqueo en un paso de maduración temprano en el proceso de diferenciación. Este defecto causa que la acumulación de la progenie celular neoplásica ocurra primero en la médula ósea y luego en la sangre periférica. En el caso de la **leucemia crónica**, las células acumuladas pertenecen a un paso de maduración mas tardío en la vía de diferenciación y son, por ende, parcialmente funcionales [Golub ES, 1987].

Leucemias mieloides:

Esta categoría puede a su vez dividirse en siete leucemias mieloides agudas (LMA) y seis leucemias mieloides crónicas (LMC). Esta clasificación se basa principalmente en el grado de diferenciación o maduración y en el tipo celular acumulado. Entre las LMA se encuentran: LMA mieloblástica o M1, LMA mieloblástica con maduración o M2, LMA mielomonocítica o M4, LMA monocítica o M5, LMA promielocítica o M3, LMA eritroblástica o M6 y LMA megacariocítica o M7. Por otro lado, entre las crónicas pueden mencionarse la LMC granulocítica, la LMC mielomonocítica, la LMC monocítica, la leucemia eritroblástica crónica o policitemia

vera, la leucemia megacariocítica crónica o trombocitemia esencial y la mielofibrosis primaria crónica [Wittels B y Bennington JL, 1985].

Es importante mencionar, sin embargo, que en base al multifactor denominador común que caracteriza a estas leucemias hay una tendencia a considerarlas como un espectro de enfermedades superpuestas cuyos límites son frecuentemente borrosos o confusos.

De todos éstos tipos de leucemia, nuestro interés se basa principalmente en la **leucemia mieloide crónica granulocítica**, la que se caracteriza por presentar esplenomegalia combinada con una suave anemia y una *marcada granulocitosis* (mayor a 50000/ul) en la cual una mezcla de neutrófilos maduros y en desarrollo es acompañada por una basofilia en sangre periférica [Wittels B y Bennington JL, 1985]. Los mieloblastos no exceden al 5% de la población granulocítica.

Genotípicamente se caracteriza por la presencia del cromosoma Philadelphia (el cromosoma 22 está acortado puesto que la mitad de su brazo largo se encuentra translocado al cromosoma 9), también presente en células de la serie eritroide y trombocítica pero ausente en células linfoides.

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS

- Albelda SL**, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. (1991) Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 114: 1059.
- Albini A**, Iwamoto Y, Kleinman GR y col. (1987) *Cancer Res.* 47: 3239.
- Allard WJ**, Neaman IE, Elting JJ y col. (1994) *Cancer Research* 54: 1227.
- Alon R**, Feizi T, Yuen C-T y col. (1995) Glycolipid ligands for selectin support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions. *J. Immunol.* 154: 5356.
- Allred DC**. (1993) Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 85: 200.
- Annibali NV**, San Martino JA, Baldi A. (1994) Monoclonal antibodies against human breast tumor-associated antigens: characterization of B21 antigen. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 3: 215.
- Arakawa F**, Kuroki M, Misumi Y y col. (1990) Characterization of a cDNA encoding a new species of nonspecific cross-reacting antigen (NCA), a member of the CEA gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 1063.
- Audette M**, Buchegger F, Schreyer M y col. (1987) Monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen (CEA) identifies two new forms of crossreacting antigens of molecular weight 90,000 and 160,000 in normal granulocytes. *Mol.Immunol.* 24: 1177.
- Azumi N**, Battifora H. (1987) The distribution of vimentin and keratin in epithelial and non epithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin and alcohol fixed tumors. *Am. J. Clin. Pathol* 88: 286.
- Badenoch-Jones P**. (1982) Lymphokine-induced neutrophil aggregation. *Immunology* 47, 1: 169.
- Bajorin D**, Chapman P, Wong G y col. (1990) Phase I evaluation of a combination of monoclonal antibody R24 and Interleukin 2 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Res.* 50: 7490.
- Ballaré C**, Bravo AI, Laucella S y col. (1989) DNA synthesis in estrogen receptor-positive human breast cancer takes place preferentially in estrogen receptor-negative cells. *Cancer* 64: 842.
- Ballaré C**, Bravo AI, Sorin I y col. (1991) The expression of progesterone receptors coincides with an arrest of DNA synthesis in human breast cancer. *Cancer* 67: 1352.
- Ballaré C**, Barrio M, Portela P, Mordoh J. (1995) Functional properties of FC-2.15, a monoclonal antibody that mediates human complement cytotoxicity against breast cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother* 41: 15.
- Banks RE**, Gearing AJH, Hemingway IK. (1993) *British J. Cancer* 68: 122.
- Bargmann CI**, Hung MC, Weinberg RA. (1986) The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor related protein. *Nature* 316: 226.

- Bast RC**, De Fabritis P, Lipton J y col. (1985) Elimination of malignant clonogenic cells from human bone marrow using multiple monoclonal antibodies and complement. *Cancer Res.* 45: 499.
- Battifora H.** (1986) The multitumor (sausage) tissue block; novell method for inmuno histochemical antibody testing. *Lab. Invest.* 55: 244.
- Battifora H.** (1988) Clinical applications of the immunohistochemistry of filamentous proteins. *Am. J. Surg. Pathol.* 12: 24.
- Baum RP**, Hertel A, Baew-Christow T y col. (1991) Initial clinical results with Tc-99m-labeled anti-AFP monoclonal antibody fragment in germ line cell and liver tumors (abstract 613) *J. Nucl. Med.* 32: 1053.
- Bayer EA**, Wilchek M (1980) The use of avidin-biotin complex as tool in molecular biology. *Methods Biochem Anal* 26:1.
- Benchimol S**, Fuks A, Jothy S y col. (1989) Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intracellular adhesion molecule. *Cell* 57: 327.
- Bennett TA**, Schammel CM, Lynam EB y col. (1995) Evidence for a third component in neutrophil aggregation: potential roles of O-linked glycoproteins as L-selectin counter-structures. *J. Leukoc. Biol.* 58, 5: 510.
- Berg EL**, Robinson MK, Mansson O y col. (1991) A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(x) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J. Biol. Chem.* 266: 14869.
- Berlin RD**, Ukena TE. (1972) Effect of colchicine and vinblastine on the agglutination of polymorphonuclear leukocytes by concanavalin A. *Nature New Biology* 238: 120.
- Bergh J**, Norberg T, Sjogren S y col. (1995) Complete sequencing of the *p53* gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature Med.* 1: 1029.
- Berling B**, Kolbinger F, Grunert F y col. (1990) Cloning of a carcinoembryonic antigen gene family member expressed in leucocytes of chronic myeloid leukemia patients and bone marrow. *Cancer Res.* 50: 6534.
- Bevilacqua MP.** (1993) Endothelial-leucocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 767.
- Biasi D**, Bambara LM, Carletto A y col. (1994) Increased in vitro neutrophil adherence in a case of chronic idiopathic neutropenia. *Br J Haematol* 86, 2: 421.
- Bichel P**, Skovgaard Poulsen H, Andersen J. (1982) *Cancer* 50: 1771.
- Blackshear PJ.** (1984) *Methods. in Enzymology* 104: 237.
- Blend MJ**, Hyun H, Kozloff M y col. (1995) Improved staging of B-cell non-Hodgkin's lymphoma patients with 99mTc-labeled LL2 monoclonal antibody fragment. *Cancer Res.* 55 (suppl): 5764.
- Blotti re HM**, Pelhate S, Aubry J y col. (1991) A new tumor-associated antigen expressed on breast carcinomas, defined by monoclonal antibody BCA 227. *Cancer Res.* 51: 1537.
- Bover L**, Barrio M, Slavutsky I y col. (1991) Description of a new human breast cancer line, IIB-BR-G, established from a primary undifferentiated tumor. *Breast Cancer Res Treatm* 19: 47.

- Bravo AI**, Sorin I, Guman N, Mordoh J. (1985) Carcinoembryonic antigen and differentiation in human breast cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 4: 3.
- Bremer EG**, Levery SB, Sonnino S y col. (1984) Characterization of a glycosphingolipid antigen defined by the monoclonal antibody MBr1 expressed in normal and neoplastic epithelial cells of human mammary gland. *J.Biol.Chem.* 259: 14773.
- Briggs S**, Price MR, Tendler SJ. (1993) Fine specificity of antibody recognition of carcinoma-associated epithelial mucins: antibody binding to synthetic peptide epitopes. *Eur. J. Cancer* 29A: 230.
- Brockhausen I**, Yang JM, Burchell C y col. (1995) Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur.J.Biochem.* 233: 607.
- Brooks SA**, Leatham AJ. (1995) Expression of the CD15 antigen (Lewis x) in breast cancer. *Histochem. J.* 27, 9: 689.
- Buick RN**. (1984) The cellular basis of cancer chemotherapy. En: *Antineoplastic Agents* (W.A. Remers, ed.), pp. 1-39. John Wiley & Sons, Inc., NY.
- Buick RN**, Pollak MM. (1984) Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells and oncogenes. *Cancer Res* 44: 4909.
- Burchell J**, Taylor-Papadimitriou J, Boshell M y col. (1989) A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *Int.J.Cancer* 44: 691.
- Burnette WN**. (1981) *Anal.Biochem.* 112: 195.
- Cailleau R**, Young R, Olive M, Reeves WJ. (1974) *J Natl Cancer Inst* 53: 661.
- Canevari S**, Fossati G, Balsari A. (1983) Immunochemical analysis of the determinant recognized by a monoclonal antibody (MBr1) wich specifically binds to human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 43: 1301.
- Capon C**, Wieruszkeski JM, Lemoine J y col. (1997) Sulfated lewis X determinants as a major structural motif in glycans from LS174T-HM7 human colon carcinoma mucin. *J. Biol. Chem.* 272, 51: 31957.
- Carr ME**, Whitehead J, Carlson P y col. (1996) Case report: immunoglobulin M-mediated, temperature - dependent neutrophil agglutination as a cause of pseudoneutropenia. *Am. J. Med. Sci* 311, 2: 92.
- Carrasquillo JA**, Bunn PA, Keenam TA, y col. (1986) Radioimmunodetection of cutaneous T-cell lymphoma with 111-In-labeled T101 monoclonal antibody. *N.Engl.J.Med.* 315: 673.
- Chalbos D**, Galtier F. (1994) Differential effect of forms A and B of human progesterone receptor on estradiol-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 269: 23007.
- Chalbos D**, Vignon F, Keydar I y col. (1982) Estrogens stimulate cell proliferation and induce secretory proteins in a human breast cancer cell line (T47D). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55: 276.
- Chen LC**, Kurisu W, Ljung BM y col. (1992) Heterogeneity for allelic loss in human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 506.
- Chen WC**, Obrink B. (1991) Cell-cell contacts mediated by E-cadherins (Uvomorulin) restrict invasive behavior of L-cells. *J. Cell Biol.* 114: 319.

- Chen YH**, Li CD, Yap EP, McGee JO. (1995) Detection of loss of heterozygosity of p53 gene in paraffin-embedded breast cancers by non-isotopic PCR-SSCP. *J. Pathol.* 177: 129.
- Colcher D**, Esteban JM, Carrasquillo JA y col. (1987) Quantitative analysis of selective radiolabeled monoclonal antibody localization in metastatic lesions of colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 47: 1185.
- Colcher D**, Horan Hand P, Nuti M, Schlom J. (1981) A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3199.
- Colcher D**, Horan Hand P, Nuti M, Schlom J. (1983) Differential binding to human mammary and non mammary tumors of monoclonal antibodies reactive with carcinoembryonic antigen. *Cancer Invest* 1: 127
- Cournoyer D**, Beauchemin N, Boucher D y col. (1988) *Cancer Research* 48: 3153.
- Dacruz OJ**, Lambert H, Hass GG. (1997) Expression of CD15 (Lewix (x)) antigen on human sperm and its role in sperm-egg interaction. *Am J Reproductive Immunology* 37, 2: 172
- DeLisser HM**, Newman PJ, Albelda SM. (1994) Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol. Today* 15: 490.
- Demetrick DJ**, Herlyn D, Tretriak M y col. (1992) Melanoma-associated glycoprotein family: antigen identity of ME491, NKI/C-3, neuroglandular antigen (NGA), and CD63 proteins. *J Natl Cancer Inst* 84: 422
- De Santes K**, Slamon D, Anderson SK y col. (1992) Radiolabeled antibody targeting of the HER-2/*neu* oncoprotein. *Cancer Res.* 52: 1916.
- Devine PL**, Clarck BA, Birrell GW y col. (1991) The breast tumor-associated epitope defined by monoclonal antibody 3E1.2 is an O-linked mucin carbohydrate containing N-glycolylneuraminic acid. *Cancer Res.* 51: 5826.
- Dillman RO**, Beauregard JC, Sobol RE y col. (1984) Lack of radioimmunodetection and complications associated with monoclonal anticarcinoembryonic antigen antibody cross-reactivity with an antigen on circulating cells. *Cancer Res.* 44: 2213.
- Dinh Q**, Weng NP, Kiso M y col. (1996) High affinity antibodies against Le^x and Sialyl Lex from a phage display library. *J. Immunol.* 157: 732.
- Doerr RJ**, Abdel-Nabi H, Krag D y col. (1991) Radiolabeled antibody imaging in the management of colorectal cancer. *Ann. Surg.* 214: 118.
- Donehower LA**, Bradley A. (1993) The tumor suppressor p53. *Biochim. Biophys. Acta* 1155: 181.
- Dustin ML**, Springer TA. (1991) *Ann. Rev. Immunol.* 9: 27.
- Ellis G**, Ferguson M, Yamanaka E y col. (1989) Monoclonal antibodies for detection of occult carcinoma cells in bone marrow of breast cancer patients. *Cancer* 63: 2509.
- Engwall E**. (1980) *Method in Enzymology* 70: 419.
- Esteban JM**, Colcher D, Sugarbaker P y col. (1987) Quantitative and qualitative aspects of radiolocalization in colon cancer patients of intravenously administered MAb B72.3. *Int. J. Cancer* 39: 50.

- Fawcett J**, Buckley C, Holness CL y col. (1995) Mapping the homotypic binding sites in CD31 and the role of CD31 adhesion in the formation of interendothelial contacts. *J. Cell. Biol.* 128: 1229.
- Fearon ER**, Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61; 759.
- Finlay CA**, Hinds PW, Tan TH y col. (1988) Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with altered half life. *Mol. Cell. Biol.* 8: 531.
- Fogh J**, Fogh JM, Orfeo T. (1977) One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59: 221.
- Ford CHJ**, Casson AG. (1986) Antibody-mediated targeting in the treatment and diagnosis of cancer: an overview. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 17: 197.
- Franker PJ**, Speck JC. (1978) Protein and cell membrane iodination with sparingly soluble chloramide 1,3,4,6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycouril. *Biochem Biophys Res Commun* 80: 849.
- Frixen UH**, Behrens J, Sachs M y col. (1991) E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell. Biol.* 113: 173.
- Fujii H**, Marsh C, Cairns P, y col. (1996) Genetic divergence in the clonal evolution of breast cancer. *Cancer Res.* 56: 1493.
- Fukuda M.** (1994) Cell surface carbohydrates: cell-type specific expression. En: *Molecular Glycobiology* (M Fukuda, O Hindsgaul Eds.) *Frontiers in Molecular Biology* ®.
- Fukuda M.** (1996) Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res* 56: 2237.
- Fukuda M**, Spooner E, Oates JE y col. (1984) Structure of sialylated fucosyl lactosaminoglycan isolated from human granulocytes. *J. Biol. Chem.* 259: 10925.
- Fukushima K**, Hirota M, Terasaki PI y col. (1984) Characterization of sialosylated Lewisx as a new tumor-associated antigen. *Cancer Res.* 44: 5279.
- Galea-Lauri J**, Blackford J, Wilkinson JM. (1993) The expression of CD11/CD18 molecules on rabbit leukocytes: identification of monoclonal antibodies to CD18 and their effect on cellular adhesion processes. *Mol. Immunol.* 30, 6: 529.
- Gallinger S**, Reilly RM, Kirsh JC y col. (1993) Comparative dual label study of first and second generation antitumor-associated glycoprotein-72 monoclonal antibodies in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 53: 271.
- Galfre G**, Milstein C. (1981) Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Meth. Enzimol.* 73: 3.
- Gearing AJH**, Newman W. (1993) Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol. Today* 14: 506.
- Gendler SJ**, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J y col. (1990) Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem* 265: 15286.
- George A**, Spooner R, Epenetos A. (1994) Applications of monoclonal antibodies in clinical oncology. *Immunol. Today* 15: 559.

- Gerhard M**, Juhl H, Kalthoff H y col. (1994) Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J. Clin. Oncol.* 12: 725.
- Giavazzi R**, Chirivi RGS, garofalo A y col. (1992) Soluble intercellular adhesion molecule 1 is released by human melanoma cells and is associated with tumor growth in nude mice. *Cancer Res.* 52: 2628.
- Gill PG**, Tilley WD, De Young NJ y col. (1991) Inhibition of T47D human breast cancer cell growth by the synthetic progestin R5020: effects of serum, estradiol, insulin and EGF. *Breast Cancer Res. Treat.* 20: 53.
- Girling A**, Bartkova J, Burchell J y col. (1989) A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int. J. Cancer* 43: 1072.
- Glukhova M**, Deugnier M-A, Thiery JP. (1995) Tumour progression: the role of cadherins and integrins. *Molec. Med. Today* :84.
- Go VLW**, Zamchek N. (1982) The role of tumor markers in the management of colorectal cancer. *Cancer* 30 (suppl.): 2618.
- Gold P(1)**, Freedman SO. (1965) Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* 121: 439.
- Gold P(2)**, Freedman SO. (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122: 467.
- Goldenberg DM**. (1993) Monoclonal antibodies in cancer detection and therapy. *The American J. of Medicine* 94: 297.
- Goldenberg DM**, Goldenberg H, Sharkey RM y col. (1990) Clinical studies of cancer radioimmuno-detection with carcinoembryonic antigen monoclonal antibody fragments labeled with ¹²³I or ^{99m}Tc. *Cancer Res.* 50: 909.
- Goldenberg DM**, Larson SM. (1992) Radioimmunodetection in cancer identification. *J. Nucl. Med.* 33: 803.
- Goldenberg DM**, Leland F, Kim E y col. (1978) Use of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localisation of diverse cancers by external photoscanning. *N. Engl. J. Med.* 298: 1384.
- Goldenberg DM**, Preston DF, Primus FJ y col. (1974) Photoscan localisation of GW-39 tumors in hamsters using radiolabelled anticarcinoembryonic antigen immunoglobulin G. *Cancer Res.* 34: 1.
- Golub ES**. (1987) Immunology: a synthesis. Sinauer Associates Inc.: 524.
- Gooi HC**, Feizi T, Kapadia A y col. (1981) Stage-specific embryonic antigen involves $\alpha 1 \rightarrow 3$ fucosylated type 2 blood group chains. *Nature* 292: 156.
- Gooi HC**, Thorpe S, Hounsell EF y col. (1983) Marker of peripheral blood granulocytes and monocytes of man recognized by two monoclonal antibodies VEP8 and VEP9 involves the trisaccharide 3-fucosyl-N- acetylactosamine. *Eur. J. Immunol.* 13: 306.
- Guarino A**, Cohen M, Thompson M y col. (1987) T84 cell receptor binding and guanyl cyclase activation by Escherichia coli heat-stable toxin. *Am. J. Physiol.* 253: G775.
- Hakomori S**. (1985) Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res.* 45: 2405.

- Hammert LC**, Ball ED. (1997) Purging autologous bone marrow with monoclonal antibodies for transplantation in acute myelogenous leukemia. *Blood Rev.* 11: 80.
- Hancock MC**, Langton BC, Chan T y col. (1991) A monoclonal antibody against the c-erbB-2 protein enhances the cytotoxicity of cis-diamminedichloroplatinum against human breast and ovarian tumor cell lines. *Cancer Res.* 51: 4575.
- Hanisch F-G**, Hanski C, Hasegawa A. (1992) Sialyl Lewis^x antigen as defined by monoclonal antibody AM-3 is a marker of dysplasia in the colonic adenoma-carcinoma sequence. *Cancer Research* 52: 3138.
- Harning R**, Mainolfi E, Bystryk J-C. (1991) *Cancer Res.* 51: 5003.
- Harris JR**, Morrow M, Banadonna G. (1993) Cancer of the breast. En: *Principles and Practice of Oncology* (V.T. De Vita, S. Hellman, S.A. Rosenberg, eds.) - Capítulo 40. J.B. Lippincott Co., Philadelphia.
- Hartwerth IM**, Wels W, Marte BM y col. (1992) Monoclonal antibodies against the extracellular domain of the erbB-2 receptor function as partial ligand agonist. *J. Biol. Chem.* 267: 15160.
- Hawkes R**, Niday E, Gordon JA (1982) Dot-Immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem* 119: 142
- Hedrick L**, Cho RK, Vogelstein B. (1993) Cell adhesion molecules as tumour suppressor. *Trends Cell Biol.* 3: 36.
- Hertel A**, Baum RP, Lorenz M y col. (1990) Immunoscintigraphy using a technetium-99m labelled monoclonal anti-CEA antibody in the follow-up of colorectal cancer and other tumours producing CEA. *Br. J. Cancer* 62 (Suppl. X): 34.
- Hession C**, Osborn L, Goff D y col. (1990) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: direct expression cloning and functional interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 1673.
- Hilkens J**, Vos HL, Wesseling J y col. (1995) Is episialin / MUC1 involved in breast cancer progression? *Cancer Lett.* 90: 27.
- Hinds PW**, Weinberg RA. (1994) Tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 135.
- Hissom JR**, Moore MR. (1987) Progestin effects on growth in the human breast cancer cell line T-47D - Possible therapeutic implications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 706.
- Ho JJ**, Kim YS. (1994) Serological pancreatic tumor markers and the MUC1 apomucin. *Pancreas* 9: 674.
- Ho SB**, Kim YS. (1991) Carbohydrate antigens on cancer-associated mucin-like molecules. *Semin. Cancer Biol.* 2: 389.
- Holden KG**, Yim NCF, Griggs LJ, Weisbach JA. (1971) Gel electrophoresis of Mucous Glycoproteins. I. Effect of Gel Porosity. *Biochemistry* 10, 16: 3105.
- Hoskins K**, Weber BL. (1994) The biology of breast cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 6: 554.
- Hostetter RB**, Augustus LB, Mankarious R y col. (1990) Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of a colorectal cancer metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 5: 380.
- Huang LC**, Civin CI, Magnani JL y col. (1983) My-1, the human myeloid-specific antigen detected by mouse monoclonal antibodies, is a sugar sequence found in Lacto-N-fucopentaose III. *Blood* 61: 1020.

- Hudziak RM**, Schlessinger J, Ullrich A. (1987) Increased expression of the putative growth factor receptor p185^{HER2} causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7159.
- Hung M-C**, Matin A, Zhang Y y col. (1995) HER-2/*neu*-targeting gene therapy - A review. *Gene* 159: 65.
- Hynes NE**, Stern DF. (1994) The biology of *erbB-2* / *neu* / *HER-2* and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1198: 165.
- Hynes RO**. (1994) The impact of molecular biology on models for cell adhesion. *BioEssays* 16: 663.
- Imai K**, Makiguchi Y. (1996) Functions of mucin molecules in gastrointestinal cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 97: 152.
- Jeng MH**, Langan-Fahey SM, Jordan VC. (1993) Estrogenic actions of RU486 in hormone-responsive MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinol.* 132: 2622.
- Johnson JP**, Stade BG, Holzmann B y col. (1989) De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 641.
- Juliano RL**, Varner JA. (1993) Adhesion molecules in cancer: the role of integrins. *Current Op. Cell Biol.* 5: 812.
- Karcela PI**, Bowden SJ, Green SJ, Kilshaw PJ. (1995) Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin $\alpha_{M290}\beta_7$ ($\alpha_E\beta_7$). *Eur. J. Immunol.* 25: 852.
- Kasprzyk PG**, Song SU, Di Flore PP y col. (1992) Therapy of an animal model of human gastric cancer using a combination of anti-*erbB-2* monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 52: 2771.
- Kawakami H**, Ito M, Miura Y, Hirano H. (1994) Expression of Lewis(x) sugar structure in the liver metastasis of mouse colon carcinoma (colon 26) cells. *Clin Exp Metastasis* 12, 2: 129.
- Kelsey JL**, Bernstein L. (1996) Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annu. Rev. Public. Health* 17: 47.
- Kerr DE**, Schreiber GJ, Vrudhula VM y col. (1995) Regressions and cures of melanoma xenografts following treatment with monoclonal antibody beat-lactamase conjugates in combination with anticancer prodrugs. *Cancer Res.* 55: 3558.
- Keydar I**, Chen L, Karby S y col. (1979) Establishment and characterization of a cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* 15: 659.
- Keydar I**, Chou CS, Hareuveni M y col. (1989) Production and characterization of monoclonal antibodies identifying breast tumor-associated antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1362.
- Khan WN**, Frängsmyr L, Teglund S y col. (1992) Identification of three new genes and estimation of the size of the carcinoembryonic antigen family. *Genomics* 14: 384.
- Kim YS**. (1992) Altered glycosylation of mucin glycoproteins in colonic neoplasia. *J.Cell Biochem. (Suppl)* 16G: 91.
- Kim YS**. (1990) Carbohydrate antigen expression in colorectal cancer. *Semin. Cancer Biol.* 1: 189.

- Kim YS**, Itzkowitz SH, Yuan M y col. (1988) Lex and Ley antigen expression in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 48: 475.
- Klein G**, Klein E. (1985) Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. *Nature* 315: 190.
- Köhler G**, Milstein C. (1975) Continuous culture of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. *Nature* 256: 495.
- Kong RK**, Barrios A, Knapp W, Macher BA. (1993) Fucosylated glycosphingolipids of human myeloid cells. *Arch. Biochem. Biophys* 300, 2: 677.
- Kovach JS**, Hartmann A, Blaszyk H y col. (1996) Mutation detection by highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1093.
- Kramer RH**, Vogel KG. (1984) *J. Natl. Cancer Inst.* 72: 8889.
- Kudo T**, Ikehara Y, Togayachi A y col. (1998) Up-regulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer. *Lab. Invest.* 78, 7: 797.
- Kufe DW**, Nadler L, Sargent L y col. (1983) Biological behaviour of human breast carcinoma-associated antigens expressed during cellular proliferation. *Cancer Res.* 43: 851.
- Kuijpers TW**, Hoogerwerf M, Kuijpers KC y col. (1992) Cross-linking of sialophorin (CD43) induces neutrophil aggregation in a CD18-dependent and a CD18-independent way. *J. Immunol* 149, 3: 998.
- Kumamoto K**, Mitsuoka C, Izawa M y col. (1998) Specific detection of sialyl Lewis X determinant carried on the mucin GlcNAc beta1→6GalNAc alpha core structure as a tumor-associated antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 2: 514.
- Kung WM**, Silver E, Novak I y col. (1986) Effects of hormones and growth factors on the growth of six human breast cancer cell lines in defined media. *Contr. Oncol* 23: 26.
- Kuroki M**, Arakawa F, Matsuo Y y col. (1991) Molecular cloning of Nonspecific Cross-reacting Antigens in human granulocytes. *J. Biol. Chem.* 266, 18: 11810.
- Kuroki M**, Matsuoka Y. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 701.
- Laemmli UK** (1971) Cleavage of structural proteins during assembly of a head bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 227: 680.
- Lane DP**. (1992) p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15.
- Larocca D**, Peterson JA, Urrea R y col. (1991) *Cancer Res.* 51: 4994.
- Lasky LA**. (1992) Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258: 964.
- Lasky LA**. (1995) Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 113.
- Lippman ME**. (1993) The development of biological therapies for breast cancer. *Science* 259: 631.
- Livingston PO**, Adluri S, Helling F y col. (1994). Phase I trial of the immunological adjuvant QS-21 with a GM2 ganglioside-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine in patients with malignant melanoma. *Vaccine* 12: 1275.

- LoBuglio A**, Saleh M, Lee J y col. (1988) Phase I trial of multiple large doses of murine monoclonal antibody CO17-1A. I. Clinical Aspect. *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 932.
- Lohmann D**, Ruhri C, Schmitt M y col. (1993) Accumulation of p53 protein as an indicator for p53 gene mutation in breast cancer. Occurrence of false-positives and false-negatives. *Diagn. Mol. Pathol.* 2: 36.
- Lloyd KO**, Kabat EA, Layug EJ, Gruezo F (1996) Immunochemical studies on blood groups. XXXIV. Structures of some oligosaccharides produced by alkaline degradation of blood groups A, B, and H substances. *Biochemistry* 5: 1489.
- Lowe JB**, Stoolman LM, Nair RP y col. (1990) ELAM-1 dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyl transferase cDNA. *Cell* 63: 475.
- Lowry OH**, Rosenbrough NJ, Farr AL y col. (1951) Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Mach JP**, Carrel S, Merenda C y col. (1974) In vivo localisation of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma grafted into nude mice. *Nature* 248: 704.
- Mach JP**, Carrel S, Forni M y col. (1980) Tumor localization of radiolabelled antibodies against carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 303: 5.
- Macher BA**, Buehler J, Scudder P y col. (1988) A novel carbohydrate, differentiation antigen on fucogangliosides of human myeloid cells recognized by monoclonal antibody VIM-2. *J. Biol. Chem.* 263 : 10186.
- Mackenzie SJ**, Kerr MA. (1995) IgM monoclonal antibodies recognizing Fc α R but not Fc γ RIII trigger a respiratory burst in neutrophils although both trigger an increase in intracellular calcium levels and degranulation. *Biochem. J.* 306: 519.
- Mackillop WJ**, Ciampi A, Till JE, Buick RN. (1983) A stem cell model of human tumor growth: Implications for tumor cell clonogenic assays. *J. Natl. Cancer Inst.* 70: 9.
- Madyastha PR**, Glassman AB. (1988) Characterization of neutrophil agglutinins in primary autoimmune of early childhood. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 18, 5: 367.
- Madyastha PR**, Glassman AB. (1989) Neutrophil antigens and antibodies in the diagnosis of immune neutropenias. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 19, 3: 146.
- Majuri ML**, Niemela R, Tiisala S y col. (1995) Expression and function of α 2,3-sialyl- and α 1,3/1,4 fucosyltransferases in colon adenocarcinoma cell lines: role in the synthesis of E-selectin counter-receptors. *Int. J. Cancer* 63, 4: 551.
- Malinoff HL**, Wicha MS. (1983) *J. Cell. Biol.* 96: 1475.
- Malkin D.** (1994) p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 1198: 197.
- Mannori G**, Crottet P, Cecconi O y col. (1995) Differential colon cancer cell adhesion to E-, P- and L-selectin: Role of mucin-type glycoproteins. *Cancer Research* 55: 4425.
- Mareel MM**, Van Roy FM, De Baetselier P. (1990) The invasive phenotypes. *Cancer Metastasis Rev.* 9: 45.
- Marshall E.** (1992) Breast cancer: Stalemate in the war on cancer. *Science* 254: 1719.
- Marshall E.**(1993) Search for a killer: focus shifts from fat to hormones. *Science* 259: 618.

- Martin-Satue M**, Marrugat R, Cancelas JA, Blanco J. (1998) Enhanced expression of alpha(1,3)-fucosyltransferase genes correlates with E-selectin-mediated adhesion and metastatic potential of human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 58, 7: 1544.
- McCarthy JB**, Basara ML, Palm SL y col. (1985) *Cancer Metastasis Rev.* 4: 125.
- McCuaig K**, Turbide C, Beauchemin N. (1992) mmCGM1a: a mouse carcinoembryonic antigen gene family member, generated by alternative splicing, functions as a adhesion molecule. *Cell Growth and Differentiaton* 3: 165.
- Menard S**, Tagliabue E, Canevari S y col. (1983) Generation of monoclonal antibodies reacting with normal and cancer cells of human breast. *Cancer Res* 43: 1295.
- Metha J**, Powles R, Treleaven J y col. (1997) Autologous transplantation with CD52 monoclonal antibody-purged marrow for acute lymphoblastic leukemia: long term follow up. *Leuk. Lymphoma* 25: 479.
- Meyer D**, Birchmeier C. (1995) Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378: 386.
- Meyer JS**, Wittliff JL. (1991) Regional heterogeneity in breast carcinoma: thymidine labelling index, steroid hormone receptors, DNA ploidy. *Int. J. Cancer* 47: 213.
- Miotti S**, Leoni F, Canevari S, Sonnino S. (1989) Colnaghi M.I. Immunoblotting detection of carbohydrate epitopes in glycolipids and glycoproteins of tumoral origin. En: *Gangliosides and Cancer* (H.F.Oettgen ed.), Cap. 17, pp.169-176.VCH Publishers, New York, NY.
- Mordoh J**, Silva C, Albarellos M y col. (1995) Phase I clinical trial in cancer patients of a new monoclonal antibody, FC-2.15, reacting with tumor proliferating cells. *J of Immunother* 17:151.
- Mori M**, Mimori K, Inoue H y col. (1995) Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 55: 3417.
- Muller WA**, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leucocytes. *J. Exp. Med.* 178: 449.
- Mulligan MS**, Lowe JB, Larsen RD y col. (1993) Protective effects of sialylated oligosaccharides in immune complex-induced acute lung injury. *J. Exp. Med.* 178: 623.
- Musgrove EA**, Lee CS, Sutherland RL. (1991) Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol. Cell Biol* 11: 5032.
- Myklebust AT**, Godal A, Pharo A y col. (1993) Eradication of small cell lung cancer cells from human bone marrow with immunotoxins. *Cancer Res.* 53: 3784.
- Nadler LM**, Takvorian T, Botnick L y col. (1984) Anti-B1 monoclonal antibody and complement treatment in autologous bone-marrow transplantation for relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 2: 427.
- Nakagoe T**, Fukushima K, Hirota M y col. (1994) An immunohistochemical employer monoclonal antibodies against Le(a), sialyl Le(a), Le(x), and sialyl Le(x) antigens in primary colorectal, carcinomas and lymph node and hepatic lesions. *J Gastroenterol* 29, 2: 129.
- Nakamori S**, Kameyama M, Kumaoka S y col. (1993) Increased expression of sialyl-Lex antigens correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathologic and immunohistochemical studies. *Cancer Res.* 53: 3632.

- Nakamori S**, Kameyama M, Imaoka S y col. (1997) Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewisx in colorectal cancer metastasis. *Dis. Colon Rectum* 40, 4: 420.
- Newman PJ**. (1994) The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Annals New York Acad. Sci.* 714: 165.
- Nicolson GL**. (1989) Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane and tissue. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1: 1009.
- Nowell PC**. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23.
- Nuti M**, Turchi V, Masci AMC y col. (1992) Characterization of monoclonal antibody 436 recognizing the ARG-PRO-ALA-PRO sequence of the polymorphic epithelial mucin (PEM) protein core in breast carcinoma cells. *Int J Biol Markers* 7: 71.
- Ogawa J-i**, Inou H, Koide S. (1996) Expression of α -1,3-Fucosyltransferase type IV and VII genes is related to poor prognosis in lung cancer. *Cancer Res.* 56: 325.
- Okazaki K**, Nakayama I, Shibao K y col. (1998) Enhancement of metastatic activity of colon cancer as influenced by expression of cell surface antigens. *J. Surg. Res.* 78, 1: 78.
- Okuyama M**, Kambayashi J, Sakon M, Monden M. (1996) LFA-1/ICAM-3 mediates neutrophil homotypic aggregation under fluid shear stress. *J. Cell. Biochem.* 60, 4: 550.
- Okuyama M**, Otha Y, Kambayashi J, Monden M. (1996) Fluid shear stress induces actin polymerization in human neutrophils. *J. Cell. Biochem.* 63, 4: 432.
- Orlandi R**, Canevari S, Conde FP y col. (1988) Immunoconjugate generation between the ribosome inactivating protein restrictocin and an anti-human breast carcinoma MAb. *Cancer Immunol. Immunother.* 26: 114.
- Orlandi R**, Figini M, Tomassetti A y col. (1992) Characterization of a mouse-human chimeric antibody to a cancer-associated antigen. *Int.J.Cancer* 52: 588.
- Orr FW**, Mokashi S. (1985) Effect of leukocyte activation on the formation of heterotypic tumor-cell aggregates in vitro. *Int. J. Cancer* 35, 1: 101.
- Osborne CK**, Arteaga CL. (1990) Autocrine and paracrine growth regulation of breast cancer: clinical implications. *Breast Cancer Res. Treat* 15: 3.
- Pagliaro LC**, Liu B, Munker R y col. Humanized M195 monoclonal antibody conjugated to recombinant gelonin: an anti-CD33 immunotoxin with antileukemic activity. *Clin. Cancer Res.* 4: 1971.
- Pancino GF**, Charpin C, Calvo F y col. (1987) A novel monoclonal antibody (7B10) with differential reactivity between human mammary carcinoma and normal breast. *Cancer Res.* 47: 4444.
- Pancino GF**, Le Doussal V, Mortada MH y col. (1989) Characterization and distribution in normal and tumoral human tissues of breast cancer-associated antigen defined by monoclonal antibody 7B₁₀. *Cancer Res.* 49: 7078.
- Patel DD**, Bhatavdekar JM, Chikhlikar PR y col. (1996) Node negative breast carcinoma: hyperprolactinemia and/or overexpression of p53 as an independent predictor of poor prognosis compared to newer and established prognosticators. *J. Surg. Oncol.* 62: 86.
- Patton S**, Gendler SJ, Spicer AP. (1995) The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1241: 407.

- Pavelic ZP**, Pavelic K, Carter CP y col. (1992) Heterogeneity of c-myc expression in histologically similar infiltrating ductal carcinomas of the breast. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118: 16.
- Pegram MD**, Lipton A, Hayes DF y col. (1998) Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J. Clin. Oncol.* 16: 2659.
- Perkins AC**, Pimm MV. (1991) Immunoscintigraphy practical aspects and clinical applications. Editado por Perkins AC, Pimm MV, Wiley-Liss cap. 7:179.
- Peterson JA**, Couto JR, Taylor MR y col. (1995) Selection of tumor-specific epitopes on target antigens for radioimmunotherapy of breast cancer. *Cancer Res.* 55: 5847s.
- Phillips ML**, Nudelman E, Gaeta FCA y col. (1990) ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl- Le^x. *Science* 250: 1130.
- Podhajcer OL**, Bravo AI, Sorín I y col. (1986) Determination of DNA synthesis, estrogen receptors, and carcinoembryonic antigen in isolated cellular subpopulations of human breast cancer. *Cancer* 58: 720.
- Podhajcer OL**, Resnicoff M, Bover L y col. (1988) Effect of estradiol and tamoxifen on the anchorage-independent growth of the subpopulations derived from MCF-7 breast carcinoma cells: cytogenetic analysis of the stem cell subpopulation. *Exp. Cell Res.* 179: 58.
- Polley MJ**, Phillips ML, Wayner E y col. (1991) CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis^x. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6224.
- Potten CJ**, Schofield R, Lajtha LG (1979) A comparison of cell replacement in bone marrow, testis and three regions of surface epithelium. *Biochim. Biophys. Acta* 560: 281.
- Pukel CS**, Lloyd KO, Travassos IR y col. (1982) GD3, a prominent ganglioside on human melanoma. Detection and characterization by mouse monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 155: 1133.
- Quang D**, Weng N-P, Kiso M y col. (1996) High affinity antibodies against Lex and sialyl Lex from a phase display library. *J Immunol* 157: 732.
- Ragupathi G**, Park TK, Zhang S y col. (1997) Immunization of mice with the synthetic hexasaccharide Globo H results in antibodies against human cancer cells. *Angewandte Chemie*, 36: 125.
- Rao CN**, Barsky SH, Terranova VP, Liotta LA. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 804.
- Regimbald LH**, Pilarski LM, Longenecker BM y col. (1996) The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res.* 56: 4244.
- Resnicoff M**, Medrano EE, Podhajcer OL y col. (1987) Subpopulations of MCF 7 cells separated by Percoll gradient centrifugation: A model to analyze the heterogeneity of human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84: 7295.

- Rice GE, Bevilacqua MP.** (1989) An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 246: 1303.
- Riethmuller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G y col.** (1994) Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. *Lancet* 343: 1994.
- Rieu P, Porteu F, Bessou G y col.** (1992) Human neutrophils release their major membrane sialoprotein, leukosialin (CD43), during cell activation. *Eur. J. Immunol.* 22, 11: 3021.
- Ro J, Sahin A, Ro JY y col.** (1990) Immunohistochemical analysis of P-glycoprotein expression correlated with chemotherapy resistance in locally advanced breast cancer. *Hum. Pathol.* 21:787.
- Robbins PF, Eggenberger D, Qi CF y col.** (1993) Definition of the expression of the human carcinoembryonic antigen and non-specific cross-reacting antigen in human breast and lung carcinomas. *Int. J. Cancer* 53: 892.
- Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, Juliano R.** (1995) Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim. et Biophys. Acta* 1242: 77.
- Rüegg C, Postigo AA, Sikorski EE y col.** (1992) Role of integrin $\alpha_4\beta_7/\alpha_4\beta_p$ in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering. *J. Cell. Biol.* 117: 179.
- Saitoh O, Wang W, Lotan R, Fukuda M.** (1992) Differential glycosylation and cell surface expression of lysosomal membrane glycoproteins in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J. Biol. Chem.* 267: 5700.
- Saleh M, Khazaeli M, Grizzle E y col.** (1993) A Phase I clinical trial of murine monoclonal antibody D612 in patients with metastatic gastrointestinal cancer. *Cancer Res.* 53: 4555.
- Saleh M, Khazaeli M, Wheeler R y col.** (1992) Phase I trial of a murine monoclonal anti-GD2 antibody 14G2a in metastatic melanoma. *Cancer Res.* 52: 4342.
- Sato J, Kim SU.** (1994) Differential expression of Lewis (x) and sialyl-Lewis (x) antigens in fetal human neural cells in culture. *J. Neurosci. Res* 37, 4: 466.
- Saitoh O, Wang W, Lotan R, Fukuda M.** (1992) Differential glycosylation and cell surface expression of lysosomal membrane glycoproteins in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J. Biol. Chem.* 267: 5700.
- Sawada R, Tsuboi S, Fukuda M.** (1994) Differential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublines of human colon cancer with distinct metastatic potentials. *J. Biol. Chem.* 269: 1425.
- Sawada R, Lowe JB, Fukuda M.** (1993) E-selectin-dependent adhesion efficiency of colonic carcinoma cells is increased by genetic manipulation of their surface lamp-1 expression levels. *J. Biol. Chem.* 268: 12675.
- Scatchard G.** (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51: 660.
- Schlimok G, Funke I, Bock B y col.** (1990) Epithelial cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: Immunocytochemical detection, phenotypic characterization and prognostic significance. *J. Clin. Oncol.* 8: 831.
- Schlom J.** (1986) *Cancer Res.* 48: 3225.

- Schlom J**, Eggenesperger D, Colcher D y col. (1992) Therapeutic advantage of high-affinity anticarcinoma radioimmunoconjugates. *Cancer Res.* 52: 1067.
- Selby P**, Bizzari J-P, Buick RN. (1983) Therapeutic implications of a stem cell model in human breast cancer: A hypothesis. *Cancer Treat. Rep.* 67: 659.
- Seregini E**, Bombardieri E, Bogni A y col. (1992) The role of serum carcinoembryonic antigen (CEA) in the management of patients with colorectal carcinoma: the experience of the Istituto Tumori of Milan. *Int. J. Biol. Markers* 7: 167.
- Shan D**, Ledbetter JA, Press OW. (1998) Apoptosis of malignant human B cell by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 91: 1644.
- Shimodaira K**, Nakayama J, Nakamura N y col. (1997) Carcinoma-associated expression of core 2 β -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase gene in human colorectal cancer: role of O-glycans in tumor progression. *Cancer Res.* 57: 5201.
- Sikut R**, Zhang K, Baeckstrom D, Hansson GC. (1996) Distinct sub-populations of carcinoma-associated MUC-1 mucins as detected by the monoclonal antibody 9H8 and antibodies against the sialyl Lewis-a and sialyl Lewis-x epitopes in the circulation of breast-cancer patients. *Int. J. Cancer* 66, 5: 617.
- Silvestrini R**, Benini E, Daidone MG y col. p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. *J. Natl. Cancer. Inst.* 85: 965.
- Simchowicz L**, Schur PH. (1976) Lectin-dependent neutrophil-mediated cytotoxicity. II. Possible mechanism. *Immunology* 31, 2: 313.
- Sivolapenko GB**, Douli V, Pectasides D y col. (1995) Breast cancer imaging with radiolabelled peptide from complementary-determining region of antitumour antibody. *Lancet* 346: 1662.
- Sjogren S**, Inganas M, Norberg T y col. (1996) The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J. Natl. Cancer Inst.* 88: 173.
- Smith HS**, Wolman SR, Hackett AJ. (1984) The biology of breast cancer at the cellular level. *Biochim. Biophys. Acta* 738: 103.
- Solter D**, Knowles B (1978) Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5565.
- Sorin I**, Bravo AI, Podhajcer OL y col. (1988) Analysis of DNA synthesis and carcinoembryonic antigen expression in human breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 77: 35.
- Soule HD**, Vazquez J, Long A y col. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51: 1409.
- Spooner E**, Fukuda M, Klock JC y col. (1984) Isolation and characterization of polyfucosylated lactosaminoglycans from human granulocytes. *J. Biol. Chem.* 259: 4792
- Springer TA**. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425.
- Springer TA**. (1994) Traffic signals for lymphocytes recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301.
- Stetler-Stevenson WG**, Aznavoorian S y Liotta LA. (1993) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9: 541.

- Stockl J**, Majdic O, Rosenkranz A y col. (1993) Monoclonal antibodies to the carbohydrate structure Lewis(x) stimulate the adhesive activity of leukocyte integrin CD11b/CD18 (CD3, Mac-1, alpha m beta 2) on human granulocytes. *J Leukoc Biol* 53, 5: 541.
- Sutherland RL**, Hall RE, Pang GY y col. (1988) Effect of medroxyprogesterone acetate on proliferation and cell cycle kinetics of human mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* 48: 5084.
- Symington FW**, Hedges DL, Hakomori S-I. (1985) Glycolipid antigens of human polymorphonuclear neutrophils and the inducible HL-60 myeloid leukemia line. *J. Immunol.* 134: 2498.
- Szollosi J**, Balazs M; Feuerstein BG y col. (1995) ERB B-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res.* 55: 5400.
- Taichman DB**, Cybulsky MI, Djaffar I y col. (1991) Tumor cell surface $\alpha_4\beta_1$ integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1. *Cell Reg.* 2: 347.
- Takada A**, Ohmori K, Yoneda T y col. (1993) Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and Sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res.* 53:354.
- Takeichi M.** (1993) Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Current Op. Cell Biol.* 5: 806.
- Taki T.** (1996) Cancer-associated alterations of glycoconjugates: Special reference to glycosphingolipids. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 97: 123.
- Tang DG**, Chen YQ, Newman PJ y col. (1993) Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *J. Biol. Chem.* 268: 22883.
- Tarentino A**, y col. (1990) *Journal of Biological Chemistry* 265: 6961.
- Teixeira MR**, Pandis N, Bardi G y col. (1995) Clonal heterogeneity in breast cancer: karyotypic comparisons of multiple intra- and extra-tumorous samples from 3 patients. *Int. J. Cancer* 63: 63.
- Thakur ML**, Li J, Chandy B y col. (1996) Transient neutropenia: neutrophil distribution and replacement. *J. Nucl. Med.* 37, 3: 489.
- Thompson JA.** (1995) Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. *Tumour Biol.* 16: 10.
- Thompson JA**, Grunert F, Zimmermann W. (1991) Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.* 5: 344.
- Trail PA**, Wilner D, Lasch SJ y col. (1993) Cure of xenografted human carcinomas by BR96-doxorubicin immunoconjugates. *Science* 261: 212.
- Turpeenniemi-Hujanen T**, Thorgeirsson UP, Rao CN, Liotta LA. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 1883.
- Urbanski R**, Carrithers SL, Waldman SA (1995) Internalization of E coli ST mediated by Guanylyl yclase C in T84 human colon carcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1245: 29.

- Urdal DL**, Brentnall TA, Bernstein ID, Hakomori SI (1983) A granulocyte reactive monoclonal antibody, 1G10, identifies the galb1-4 (Fuca1-3) GlcNAc (X determinant) expressed in HL60 cells on both glycolipid and glycoprotein molecules. *Blood* 62: 1022.
- van Damm GJ**, Claas FH, Yazdanbakhsh M y col. (1996) Schistosoma mansoni excretory circulating cathodic antigen shares Lewis-x epitopes with a human granulocyte surface antigen and evokes host antibodies mediating complement-dependent lysis of granulocytes. *Blood* 88, 11: 4246.
- Vaporciyan AA**, DeLisser HM, Yan HC y col. (1993) Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 262: 1580.
- Verma M.** (1994) Carcinoma associated mucins: molecular biology and clinical applications. *Cancer Biochem. Biophys.* 14: 151.
- Viale G**, Flamini G, Grassi F y col. (1989) Idiotypic replica of an anti-human tumor-associated antigen monoclonal antibody. Analysis of monoclonal Ab1 and Ab3 fine specificity. *J. Immunol.* 143: 4338.
- Vlaminckx K**, Vakaet L Jr., Mareel Materiales y Métodos y col. (1991) Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor reveals an Invasion Suppressor role. *Cell* 66: 107.
- Vogelstein B**, Kinzler KW. (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9: 138.
- von den Driesch P**, Weller M, Worl P. (1997) Adhesion of neutrophils to epidermal cells: prerequisites for and blocking by anti-CD11b antibodies. *Arch. Dermatol. Res.* 289, 12: 692.
- Wagener C**, Müller-Waliraf R, Nisson S y col. (1981) Localization and concentration of carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal tumors: Correlation with CEA levels in plasma. *J. Natl. Cancer Inst.* 67: 539.
- Walz G**, Aruffo A, Kolanus W y col. (1990) Recognition by ELAM-1 of the Sialyl-Le^x determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 250:1132.
- Wawrzynczac EJ**, Derbyshire EJ. (1992) Immunotoxins: The power and the glory. *Immunol. Today* 13: 381.
- Wittels B**, Bennington JL. (1985) Surgical Pathology of bone marrow – Core biopsy diagnosis: 2.
- Yago K**, Zenita K, Ginya H y col. (1993) Expression of the α -(1,3)-fucosyltransferases which synthesize sialyl Le^x and sialyl Le^a, the carbohydrate ligands for E- and P- selectins, in human malignant cell lines. *Cancer Research* 53: 5559.
- Yamaguchi A**, Ding K, Maehara M y col. (1998) Expression of nm23-H1 gene and sialyl Lewisx antigen in breast cancer. *Oncology* 55, 4: 357.
- Yamamoto T**, Ikawa S, Akiyama T y col. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319: 230.
- Zhang K**, Baeckstrom D, Brevinge H, Hansson GC. (1996) Secreted MUC1 mucins lacking their cytoplasmic part and carrying sialyl-Lewis a and x epitopes from a tumor cell line and sera of colon carcinoma patients can inhibit HL-60 leucocyte adhesion to E-selectin-expressing endothelial cells. *J. Cell. Biochem.* 60, 4: 538.
- Zhou H**, Stanners CP, Fuks A. (1993) Specificity of anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their effects on CEA-mediated adhesion. *Cancer Res.* 53: 3817.

Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. (1992) Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. Immunol. Today 13, 3: 93.

141

