

Tesis Doctoral

Ensayos pre-clínicos de dos vacunas inmunoterapéuticas con actividad antitumoral desarrolladas a partir de gangliósidos

Gabri, Mariano Rolando

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas 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 Master's and 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:

Gabri, Mariano Rolando. (2004). Ensayos pre-clínicos de dos vacunas inmunoterapéuticas con actividad antitumoral desarrolladas a partir de gangliósidos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3721_Gabri

Cita tipo Chicago:

Gabri, Mariano Rolando. "Ensayos pre-clínicos de dos vacunas inmunoterapéuticas con actividad antitumoral desarrolladas a partir de gangliósidos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3721_Gabri

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

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

Autor
Mariano Rolando Gabri

Director
Dr. Daniel F. Alonso

“Ensayos pre-clínicos de dos vacunas
inmunoterapéuticas con actividad antitumoral
desarrolladas a partir de gangliósidos”

Laboratorio de Oncología Molecular
Departamento de Ciencia y Tecnología
Universidad Nacional de Quilmes

#3721•



FR.ST.A

Los resultados presentados en esta tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

“A novel hydrophobized ganglioside/Neisseria meningitidis outer-membrane-protein complex vaccine induces tumor protection in B16 murine melanoma” Daniel F. Alonso, Mariano R. Gabri, Marcelo D. Guthmann, Leonardo Fainboim, and Daniel E. Gomez. International Journal of Oncology 15:59-66, 1999.

“Role of tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice bearing a highly invasive metastatic mammary carcinoma” Mariano R. Gabri, Pablo Lorenzano Menna, Alejandra Scurzoni, Daniel E. Gómez and Daniel F. Alonso. Pathobiology 67; pp 180-185; 1999.

“Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to N-glycolyl-containing gangliosides” Ana María Vazquez, Mariano R Gabri, Ana María Hernández, Daniel F. Alonso, Irene Beausoleil, Daniel E. Gomez, and Rolando Perez. Oncology Reports 7: 751-756, 2000.

“Role of cell surface GM3 ganglioside and sialic acid in the antitumor activity of a GM3-based vaccine in the murine B16 melanoma model” Gabri MR, Ripoll GV, Alonso DF, Gomez DE. J Cancer Res Clin Oncol 128; Nro 12; pp. 669-77; 2002.

Abreviaturas:

ANMAT	Asociación Nacional de Medicamentos y Tecnología Alimentaria
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FAK	Quinasa de adhesión focal
FDA	Administración federal de drogas (USA)
FN	Fibronectina
GLS	Gangliósido
HAMA	Anticuerpos anti-murinos en humanos
HLA	Antígeno humano de leucocitos
i.m.	Intra-muscular
i.p.	
IL	Interleuquina
INF	Interferón
LPS	Lipopolisacárido
mAc	Anticuerpo monoclonal
MAGE	Gen codificante de antígeno de melanoma
MIIC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Nac	N-acetil
NCI	Instituto nacional del cáncer
Ngc	N-glicolil
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NK	Célula asesina natural
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Bufer fosfato salino
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
s.c.	Sub-cutáneo
SFB	Suero Fetal Bovino
TAA	Antígenos asociados a tumor
TCR	Receptor de células T
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VSSP	Protcoliposoma de pequeño tamaño

Indice

RESUMEN Y ABSTRACT.....13

ABSTRACT.....17

OBJETIVOS GENERALES.....21

 Objetivos Particulares24

EL CÁNCER27

 BIOLOGÍA Y EVOLUCIÓN CELULAR.....29

 UN POCO DE HISTORIA.....30

 TRANSFORMACIÓN CELULAR.....31

 ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMOR.....32

 USO DE MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DEL CÁNCER.....35

LOS GANGLIÓSIDOS.....37

 DESCRIPCIÓN MOLECULAR.....39

 BIOSÍNTESIS Y UBICACIÓN CELULAR.....40

 PARTICIPACIÓN DE LOS GANGLIÓSIDOS EN LA BIOLOGÍA CELULAR.....43

 LOS GANGLIÓSIDOS Y LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA.....48

 LOS GANGLIÓSIDOS COMO INMUNOMODULADORES50

INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER.53

 SISTEMA INMUNE Y CÁNCER.....55

 ORÍGENES DE LA INMUNOTERAPIA.....68

 VACUNAS ONCOLÓGICAS69

 INMUNOTERAPIA BASADA EN GANGLIÓSIDOS74

ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL ANTICUERPO 1E10 EN UN CARCINOMA MAMARIO MURINO77

INTRODUCCIÓN79

 CÁNCER DE MAMA.....81

Alternativas terapéuticas convencionales.....83

Inmunoterapia en cáncer de mama.....85

Modelos murinos utilizados en el estudio de cáncer de mama.....87

 ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO.....89

Características generales.....89

Anticuerpo anti-idiotipo 1E10.....91

RESULTADOS.....93

 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EN ESTUDIO.....95

El carcinoma mamario F3II es altamente invasivo y metastásico.....95

La portación tumoral de F3II produce mielopoyesis extramedular y aumento de la celularidad en médula ósea.....97

Las células F3II son reactivas al anticuerpo P3.....99

 ESTUDIO DE TÓXICIDAD IN VIVO CON EL ANTICUERPO 1E10100

 ESTUDIO DE TÓXICIDAD IN VIVO CON EL ANTICUERPO 1E10101

La vacuna a base de 1E10 presenta bajos niveles de toxicidad en ratones Balb/c.....101

 EFECTO ANTITUMORAL DE LA VACUNA A BASE DE 1E10.....103

La inmunización con 1E10 reduce la carga tumoral.....103

El tratamiento con 1E10 reduce significativamente el número de metástasis en pulmón.....105

 RESPUESTA INMUNOLÓGICA DESARROLLADA POR LA VACUNACIÓN CON 1E10.....106

Los sueros de ratones inmunizados reconocen células de tumor F3II.....106

ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA VACUNA NACGM3/VSSP EN UN MODELO DE MELANOMA MURINO.....107

INTRODUCCIÓN	109
EL MELANOMA.....	111
<i>Etiología del melanoma.....</i>	<i>113</i>
<i>Modelos murinos utilizados en el estudio del melanoma.....</i>	<i>119</i>
VACUNA NACGM3/VSSP.....	120
RESULTADOS.....	123
CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE MELANOMA B16.....	125
<i>Las células de melanoma B16 expresan NacGM3 en su membrana.....</i>	<i>125</i>
<i>El gangliósido NacGM3 modula la proliferación in vitro de B16 y F3II.....</i>	<i>126</i>
<i>La toma tumoral del melanoma B16 depende de la carga del desafío.....</i>	<i>127</i>
ESTUDIO TOXICOLÓGICO DE LA VACUNA NACGM3/VSSP EN RATONES C57BL/6	129
<i>La inmunización con la vacuna NacGM3/VSSP es bien tolerada</i>	<i>129</i>
EFFECTO ANTITUMORAL DE LA VACUNA NACGM3/VSSP SOBRE MELANOMA B16 EN UN MODELO MURINO SINGÉNICO.....	133
<i>La preinmunización disminuye la toma tumoral y aumenta la latencia y la supervivencia en ratones desafiados</i>	<i>133</i>
<i>La actividad antitumoral de la vacuna NacGM3/VSSP muestra un perfil dosis dependiente</i>	<i>137</i>
<i>Los ratones inmunizados mantienen una "memoria antitumoral" hasta los 3 meses.....</i>	<i>139</i>
<i>El rechazo tumoral en los ratones inmunizados está relacionado con la expresión de NacGM3 en membrana.....</i>	<i>142</i>
RESPUESTA INMUNOLÓGICA DESARROLLADA LUEGO DE LA VACUNACIÓN CON NACGM3/VSSP	145
<i>Los sueros inmunes presentan anticuerpos específicos contra los componentes de la vacuna.....</i>	<i>145</i>
<i>Los sueros de los ratones inmunizados con la vacuna demuestran una alta y específica reactividad contra células de melanoma B16.....</i>	<i>147</i>
<i>Los sueros inmunes no reconocen células que no expresen NacGM3 en su membrana.....</i>	<i>150</i>
<i>Los sueros inmunes son capaces de desencadenar una respuesta citotóxica mediada por anticuerpos contra las células de melanoma B16.....</i>	<i>152</i>
<i>Los sueros de los pacientes inmunizados tienen reactividad sobre cortes de melanoma.....</i>	<i>154</i>
EL ÁCIDO SIÁLICO ES UN RESIDUO FUNDAMENTAL PARA EL RECONOCIMIENTO SÉRICO DE MELANOMA.....	156
DISCUSIÓN	159
ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE UN ANTICUERPO ANTIDIOTÍPICO GENERADO A PARTIR DE NGGM3	161
<i>Caracterización del modelo empleado y evaluación de la toxicidad de la vacuna.....</i>	<i>161</i>
<i>Propiedades antitumorales de la vacuna.....</i>	<i>165</i>
<i>Respuesta inmunológica desarrollada por la vacunación.....</i>	<i>165</i>
ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA VACUNA NACGM3/VSSP EN UN MODELO DE MELANOMA MURINO.....	167
<i>Caracterización del modelo empleado y evaluación de la toxicidad de la vacuna.....</i>	<i>167</i>
<i>Propiedades antitumorales de la vacuna.....</i>	<i>169</i>
<i>Respuesta inmunológica desarrollada por la vacunación.....</i>	<i>173</i>
CONCLUSIONES	177
MATERIALES Y MÉTODOS	181
AGRADECIMIENTOS	193
BIBLIOGRAFÍA	197

Resumen y Abstract

Para el año 1934 la toxina de Coley era el único tratamiento sistémico para el tratamiento de cáncer. Este preparado fue desarrollado unos años antes por el prestigioso cirujano del *Memorial Hospital* de New York, William B. Coley, utilizando toxinas bacterianas de los géneros *Serratia* y *Streptococcus*. Este producto se convirtió así en la primera vacuna oncológica y en uno de los primeros tratamientos sistémicos del cáncer. A pesar de los experimentos iniciales del siglo pasado, luego de los ensayos de Coley la inmunoterapia oncológica fue dejada de lado por el advenimiento de las drogas quimioterapéuticas y las mejoras en la radioterapia.

En las últimas décadas se ha vuelto a observar a la inmunoterapia como una estrategia complementaria válida para el tratamiento de cáncer. Este nuevo interés sobre este tipo de tratamientos, tiene sus bases en el gran avance alcanzado en el entendimiento de los mecanismos inmunológicos y de los procesos que dominan la biología tumoral.

En esta tesis se presentan resultados relativos a dos vacunas desarrolladas a partir de gangliósidos, moléculas de membrana anfipáticas que pertenecen a la familia de los glicoesfingolípidos con por lo menos, un residuo de ácido siálico lo cual es una característica distintiva de estos compuestos. Los resultados se centran en la evaluación de los efectos tóxicos, la respuesta antitumoral y la modulación inmunológica desencadenados por la aplicación de vacunas inmunoterapéuticas a base de gangliósidos, consistentes en un anticuerpo anti-idiotipo dirigido a gangliósidos glicosilados (anticuerpo 1E10) y de una vacuna molecular del gangliósido NacGM3 conjugado a proteínas externas de membrana de *N. Meningitidis* en proteoliposomas de muy pequeño tamaño (NacGM3/VSSP). Con este fin se evaluará también el perfil de los modelos murinos experimentales de cáncer mamario y melanoma a emplearse para cada vacuna, respectivamente.

Los resultados demuestran que los modelos animales elegidos presentan características adecuadas para ser utilizados como herramientas de evaluación de los efectos y mecanismos desencadenados por la inmunización con las vacunas.

La línea celular de cáncer mamario murino F3II crece en el espacio subcutáneo desarrollando un fenotipo tumoral altamente maligno. Su portación produce un cuadro inmunoestimulatorio posiblemente ligado a la secreción de GM-CSF, citoquina ante la cual se modifica su respuesta proliferativa. Además estas células son reactivas al anticuerpo P3, precursor del 1E10, lo que la convierte en un modelo apropiado para la evaluación de la respuesta antitumoral de 1E10. La inmunización de ratones con el preparado 1E10-KLH no produce efectos tóxicos de magnitud en los animales, desarrollando una respuesta humoral que es capaz de reconocer a las células F3II. Utilizando este proceso de inmunización se puede observar un retardo en el crecimiento tumoral y una disminución significativa en el recuento de metástasis espontáneas en los ratones tratados.

Además se evaluó a la línea B16 crecida en animales singénicos como modelo de estudio de los efectos producidos por la vacunación con NacGM3/VSSP. Las células B16 presentan en su membrana al gangliósido NacGM3, reaccionando positivamente ante la presencia del mismo en el medio de cultivo. La vacunación de ratones C57 con NacGM3/VSSP desarrolla una respuesta inmunológica humoral que es capaz de reconocer a los componentes de la vacuna y a las células de melanoma B16. La aplicación de la vacuna no produce efectos tóxicos de importancia. La vacunación con NacGM3/VSSP genera una respuesta antitumoral que se manifiesta en el rechazo del desafío tumoral en el 100% de los animales vacunados. Esta respuesta se mantiene en el tiempo hasta tres meses luego de finalizada la misma. La respuesta antitumoral obtenida es dosis dependiente ya que se pudo observar una actividad antitumoral creciente en lotes de ratones inmunizados con una concentración vacunal de hasta 360 µg/dosis y específica hacia células que expresan el gangliósido NacGM3. La vacunación con NacGM3/VSSP desarrolla una respuesta de anticuerpos con preponderancia del isotipo IgG2b. Estos anticuerpos reconocen cortes de tumor B16 siendo su epítipo reactivo el residuo de ácido siálico presente en las células.

La investigación básica en vacunas provee un mejor entendimiento de los mecanismos inmunológicos involucrados en el rechazo tumoral inducidos por la vacunación. Los ensayos preclínicos con modelos animales de cáncer son de importancia capital en el estudio de los efectos inmunomodulatorios de estas vacunas y en la evaluación de sus capacidades terapéuticas a nivel clínico.

Abstract

By 1934 Coley's toxin was the only systemic treatment for cancer. This compound was developed few years before for the famous surgeon from The *Memorial Hospital* of New York, William B. Coley, using bacterial toxins from *Serratia* and *Streptococcus*. This product became the first cancer vaccine and one of the first systemic treatments for cancer. Despite the initial experiments carried out in the last century, after Coley attempts cancer immunotherapy was abandoned due to the appearance of quimiotherapeutic drugs and improvements in radiotherapy.

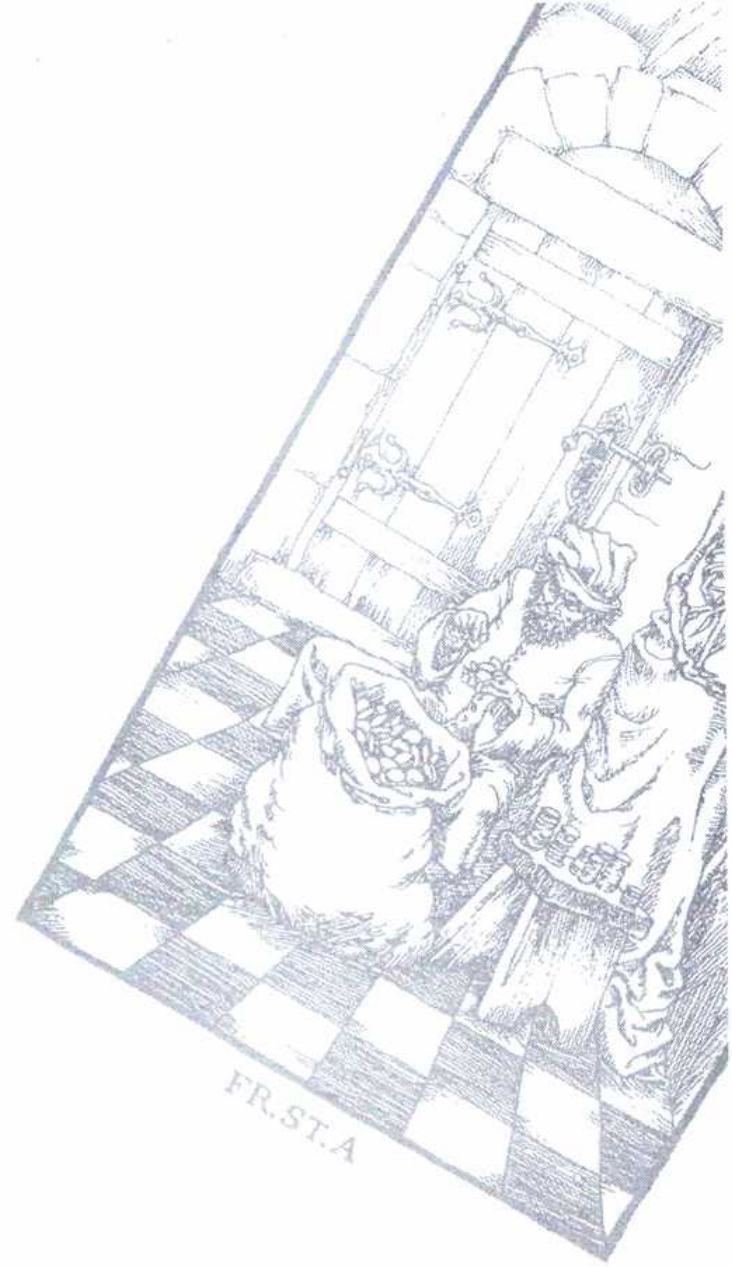
In the last decades, immunotherapy is seeing again as a valid adjuvant therapy for cancer treatment. This new interest in this kind of treatments, is based in the important advance reached in the understanding of immunology and the processes that govern tumor biology.

In this thesis, results related with two vaccines based in gangliosides are presented. Gangliosides are amphipatic membrane molecules that belong to the glycoesfingolipid family, having at least one residue of sialic acid, which is a distinctive characteristic of this kind of compounds. The results focus in the evaluation of toxicity, antitumoral response and the immunological modulation due to the application of this two vaccines, one an antiidiotypic antibody against glycolilated gangliosides (1E10 antibody) and other a molecular vaccine composed by the ganglioside NacGM3 conjugated to proteins from the outer membrane of *N. Meningitidis* in proteoliposomes of very small size (NacGM3/VSSP). With this reasoning in mind, the profile of the experimental murine models of breast cancer and melanoma to be employed with each vaccine, was also evaluated. Results demonstrated that the animal models chosen have the characteristics needed to be used as evaluation tools of the effects and mechanisms developed by the immunization with the vaccines.

F3II murine breast cancer cell line grows in the subcutis developing a highly malignant tumor phenotype. Its bearing produce an immunoestimulatory effect probably related to the secretion of GM-CSF, a cytoquine able to modify its proliferative response. Furthermore, this cells are reactive to P3 antibody, a precursor of 1E10, becoming a very adequate model for the evaluation of 1E10 antitumor response. Immunization of mice with the preparation 1E10-KI.H did not produce relevant toxic effects in the animals, developing a humoral response able to recognize F3II cells. Using this immunization process it can be observed a delay in tumor growth an a significant decrease in the number of spontaneous metastasis in treated animals.

Also, the B16 line, growing in syngenic animals, as a study model of the effect produced by vaccination with NacGM3/VSSP, was evaluated. B16 cells have in its membrane NacGM3 ganglioside. Vaccination of C57 mice with NacGM3/VSSP developed a humoral immunologic response able to recognize both, components of the vaccine and B16 melanoma cells. Administration of the vaccine did not produce relevant toxic effects. Vaccination with NacGM3/VSSP generated an antitumoral response that translated in the rejection of the tumor challenge in 100% of the vaccinated animals This response is sustained in the time up to three months after final inoculation. The antitumoral response obtained is dose-dependent since was observed an increasing antitumoral activity in mice immunized with a vaccine concentration of up to 360 µg/dose, being specific towards cells expressing NacGM3 ganglioside. Vaccination with NacGM3/VSSP developed an antibody response mostly based in the isotype IgG2b. This antibodies recognize B16 tumor slides being its reactive epitope the sialic acid residue which is present in the cells

Basic research in vaccines provide a better understanding of the immunologic mechanisms involved in tumor rejection induced by vaccination. Preclinical experiments with animal models of cancer are of utmost importance in the study of the immunomodulatory effects of this vaccines and the evaluation of its therapeutic capabilities at the clinical level.



Objetivos generales

Teniendo en cuenta la potencial utilidad de los gangliósidos en la inmunoterapia antitumoral, los trabajos presentados en esta tesis se centrarán en la evaluación de las respuestas y los mecanismos antitumorales desencadenados por la aplicación de vacunas inmunoterapéuticas a base de gangliósidos, consistentes en un anticuerpo anti-idiotipo dirigido a gangliósidos glicolilados (anticuerpo 1E10) y de una vacuna molecular del gangliósido NacGM3 conjugado a proteínas externas de membrana de *N. Meningitidis* en proteoliposomas de muy pequeño tamaño (NacGM3/VSSP). Con este fin se evaluará también el perfil de los modelos murinos experimentales de cáncer mamario y melanoma a emplearse para cada vacuna, respectivamente.

La hipótesis central de este trabajo está centrada en que los modelos murinos elegidos presentan características adecuadas para ser utilizados como herramientas de evaluación de los efectos y mecanismos desencadenados por la inmunización con las vacunas ya presentadas.

Concerniente al anticuerpo anti-idiotipo 1E10 se espera que la inmunización con este anticuerpo unido covalentemente a KLH sea capaz de desencadenar un efectivo rechazo tumoral basado en la inducción de una coherente respuesta inmunológica contra el tumor asociado a una leve respuesta tóxica.

Relativo a la vacuna NacGM3, se infiere que la inmunización con la misma, es capaz de desencadenar una respuesta antitumoral basada en la modulación del sistema inmune en contra de las células tumorales. Los eventos de toxicidad esperados para esta vacuna son mínimos. También serán explorados los mecanismos por los cuales se lleva adelante esta inmunomodulación, determinando la respuesta de anticuerpos específica desencadenada, su perfil de expresión y los blancos moleculares hacia los cuales está dirigida.

Objetivos particulares

1) *Caracterización de los modelos tumorales singénicos elegidos.*

- Valorar *in vitro* las características morfológicas y de comportamiento de las líneas celulares elegidas, además del perfil de expresión de gangliósidos que presentan interés para el proyecto.
- Evaluar *in vivo* las características tumorales de los modelos experimentales empleados, considerando la progresión tumoral primaria y metastásica, y los efectos que ella produce en el animal portador.

2) *Evaluación de la tolerancia y los efectos tóxicos asociados a la aplicación de los preparados vacunales.*

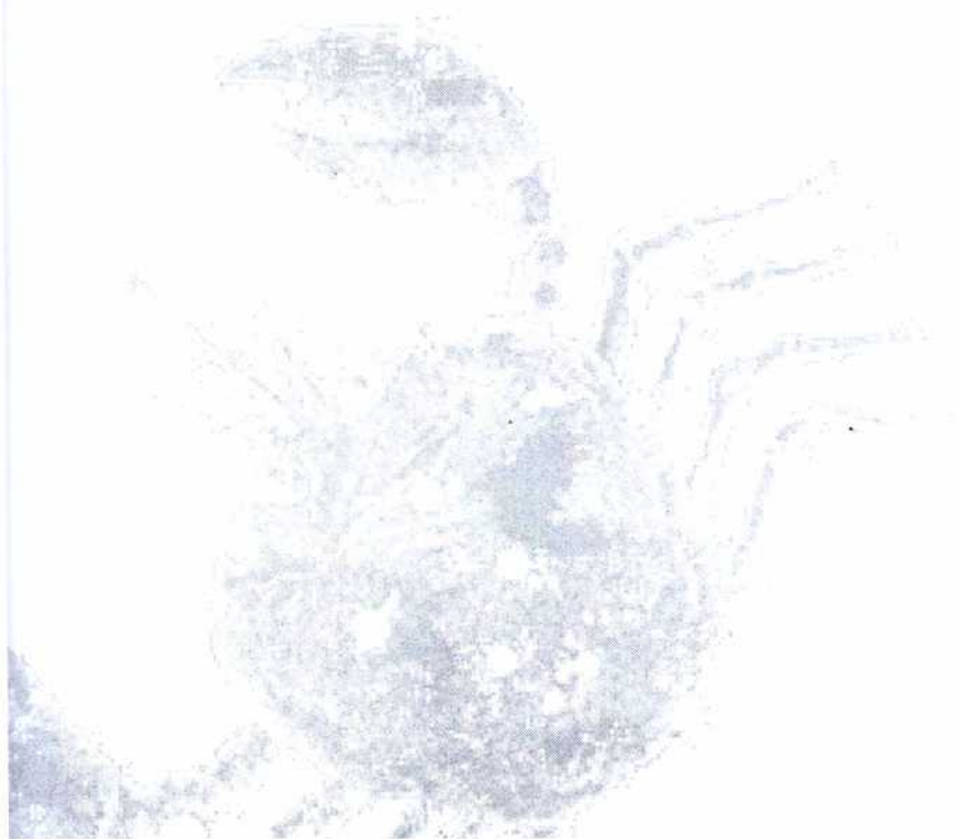
- Valorar la toxicidad como resultado de la inyección diaria de los preparados vacunales o como consecuencia de la inyección según el protocolo de vacunación elegido.
- Realizar estudios histopatológicos completos de los órganos mayores del organismo para determinar los efectos de la vacunación sobre el organismo.

3) *Valoración de la actividad antitumoral de los preparados vacunales.*

- Determinar un protocolo de vacunación que desarrolle una adecuada respuesta antitumoral en los modelos experimentales elegidos.
- Valorar la progresión del tumor primario en los animales sometidos a vacunación, así también como cuantificar la respuesta antimetastásica que es capaz de desarrollar la vacuna.

4) *Determinación de los mecanismos de respuesta inmunológica desarrollados por la vacunación.*

- Valorar la respuesta inmunológica desarrollada por la vacunación.
- Estudiar el perfil de inmunoglobulinas y la reactividad de estas contra los componentes de la vacuna en la respuesta generada por la vacunación con NacGM3/VSSP.
- Evaluar la respuesta inmunológica desarrollada contra las células tumorales.
- Extender este estudio a la respuesta contra tumores humanos utilizando sueros de los pacientes ingresados al protocolo clínico de fase I de la vacuna NacGM3/VSSP.
- Estudiar los arreglos moleculares sobre los cuales se articula la respuesta inmunológica contra las células tumorales generada por la vacunación con NacGM3/VSSP.

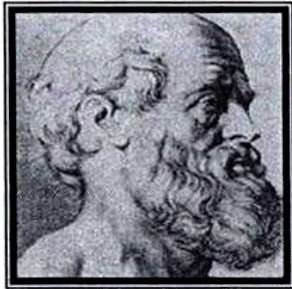


El Cáncer

Biología y evolución celular

Cada minuto 10 millones de células (10^7) se dividen en nuestro cuerpo. Este número de células en división no representa un crecimiento del organismo si consideramos que el número de células en un cuerpo humano adulto tiene entre 7 y 8 órdenes mayores de magnitud (10^{13} - 10^{14}) y que la tasa de muerte celular es relativamente la misma que la de proliferación. Esto significa que en condiciones normales, un cuerpo adulto no experimenta aumento de masa a costa del aumento en el número de células. Sin embargo, el cáncer es una enfermedad en donde se pone de manifiesto un desorden proliferativo de algunas células del cuerpo. El número de células que se divide es mayor al número de células que mueren en un determinado tejido, dando origen a un tumor. Se consideran tumores benignos aquellos que no se extienden más allá del sitio de origen y no comprometen la salud de la persona, como por ejemplo los lunares o nevos y los lipomas. Los malignos son aquellos tumores agresivos, con células con la capacidad de diseminarse por el organismo, y que pueden afectar el normal funcionamiento del cuerpo. La enfermedad derivada de la portación de tumores malignos se denomina cáncer.

Un poco de historia



Hipócrates

En los tiempos grecorromanos, todos los tumores eran considerados como sucesos de orden inflamatorio. Según esta concepción, los tumores eran la consecuencia del movimiento anormal de los fluidos corporales hacia los tejidos. El concepto de tumor como un crecimiento de tejido “nuevo” (neoplasia) es una idea relativamente reciente, teniendo un nacimiento hace alrededor de dos siglos. Hipócrates (460-377 A.C.), considerado el padre de la medicina, clasificó en aquel momento a los tumores en tres categorías *phumata*, *oidemata* y *karkinomata*, aunque las tres categorías podían incluir ocasionalmente algún tipo de cáncer tal como lo conocemos hoy. Dentro de *Phumata* se encontraban una variedad importante de tumores tanto de origen inflamatorio como neoplásico pero mayormente benignos, mientras que *Oidemata* se refería a tumores blandos e indoloros que incluían normalmente edemas. La gran mayoría de lo que conocemos como tumores malignos eran llamados *karkinoi*/*karkinomata*, que en latín se traduce como *cancrum*/*carcinoma*, palabras de las cuales derivan cáncer y carcinoma. Hipócrates asignó la palabra *karkinoi* (en griego: cangrejo), ya que la invasión tumoral le recordaba a él las pinzas de este animal.

Los agentes etiológicos causantes de esta enfermedad conforman una lista extensa. Aunque está bien documentado la existencia de núcleos familiares con alta predisposición a desarrollar ciertos tipos de cáncer, los factores ambientales y ciertos hábitos de vida conforman el 80% de las causas probadas de desarrollo de la enfermedad.

Transformación celular

El pasaje de una célula normal a una tumoral, evento conocido como transformación celular, involucra una serie de pasos que necesariamente incluyen cambios en la información genética de la célula. Es por esto que el cáncer es una enfermedad con causas que se entienden en el mundo de la biología molecular a través del análisis de las mutaciones adquiridas por las células y las consecuencias de comportamiento que estas mutaciones imponen, en las células y en el tejido afectado. Abonando el concepto de origen monoclonal de los tumores, se acepta que la enfermedad comienza con un evento fundacional de transformación, lo que implica que la modificación en una sola célula es capaz de dar el puntapié inicial en la conformación del tumor. La progresiva adquisición de mutaciones y la selección por el microambiente tisular determinan el origen, la evolución y las características del tumor. Sin embargo, a pesar del origen monoclonal, la población tumoral presenta un nivel de heterogeneidad celular importante, dado por las distintas subpoblaciones derivadas de linajes celulares que atravesaron distintos caminos de mutación. Este hecho hace que las reglas de la selección determinen que ciertas subpoblaciones se encuentren más representadas en un momento de la progresión tumoral, mientras que otras pueden hacerlo en otro.

Las mutaciones que se registran en los tumores suceden invariablemente con elementos que regulan la proliferación celular. En la célula transformada la proliferación autónoma es una característica distintiva, a diferencia de lo que ocurre en las células normales.

Oncogenes y genes supresores de tumor

Los oncogenes fueron descritos originalmente como parte de la información genética de ciertos virus que tienen la habilidad de transformar células eucariotas, produciendo finalmente tumores¹. Estos virus estimulan la proliferación de la célula huésped y para ello utilizan como herramienta a los oncogenes virales, una batería de elementos genéticos que se traducen dentro de la célula huésped, tomando el control de la proliferación celular². Resultó sorprendente el hallazgo que estos genes virales eran elementos “robados” de genes normales de las células eucariotas, que en condiciones normales actúan modulando el ciclo celular, pero que con sutiles y críticas modificaciones alteran su funcionamiento. A estos genes normales se los denominó protooncogenes; la denominación protooncogén está dada por la idea de que la alteración de estos genes da lugar a su contrapartida patológica u oncogén³.

Los oncogenes pueden codificar proteínas de membrana, citoplasmáticas o nucleares, que invariablemente participan en las vías de señalización celular. La mayoría actúa a través de vías de fosforilación, siendo tanto receptores de membrana, intermediarios de señalización o estimuladores de transcripción nuclear. La mutación en estos genes es dominante lo que implica que la mutación en sólo uno de los alelos del gen es suficiente para contribuir al fenotipo transformado.

Un ejemplo claro es el oncogén erb-B2. Este oncogén es una copia alterada del gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor, EGF*)⁴. La transcripción de este gen en células normales genera un producto proteico que alcanza la membrana plasmática pero no está regulado por su unión al ligando, el EGF, sino que envía señales de proliferación constantemente al interior celular. De esta manera, la célula se encuentra en constante estimulación proliferativa, dando el puntapié inicial para el desarrollo de una neoplasia⁵.

El otro grupo de genes implicados en la transformación celular es el de los llamados genes supresores tumorales, los cuales están implicados en los mecanismos de inhibición de la proliferación celular. Las mutaciones en estos genes o la delección de las porciones cromosómicas que los contienen, pueden modificar dramáticamente el comportamiento celular. Los supresores de tumor deben su nombre al hecho que, cuando están presentes o activos, la transformación tumoral no se produce, ya que detienen el ciclo celular. Esto implica que a diferencia de lo que ocurre con los oncogenes, la mutación no es dominante sino recesiva, puesto que ambos genes tienen que estar alterados para que la alteración del ciclo celular ocurra. Las primeras evidencias que indicaban la existencia de reguladores negativos de la proliferación celular surgieron de experimentos de fusión celular. Cuando células normales se fusionan con células transformadas, se producen fuertes modificaciones cromosómicas que en los casos en los cuales el fenotipo maligno es el preponderante, se omiten invariablemente particulares regiones cromosómicas. De estos experimentos se interpretó que la desregulación del ciclo celular ocurre siempre que ciertos elementos genéticos son omitidos en la célula⁶.

Un ejemplo de los genes supresores de tumor es el gen Rb, el cual debe su nombre a un raro tipo de cáncer que aparece en niños, el Retinoblastoma. La pérdida o alteración de ambos alelos de este gen se ha descrito en la gran mayoría de los casos clínicos de esta enfermedad. El gen Rb codifica para una proteína nuclear presente en una gran cantidad de tipos celulares de mamíferos. Es una proteína regulada por fosforilación; cuando no está fosforilada tiene afinidad por proteínas inductoras del ciclo celular. Así, Rb resulta ser un regulador negativo del ciclo celular, puesto que su ausencia o malfuncionamiento lleva a la continuidad de la actividad proliferativa^{7,8}.

Se consideran mutaciones primordiales a aquellas que participan en los pasos iniciales de la transformación neoplásica y que, como ya se mencionó, están involucradas en la desregulación del ciclo celular. Una serie de mutaciones

adicionales y modificaciones fenotípicas deben ocurrir para que la transformación inicial de lugar a una masa tumoral maligna capaz de comprometer la vida del organismo. Estos cambios adicionales pueden involucrar una variada gama de alternativas, como el aumento en la secreción de proteasas degradadoras de matriz extracelular^{9,10}, la secreción de factores de crecimiento¹¹ y sus receptores¹², el aumento de expresión en moléculas de adhesión¹³ y de co-receptores¹⁴.

Uso de modelos animales en el estudio del cáncer.

El uso de animales de experimentación representa una herramienta de invaluable valor para el estudio de los procesos que dominan la malignidad tumoral y sus posibles tratamientos. Aunque virtualmente los animales que pueden presentar utilidad para la investigación oncológica son muchos, el mayor cuerpo de evidencias se encuentra en el uso de roedores, básicamente Rata (*Rattus norvegicus*) y Ratón (*Mus musculus*)¹⁵.

El concepto *modelo animal* se refiere a una combinación de elementos vivos que dan como resultado un reactivo de laboratorio que presenta alta predictibilidad y reproducibilidad. La aplicación de dosis controladas de agentes carcinogénicos sobre los animales de forma tal de inducir el desarrollo de focos tumorales, es una de las alternativas para desarrollar modelos experimentales. Otra forma está dada por la inducción de la transformación de células normales *in vitro* y su posterior inyección en los animales. El mantenimiento de las células transformadas ya sea por pasajes reiterados de animal en animal o en condiciones de cultivo, permite contar con material celular capaz de desarrollar cáncer una vez inyectado en el animal portador.

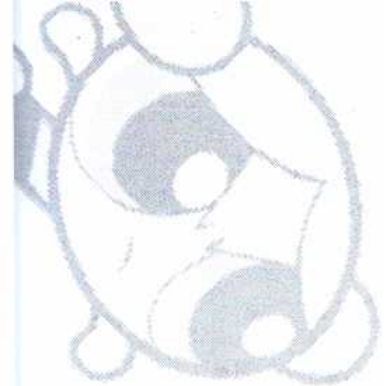
El animal mayormente utilizado en el estudio del cáncer es el ratón. Su fácil manejo asociado a lo económico de su mantenimiento y su alta tasa reproductora, hace de esta especie la mayormente elegida por los investigadores. Fue a principios de siglo donde se empezaron a generar por cruza entre individuos con alta identidad genética, poblaciones de ratones con una homología genética mayor al 99% a las cuales se las conoce como cepas, herramientas de gran utilidad en experimentación ya que su uso permite despreciar la variación de respuesta entre individuos. En la actualidad la página oficial del NCI (*National Cancer Institute*) registra mas de 400 cepas distintas de ratones¹⁶.

La caracterización de una línea tumoral implica el estudio detallado de una serie de parámetros, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos incluyen el aspecto

morfológico que poseen al ser cultivadas *in vitro*, tiempo de duplicación poblacional, densidad de saturación, análisis citogenético, capacidad de invasión sobre matrices artificiales, entre otros. *In vivo*, las líneas de tumores sólidos son evaluadas respecto del crecimiento e invasión de la masa neoplásica primaria, capacidad de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos y diseminación metastásica espontánea. Las células también pueden ser inoculadas por vía intravenosa en animales de experimentación, con el objetivo de investigar directamente la siembra hematógena hacia los órganos blanco, en un ensayo conocido como diseminación metastásica experimental. Sobre éstos parámetros caracterizados, los estudios suelen complementarse con la sensibilidad de la línea tumoral a agentes quimioterapéuticos tradicionales para el tipo histológico en cuestión.

Con estos elementos, el modelo suele estar a punto para su utilización como banco de prueba para el ensayo de nuevos protocolos terapéuticos, como también para investigar distintos aspectos de la biología celular y molecular del cáncer.

Los resultados obtenidos dan cuenta de la gran utilidad que presentan los modelos murinos en el testeo de nuevas terapias oncológicas¹⁷. Hoy en día la aprobación de cualquier nueva estrategia terapéutica requiere su validación previa en modelos animales de cáncer, por lo que la elección del modelo animal y su correcta caracterización se convierte en pilares fundamentales de la investigación en las nuevas estrategias terapéuticas^{18,19}.

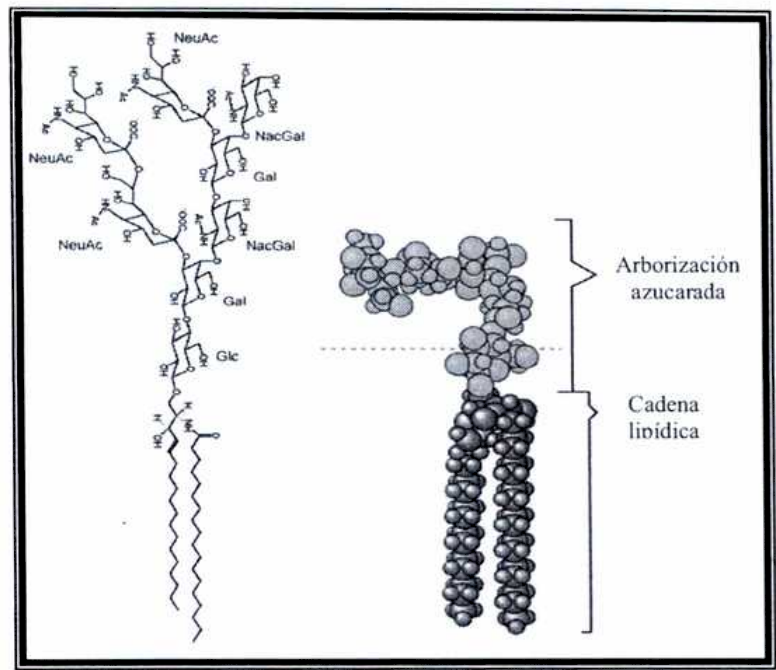


Los gangliósidos

Descripción molecular

En el año 1935, el profesor Ernst Klenk aisló en su laboratorio una fracción lipídica soluble en agua a partir del cerebro de vaca. A esta fracción tan particular de lípidos, la llamó sustancia X²⁰. Siete años más tarde terminó su caracterización, denominando gangliósidos (GLS) a sus componentes²¹. Debido a la variabilidad en la composición obtenida utilizando diferentes métodos de extracción y a la posibilidad de conseguir distintas fracciones a partir de diferentes protocolos, Lars Svennerholm propuso en el año 1956 que los gangliósidos serían una familia de moléculas que presentan una variada gama de arreglos de carbohidratos²². En 1964 se publicó el primer trabajo de compilación de información (*review*) importante que hace referencia a los gangliósidos como entidades moleculares representadas conspicuamente en el sistema nervioso central, con cierta presencia en otras células somáticas²³.

Los gangliósidos son compuestos lipídicos que pertenecen a la familia de los glicosfingolípidos. La presencia de por lo menos un residuo de ácido siálico es una característica distintiva de estos compuestos. Es por esto que, junto con los sulfátidos, constituyen el grupo de los glicosfingolípidos ácidos.



Esquemas representativos de moléculas de gangliósidos

Presentan una porción hidrofóbica denominada ceramida y una porción hidrofílica altamente variable -según el tipo de gangliósido- con residuos azucarados del tipo glucosa y galactosa, y una o más moléculas de ácido siálico.

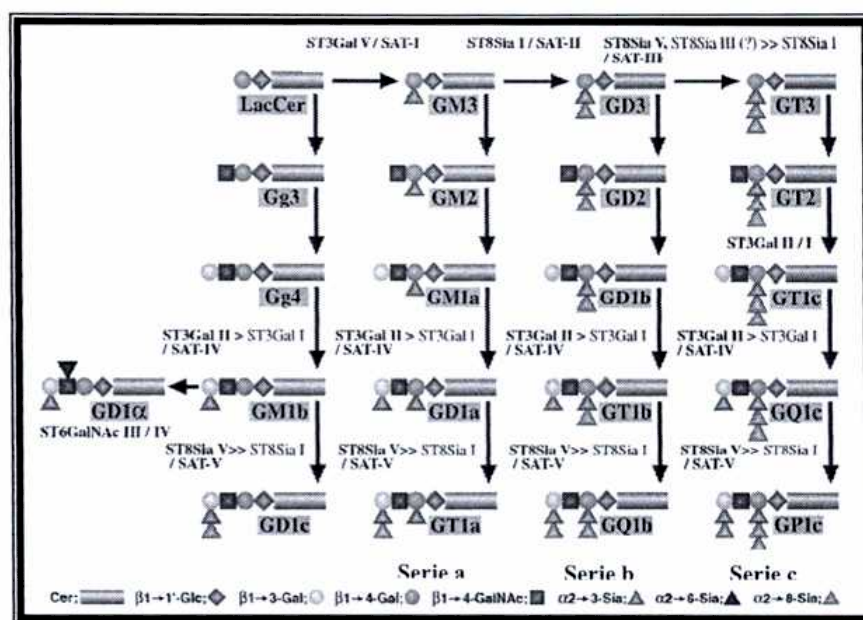
Biosíntesis y ubicación celular

La biosíntesis de los gangliósidos se lleva adelante en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, catalizada por enzimas que se encuentran unidas a membrana. La síntesis *de novo* comienza con la formación de la ceramida.

La condensación de palmitoil-CoA con una serina resulta en un compuesto llamado β -ceto-dihidro-esfingosina. Este compuesto es reducido y acetilado en dos pasos posteriores dando lugar a la dihidro-ceramida que, a través de una desaturación final, resulta en la ceramida (C:18 o C:20). La adición posterior de una molécula de glucosa da lugar a la glucosil-ceramida. Todas las enzimas catalizantes de estas reacciones están localizadas en el retículo endoplasmático con orientación hacia el citosol. La glucosil-ceramida recién sintetizada experimenta un movimiento de *flip-flop* de forma tal que queda orientada hacia el espacio luminal del retículo endoplasmático²⁴, donde por acción enzimática se le adiciona una galactosa que da lugar al compuesto lactosil-ceramida^{25,26}. Esta molécula migra desde el retículo endoplasmático hacia las membranas del *cis*-Golgi a través de un mecanismo aún no aclarado por completo, y se comporta como la molécula precursora no sialilada que da lugar a todas las variantes de la familia de gangliósidos.

La adición de un

residuo de ácido siálico al compuesto lactosil-ceramida en los sacos de Golgi deriva en el monosialogangliósido GM3, una segunda adición origina al

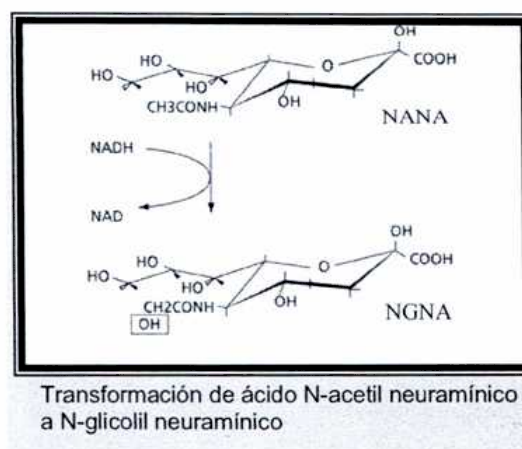


Vías de síntesis de los distintos gangliósidos
Fuente: www.glycoforum.gr.jp.

disialogangliósido GD3 y una tercera al trisialogangliósido GT3. Estos tres compuestos son los precursores de las tres series de gangliósidos a, b y c, denominadas así por Svennerholm en 1970, siendo la nomenclatura aceptada hoy en día para la clasificación de gangliósidos²⁷.

La denominación ácido siálico hace referencia a un grupo de compuestos orgánicos que comparten una estructura denominada ácido neuramínico. La presencia de un residuo acetilo en el anillo del ácido neuramínico da lugar a un compuesto conocido como ácido neuramínico N-acetilado (NANA, por su sigla en inglés), por lo que al gangliósido que lo incluye en estructura lo denominaremos NacGLS; si este gangliósido es el GM3 la denominación que le corresponde es NacGM3. Sin embargo, una modificación puede cambiar al grupo acetilo en uno glicolil, por lo que este ácido siálico se denomina NGNA, siendo la nomenclatura para gangliósidos correspondiente NgGLS.

Mientras que los gangliósidos N-acetilados son comunes en el ser humano, una delección en el gen que codifica para la enzima principal de la vía de modificación de estos gangliósidos hacia los N-glicolilados hace que en el ser humano no se presenten naturalmente este tipo de



gangliósidos²⁸. Sin embargo, es interesante destacar que se ha descrito la expresión de gangliósidos N-glicolilados en tumores humanos colónicos²⁹ y mamarios³⁰.

Los gangliósidos se encuentran en la capa externa de la membrana plasmática, donde los residuos azucarados se presentan hacia el espacio extracelular y la porción lipídica se inserta por interacción hidrofóbica en la membrana. También se ha descrito la secreción activa de gangliósidos al espacio extracelular, proceso conocido como *shedding* de gangliósidos³¹.

Los gangliósidos son los componentes mayoritarios de las membranas de neuronas, constituyendo el 10-12% del total de los componentes lipídicos. Este porcentaje aumenta hasta el 20-25% si se considera solamente la capa externa de la membrana plasmática³². Varios tipos celulares que no pertenecen al sistema nervioso expresan distintos tipos de gangliósidos, aunque el tipo y la concentración de éstos es altamente variable entre células de distinto origen.

Participación de los gangliósidos en la biología celular

En los últimos tiempos se comenzó a pensar que los gangliósidos tendrían una participación destacada en funciones normales de las células. Las primeras descripciones refieren a los gangliósidos como componentes conspicuos de la membrana plasmática de las células neuronales, aunque en ese momento no se entendían cuáles eran las causas que explicaban este hecho²³.

Hoy en día, se conoce mucho más de la biología de estos compuestos, su ubicación y la participación que tienen en la biología celular, tanto normal como tumoral, aunque aún quedan muchas preguntas por responder.

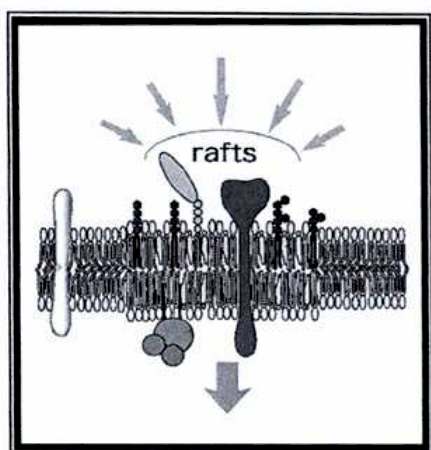
Un trabajo publicado hace algunos años propone que la presencia de gangliósidos en el cerebro de animales vertebrados podría estar relacionada con la adaptación al aumento en la temperatura corporal³³. En este trabajo se hace un extenso análisis de la concentración de gangliósidos en el cerebro de varios tipos de animales y se establece una correlación entre la relación de fosfolípidos/gangliósidos y la temperatura corporal. Estos resultados estarían en línea con el hecho que sólo los vertebrados expresan gangliósidos, siendo la mayoría de ellos homeotermos.

En la última década una cantidad importante de trabajos hace referencia a la función de gangliósidos en células no pertenecientes al sistema nervioso. Mediante el uso de animales *knock-out* se ha podido determinar que estas moléculas cumplen un rol fundamental en estadios embrionarios tanto en el desarrollo como en la diferenciación celular. Ratones a los cuales se les suprimió la expresión de glucosil-ceramida sintasa (la enzima responsable de generar la glucosil-ceramida en el retículo endoplasmático) y que por ende son incapaces de producir gangliósidos, presentan una mortalidad del 100% en estadios fetales. En estos ratones se pudo observar que una apoptosis masiva centrada en el ectodermo alrededor del día 7 de gestación es la causa fundamental de muerte de los animales doble *knock-out*³⁴. Además, células precursoras aisladas a partir de estos mutantes no fueron capaces de diferenciarse en células maduras lo cual

demuestra que los gangliósidos no sólo son necesarios para la proliferación celular sino también en la diferenciación de los tejidos embrionarios.

Han sido generados otros ratones incapaces de producir distintos tipo de gangliósidos y aunque sobreviven al período embrionario muchos de ellos – sobre todo los que al menos expresan monosialogangliósidos–, en todos se ha constatado fallas en el sistema nervioso.

Por más de treinta años el modelo de membrana plasmática de Singer y Nicholson³⁵ explicó muchos de los sucesos que ocurren en las membranas celulares, donde las proteínas son imaginadas como estructuras dinámicas inmersas en un “mar” de fluidos lipídicos. En la actualidad se acuerda que este modelo no se ajusta estrictamente a la realidad, ya que varios trabajos publicados en la última década describen superestructuras móviles incluidas en la membrana plasmática –compuestas por glucolípidos, colesterol y proteínas–



Esquema representativo de los rafts de membrana

denominadas *clusters* o *rafts* de membranas, aludiendo en inglés a agregados moleculares que “navegan” en la membrana.

Entre otras características, los esfingolípidos se diferencian de los fosfolípidos por contener largas cadenas carbonadas con uniones saturadas, lo cual les confiere la particularidad de agruparse y empaquetarse rápidamente. Estudios con membranas sintéticas determinaron que a cierta relación esfingolípidos/fosfolípidos se produce naturalmente una separación de fases en la mezcla³⁶. La adición de colesterol a las preparaciones de esfingolípidos/fosfolípidos sintéticas disminuye la concentración de esfingolípidos necesaria para generar la separación de fases³⁷, hecho que explicaría por qué el colesterol se encuentra en alta concentración en los *rafts* de membrana. Además, la depleción de colesterol de la membrana plasmática desordena los *rafts* y afecta profundamente su funcionamiento³⁸. Ha sido

reportado que la concentración de glicolípidos –particularmente de gangliósidos y sulfátidos– se encuentra aumentada 5 veces en los *rafts* de membrana en comparación a la concentración en el resto de la membrana plasmática³⁹.

Se ha aportado mucha información acerca de la participación que tienen los gangliósidos en los *rafts* de membrana. No sólo en su aspecto estructural, sino también como activos partícipes en la adhesión celular, la diferenciación y la modulación de los factores de crecimiento.

Gangliósidos y receptores de membrana. La presencia en los *rafts* de membrana de una variedad de proteínas relacionadas con la señalización celular, hace sospechar que estas estructuras tienen un alto grado de compromiso con este tipo de eventos celulares. En un modelo simple, los *rafts* de membrana son visualizados como plataformas de señalización que sirven para colocalizar los componentes participantes en las vías de señalización. Es así que receptores, intermediarios de señalización, kinasas y sustratos estarían localizados en una porción discreta del citoplasma, lo cual optimizaría su funcionamiento y permitiría un alto grado de regulación⁴⁰.

Se han descripto dos tipos de receptores asociados a estas estructuras, los receptores asociados a proteínas G y los receptores de tipo tirosina kinasa. Entre otros receptores podemos mencionar: receptores de células T y B, integrinas, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFr) y receptor de insulina como los más destacados. En la tabla se describen los receptores mencionados más frecuentemente en bibliografía presentes en *rafts* de membrana y su conducta al ser estimulados.

Receptor	Comportamiento ante el estímulo		
	Se mueve hacia el raft	Se mueve fuera del raft	No varía
Tirosina kinasas			
EGF		*	
ErbB2			*
Insulina	*		*
NGF			*
PDGF			*
Proteína G			
Adenosina A1		*	
Angiotensina II tipo I	*		
β2-adrenérgico		*	
β1-adrenérgico			*
M2-muscarínico	*		
colinérgico	*		
Bradiquinina 1	*		
Bradiquinina 2	*		
EDG-1	*		
Endotelina			*
Rodopsina			*

Receptores asociados a los rafts de membrana y su comportamiento ante el estímulo.
Fuente: Pike LJ, 2003.

Un ejemplo de la participación de los gangliósidos en la modulación de receptores de membrana es la interacción entre el GM1 y el NGF (*nerve growth factor*). El GM1 regula positivamente la actividad de los receptores de tirosina kinasa del NGF (*nerve growth factor*), denominados Trks. Los primeros trabajos demostraban que la adición de GM1 al medio de cultivo aumenta la sensibilidad al NGF en las células PC12, una línea celular de rata utilizada ampliamente en estudios de diferenciación celular. Estas células demostraban crecimiento de neuritas y expresión de microfilamentos en presencia de dosis subóptimas de NGF en medio de cultivo suplementado con GM1⁴¹. Recientes estudios en líneas celulares y células de tejidos nerviosos, demostraron que el GM1 facilita la autofosforilación del receptor, además de inducir su correcta localización en membrana⁴². También se ha reportado que el GM1 y otros gangliósidos inducen la vía de señalización de ERK⁴³.

Gangliósidos y comportamiento celular. A principios de la década del noventa fueron publicados los primeros resultados que demuestran el papel que despliegan algunos gangliósidos, como el GM3, en la adhesión celular. Los resultados indicaban que estos gangliósidos inducen la adhesión celular a través de la interacción con otras moléculas glucolípídicas⁴⁴. Además, un trabajo reciente demostró utilizando células transfectadas que sobreexpresan gangliósidos de la serie b y anticuerpos anti-GLS serie b, que GT1b y GD3 estimulan las vías de FAK-Src1, la cual está involucrada en el fenómeno de *spreading* celular⁴⁵. Sin embargo, estudios hechos utilizando líneas celulares de keratinocitos revelaron que estos gangliósidos interaccionan con integrinas, particularmente con la integrina $\alpha_5\beta_1$, imposibilitando su unión a la fibronectina (FN). Esta interacción se verificó para todos los componentes de la serie, aunque el nivel varía según el gangliósido implicado; así, la magnitud de la interacción registrada es GD1b>GD3>GM3⁴⁶. Los resultados están en línea con trabajos anteriores que describían que estos gangliósidos inhiben la migración y el *spreading* celular sobre *coatings* de fibronectina^{47,48}. Finalmente, esta modulación negativa parece estar relacionada con la asociación del gangliósido a una molécula proteolípídica denominada CD9, por lo que la inhibición en la movilidad se daría en circunstancias en las que ambas moléculas están expresadas en la superficie celular^{49, 50}.

Los gangliósidos y la transformación maligna

Como se mencionó, la transformación maligna involucra la alteración de las vías de señalización. Estos cambios implican, de manera invariable, la regulación positiva o negativa en la expresión de moléculas que participan directa o indirectamente en la traducción de señales. Además, durante el proceso de transformación el perfil de expresión de antígenos se ve alterado, modificando así la concentración relativa de moléculas en membrana en función de las nuevas demandas celulares.

La sobreexpresión de gangliósidos en tumores de origen neuroectodérmico es una característica descrita en los comienzos de la década del sesenta^{51,52}. La ocurrencia de estas moléculas en distintos tipos de tumores y su baja concentración en la gran mayoría de las células normales del organismo ha hecho que sean consideradas buenos marcadores tumorales para los cánceres epiteliales⁵³, melanoma^{54,55}, astrocitoma⁵⁶ y sarcoma⁵⁷.

Algo más de diez años atrás se demostró que el aumento en la expresión del oncogén ras *in vitro* aumenta la presencia de arreglos azucarados conteniendo ácido siálico⁵⁸ y que la concentración de esta molécula en membrana está relacionada con la agresividad tumoral *in vivo*⁵⁹. Siendo el ácido siálico un residuo presente en todos los gangliósidos, es de esperar que buena parte del aumento de esta molécula en la membrana celular se deba a los gangliósidos. En años posteriores, estudios realizados sobre líneas celulares de melanoma depletadas de GD3 señalaron que el cambio de perfil de gangliósidos en membrana conduce a una disminución en la proliferación celular y en las características tumorigénicas de las células⁶⁰. Los últimos trabajos realizados en el área demuestran que la manipulación en la expresión de gangliósidos a través del uso de técnicas de transfección, altera profundamente el comportamiento celular y la malignidad tumoral confirmando que la presencia de estas moléculas en la superficie celular no es un efecto colateral del proceso de transformación sino

una consecuencia de la selección de marcadores que participan activamente en el fenotipo tumoral^{61, 62}.

Los gangliósidos como inmunomoduladores

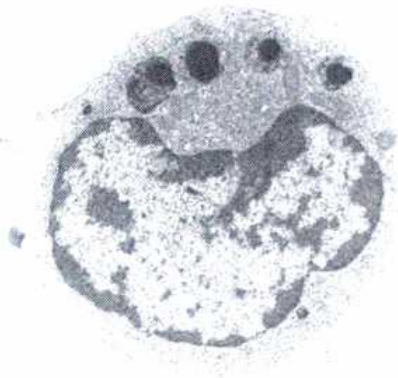
Varios grupos de investigación han estudiado la actividad inmunomoduladora de los gangliósidos. Los datos recabados hasta el momento indican que este tipo de moléculas cumple un rol crítico en la interacción entre ciertos tumores y el sistema inmune. Esta hipótesis está basada principalmente en resultados que demuestran la activa secreción de gangliósidos al medio extracelular por células tumorales y la actividad inmunosupresora que estos gangliósidos tienen⁶³.

Los primeros resultados obtenidos en la década del ochenta indicaron que los gangliósidos son capaces de inhibir la presencia de la molécula CD4 *in vitro* en linfocitos de roedores y humanos⁶⁴, además de inhibir la adhesión en monocitos⁶⁵. Trabajos posteriores demostraron que los gangliósidos derivados de células tumorales están involucrados en varios pasos de la inhibición de la respuesta inmune; pueden bloquear las funciones de linfocitos T *helper*⁶⁶, la actividad citotóxica de las células *natural killer*⁶⁷, la producción de TNF α (*tumor necrosis factor α*) y la presentación antigénica de monocitos^{65,68}. El efecto inmunosupresor de los gangliósidos tumorales fue también bien demostrado *in vivo* en un modelo murino⁶⁹.

Es significativo el hecho que la estructura de los gangliósidos sea un factor determinante en el nivel de actividad inmunosupresora⁷⁰, siendo la combinación de residuos azucarados y el largo de la cadena carbonada de la ceramida los elementos mayormente responsables. Los gangliósidos sintetizados por los tumores tienen propiedades distintas de aquellos presentes en células normales; entre las diferencias encontradas, la más notoria está dada por la reducida longitud de la cadena lipídica⁷¹, asociada al desarrollo de una mayor actividad inmunosupresora⁷².

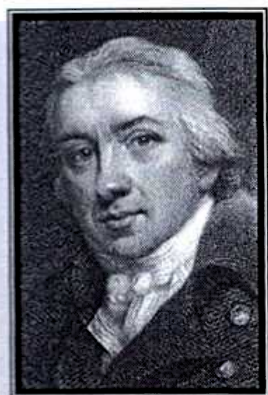
La síntesis de gangliósidos por las células tumorales ha demostrado no ser solamente un evento paralelo a la transformación, sino una característica determinante del proceso y vinculado a la sobrevivencia celular. Estos compuestos

presentan una activa participación en el comportamiento de las células malignas, además de contribuir a los mecanismos de regulación del sistema inmune que necesita el tumor para sobrevivir ante los embates del organismo.



Inmunoterapia del cáncer.

Sistema inmune y cáncer



Dr. Edward Jenner

En 1796 Edward Jenner, un médico de campo que ejercía su profesión en su pueblo natal de *Gloucestershire* al oeste de Inglaterra, realizó una serie de experimentos exponiendo a la gente de su pueblo a una variante no mortal de la viruela que se da en el ganado bovino. La gente expuesta a esta variante de la viruela demostraba signos de infección pero en ningún caso la infección comprometía la vida del paciente. Según las observaciones de Jenner, quienes entraban en contacto con el virus bovino eran refractarios a la aparición de nuevos signos cuando eran expuestos a una segunda infección. Deduciendo que la primera infección con el material de las vacas generaba una suerte de protección en el individuo frente a posteriores infecciones, Jenner denominó a este proceso “vacunación”. Los experimentos de Jenner se convirtieron en uno de los pasos iniciales del hombre en el campo de la inmunología y el responsable finalmente de la erradicación de la viruela en el mundo.

Desde los experimentos de Jenner hasta nuestros días son muchos los avances que se han logrado en el campo de la inmunología. Los conocimientos que se han adquirido durante los últimos dos siglos, hablan de la complejidad de funciones inmunológicas. Siendo el sistema inmune el que lleva la pesada carga de mantener al organismo fuera del alcance de los patógenos, es entendible que los procesos que realiza sean variados e intrincados.

Frente a la entrada de un patógeno al organismo, el sistema inmune se articula en dos tipos de respuestas inmunológicas. Una de ellas actúa inmediatamente como consecuencia de señales de alarma generales que se encuentran en el mundo microbiano, como el péptidoglicano (componente de la pared bacteriana de bacterias gram-positivas) o el ARN doble cadena (presente en ciertas familias virales). Esta respuesta se denomina innata o inespecífica. Su accionar frente a un agente infeccioso es inmediato, no generando una respuesta

a largo plazo. Sus actores principales son los macrófagos y los granulocitos, que son células con alta capacidad fagocítica. Además, estas células son las encargadas de iniciar la respuesta inflamatoria a través de la secreción de mediadores como las citoquinas y las quemoquinas. Otro componente importante de la inmunidad innata está conformado por un conjunto de proteínas líticas denominadas sistema de complemento. Estas proteínas circulan libremente en el plasma sanguíneo en forma inactiva. A consecuencia de su activación a través de iniciadores específicos, el sistema se activa dando lugar a la conformación de agregados proteicos con potente actividad citolítica.

La inmunidad adaptativa o específica genera actividad frente a elementos propios del agente infeccioso produciendo, además, una respuesta –a diferencia de la innata– con mayor duración temporal y con generación de memoria inmunológica. No está mediada por señales generales de alarma, sino que se articula en función de los componentes particulares del patógeno infectante. Los inmunólogos definen como antígenos a aquellas porciones del patógeno que son reconocibles por el sistema inmune adaptativo y que son capaces de desencadenar una respuesta inmunológica duradera en el tiempo. Los actores celulares principales de esta respuesta inmunológica, son los linfocitos T, los linfocitos B y las células presentadoras de antígenos entre las cuales se cuentan las células presentadoras de antígenos profesionales llamadas células dendríticas. Los anticuerpos -componentes humorales de la respuesta adaptativa- son seleccionados activamente durante el proceso infeccioso, por su capacidad de reconocimiento de los antígenos presentes en el patógeno, generándose así una población de anticuerpos con una alta reactividad antigénica.

Las reacciones inmunológicas pueden ser llevadas a cabo, no sólo contra microbios externos sino contra células del propio organismo. Esta situación puede darse en un contexto patológico -como lo son las enfermedades autoinmunes o las reacciones de hipersensibilidad-, contra células infectadas por virus o bacterias intracelulares, e inclusive contra células preneoplásicas. Este es

el motivo por el cual se entiende que muchos tumores pongan en juego mecanismos de evasión inmunológica, puesto que muchas células transformadas, que pueden dar lugar a tumores, son destruidas tempranamente por el sistema inmunológico^{73,74}.

En los próximos párrafos se hará una breve descripción de los mecanismos celulares y moleculares de las respuestas inmune innata y adaptativa.

Inmunidad innata. Común entre todos los vertebrados, los insectos y las plantas, la inmunidad innata es activada frente a determinados elementos pertenecientes sólo al campo de los organismos microscópicos.

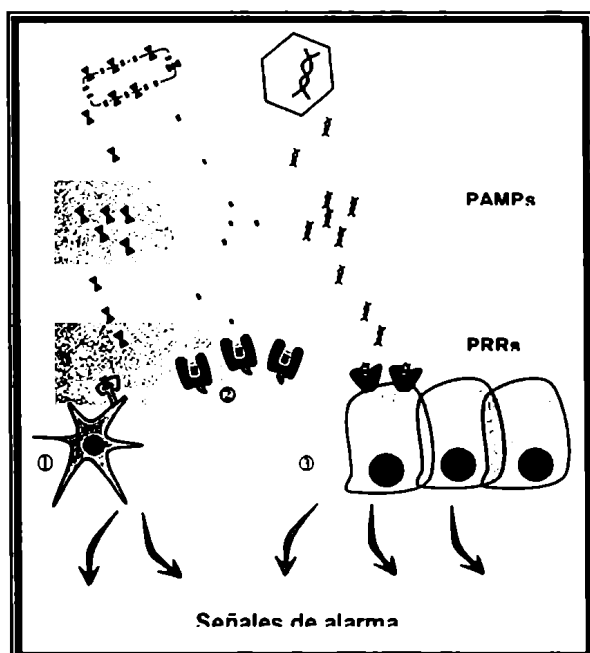
En una primera línea de defensa, las células fagocíticas, mayormente macrófagos y neutrófilos, se dedican a fagocitar a los patógenos emitiendo a su vez señales químicas para alertar al organismo.

La activación de la respuesta innata se desencadena invariablemente a partir de elementos comunes en el mundo microscópico; todos los compuestos conocidos de origen microbiano que presentan actividad inmunoestimuladora son estructuras químicas compartidas por un gran número de microorganismos y que son indispensables para la sobrevivencia de estos. El ácido teóico y el lipopolisacárido (LPS) son claros ejemplos de lo expuesto, componentes de las bacterias gram positivas y gram negativas, respectivamente. Ninguno de ellos es producido por el organismo huésped, siendo indispensables para la sobrevivencia de estos microorganismos. Las bacterias gram-negativas por ejemplo, no pueden sobrevivir sin la producción de péptidoglicanos como lo demuestra el efecto letal de la penicilina.

A estos componentes activadores de la respuesta innata, se los ha denominado PAMPs que en inglés significa patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)⁷⁵. Además se ha determinado la existencia de receptores específicos para este tipo de moléculas a los cuales se les

ha asignado el nombre de PRRs, receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors*).

Queda claro, entonces, que la estrategia de defensa de la inmunidad



Reconocimiento de antígenos microbianos (PAMPs) por el sistema inmune innato. ① Receptores (PRRs) en células presentadoras del sistema adaptativo. ② Receptores solubles. ③ Receptores en células somáticas.

innata previene la aparición de mutantes que escapen a su reconocimiento –ya que apunta a componentes vitales e invariables de los microorganismos– e involucra la participación de un número discreto de receptores por parte del organismo huésped.

Funcionalmente los PRRs pueden ser divididos en tres tipos: proteínas humorales que circulan libremente en el plasma, receptores expresados en la superficie de las células y receptores de señalización que pueden encontrarse

tanto en la superficie celular como en el interior de las células⁷⁶.

Se ha encontrado que los PRRs asociados a superficies celulares se expresan en células efectoras de la inmunidad innata, en células presentadoras de antígenos profesionales –pertenecientes a la inmunidad adaptativa– y también en células somáticas como las células epiteliales, que son las primera en enfrentarse con el agente patógeno.

Este perfil de expresión permite que los PRRs sean los inductores directos de los mecanismos efectoras de la respuesta innata y también cumplan la función de alertar al organismo de la presencia de agentes infecciosos a través de la emisión de señales endógenas como los interferones, las interleuquinas inflamatorias –principalmente IL-12– y ciertas quemoquinas. Además, por estar presentes en células del sistema adaptativo, actúan como comunicantes de ambas respuestas.

En referencia al accionar de la respuesta innata frente a células propias del organismo, se ha encontrado que las células NK (en inglés *natural killers*), son una de los componentes celulares mayormente involucrados. Estas células presentan una alta capacidad de inducción lítica sobre células sin pared celular. Las células NK se activan en respuesta a interferón, a ciertas citoquinas secretadas por macrófagos o frente a IL-12⁷⁷.

Respuesta innata y actividad antitumoral. La inducción de la respuesta innata a través de la inyección de citoquinas proinflamatorias, como IL-12 o interferón, es una alternativa terapéutica que está siendo explorada en la actualidad tanto en modelos animales como en ensayos clínicos en pacientes.

Estudios experimentales que involucran la inyección repetida de IL-12, han demostrado una disminución significativa en la incidencia tumoral^{78,79} con remisión de tumores establecidos en un alto porcentaje de animales en un modelo de carcinoma mamario⁸⁰. Los resultados muestran un incremento en el recuento de células NK y granulocitos en el tumor, además de constatar un aumento de interferón- α y γ . La destrucción se da como resultado de tres mecanismos principales: (1) destrucción de la vasculatura tumoral por acción citotóxica de los granulocitos contra las células endoteliales, (2) inhibición de la angiogénesis por INF- γ , TNF- α y ciertas quemoquinas (IP-10, MIG) y (3) activación de linfocitos citotóxicos y secreción de anticuerpos antitumorales. Alentado por los buenos resultados obtenidos en modelos animales, se habilitó el ensayo clínico en Fase I con IL-12 por vía endovenosa para encontrar los efectos adversos que esta pudiera presentar y la dosis máxima tolerada⁸¹. En función de estos resultados, dos ensayos clínicos fueron puestos en marcha *a posteriori* para la evaluación de la IL-12 en el tratamiento de cáncer de ovario y cáncer renal. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que se obtuvieron respuestas sólo en un 7% en el protocolo de cáncer renal y de 4% en el de cáncer de ovario^{82,83} observándose además ciertos efectos tóxicos

indeseables que hicieron que esta droga fuera descartada para su uso como agente antitumoral. A pesar de los efectos positivos que el tratamiento con IL-12 como monodroga ha demostrado en ciertos modelos murinos, su alta toxicidad asociada a una respuesta no del todo satisfactoria ha descartado a la IL-12 para el tratamiento del cáncer. En la actualidad se encuentra en discusión su uso como adyuvante a otras drogas oncológicas⁸⁴.

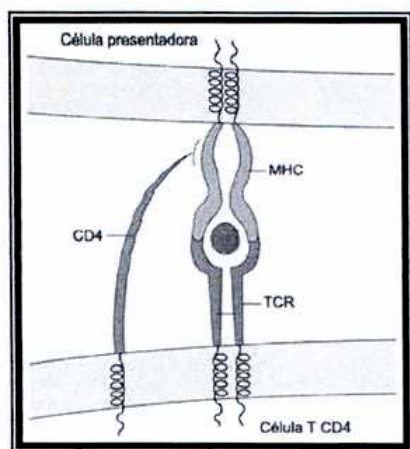
Otra citoquina que ha demostrado mejores resultados para el tratamiento de ciertos cánceres sólidos, es el interferón, particularmente el INF- α 2a y el 2b. En la actualidad, se utiliza la aplicación de interferón como alternativa terapéutica a la quimioterapia en el tratamiento de tumores quimioresistentes como melanoma⁸⁵ y cáncer renal⁸⁶. El uso de interferón en este tipo de tumores es la mejor alternativa terapéutica que ha demostrado cierto efecto en estos pacientes. Hasta el momento se han publicado nueve estudios sobre el tratamiento del melanoma con interferón como único agente. El análisis estadístico de estos estudios arroja como resultado que sólo uno de ellos demuestra un aumento significativo en el tiempo libre de enfermedad⁸⁷. A pesar de ser una droga que ya se encuentra en el mercado, el interferón no deja de despertar contradicciones. Asociado a su discreto efecto antitumoral, sus detractores critican el alto carácter tóxico de la droga y lo costoso que resulta su uso^{88,89}.

Se ha demostrado que las células NK despliegan actividad citotóxica frente a varias líneas tumorales y se pone en consideración hoy en día su participación en el rechazo tumoral. Un reciente estudio en ratones transgénicos que presentan una deficiencia severa en la actividad de células NK, demuestra que la ausencia de rechazo tumoral está asociada a esta falla del sistema inmune innato⁹⁰. Aún más contundentes son los resultados obtenidos por Ruggeri et al. en donde se describe que células NK reactivas obtenidas de un donante leucémico tienen la capacidad de prevenir el desarrollo de la enfermedad en un animal receptor⁹¹.

Aunque la inmunidad innata es normalmente ignorada, hay fuertes evidencias que demuestran que es un componente importante en la articulación del rechazo tumoral, ya sea por su participación directa o por la capacidad de direccionar la respuesta de la inmunidad adaptativa.

Inmunidad adaptativa. Como se mencionó anteriormente, la inmunidad adaptativa responde a discretos elementos presentes en el patógeno o en células del propio organismo llamados antígenos, accionando de manera sostenida en el tiempo con la consecuente generación de memoria inmunológica.

En apartados anteriores se mencionó que varios tipos de células



Esquema representativo de presentación antigénica MHC-TCR

fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) forman una primera línea de defensa contra antígenos extraños. A su vez, estas células juegan un papel fundamental en la vinculación entre la inmunidad innata y la adaptativa. Los patógenos fagocitados son procesados en compartimentos intracitoplasmáticos y ciertos fragmentos resultantes de los antígenos microbianos son expuestos en la membrana celular

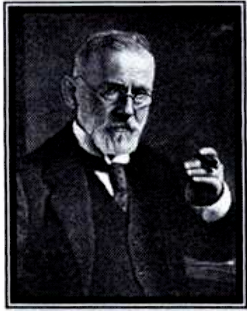
en un proceso que los inmunólogos denominan presentación antigénica. Esta se realiza en el caso de compuestos proteicos, utilizando los llamados complejos mayores de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*).

La presentación antigénica es un paso fundamental en el proceso de generación de una respuesta adaptada a medida del patógeno. Los fragmentos del antígeno presentados son posteriormente reconocidos por clones específicos de linfocitos T, células circulantes en sangre que presentan en su membrana un complejo proteico denominado receptor T (TCR, del inglés *T-cell receptor*) altamente variable en una discreta región de su molécula que hace que no todos los linfocitos T sean iguales, sino que la afinidad por un antígeno dado sea una característica particular de cada linfocito. Cuando un linfocito T reconoce un

fragmento antigénico particular presentado en un MHC en un contexto inmunológico determinado, se desencadenan una serie de eventos celulares que se conocen como activación del linfocito T. Esta activación involucra un pasaje del linfocito T de la quiescencia a la proliferación activa, dando lugar a más células que presentan la misma o mejor reactividad frente a ese fragmento antigénico particular. Existen varias subpoblaciones de linfocitos T pero mayormente se pueden reconocer tres: (1) los linfocitos T citotóxicos, que una vez activados pueden desencadenar una potente actividad lítica contra la célula portadora del fragmento correctamente presentado, (2) los linfocitos T helper que actúan en la activación final de los linfocitos B descrita más adelante y (3) los linfocitos T supresores, que son células encargadas de regular los procesos de activación.

Paralelamente, los antígenos que han entrado en el organismo pueden ser reconocidos sin mediar ninguna presentación celular por linfocitos B, una población de células similar a los linfocitos T que circulan libremente por la sangre y que presentan en su membrana moléculas proteicas denominadas anticuerpos. En un proceso similar a la unión del TCR con la MHC presentadora, el anticuerpo unido al linfocito B es característico de ese linfocito y reconoce regiones particulares del antígeno, denominadas epítopes. Una vez que ese anticuerpo se une a su correspondiente epítopo envía señales al interior celular activando al linfocito B. Finalmente este estímulo puede ser complementado por la activación de un linfocito T helper activado o ser suficiente (según el tipo de antígeno) para desencadenar la diferenciación del linfocito B a plasmocito, con la consecuente secreción de anticuerpos libres al torrente sanguíneo. Estos anticuerpos libres, al encontrarse con sus correspondientes epítopes, pueden desencadenar la activación del complemento contra el portador del epítopo, la activación de células líticas circulantes (como los linfocitos T citotóxicos o los NK) o la opsonización y posterior fagocitosis por macrófagos u otras células fagocíticas.

Inmunidad adaptativa y actividad antitumoral. En 1909, Paul Ehrlich llevo adelante



Dr. Paul Ehrlich

experimentos en animales inmunizándolos con células tumorales y pudo observar que estos animales resistían el posterior desafío tumoral. Frente a esos resultados, Ehrlich propuso que la aparición de células malignas en el organismo era un suceso quizás más común de lo que la aparición de tumores establecidos haría pensar, sugiriendo que esta aparición de células transformadas era controlada por el sistema inmune.

Aunque su razonamiento era simple, esta afirmación sigue siendo válida hoy en día en la opinión de muchos investigadores. La aceptación de este postulado implica que las células transformadas tienen elementos particulares que la diferencian del entorno normal, de forma tal que la hacen reconocible por el sistema inmune. Además, se podría afirmar que el cáncer implica necesariamente la adquisición por parte de las células tumorales de mecanismos de evasión de la vigilancia del sistema inmune.

A mediados de la década del sesenta se describió el reconocimiento por parte de linfocitos T citotóxicos de pequeños fragmentos peptídicos unidos a moléculas de MHC⁹². Sin embargo, fue recién en 1991 cuando se presentó el primer reporte de la clonación de un gen codificante para una proteína cuya expresión estaba asociada a un tumor maligno (melanoma). A este péptido se lo denominó antígeno de melanoma MAGE-1 (en inglés, *melanoma antigen encoding gene*) y fue el puntapié inicial en la descripción de los denominados antígenos asociados a tumor o TAA (*tumor associated antigens*)⁹³. La identificación del nonapéptido reconocible por una molécula HLA específica fue publicada al año siguiente⁹⁴.

A partir de estas publicaciones el mundo científico se encontró con los elementos diferenciales que Paul Erlich había propuesto a principios de siglo,

con los cuales el sistema inmune podría identificar al tumor e implementar algún efecto antitumoral.

Así, se describieron dos grandes grupos de antígenos, los TAA, moléculas normales en el organismo pero con expresión exacerbada en el tumor y los antígenos específicos de tumor, que sólo se expresan en las células tumorales y que resultan normalmente de mutaciones particulares, como por ejemplo deleciones⁹⁵, fusiones⁹⁶ o inserciones de oncogenes virales⁹⁷.

A finales de la última década grandes esfuerzos se han hecho en función de encontrar antígenos expresados diferencialmente en células tumorales. Las últimas técnicas aplicadas incluyen la transfección de células que expresan una determinada MHC con bibliotecas de cDNA producidas a partir de una población de células tumorales. El posterior co-cultivo de estas células transfectadas con linfocitos T citotóxicos, daría la oportunidad de señalar los clones reconocibles por las células citotóxicas y la consecuente identificación del antígeno tumoral involucrado⁹⁸. Otra estrategia implica la posibilidad de eluir los péptidos presentados por los MHC de células tumorales, su posterior concentración, secuenciación y utilización para evaluar finalmente, su capacidad de generar células T reactivas⁹⁹. Una tercera técnica utilizada es la conocida como análisis serológico de la expresión de bibliotecas de cDNA recombinantes o SEREX (del inglés, *serologic analysis of recombinant cDNA expression libraries*). Esta estrategia implica la expresión de las proteínas tumorales por métodos recombinantes (en bacterias u hongos) y la exposición de estas moléculas a anticuerpos presentes en el suero de pacientes con cáncer, para su posterior identificación y secuenciación¹⁰⁰.

En la actualidad se han descripto aproximadamente 70 antígenos tumorales asociados a la presentación por moléculas MHC de clase I y de clase II. Mientras que más de 1700 han sido identificadas utilizando los anticuerpos circulantes en la sangre de enfermos de cáncer¹⁰¹. Este escenario abre grandes expectativas en la producción de vacunas oncológicas, aunque no se sabe

estrictamente cuántos de los candidatos propuestos puedan ser útiles en el tratamiento de la enfermedad.

Estrategias tumorales de evasión inmunológica. En los cambiantes mundos del sistema inmune y del desarrollo tumoral la batalla que se libra por la defensa del huésped y la sobrevivencia del tumor apela a las más variadas estrategias. Ya se han descrito las herramientas utilizadas por el sistema inmune en su batalla contra las células transformadas, y a continuación se hará referencia a los mecanismos implementados por las células tumorales en función de resistir a este embate.

La idea de que el tumor debe escapar del sistema inmune está basada fundamentalmente en el razonamiento de que si el tumor presenta moléculas nuevas, las cuales pueden ser detectadas por el sistema inmune, éstas tienen que ser necesariamente inmunogénicas, por su condición de nuevos antígenos. Esta idea fue puesta seriamente en duda con experimentos en donde se transfectaron proteínas xenogénicas altamente inmunogénicas como la proteína de influenza¹⁰², la B-galactosidasa de *Escherichia coli* o la ovoalbumina de pollo¹⁰³, a células tumorales. Los resultados obtenidos fueron los mismos en todos los casos, las células transfectadas fueron capaces de desarrollar tumores cuando se inyectaron en ratones, lo que indica que la condición de molécula nueva altamente antigénica no era condicionante para disparar una eficiente respuesta antitumoral.

Los resultados comentados encuentran razón en muchas explicaciones, aunque es todavía un terreno de amplio debate. Los mecanismos propuestos en el llamado escape tumoral incluyen eventos relacionados con la inestabilidad propia de los tumores en cuanto a la presentación y expresión de sus antígenos, la disminución en la expresión de moléculas co-estimuladoras, la producción de agentes inmunosupresores y además, la inducción de apoptosis sobre las células blancas atacantes.

La disminución de moléculas presentadoras en las células tumorales o de moléculas necesarias en la presentación antigénica es un hecho ampliamente documentado, tanto en modelos animales como en pacientes. En ratones se demostró que los tumores recidivantes luego de un primer desafío y remoción del tumor inicial, presentaban resistencia a la lisis por linfocitos T citotóxicos. La adquisición de la resistencia podía deberse a la disminución en la expresión de MHC o a la disminución en la expresión de B7-1, una molécula co-estimuladora necesaria en la activación linfocitaria¹⁰⁴. La disminución en la expresión de MHC I también fue encontrada en pacientes portadores de melanoma. Interesante es el hecho que la disminución de esta molécula correlaciona significativamente con la masa del tumor primario y la sobrevida de los pacientes¹⁰⁵.

Otra estrategia que los tumores usan para escapar de la vigilancia del sistema inmune es la expresión de factores inmunosupresores. Estos elementos pueden ser generados por las células tumorales o por células no tumorales presentes en el tumor tales como células del propio sistema inmune, estromales o epiteliales. La molécula mayormente descrita es el factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés *transforming growth factor*). Esta citoquina actúa sobre la proliferación, la activación y la diferenciación tanto de células del sistema inmune innato y como adaptativo¹⁰⁵. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*) es secretado por muchos tumores. Además de su capacidad para inducir el crecimiento endotelial y la formación de nuevos vasos, el VEGF inhibe la diferenciación de células dendríticas¹⁰⁶. Otros agentes inmunosupresores secretados por células tumorales descritos son las prostaglandinas¹⁰⁷, la interleucina-10¹⁰⁸ y los gangliósidos solubles⁶⁹. Es de destacar en este punto los resultados obtenidos por investigadores argentinos en donde se demuestra que la Galectina-1, molécula perteneciente a la familia de los carbohidratos que unen proteínas, es un potente inmunosupresor que actúa principalmente induciendo el arresto y la apoptosis de los linfocitos T activados¹⁰⁹. Resultados recientemente publicados

demuestran que la inhibición de la expresión de esta molécula en la superficie de células tumorales, aumenta el rechazo tumoral mediado por linfocitos T¹¹⁰.

Las células tumorales no sólo son capaces de disminuir los niveles de expresión de moléculas presentadoras de antígenos o co-estimuladoras y secretar factores inmunosupresores, también se ha descrito en muchos tumores la insensibilidad hacia señales apoptóticas externas, un mecanismo implementado por el sistema inmune para erradicar células propias defectuosas. Una estrategia que los tumores usan para evadir las señales apoptóticas es la sobreexpresión de moléculas antiapoptóticas intracelulares, como la proteína FLIP. La sobreexpresión de esta molécula se ha reportado en modelos murinos¹¹¹ y en células transformadas humanas¹¹². Además, otras proteínas como la survivina¹¹³, la proteína PI-9/SPI-6¹¹⁴ o la secreción de receptores solubles de señales apoptóticas¹¹⁵, son algunos de los mecanismos identificados hasta el momento como mediadores de la respuesta antiapoptótica de las células tumorales.

Finalmente, un mecanismo que se ha denominado de contraataque tumoral, implica la expresión en la célula tumoral del ligando proapoptótico denominado FasL o CD95L¹¹⁶. Las células tumorales se convierten en un inductor de apoptosis de los linfocitos infiltrantes del tumor¹¹⁷. La expresión de FasL es característica de células que se encuentran en regiones inmunoprivilegiadas, como el ojo o los testículos¹¹⁸.

Orígenes de la inmunoterapia

Para el año 1934 la toxina de Coley era el único tratamiento sistémico de cáncer.



Dr. William B. Coley

La toxina fue desarrollada unos años antes por el prestigioso cirujano del *Memorial Hospital* de New York, William B. Coley. El desarrollo se basó en la observación que la sobrevida de pacientes con cáncer que cursaban erisipela (comúnmente mortal para la época) mostraba en algunos casos remisión en la masa tumoral. Coley pensó que ciertas propiedades de los microorganismos eran mediadores de la respuesta antitumoral observada. Este razonamiento lo llevó a realizar al primer ensayo clínico de inmunoterapia oncológica¹¹⁹. Este se hizo sobre diez pacientes utilizando una mezcla de toxinas bacterianas provenientes de los géneros *Streptococcus* y *Serratia*, a la cual se la conoció como toxina de Coley. Posteriormente el ensayo se realizó sobre 800 pacientes y fue aceptado por la comunidad médica como tratamiento válido en pacientes con cáncer.

Como se mencionó anteriormente, la comprensión de los mecanismos inmunológicos se consolida en la segunda mitad del siglo pasado. Recién en los comienzos de la década del sesenta las funciones del linfocito fueron suficientemente conocidas¹²⁰. Por lo tanto, los mecanismos por los cuales la toxina de Coley tenía cierta acción antitumoral, eran –y lo son aún– no totalmente entendidos. Es probable que la combinación de la inducción del sistema inmune inespecífico y específico, más la estimulación en la secreción de citoquinas genere una respuesta inmunológica que en ciertas circunstancias puede ser dirigida contra las células malignas.

Desde los días de la toxina de Coley hasta nuestra época muchos trabajos han sumado entendimiento a la relación que existe entre el sistema inmune y el cáncer. Queda claro hoy en día que muchos tipos tumorales pueden ser tratados apelando a estrategias inmunoterapéuticas y que, por el contrario, muchos otros aún no es factible tratarlos de esa forma.

A pesar de los experimentos iniciales del siglo pasado, luego de los ensayos de Coley la inmunoterapia oncológica fue dejada de lado por el advenimiento de las drogas quimioterapéuticas y las mejoras en la radioterapia. Recién en las últimas décadas se ha vuelto a observar a la inmunoterapia como una estrategia complementaria válida para el tratamiento de cáncer¹²¹.

Vacunas oncológicas

La inmunoterapia oncológica puede dividirse en dos grandes grupos, la inmunoterapia pasiva, basada en el uso de anticuerpo dirigidos directamente contra antígenos de las células tumorales, y la inmunoterapia activa, en la cual se busca incentivar al sistema inmune del organismo para que reaccione en contra de las células tumorales.

Inmunoterapia pasiva. La inmunoterapia pasiva utiliza como herramienta fundamental los anticuerpos monoclonales. Estos permiten que el tratamiento pueda ser específicamente dirigido contra blancos tumorales, de allí que la especificidad del anticuerpo es crucial para obtener resultados positivos. Este tipo de tratamientos son posibles gracias a los avances alcanzados con la tecnología de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden conjugarse a toxinas, radioisótopos o prodrogas, produciendo así una acción tóxica específica contra la célula tumoral sin atacar células somáticas normales. Por ejemplo, se ha aprobado recientemente la venta de un anticuerpo monoclonal denominado IDEC-CDB8 y conocido comercialmente como Rituximab para el tratamiento de pacientes con linfomas no Hodkings CD-20 positivos. Este anticuerpo fue desarrollado por los laboratorios de IDEC, Genetech y Roche, siendo la primera droga biológica aprobada por la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA) en diez años^{122, 123}.

Inmunoterapia activa. Son muchos los protocolos inmunoterapéuticos que se están llevando adelante actualmente dentro de esta categoría. Este tipo de terapias apelan a la inducción del sistema inmune para que éste monte la respuesta necesaria para rechazar a las células tumorales, bajo la forma de vacunas oncológicas. Aunque la variación de los componentes de este tipo de vacunas abarca un universo sumamente variado, se pueden describir generalmente tres elementos componentes de estas vacunas: (1) el antígeno (o a veces el anticuerpo) utilizado sobre el cual se pretende que el sistema inmune reaccione, (2) el *carrier* y (3) el adyuvante inmunológico.

Los antígenos utilizados en las vacunas oncológicas serán ampliamente descriptos en párrafos siguientes por lo que se hará ahora una breve reseña de los otros dos componentes.

La palabra *carrier* en inglés significa cargador o transportador. Esta denominación se usa en inmunología para definir a elementos de alto peso molecular y con una fuerte capacidad inmunogénica que se unen al componente activo de la vacuna transfiriendo así sus propiedades. El *carrier* más utilizado en estas vacunas es una proteína de alto peso molecular obtenida del molusco marino *Megathura crenulata*, denominada KLH (*keyhole-limpet hemocyanin*). La misma presenta una marcada actividad inmunomoduladora tanto en animales de experimentación como en humanos¹²⁴.

Los adyuvantes inmunológicos también actúan en la modulación del sistema inmune optimizando la presentación antigénica y generando un foco inflamatorio en el sitio de inyección. Los adyuvantes se pueden dividir en tres categorías, las sales minerales -como la alúmina-, los que generan emulsiones de aceite en agua -como el adyuvante de Freund y el Montande ISA 51- y los derivados de lípidos bacterianos -como el MPL-¹²⁵. Históricamente, los adyuvantes inmunológicos más usados son el adyuvante de Freund y la alúmina, estando entre los más novedosos el DETOX¹²⁶ y el QS21¹²⁷.

A continuación se realizará un breve repaso de los diferentes tipos de vacunas inmunoterapéuticas yendo en orden creciente respecto a la especificidad del tratamiento.

- *Activadores inmunológicos inespecíficos.* El Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, se emplea actualmente en la clínica para el tratamiento de cánceres superficiales de vejiga, siendo el que brinda los mejores resultados tanto en el tratamiento de tumores establecidos como en la prevención de recidivas luego de la cirugía¹²⁸. El cáncer de vejiga es uno bastante común en la población masculina y cerca de las dos terceras partes de ellos son cánceres superficiales. La BCG no posee un efecto citotóxico *per se*, sino que actúa estimulando células del sistema inmune del huésped, como linfocitos T citotóxicos, células NK y macrófagos, generando el entorno inflamatorio necesario para que se produzca la reacción contra antígenos tumorales. Otros inmunomoduladores inespecíficos, algunos de los cuales se encuentran aún en fases de experimentación preclínica, son el interferón- α , que ejerce efectos citotóxicos directos además de activar células linfoides, el TNF- α -de efectos similares al interferón- y la proteína KIH. Esta última es altamente inmunogénica, pudiendo ser empleada también como proteína *carrier* de otros antígenos, como se mencionó más arriba.

- *Células totales.* Otra alternativa que se encuentra en experimentación consiste en la inoculación de células tumorales, previamente irradiadas, con el fin de aumentar la presentación de antígenos tumorales y así potenciar la respuesta inmune contra el tumor instalado. Este tipo de estrategia terapéutica es llevada a cabo por el grupo de investigación conducido por Donald Morton en el *John Wayne Cancer Institute* (Santa Mónica, USA), quien desarrolló una vacuna a partir de tres líneas celulares de melanoma, cada una de las cuales expresa altas concentraciones de seis antígenos asociados al melanoma. Los ensayos ya han

alcanzado el nivel de experimentación clínica de fase III¹²⁹ y el producto se ha registrado comercialmente con el nombre Canvaxin (Cancer Vax Corp.).

Una variante de esta estrategia consiste en la extracción de células del tumor del paciente y su posterior reinoculación en condiciones controladas, previa irradiación. Hanna et al. han aplicado este método para el tratamiento del cáncer renal inyectando las células irradiadas junto a BCG como inmunoadyuvante y complementando con un tratamiento de IL-2¹³⁰.

- *Lisados celulares.* Al inocular lisados de células tumorales, la presentación de antígenos se vería favorecida puesto que las células presentadoras de antígeno se encuentran con restos celulares, más fácilmente procesables. Mitchell y colaboradores desarrollaron una vacuna para el tratamiento de pacientes con melanoma, que consiste en la administración de células no irradiadas lisadas por métodos mecánicos, en combinación con el adyuvante DETOX¹³¹.
- *Oncolisados virales.* Wallack et al. pusieron a punto una vacuna que consiste en un lisado producido a partir de células de melanoma infectadas con el virus Vaccinia¹³². Además de enfrentarse con antígenos tumorales, las células presentadoras se encuentran con antígenos virales, que también son presentados a través del complejo mayor de histocompatibilidad. Los antígenos virales producen una acción inmunogénica mucho mayor que los antígenos tumorales, activando la secreción de citoquinas de los linfocitos T colaboradores. Este efecto conduce a una mayor respuesta contra los antígenos de melanoma. La vacuna basada en oncolisados virales ha concluido un ensayo de fase III en el año 2001, aunque lamentablemente los resultados obtenidos no muestran efectos contundentes antitumorales.
- *Antígenos liberados.* En condiciones *in vitro*, aproximadamente la mitad de las moléculas de membrana se libera al medio dentro de las tres horas de cultivo.

Distintas vacunas desarrolladas a partir de este material presentan la ventaja de no poseer todos los antígenos de las células tumorales, que podrían generar un efecto indeseable o tóxico en el paciente. El grupo liderado por Jean-Claude Bystryl, de la *School of Medicine of New York* (USA) desarrolló una vacuna de este tipo a partir de antígenos solubles liberados por cuatro líneas celulares de melanoma¹³³, empleando alúmina como inmunoadyuvante. La vacuna ingresó en 1995 en la fase III de experimentación clínica. Llamativamente los resultados de este ensayo clínico no fueron publicados no habiendo hasta el momento mas noticias sobre las capacidades antitumorales de esta vacuna.

- *Antígenos tumorales purificados.* En este caso, se busca una respuesta inmune dirigida contra un único antígeno -o un grupo limitado de antígenos- a partir de la inoculación de moléculas purificadas propias del tumor. Es de vital importancia la correcta elección del antígeno ya que se debe tener en cuenta su presencia en las células normales del organismo y la facilidad en el proceso de su purificación. Un ejemplo de este tipo de vacunas corresponde a la vacuna poliantigénica a base de tres antígenos proteicos marcadores de estirpe de células de melanoma, MART-1, gp-100 y tirosinasa. Esta vacuna ha ingresado recientemente en fase I para el tratamiento de melanoma¹³⁴. También los gangliósidos han demostrado ser moléculas atractivas como antígenos para la inmunoterapia tumoral, las cuales serán analizadas en el apartado siguiente.

Inmunoterapia basada en gangliósidos

Una numerosa cantidad de vacunas a base de gangliósidos se han desarrollado en pos de buscar alternativas terapéuticas en tumores de origen neuroectodérmico. Es así que la evaluación de la actividad antitumoral de vacunas a base de gangliósidos tales como GD2¹³⁵, GD3¹³⁶ y fucosyl-GM1¹³⁷ ha sido estudiada en ensayos de fase clínica I.

Los resultados obtenidos hasta el momento con estas vacunas muestran que la inmunización con los gangliósidos conjugados covalentemente a *carriers* proteicos genera una respuesta de anticuerpos significativa y que estos anticuerpos son capaces de generar citotoxicidad. De este tipo de vacunas de gangliósidos con *carriers* proteicos, la que más resultados terapéuticos ha demostrado es una vacuna a base de GM2.

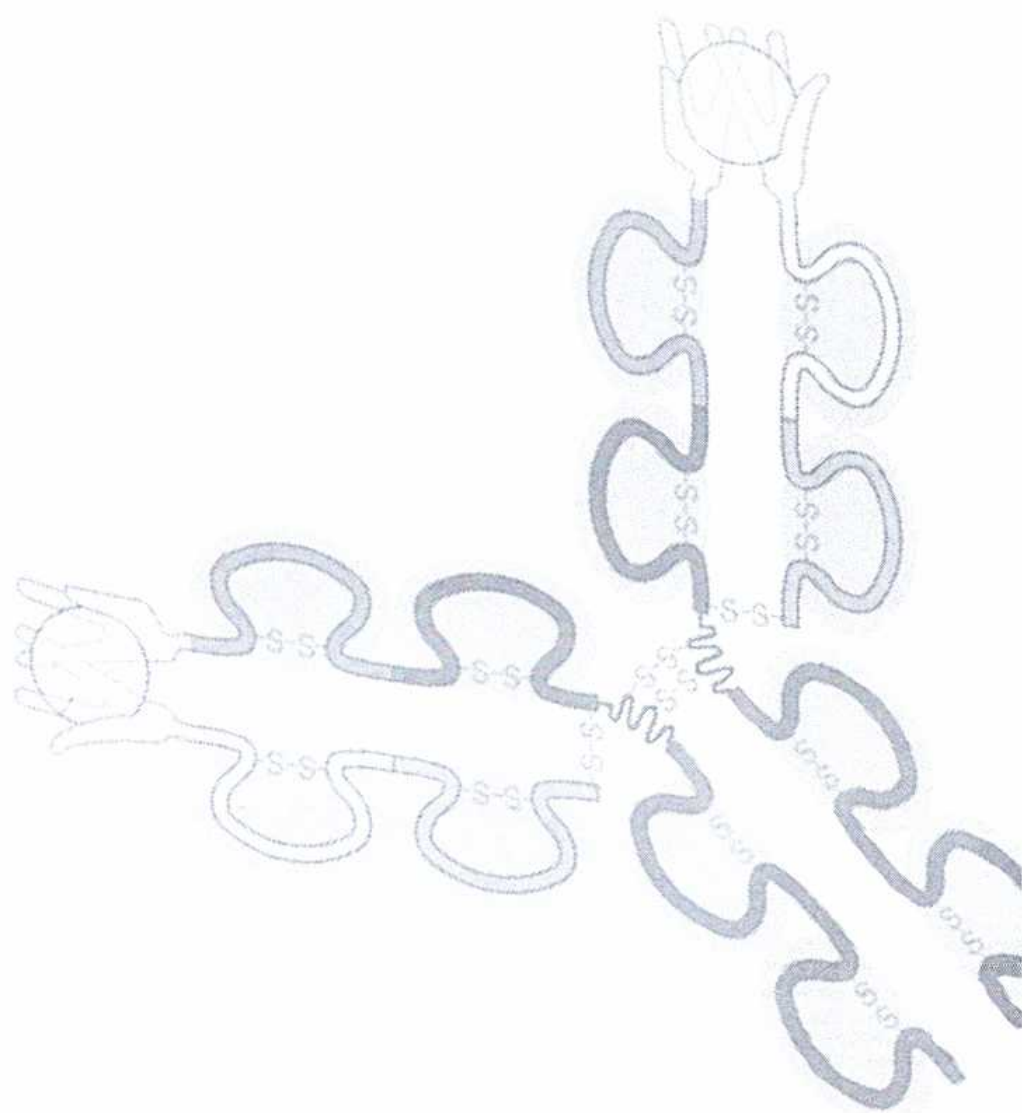
El grupo del Dr. Philip Livingston ha venido desarrollando una vacuna conjugando covalentemente la proteína de molusco KLH con el gangliósido GM2. Esta vacuna, desarrollada en el *Memorial Sloan Kettering* de New York, fue producida con el aporte de la compañía *Bristol-Myers Squibb*, hasta marzo del 2001 momento donde fue tomada por la firma *Progenics Pharmacia*. Actualmente, la compañía se encuentra haciendo el seguimiento de los pacientes de melanoma enrolados en el estudio de fase III de la vacuna que se considera será concluido en este año. Un análisis técnico profundo predice para fines de la década en curso un vasto campo de aplicación de la vacuna en los países desarrollados y en el resto del mundo¹³⁸. Esta vacuna demostró que en pacientes con melanoma desarrolla una respuesta humoral efectiva contra las células tumorales¹³⁹. Los resultados preliminares favorables obtenidos con esta vacuna en la experimentación preclínica y en las fases clínicas I y II, alimentaron expectativas que llevaron a la ejecución en paralelo de dos ensayos clínicos de fase III. En uno de estos ensayos se compararon pacientes vacunados versus no tratados y en el otro la comparación se realizó versus pacientes tratados con altas dosis de INF- α 2b en un estudio multicéntrico europeo (ensayos clínicos

E1694/S9512/C509801). En este último ensayo clínico, el tratamiento con GM2-KLH no mostró diferencias significativas respecto del grupo de pacientes tratados con INF- α 2b¹⁴⁰, aunque sí las hubo con el grupo control de pacientes no tratados. Este resultado fue decepcionante en función de las expectativas generadas entorno de esta vacuna y ha llevado a interesantes replanteos en el diseño de estrategias de tratamiento oncológico con vacunas de gangliósidos.

El estudio permitió modificar y ajustar el marco terapéutico para la aplicación de vacunas oncológicas. En primer lugar, el universo de pacientes que podrían beneficiarse claramente con la aplicación de vacunas, corresponde a aquellos con una carga residual de tumor pequeña o estadios bajos, siendo el objetivo terapéutico consolidar la remisión de la enfermedad. Los resultados preclínicos muestran evidencias en este sentido cuando se trabaja con tratamientos que no despliegan una acción citotóxica directa contra las células tumorales, como lo hace la quimioterapia convencional. Por otro lado, el diseño de un ensayo clínico debería apuntar a mostrar la acción beneficiosa de la vacunación al sumarse a los tratamientos habituales ya probados para la variante tumoral correspondiente. Las mejoras en el abordaje del tratamiento oncológico suelen depender de la incorporación de nuevas formas de tratamiento, más que del rápido reemplazo de los tratamientos convencionales.

Una ventaja que merece remarcarse para el tratamiento con vacunas inmunoterapéuticas, incluyendo aquellas a base de gangliósidos, es que no han demostrado eventos de toxicidad severos como sí ocurre con los agentes quimioterápicos y el interferón. De tal manera que la combinación de las vacunas a otros tratamientos podría redundar también en una buena acción antitumoral, sin una mayor presencia de efectos tóxicos.

**Actividad antitumoral del anticuerpo 1E10 en un
carcinoma mamario murino**



Introducción

Cáncer de mama.

La mama humana está compuesta de una región secretora -productora de

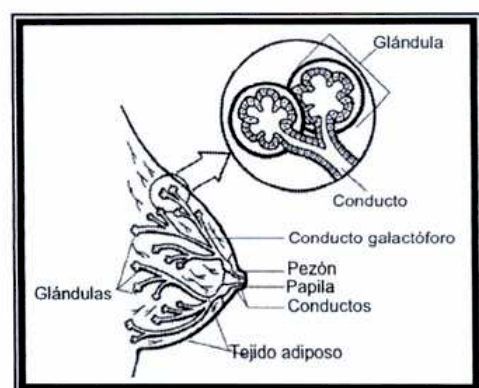


Diagrama de una mama normal

calostro y leche- más una estructura con función de soporte que se constituye básicamente de tejido conectivo adiposo. Se presentan de 15 a 25 lóbulos por mama, variando el número de glándulas y conductos que los conforman de acuerdo con el entorno hormonal del cuerpo. Las glándulas secretoras

de la mama son glándulas exócrinas tubuloalveolares, cuyos conductos se van uniendo en el trayecto hacia el pezón, terminando en una salida única por lóbulo denominada papila. Las glándulas y los conductos mamarios responden sensiblemente a las concentraciones sistémicas de una serie de hormonas como ser estrógeno, progesterona y prolactina.

La transformación maligna de las células mamarias da lugar a distintos tipos de cáncer, que se denominan de distinta manera según la variante celular afectada y su ubicación. La gran mayoría de los tumores mamarios se clasifican como adenocarcinomas, pudiéndose dividir en dos tipos: los adenocarcinomas ductales, que derivan de células componentes de los conductos y los adenocarcinomas lobulares los cuales provienen de las células glandulares. En los estadios tempranos de la enfermedad los adenocarcinomas pasan habitualmente por una etapa en la que están contenidos en el territorio tisular - ya sea en la glándula o en el conducto- y sin sobrepasar la membrana basal, instancia en la cual se los denomina adenocarcinomas *in situ*. La invasión de las células malignas hacia el espacio estromal de la mama, resulta en la variante invasiva de la enfermedad, representando los adenocarcinomas lobulares invasivos el 5% y los ductales el 80% del total de cánceres mamarios invasivos.

Etiología del cáncer de mama. La transformación maligna de las células mamarias puede tener múltiples causas. Se pueden encontrar casos asociados fuertemente a factores hereditarios, ambientales, dietarios y hormonales. Sin embargo, cerca de la mitad de los tumores mamarios no encuentran una causa evidente y determinante, más que la asociación con sexo y edad¹⁴¹.

Datos presentados hace algunos años mostraban que ciertas familias presentaban una predisposición mayor a desarrollar tumores mamarios que la media de la población¹⁴². Esta observación fue confirmada y justificada a través de la descripción de genes asociados a tal predisposición. El gen BRCA-1 fue el primero en ser descrito^{143,144}. Pertenece al grupo de los genes supresores de tumor, participando en los mecanismos de reparación del ADN¹⁴⁵. La mutación en uno de los alelos del gen aumenta la predisposición en el individuo, por lo que la aparición de un evento de mutación en el otro alelo es suficiente para desregular los mecanismos celulares de reparación genómica. Posteriormente se describió un segundo gen (BRCA-2) el cual también demostró estar asociado con el cáncer hereditario¹⁴⁶. Los cánceres hereditarios representan alrededor del 5 al 10% del total de cánceres mamarios¹⁴⁷; por lo tanto, resulta evidente que la herencia no es la causa determinante de la aparición de la mayoría de este tipo de tumores.

Son variados los factores ambientales responsables de la aparición de esta enfermedad en la población. La ingesta excesiva de grasas y el sedentarismo son factores de riesgo de esta enfermedad, probablemente vinculados al impacto en el contexto hormonal. Sumado a esto, se han aportado evidencias acerca del contacto con radiaciones ionizantes, pesticidas organoclorados y la exposición ocupacional a campos electromagnéticos, entre otros factores de riesgo¹⁴⁸.

El análisis de resultados epidemiológicos divididos por regiones, demuestran que el nivel de consumo de grasas en la dieta correlaciona con la incidencia y la mortalidad. Aunque pueden encontrarse datos que indican cierta predisposición genética, existen evidencias de que el comportamiento

alimentario es el factor determinante. Un ejemplo de lo mencionado se encuentra en estudios realizados sobre individuos asiáticos emigrados a países occidentales. El estudio de la incidencia de cáncer evidencia un aumento significativo en aquellos que no mantienen su dieta original, en comparación a las tasas de incidencia en su país de origen^{149,150}. Sin embargo otros estudios muestran resultados encontrados. En comunidades cerradas que no ingieren carne se mostró que la incidencia de cáncer es similar a la de la población general¹⁵¹, además el mayor análisis epidemiológico realizado para este fin, sobre un total de 89.538 mujeres, no mostró correlación entre la ingesta de grasas y la incidencia de cáncer¹⁵², por lo que la relación entre cáncer de mama y consumo de grasas es aún hoy una pregunta abierta¹⁵³.

Finalmente, los factores hormonales se encuentran claramente ligados al desarrollo de esta enfermedad. Siendo el tejido glandular hormono-dependiente no es caprichoso pensar que la transformación celular se encuentra relacionada con las condiciones hormonales. En términos generales la incidencia en la población femenina post-menopáusica es significativamente menor en comparación con la pre-menopáusica, sugiriendo que la actividad hormonal del ovario es un factor inductor de la transformación celular en la mama¹⁵⁴. El establecimiento de los ciclos ovulatorios en la mujer parece estar estrechamente relacionado con el aumento en la incidencia¹⁵⁵; además el período de vida fértil relaciona inversamente con el riesgo de contraer cáncer de mama¹⁵⁶.

Alternativas terapéuticas convencionales.

La remoción quirúrgica del tumor es la primera alternativa terapéutica en el manejo de cáncer de mama. La remoción quirúrgica conservadora de la masa tumoral, la mastectomía y la mastectomía con remoción de ganglios son las tres alternativas quirúrgicas posibles. La decisión de cuál de las tres alternativas ofrece los mejores resultados depende de las características de cada tumor y el avance de la enfermedad al momento de su diagnóstico.

Generalmente la remoción quirúrgica se complementa con terapia radiante localizada¹⁵⁷ ya que estudios comparativos demuestran que el porcentaje de recurrencia local disminuye en pacientes tratados¹⁵⁸. El análisis de la presencia de receptores de estrógeno y progesterona y la existencia de células tumorales en los ganglios axilares drenantes del tumor ayudan a definir el grado de malignidad de la enfermedad y las consecuentes alternativas terapéuticas posibles.

La alternativa de tratamiento adyuvante a la cirugía, cuando se demuestra la presencia de células tumorales en ganglio, varía según las características del tumor y del paciente. Es así que terapias adyuvantes con quimioterapia, radioterapia, antiestrógenos y/o remoción de ovario se encuentran entre las posibles alternativas.

El tratamiento con antihormonas como los antiestrógenos ha sido probado en situaciones en donde el tumor demuestra ser hormono-dependiente. La droga mayormente usada en estos casos es el tamoxifeno, un producto sintético con alta afinidad por los receptores de estrógeno que se usa en clínica hace mas de veinte años¹⁵⁹. Un resultado posible en estos casos es la aparición de tumores resistentes debido a la selección de subpoblaciones tumorales hormono-independientes como consecuencia del tratamiento prolongado con antiestrógenos. Sin embargo, una nueva generación de antihormonas está siendo objeto de intensa investigación, por lo cual esta área de tratamiento puede dar lugar a nuevas alternativas terapéuticas¹⁶⁰.

Las drogas quimioterapéuticas ofrecen una gran variedad de tratamientos. Entre ellas, las que más se destacan son la doxorubicina, la ciclofosfamida y el metotrexate, entre otras, además de existir una variedad de protocolos recomendados según el estatus del paciente, de combinación de estas drogas. La decisión del tratamiento a seguir es compleja ya que el profesional responsable debe valorar la condición clínica del individuo, el nivel de agresividad de su enfermedad y las probabilidades de recidiva o metástasis.

A pesar de la batería de tratamientos existentes en adyuvancia que suman a la cirugía, la recurrencia en pacientes operados es alta y suele darse entre los 2 y 7 años después de la extirpación del tumor primario. Puede ocurrir tanto localmente como en forma de metástasis en otros órganos (hígado, hueso, cerebro u otros). El pronóstico para los pacientes con metástasis no es bueno. A pesar de que se han ensayado una gran cantidad de drogas la media de sobrevida para estos pacientes es de 3 años.

Respuesta a la quimioterapia combinada en pacientes metastásicos de cáncer de mama.

Respuesta parcial o completa	45% a 85%
Respuesta completa	5% a 25% (todos los pacientes)
Tiempo medio de respuesta al tratamiento	4 a 8 semanas
Duración media de la respuesta	5 a 13 meses
Sobrevida media de los respondedores	15 a 35 meses

Fuente: DeVita et al.

Por lo expuesto se deduce fácilmente que el estudio de las alternativas terapéuticas para este tipo de cáncer se mantiene en alta prioridad en todos los centros oncológicos del mundo. En este sentido, la existencia de buenos modelos animales permite alcanzar resultados críticos para luego continuar con el diseño de ensayos clínicos.

Inmunoterapia en cáncer de mama.

Como ya se comentó, son varias las alternativas clínicas que existen para el tratamiento del cáncer de mama. A pesar de los avances en el desarrollo de nuevas drogas, la terapia contra este tipo de cáncer no ha logrado reducir drásticamente los eventos de recaída después del tratamiento inicial.

Un abanico de alternativas inmunoterapéuticas se encuentra en la actualidad en exploración con el objetivo de complementar a las terapias de primera elección de forma tal de reducir los sucesos de recurrencia de la enfermedad. Las proteínas HER2/neu, MUC1 y la proteína que une folato, FBP (del inglés, *folate binding protein*), son consideradas hoy en día como buenos AAT para cáncer de mama. Estas moléculas se sobreexpresan en el tejido tumoral, son inmunogénicas y susceptibles de ser atacadas por anticuerpos monoclonales^{161,162, 163}.

El antígeno que ha reunido más atención en este campo es el Her2/neu, una proteína derivada de un protooncogén que codifica para un receptor de factor de crecimiento con actividad de tirosina kinasa, involucrada en procesos de señalización celular. Se ha demostrado que en adenocarcinomas ductales este receptor está sobreexpresado entre un 20% y un 40%, y que el nivel de sobreexpresión está asociado positivamente con un peor pronóstico¹⁶⁴. Trastuzumab[®] (Herceptin)¹⁶⁵ es un anticuerpo monoclonal humanizado en el cual se ha demostrado actividad antitumoral contra tumores mamarios con alta expresión de Her2/neu. Este anticuerpo ha sido aprobado para el uso en pacientes con cáncer mamario y de ovario como tratamiento complementario a la quimioterapia. Se está evaluando actualmente el efecto de la combinación de Trastuzumab con agentes quimioterapéuticos¹⁶⁶ o en otras patologías¹⁶⁷.

Otras estrategias inmunoterapéuticas se han desarrollado con el fin de mejorar las expectativas de tratamiento de los pacientes con cáncer de mama^{168,169}. Theratope[®] ¹⁷⁰ es un producto vacunal a base del carbohidrato denominado STn. Este carbohidrato está asociado al antígeno MUC1 que como ya se mencionó, se sobre-expresa en carcinomas mamarios. Maclean et al. condujeron el primer ensayo clínico de una vacuna que se componía de la conjugación de STn con KLH usando DETOX como inmunoadyuvante. Este preparado vacunal ha demostrado resultados prometedores por lo que se encuentra actualmente en fase III de experimentación clínica¹⁷¹. Otro

carbohidrato que se encuentra también en evaluación como blanco molecular inmunoterapéutico para cáncer de mama es el globo-H con el cual se ha desarrollado una vacuna conjugándolo covalentemente con KLH usando QS-21 como adyuvante inmunológico. Los resultados obtenidos muestran que la vacuna es bien tolerada y que el preparado desarrolla anticuerpos específicos en los pacientes^{1,2}.

Modelos murinos utilizados en el estudio de cáncer de mama.

Con respecto a la validación y testeo de nuevas estrategias terapéuticas, los modelos murinos tienen mucho que aportar. En este aspecto se puede destacar el uso de animales atímicos^{1,3} –los cuales son buenos receptores de tumores humanos-, animales genéticamente modificados^{1,4} y modelos de animales singénicos^{1,5}. Dentro de estos últimos se pueden destacar diferentes modelos singénicos desarrollados en nuestro país como las líneas celulares denominadas F3H y M3 las cuales surgieron de trabajos realizados inicialmente en el Área Investigación del Instituto de Oncología “Ángel H Roffo”. El adenocarcinoma mamario M3 se originó espontáneamente en una hembra de la cepa BALB/c y es mantenido en crecimiento por pasajes subcutáneos entre animales. Existe una variante denominada MM3 que fue obtenida *in vivo* mediante trasplantes sucesivos en ratones singénicos de nódulos metastásicos pulmonares derivados del M3. Esta variante presenta un crecimiento local más lento, pero –a diferencia de la línea parental- la incidencia de metástasis pulmonares supera el 80%, con un alto número de nódulos pulmonares por animal.

La línea celular F3H se originó del cultivo de una subpoblación clonal aislada *in vitro* del adenocarcinoma M3. Los tumores F3H registraron una prominente invasividad local y una capacidad de generar metástasis pulmonares espontáneas cercana al 100%, mucho mayor que la línea original.

Las células F3II produjeron una importante actividad proteolítica, con una significativa proporción de esta actividad asociada a la superficie celular. Los receptores específicos de proteasas capturan enzimas solubles y focalizan la actividad degradativa en la superficie de las células tumorales, sobre el frente de invasión. Las monocapas de F3II resultaron triploides, mientras que la línea original, menos agresiva en el rango tetraploide. Este dato coincide con el hecho de que la aneuploidía se asocia con la progresión de enfermedad.

Mas allá de servir como marco experimental para investigar los aspectos críticos de la cascada metastásica, los atributos biológicos del modelo F3II lo convierten en un sistema animal adecuado para efectuar estudios de tipo preclínicos de agentes antitumorales^{176,177}.

Anticuerpos anti-idiotipo

Como se mencionó anteriormente, el reconocimiento entre los anticuerpos y sus moléculas blanco ocurre por la interacción entre una zona discreta del anticuerpo denominada idiotipo, y su contraparte antigénica denominada epítope. El idiotipo está conformado por ambas subunidades proteicas que conforman el anticuerpo (cadena pesada y liviana), aunque en porciones que se conocen como regiones variables. Este nombre se debe a que la generación del idiotipo en el organismo ocurre por mecanismos que involucran la mutación de forma azarosa en las porciones variables de los genes codificantes de las cadenas pesada y liviana. La alta tasa de mutación en estos genes asegura la existencia de un repertorio de anticuerpos suficientemente amplio de forma tal que el organismo es capaz de reconocer epítopes a los cuales nunca fue enfrentado.

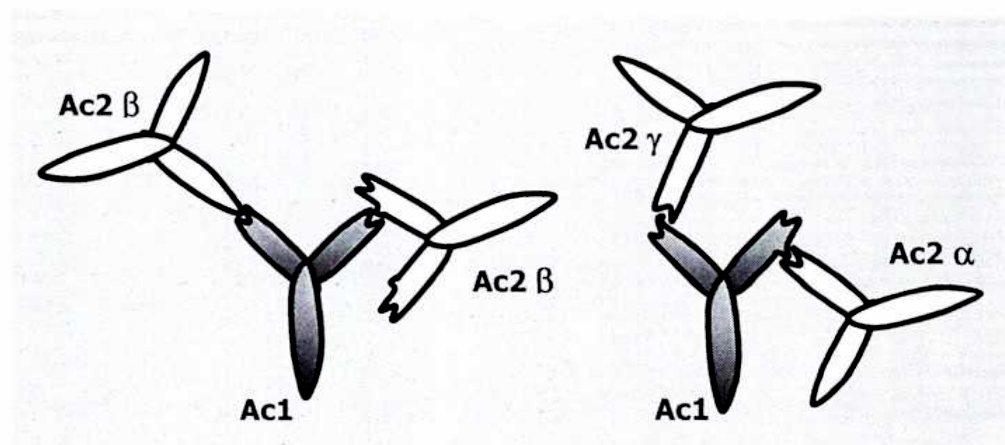
Características generales.

Los anticuerpos anti-idiotipo se describen como anticuerpos que presentan afinidad con el idiotipo de otro anticuerpo. Por ser una consecuencia de la existencia del primer anticuerpo (o Ac1) se los denomina también Ac2. La existencia de estos anticuerpos en el organismo no es consecuencia de condiciones anormales o patológicas sino que varios trabajos abonan la idea de que estos elementos son indispensables para el correcto desarrollo de la red idiotípica^{178,179} y que además cumplen funciones regulatorias en el sistema inmune^{180,181}.

El trabajo fundacional que propuso el accionar de los anticuerpos anti-idiotipo como participantes necesarios para el correcto desarrollo de la red idiotípica se debe al Dr. Jerne en el año 1974¹⁸². Esta hipótesis es aceptada en la actualidad aunque con pequeñas modificaciones¹⁸³. En términos generales la teoría de Jerne propone que en el desarrollo de la red idiotípica, esto es en los mecanismos involucrados para que el organismo cuente con una variada

población de anticuerpos con idiotipos distintos, es fundamental la existencia de una red de anticuerpos que se reconocen unos a otros con distinta afinidad. Mas aún, Jerne postula que la red de anticuerpos anti-idiotipos nace de los anticuerpos que reconocen antígenos propios del organismo, citando sus propias palabras: “... *the immune system reflects first ourselves, then produces a reflection of this reflection, and that subsequently it reflects the outside world: a ball of mirrors.*”¹⁸⁴.

Originalmente, Jerne describió dos tipos distintos de anticuerpos anti-idiotipo, los denominados tipo α y tipo β . En la variante α , el Ac2 reconoce una región periférica al idiotipo llamada paratope, mientras que los Ac2 de tipo β reconocen directamente el idiotipo ya sea a través de su propio idiotipo o de su paratope. Una posterior aclaración introducida por Gaulton y Greenc asigna la descripción de anticuerpos γ a los que reconocen el paratope del Ac1 (al igual que los α) pero que tengan la capacidad de interferir en la unión del Ac1 con el ligando¹⁸⁵.



Representación esquemática de los distintos tipos de anticuerpos anti-idiotipos posibles.
Tomado de Gaulton et al. 1986.

Trabajos realizados con el fin de estimar la cantidad de anticuerpos Ac2 que reconocen la imagen interna del Ac1, demostraron que en una respuesta anti-idiotípica sólo el 15% de los anticuerpos generados presentan esas características. La mayor parte de la respuesta está direccionada a sitios no

relacionados con la unión del Ac1 con su ligando o con Ac2 que aunque no reconocen la imagen interna, la interfieren de cierta manera¹⁸⁶.

Anticuerpo anti-idiotipo 1E10.

Los anticuerpos anti-idiotipo se generan, como ya se mencionó, por reactividad contra otro anticuerpo.

Inmunizando ratones Balb/c repetidamente con el gangliósido NgGM3 incluido en liposomas¹⁸⁷ se seleccionó un clon particular secretor de anticuerpos IgM de tipo κ denominado P3. Este anticuerpo monoclonal reconoce los residuos N-glicolil (NeuGc) por lo que presenta una marcada reactividad contra gangliósidos N-glicolilados, además reacciona también contra sulfátidos. Ha sido demostrado que P3 presenta una fuerte reactividad contra biopsias de melanoma¹⁸⁷ y mama¹⁸⁸ teniendo además un idiotipo particular que entra en la clasificación de idiotipos regulatorios ya que presenta la capacidad de activar linfocitos T y de desencadenar una respuesta contra sí mismo en distintas especies¹⁸⁹. Consecuentemente, se realizaron inmunizaciones de ratones Balb/c con el anticuerpo P3, que desarrolló una vigorosa respuesta anti-idiotípica de la cual se seleccionó un clon secretor de anticuerpos IgG1 al que se llamó 1E10¹⁹⁰.

1E10 presenta características particulares, tiene la capacidad de bloquear la unión entre el Ac1 (P3) y su antígeno (NeuGc). También puede desarrollar una respuesta anti-idiotípica (que en este caso genera anticuerpos Ac3) que como consecuencia produce anticuerpos que comparten el idiotipo de P3 aunque estos no presentan la misma especificidad antigénica que el Ac1. La suma de las características de 1E10 determina que se enmarque dentro de los anticuerpos anti-idiotipos de tipo γ ¹⁹¹.



Resultados

Caracterización del modelo en estudio

El carcinoma mamario F3II es altamente invasivo y metastásico

El carcinoma mamario F3II deriva de una subpoblación clonal altamente agresiva seleccionada *in vitro* de un adenocarcinoma mamario murino espontáneo, denominado M3, originado en una hembra de ratones endocriados de la cepa Balb/c¹⁷⁷. Tanto las células crecidas *in vitro* como *in vivo* presentan un fenotipo fusocelular o sarcomatoide (**Fig 1**), el cual no se corresponde con el fenotipo esperado de un tumor derivado de células epiteliales, lo que pone en evidencia su pobre nivel de diferenciación.

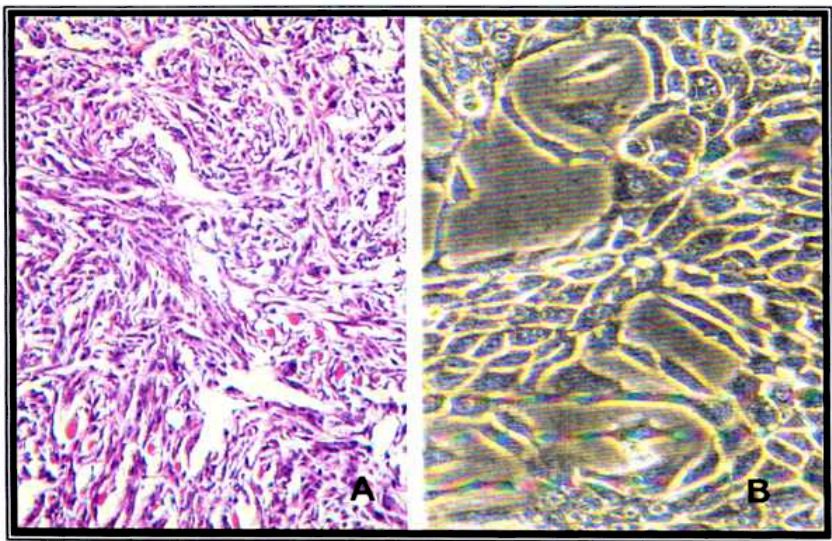


Fig 1. Microfotografías ópticas de células F3II crecidas *in vitro* (A) coloreadas con la técnica del tricrómico de Mallory para fibras colágenas, o *in vivo* (B) obtenida con un microscopio de contraste de fase. Aumento: 100X

En ensayos de seguimiento de la progresión tumoral, el carcinoma mamario F3II creció inicialmente ocupando el espacio subcutáneo, dérmico y subepitelial. La **Fig 2** muestra los datos registrados de diámetro tumoral. Hacia el día 30 luego del inóculo de células tumorales, en la mayoría de los animales se observó invasión de la epidermis y necrosis con ulceración epitelial visible en la superficie tumoral. Al día 60, la incidencia de metástasis espontáneas en pulmón alcanzó el 97% de los animales (34 de 35), con una media de 6 metástasis por

animal. La tasa de crecimiento media registrada fue de $0,37 \pm 0,02$ mm/día (media $\pm$ error estándar).



Fig. 2. Crecimiento tumoral subcutáneo de las células F3II en ratones hembras de la cepa Balb/c. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes con al menos 8 animales en cada ensayo. Los ratones fueron seguidos por palpación tres veces por semana durante el desarrollo del experimento. En todos los casos el error

En exámenes histopatológicos de las metástasis pulmonares se constató que las mismas se correspondían con nódulos de carcinoma pobremente diferenciado. Los pulmones mostraron lesiones que incluían edema y congestión vascular en el parénquima, además de una intensa infiltración del parénquima con células blancas de la sangre con predominio de neutrófilos (**Fig 3**).

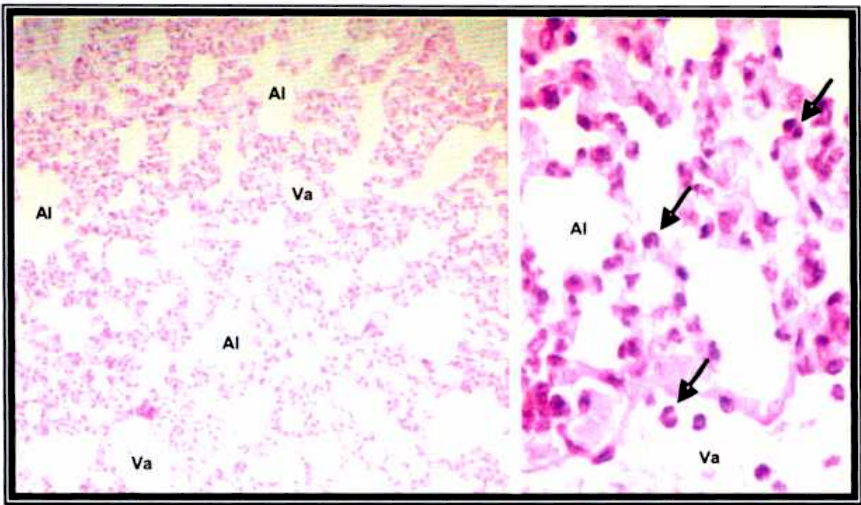


Fig 3. Microfotografías ópticas de pulmón perteneciente a ratones portadores de tumor F3II. Las flechas indican imágenes compatibles con la morfología de células polimorfonucleares de la sangre. Al: alvéolo. Va: vaso sanguíneo. Coloración H&E. Aumento: 100X (A) y 400X (B).

La portación tumoral de F3II produce mielopoyesis extramedular y aumento de la celularidad en médula ósea

En los 35 ratones portadores de tumor analizados se observó una marcada esplenomegalia, sin encontrarse en ninguno de los ratones focos de metástasis dentro del bazo. Sugestivamente, se encontró una correlación positiva entre el diámetro mayor del bazo con respecto a la portación de la masa tumoral (**fig 4**).

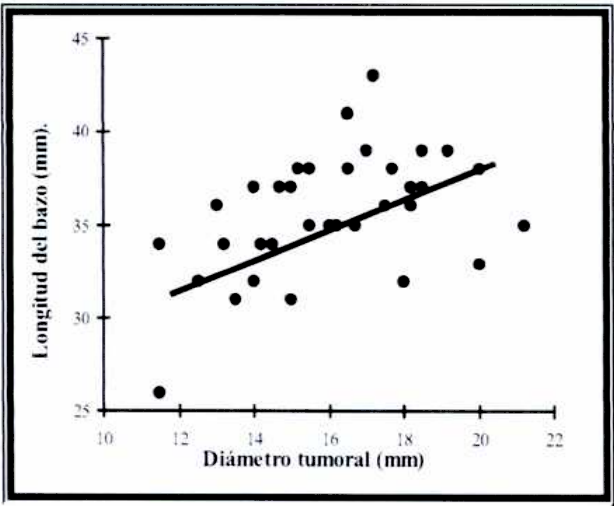


Fig. 4. Correlación entre la longitud mayor del bazo de animales portadores de tumor F3II y el diámetro tumoral. $p<0,01$. $r=0.46$.

El estudio histopatológico de los bazos reveló una intensa mielopoyesis y megacariopoyesis (**fig 5**). El hígado de ratones portadores también reveló focos de mielopoyesis en *clusters* alrededor de los capilares sinusoides (**fig 5**). Asimismo, el análisis de la médula ósea demostró un aumento de la celularidad cercana al 100%, con una relación mielo:eritroide de 10:1, marcadamente desviada de la normalidad, asociada con una importante neutrofilia periférica y un incremento en el recuento de glóbulos blancos total, parámetros que se describieron también en el crecimiento *in vivo* de la línea celular parental M3¹⁹²

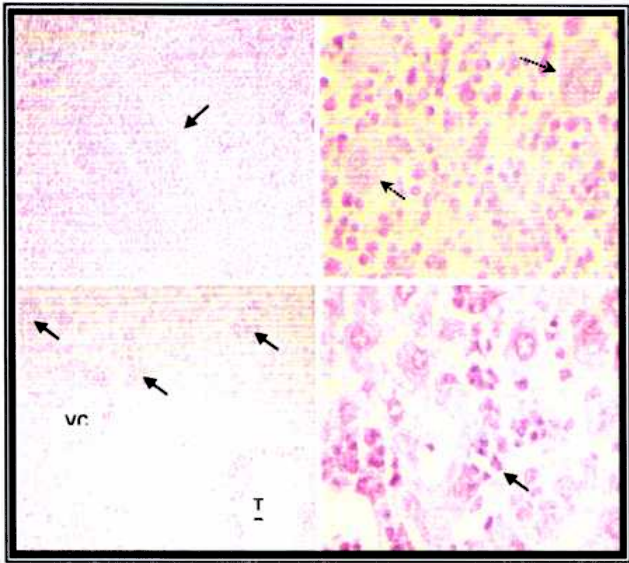


Fig 5. Microfotografías ópticas pertenecientes a ratones portadores de tumor F3II. Bazo (A y B) e hígado (C y D). Coloración H&E. Aumento: 100X. Las flechas continuas indican imágenes de nidos de mielopoyesis. Las flechas discontinuas indican megacariocitos. VCL: Vena Centro Lobulillar. TP: Tríada portal. Coloración H&E. Aumento: 100X (A y C) y 400X (B y D)

Resultados publicados previamente muestran que la línea celular M3 tiene la capacidad de estimular la proliferación en células respondedoras a este factor de crecimiento¹⁹³. En función de evaluar si el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) podría ser un factor importante en la estimulación proliferativa de esta línea celular, se realizaron experimentos de proliferación celular sobre F3II *in vitro* en presencia del GM-CSF.

La adición de GM-CSF en los medios de cultivo indujo un crecimiento dosis dependiente con un pico en la estimulación máxima en una concentración de 25 ng/ml. Este crecimiento se registró tanto en ausencia como en presencia de suero fetal bovino. Sin embargo la adición de GM-CSF a concentraciones mayores de 50 ng/ml resulta en un

efecto inhibitorio del crecimiento el cual es mas notorio cuando a las células se las crece en ausencia de suero (**Fig. 6**).

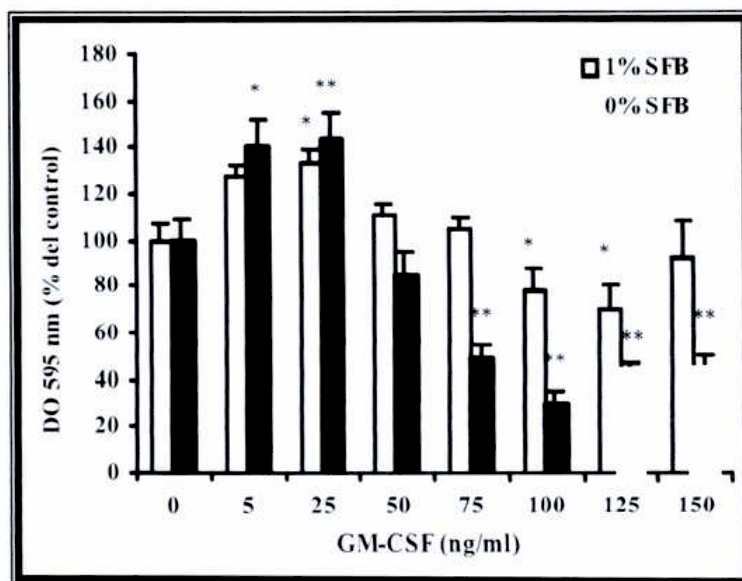


Fig. 6. Efecto de la adición de GM-CSF sobre el crecimiento *in vitro* de células F3II en presencia o ausencia de SFB. Los datos representan la media $\pm$ error Standard (n=8) y son representativos de tres experimentos independientes. *p<0,05 y **p<0,01, ANOVA (Dunnet test)

Las células F3II son reactivas al anticuerpo P3.

Para determinar la reactividad de las células F3II de carcinoma mamario hacia el anticuerpo P3 se realizaron ensayos inmunocitoquímicos sobre monocapas celulares. Como se mencionó el anticuerpo P3 es el Ac1 del cual se obtuvo el anticuerpo 1E10 (Ac2). También se valoró la actividad del 1E10 para determinar si existe un reconocimiento directo de este anticuerpo contra las células tumorales. Los mismos ensayos se realizaron también utilizando células B16 de melanoma ya que esta línea celular presenta un perfil de expresión de gangliósidos diferente al registrado en F3II. Mientras que la expresión de gangliósidos en las células F3II presenta una alta concentración de oligosialogangliósidos y gangliósidos N-glicolilados (CIM, comunicación personal), la línea celular B16 expresa mayormente gangliósidos N-acetilados monosialilados¹⁹⁴

Los resultados (**Fig 7**) muestran que el anticuerpo P3 reconoce regiones discretas de las células F3II, mientras que con el anticuerpo anti-idiotipo 1E10 la reactividad es muy escasa. Particularmente se puede reconocer un claro reforzamiento de membrana con una notoria tinción intracitoplasmática con una disposición que hace pensar que el compartimento comprometido es el sistema de endomembranas. Por otro lado, la línea celular B16 también demostró un nivel de marcación significativa con este anticuerpo (datos no mostrados).

Estos resultados confirman a la línea F3II de carcinoma mamario como un modelo apropiado para el estudio de estrategias vacunales dirigidas a gangliósidos glicolilados, como es el caso del anticuerpo anti-idiotípico 1E10.

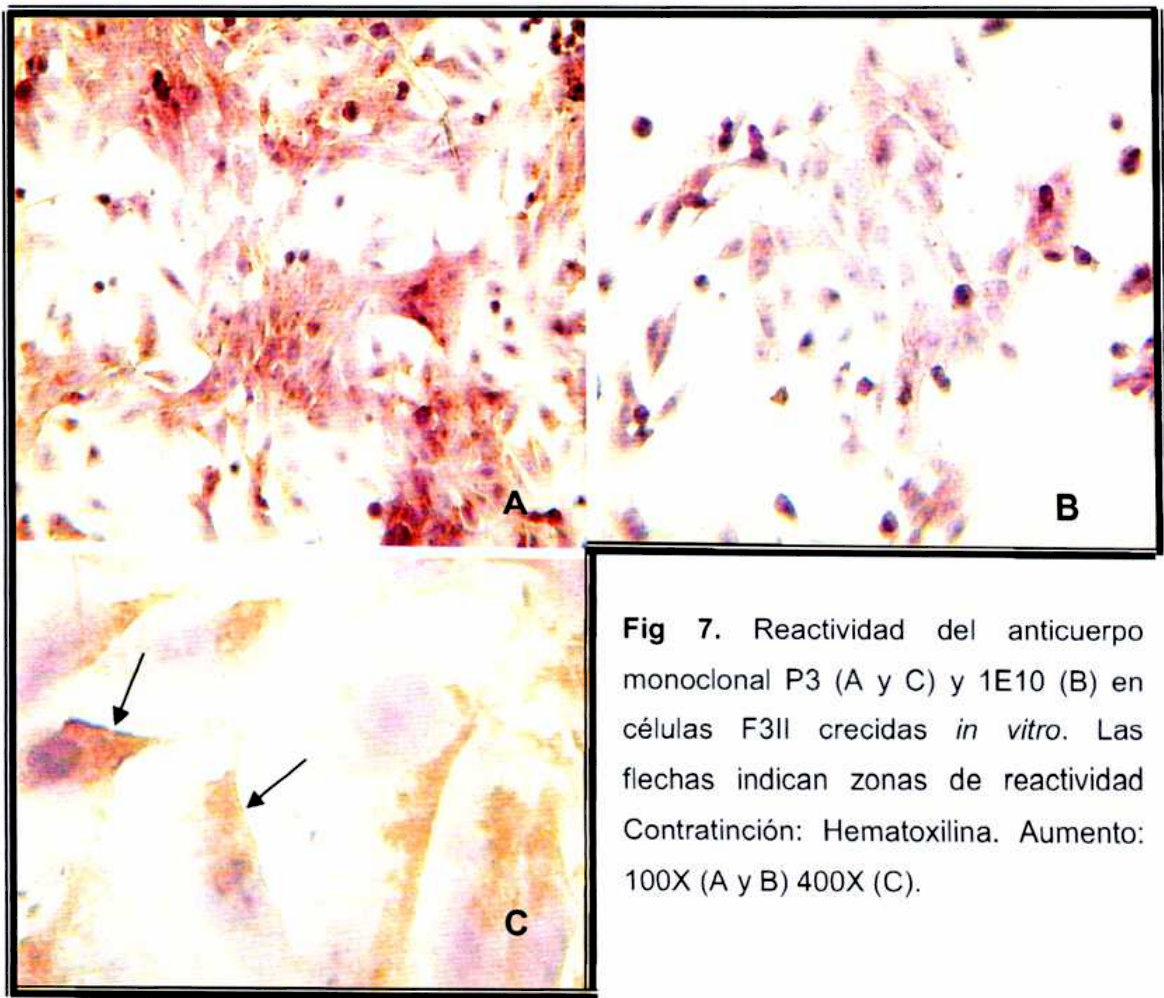


Fig 7. Reactividad del anticuerpo monoclonal P3 (A y C) y 1E10 (B) en células F3II crecidas *in vitro*. Las flechas indican zonas de reactividad Contratación: Hematoxilina. Aumento: 100X (A y B) 400X (C).

Estudio de toxicidad in vivo con el anticuerpo 1E10

La vacuna a base de 1E10 presenta bajos niveles de toxicidad en ratones Balb/c

Se utilizaron ratones Balb/c hembras para evaluar el efecto tóxico subagudo de la inyección diaria con una preparado de 1E10 en alúmina. Al ser la alúmina un potente efector inflamatorio no se utilizaron adyuvantes en este protocolo de administración.

Los ratones fueron divididos en dos lotes a los cuales se les aplicaron dosis diarias por vía s.c. de 50 µg de vacuna. Un lote recibió la vacunación durante 7 días mientras que en el segundo la administración alcanzó los 14 días.

No se observaron variaciones de comportamiento ni sociales en los animales durante el período de administración del preparado vacunal. El consumo de agua y el peso de los animales no registraron variaciones significativas (datos no mostrados). En la necropsia no se registraron signos de daño macroscópico evidente en ninguno de los órganos.

El análisis histopatológico reveló una alta homogeneidad de respuesta entre los animales ensayados, tanto hembras como machos.

No se encontraron alteraciones histológicas en el sistema nervioso central, en el riñón, en el músculo estriado o en los testículos. La médula ósea mostró signos de hiper celularidad a expensas de las tres series, mieloide, eritroide y megacariocítica. En el bazo se encontraron signos de hemorragias intraparenquimatosas y focos de megacariopoyesis ectópica. El pulmón mostró signos de congestión vascular acentuada y ocasionalmente, signos de hemorragia intraalveolar. Si bien el parénquima hepático mostró una arquitectura lobulillar conservada, se encontraron signos de degeneración balonizante en los hepatocitos y ciertas regiones del parénquima renal necrosadas. Sorprende el hecho que estos signos degenerativos se mostraron mas marcados en los lotes tratados durante 7 días en comparación con los animales sometidos a 14 días de inyección. Este resultado podría indicar que este efecto tóxico se da en respuesta

a las primeras inyecciones y que sería revertido con el transcurrir del tiempo. La piel en la zona de inyección mostró una histoarquitectura conservada con signos de vasodilatación capilar en dermis e infiltración de elementos blancos de la sangre.

El análisis de los efectos tóxicos al preparado vacunal 1E10-KLH se realizó siguiendo los protocolos utilizados para evaluar el efecto antitumoral. En distintos protocolos se utilizaron un total de 90 ratones endocriados de la cepa Balb/c los cuales fueron inyectados por vía i.p. con 4 ó 7 dosis cada 14 días con una concentración de 50 µg/ml utilizando como complemento inmunológico adyuvante de Freund completo (primera dosis) o incompleto (resto de las dosis). Los animales fueron monitoreados periódicamente sin registrarse variaciones significativas en su ingesta de alimento o agua. El peso corporal evolucionó según los parámetros normales de la especie. No se registraron durante la evolución del ensayo variaciones de relevancia en el comportamiento.

Los hallazgos autopsicos e histopatológicos de mayor jerarquía incluyen un aumento en la celularidad en la médula ósea, con desviación de la relación mielo-eritroide (8:1), esplenomegalia con focos de mielopoyesis y megacariopoyesis y una marcada infiltración en pulmón con predominio de polimorfonucleares neutrófilos. En el riñón se encontró congestión del parénquima y de los capilares glomerulares, además de vacuolización del epitelio tubular en grado leve. En el hígado se encontraron focos de mielopoyesis ectópica, con degeneración balonizante de hepatocitos.

Más allá de los hallazgos histopatológicos que deben ser considerados cuidadosamente, puede concluirse que la inmunización repetida con 1E10 genera efectos que son bien tolerados por los animales.

Efecto antitumoral de la vacuna a base de 1E10

La inmunización con 1E10 reduce la carga tumoral

Lotes de 9-10 animales se sometieron al esquema de inmunización descrito más arriba, que se presenta en la **Fig 8**. Los lotes ensayados fueron 1E10-KLH, KLH solo, 1E10 solo y PBS. Los animales fueron inyectados por vía i.p. con 50 µg de vacuna más adyuvante completo (primera dosis) o incompleto de Freund (dosis subsiguientes) con un total de 7 dosis. Al día 0 del experimento, los animales fueron inoculados s.c. con 200.000 células F3II, y la evolución tumoral se siguió hasta 50 días posteriores al desafío.

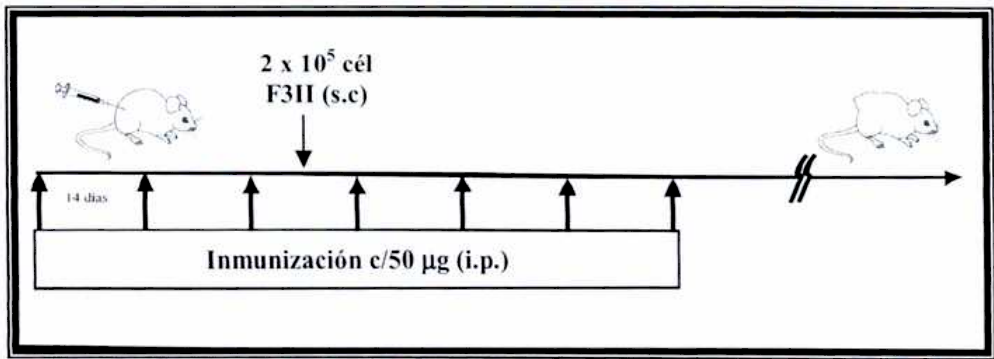


Fig. 8. Esquema ilustrativo del protocolo utilizado para evaluar el efecto antitumoral de la vacuna 1E10-KLH con adyuvante de Freund

La cinética de crecimiento tumoral fue menor en los ratones tratados con la vacuna 1E10-KLH, con respecto a los tres grupos restantes (**fig. 9**), encontrándose una diferencia significativa entre los días 25 y 35. Así, la tasa de crecimiento tumoral y el volumen tumoral final del lote de ratones tratados con 1E10-KLH fueron significativamente menores que los calculados para los otros grupos (**Tabla I**).

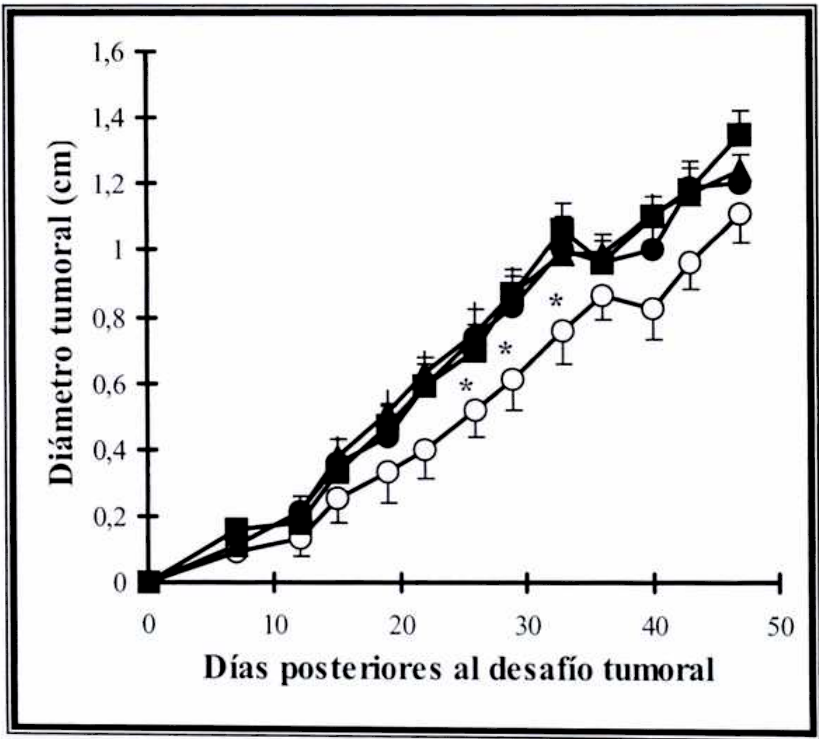


Fig. 9. Crecimiento tumoral del carcinoma F3II en ratones inmunizados con 7 dosis de 1E10-KLH (círculos vacíos), 1E10 solo (triángulos llenos), KLH (cuadrados) o vehículo (círculo lleno) y desafiados con 2×10^5 de células F3II por vía s.c. Los datos representan el diámetro $\pm$ SD

Tabla I. Tasa de crecimiento y Volumen tumoral al día de la autopsia de ratones inmunizados con 1E10-KLH con siete dosis ($50 \mu\text{g/dosis}$) y desafiados por vía s.c. con 2×10^5 células F3II.

	Tasa de crecimiento mm/día (media $\pm$ SEM)	Vol. Tumoral mm ³ (media $\pm$ SEM)
PBS	0,37 $\pm$ 0,03	2143 $\pm$ 412
1E10-KLH	0,27 $\pm$ 0,01 ^{a,b}	1620 $\pm$ 175 ^c
1E10	0,38 $\pm$ 0,04	2141 $\pm$ 270
KLH	0,38 $\pm$ 0,04	2301 $\pm$ 237

^a $p < 0,02$ versus PBS (t-test)
^b $p < 0,05$ versus KLH o 1E10 (t-test)
^c $p < 0,05$ versus PBS, KLH y 1E10 (t-test)

El tratamiento con 1E10 reduce significativamente el número de metástasis en pulmón.

A consecuencia de su gran agresividad, el tumor F3II produce espontáneamente nódulos metastásicos en pulmón, convirtiéndose así en un buen modelo para estudiar el efecto de la vacuna en la enfermedad metastásica. Como puede observarse en la **Tabla II** la mediana del recuento de metástasis en el lote tratado con 1E10-KLH es significativamente menor que el registrado en los demás lotes. Un dato particularmente llamativo es que la mediana del lote de ratones tratados solo con KLH es mayor que la de los otros lotes. Este hecho se correlaciona con una mayor invasión del tumor primario en estos animales lo cual podría sugerir que la inyección del *carrier* presenta efectos adversos *per se* que serían no tan dañinos administrados en conjunción con el anticuerpo.

Tabla II. Invasión local y recuento de metástasis en ratones inmunizados con 7 dosis de 1E10-KLH (50 µg/dosis) y desafiados con 2x10⁶ células F3II por vía s.c..

	Invasión		Metástasis
	Superficial	Planos profundos	Mediana
	% (positivos/total)	% (positivos/total)	(rango)
PBS	100% (9/9)	22% (2/9)	6,0 (2-43)
1E10-KLH	77% (7/9) ^{NS}	33% (3/9)	3,0 (1-10)*
1E10	100% (10/10)	10% (1/10)	3,5 (0-37)
KLH	100% (10/10)	60% (6/10) ^{NS}	14,0 (3-80)

NS no significativo
* p<0,05 test de Kruskal-Wallis

Respuesta inmunológica desarrollada por la vacunación con 1E10

Los sueros de ratones inmunizados reconocen células de tumor F3II

Con el fin de determinar si los sueros de los ratones inmunizados con la vacuna 1E10-KLH mostraban reactividad contra las células mamarias F3II, se realizaron ensayos inmunohistoquímicos sobre cortes de tumor.

Los resultados obtenidos muestran que los sueros de los ratones inmunizados con la vacuna 1E10-KLH presentan alta reactividad contra las células tumorales, mientras que los sueros de los ratones inmunizados con 1E10 solo o PBS, desarrollaron una muy leve reacción. Llamativamente, los sueros de los ratones inmunizados con KLH demostraron también tener una cierta reactividad frente al parénquima tumoral (**Fig 10**).

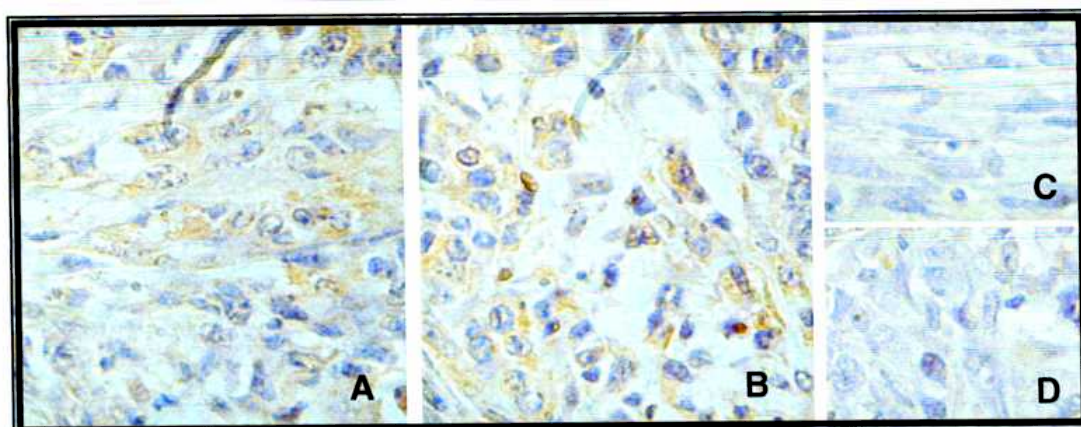


Fig 10. Inmunohistoquímica sobre cortes de tumor F3II utilizando sueros inmunizados con 7 dosis de 50 μ g/dosis de 1E10-KLH (A), KLH solo (B), 1E10 solo (C) o solo el adyuvante de Freund (D). Contratinción: Hematoxilina. Aumento: 400X.

**Actividad antitumoral de la vacuna NacGM3/VSSP en
un modelo de melanoma murino.**

Introducción

El melanoma

El melanoma es una enfermedad de tipo neoplásica que sucede a consecuencia del crecimiento indisciplinado de los melanocitos, células normales presentes en la epidermis distribuidas conspicuamente por todo el tejido tegumentario del organismo. A diferencia del resto de las células de la piel, los melanocitos derivan de células de la cresta neural. A las diez semanas de vida embrionaria células precursoras de la cresta neural migran y se alojan en la capa basal de la epidermis, dando lugar a los melanoblastos que finalmente se diferencian en melanocitos.

La función principal de estas células es la de secretar compuestos pigmentados que son los responsables de la coloración de la piel. Cada melanocito se rodea de cinco a seis queratinocitos, que son células no pigmentadas constituyentes mayoritarias del parénquima epidérmico. Morfológicamente, presentan prolongaciones citoplasmáticas que entran en estrecho contacto con los queratinocitos de la capa espinosa de la epidermis. Estas prolongaciones transportan estructuras subcelulares denominadas melanosomas cargadas de pigmentos; melanina, caroteno y hemoglobina.

No existen diferencias importantes en la densidad de melanocitos entre individuos de distintas razas siendo la causa de la diferente coloración la cantidad y distribución de los pigmentos, básicamente de melanina. Todas las células del parénquima epidérmico –no siendo los melanocitos una excepción– mantienen una alta capacidad proliferativa que permite el continuo recambio de la epidermis, además de concederle una alta capacidad auto-reparadora al tejido. Este hecho sumado a que la piel es la principal barrera del organismo contra las agresiones del ambiente, hace que no sean raros los eventos de transformación celular tanto benignos como malignos.

La pigmentación de la epidermis llevada a cabo obstinadamente por los melanocitos responde a la necesidad de proteger los estratos mas profundos del

organismo de los rayos solares, básicamente de la radiación ultravioleta (UV). La radiación UV se encuentra en el rango de luz entre 240 a 400 nm, y normalmente se subdivide en tres niveles de energía llamados UVA (400 a 320 nm), UVB (320 a 290 nm) y UVC (290 a 240 nm). La radiación UVC por su baja carga energética es absorbida por los estratos superiores de la atmósfera rica en ozono y no alcanza la superficie de la tierra. Sin embargo la vida sobre la tierra ha debido encontrar formas de protegerse del efecto dañino de las radiaciones UVB y UVA que impactan constantemente sobre el manto terrestre. Se ha demostrado que por su cercanía a la longitud de onda de absorción del ácido nucleico (260 nm), la radiación UVB produce daños directos sobre el ADN, básicamente a través de la dimerización de pirimidinas adyacentes¹⁹⁵. Estas dimerizaciones dan como resultado varios productos distintos siendo los mas mutagénicos y carcinogénicos, los residuos de ciclobutano y las uniones covalentes entre los anillos de las posiciones 6-4. Este tipo de fotocompuestos de ADN son reparados enzimáticamente por el sistema de reparación denominado reparación por escisión de nucleótidos (NER por *nucleotide excision repair*). Es interesante destacar que los individuos con *Xeroderma pigmentosum* presentan alguna falla en el complejo de reparación NER¹⁹⁶. Significativamente, estos pacientes tienen una alta incidencia de carcinomas epiteliales. Estudios experimentales con ratones deficientes del sistema NER reproducen los mismos síntomas de la patología^{197,198}.

También se ha demostrado que la capacidad de transformación de las radiaciones UVB y UVC depende también de la estructura primaria, secundaria y terciaria de la hebra de ADN. Por ejemplo Tomassi et al.¹⁹⁹ han publicado que la metilación en una secuencia específica del gen p53 aumenta la probabilidad de formación de dímeros dando como resultado mutaciones específicas ligadas a la exposición a la luz UV presentes en tumores de origen epitelial^{200,201}.

Por su parte, las radiaciones UV de alta carga energética (UVA) atraviesan la atmósfera y penetran profundamente en la piel siendo su efecto adverso mas

severo la producción de radicales libres dentro del organismo, ligados también estrechamente a la transformación celular maligna²⁰².

Etiología del melanoma.

Se han descrito tres neoplasias de origen epidérmico, el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas, ambos derivados de queratinocitos y el melanoma maligno que deriva como se dijo de los melanocitos. Actualmente se considera que la radiación solar es la causa primordial, -sino la única- de la aparición de estos tipo de tumores sólidos epidérmicos en los casos que no se refieren a cáncer familiar. Las evidencias que alimentan este razonamiento son varias. Ya en el año 1894 Unna²⁰³, describió lo que él llamó carcinoma de piel de marineros “Seemannshautcarzinom” comentando que estos crecimientos aparecían en regiones de la piel altamente expuestas a la radiación solar. Dos años después Dubreuilh²⁰⁴ publicó observaciones similares referidas a personas que trabajaban en viñedos. En la década del 30’ el Dr. Angel H. Roffo demostró que la luz del sol podía inducir carcinomas epidérmicos en ratas y que este proceso podía ser evitado a través del uso de colorantes o de vidrios incoloros, que comúnmente filtran la radiación UVB²⁰⁵. El primer trabajo que puso el acento sobre la correlación entre la exposición solar y la mortalidad a causa de melanoma fue publicado por Lancaster et al.²⁰⁶ en 1956. En este trabajo se remarca que en las regiones mas cercanas al ecuador se registra la mayor mortalidad a causa de esta enfermedad en individuos de origen caucásico. A partir de estas observaciones los resultados recogidos hasta el momento no han hecho otra cosa que confirmar la responsabilidad casi exclusiva de la radiación solar en la aparición de melanoma^{207,208,209}.

Está aceptado que la radiación ultravioleta -principalmente la UVB- es el factor etiológico principal en la transformación maligna a melanoma. Sin embargo, a diferencia de otros tumores de piel en donde la transformación esta relacionada con la acumulación de tiempo en la exposición a la radiación, el

desarrollo y la progresión del melanoma encuentra su causa en la exposición intermitente y excesiva a la radiación en combinación con un genotipo, un fenotipo y una inmunocompetencia particular^{210,211}. En la tabla se presentan los resultados del análisis estadístico de los resultados publicados hasta el momento. Se puede apreciar que el cociente de probabilidades en individuos que tienen exposición intermitente al sol, supera en mas del doble a aquellos individuos que reciben radiación solar continua por causas ocupacionales. Es interesante destacar que la incidencia aumenta aun mas cuando los eventos de exposición excesiva al sol se producen en la adolescencia.

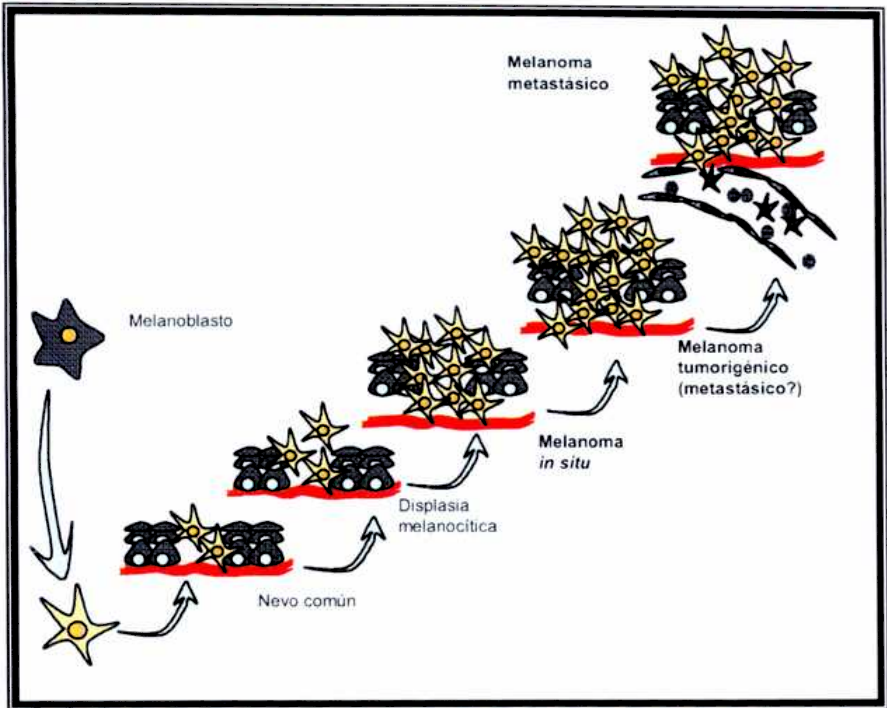
Resumen de resultados de los trabajos publicados hasta el momento en melanoma y exposición solar.

Exposición solar	OR^a
Intermitente	1.87
Ocupacional	0.76
Exposición excesiva en la adultez	1.91
Exposición excesiva en la adolescencia	1.95
Exposición excesiva en la niñez	1.62

Transformación hacia la malignidad.

Solo en pocos tipos de cáncer se ha establecido los pasos que tienen lugar en la transformación desde la célula normal hacia la maligna. El estudio histológico junto al seguimiento clínico de casos de melanoma ha permitido caracterizar los eventos que participan en el desarrollo de la enfermedad.

La transformación maligna de los melanocitos puede representarse en 5 estadios bien definidos^{212,213,214}. El primero de ellos –estadio 0– se refiere al melanocito en su estado normal con su función pigmentaria intacta en íntimo contacto con los queratinocitos. En el estadio I se encuentran los lunares clásicos, crecimientos neoplásicos benignos en donde el melanocito ha iniciado un camino de transformación perdiendo la comunicación con los queratinocitos. La proliferación celular puesta de manifiesto en los lunares es limitada y se mantiene dentro de la zona epidérmica. Los lunares displásicos se engloban dentro del estadio II de transformación. En ellos se hace evidente una atipía estructural y arquitectónica. Un marcado crecimiento radial del lunar se hace evidente en los melanomas de estadio III. En este estadio el lunar por su imposibilidad de atravesar la membrana basal no es tumorigénico ni puede dar lugar a crecimientos neoplásicos a distancia (metástasis). El estadio IV



representa el primer paso de transformación maligna en donde el lunar adquiere la capacidad de invadir los planos profundos de la piel atravesando la membrana basal, es por ello que este estadio se caracteriza por el crecimiento vertical de

Estadios de progresión del melanoma

la masa neoplásica. La habilidad de atravesar la membrana basal da lugar a desprendimientos celulares que eventualmente pueden generar metástasis. Finalmente el estadio V se refiere al melanoma metastásico que presenta ubicación en un órgano distante del tumor primario.

Alternativas terapéuticas. El melanoma es una enfermedad neoplásica que presenta características particulares para su tratamiento. Por su accesible localización la resección quirúrgica de melanoma de estadios bajos (I, II) sin tratamiento posterior ha demostrado una alta tasa de cura de la enfermedad^{215,216}. El tratamiento para melanomas de estadio III complementa la resección quirúrgica con la remoción de los ganglios locoregionales. Se discute actualmente, si el tratamiento con INF- α 2b a altas dosis es recomendable para este tipo de pacientes^{217,218} aunque se ha encontrado que en los pacientes sometidos a esta terapia aumenta el tiempo libre de enfermedad no se ha demostrado en estos trabajos un aumento en el tiempo de sobrevida^{219,85}. Además, los efectos tóxicos del INF hacen que el tratamiento sea muchas veces difícil de llevar adelante. Finalmente, en los estadio mayores de la enfermedad (IV y V) se recurre según la localización de las metástasis a la resección individual, a la quimioterapia citotóxica y a la radioterapia. Lamentablemente, la respuesta de los melanomas metastásicos a la quimioterapia es muy pobre. Las respuestas objetivas alcanzadas utilizando decarbacina o las nitrosoureas, carmustina y lomusina, no superan el 25% de respuestas positivas²²⁰ (aumentos cortos en la sobrevida que oscilan entre los tres a seis meses). Sin embargo, ocasionales respuestas de remisiones por largo tiempo pueden darse, aunque estos eventos no superan el 2%. A pesar de que se han probado varios tratamientos quimioterapéuticos combinados ninguno ha demostrado hasta el momento un efecto superior al 20%. En la tabla se muestran los resultados de las respuestas obtenidas por los agentes quimioterapéuticos mas utilizados.

Respuestas conseguidas en distintos protocolos frente al uso de quimioterapéuticos.

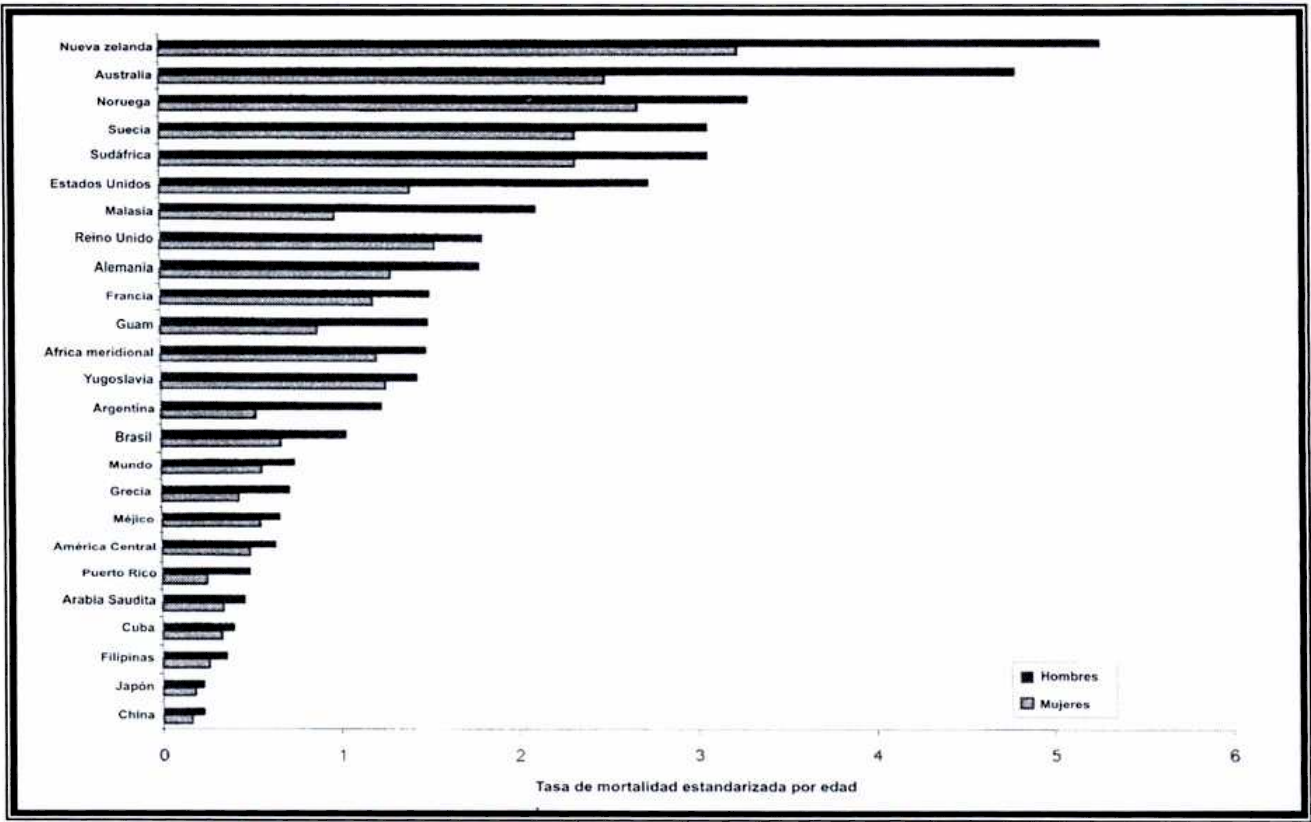
Agente	No. de pacientes	Respuesta total ^a (%)
Alquilantes		
Dacarbacina	1868	20
Dibromodulcitol	144	20
Nitrosoureas		
Carmustina	122	13
Lomustina	270	16
Scmustina	347	16
Fotemustina	226	25
Toxinas microtubulares		
Vincristina	52	12
Vinblastina	62	13
Vindesina	273	14
Taxol	71	17
Análogos de platino		
Cisplatino/carboplatino	137	15

^a Respuesta completa + respuesta parcial
Fuente: DeVita et al.

La respuesta del melanoma a la radioterapia es llamativamente pobre. Así es como por mucho tiempo se consideró al melanoma radio-resistente. Estudios posteriores determinaron que el tratamiento de melanoma metastásico con altas dosis de radioterapia puede llegar a producir respuestas parciales hasta de un 35% y totales en un 24%²²¹.

Algunos datos estadísticos. La incidencia de esta enfermedad a nivel mundial presenta sustanciales variaciones entre países. Las cifras mas elevadas pueden encontrarse en Oceanía siendo Nueva Zelanda (56,2 cada 100.000 habitantes) y Australia (28.9 c/100.000 hab) los países con mayores registros. En Estados Unidos se puede observar que la incidencia de esta enfermedad para la población blanca ha aumentado de 1 cada 100.000 en 1935 a 15 cada 100.000 en

1998, sin embargo la mortalidad no ha sufrido el mismo cambio lo que indicaría que se ha incrementado en estos últimos años la detección precoz de la enfermedad²²². Las menores tasas de incidencia se encuentran en Asia donde China, India y Singapur muestran registros menores a 1 cada 100.000 habitantes²²³. En la figura se muestra la incidencia del melanoma maligno en 25 países seleccionados mostrando la variabilidad de esta enfermedad a nivel mundial.



Incidencia de melanoma en distintos países.

Modelos murinos utilizados en el estudio del melanoma. De lo anteriormente expuesto, se deduce que el melanoma es una enfermedad que, aunque fácil de abordar en estadios mas tempranos se convierte en un difícil contendiente una vez que el tumor ha logrado diseminarse por el organismo. Las terapias convencionales, altamente eficaces en otras patologías neoplásicas no logran alcanzar los mismos resultados en esta. Es por esto que el tratamiento de nuevas estrategias terapéuticas para melanoma es un área de incesante trabajo. En este sentido, existen varios modelos animales de estudio del melanoma, principalmente de cepas murinas.

La línea celular B16 se obtuvo adaptando células de melanoma de origen murino a condiciones de crecimiento in vitro. Fidler publicó en el año 1975²²⁴ el trabajo de caracterización de esta línea celular, permitiendo a la comunidad científica contar con el modelo de experimentación en melanoma que mejor se adapta a la experimentación preclínica. Estas células son capaces de crecer en estufa de cultivo y al ser inyectadas en ratones C57 tienen la capacidad de generar nódulos tumorales. Un año después de la caracterización de la línea, a través de la selección de subpoblaciones con mayor o menor capacidad metastásica, Fidler describe las variantes tumorales B16F0 y B16F10 que presentan baja y alta capacidad de formar nódulos tumorales en pulmón respectivamente²²⁵.

Los tumores de origen neuroectodérmico se caracterizan por expresar gangliósidos en la membrana plasmática²²⁶. El nivel de expresión es tan significativo que estos antígenos se convirtieron en marcadores tumorales de este tipo de tumores²²⁷, por lo que son antígenos de elección para el desarrollo de estrategias de inmunoterapia oncológica²²⁸.

Vacuna NacGM3/VSSP

En esta sección se presentarán los resultados obtenidos en el estudio del efecto de una vacuna a base del gangliósido NacGM3, denominada NacGM3/VSSP. Parte de los resultados presentados aquí fueron considerados por la Asociación Nacional de Medicamentos y Tecnología Alimentaria (ANMAT) como prueba experimental de bioseguridad y actividad antitumoral del preparado vacunal, ente que autorizó la ejecución de un primer ensayo de fase I de la vacuna NacGM3/VSSP sobre pacientes de melanoma en estadios avanzados, libres de enfermedad (Nro. de expediente: 1-47-1572-02-6).

Esta vacuna es el producto de la conjugación de componentes bacterianos de *Neisseria meningitidis* y NacGM3. El componente bacteriano es una fracción de la membrana externa de *N. meningitidis* que naturalmente es secretada al medio en forma de vesículas (VME, vesículas de membrana externa) que contienen lípidos, polisacáridos y proteínas por las bacterias. La composición de una serie de vacunas contra la meningitis bacteriana esta compuesta por fracciones de membranas externas de esta especie bacteriana por lo que los efectos que produce sobre el sistema inmunológico de estos compuestos está suficientemente reportado. Gracias al estudio de los efectos causados sobre seres humanos vacunados con estos compuestos se conoce que las proteínas de membrana externa presentan naturalmente un fuerte efecto inmunoestimulante. Resultados publicados recientemente demuestran que la inmunización con proteínas externas de *N. meningitidis* inducen la expresión de moléculas co-estimuladoras y la proliferación en la población de linfocitos B²²⁹, además de estimular la expresión de segundos mensajeros necesarios en la producción de anticuerpos. Al combinar las VME con NacGM3, se produce una particulación en la solución resultando en que en la fracción soluble se retiene una solución de liposomas de bajo peso molecular conteniendo NacGM3 y parte de los componentes bacterianos. A estos pequeños liposomas

se los denominó VSSP refiriéndose a *very small size liposomes*, por lo que el nombre de esta vacuna resulta en NacGM3/VSSP.

Resultados

Caracterización del modelo de melanoma B16

Las células de melanoma B16 expresan NacGM3 en su membrana.

Se evaluó la expresión del gangliósido NacGM3 en las células de melanoma B16 y de carcinoma mamario F3II, mediante un ensayo de citofluorometría de flujo. Para esto se utilizó un anticuerpo monoclonal específico para este gangliósido conocido como M2590²³⁰.

Como se muestra en la **Fig 11**, el anticuerpo demostró una alta afinidad por las células B16. Esta respuesta fue notablemente inhibida cuando se sometió al anticuerpo a una preincubación con NacGM3 soluble purificado evidenciando la especificidad del reconocimiento. Estos resultados son coincidentes con publicaciones previas

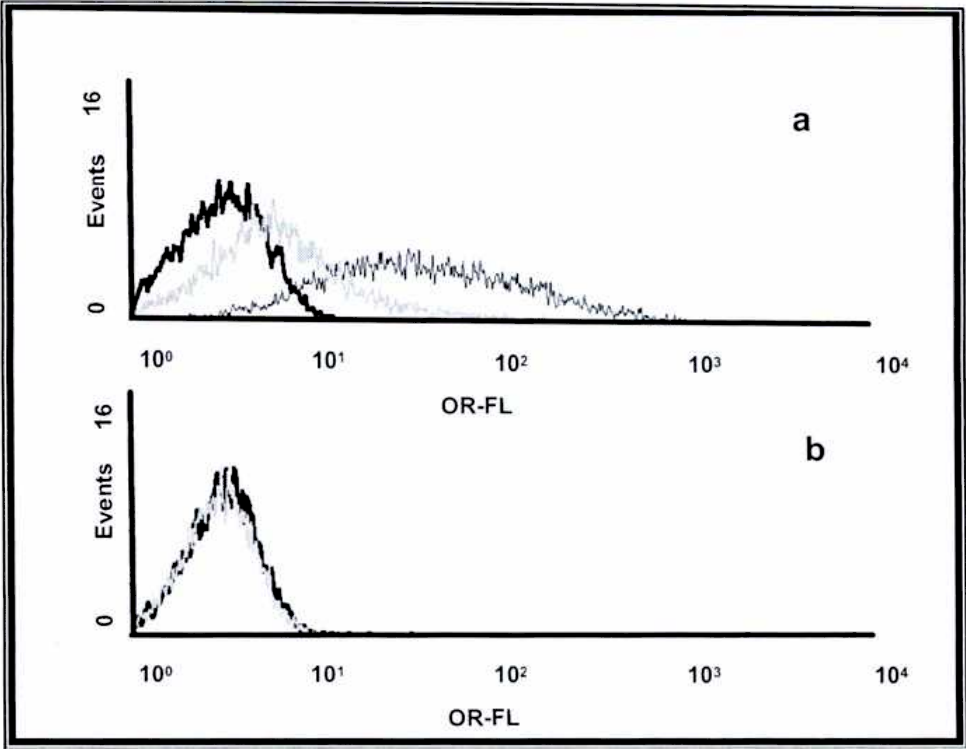


Fig 11. Citofluorometría de flujo utilizando el anticuerpo m2590 sobre células B16 (a) y F3II (b). La marcación con el anticuerpo monoclonal se representa en el histograma con la línea fina mientras que la línea gruesa representa el control de isotipo. La línea gris se refiere a la preincubación con NacGM3 soluble.

que demuestran la expresión de NacGM3 en las células B16. Por otro lado, este comportamiento no se puso en evidencia cuando las células F3II se sometieron a la incubación con el mismo anticuerpo.

Los resultados mostrados indican que el perfil de expresión de NacGM3 en membrana es totalmente distinto entre los dos tipos celulares. Mientras que las células de melanoma muestran concentraciones significativas del gangliósido NacGM3 en su membrana, las células F3II presentan una muy baja o nula presencia en membrana de este gangliósido.

El gangliósido NacGM3 modula la proliferación in vitro de B16 y F3II

Como se mencionó, la participación de ciertos gangliósidos tanto en respuestas proliferativas como anti-proliferativas ha sido reportada en varios trabajos. Para valorar el efecto de NacGM3 sobre el crecimiento de las células de melanoma B16 se realizaron ensayos de respuesta proliferativa en condiciones de adición exógena del gangliósido in vitro. Los resultados demostraron que a concentraciones mayores a 50 $\mu\text{g/ml}$ para las condiciones de cultivo estándar pero en ausencia de suero, la adición del gangliósido produjo un incremento en la proliferación celular de las células B16. En las mismas condiciones

de cultivo la línea celular F3II no mostró variaciones significativas en ninguna de las concentraciones de gangliósido ensayadas. Además, en la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ se observó un efecto inhibitorio sobre las células F3II en

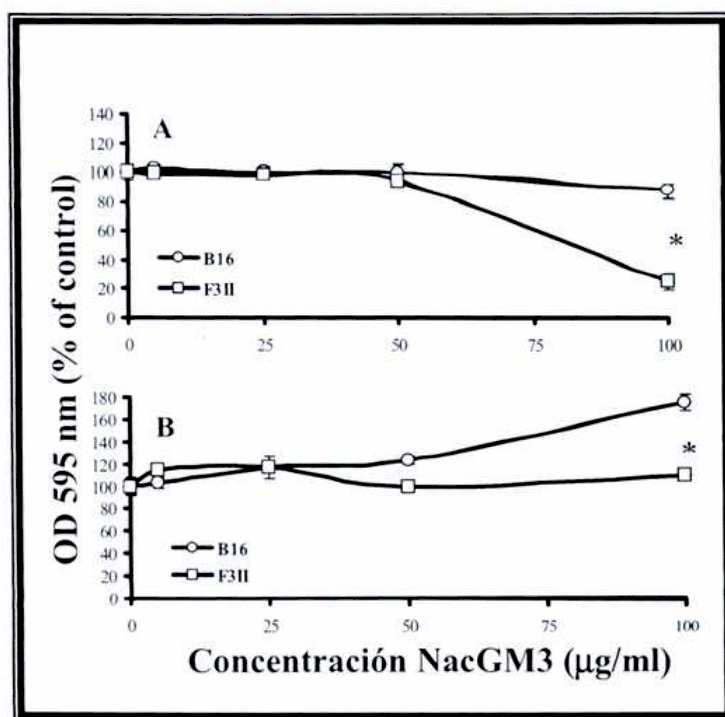


Fig 12. Variación de la proliferación *in vitro* en distintas concentraciones de NacGM3 en células F3II y B16 en ausencia (A) y presencia (B) de

presencia de suero al 5% (**Fig. 12**), algo no observado en las células B16 para las mismas condiciones. La variación observada en la respuesta proliferativa de las células ensayadas podría interpretarse como un indicador de la distinta participación que tiene el gangliósido NacGM3 en el comportamiento de las células tumorales.

Se realizaron ensayos colorimétricos tendientes a determinar si el agregado exógeno del gangliósido produce algún efecto citotóxico en las células F3II en presencia de suero, sin encontrarse variaciones significativas. Tampoco se encontraron indicios de apoptosis cuando se marcaron los extremos libres de ADN según la modalidad utilizada en el ensayo TUNEL (datos no mostrados).

La toma tumoral del melanoma B16 depende de la carga del desafío

El modelo de melanoma B16 singénico en ratones C57BL/6 fue descrito, como ya se mencionó, por Fidler et al. en 1975¹⁷⁰. Para evaluar las características tumorigénicas de la línea, ratones machos C57BL/6 fueron desafiados con distintas cantidades de células de melanoma B16F0 luego de ser inmunizados con cuatro dosis de Montanide, el adyuvante inmunológico utilizado en la vacuna NacGM3/VSSP.

Los resultados arrojados se muestran en la **Tabla III**, donde puede observarse que el 100% de toma tumoral -definiendo este término como el número de ratones positivos sobre el total- se logró inyectando 5×10^4 células B16, mientras que con el inóculo de 1×10^3 células sólo se consiguió que alrededor del 30% de los ratones desarrollasen tumor, siendo la variación en la incidencia tumoral con respecto al inóculo inyectado estadísticamente significativa ($p < 0,001$, χ^2 para tendencia). Es interesante destacar que, aunque la incidencia tumoral en los distintos lotes de ratones fue variable, la latencia tumoral –el lapso hasta que los tumores se hacen palpables en los animales positivos– se mostró bastante pareja, sin mayores diferencias empleando incluso cargas pequeñas (un promedio de alrededor de 20 días). Esta cierta estabilidad

en la latencia tumoral repercutió en la supervivencia de los animales que resultó también similar en las cargas tumorales más altas (alrededor de 50 días).

Por los resultados obtenidos se puede especular que la incidencia tumoral puede resultar en un buen parámetro indicador del efecto antitumoral de las vacunas a ensayarse.

Tabla III. Parámetros evaluados del desafío con células B16 inyectadas s.c. en ratones singénicos C57bl6, preinmunizados con cuatro dosis del adyuvante inmunológico Montanide ISA 51.

Inóculo	1.000	2.500	5.000	50.000
% Incidencia ^a (positivos/total)	29% (5/17)	38% (3/8)	77% (20/26)	100% (5/5)
Latencia tumoral (días ± DS)	28 ± 7	21 ± 2	18 ± 5	21 ± 4
Sobrevida (días ± DS)	80 ± 17	69 ± 30	50 ± 25 ^b	50 ± 8 ^c

^a p<0,001 χ^2 para tendencia
^b p<0,001 vs 1000 células test de Turkey-Kramer
^c p<0,05 vs 1000 células test de Turkey-Kramer

Estudio toxicológico de la vacuna NacGM3/VSSP en ratones C57BL/6

La inmunización con la vacuna NacGM3/VSSP es bien tolerada

El efecto tóxico de la vacuna NacGM3/VSSP utilizando el adyuvante Montanide ISA 51 fue evaluado luego de cuatro inmunizaciones cada 14 días por vía i.m. No se observaron hasta 70 días luego de la cuarta dosis, signos manifiestos de toxicidad en los ratones. Así, tanto el peso de los ratones como el consumo de agua y comida se encuadró dentro de la normalidad. El análisis histopatológico de las piezas obtenidas no evidenció signos de toxicidad manifiesta en riñón, hígado, pulmones, corazón o en el sistema nervioso central (cerebro y cerebelo). Por el contrario, estos animales mostraron congestión con una llamativa hiperplasia reactiva en bazo, parámetro que puede atribuirse al efecto inmunomodulador de los componentes de la vacuna.

No obstante los pocos indicios de efectos tóxicos del protocolo estándar de inmunización, se evaluó también la toxicidad sub-aguda del preparado vacunal. Para ello, ratones C57BL/6 machos y hembras fueron sometidos a una inyección diaria del preparado vacunal durante 15 días con una dosis de 120 µg de NacGM3 por vía i.m. Estos animales mostraron buena tolerancia al tratamiento en estas condiciones. El efecto de la administración diaria, no presentó diferencias significativas de toxicidad entre machos y hembras. Todos los ratones sometidos a este protocolo llegaron vivos al final del experimento, sin signos manifiestos de toxicidad.

El consumo de agua, la ingesta de alimentos y la evolución del peso son indicadores de la sanidad de los animales durante el transcurso del experimento. En este protocolo se pudo comprobar en los primeros tres días del experimento, una disminución en la ingesta diaria de agua que fue revertida en los días posteriores no observándose variaciones de importancia durante el desarrollo del experimento. El consumo aproximado de agua por animal fue de

alrededor de 2 ml diarios, en consonancia con la toma normal de estos animales (Fig 13).

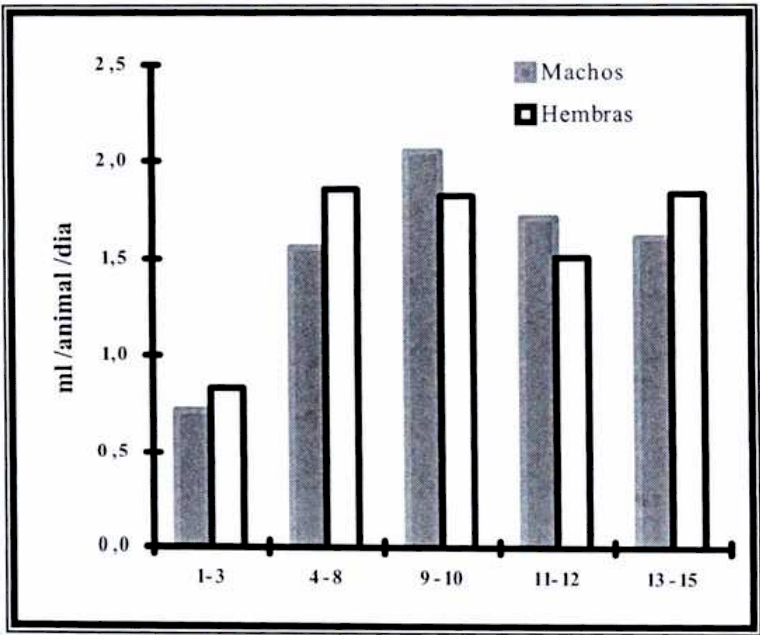


Fig 13. Consumo de agua de ratones inyectados diariamente con 120 ug de NacGM3/VSSP.

No se encontraron variaciones en la ingesta de alimento o en el comportamiento social e individual de los ratones. El peso de los ratones tampoco mostró variaciones significativas en ninguno de los lotes a lo largo del experimento siendo similar al peso observado en ratones sanos (Tabla IV).

Tabla IV. Evolución del peso de los ratones inyectados diariamente con 120 µg de NacGm3/VSSP (toxicidad subaguda).

Día	Peso (gr) (variación porcentual respecto del peso inicial)	
	Machos	Hembras
2	27.3 ± 1.7 (0)	23.4 ± 2.4 (0)
8	26.3 ± 1.4 (-3.4)	23.6 ± 1.5 (+0,7)
15	27.1 ± 1.4 (-0,4)	24.1 ± 0.8 (+3)

Los datos surgidos del análisis histopatológico de los especímenes recogidos en la autopsia realizada *a posteriori* del experimento, revelan en el sitio de inyección signos de dislaceración mecánica de los fascículos musculares aunque sin evidencias de necrosis de los planos profundos o de los planos cutáneos superficiales.

El bazo de todos los ratones demostró hiperplasia reactiva, incluyendo una marcada hemopoyesis extramedular, con numerosos megacariocitos y nidos blancos.

En el hígado se pudo constatar que no se encontraba alterada la histoarquitectura trabecular y lobulillar, con espacios porta de caracteres normales. Se constató en todos los animales una movilización leucocitaria leve a moderada con focos aislados de hemopoyesis extramedular. También se encontraron signos de vacuolización citoplasmática hepatocitaria y una discreta cantidad de pigmento férrico intracitoplasmático.

En la vasculatura pulmonar se encontró una movilización intravascular leucocitaria con predominio de polimorfonucleares. Los septos alveolares mostraron un engrosamiento debido a la infiltración leucocitaria, viéndose en algunos animales una disminución de la luz alveolar. Algunos ratones (5%)

mostraron focos aislados de hemorragia subpleural, coincidente con abundantes hemosiderófagos.

No se encontraron signos de alteración histológica en riñones, corazón o sistema nervioso central.

Efecto antitumoral de la vacuna NacGM3/VSSP sobre melanoma B16 en un modelo murino singénico.

La preinmunización disminuye la toma tumoral y aumenta la latencia y la sobrevida en ratones desafiados

Constatada la expresión del gangliósido NacGM3 en la membrana de las células B16 y corroborada la baja toxicidad del protocolo de inmunización, se llevaron adelante una serie de experimentos con la finalidad de evaluar la potencial actividad antitumoral de la vacuna.

Para evaluar el efecto antitumoral, grupos de al menos 5 ratones fueron vacunados en cuatro oportunidades cada 14 días, previo al desafío con las células de melanoma (**Fig 14**). En los ratones control que recibieron solamente el adyuvante emulsionado en PBS, la incidencia tumoral fue del 100% y del 87% para los lotes inoculados con 5×10^4 y 5×10^5 células, respectivamente. La latencia tumoral en estos lotes control fue similar (21 ± 2 y 19 ± 4 , días respectivamente; media $\pm$ SEM). En animales control inoculados con 1×10^3 células, sin embargo, la incidencia tumoral fue del 20% y la latencia tumoral fue algo mayor (30 ± 9 días).

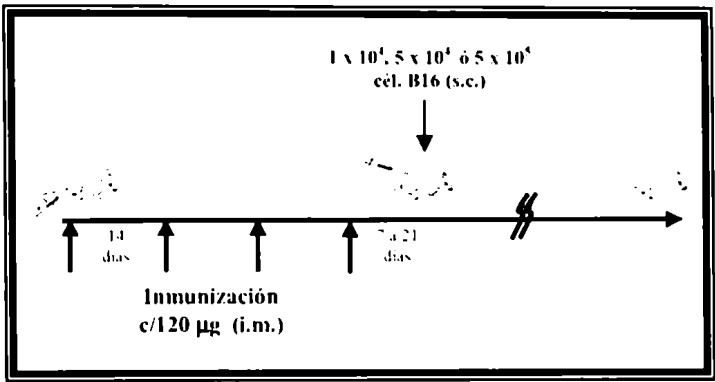


Fig. 14. Esquema del protocolo utilizado para evaluar el efecto antitumoral del preparado vacunal NacGM3/VSSP a 120 ug / dosis.

Como se muestra en la **Tabla V**, la vacunación con NacGM3/VSSP inhibió completamente la formación tumoral en los animales desafiados con 5×10^3 ó 10^3 células de melanoma B16. Los animales inmunizados demostraron una mayor sobrevida con respecto a los animales control en estos grupos (**Fig 15**), siendo sacrificados entre los días 60 y 90 luego del desafío tumoral sin evidencias de tumor.

Tabla V. Efecto de la vacunación con 4 dosis de 120 µg de NacGM3-VSSP cada 14 días sobre la formación tumoral utilizando células de melanoma B16 de pasajes *in vitro*.

Desafío tumoral	Tratamiento	Incidencia tumoral ^a	
		Día 30	Día 60
5×10^4 células	Control PBS	5/5 (100%)	5/5 (100%)
	NacGM3-VSSP	3/5 (60%)	4/5 (80%)
5×10^3 células	Control PBS	7/8 (87%)	7/8 (87%)
	NacGM3-VSSP	0/13 (0%)*	0/13 (0%)*
10^3 células	Control PBS	1/10 (10%)	2/10 (20%)
	NacGM3-VSSP	0/10 (0%)	0/10 (0%)

^aLa incidencia tumoral se expresa como ratones positivos/total de animales a los días indicados después del desafío tumoral.
*p<0.001, Test exacto de Fisher.

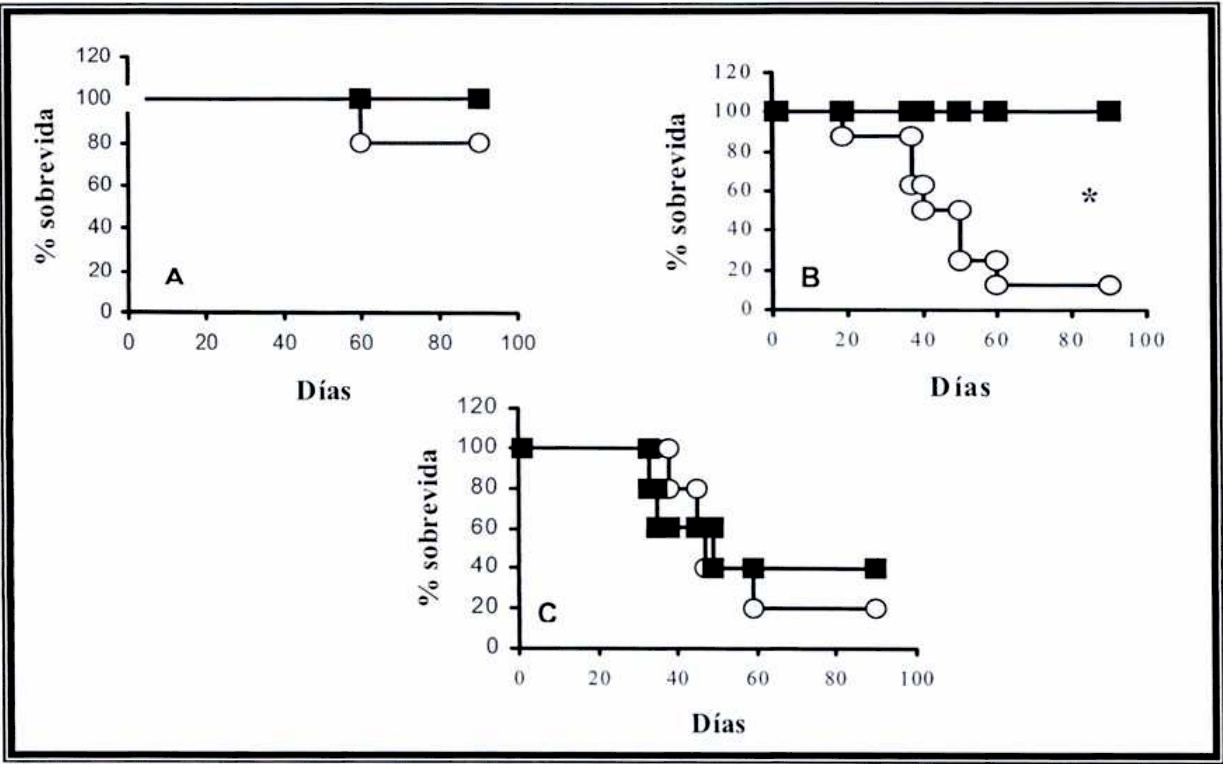


Fig. 15. Sobrevida de los ratones inmunizados con 120 µg de NacGM3/VSSP (círculos vacíos) o sólo con PBS y adyuvante (cuadrados llenos). Los ratones fueron desafiados con 1000 (A), 5000 (B) ó 50.000 (C) células de melanoma B16 po vía s.c. * p<0,01, log-rank test.

Aunque la inmunización no fue eficaz en detener la formación tumoral en ratones desafiados con la carga tumoral más elevada de 5×10^4 células (**Tabla V**), los animales vacunados demostraron una reducción significativa en los volúmenes tumorales en los estadios tempranos del desarrollo de la enfermedad (**Fig 16**). A pesar de esta diferencia, la carga tumoral mostró una tendencia a equipararse entre los grupos hacia el final de los experimentos.

Complementariamente, se realizaron ensayos para evaluar el efecto antitumoral de la vacunación utilizando células B16 provenientes de cultivos primarios de tumor B16.

En estos ensayos se pudo observar un rechazo en el 100% de los animales a la formación tumoral en ratones machos y hembras descriptos en la **Tabla VI**.

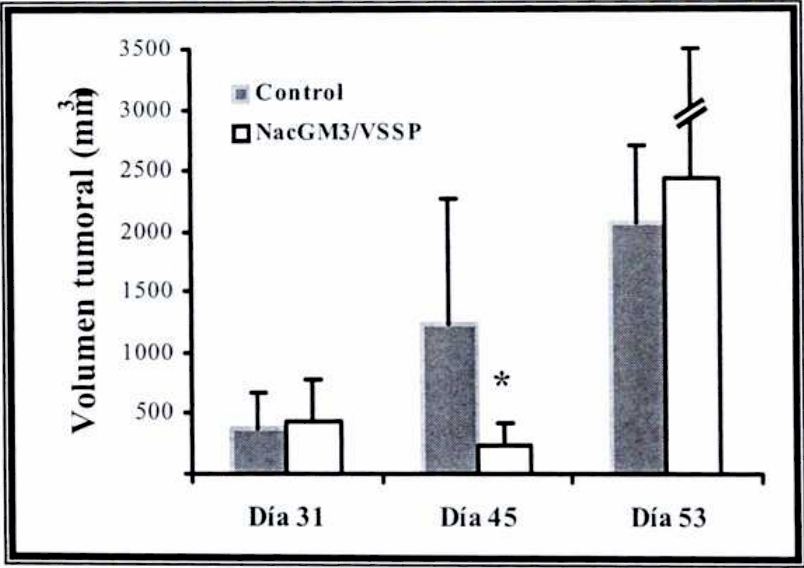


Fig 16. Volumen tumoral promedio en ratones desafiados con 5×10^4 cél de melanoma murino B16 y preinmunizados con 4 dosis de NacGM3/VSSP (120 μ g/dosis) o con PBS mas adyuvante. * $p < 0,05$, test de Student.

Tabla VI. Efecto de la vacunación con 4 dosis de 120 μ g de NacGM3-VSSP sobre la formación tumoral utilizando células de melanoma B16 obtenidas de cultivo primario de tumor.

Desafío tumoral	Incidencia tumoral ^a		
	Tratamiento	Día 30	Día 60
5 x 10 ³ células	Control PBS	4/5 (80%)	4/5 (80%)
	NacGM3-VSSP	0/5 (0%)*	0/5 (0%)*
10 ³ células	Control PBS	2/8 (25%)	3/8 (37%)
	NacGM3-VSSP	0/8 (0%)	0/8 (0%)

^aLa incidencia tumoral se expresa como ratones positivos/total de animales a los días indicados después del desafío tumoral.

* $p < 0.001$, Test exacto de Fisher.

Varios tumores subcutáneos de cada grupo fueron examinados por técnicas histopatológicas y todos los tumores fueron diagnosticados como melanoma maligno epitelioides altamente agresivo.

La actividad antitumoral de la vacuna NacGM3/VSSP muestra un perfil dosis dependiente

Se evaluó el efecto antitumoral de la vacuna NacGM3/VSSP inmunizando los ratones con diferentes dosis del preparado vacunal. Para ello lotes de ratones machos fueron inmunizados con 120, 240 ó 360 µg de la vacuna siguiendo el protocolo convencional de inmunización, consistente en cuatro dosis cada catorce días por vía i.m. El desafío tumoral se realizó con una carga de 1 x 10⁴ células B16, algo mayor a aquella que demostró la completa protección conferida por la vacunación para poner en evidencia el posible efecto antitumoral a mayores dosis.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla VII**, donde se observa que la actividad antitumoral mejora con el aumento de la dosis.

Tabla VII. Efecto antitumoral en ratones inmunizados con 4 dosis cada 14 días con la vacuna NacGM3/VSSP a distinto nivel de dosis.

Tratamiento	Incidencia tumoral ^a (Día 60 post-desafío)
Control	12/13 (92%)
NacGM3/VSSP 120 µg	3/10 (30%)
NacGM3/VSSP 240 µg	1/5 (20%)
NacGM3/VSSP 360 µg	1/9 (11%)

^a La incidencia se expresa como animales positivos/total.
* p<0.001, χ^2 para tendencia respecto al incremento de dosis

Consecuentemente, en la **Fig. 17** puede observarse la curva de supervivencia obtenida de los distintos lotes evaluados. Estos resultados demuestran que es posible incrementar el efecto antitumoral inyectando mayores dosis del preparado vacunal.

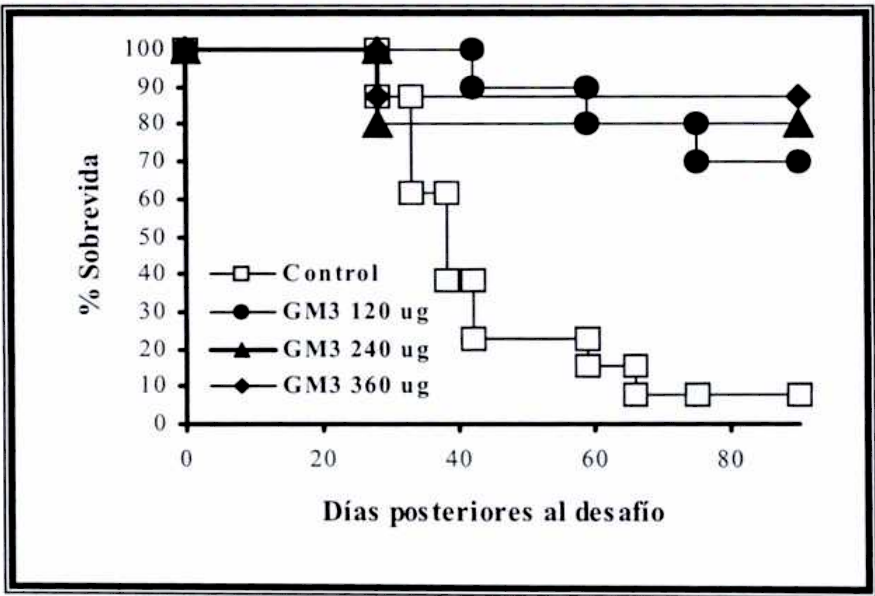


Fig. 17. Sobrevida de los ratones inmunizados con 4 dosis cada 14 días con la vacuna NacGM3/VSSP a distinto nivel de dosis

La actividad antitumoral varía según el número de inmunizaciones

Con el fin de determinar si el aumento en el número de inmunizaciones con la dosis estándar de 120 µg desencadena algún tipo de tolerancia antigénica que redunde en una pérdida de la capacidad antitumoral de la vacuna, lotes de ratones machos fueron inmunizados con distinto número de dosis, según se esquematiza en la **Fig 18**.

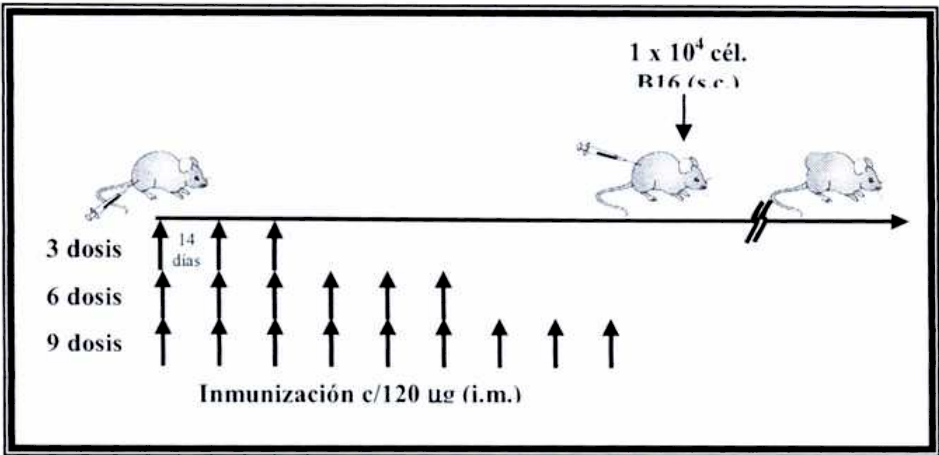


Fig. 18. Esquema ilustrativo del protocolo utilizado para evaluar el efecto antitumoral en la variación del número de dosis.

Los resultados demostraron que, alcanzando nueve inmunizaciones no se desencadena ningún proceso de tolerancia inmunológica, manifestado como una pérdida de la actividad antitumoral. Se constató una razonablemente buena protección para la carga empleada de 10^4 células B16 con el uso de un mayor número de dosis, siendo protegidos más de la mitad de los animales (aplicando 9 dosis desarrollaron tumor 3 de 7 ratones). Por el contrario, preinmunizando con 3 dosis, se puso de manifiesto una pobre actividad antitumoral con valores similares a los obtenidos en los ratones control. En este caso cerca del 80% de los animales desarrollaron tumor (13 de 18).

Estos resultados indican que las reinmunizaciones repetidas en las condiciones exploradas no desencadenan tolerancia antigénica, proceso relativamente común en muchas inmunizaciones, que anule el efecto antitumoral de la vacuna contra las células de melanoma. Además, los resultados indican que sería necesario un mínimo de 4 dosis para lograr una protección antitumoral adecuada.

Los ratones inmunizados mantienen una "memoria antitumoral" hasta los 3 meses

En ensayos anteriores se ha demostrado que la inmunización con la vacuna genera protección frente al desafío tumoral contra las células de melanoma B16 cuando estas son inyectadas entre 7 y 21 días luego de la cuarta dosis.

La memoria antitumoral desarrollada por la inmunización con cuatro dosis de 120 ug de la vacuna fue evaluada para determinar el tiempo máximo en el cual se mantiene el rechazo tumoral. Con este fin 4 lotes de ratones machos fueron inmunizados según el protocolo ya mencionado y desafiados posteriormente a distintos tiempos a saber: 21, 35, 49 días posteriores a la cuarta inmunización- en el espacio subcutáneo del flanco derecho (primer desafío) con $2,5 \times 10^5$ células. Con el fin de evaluar la memoria inmunológica a tiempos mayores, 70 días después del primer desafío se realizó un segundo inóculo

tumoral inyectando $2,5 \times 10^3$ células B16 en el flanco izquierdo de los animales que habían rechazado el primer desafío (segundo desafío). De esta forma se generaron nuevos grupos de días 91, 105 y 119 (**Fig 19**).

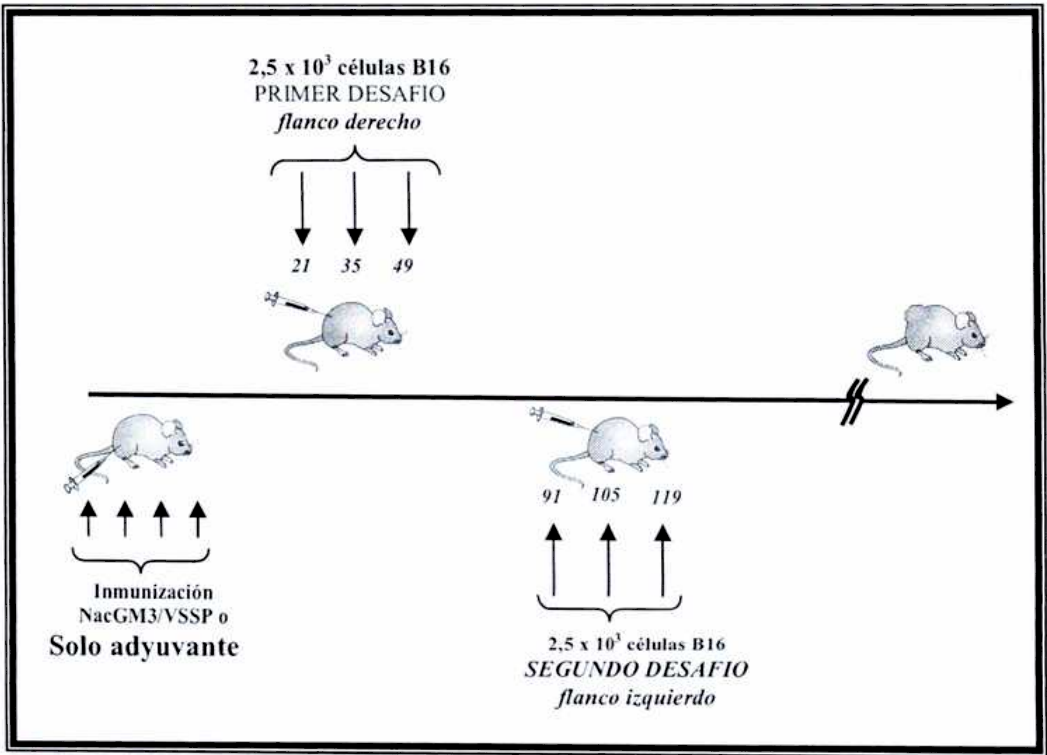


Figura 19. Esquema de inmunización y desafíos utilizado para evaluar la memoria antitumoral generada por la vacunación con NacGM3/VSSP.

En la **Tabla VIII** y en la **Fig 20** se muestran los resultados obtenidos de estos experimentos. Se pone de manifiesto que la vacunación en dosis de $120 \mu\text{g}$ de NacGM3/VSSP cada 14 días en este modelo experimental desarrolla una memoria antitumoral con habilidad de rechazar al menos al 50% de los animales, que supera los tres meses. Estos datos indicarían que la re-inmunización cada tres meses podría mantener el nivel de protección tumoral.

Tabla VIII. Latencia e incidencia de los ratones inmunizados con 4 dosis cada 14 días con 120 µg de NacGM3/VSSP a distintos tiempos luego de la cuarta inmunización.

Tratamiento (Día de desafío post- inmunización)	Desafío (flanco)	Número de animales	Latencia (Días ± SD)
Control	Der	8	21 ± 2
NacGM3/VSSP (21)	Der	6	> 60
NacGM3/VSSP (35)	Der	7	> 60
NacGM3/VSSP (49)	Der	8	24 ± 0
NacGM3/VSSP (91)	Izq	6	12 ± 0
NacGM3/VSSP (105)	Izq	7	20 ± 7
NacGM3/VSSP (119)	Izq	7	20 ± 8

En la **Fig 20** se representa el porcentaje de protección alcanzado por cada lote, siendo este el porcentaje de animales que no alcanzan a desarrollar la enfermedad en el transcurso del experimento.

En consonancia con estos resultados se inmunizaron ratones con tres dosis cada catorce días, a los cuales se les inyectó una cuarta inmunización a los 84 días posteriores a la ultima inmunización. Aunque el ensayo se realizó con pocos animales, ninguno de estos ratones desarrolló tumor, mientras que el 30% del lote que recibió solo tres dosis progresó en la enfermedad. (datos no mostrados)

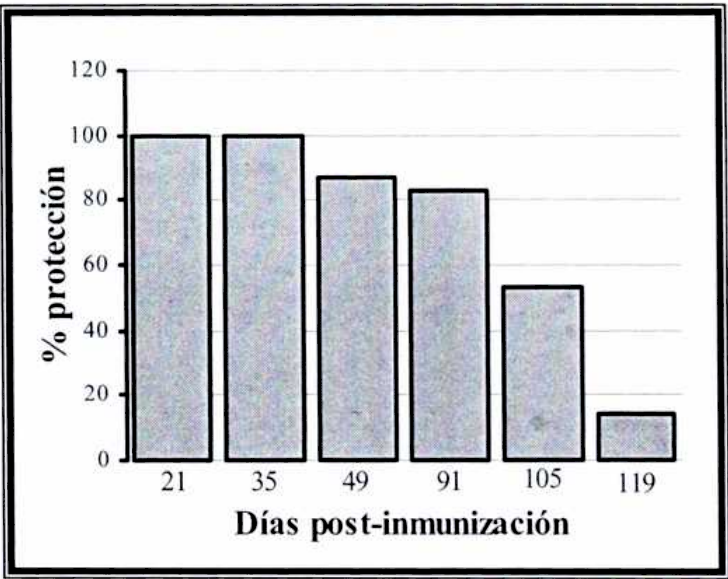


Fig 20. % de protección en ratones desafiados con $2,5 \times 10^3$ cél B16 a distintos tiempos luego de la inmunización con 4 dosis de NacGM3/VSSP (120 µg/dosis). El 60% de los animales control no desarrollaron tumor.

El rechazo tumoral en los ratones inmunizados esta relacionado con la expresión de NacGM3 en membrana.

Finalmente, para determinar si la actividad antitumoral de la vacuna esta relacionada a la presencia de NacGM3 en la membrana celular, ratones C57BL/6 o BALB/c fueron inmunizados con cuatro dosis del preparado vacunal cada 14 días y desafiados con células de melanoma B16 (positivas para NacGM3) o F3II (negativas para NacGM3) respectivamente, dato que se demostró anteriormente. En ambos casos los animales recibieron el desafío tumoral mínimo que asegure el 100% de incidencia (1×10^4 células de melanoma B16 ó 2×10^5 células de carcinoma mamario F3II), según datos de inoculación obtenidos en experimentos preliminares.

Tabla antitumoral IX. Efecto antitumoral con 4 dosis con NacGM3/VSSP (120 µg) sobre la formación de tumor frente al desafío con las líneas celulares F3II y B16^a

Línea tumoral	Tratamiento	Incidencia tumoral ^a	
		Día 10	Día 30
Melanoma B16	Control	0/6 (0)	6/6 (100)
	NacGM3/VSSP	0/10 (0)	3/10 (30) ^b
Carcinoma mamario F3II	Control	10/10 (100)	10/10 (100)
	NacGM3/VSSP	9/10 (90)	9/10 (90)

^aLa incidencia tumoral se expresa como ratones positivos/total a los días indicados posteriores al desafío tumoral. El número entre paréntesis se refiere al porcentaje.
^bP <0.01 versus control, Test exacto de Fisher.

Como se muestra en la tabla antitumoral F3II/B16, la preinmunización con NacGM3/VSSP inhibió significativamente la formación tumoral en ratones C57BL/6 desafiados con las células de melanoma B16. Estos ratones demostraron una mayor sobrevida que sus pares del lote control (**Fig 21 A**), varios animales fueron sacrificados 90 días luego del desafío tumoral sin rastros de desarrollo de la enfermedad. Por el contrario, la vacunación fue inefectiva en los ratones BALB/c para prevenir el desarrollo tumoral de las células F3II (**Tabla X, y Fig 21 B**). Resultados similares fueron obtenidos cuando se inocularon cantidades menores de células, aunque en estos casos la incidencia tumoral en los lotes control fue menor al 50% (datos no mostrados).

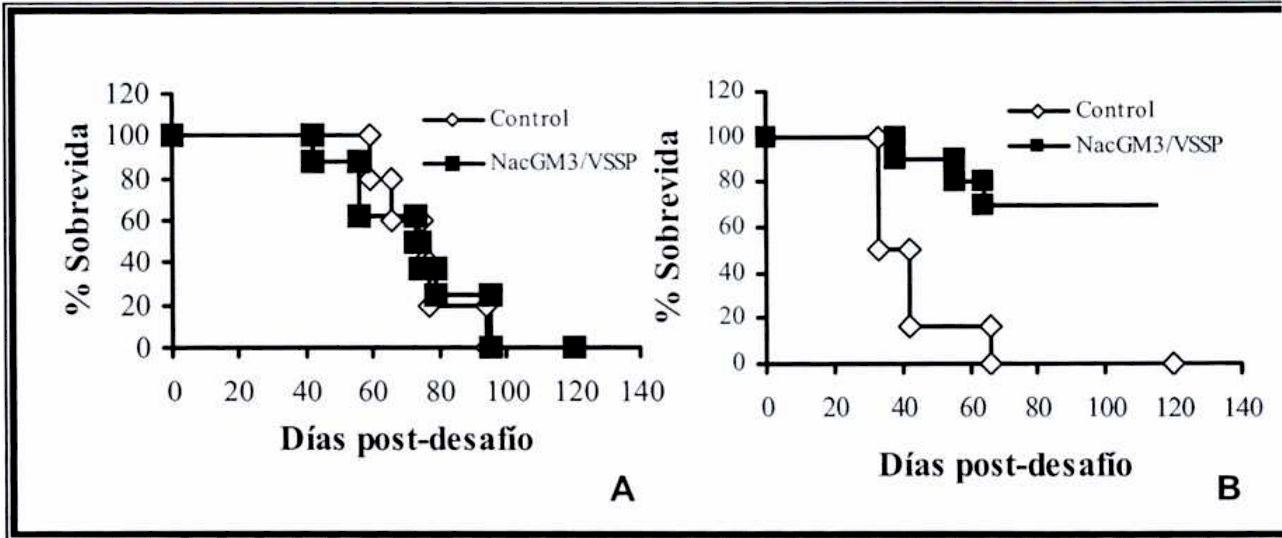


Fig 21. Sobrevida de los ratones desafiados con 1×10^4 cél B16 (a) o 2×10^5 cél. F3II (b), los círculos llenos representan al lote control, mientras que los círculos vacíos al tratado con 4 dosis de 120ua/dosis de NacGM3/VSSP cada 15 días.

Respuesta inmunológica desarrollada luego de la vacunación con NacGM3/VSSP

Los sueros inmunes presentan anticuerpos específicos contra los componentes de la vacuna

Para determinar si la inmunización con el preparado vacunal produce una respuesta inmune humoral contra algún componente de la vacuna, se inmunizaron ratones según el esquema estándar que muestra la **Fig. 22**.

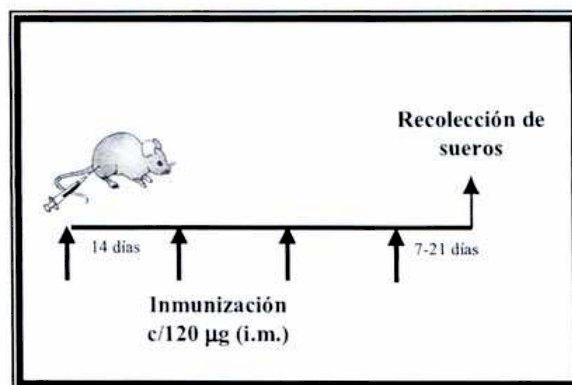


Fig.22. Esquema que representa el protocolo de inmunización utilizado para evaluar la respuesta humoral generada por el preparado vacunal.

Con los sueros obtenidos de estos ratones se realizaron ensayos de ELISA en placas de microtitulación cuyas fosas fueron sensibilizadas con el preparado vacunal (NacGM3/VSSP), el carrier bacteriano (VSSP), el carrier conjugado con un gangliósido modificado, en donde el residuo de ácido neuramínico en lugar de ser acetilado es glicolilado (NgGM3/VSSP), o seroalbúmina bovina (BSA).

Se hicieron reaccionar las placas sensibilizadas con diluciones de sueros de ratones inmunizados con la vacuna, sueros de ratones inmunizados con el adyuvante y sueros de ratones normales. El pool de sueros de ratones inmunizados con el NacGM3/VSSP mas adyuvante reaccionó fuertemente contra el propio preparado vacunal mientras que estos mismos sueros mostraron una pobre reactividad frente al preparado NgGM3/VSSP, al carrier solo o a la placa sensibilizada con BSA (**Fig. 23**). Por otro lado, los sueros de los ratones tratados con adyuvante y los sueros normales no mostraron reactividad en ninguna de las condiciones ensayadas.

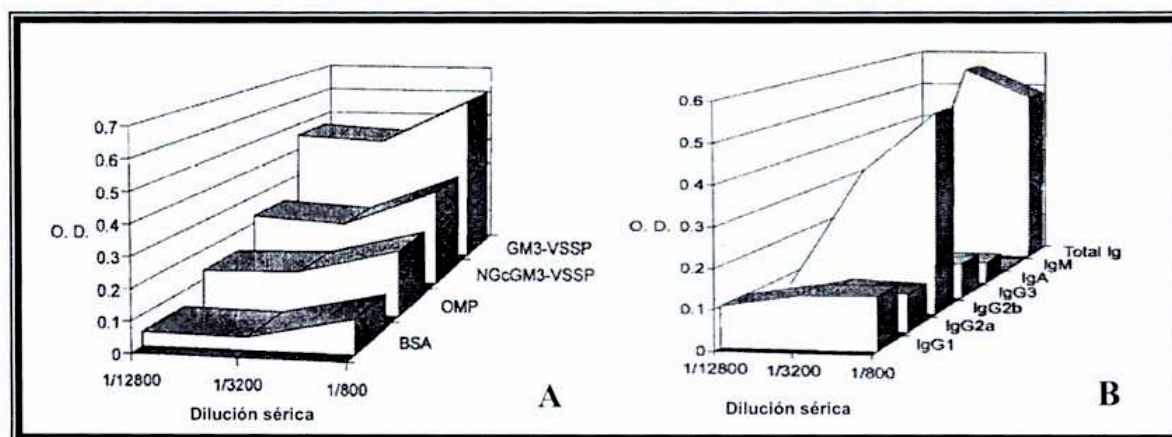


Fig 23. Caracterización del perfil de inmunoglobulinas presentes en el suero de ratones inmunizados. A, Cuantificación de la reactividad contra distintos antígenos (Ig totales). B, Determinación del perfil de isotipo presente en los sueros.

Además, con el fin de caracterizar el perfil de inmunoglobulinas reactivas se determinaron los isotipos mayoritarios de los anticuerpos reactivos al preparado vacunal. En la **Fig 23**, los resultados muestran que hay una clara preponderancia de anticuerpos de la subclase IgG2b.

La unión específica de los anticuerpos séricos a NacGM3 purificado también fue evaluada utilizando la técnica de ELISA. Fosas no sensibilizadas fueron usadas como control de la unión de anticuerpos no específica. Todos los sueros obtenidos de ratones inmunizados con la proteína carrier mas Montanide o el adyuvante solo, así como de ratones normales, mostraron títulos no detectables de anticuerpos específicos contra NacGM3 (títulos de IgM e IgG <80). El análisis de las muestras séricas obtenidas de ratones inmunizados con la vacuna demostraron un bajo título de anticuerpos IgM específicos para NacGM3 en 4 de 8 ratones. En cuanto a la presencia de anticuerpos de tipo IgG se alcanzaron títulos moderados de anticuerpos específicos contra NacGM3, llegando a títulos de 1280 (**Tabla XI**). Sin embargo no se manifestó una significativa correlación entre los títulos de IgM e IgG. En 5 de 8 ratones C57BL/6 (62.5%), se pudo observar la presencia de al menos una clase de anticuerpo específico contra el antígeno nominal, es decir el gangliósido NacGM3 purificado.

Tabla XI. Título de IgM e IgG alcanzado por la inmunización de ratones C57bl6/j con 4 dosis de NacGM3/VSSP (120 µg).

Cepa	n	Título (n)	
		IgM	IgG
C57BL/6	8	<80 (4); 80 (3); 320 (1).	<80 (4); 80 (1); 160 (2); 1280 (1).
BALB/c	5	<80 (3); 80 (1); 640 (1).	<80 (2); 80 (2); 1280 (1).

Los sueros de los ratones inmunizados con la vacuna demuestran una alta y específica reactividad contra células de melanoma B16

Con el fin de valorar si el protocolo de inmunización logró inducir una respuesta humoral que reconozca a las células B16, se realizaron ensayos inmunohistoquímicos con sueros de ratones inmunizados sobre cortes de tumores B16 crecidos en ratones vírgenes de tratamiento revelados con anticuerpos anti-IgG de ratón.

Como puede verse en la **Fig. 24** el suero proveniente de ratones inmunizados con NacGM3-VSSP mas Montanide ISA 51, según el protocolo esquematizado en la **Fig. 14**, mostró una marcada reactividad contra el estroma tumoral (**Fig. 24 A y C**) a diferencia del resultado obtenido con los sueros de los ratones inyectados sólo con el adyuvante (**Fig. 24 B y D**) los cuales no desarrollaron una coloración significativa. El mismo resultado fue obtenido cuando se utilizaron sueros normales provenientes de ratones sin tratamiento, o cuando el ensayo se realizó en ausencia del anticuerpo primario (datos no mostrados).

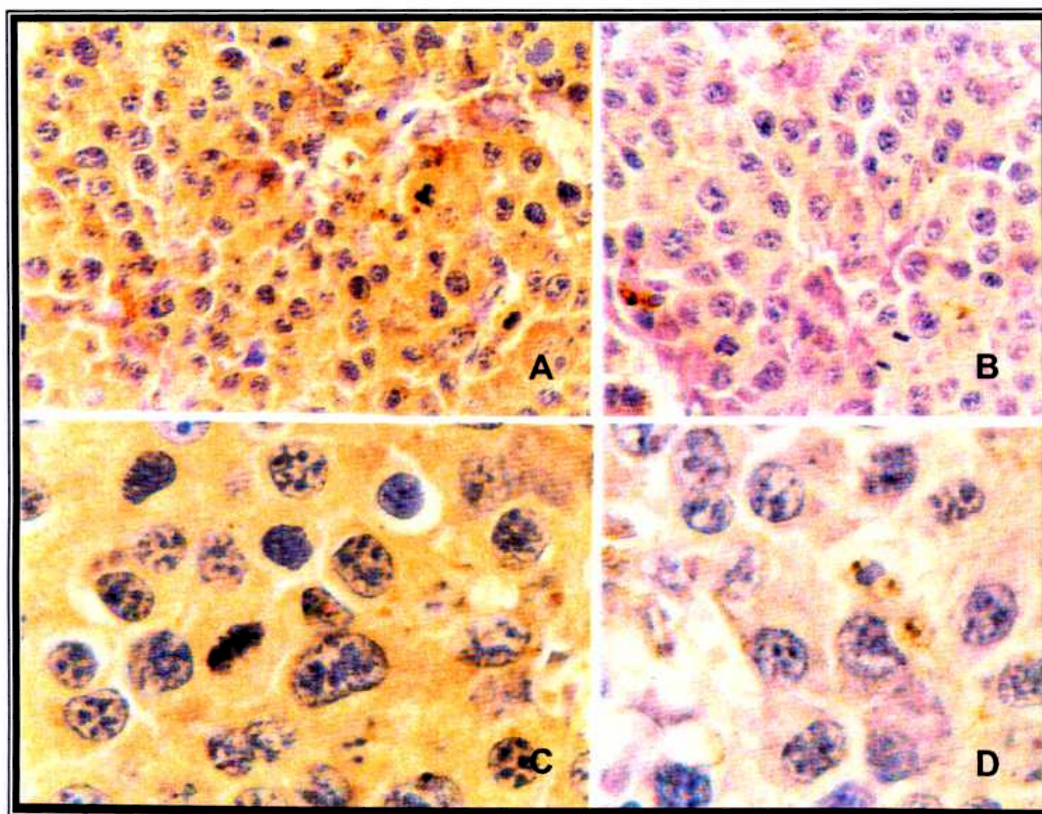


Fig 24. Inmunohistoquímica sobre cortes de tumor B16 utilizando sueros inmunizados con 4 dosis de 120 µg/dosis de NacGM3/VSSP (A y C) o solo el adyuvante Montanide ISA 51 (B y D). Contratinción: Hematoxilina. Aumento: 100X (A y B) 400X (C y D).

Las fotos ponen de manifiesto que la reactividad registrada frente a la célula tumoral es significativamente mayor en los sueros inmunizados con NacGM3-VSSP. La zona necrosada del tumor demuestra una alta reactividad en todos los tratamientos, por lo que puede ser adjudicado a una marcación inespecífica. Glándulas sebáceas, epidermis y particularmente el tejido muscular esquelético demostraron también una reactividad evidente frente al suero inmune. Trabajos realizados en músculo esquelético demuestran la presencia de NacGM3 en el sarcolema asociado a la actividad $\text{Ca}(2+)\text{-ATPasa}$ de ese compartimiento subcelular, por lo que la positividad en el músculo empleando técnicas inmunohistoquímicas podría explicarse por este motivo^{231,232}.

Estos resultados se obtuvieron utilizando piezas tumorales fijadas e incluidas en parafina según los procedimientos histológicos tradicionales. Para descartar eventuales artificios de técnica derivados de una extracción de los

antígenos glicolipídicos de interés, se realizaron ensayos de marcación inmunohistoquímica sobre piezas tumorales fijadas e incluidas en Epón o Spur, resinas sintéticas que no requieren tratamientos con xilol para la rehidratación de la pieza y por lo tanto no remueven las grasas. En estos ensayos los resultados obtenidos fueron similares (datos no mostrados).

En función de determinar la especificidad de este reconocimiento celular se realizaron ensayos de citofluorometría de flujo utilizando los sueros inmunes sobre distintas líneas celulares y esplenocitos de ratones normales. De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de tinción inmunohistoquímica, el antisuero reaccionó fuertemente contra células permeabilizadas de melanoma B16 (**Fig 25**). Sin embargo, no se registró ninguna reactividad contra esplenocitos de ratones normales, aún luego de la incubación de éstos con mitógenos específicos como la fitohemaglutinina o lipopolisacáridos.

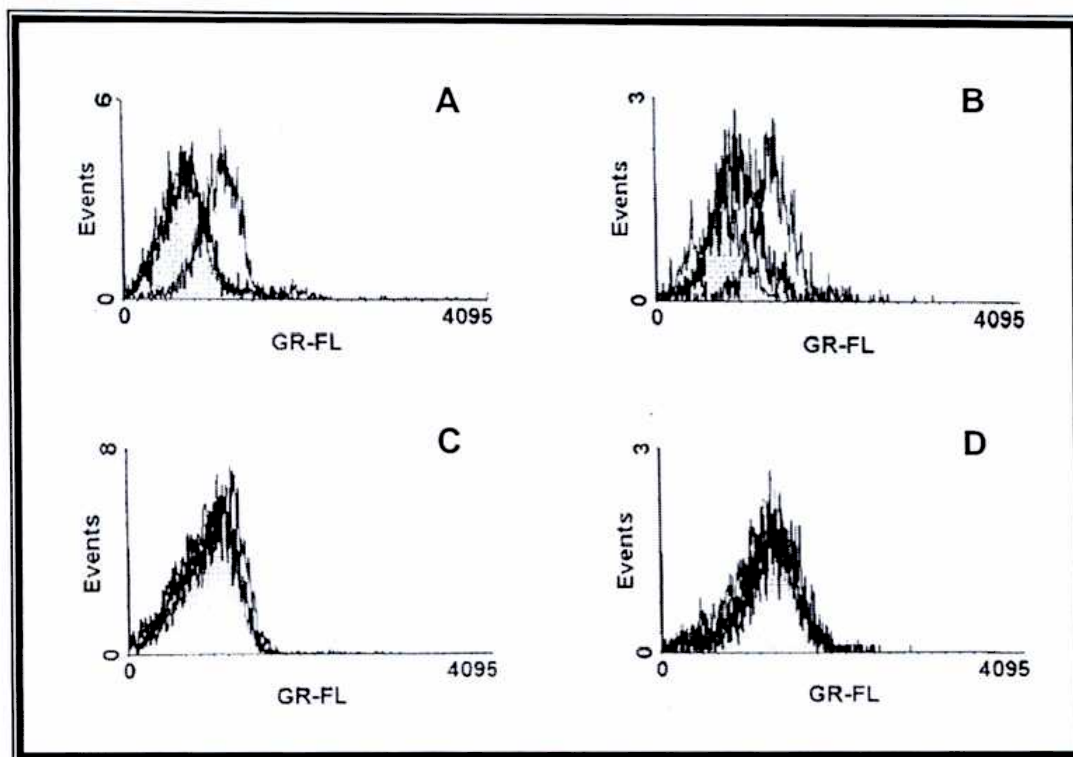


Fig. 25. Citometría de flujo usando sueros provenientes de ratones inmunizados con NacGM3/VSSP con 4 dosis (120 µg) cada 14 días contra células B16 (A y B) o esplenocitos de ratones (C y D). Los esplenocitos fueron permeabilizados e incubados inmediatamente luego de la aislamiento (C) o cuatro días después con el agregado de 5 µg/ml de lipopolisacárido. La curva con área gris representa a las células incubadas con el suero normal, la curva de línea gruesa a las incubadas con suero control y la línea fina se refiere al uso de suero inmune.

La suma de los resultados expuestos indica que la inmunización con la vacuna NacGM3/VSSP induce la producción de anticuerpos específicos contra el gangliósido NacGM3 y con capacidad de reconocimiento del melanoma B16.

Los sueros inmunes no reconocen células que no expresen NacGM3 en su membrana

Con el fin de evaluar si el reconocimiento de los anticuerpos séricos provenientes de ratones inmunizados con la vacuna tiene especificidad celular contra células que expresen NacGM3 en su membrana, se realizaron ensayos de inmunomarcación y citofluorometría de flujo utilizando la línea tumoral murina F3II de carcinoma mamario, que como se describió al principio no expresa este gangliósido en la superficie celular.

Utilizando como herramienta de marcación los sueros obtenidos de ratones inmunizados se evaluó la reactividad sobre células B16 y F3II. En la **Tabla XII**, queda de manifiesto que un amplio porcentaje de los sueros inmunes son reactivos contra las células de melanoma B16 (5 de 8) positiva para NacGM3 mientras que no se registra reacción de los sueros inmunes contra las células F3II (0 de 5) negativa en la expresión de este gangliósido.

Tabla XII. Valoración de la reactividad sérica de ratones inmunizados con 4 dosis (120 µg) de la vacuna NacGM3/VSSP ó VSSP mas Montanide ISA 51 por citofluorometría de flujo contra células B16 ó F3II.

	Ig anti-B16 ^a	Ig anti-F3II
Control (VSSP)	1/7	0/1
NacGM3/VSSP	5/8	0/5

^a sueros positivos sobre el total.

El análisis de la reactividad de los sueros inmunes contra líneas tumorales crecidas *in vitro* indicó que la marcación sobre las células B16 es conspicua en

citosol con un claro reforzamiento de membrana (**Fig 16**). Llamativamente, las células F3II exhibieron una tinción, aunque circunscripta al espacio intracelular, posiblemente ligado al sistema de endomembranas. Esta marcación puede ser indicativa de la presencia de NacGM3 en el interior celular, quizás como precursor de gangliósidos más complejos.

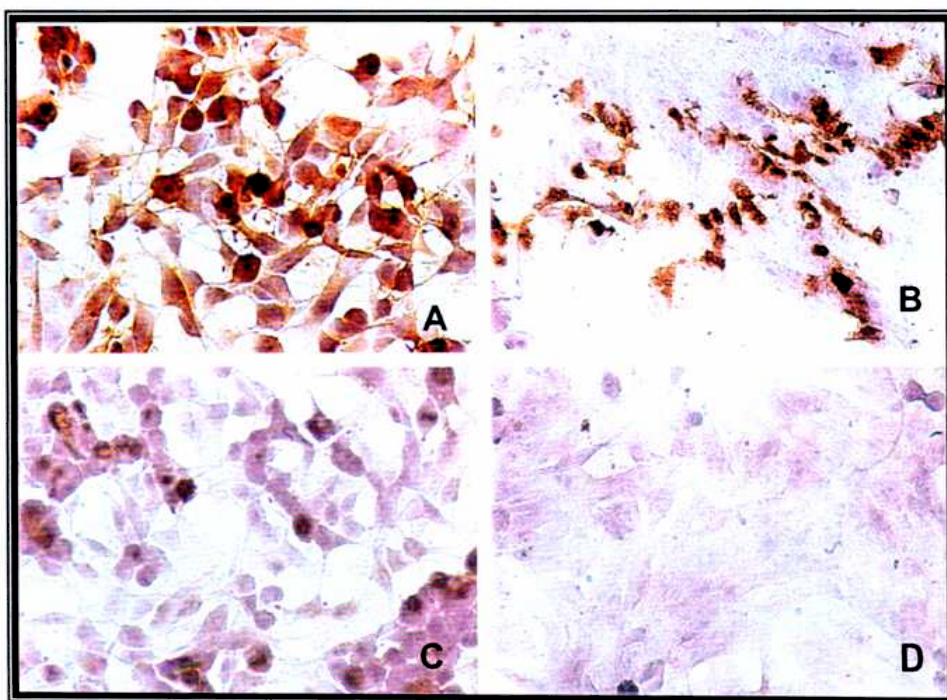


Fig 26. Inmunocitoquímica sobre células B16 (A y C) y F3II (B y D) crecidas *in vitro* utilizando sueros inmunizados con 4 dosis de 120 µg/dosis de NacGM3/VSSP (A y C) o solo el adyuvante Montanide ISA 51 (B y D). Contratinción: Hematoxilina. Aumento: 100X.

Los sueros inmunes son capaces de desencadenar una respuesta citotóxica mediada por anticuerpos contra las células de melanoma B16

Con el fin de analizar si el suero de ratones inmunizados es capaz de desarrollar una actividad citotóxica mediada por el sistema de complemento, se incubaron células de melanoma B16 ó esplenocitos de ratones normales con un panel de diluciones de sueros de ratones inmunizados con NacGM3/VSSP o solo con el adyuvante en presencia o ausencia de complemento exógeno.

Solo las células de B16 fueron lisadas por el complemento en forma dilución-dependiente por el suero de ratones inmunizados. Por su parte la integridad de las células del bazo no fue afectada en ninguna de las condiciones ensayadas (**Tabla XIII**).

Tabla XIII. Citotoxicidad celular mediada por complemento de los anticuerpos séricos de ratones inmunizados con NacGM3-VSSP^a

Células	Sueros		
	Suero NacGM3/VSSP	Suero control	Suero normal
B16	90% (20%)	40% (10%)	10% (10%)
Esplenocitos	10% (10%)	10% (10%)	10% (10%)

^aLa citotoxicidad se expresa en porcentaje del total de las células, evaluando las células teñidas con CFDA sobre el total (CFDA positivas más bromuro de etidio positivas). La citotoxicidad en ausencia de complemento figura entre paréntesis.

Este resultado confirma que los anticuerpos generados contra las células B16 pueden desencadenar una actividad citotóxica específica, pudiendo ser éste uno de los mecanismos antitumorales desencadenados *in vivo*.

Los sueros de los pacientes inmunizados tienen reactividad sobre cortes de melanoma.

Accesoriamente, se realizaron ensayos que buscaron valorar la respuesta humoral en pacientes de melanoma provenientes del ensayo clínico de fase I de la vacuna NacGM3/VSSP. En primera instancia se valoró la respuesta sérica en condición heteróloga esto es, utilizando cortes de tumor de archivo hospitalario luego del tratamiento. En tres pacientes de un total de ocho estudiados se manifestó la presencia de anticuerpos reactivos al tumor. Estas mediciones se realizaron con muestras de suero posteriores a la 4ta. inmunización cada 14 días. De ocho pacientes estudiados, dos presentaron seroconversión entre el suero pre y post-inmunización (**Tabla XIV**). Uno de ellos demostró que la diferencia de reactividad era producto del aumento en la reactividad de la población de anticuerpos del subtipo IgG y el otro del IgM.

Es de destacar que de los pacientes estudiados solo dos presentaron una favorable respuesta clínica, siendo uno de ellos el que mostró la mayor variación en la reactividad sérica (**Fig 27**).

Tabla XIV. Respuesta serológica evaluada por IHQ heteróloga de sueros provenientes de pacientes del ensayo clínico de Fase I.

<i>Pac</i>	<i>Respuesta total¹</i>		<i>Seroconversión²</i>
	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	
1	++	±	--
2	+	++	IgG
3	+	±	--
4	+	+	--
5	±	-	--
6*	+	++	IgG
7	+	±	--
8	+	++/+++	IgM

¹ Respuesta IgG + IgM.
² Isotipo en el cual se encontró la seroconversión.
* Este paciente tuvo una respuesta parcial al tratamiento

Uno de los sueros respondedores correspondía con un paciente que había demostrado una respuesta parcial al tratamiento. Con este suero se realizaron ensayos inmunocitoquímicos autólogos -sobre cortes propios de tumor- observándose una marcada reactividad del suero inmune contra las células tumorales. También se valoró la presencia de NacGM3 en el tumor a través de la tinción con el anticuerpo M2590.

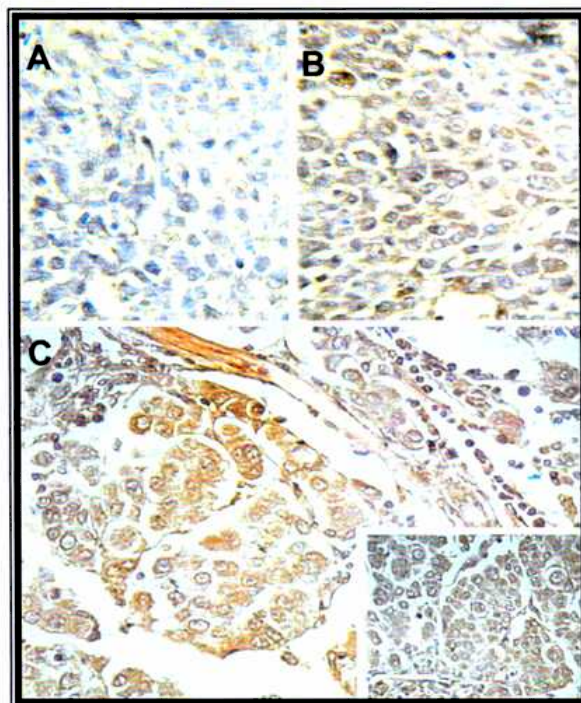


Fig 27. Fotomicrografías ópticas de IHQ realizadas con sueros inmunes de pacientes en condición autóloga pre-inmune (A) y post-inmune (B) y heteróloga post-inmune (C). El inset muestra el reconocimiento del anticuerpo M2590. Contratinción: Hematoxilina. Aumento: 100X.

El ácido siálico es un residuo fundamental para el reconocimiento sérico de melanoma

Con el fin de establecer la participación del residuo de ácido siálico en el reconocimiento antigénico por los anticuerpos presentes en los ratones inmunizados, monocapas celulares de B16 fijadas, fueron incubadas con neuraminidasa, una hidrolasa de *Vibrio cholerae* que remueve específicamente el residuo de ácido siálico de la superficie celular, sin alterar el perfil proteico o lipídico normal de la célula. Los resultados de los ensayos inmunohistoquímicos realizados sobre estas monocapas revelan que la potente marcación generada por los sueros de los ratones vacunados es casi completamente abolida cuando estos sueros son enfrentados a las células carentes del residuo de ácido siálico (**Fig 28**). El mismo resultado se observó cuando el ensayo se realiza sobre cortes de tumor B16 pre-tratado con neuraminidasa (datos no mostrados).

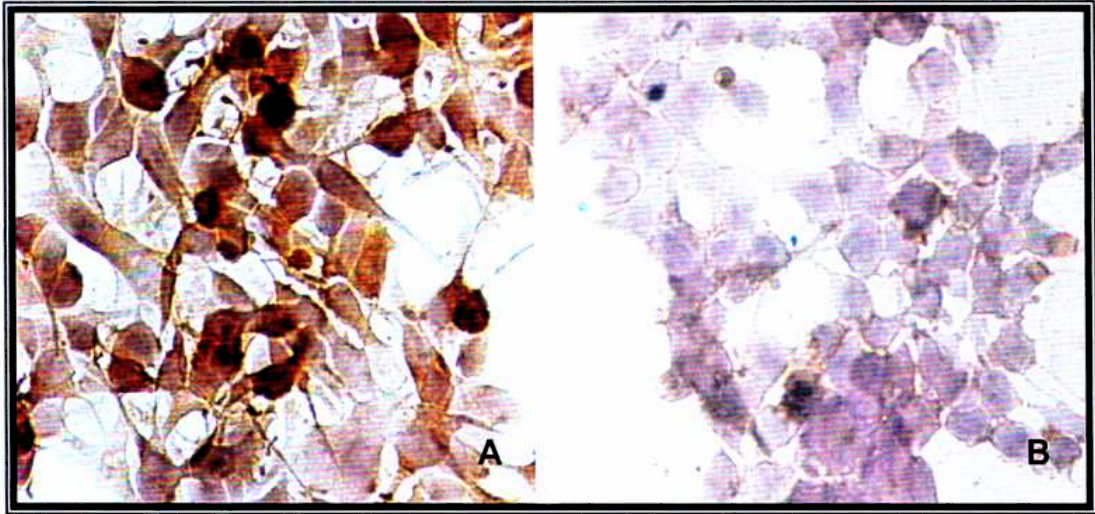


Fig 28. Inmunocitoquímica sobre células B16 crecidas *in vitro* utilizando sueros inmunizados con 4 dosis de 120 µg/dosis de NacGM3/VSSP. Las células fueron tratadas (B) o no (A) con Neuraminidasa. Contratinción: Hematoxilina. Aumento: 100X.

Las indicaciones del proveedor alertan que la solución de ácido siálico puede llegar a contener trazas de enzimas proteolíticas. Para descartar que el resultado obtenido se deba en parte a la actividad proteolítica de la solución de neuraminidasa, se realizó un ensayo de caseinólisis radial sobre un sustrato de caseína. Este ensayo, no reveló actividad proteolítica alguna aún a las 72 h de incubación (datos no mostrados).

Discusión

El camino de presentación utilizado para referirse a los trabajos realizados en la evaluación de la actividad antitumoral de las vacunas presentadas en esta tesis, comienza con una exposición de los resultados obtenidos de la caracterización de las líneas celulares utilizadas y del modelo murino empleado en cada caso. *A posteriori*, se describen los ensayos realizados con el fin de evaluar los efectos tóxicos de la vacunación en los modelos murinos elegidos para así llegar a la valoración de las capacidades antitumorales de las vacunas. Finalmente, se puntualizan los resultados que demuestran las consecuencias inmunomoduladoras de las vacunas y las características que presentan las respuestas humorales antitumorales que ellas desencadenan.

Actividad antitumoral de un anticuerpo antidiotípico generado a partir de NgGM3

Caracterización del modelo empleado y evaluación de la toxicidad de la vacuna.

La línea celular F3H deriva de un adenocarcinoma mamario murino singénica con la cepa de ratones Balb/c la cual fue seleccionada *in vitro* a partir de una línea mantenida en ratones denominada M3. Entre las características estudiadas se remarca que éstas células presentan un genotipo cercano a la triploidía, crecen manteniendo una morfología fusocelular *in vitro*, secretan a la matriz extracelular fibronectina además de expresan el receptor de urokinasa en su superficie celular, una enzima involucrada en los procesos de invasión y metástasis tumoral²³³.

La inoculación s.c. *in vivo* de estas células genera un crecimiento que aunque inicialmente se limita al sitio de inyección, alcanza a degradar el plano epidérmico generando en última instancia una ulceración visible en el flanco del animal. El desarrollo de metástasis pulmonar en este modelo alcanza al 97% de los animales a los 60 días posteriores a la inoculación, con una media de 6 metástasis por animal.

Considerando sus particularidades fenotípicas y su comportamiento tanto *in vitro* como *in vivo*, la línea F3H muestra un alto nivel de desdiferenciación, características altamente asociadas a la malignidad tumoral.

En la presente tesis, se presentó que la portación tumoral en los ratones produce efectos asociados con la estimulación en la proliferación de las células blancas de la sangre. Una marcada esplenomegalia, no asociada a la aparición de focos tumorales en el órgano, se ha registrado en todos los animales estudiados portadores de tumor. El aumento de tamaño en el bazo se asocia positivamente con la carga tumoral, sugiriendo una relación causal entre ambos eventos. Además, el estudio histológico reveló una conspicua mielopoyesis extramedular tanto en el bazo como en el hígado. También se registró una celularidad cercana al 100% en la médula ósea con una relación mielo-citroide de 10:1, estando estos parámetros marcadamente desviados de la normalidad.

Se evaluó la respuesta de las células tumorales al GM-CSF, una citoquina con comprobado efecto hematopoyético²³⁴. Para esto, células F3H crecidas *in vitro* fueron cultivadas con el agregado de distintas cantidades de GM-CSF, valorando posteriormente la respuesta proliferativa. Los resultados muestran que el GM-CSF es un factor mitogénico de las células F3H.

Analizando en conjunto estos resultados, se puede inferir que la portación tumoral puede ser responsable de la secreción de factores mitogénicos que actúan sobre las células blancas de la sangre, generando una respuesta sistémica patológica que cursa paralelamente al cuadro canceroso.

Por lo expuesto, el GM-CSF se convierte en un posible candidato responsable de este efecto. Ya que se conoce que su inyección a nivel sistémico genera un cuadro similar al descrito y que además -como se demostró- es un factor mitogénico importante en esta línea tumoral. Datos obtenidos de ensayos realizados sobre la línea M3, demuestran que estas células secretan activamente GM-CSF al medio extracelular¹⁹³.

Por todo esto podría especularse que el GM-CSF es una citoquina con actividad mitogénica autóloga en el tumor F3II y que su exceso en el organismo determina un cuadro patológico basado en la mielopoyesis extramedular y la movilización leucocitaria. El perfil de expresión de gangliósidos de las células F3II no fue abundantemente explorado aunque se conoce que expresa mayormente gangliósidos complejos oligosialilados (datos no reportados). Sin embargo, con el objetivo de determinar si esta línea es un buen modelo de estudio para evaluar el efecto de la vacunación con el anticuerpo anti-idiotipo 1E10, se realizaron pruebas de reactividad por inmunohistoquímica con el anticuerpo P3 -Ac1 responsable de la generación del 1E10- sobre células F3II crecidas *in vitro*.

Mientras que el anticuerpo anti-idiotipo no demostró reactividad contra las células, el anticuerpo P3 mostró un marcado reconocimiento. Estos resultados alientan el uso de la línea celular y el modelo murino singénico en pos de evaluar el efecto antitumoral del anticuerpo anti-idiotipo.

Previo al comienzo de los ensayos de evaluación antitumoral, se valoró las consecuencias tóxicas que implican la vacunación con el anticuerpo junto con Alúmina o acoplado a la proteína KLH.

La aplicación diaria de 50 µg del anticuerpo junto a Alúmina no generó alteraciones importantes en el comportamiento de los animales, tampoco produjo modificaciones en los niveles de ingesta de alimento ni de agua. Se realizaron autopsias de los animales a los siete y catorce días de inyección diaria. Los efectos más notorios se encontraron en pulmón (congestión vascular acentuada), hígado (degeneración balonizante) y riñón (necrosis en parte del parénquima) notoriamente mas acentuados en las autopsias de los animales realizadas al día siete. También se observó hiper celularidad en médula ósea y mielopoyesis extramedular en bazo.

Resultados similares se encontraron en el análisis de los animales sometidos a la vacunación cada catorce días con el anticuerpo anti-idiotipo

unido covalentemente a KLH. En esta condición también se observó un aumento de celularidad en la médula ósea con focos de mielopoyesis ectópica en hígado. Cabe destacar que estos resultados se refieren a los obtenidos de distintos ensayos de progresión tumoral con vacunación. No se puede ignorar el efecto fisiológico que causa la presencia del tumor F3II sobre el hospedador los cuales fueron expuestos anteriormente, por lo que este factor debe ser tomado en consideración.

Los resultados obtenidos indican que la vacunación con 1E10 en las dos presentaciones ensayadas, presenta un nivel de seguridad aceptable. Siendo sus efectos mas visibles la proliferación y movilización leucocitaria, los cuales pueden estar asociados a los efectos inmunomoduladores de la vacuna.

Aunque como se mencionó anteriormente, este anticuerpo presenta un alto nivel de seguridad; en ensayos a realizarse en seres humanos no debe ser menospreciada la respuesta contra los anticuerpos de origen murino que se pueda generar. Esta respuesta es conocida como respuesta HAMA (del inglés *Human Anti-Mouse Antibody*) siendo un evento de aparición normal en la mayoría de los pacientes reclutados en protocolos de vacunaciones que involucran proteínas animales^{235,236}.

La discusión sobre los efectos que desencadena la respuesta HAMA está centrada en lo nocivo que ella puede ser a los fines terapéuticos del tratamiento. Es por esto que una estrategia para evitar este tipo de respuesta se basa en la utilización de anticuerpos humanizados, osea anticuerpos en donde se reduce el componente proteico animal a la mínima expresión útil (solo el idiotipo) remplazando lo demás por regiones protéicas humanas^{237,238,239}. Sin embargo varios trabajos presentan resultados que demuestran que la respuesta HAMA desarrollada en protocolos clínicos oncológicos no interfiere con la respuesta antitumoral de las vacunas²⁴⁰ o que inclusive en ciertos casos que involucran respuestas anti-idiotípicas, da indicios de aumentar los beneficios del tratamiento²⁴¹.

Propiedades antitumorales de la vacuna.

Para evaluar los efectos antitumorales del anticuerpo, animales Balb/c fueron inmunizados con 50 µg por dosis del preparado vacunal 1E10-KLH cada 14 días llegando a un total de nueve inmunizaciones, en donde siete días después de la tercera inmunización se realizó el desafío tumoral.

Mientras que los lotes inmunizados solamente con el vehículo, con KLH solo o con el anticuerpo 1E10 no acoplado mostraron curvas de progresión tumoral similares, el grupo de animales vacunados con el complejo 1E10-KLH demostró una cinética de crecimiento tumoral significativamente menor.

El análisis del recuento de metástasis espontáneas en pulmón demostró que los animales tratados con la vacuna 1E10-KLH fueron capaces de desarrollar menos metástasis que los animales pertenecientes a los demás grupos. Además, se pudo observar que los animales vacunados con 1E10-KLH, demostraron un menor nivel de invasión de la epidermis, aunque no significativa con los demás grupos.

Los resultados demuestran que el preparado vacunal 1E10-KLH presenta actividad terapéutica de relevancia en el modelo murino estudiado, indicando las potencialidades terapéuticas de la vacuna en tumores que tengan un perfil similar.

Respuesta inmunológica desarrollada por la vacunación.

Finalmente, buscando valorar la respuesta humoral desarrollada por la vacunación, diluciones de sueros de ratones inmunizados, se utilizaron en ensayos de inmunohistoquímica contra cortes de tumor F3H.

Estos resultados muestran que los sueros de los ratones vacunados solamente con el vehículo o con el anticuerpo no conjugado, no presentan reactividad contra los cortes tumorales. Sin embargo, una marcada respuesta

inmune humoral tanto en los ratones inmunizados con el preparado vacunal como en los que solo recibieron la proteína KLH.

La reactividad observada en el análisis de los resultados obtenidos usando el suero de ratones vacunados con KLH, puede buscar una interpretación en el protocolo de inmunización utilizado. La inmunización de los ratones se realizó con tres dosis previas al desafío tumoral y cuatro posteriores al mismo. La proteína KLH ha demostrado potentes efectos inmunomoduladores en varios protocolos experimentales¹²⁴, por lo que la aparición de la reactividad sérica podría deberse a la simultaneidad entre las inmunizaciones y el desafío celular, actuando este último como un componente mas del proceso de inmunización.

Trabajos que estudian el efecto antitumoral de la proteína KLH, resaltan las características propias que esta proteína podría tener en el tratamiento de ciertos carcinomas como cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de mama o cáncer de ovario. La proteína KLH presenta arreglos azucarados del tipo (β 1-3) N-acetil galactosamina²⁴², el cual cruza con epítopes azucarados propios de tumores epiteliales¹²⁴. Estos trabajos indican que la proteína KLH *per se* podría tener un efecto inmunomodulador capaz de generar una respuesta reactiva contra las células tumorales. Por lo tanto, existe la posibilidad de que la vacunación con KLH genere una respuesta humoral con la habilidad de reconocer a las células tumorales F3II pero que esta respuesta humoral no sea capaz de desarrollar una correcta y efectiva actividad antitumoral en las condiciones experimentales ensayadas.

Actividad antitumoral de la vacuna NacGM3/VSSP en un modelo de melanoma murino.

Caracterización del modelo empleado y evaluación de la toxicidad de la vacuna.

En este trabajo se demostró que las células B16 y F3II presentan un distinto perfil de expresión de NacGM3. Esta disparidad fue constatada a través de la utilización de un anticuerpo monoclonal que presenta reactividad específica contra el gangliósido NacGM3²³⁰, tanto por su determinación por citofluorometría de flujo como por la técnica de inmunohistoquímica. La preincubación del anticuerpo con el gangliósido soluble demostró que este reconocimiento era específico de la presencia del gangliósido en las células. Mientras que las células B16 mostraron una marcada positividad, las F3II fueron en todos los casos negativas. Esta diferencia de expresión puede ser indicativa del diferente comportamiento que demostraron estas células *in vitro* en respuesta al agregado exógeno del gangliósido. Sugestivamente se constató una respuesta positiva en presencia del gangliósido y suero fetal bovino, mientras que F3II demostró el comportamiento inverso. No se encontraron evidencias de que la inhibición del crecimiento registrada en las células F3II fuera debida a efectos citotóxicos o a inducción de procesos de apoptosis masiva ya que estos eventos no pudieron ser demostrados a través de las técnicas empleadas. Esto indicaría que la inhibición de crecimiento registrada en las células F3II sería consecuencia de un efecto citostático del gangliósido.

Estos resultados no son encontrados con lo reportado en literatura ya que como se mencionó anteriormente, los gangliósidos pueden estar involucrados tanto en respuestas proliferativas²⁴³ como antiproliferativas^{244,245} actuando en muchos casos como co-receptores de factores de crecimiento^{43,246}.

Xiao-Qi et al. han demostrado que la sobreexpresión de NacGM3 en una línea de queratinocitos humanos inhibe la respuesta proliferativa de estas células al EGF mediante la inhibición de la vía de fosforilación de la quinasa Scr y la fosfatidil

inositol 3 quinasa²⁴⁴. Las células utilizadas para estos experimentos no expresan naturalmente el gangliósido NacGM3 aunque si el EGFr, características similares a la línea celular murina F3II.

En función de lo mencionado no es antojadizo pensar que la diferencia de expresión del gangliósido NacGM3 entre las células responde a la combinación entre las necesidades que tiene cada célula para responder a su medio ambiente y el camino de mutaciones por el cual atravesó hacia la inmortalidad, condiciones que determinan su respuesta proliferativa. Es por esto que la expresión de NacGM3 en las células de melanoma B16 no es solamente un evento consecuente de la transformación celular, sino que es un factor regulador de estas células a las condiciones ambientales.

En la evaluación del modelo de estudio murino empleado se valoró la respuesta tumoral producida por la inyección subcutánea de las células de melanoma B16. La inyección de 5×10^4 demostró ser el inóculo que asegura una incidencia tumoral mayor al 50%. Es interesante destacar que la latencia tumoral no varía entre los distintos lotes de ratones desafiados, mientras que la incidencia es el valor que correlaciona con la carga del desafío.

Consecuentemente con la información recogida, los datos indicaron que la línea de melanoma murina B16 es un buen modelo de estudio para evaluar el efecto antitumoral de la vacuna NacGM3/VSSP. Ya que expresa el antígeno blanco de la vacuna y es capaz de desarrollar tumores *in vivo*.

Se presentaron también los resultados realizados tendientes a valorar el efecto tóxico que pueda tener la vacuna. En una serie de experimentos se inyectaron ratones con 4 dosis de 120 µg por dosis por vía i.m. ya que según experimentos preliminares realizados en el Centro de Inmunología Molecular (CIM) de La Habana (Cuba), éste resultó ser el protocolo óptimo de generación de respuesta humoral contra el gangliósido en ratones. Los indicios de toxicidad en estos animales fueron mínimos, siendo el mas llamativo una hiperplasia reactiva en

bazo, probable consecuencia del efecto inmunomodulador de los componentes de la vacuna.

También se evaluó la toxicidad de la vacuna en condiciones de administración diaria. Los animales fueron inyectados durante 15 días en forma consecutiva por vía i.m. Los animales mostraron buena tolerancia al tratamiento. El consumo de agua, la ingesta de alimento y el comportamiento individual y social de los animales no mostró diferencias entre los sometidos al protocolo y los normales. El análisis autopsico histopatológico reflejó nuevamente una marcada esplenomegalia a costa de un proceso de mielopoyesis extramedular. Como efecto de toxicidad mas dramático se pudo constatar que en un 5% de los animales se encontraron imágenes de hemorragia en pulmón en el espacio subpleural.

Los datos reportados en literatura tanto de los ensayos pre-clínicos como de los obtenidos de los ensayos de fases clínicas han demostrados que las vacunas oncológicas que no involucran la inyección de interferón, interleukinas o anticuerpos (en algunas formulaciones) presentan baja o nula toxicidad²⁴⁷. Coincidentemente, nuestros resultados demostraron un alto nivel de seguridad para este preparado vacunal.

Propiedades antitumorales de la vacuna.

Los efectos antitumorales de la vacuna se evaluaron utilizando un protocolo de cuatro dosis cada 14 días de 120 µg por dosis el cual asegura el nivel máximo en el título de anticuerpos reactivos a NacGM3. El desafío celular se realizó entre 7 y 21 días posteriores a la cuarta inmunización. La elección de este momento para realizar el inóculo de células tumorales se debe a que ensayos preliminares demostraron que el desafío a comienzos del proceso de inmunización desarrolla una progresión tumoral que no permite alcanzar una respuesta inmune apropiada que consiga detener el crecimiento del tumor (dato no mostrado). Este hecho queda claramente demostrado si se considera que la

sobrevida de los ratones libres de cualquier tratamiento desafiados con células B16 no supera en su gran mayoría (>80%) el día 60. En ratones desafiados en los cuales el tratamiento se comienza al momento del desafío tumoral, la cuarta inmunización es aplicada en individuos con un alto grado de progresión de la enfermedad.

Los ensayos de evaluación del efecto antitumoral de la vacuna mostraron un contundente efecto protector en ratones desafiados con 5×10^3 células. Desafíos con una menor cantidad de células redundan en la protección del 100% de los animales aunque esta protección no es significativa debido a la baja incidencia registrada en los animales control. La inyección de cantidades mayores de células excede la capacidad del sistema inmune del animal en articular un efectivo rechazo. Sin embargo, en la evolución tumoral de los distintos tratamientos se registró una disminución significativa en la portación tumoral de los ratones tratados.

Se encontraron resultados comparables cuando se repitió el experimento utilizando células provenientes de cultivos primarios, con el fin de evaluar el efecto de la vacuna sobre células seleccionadas previamente *in vivo* por su capacidad de generar tumor.

La vacuna también demostró una cierta actividad dosis dependiente cuando se inmunizaron ratones elevando la masa del preparado vacunal en las dosis. Los ratones fueron inmunizados siguiendo el protocolo clásico (4 dosis cada 14 días) aunque en tres niveles de dosis distintos (120 μg , 240 μg y 360 μg). En estas condiciones se pudo observar una respuesta antitumoral dependiente de la dosis, lo que podría estar sugiriendo una ventana de mejora en el uso de la vacuna.

Otras vacunas a base de gangliósidos han sido utilizadas en protocolos de fase clínica, como la vacuna GD2-lactona-KLH o la GM2-KLH, las cuales ya han sido mencionadas en la introducción. En estas vacunas las dosis exploradas no superan los 70 μg por dosis sin registrar en ninguno de los casos exclusiones

de los protocolos clínicos debidos a eventos de toxicidad^{139,135}. Sin embargo, la comparación de masas entre las distintas dosis no arroja conclusiones de valor ya que, si se asume que el peso molecular de los distintos gangliósidos es casi el mismo, la masa de las distintas vacunas depende en gran medida del peso molecular de los distintos *carriers* utilizados.

Es interesante realizar en este punto una comparación de las similitudes y diferencias que esta vacuna presenta en relación a la vacuna GM2-KLH presentada por el grupo de Phillip Livingston. Como se mencionó en la introducción la vacuna GM2-KLH no demostró diferencias terapéuticas de importancia con respecto a un grupo de pacientes tratados con INF- α 2b¹⁴⁰.

Sustanciales diferencias existen para alimentar mayores expectativas con la vacuna NacGM3/VSSP. En primer lugar, aunque ambas están formuladas a base de gangliósidos asociados a las células de melanoma, la tolerancia antigénica del organismo hacia GM2 es mucho mayor que hacia NacGM3, lo que implica que lograr desencadenar una respuesta inmunológica hacia NacGM3 implica una respuesta de tipo mas específica. La formulación de ambas vacunas presenta características totalmente diferentes. Mientras que la GM2-KLH se compone de la unión covalente del gangliósido al *carrier* bacteriano, la unión del NacGM3 a su contraparte bacteriana está dada por interacciones hidrofóbicas en la vacuna NacGM3/VSSP lo que le confiere -en su asociación con el adyuvante inmunológico- características de mezcla de fases: agua-aceite. Importantes trabajos señalan que este tipo de formulaciones desarrollan una fuerte y duradera respuesta inmunológica^{248,249}. Finalmente, es de destacar que la contraparte VSSP esta dada por un abanico de proteínas y lípidos bacterianos que presentan una potente actividad inmunomoduladora²⁵⁰.

Se valoró el efecto que tiene la variación en el número de dosis aplicadas a los animales referente al efecto antitumoral de la vacuna. Los resultados demostraron que con tres dosis no se alcanzó un buen nivel de protección

mientras que la aplicación de nueve dosis no generó una respuesta tal que actúe en detrimento de la actividad antitumoral de la vacuna.

La memoria antitumoral desarrollada luego de la inmunización con el esquema clásico de vacunación (120 µg), superó los tres meses luego de la cuarta inmunización considerando una protección mínima del 50%. Este hecho sería indicativo de la necesidad de re-inmunizar cada tres meses en pos de mantener la actividad antitumoral en los animales.

Los parámetros evaluados de la respuesta que genera la inmunización con la vacuna NacGM3, revelan que la vacunación puede efectivamente rechazar implantes pequeños de células tumorales, lo cual indicaría que podría ser utilizada en pacientes libres de enfermedad en pos de prevenir la recaída clínica en consonancia con las expectativas que se depositan hoy en día en las vacunas oncológicas (Abou-jawde). Este tipo de tratamientos ocupan en la actualidad un lugar en las alternativas clínicas que están siendo testeadas como complementarias a las terapias convencionales más agresivas²⁵¹. El sistema inmune por si solo difícilmente puede conseguir la regresión de una masa tumoral importante. Sin embargo luego de la remoción quirúrgica del tumor primario y posterior a los protocolos quimioterapéuticos aplicados normalmente post-cirugía, el paciente se encuentra en una condición con muy pocas alternativas de tratamiento y con una posibilidad cierta (en muchos casos no menor) de recaída en la enfermedad. En este momento las vacunas oncológicas pueden ofrecer sus potencialidades de modulación del sistema inmune con el fin de remover definitivamente del organismo los residuos microscópicos de focos tumorales.

La especificidad en la respuesta antitumoral que la vacuna desarrolla se puso de manifiesto cuando ratones inmunizados fueron desafiados con células con diferente expresión de gangliósidos. Usando la mínima cantidad de células que asegura el 100% en la toma tumoral, ratones singénicos C57bl6 ó Balb/c fueron desafiados con células B16 y F3II respectivamente a 21 días luego de la

cuarta dosis de inmunización. Mientras que los ratones C57bl6 inmunizados lograron rechazar positivamente el implante tumoral, los ratones Balb/c desarrollaron la enfermedad al igual que los animales control. Con estos resultados surge una pregunta obligada, ¿Es esta diferencia en el rechazo tumoral una consecuencia de la diferencia de patrón inmunológico existente entre las cepas murinas o se debe a la distinta expresión de gangliósidos de las células usadas? Los sueros provenientes de animales inmunizados con NacGM3/VSSP de ambas cepas de ratones fueron capaces de reconocer a células B16 por inmunohistoquímica tanto sobre cortes de tumor como de células crecidas *in vitro*, sugiriendo la existencia de una alta similitud en la respuesta humoral desarrollada por la vacunación en los dos tipos de ratones. En consonancia, Esteves et al. demostraron que la inmunización con NacGM3/VSSP desarrolla un perfil de anticuerpo similar²⁵⁰. Por el contrario la presencia de NacGM3 en las células B16 y la poca o nula expresión de este gangliósido en las células F3II, permite hipotetizar que este podría ser el factor responsable del disímil comportamiento antitumoral.

Respuesta inmunológica desarrollada por la vacunación

Los parámetros inmunológicos evaluados se centraron básicamente en la respuesta humoral generada a partir de la inmunización con la vacuna. Ratones inmunizados con el protocolo clásico de vacunación fueron sangrados 21 días posteriores a la finalización del protocolo.

El análisis mediante el ensayo de ELISA de los anticuerpos presentes en los sueros mostró títulos bajos de reactividad contra placas sensibilizadas con distintos tipos de gangliósidos. Este resultado es congruente con lo reportado por otras vacunas a base de gangliósidos²⁵². La causa podría estar dada por la suma entre la baja antigenicidad de estas moléculas y a las dificultades técnicas que implica la realización de ELISA con antígenos no proteicos. Tomando en consideración lo antes expuesto, se determinó en 80 el título crítico para

considerar a un suero como respondedor. Sobre un total de 8 ratones analizados de la cepa C57 y 5 de Balb/c, el 50% y el 40% respectivamente mostraron seroconversión del isotipo IgM, mientras que un 50% y 60% lo hicieron para IgG. El análisis del perfil de isotipos de anticuerpos presentes en los sueros, mostró que el isotipo IgG2b es el más representado.

Por otro lado en los sueros inmunes se encontró una fuerte reactividad contra las células B16. Esta actividad se puso de manifiesto a través de la valoración tanto por inmunohistoquímica sobre cortes de tumor o cultivos celulares como por citofluorometría de flujo sobre células vivas. En estos ensayos se puso de manifiesto también que los sueros inmunes no reconocen en cambio células F3II que, como ya se mencionó, no expresan NacGM3 en membrana. La tinción observada en el ensayo de inmunohistoquímica sobre células F3II presenta un patrón que podría ser interpretado como marcación intracelular. Lo que coincide con que estas células no fueron reconocidas por los sueros inmunes en los ensayos de citofluorometría usando células vivas (la cual no permite la marcación intracelular). Es interesante destacar la concordancia que presentan los resultados derivados de estas dos técnicas en la valoración del reconocimiento de los sueros contra las distintas células tumorales.

La capacidad de lisar células a través de la activación de complemento fue evaluada en estos sueros, observándose que estos anticuerpos son capaces de activar al sistema de complemento en forma dilución dependiente sobre células B16. Este efecto no fue observado utilizando como células blanco esplenocitos de ratón, lo cual reconfirma la especificidad de la respuesta humoral desarrollada por la vacunación.

También se realizaron ensayos para evaluar la reactividad de los sueros provenientes de pacientes incluidos en el protocolo clínico. Este protocolo se realizó entre el año 1999 y 2002 e incluyó 21 pacientes con melanoma de estadios elevados. Sueros de ocho pacientes de este protocolo fueron utilizados en inmunohistoquímicas heterólogas sobre cortes de tumor de melanoma. Dos

de los cuales mostraron seroconversión a costa del isotipo IgG mientras que uno lo hizo a costa del IgM. Uno de estos pacientes, presentaba una enfermedad metastásica con múltiples metástasis subcutaneas. Este paciente tuvo una respuesta parcial al tratamiento con aclaramiento epidérmico perimetastásico y signos de involución en ciertas metástasis. El suero de este paciente fue testeado además en forma autóloga contra un corte de metástasis abdominal el cual demostró ser positivo para NacGM3, reflejando una marcada reactividad.

Resultados similares fueron encontrados en un trabajo en colaboración realizado entre nuestro laboratorio y el CIM. En este trabajo se pudo observar en forma preliminar que los pacientes bajo tratamiento inmunoterapéutico, muestran seroconversión sobre cortes de tumores de archivo hospitalario²⁵³. El análisis sérico a través de este tipo de técnicas sobre material autólogo o heterólogo no encuentra antecedentes de publicación en ensayos de otras vacunas oncológicas.

Finalmente, se buscó determinar el arreglo molecular sobre el cual está montada la respuesta humoral producto de la vacunación. Para ello, se realizaron incubaciones con Neuraminidasa, una enzima que remueve específicamente el residuo de ácido siálico, sobre cultivos celulares o cortes de tumor fijados en los cuales se valoró posteriormente la reactividad de los sueros inmunes. Estos experimentos indicaron que el ácido siálico es un residuo fundamental en el reconocimiento de los sueros de las células tumorales.

El ácido siálico es un componente común en la superficie celular. No sólo por la presencia de gangliósidos en la misma sino porque además es componente de los residuos azucarados presentes en muchas proteínas glicosiladas²⁵⁴. A raíz de ello existe la posibilidad que la respuesta humoral observada no este únicamente direccionada contra gangliósidos sino en general contra un arreglo azucarado particular que involucre la molécula de ácido siálico.

En definitiva los resultados obtenidos indican que los sueros provenientes de los ratones inmunizados con la vacuna presentan un perfil de anticuerpos

con predominio de IgG2b, que estos anticuerpos solo reconocen a las células que expresan NacGM3 en su membrana plasmática, que son capaces de activar el sistema de complemento en contra de las células tumorales y que este reconocimiento humoral está montado sobre las moléculas de ácido siálico presentes en las células.

La inmunoterapia basada en gangliósidos incluyendo a aquellas que utilizan moléculas purificadas como a las que incluyen anticuerpos anti-idiotipos, parece conformar una alternativa de intensa investigación en los protocolos clínicos del futuro. La finalización de los ensayos de fase II y III que se están realizando en la actualidad va a esclarecer los beneficios que presentan estas vacunas para el tratamiento de pacientes con melanoma y cáncer de mama con enfermedad residual que se encuentren en alto riesgo de recidiva. La investigación básica proveerá un mejor entendimiento de los mecanismos inmunológicos involucrados en el rechazo tumoral inducidos por la vacunación con gangliósidos. Además los modelos animales preclínicos de cáncer serán de importancia capital en el estudio de las potenciales acciones sinérgicas de estas vacunas en combinación con los agentes antitumorales convencionales. La rápida transferencia de los resultados preclínicos relevantes hacia los ensayos clínicos mejorarán los beneficios que puedan recibir los pacientes con cáncer.

Conclusiones

- La línea celular F3II es reactiva al anticuerpo P3, lo que la convierte en una buena herramienta como blanco celular en la terapia con la vacuna 1E10. Por su parte Las células B16 expresan NacGM3 en su membrana por lo que se convierten en células blanco apropiadas para la terapia con NacGM3/VSSP
- Las células F3II responden a la adición de GM-CSF *in vitro* lo que - asociado al fenómeno de proliferación y movilización leucocitaria que estas células desencadenan *in vivo*- sugieren una destacada participación de esta citoquina en el crecimiento de los tumores F3II.
- El estudio *in vitro* de las líneas celulares elegidas demostró un perfil de respuesta diferente al gangliósido NacGM3, asociado al distinto patrón de expresión de gangliósidos en membrana existente entre las líneas.
- Los modelos murinos de cáncer evaluados, tanto de mama como de melanoma, ofrecen características de desarrollo de la enfermedad compatibles con la evaluación de la respuesta antitumoral desencadenada por las vacunas.
- Ambas vacunas demostraron no alterar los parámetros de comportamiento y alimentación en los animales, tanto en su aplicación diaria como en la utilizada para la inmunización de los animales. Además no se observaron daños significativos en el análisis histológico de sus órganos.
- La vacunación con el preparado vacunal 1E10-KLH produce un nivel de rechazo tumoral en los ratones, expresado en un retardo de la tasa de crecimiento tumoral y en la reducción del número de metástasis espontánea. Los sueros de los ratones inmunizados reconocen específicamente a las células del tumor F3II.
- La vacunación preventiva de los animales con la vacuna NacGM3/VSSP desencadena una respuesta antitumoral capaz de rechazar al desafío tumoral con 5000 células B16. El desafío con inóculos mayores muestra diferencias en la tasa de progresión de los tumores con respecto a los lotes no vacunados. Además se demostró que estos resultados se repiten en los ensayos realizados con células B16 derivadas de cultivos primarios de tumor.
- La vacunación con NacGM3/VSSP demostró un perfil dosis dependiente escalando la dosis hasta 360 µg. Además se observó que la vacunación con 120 µg no se mejora por el aumento de inoculaciones y que en el

protocolo clásico de cuatro dosis, genera una respuesta antitumoral que protege a mas del 50% de los animales hasta los tres meses luego de finalizada la misma.

- Los resultados demostraron que el efecto antitumoral de la vacuna NacGM3/VSSP está ligado a la expresión del gangliósido NacGM3 en la membrana de células blanco.
- El perfil de inmunoglobulinas desarrollado por la vacunación con NacGM3/VSSP tiene una presencia mayoritaria del isotipo IgG2b. Estos anticuerpos reconocen *in vitro* a los componentes de la vacuna. Además, reaccionan postivamente ante cortes de tumor B16 y células B16 crecidas *in vitro* y son capaces de desarrollar una respuesta citotóxica mediada por complemento contra las mismas.
- Finalmente, valorando la actividad de sueros de pacientes inmunizados con la vacuna se pudo observar una respuesta humoral en algunos de ellos, contra cortes de melanoma de archivo hospitalario.



MARIANO GABR



D.F. ALONSO

Materiales y métodos

Ratones

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6j y BALB/c de 8 a 14 semanas de edad y un peso de 20 a 25 g, en la experimentación con los modelos singénicos de melanoma B16 y de carcinoma mamario F3II, respectivamente. Los ratones fueron suministrados por el bioterio del Instituto de Oncología “Angel H. Roffo” de la Universidad Nacional de Buenos Aires o por el bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de la Plata y se mantuvieron en condiciones estándar, en cajas plásticas con no más de 10 animales por caja con comida y agua *ad libitum*.

Líneas celulares

Células de melanoma murino B16F0 (moderadamente metastásica)²⁵⁵ y B16F10 (altamente metastásica)²⁵⁶, singénica con ratones C57bl/6 fueron cultivadas en D-MEM (Gibco BRL) con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina 2 mM, tetraciclina 10 µg/ml, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 1 mg/ml y anfotericina B 0,25 µg/ml. La línea se mantuvo con 2 repiques semanales usando tripsina 0,05% y EDTA 0,53 mM en PBS para levantarlas.

Como modelo de cáncer mamario, se utilizó la línea celular F3II (altamente invasiva y metastásica), singénica con ratones BALB/c²⁵⁷. Las células se cultivaron en MEM (Gibco BRL) suplementado con SFB 5%, glutamina 2 mM y 80 µg/ml de gentamicina. La línea se mantuvo con 2 repiques semanales usando tripsina 0,05% y EDTA 0,53 mM en PBS para levantarlas.

Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal murino M2590¹⁷⁶ (International Bioscience, Tokyo, Japan) fue utilizado para confirmar la presencia o ausencia del gangliósido NacGM3 en las líneas celulares. El anticuerpo monoclonal (mAc) murino anti-idiotipo 1E10 (IgG1κ) reactivo al mAc P3 (IgM)²⁵⁸. Los hibridomas productores del anticuerpo se inyectaron en la cavidad peritoneal de los ratones

purificándose posteriormente los anticuerpos a partir del fluido ascítico. Esta purificación se realizó utilizando una columna de Sepharosa-Proteína A (Amersham Pharmacia Biotech).

Vacunas

NacGM3/VSSP: La vacuna a base del monosialogangliósido NacGM3 fue producida y generosamente provista por el Centro de Inmunología Molecular de La Habana, Cuba. El gangliósido NacGM3 fue purificado a partir de eritrocitos de perro e hidrofóbicamente conjugado con vesículas lipoprotéicas de membrana externa de *Neisseria Meningitidis* cepa 385¹⁹. La extracción del gangliósido se realizó siguiendo el protocolo de extracción publicado por Folch et al.²⁵⁹ y su incorporación a las vesículas bacterianas fue realizada utilizando una modificación del procedimiento de Lowell et al.²⁶⁰. Brevemente, vesículas de *Neisseria meningitidis* y NacGM3 se disolvieron en buffer 0,1M Tris-HCl, pH 8,5, conteniendo deoxycolato de sodio y dodecilsulfato de sodio y posteriormente se dializaron para remover los detergentes. Este método permite que los gangliósidos y los complejos lipoprotéicos bacterianos generen vesículas de pequeño tamaño altamente hidrosolubles, denominadas VSSP (*Very Small Size Proteoliposomes*). Al momento de aplicación el conjugado NacGM3/VSSP se emulsionó con un volumen de Montanide ISA 51 (Seppic, France) utilizado como adyuvante inmunológico.

1E10: Para los ensayos de actividad antitumoral, el anticuerpo monoclonal murino 1E10, generosamente provista por el Centro de Inmunología Molecular de La Habana, Cuba, se conjugó covalentemente con la proteína KLH del crustáceo *Megathura crenulata* cuyo nombre en inglés es *Keyhole Limpet Hemocyanin*, el preparado vacunal consistió en la emulsión de una solución acuosa conteniendo 1E10-KLH con adyuvante completo o incompleto de Freund.

Proliferación *in vitro*

Con el objeto de caracterizar la respuesta proliferativa de las líneas celulares en estudio al agregado exógeno del gangliósido NacGM3, se llevaron adelante ensayos colorimétricos *in vitro*. En placas de 96 fosas se sembraron $5-10 \times 10^3$ cél / fosa en medio suplementado con 5% de SFB. Al día siguiente de la siembra, las células fueron lavadas con buffer PBS e incubadas por 48 h en el mismo medio con o sin el agregado de 5% de SFB mas la concentración indicada (0-100 µg/ml) de NacGM3 (Sigma). Las monocapas fueron luego lavadas y fijadas con formaldehído al 3,7% en PBS. Posteriormente se tiñeron las células con una solución de Azul de Toluidina al 0,5% en agua. Luego de dos lavados con PBS, el colorante retenido en la monocapa se solubilizó utilizando una solución de SDS al 1%. El color de la solución se leyó en un espectrofotómetro de placa a 595 nm.

Ensayos de toxicidad subaguda de los preparados vacunales

Vacuna NacGM3/VSSP: Dos lotes de 10 ratones machos o hembras de 8 a 10 semanas de edad de la cepa C57Bl./6, fueron inmunizados por vía i.m. diariamente con 120 µg de NacGM3/VSSP, emulsionado en relación 1:1 con el adyuvante Montanide ISA 51, en un volumen final de 0,1 ml. La inyección se realizó en los muslos, alternando el sitio de inyección diariamente entre izquierdo y derecho. Los ratones fueron controlados periódicamente respecto de la ingesta de alimento, agua, comportamiento y estado general. Al finalizar el experimento los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se realizó una autopsia completa y se fijó material del sitio de inyección muscular, hígado, pulmón, riñón, corazón, cerebro, bazo y médula ósea para un completo análisis histopatológico.

Vacuna 1E10: 10 ratones de la cepa Balb/c adultos hembras o machos, de 10 a 16 semanas de edad, con un peso promedio de 25 gr. fueron inyectados

diariamente por vía s.c. en la región interescapular con 50 µg de 1E10 combinada con alúmina en un volumen de 0,2 ml. La mitad de cada lote fue inyectada por 7 días y en el resto el ensayo se continuó hasta los 14 días. La ingesta de agua y alimento se controló diariamente, así también como la evaluación del comportamiento social e individual de los animales. A las 24 h de la última dosis, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical realizando posteriormente una autopsia completa con recolección de material para examinación histopatológica.

Inmunización

NacGM3/VSSP: La inmunización se realizó por vía i.m. en la cara interna del muslo, empleando dosis de 120, 240 ó 360 µg, según el experimento, emulsionado con 0,05 ml de Montanide ISA 51 en un volumen final de 0,1 ml. En todos los ensayos las dosis del preparado vacunal fueron aplicadas cada 14 días, mientras que el desafío tumoral se aplicó a distintos tiempos luego de finalizado el esquema de inmunización, según el diseño del experimento el cual se esquematiza para cada ensayo en resultados.

1E10: La inmunización se realizó inyectado ratones hembras Balb/c por vía ip 7 veces cada 14 días con 50 µg de 1E10 unido covalentemente a la proteína *carrier* KLH, 1E10 libre ó la proteína *carrier* sola en 0,1 ml de PBS mezclado con un volumen igual de Adyuvante completo (primera dosis) o incompleto (resto de las dosis) de Freund (Sigma). Los animales control recibieron solo el adyuvante mezclado con PBS.

Desafío tumoral

Ensayos de tumor primario: Al momento de realizar los desafíos tumorales las células fueron tripsinizadas con una solución de Tripsina/EDTA, resuspendidas en medio sin suero y mantenidas durante 1 h a temperatura ambiente. Los desafíos tumorales se realizaron en el espacio subcutáneo del flanco derecho de los animales con la cantidad correspondiente de células B16 (1×10^3 a 5×10^4 células viables) o F3II (5×10^4 a 2×10^5 células viables) en 0,2 ml de medio de cultivo, de acuerdo con cada diseño experimental (ver resultados). El tiempo de aparición de la masa tumoral fue monitoreado por palpación periódicamente y confirmado posteriormente por histología. El diámetro promedio se calculó según la fórmula: $\sqrt{(M \times m)}$, donde M es el diámetro mayor y m el diámetro menor de la masa tumoral los cuales fueron medidos al menos dos veces por semana.

Sacrificio, necropsia y recuento de metástasis

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical cuando la carga tumoral excedía los 15.000 mm^3 , según su estado general o de acuerdo a la fecha estipulada de finalización del experimento. Cuando la recolección de sangre fue necesaria, el sangrado se realizó a través de la arteria ocular de ratones previamente dormidos en una cámara saturada con vapores de éter. La recolección de suero para análisis inmunológicos se realizó 7 a 21 días después de la cuarta dosis.

El recuento y cuantificación del tamaño de las metástasis pulmonares superficiales en los experimentos que así lo requerían, se realizó sobre pulmones fijados en solución de Bouin con la ayuda de lupa estereoscópica.

Cuantificación del título de anticuerpos reactivos

Vacuna NacGM3/VSSP: El título de anticuerpos anti-NacGM3 en los sueros de los ratones inmunizados fue medido por la técnica de ELISA en fase sólida. Diluciones de sueros de ratones inmunizados o control fueron agregadas a placas de microtitulación de alto *binding* (Becton-Dickinson), sensibilizadas con 20 µg/ml de seroalbúmina bovina (BSA), VSSP o VSSP conjugado hidrofóbicamente con NacGM3 o NgGM3. Después de 2 h de incubación, las placas fueron secuencialmente incubadas con anticuerpos de cabra biotinilados anti-inmunoglobulinas de ratón (Sigma), complejo de peroxidasa-avidina (Sigma) y ortofenildiamina (Gibco BRL), haciendo entre las incubaciones lavados con Tween 20 al 0,01% en PBS. Finalmente, el desarrollo de color fue analizado utilizando un lector de multiplacas (Multiskan Reader, Labysystems). Para determinar el isotipo de las inmunoglobulinas séricas se utilizaron anticuerpos de cabra anti-ratón específicos de subclases (Sigma), seguido de una posterior incubación con anticuerpos anti-cabra conjugados con peroxidasa. El desarrollo del color se obtuvo y analizó de la misma manera descripta anteriormente.

Citofluorometría de flujo

Vacuna NacGM3/VSSP: Cultivos de melanoma B16 o carcinoma mamario F3II fueron levantados mecánicamente y lavados con medio sin suero. Las células fueron fijadas y permeabilizadas (Fix and Perm reagents, Caltag Laboratories) y luego muestras de 1×10^5 células fueron incubadas con 15 µl de suero durante 30 min a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas con medio conteniendo 1% de SFB y luego incubadas con 5 µl de F(ab')₂ de cabra conjugado con FITC anti-inmunoglobulinas de ratón (Caltag) en 25 µl del reactivo de permeabilización. Cuando la tinción se realizó para revelar antígenos de membrana el paso de fijación fue omitido y no se utilizó el reactivo de permeabilización. La marcación de NacGM3 se realizó sobre células no

permeabilizadas, utilizando 1 µg del anticuerpo M2590 por 30 min a 4°C revelado con un anti-IgM de ratón unido a FITC. Paralelamente fueron incubadas células con anticuerpos inespecíficos del mismo isotipo o con M2590 pre-incubado con NacGM3 (Sigma) en una relación molar NacGM3:mAc de 10:1. La fluorescencia asociada a 10.000 células fue analizada con un citofluorómetro de flujo (Cytoron, Ortho Diagnostics Systems), en el Servicio de Inmunogenética del Hospital de Clínicas de la Ciudad de Buenos Aires.

Vacuna 1E10: La unión de 1E10 a células de B16 fue analizado mediante citofluorometría de flujo. Células de melanoma B16 fueron incubadas con 1E10, lavadas y posteriormente incubadas con anticuerpo anti-ratón conjugado a FITC (Dakopatts) en una dilución de 1:100. Después de lavar, las células fueron resuspendidas y analizadas con un citofluorómetro de flujo (Becton-Dickinson). Como control positivo se utilizó un anticuerpo anti-NacGM3.

Procesamiento histológico

El material se procesó según las técnicas de procesamiento histológico convencionales. Las piezas necrópsicas fueron fijadas en una solución de Formaldehído al 3,7% o en solución de Bouin por lo menos durante 4 h y posteriormente fueron deshidratadas e incluidas en parafina. Secciones de 5 µm de los tacos de parafina fueron fijados a portaobjetos de vidrio para su posterior tinción. Para descartar que la incubación con xilol realizada en el proceso de deshidratación de la pieza, afectara la detección de gangliósidos, ciertos tumores fueron incluidos en Epón, una resina sintética con las que se omite el paso de deshidratación con xilol, y procesadas posteriormente igual que las demás²⁶¹. Los cortes se utilizaron en técnicas de inmunomarcación o en tinciones convencionales de microscopía óptica. Las coloraciones se realizaron luego de hidratar la pieza con incubaciones sucesivas en concentraciones decrecientes de alcohol etílico, utilizando hematoxilina (Hematoxilina activada,) y eosina

(Biopur) para tinciones de rutina o luxol (Biopur) para marcación de mielina en sistema nervioso central. Una vez que la coloración se realizó exitosamente los cortes fueron deshidratados y montados usando cubreobjetos y medio de montaje sintético (P.M. Y R., Argentina).

Inmunohistoquímica

Tumores generados por inoculación de células B16 en ratones C57bl/6 fueron resecados, fijados en formaldehído 3,7% y embebidos en parafina. Los tacos de parafina fueron cortados con micrótopo, generando cortes de un espesor de 5 μm . Los cortes fueron desparafinizados con xilol e hidratados mediante una serie de alcoholes en concentración decreciente. Los cortes hidratados se sometieron a un bloqueo con suero normal de caballo diluido en PBS y se incubó con una solución de avidina, seguido de una solución de biotina (Blocking Kit, Vector). Luego se incubó con el suero a testear (1/500) o con los anticuerpos correspondientes diluidos en PBS, o con PBS solo en caso del control del primer anticuerpo, seguido por una incubación con un segundo anticuerpo biotinilado anti-primer anticuerpo (Vectastain ABC Kit, Vector). A continuación, se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol y se incubó con avidina-peroxidasa. El revelado se realizó con diaminobenzidina (DAB Substrate Kit for Horseradish Peroxidase, Vector) observándose, cuando la marcación es positiva, una coloración marrón. Finalmente, se realizó una contratinción nuclear suave con hematoxilina (Hematoxilina activada, Biopur). Cuando la marcación se realizó sobre monocapas celulares, éstas fueron crecidas en cámaras sobre portaobjetos (Lab-Tek Chamber Slide System, Nalgene Nunc) y fijadas con formaldehído al 3,7% durante 4 h.

Con el fin de evaluar la reactividad contra el residuo de ácido siálico presente en la respuesta humoral generada en los ratones vacunados con NacGM3/VSSP, células tumorales fijadas fueron expuestas a una incubación con Neuraminidasa,

una enzima hidrolítica que remueve específicamente el residuo de ácido siálico. Monocapas celulares o cortes de tumores fijados fueron incubados a 37°C por 4 ó 16 h, respectivamente en presencia de 0,1-1 UI/ml de Neuraminidasa Tipo III (Sigma) previamente a la inmunomarcación con los sueros de ratones inmunizados. Como la solución de Neuraminidasa puede llegar a contener trazas de proteasas, la presencia de actividad proteolítica fue descartada por un ensayo de caseinolisis radial usando un sustrato de agarosa-caseína²⁶².

Aislamiento de esplenocitos

Ratones C57bl/6 fueron sacrificados por dislocación cervical. Inmediatamente los bazos fueron removidos y sumergidos en buffer PBS. Posteriormente se disgregaron mecánicamente utilizando una aguja de 21G para obtener una suspensión celular homogénea. Las células fueron precipitadas por centrifugación y resuspendidas en una solución 140mM de NH₄Cl, 17 mM Tris-Cl, pH 7,5 por 5 min. Finalmente se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI-1640.

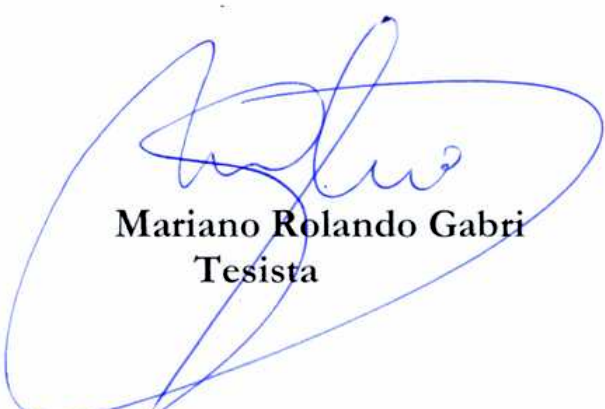
Ensayo de citotoxicidad mediada por complemento

El efecto citotóxico de los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados con NacGM3/VSSP contra células B16 fue ensayado *in vitro*²⁶³. Estos ensayos se realizaron utilizando placas de microtitulación Terasaki (One Lambda). Luego de marcar $1,5 \times 10^3$ células con carboxifluoreceína (Molecular Probes) estas fueron incubadas con una solución diluida de anti-suero murino inactivado por calor en un volumen total de 2 µl, 30 min a temperatura ambiente. Luego de la adición de 5 µl de suero de conejo (inactivado o no), las células fueron incubadas por 60 min. La reacción se detuvo con el agregado de 1 µl de una solución de Bromuro de etidio 0,05 mg/ml en 1 mM de EDTA, pH 8,0. El porcentaje de lisis celular se determinó utilizando un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon) usando un prefiltro de 510 nm con una

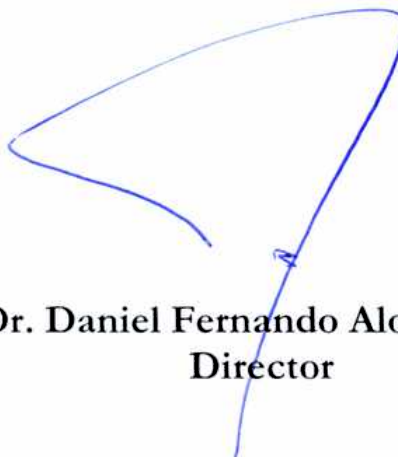
lámpara de UV de mercurio. Como control, se utilizaron células obtenidas de bazo de ratones normales.

Ensayo clínico de fase I

Material de pacientes reclutados en el ensayo clínico de fase I (Nro. de expediente de ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos y Tecnología Alimentaria): 1-47-1572-02-6), ejecutado entre los años 1999 y 2002 fue utilizado para evaluar la respuesta humoral reactiva al tumor autólogo o hacia tumores heterólogos. Los sueros fueron obtenidos previo al comienzo de la inmunización y en los momentos correspondientes a cada una de las aplicaciones vacunales y guardados bajo cero hasta el momento de su uso. Los tumores se tomaron del acto quirúrgico y fueron procesados según la técnica usual de fijación de material hospitalario.



Mariano Rolando Gabri
Tesisista



Dr. Daniel Fernando Alonso
Director



Agradecimientos

Uno busca lleno de esperanzas el camino que los sueños prometieron a sus ansias.

Siempre me pregunté cómo pudo él encontrar un arreglo de palabras que se acerque tanto a una verdad tan cierta de una manera tan ilustrativa, tan contundente.

Sin embargo la edificación del camino no se consigue en soledad. Los actores que participan en ella son muchos y de las mas variadas procedencias.

Hoy, yo puedo (y quiero) llenarme la boca diciendo que he alcanzado un mojón de mi camino que sido largamente prometido por mis sueños, y este logro no es resultado de mi trabajo solitario sino, una obra construida entre muchos. Personas que han colaborado directamente conmigo en este proyecto y otras que han sido (y aun lo son) compañeras y sostén en el suceder de mi camino personal.

Quiero agradecer en primer lugar a mi director de tesis Dr. Daniel Alonso por su incomparable capacidad de docencia en mi formación científica, su apoyo incesante a mi trabajo y por su amistad. También al Dr. Daniel Gomez, director del laboratorio, quien ha sostenido mi mano en mi transitar profesional, me ha abierto las puertas de su amistad y me ha demostrado el valor que tiene el trabajo por la permanente superación personal.

A Hernán por su regalo de amistad incondicional.

A Giselle por su amistad y por ser una persona tan increíble como para convertirse en una incomparable compañía todos los días.

A Pablo por su compañerismo y amistad.

A Willy por haberme regalado su amistad y por haber sido y seguir siendo aún, un ejemplo de vida.

A Santiago, Laura y Valeria por su compañerismo y su trato diario.

A todos ellos por hacer del “todos los días” en el laboratorio algo lindo de vivir.

A la Dra. Alejandra Scursoni por su ayuda en el análisis histológico de las piezas.

Quiero agradecer a la Dra. Silvia Gold y al laboratorio Elea el apoyo sin condicionamientos que le han entregado a este proyecto de investigación. Por creer en las Universidades y científicos del país y por apostar a la capacidad de estos para desarrollar e investigar en nuevas terapias oncológicas.

También quiero agradecer al Dr. Leonardo Fainboim, director del Laboratorio de Inmunogenética del Hospital de Clínicas y al Dr. Marcelo Guthman por su constante colaboración con esta tesis.

Al Dr. Luis Enrique Fernández, a la Dra. Ana María Vázquez y a la Dra. Adriana Carr del Centro de Inmunología Molecular de La Habana, Cuba, por la producción y la generosa provisión de los preparados vacunales.

Esta tesis no hubiese sido posible sin la amistad con la que me premian todos los días Sandra, Martín, Mariana, Facundo, Guillermo y Gonzalo. Estén en el lugar del mundo que estén, transitando caminos con objetivos similares.

Finalmente agradezco sentidamente al destino que puso en mi camino a mi mujer, mi amante, mi apoyo: A Vane.

Que me ofrece su amor sin pedir nada a cambio, que sabe poner la medida de cordura justa en los momentos en donde hace falta y que me complementa con su compañía.

Agradezco a la vida por el regalo invaluable de mis dos hijas, Mariel y Malena que llenan mi vida de amor y a la cual le dan sentido. Que me muestran continuamente las cosas por las cuales vale la pena estar vivo.

La tesis presenta en su comienzo una ilustración del libro “El Club Dumas” de Arturo Pérez-Reverte. En ella se puede observar un avaro contando sus monedas y a la muerte a sus espaldas sosteniendo un reloj de arena esperando el paso del tiempo para cobrarse su parte. En la base se adivina la leyenda FRUSTRÁ que se refiere al concepto “en vano”.

Agradezco a todos los que han influido en mi vida de forma que hoy mi capital más valioso no pueda ser contado sobre la superficie de una mesa.

A todos muchas, muchas gracias.

Mariano Rolando Gabri

Abril, 2004

Bibliografia

- 1 Sauer G. Molecular biology of tumor viruses. *Naturwissenschaften*. 1977 Oct;64(10):518-24
- 2 Reiss K, Khalili K. Viruses and cancer: lessons from the human polyomavirus, JCV. *Oncogene*. 2003 Sep 29;22(42):6517-23.
- 3 Krontiris TG "Oncogenes" *N England Jour Med* 1995; 333(5):303-306
- 4 Stoscheck CM, King LE Jr. Functional and structural characteristics of EGF and its receptor and their relationship to transforming proteins. *J Cell Biochem*. 1986;31(2):135-52.
- 5 Gill GN, Bertics PJ, Santon JB. Epidermal growth factor and its receptor. *Mol Cell Endocrinol*. 1987 Jun;51(3):169-86.
- 6 Klinger HP. Genetic analysis of cell malignancy--evidence from somatic cell genetics. *Bull Schweiz Akad Med Wiss*. 1978 Nov;34(4-6):377-88.
- 7 Stevaux O, Dyson NJ. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Dec;14(6):684-91.
- 8 Shen WH. The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends Plant Sci*. 2002 Nov;7(11):505-11.
- 9 Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer*. 2003 Nov 17;89(10):1817-21.
- 10 Gomez DI, Alonso DI, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*. 1997 Oct;74(2):111-22.
- 11 Shamji AF, Nghiem P, Schreiber SL. Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. *Mol Cell*. 2003 Aug;12(2):271-80.
- 12 Zhang D, Samani AA, Brodt P. The role of the igf-I receptor in the regulation of matrix metalloproteinases, tumor invasion and metastasis. *Horm Metab Res*. 2003 Nov;35(11-12):802-8.
- 13 Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*. 2003 Jul;94(7):575-81
- 14 Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol*. 2002;515:33-48.
- 15 Jackson-Grusby L. Modeling cancer in mice. *Oncogene*. 2002 Aug 12;21(35):5504-14.
- 16 <http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/STRAINS.shtml>
- 17 Klatt P, Serrano M. Engineering cancer resistance in mice. *Carcinogenesis*. 2003 May;24(5):817-26.
- 18 Corpet DE, Pierre F. Point: From animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 May;12(5):391-400
- 19 Srivastava PK. Immunotherapy of human cancer: lessons from mice. *Nat Immunol*. 2000 Nov;1(5):363-6.
- 20 Klenk E. Hoppe-Seyler's *Z Physiol Chem* 1935; 235: 24.
- 21 Klenk E. Hoppe-Seyler's *Z Physiol Chem* 1942; 273: 76.
- 22 Svennerholm, L. 1956. The quantitative estimation of cerebroside in nervous tissue. *J. Neurochem*. 1:42-53
- 23 Svennerholm, L. The Gangliosides. *J Lipid Res*. 1964 Apr;41:145-55.
- 24 Hannun YA, Obeid LM. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem*. 2002 Jul 19;277(29):25847-50. Epub 2002 May 13.

- 25 Schulte S, Stoffel W. Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Nov 1;90(21):10265-9.
- 26 Sprong H, Kruithof B, Leijendekker R, Slot JW, van Meer G, van der Sluijs P. UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1998 Oct 2;273(40):25880-8.
- 27 Svennerholm, *Comprehensive biochemistry*, vol 18, Elsevier, 1970
- 28 Chou HH, Takematsu H, Diaz S, Iber J, Nickerson E, Wright KL, Muchmore EA, Nelson DL, Warren ST, Varki A. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 29;95(20):11751-6.
- 29 Hirabayashi Y, Kasakura H, Matsumoto M, Higashi H, Kato S, Kasai N, Naiki M. Specific expression of unusual GM2 ganglioside with Hanganutziu-Deicher antigen activity on human colon cancers. *Jpn J Cancer Res*. 1987 Mar;78(3):251-60.
- 30 Marquina G, Waki H, Fernandez LE, Kon K, Carr A, Valiente O, Perez R, Ando S. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res*. 1996 Nov 15;56(22):5165-71.
- 31 Li R, Ladisch S. Abrogation of shedding of immunosuppressive neuroblastoma gangliosides. *Cancer Res*. 1996 Oct 15;56(20):4602-5.
- 32 Tettamanti G, Bassi R, Viani P, Riboni L. Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism. *Biochimie*. 2003 Mar-Apr;85(3-4):423-37.
- 33 Rahmann H, Jonas U, Kappel T, Hilderbrandt H. Differential involvement of gangliosides versus phospholipids in the process of temperature adaptation in vertebrates. A comparative phenomenological and physicochemical study. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 Jun 19;845:72-91.
- 34 Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K, Proia RL. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):9142-7.
- 35 Singer, S. J., and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175: 720-731.
- 36 Brown DA, London E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol*. 1998 Jul 15;164(2):103-14.
- 37 Ahmed SN, Brown DA, London E. On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes rescues the responsiveness of Trk-neurotrophin receptor to its ligand, NGF. *Neurochem Res*. 2002 Aug;27(7-8):801-6.
- 38 Schroeder RJ, Ahmed SN, Zhu Y, London E, Brown DA. Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J Biol Chem*. 1998 Jan 9;273(2):1150-7.
- 39 Prinetti A, Chigorno V, Tettamanti G, Sonnino S. Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. *J Biol Chem*. 2000 Apr 21;275(16):11658-65.
- 40 Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*. 2003 Apr;44(4):655-67. Epub 2003 Feb 01.
- 41 Mutoh T, Tokuda A, Miyadai T, Hamaguchi M, Fujiki N. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 23;92(11):5087-91.
- 42 Mutoh T, Hamano T, Yano S, Koga H, Yamamoto H, Furukawa K, Ledeen RW. Stable transfection of GM1 synthase gene into GM1-deficient NG108-15 cells, CR-72 cells,

- rescues the responsiveness of Trk-neurotrophin receptor to its ligand, NGF. *Neurochem Res.* 2002 Aug;27(7-8):801-6.
- 43 Duchemin AM, Ren Q, Mo L, Neff NH, Hadjiconstantinou M. GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *J Neurochem.* 2002 May;81(4):696-707.
- 44 Kojima N, Hakomori S. Cell adhesion, spreading, and motility of GM3-expressing cells based on glycolipid-glycolipid interaction. *J Biol Chem.* 1991 Sep 15;266(26):17552-8.
- 45 Wang XQ, Sun P, Paller AS. Ganglioside modulation regulates epithelial cell adhesion and spreading via ganglioside-specific effects on signaling. *J Biol Chem.* 2002 Oct 25;277(43):40410-9. Epub 2002 Aug 14
- 46 Wang X, Sun P, Al-Qamari A, Tai T, Kawashima I, Paller AS. Carbohydrate-carbohydrate binding of ganglioside to integrin alpha(5) modulates alpha(5)beta(1) function. *J Biol Chem.* 2001 Mar 16;276(11):8436-44. Epub 2000 Dec 15.
- 47 Paller AS, Arnsmeier SL, Chen JD, Woodley DT. Ganglioside GT1b inhibits keratinocyte adhesion and migration on a fibronectin matrix. *J Invest Dermatol.* 1995 Aug;105(2):237-42.
- 48 Sung CC, O'Toole EA, Lannutti BJ, Hunt J, O'Gorman M, Woodley DT, Paller AS. Integrin alpha 5 beta 1 expression is required for inhibition of keratinocyte migration by ganglioside GT1b. *Exp Cell Res.* 1998 Mar 15;239(2):311-9.
- 49 Kawakami Y, Kawakami K, Steelant WF, Ono M, Baek RC, Handa K, Withers DA, Hakomori S. Tetraspanin CD9 is a "proteolipid," and its interaction with alpha 3 integrin in microdomain is promoted by GM3 ganglioside, leading to inhibition of laminin-5-dependent cell motility. *J Biol Chem.* 2002 Sep 13;277(37):34349-58. Epub 2002 Jun 14.
- 50 Ono M, Handa K, Sonnino S, Withers DA, Nagai H, Hakomori S. GM3 ganglioside inhibits CD9-facilitated haptotactic cell motility: coexpression of GM3 and CD9 is essential in the downregulation of tumor cell motility and malignancy. *Biochemistry.* 2001 May 29;40(21):6414-21.
- 51 Kostic D, Buchheit F. Gangliosides in human brain tumors. *Life Sci.* 1970 May 22;9(10):589-96.
- 52 Mora PT, Brady RO, Bradley RM, McFarland VW. Gangliosides in DNA virus-transformed and spontaneously transformed tumorigenic mouse cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 Aug;63(4):1290-6.
- 53 Zhang S., Zhang H. S., Cordon-Cardo C., Reuter V. E., Singhal A. K., Lloyd K. O., Livingston P. O. Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry. II. Blood group-related antigens. *Int. J. Cancer*, 73: 50-56, 1997.
- 54 Tsuchida T., Saxton R. E., Morton D. L., Irie R. F. Gangliosides of human melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 78: 45-54, 1987.
- 55 Hamilton W. B., Helling F., Lloyd K. O., Livingston P. O. Ganglioside expression on human malignant melanoma assessed by quantitative immune thin-layer chromatography. *Int. J. Cancer*, 53: 566-573, 1993
- 56 Shinoura N., Dohi T., Kondo T., Yoshioka M., Takakura K., Oshima M. Ganglioside composition and its relation to clinical data in brain tumors. *Neurosurgery (Baltimore)*, 31: 541-549, 1992.
- 57 Chang H. R., Cordon-Cardo C., Houghton A. N., Cheung N. K., Brennan M. F. Expression of disialogangliosides GD2 and GD3 on human soft tissue sarcomas. *Cancer (Phila.)*, 70: 633-638, 1992.

- 58 Easton IW, Bolscher JG, van den Eijnden DH. Enzymatic amplification involving glycosyltransferases forms the basis for the increased size of asparagine-linked glycans at the surface of NIH 3T3 cells expressing the N-ras proto-oncogene. *J Biol Chem.* 1991 Nov 15;266(32):21674-80
- 59 Morgenthaler J, Kemmner W, Brossmer R. Sialic acid dependent cell adhesion to collagen IV correlates with in vivo tumorigenicity of the human colon carcinoma sublines HCT116, HCT116a and HCT116b. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Sep 14;171(2):860-6.
- 60 Akano J., Raj B. K., Asagami C., Lloyd K. O. Human melanoma cell lines deficient in GD3 ganglioside expression exhibit altered growth and tumorigenic characteristics. *J. Investig. Dermatol.*, 107: 543-548, 1996
- 61 Tsurifune T, Ito T, Li XJ, Yamashiro S, Okada M, Kanematsu T, Shiku H, Furukawa K. Alteration of tumor phenotypes of B16 melanoma after genetic remodeling of the ganglioside profile. *Int J Oncol.* 2000 Jul;17(1):159-65.
- 62 Shoko Yoshida, Satoshi Fukumoto, Haruhiko Kawaguchi, Shigeki Sato, Ryuzo Ueda and Koichi Furukawa. Ganglioside GD2 in Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Research* 61, 4244-4252, May 15, 2001.
- 63 Black PH. Shedding from normal and cancer-cell surfaces. *N Engl J Med.* 1980 Dec 11;303(24):1415-6.
- 64 Offner H, Thieme T, Vandenbark AA. Gangliosides induce selective modulation of CD4 from helper T lymphocytes. *J Immunol.* 1987 Nov 15;139(10):3295-305
- 65 Ladisch S, Ulsh L, Gillard B, Wong C. Modulation of the immune response by gangliosides. Inhibition of adherent monocyte accessory function in vitro. *J Clin Invest.* 1984 Dec;74(6):2074-81.
- 66 Chu JW, Sharom FJ. Gangliosides interact with interleukin-4 and inhibit interleukin-4-stimulated helper T-cell proliferation. *Immunology.* 1995 Mar;84(3):396-403.
- 67 Grayson G, Ladisch S. Immunosuppression by human gangliosides. II. Carbohydrate structure and inhibition of human NK activity. *Cell Immunol.* 1992 Jan;139(1):18-29.
- 68 Ziegler-Heitbrock HW, Kafferlein E, Haas JG, Meyer N, Strobel M, Weber C, Flieger D. Gangliosides suppress tumor necrosis factor production in human monocytes. *J Immunol.* 1992 Mar 15;148(6):1753-8.
- 69 McKallip R, Li R, Ladisch S. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J Immunol.* 1999 Oct 1;163(7):3718-26.
- 70 Ladisch S, Becker H, Ulsh L. Immunosuppression by human gangliosides: I. Relationship of carbohydrate structure to the inhibition of T cell responses. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Apr 23;1125(2):180-8.
- 71 Chang F, Li R, Noon K, Gage D, Ladisch S. Human medulloblastoma gangliosides. *Glycobiology.* 1997 Jun;7(4):523-30
- 72 Ladisch S, Li R, Olson E. Ceramide structure predicts tumor ganglioside immunosuppressive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar 1;91(5):1974-8.
- 73 Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol.* 2003 Jun;195(3):346-55.
- 74 Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol.* 2003;21:807-39. Epub 2001 Dec 19.
- 75 Janeway CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54 Pt 1:1-13.
- 76 Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997 Feb;9(1):4-9.
- 77 Trinchieri G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int Rev Immunol.* 1998;16(3-4):365-96.

- 78 Boggio K, Nicoletti G, Di Carlo E, Cavallo F, Landuzzi L, Melani C, Giovarelli M, Rossi I, Nanni P, De Giovanni C, Bouchard P, Wolf S, Modesti A, Musiani P, Lollini PL, Colombo MP, Forni Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice. *J Exp Med.* 1998 Aug 3;188(3):589-96.
- 79 Noguchi Y, Jungbluth A, Richards EC, Old LJ. Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15;93(21):11798-801.
- 80 Cavallo F, Di Carlo E, Butera M, Verrua R, Colombo MP, Musiani P, Forni G. Immune events associated with the cure of established tumors and spontaneous metastases by local and systemic interleukin 12. *Cancer Res.* 1999 Jan 15;59(2):414-21.
- 81 Atkins MB, Robertson MJ, Gordon M, Lotze MT, DeCoste M, DuBois JS, Ritz J, Sandler AB, Edington HD, Garzone PD, Mier JW, Canning CM, Battiato L, Tahara H, Sherman ML. Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res.* 1997 Mar;3(3):409-17.
- 82 Motzer RJ, Rakhit A, Thompson JA, Nemunaitis J, Murphy BA, Ellnerhorst J, Schwartz LH, Berg WJ, Bukowski RM. Randomized multicenter phase II trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 versus interferon-alpha 2a for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Interferon Cytokine Res.* 2001 Apr;21(4):257-63.
- 83 Hurteau JA, Blessing JA, DeCesare SL, Creasman WT. Evaluation of recombinant human interleukin-12 in patients with recurrent or refractory ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol.* 2001 Jul;82(1):7-10.
- 84 Portielje JE, Gratama JW, van Ojik HH, Stoter G, Kruit WH. IL-12: a promising adjuvant for cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother.* 2003 Mar;52(3):133-44. Epub 2003 Feb 12.
- 85 Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial E584. *J Clin Oncol.* 1996 Jan;14(1):7-17.
- 86 Clark JI, Kuzel TM, Lestingi TM, Fisher SG, Sorokin P, Martone B, Viola M, Sosman JA. A multi-institutional phase II trial of a novel inpatient schedule of continuous interleukin-2 with interferon alpha-2b in advanced renal cell carcinoma: major durable responses in a less highly selected patient population. *Ann Oncol.* 2002 Apr;13(4):606-13.
- 87 Lens MB, Dawes M. Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials. *J Clin Oncol.* 2002 Apr 1;20(7):1818-25.
- 88 Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist.* 2001;6(1):34-55.
- 89 Kilbridge KL, Cole BF, Kirkwood JM, Haluska FG, Atkins MA, Ruckdeschel JC, Sock DE, Nease RF Jr, Weeks JC. Quality-of-life-adjusted survival analysis of high-dose adjuvant interferon alpha-2b for high-risk melanoma patients using intergroup clinical trial data. *J Clin Oncol.* 2002 Mar 1;20(5):1311-8.
- 90 Kim S, Iizuka K, Aguila HL, Weissman IL, Yokoyama WM. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 14;97(6):2731-6.
- 91 Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002 Mar 15;295(5562):2097-100.
- 92 Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature.* 1974 Apr 19;248(450):701-2.

- 93 van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991 Dec 13;254(5038):1643-7.
- 94 Traversari C, van der Bruggen P, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Van Pel A, De Plaen E, Amar-Costesec A, Boon T. A nonapeptide encoded by human gene MAGI-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J Exp Med*. 1992 Nov 1;176(5):1453-7.
- 95 Parajuli P, Pisarev V, Sublet J, Steffel A, Varney M, Singh R, LaFace D, Talmadge JJ. Immunization with wild-type p53 gene sequences coadministered with Flt3 ligand induces an antigen-specific type 1 T-cell response. *Cancer Res*. 2001 Nov 15;61(22):8227-34.
- 96 Powell DJ Jr, Eisenlohr LC, Rothstein JL. A thyroid tumor-specific antigen formed by the fusion of two self proteins. *J Immunol*. 2003 Jan 15;170(2):861-9.
- 97 Kennedy RC, Shearer MH, Watts AM, Bright RK. CD4+ T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen. *Cancer Res*. 2003 Mar 1;63(5):1040-5.
- 98 Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity*. 1999 Mar;10(3):281-7.
- 99 Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi K, Michel H, Sevilir N, Cox AL, Appella E, Engelhard VH. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science*. 1992 Mar 6;255(5049):1261-3.
- 100 Sahin U, Tureci O, Pfreundschuh M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol*. 1997 Oct;9(5):709-16.
- 101 Yu Z, Restifo NP. Cancer vaccines: progress reveals new complexities. *J Clin Invest*. 2002 Aug;110(3):289-94.
- 102 Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 3;95(3):1178-83.
- 103 McCabe BJ, Irvine KR, Nishimura MI, Yang JC, Spiess PJ, Shulman LP, Rosenberg SA, Restifo NP. Minimal determinant expressed by a recombinant vaccinia virus elicits therapeutic antitumor cytolytic T lymphocyte responses. *Cancer Res*. 1995 Apr 15;55(8):1741-7.
- 104 Zheng P, Sarma S, Guo Y, Liu Y. Two mechanisms for tumor evasion of preexisting cytotoxic T-cell responses: lessons from recurrent tumors. *Cancer Res*. 1999 Jul 15;59(14):3461-7.
- 105 Kageshita T, Hirai S, Ono T, Hicklin DJ, Ferrone S. Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am J Pathol*. 1999 Mar;154(3):745-54.
- 106 Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham IT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med*. 1996 Oct;2(10):1096-103.
- 107 McLemore TL, Hubbard WC, Litterst CL, Liu MC, Miller S, McMahon NA, Eggleston JC, Boyd MR. Profiles of prostaglandin biosynthesis in normal lung and tumor tissue from lung cancer patients. *Cancer Res*. 1988 Jun 1;48(11):3140-7.
- 108 Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P, Zhang QJ, Masucci MG, Kiessling R. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med*. 1994 Dec 1;180(6):2371-6.
- 109 Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, Sotomayor CE. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that

- induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol.* 1998 May 15;160(10):4831-40.
- 110 Natalia Mariano Norberto W, Zwirner, Marta A, Toscano, Alicia Bravo, Jose´ Mordoh, Leonardo Fainboim, Osvaldo L. Podhajcer, and Gabriel A. Rabinovich. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer cell.* 2004 5:241-251.
- 111 Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2001 Dec;21(24):8247-54.
- 112 Medema JP, de Jong J, van Hall T, Melief CJ, Offringa R. Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med.* 1999 Oct 4;190(7):1033-8.
- 113 Reed JC. The Survivin saga goes in vivo. *J Clin Invest.* 2001 Oct;108(7):965-9.
- 114 Bladergroen BA, Meijer CJ, ten Berge RL, Hack CE, Muris JJ, Dukers DF, Chott A, Kazama Y, Oudejans JJ, van Berkum O, Kummer JA. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood.* 2002 Jan 1;99(1):232-7.
- 115 Ugurel S, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Increased soluble CD95 (sFas/CD95) serum level correlates with poor prognosis in melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 2001 May;7(5):1282-6.
- 116 Restifo NP. Countering the 'counterattack' hypothesis. *Nat Med.* 2001 Mar;7(3):259.
- 117 Igney FH, Behrens CK, Krammer PH. Tumor counterattack--concept and reality. *Eur J Immunol.* 2000 Mar;30(3):725-31.
- 118 French LE, Hahne M, Viard I, Radlgruber G, Zanone R, Becker K, Muller C, Tschopp J. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J Cell Biol.* 1996 Apr;133(2):335-43.
- 119 Coley, W. B. (1893) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med.Sci.* 105, 487-511.
- 120 Hall, S. S. (1997) *A Commotion in the Blood*, New York, NY, Henry Holt
- 121 Abou-Jawde R, Choueiri T, Alemany C, Mekhail T. An overview of targeted treatments in cancer. *Clin Ther.* 2003 Aug;25(8):2121-37.
- 122 Jensen M, Winkler U, Manzke O, Engert A "Rapid tumor lysis in a patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and lymphocytosis treated with an anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab)" *Ann Hematol*, 77 (1-2): 89-91, 1998.
- 123 Taji H, Kagami Y, Okada Y, Andou M, Nishi Y, Saito H, Seto M, Morishima Y "Growth inhibition of CD20-positive B lymphoma cell lines by IDEC-C2B8 anti-CD20 monoclonal antibody" *Jpn J Cancer Res*, 89 (7): 748-756, 1998.
- 124 Harris JR, Markl J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron.* 1999 Dec;30(6):597-623.
- 125 Ulmer JB. Toward the development of better vaccine adjuvants. *Expert Opin Biol Ther.* 2002 Feb;2(2):119-21.
- 126 Schultz N, Oratz R, Chen D, Zeleniuch-Jacquotte A, Abeles G, Bystryn JC. Effect of DETOX as an adjuvant for melanoma vaccine. *Vaccine.* 1995 Apr;13(5):503-8.
- 127 Soltysik S, Bedore DA, Kensil CR. Adjuvant activity of QS-21 isomers. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Aug 12;690:392-5.
- 128 Youichi Mizutani, Osamu Yoshida and Benjamin Bonavida "Bacillus Calmette-Guerin (BCG) in the treatment of superficial bladder cancer: Development of resistance to BCG

- and strategies for overcoming resistance to BCG (Review)" *International Journal of Oncology* 11: 79-86, 1997.
- 129 Morton DL, Hsueh EC, Issner R, Foshag LJ, O'Day SJ, Bilchik A, Gupta RK, Hoon DS, Ravindranath M, Nizze JA, Gammon G, Wanek LA, Wang HJ, Elashoff RM. Prolonged survival of patients receiving active immunotherapy with Canvaxin therapeutic polyvalent vaccine after complete resection of melanoma metastatic to regional lymph nodes. *Ann Surg.* 2002 Oct;236(4):438-48; discussion 448-9.
- 130 Fenton RG, Steis RG, Medara K, Zea AH, Ochoa AC, Janik JF, Smith JW 2nd, Gause BL, Sharfman WH, Urba WJ, Hanna MG, DeJager RL, Coyne MX, Crouch RD, Gray P, Beveridge J, Creekmore SP, Holmlund J, Curti BD, Sznol M, Longo DI. "A phase I randomized study of subcutaneous adjuvant IL-2 in combination with an autologous tumor vaccine in patients with advanced renal cell carcinoma" *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19; 5: 364-374, 1996.
- 131 Mitchell MS, Harel W, Kan-Mitchell J, LeMay LG, Goedgebure P, Huang XQ, Hofman F, and Groshen S "Active specific immunotherapy of melanoma with allogeneic cell lysates. Rationale, results, and possible mechanisms of action" *Ann NY Acad Sci*, 690: 153-166, 1993.
- 132 Kim EM, Sivanandham M, Stavropoulos CI, Bartolucci AA, Wallack MK. Overview analysis of adjuvant therapies for melanoma--a special reference to results from vaccinia melanoma oncolysate adjuvant therapy trials. *Surg Oncol.* 2001 Jul-Aug;10(1-2):53-9.
- 133 Miller K, Abeles G, Oratz R, Zeleniuch-Jacquotte A, Cui J, Roses DF, Harris MN, and Bystryn JC "Improved survival of patients with melanoma with an antibody response to immunization to a polyvalent melanoma vaccine" *Cancer* 75 (2): 495-502, 1995.
- 134 Pullarkat V, Lee PP, Scotland R, Rubio V, Groshen S, Gee C, Lau R, Snively J, Sian S, Wolfe SL, Wolfe RA, Weber JS. A phase I trial of SD-9427 (progenipointin) with a multipeptide vaccine for resected metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2003 Apr;9(4):1301-12.
- 135 Ragupathi G, Livingston PO, Hood C, Gathuru J, Krown SE, Chapman PB, Wolchok JD, Williams LJ, Oldfield RC, Hwu WJ. Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res.* 2003 Nov 1;9(14):5214-20.
- 136 Ragupathi G, Meyers M, Adluri S, Howard L, Musselli C, Livingston PO. Induction of antibodies against GD3 ganglioside in melanoma patients by vaccination with GD3-lactone-KLH conjugate plus immunological adjuvant QS-21. *Int J Cancer.* 2000 Mar 1;85(5):659-66.
- 137 Cappello S, Liu NX, Musselli C, Brezicka FT, Livingston PO, Ragupathi G. Immunization of mice with fucosyl-GM1 conjugated with keyhole limpet hemocyanin results in antibodies against human small-cell lung cancer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 1999 Dec;48(9):483-92.
- 138 Knutson KL. GMK (Progenics Pharmaceuticals). *Curr Opin Investig Drugs.* 2002 Jan;3(1):159-64.
- 139 Chapman PB, Morrissey DM, Panageas KS, Hamilton WB, Zhan C, Destro AN, Williams L, Israel RJ, Livingston PO. Induction of antibodies against GM2 ganglioside by immunizing melanoma patients using GM2-keyhole limpet hemocyanin + QS21 vaccine: a dose-response study. *Clin Cancer Res.* 2000 Mar;6(3):874-9.
- 140 Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sosman JA, Sondak VK, Agarwala SS, Ernstoff MS, Rao U. High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III

- melanoma: results of intergroup trial 1:1694/S9512/C509801. *J Clin Oncol*. 2001 May 1;19(9):2370-80.
- 141 Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Nov 15;87(22):1681-5.
- 142 Lynch HT, Guirgis HA, Albert S, Brennan M, Lynch J, Kraft C, Pocekay D, Vaughns C, Kaplan A. Familial association of carcinoma of the breast and ovary. *Surg Gynecol Obstet*. 1974 May;138(5):717-24.
- 143 Liu ET. Oncogenes, breast cancer, and chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl*. 1993;17G:161-6.
- 144 Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994 Oct 7;266(5182):66-71.
- 145 Tutt A, Ashworth A. The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol Med*. 2002 Dec;8(12):571-6.
- 146 Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994 Sep 30;265(5181):2088-90.
- 147 Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH, Rosner BA. Family history, age, and risk of breast cancer. Prospective data from the Nurses' Health Study. *JAMA*. 1993 Jul 21;270(3):338-43.
- 148 Sasco AJ, Kaaks R, Little RE. Breast cancer: occurrence, risk factors and hormone metabolism. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2003 Aug;3(4):546-62.
- 149 McMichael AJ, Giles GG. Cancer in migrants to Australia: extending the descriptive epidemiological data. *Cancer Res*. 1988 Feb 1;48(3):751-6.
- 150 Deapen D, Liu L, Perkins C, Bernstein L, Ross RK. Rapidly rising breast cancer incidence rates among Asian-American women. *Int J Cancer*. 2002 Jun 10;99(5):747-50.
- 151 Kinlen LJ. Meat and fat consumption and cancer mortality: A study of strict religious orders in Britain. *Lancet*. 1982 Apr 24;1(8278):946-9.
- 152 Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Speizer FE. Dietary fat and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 1987 Jan 1;316(1):22-8.
- 153 Bingham SA, Luben R, Welch A, Wareham N, Khaw KT, Day N. Are imprecise methods obscuring a relation between fat and breast cancer? *Lancet*. 2003 Jul 19;362(9379):212-4.
- 154 Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res*. 1988 Jan 15;48(2):246-53.
- 155 Brinton LA, Hoover R, Fraumeni Jr. Reproductive factors in the aetiology of breast cancer. *Br J Cancer*. 1983 Jun;47(6):757-62.
- 156 Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. 1972 Mar;48(3):605-13.
- 157 <http://www.cancer.gov/cancerinfo/pdq/treatment/breast/healthprofessional/>
- 158 Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of radiotherapy and surgery in early breast cancer. An overview of the randomized trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *N Engl J Med* 1996 Apr 11;334(15):1003.
- 159 Ward HW. Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. *Br Med J*. 1973 Jan 6;1(5844):13-4.
- 160 Barker S. Anti-estrogens in the treatment of breast cancer: current status and future directions. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003 Jun;4(6):652-7.

- 161 Kobayashi H, Wood M, Song Y, Appella E, Celis E. Defining promiscuous MHC class II helper T-cell epitopes for the HER2/neu tumor antigen. *Cancer Res.* 2000 Sep 15;60(18):5228-36.
- 162 Ma J, Cao L. Characterization and evaluation of a novel anti-MUC-1 monoclonal antibody: induction of the idiotypic network in experimental mice. *Chin Med J (Engl).* 2003 Dec;116(12):1879-84.
- 163 Peoples GE, Anderson BW, Lee TV, Murray JL, Kudelka AP, Wharton JT, Ioannides CG. Vaccine implications of folate binding protein, a novel cytotoxic T lymphocyte-recognized antigen system in epithelial cancers. *Clin Cancer Res.* 1999 Dec;5(12):4214-23.
- 164 Carr JA, Havstad S, Zarbo RJ, Divine G, Mackowiak P, Velanovich V. The association of HER-2/neu amplification with breast cancer recurrence. *Arch Surg.* 2000 Dec;135(12):1469-74.
- 165 <https://www.her2status.com/frames.htm>
- 166 Sledge GW Jr. Gemcitabine, paclitaxel, and trastuzumab in metastatic breast cancer. *Oncology (Huntingt).* 2003 Dec;17(12 Suppl 14):33-5.
- 167 Lara PN Jr, Laptalo L, Longmate J, Lau DH, Gandour-Edwards R, Gumerlock PH, Doroshow JH, Gandara DR. Trastuzumab plus Docetaxel in HER2/neu-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: A California Cancer Consortium Screening and Phase II Trial. *Clin Lung Cancer.* 2004 Jan;5(4):231-6.
- 168 Hernando JJ, Park TW, Kuhn WC. Dendritic cell-based vaccines in breast and gynaecologic cancer. *Anticancer Res.* 2003 Sep-Oct;23(5b):4293-303.
- 169 Croce MV, Segal-Eiras A. The use of carbohydrate antigens for the preparation of vaccines for therapy in breast cancer. *Drugs Today (Barc).* 2002 Nov;38(11):759-68.
- 170 <http://www.biomira.com/investors/theratopeInterimAnalysis/>
- 171 Ibrahim NK, Murray JL. Clinical Development of the STn-KLH Vaccine (Theratope(R)). *Clin Breast Cancer.* 2003 Feb;3 Suppl 4:S139-43.
- 172 Gilewski T, Ragupathi G, Bhuta S, Williams LJ, Musselli C, Zhang XF, Bornmann WG, Spassova M, Benesath KP, Panageas KS, Chin J, Hudis CA, Norton L, Houghton AN, Livingston PO, Danishefsky SJ. Immunization of metastatic breast cancer patients with a fully synthetic globo H conjugate: a phase I trial. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 13;98(6):3270-5.
- 173 Clarke R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;39(1):69-86.
- 174 Watson CJ. The search for breast cancer therapies--the value of genetically engineered mice. *Transgenic Res.* 2002 Dec;11(6):615.
- 175 Shi HY, Zhang W, Liang R, Kittrell F, Templeton NS, Medina D, Zhang M. Modeling human breast cancer metastasis in mice: maspin as a paradigm. *Histol Histopathol.* 2003 Jan;18(1):201-6.
- 176 Daniel E, Gomez y Daniel F, Alonso. Introducción a la Oncología Molecular. Universidad nacional de Quilmes. 1978. ISBN: 987-9173-29-5
- 177 Alonso DF, Farias EF, Urtreger A, Ladedá V, Vidal MC, Bal De Kier Joffe E. Characterization of F3H, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 1996 Aug;62(4):288-97.
- 178 Hassan MM, Mostafa N, Sultan M, Gaafar M, Mostafa N. Idiotypic regulation in *Schistosomiasis mansoni*. *J Egypt Soc Parasitol.* 1999 Aug;29(2):451-8.
- 179 Ullman EF, Milburn G, Jelesko J, Radika K, Pirio M, Kempe T, Skold C. Anti-immune complex antibodies enhance affinity and specificity of primary antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Feb 15;90(4):1184-9.

- 180 Goidl EA, Thorbecke GJ, Weksler ME, Siskind GW. Production of auto-anti-idiotypic antibody during the normal immune response: changes in the auto-anti-idiotypic antibody response and the idiotype repertoire associated with aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Nov;77(11):6788-92.
- 181 Geha RS, Comunale M. Regulation of immunoglobulin E antibody synthesis in man by antiidiotypic antibodies. *J Clin Invest*. 1983 Jan;71(1):46-54.
- 182 Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)*. 1974 Jan;125C(1-2):373-89. *Ann Immunol (Paris)*. 1974 Jan;125C(1-2):373-89.
- 183 Jerne NK, Roland J, Cazenave PA. Recurrent idiotopes and internal images. *EMBO J*. 1982;1(2):243-7.
- 184 Jerne NK. Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol Rev*. 1984 Jun;79:5-24.
- 185 Gaulton GN, Greene MI. Idiotypic mimicry of biological receptors. *Annu Rev Immunol*. 1986;4:253-80.
- 186 Kelus AS, Gell PG. Immunological analysis of rabbit anti-antibody systems. *J Exp Med*. 1968 Jan 1;127(1):215-34.
- 187 Vazquez AM, Alfonso M, Lanne B, Karlsson KA, Carr A, Barroso O, Fernandez LF, Rengifo E, Lanio ME, Alvarez C, et al. Generation of a murine monoclonal antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids. *Hybridoma*. 1995 Dec;14(6):551-6.
- 188 Moreno E, Lanne B, Vazquez AM, Kawashima I, Tai T, Fernandez LF, Karlsson KA, Angstrom J, Perez R. Delineation of the epitope recognized by an antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides. *Glycobiology*. 1998 Jul;8(7):695-705.
- 189 Perez A, Mier ES, Vispo NS, Vazquez AM, Perez Rodriguez R. A monoclonal antibody against NeuGc-containing gangliosides contains a regulatory idiotope involved in the interaction with B and T cells. *Mol Immunol*. 2002 Sep;39(1-2):103-12.
- 190 Vazquez AM, Gabri MR, Hernandez AM, Alonso DF, Beausoleil I, Gomez DF, Perez R. Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to N-glycolyl-containing gangliosides. *Oncol Rep*. 2000 Jul-Aug;7(4):751-6.
- 191 Vazquez AM, Perez A, Hernandez AM, Macias A, Alfonso M, Bombino G, Perez R. Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody. *Hybridoma*. 1998 Dec;17(6):527-34.
- 192 Aguirre Ghiso J, Diament M, D'elia I, Bal de Kier Joffe E, Klein S. Effects of in vivo culture of murine mammary adenocarcinoma cells on tumor and metastatic growth. *Tumour Biol*. 1997;18(1):41-52.
- 193 Bal de Kier Joffe, Dutra HS, Puricelli L, Klein S, Diament M, Bonaparte Y, Borojevic R. Producción in vitro de factores hematopoyéticos por adenocarcinomas mamarios murinos. *Medicina (B. Aires)* 1993;53:108
- 194 Vedralova E, Borovansky J, Hach P. Ganglioside profiles of experimental melanomas and of their melanosomal fractions. *Melanoma Res*. 1995 Apr;5(2):87-92.
- 195 Niggli HJ, Cerutti PA. Cyclobutane-type pyrimidine photodimer formation and excision in human skin fibroblasts after irradiation with 313-nm ultraviolet light. *Biochemistry*. 1983 Mar 15;22(6):1390-5.
- 196 Arch Dermatol 1987 Feb;123(2):241-50. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. Kraemer KH, Lee MM, Scotto J.
- 197 Nature 1995 Sep 14;377(6545):169-73. Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA. de Vries A, van Oostrom CT, Hofhuis FM, Dortant PM, Berg RJ, de Gruijl FR, Wester PW, van Kreijl CF, Capel PJ, van Steeg H, et al.

- 198 Nature 1995 Sep 14;377(6545):162-5. High susceptibility to ultraviolet-induced carcinogenesis in mice lacking XPC. Sands AT, Abuin A, Sanchez A, Conti CJ, Bradley A.
- 199 Tommasi S, Denissenko MF, Pfeifer GP. Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases. Cancer Res. 1997 Nov 1;57(21):4727-30.
- 200 Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Ponten J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Nov 15;88(22):10124-8.
- 201 Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. Nature. 1994 Dec 22-29;372(6508):773-6.
- 202 Tyrrell RM, Pidoux M. Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet, and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res. 1987 Apr 1;47(7):1825-9.
- 203 Unna PG: Die Histopathologie der Hautkrankheiten. Berlin: August Hirschwald, 1894.
- 204 Dubreuilh W. Des hyperkeratoses circonscriptes. Ann Derm et Syph 1896, 7, 1158-1204
- 205 Roffo AH. Cancer et soleil. Carcinomes et sarcomas provoqué par l'action du soleil in toto. Bull Assoc Fra Étude Cancer 1934, 23, 590-616.
- 206 Lancaster HO. Some geographical aspects of the mortality from melanoma in Europeans. Med J Aust 1956;1:1082.
- 207 Dubin N, Pasternack BS, Moseson M. Simultaneous assessment of risk factors for malignant melanoma and non-melanoma skin lesions, with emphasis on sun exposure and related variables. Int J Epidemiol 1990;19:811.
- 208 Carli P, Biggeri A, Nardini P, et al. Sun exposure and large numbers of common and atypical melanocytic naevi: an analytical study in a southern European population. Br J Dermatol 1998;138:422.
- 209 Goldstein AM, Tucker MA. Etiology, epidemiology, risk factors, and public health issues of melanoma. Curr Opin Oncol 1993;5:358.
- 210 Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies Int J Cancer. 1997 Oct 9;73(2):198-203
- 211 Elwood JM, Koh HK. Etiology, epidemiology, risk factors, and public health issues of melanoma Curr Opin Oncol. 1994 Mar;6(2):179-87
- 212 Clark WH Jr, Elder DE, Guerry DT, et al. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. Hum Pathol 1984;15:1147.
- 213 Elder DE, Clark WH Jr, Elenitsas R, et al. The early and intermediate precursor lesions of tumor progression in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. Semin Diagn Pathol 1993;10:18.
- 214 Valyi-Nagy I, Rodeck U, Kath R, et al. The human melanocyte system as a model for studies on tumor progression. Basic Life Sci 1991;57:315.
- 215 NIH Consensus Development Panel on Early Melanoma: Diagnosis and treatment of early melanoma. Journal of the American Medical Association 268(10): 1314-1319, 1992.
- 216 Veronesi U, Cascinelli N: Narrow excision (1-cm margin): a safe procedure for thin cutaneous melanoma. Archives of Surgery 126(4): 438-441, 1991.
- 217 Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group trial E1684. Journal of Clinical Oncology 14(1): 7-17, 1996.
- 218 Balch CM, Buzaid AC: Finally, a successful adjuvant therapy for high-risk melanoma. Journal of Clinical Oncology 14(1): 1-3, 1996.

- 219 Kirkwood J, Hunt M, Smith T, Ernstoff M, Borden E, Blum R "A randomized controlled trial of high-dose INF alfa -2b for high-risk melanoma: The ECOG trial E51-1684" Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol; 12:A1331 1993
- 220 Legha SS: Current therapy for malignant melanoma. *Seminars in Oncology* 16(1, Suppl 1): 34-44, 1989.
- 221 Sause WT, Cooper JS, Rush S, et al. Fraction size in external beam radiation therapy in the treatment of melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;20:429
- 222 National Cancer Institute DoCPaC. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. CD-ROM de uso público (1973-1994). National Cancer Institute, Surveillance Program, Statistics Branch, 1997.
- 223 Desmond RA, Soong SJ. Epidemiology of malignant melanoma. *Surg Clin North Am.* 2003 Feb;83(1):1-29.
- 224 Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* 1975 Jan;35(1):218-24.
- 225 Fidler IJ, Nicolson GL. Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *J Natl Cancer Inst.* 1976 Nov;57(5):1199-202.
- 226 Kohla G, Stockfleth E, Schauer R. Gangliosides with O-acetylated sialic acids in tumors of neuroectodermal origin. *Neurochem Res.* 2002 Aug;27(7-8):583-92
- 227 Cheresch, D. A., Reisfeld, R. A., and Varki, A. P. 1984. O-acetylation of disialoganglioside GD3 by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant. *Science* 225:844-846.
- 228 Dumontet C, Portoukalian J. Gangliosides and cancer *Bull Cancer.* 1991;78(9):789-99
- 229 Wetzler LM, Ho Y, Reiser H, Wetzler LW. Neisserial porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate. *J Exp Med.* 1996 Mar 1;183(3):1151-9.
- 230 Hirabayashi Y, Hamaoka A, Matsumoto M, Matsubara T, Tagawa M, Wakabayashi S, Taniguchi M. Syngeneic monoclonal antibody against melanoma antigen with interspecies cross-reactivity recognizes GM3, a prominent ganglioside of B16 melanoma. *J Biol Chem.* 1985 Oct 25;260(24):13328-33.
- 231 Muthing J, Maurer U, Kniep B, Weber-Schurholz S "Glycosphingolipids of skeletal muscle: V. Subcellular distribution of neutral glycosphingolipids and gangliosides in rabbit skeletal muscle" *Carbohydr Res*; 307(1-2): 135-145, 1998.
- 232 Yang FY, Wang LH, Yang XY, Tsui ZC, Tu YP "The role of ganglioside GM3 in the modulation of conformation and activity of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase" *Biophys Chem*; 68(1-3): 137-146, 1997
- 233 Alonso DF, Farias EF, Urtreger A, Ladedá V, Vidal MC, Bal De Kier Joffe E. Characterization of F3H, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 1996 Aug;62(4):288-97.
- 234 Metcalf D. Cellular hematopoiesis in the twentieth century. *Semin Hematol.* 1999 Oct;36(4 Suppl 7):5-12.
- 235 Van Kroonenburgh MJ, Pauwels EK. Human immunological response to mouse monoclonal antibodies in the treatment or diagnosis of malignant diseases. *Nucl Med Commun.* 1988 Nov;9(11):919-30.
- 236 Kuus-Reichel K, Grauer LS, Karavodin LM, Knott C, Krusemeier M, Kay NE. Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies? *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994 Jul;1(4):365-72.
- 237 Kim JA. Targeted therapies for the treatment of cancer. *Am J Surg.* 2003 Sep;186(3):264-8.
- 238 Nihira S. Development of HER2-specific humanized antibody Herceptin (trastuzumab). *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2003 Dec;122(6):504-14.

- 239 Sato K, Onuma E, Yocum RC, Ogata E. Treatment of malignancy-associated hypercalcemia and cachexia with humanized anti-parathyroid hormone-related protein antibody. *Semin Oncol*. 2003 Oct;30(5 Suppl 16):167-73.
- 240 Gruber R, van Haarlem IJ, Warnaar SO, Holz E, Riethmuller G. The human antimouse immunoglobulin response and the anti-idiotypic network have no influence on clinical outcome in patients with minimal residual colorectal cancer treated with monoclonal antibody CO17-1A. *Cancer Res*. 2000 Apr 1;60(7):1921-6.
- 241 DeNardo GL, Bradt BM, Mirick GR, DeNardo SJ. Human antiglobulin response to foreign antibodies: therapeutic benefit? *Cancer Immunol Immunother*. 2003 May;52(5):309-16. Epub 2003 Mar 04.
- 242 Wirguin I, Suturkova-Milosevic L, Briani C, Latov N. Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(beta 1-3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T antigen. *Cancer Immunol Immunother*. 1995 May;40(5):307-10.
- 243 Pike IJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*. 2003 Apr;44(4):655-67. Epub 2003 Feb 01.
- 244 Wang XQ, Sun P, Paller AS. Ganglioside GM3 blocks the activation of epidermal growth factor receptor induced by integrin at specific tyrosine sites. *J Biol Chem*. 2003 Dec 5;278(49):48770-8. Epub 2003 Sep 25.
- 245 Malisan F, Testi R. GD3 ganglioside and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Dec 30;1585(2-3):179-87.
- 246 Miljan EA, Bremer EG. Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci STKE*. 2002 Nov 26;2002(160):RE15.
- 247 Bremers AJ, Parmiani G. Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000 Apr;34(1):1-25.
- 248 Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*. 2001 Mar 21;19(17-19):2666-72.
- 249 O'Hagan DT, Ott GS, Van Nest G. Recent advances in vaccine adjuvants: the development of MF59 emulsion and polymeric microparticles. *Mol Med Today*. 1997 Feb;3(2):69-75.
- 250 Estevez F, Carr A, Solorzano L, Valiente O, Mesa C, Barroso O, Sierra GV, Fernandez LE. Enhancement of the immune response to poorly immunogenic gangliosides after incorporation into very small size proteoliposomes (VSSP). *Vaccine*. 1999 Aug 20;18(1-2):190-7.
- 251 Radvanyi L. Discovery and Immunologic Validation of New Antigens for Therapeutic Cancer Vaccines. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;133(2):179-197. Epub 2004 Feb 05.
- 252 Ragupathi G, Koide F, Sathyan N, Kagan E, Spassova M, Bornmann W, Gregor P, Reis CA, Clausen H, Danishefsky SJ, Livingston PO. A preclinical study comparing approaches for augmenting the immunogenicity of a heptavalent K1H-conjugate vaccine against epithelial cancers. *Cancer Immunol Immunother*. 2003 Oct;52(10):608-16. Epub 2003 Jun 17.
- 253 Carr A, Rodriguez E, Arango Mdel C, Camacho R, Osorio M, Gabri M, Carrillo G, Valdes Z, Bebelagua Y, Perez R, Fernandez LE. Immunotherapy of advanced breast cancer with a heterophilic ganglioside (NeuGcGM3) cancer vaccine. *J Clin Oncol*. 2003 Mar 15;21(6):1015-21.
- 254 Keppler OT, Horstkorte R, Pawlita M, Schmidt C, Reutter W. Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glycobiology*. 2001 Feb;11(2):11R-18R.
- 255 *Cancer Res* 1975 Jan;35(1):218-24 "Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo" Fidler IJ.

- 256 Cancer Res 1976 Sep;36(9 pt.1):3160-5 "Characterization in vivo and in vitro of tumor cells selected for resistance to syngeneic lymphocyte-mediated cytotoxicity" Fidler IJ, Gersten DM, Budmen MB.
- 257 D.F. Alonso, E.F. Fariás, A. Urtreger, V. Laceda, M.C. Vidal, E. Bal de Kier Joffé, Characterization of F3II, a mammary sarcomatoid carcinoma cell line originated from a mouse adenocarcinoma, J. Surg. Oncol. 62 (1996) 288-297.
- 258 Vazquez AM, Perez A, Hernandez AM, Macias A, Alfonso M, Bombino G, Perez R. Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody. Hybridoma. 1998 Dec;17(6):527-34.
- 259 Folch PJ, Arsove S, and Meath JA "Isolation of brain strandin, a new type of large molecular tissue component" J Biol, Chem 191: 819-831, 1951.
- 260 Lowell GH, Smith LF, Seid RC, and Zollinger WD "Peptides bound to proteosomes via hydrophobic feet become highly immunogenic without adjuvants" J Exp Med 167: 658-663, 1988.
- 261 Roth J "Light and electron microscopic localization of glycoconjugated with gold-labeled reagents. Scanning Microsc 1:695-704, 1987.
- 262 D.F. Alonso, A.M. Tejera, E.F. Fariás, E. Bal de Kier Joffé, D.E. Gomez, Inhibition of mammary tumor cell adhesion, migration, and invasion by the selective synthetic urokinase inhibitor B428, Anticancer Res. 18 (1998) 4499-504.
- 263 Zachary AA, Klingman L, Thorne N, Smerglia AR, and Teresi GA "Variations of the lymphocytotoxicity test. An evaluation of sensitivity and specificity. Transplantation 60: 498-503, 1995.