



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Segatori, Valeria Inés

Rol del ácido neuramínico glicolilado (NGc) en la biología tumoral : desarrollo de nuevos modelos murinos



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Segatori, V. I. (2014). *Rol del ácido neuramínico glicolilado (NGc) en la biología tumoral. Desarrollo de nuevos modelos murinos. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/125>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Rol del ácido neuramínico glicolilado (NGc) en la biología tumoral. Desarrollo de nuevos modelos murinos

TESIS DOCTORAL

Valeria I. Segatori

valeriasegatori@gmail.com

Resumen

Se definen como glicoconjugados a las macromoléculas biológicas modificadas mediante el agregado de carbohidratos. Dentro de esta amplia familia de compuestos se incluyen a los gangliósidos, glicolípidos formados por una porción ceramida unida covalentemente a un oligosacárido lineal que puede contener uno o más residuos de ácido siálico (Sia). Los Sias más comunes en mamíferos son N-acetilneuramínico (NAc) y N-glicilneuramínico (NGc), siendo la única diferencia entre ellos el agregado de un átomo de oxígeno en el residuo N-acetilo del NAc, catalizado por la enzima CMAH (CMP-NAc hidroxilasa).

Los gangliósidos se distribuyen en la superficie celular formando agregados específicos denominados microdominios de membrana. Como integrantes de estas estructuras, ha sido reportado que participan como intermediarios en el flujo de información que ocurre entre el exterior e interior celular al asociarse con diversas proteínas de la membrana y modular múltiples rutas de señalización.

Debido a una mutación en el gen CMAH, normalmente no se detectan glicoconjugados que presenten NGc en los tejidos humanos sanos. Sin embargo, se describió la expresión de este ácido siálico en una gran variedad de tumores. La hipótesis más aceptada para explicar este fenómeno propone que debido a un incremento en su capacidad metabólica, las células tumorales son capaces de captar e incorporar NGc del microambiente, el cual se hace presente debido a la ingesta dietaria en particular de carnes y leche. Numerosos trabajos indican que la presencia de NGc en células transformadas les proporciona ventajas adaptativas relacionadas principalmente con la capacidad de evasión del sistema inmune. Considerando la exclusiva expresión en células tumorales y teniendo en cuenta el papel que representan para la biología tumoral, NGc y particularmente el gangliósido NGcGM3 han sido postulados como blancos específicos contra los cuales dirigir inmunoterapias oncológicas.

En el presente trabajo se desarrollaron modelos murinos de expresión de NGcGM3 con el fin de llevar adelante ensayos preclínicos de dos vacunas dirigidas a dicho gangliósido. Adicionalmente, se estudió la participación de NGcGM3 en la biología de las células tumorales utilizando un modelo murino de melanoma.

Buscando desarrollar modelos murinos de expresión de NGc, mediante la transfección de la secuencia de CMAH se obtuvieron células de melanoma B16 y carcinoma mamario F3II con expresión de NGcGM3, denominadas B16-H y F3II-H respectivamente. Un tercer modelo desarrollado consistió en la preincubación de células de carcinoma pulmonar de Lewis 3LL con NGc purificado (3LL-NGc), de manera de lograr la expresión de NGcGM3 en la superficie celular.

Los resultados demostraron que la presencia de NGcGM3 en células B16-H induce un incremento en la expresión de integrina $\alpha 5$ en la membrana plasmática y, como consecuencia, una mayor capacidad

adhesiva. Por su parte, se observó el descenso e internalización hacia el espacio citoplasmático de cav-1, una proteína de membrana involucrada en la organización de moléculas que participan en procesos de señalización celular. Esto se asoció con una disminución en la expresión de la kinasa Src y la Rho-GTPasa Rac1. Sin embargo, la proliferación celular se encontró incrementada en estas células sugiriendo la activación de vías de crecimiento independientes de anclaje como consecuencia de la expresión de NGcGM3. En los modelos F3II-H y 3LL-NGc se observaron resultados similares en cuanto a la proliferación y adhesión celular. Los resultados obtenidos sugieren que el aumento de NGcGM3 en la membrana plasmática, como posiblemente de otros glicoconjugados con residuos N-glicolilados, promueve la malignidad celular *in vitro* mediante la alteración en la estructura y/o composición de microdominios de membrana.

Los ensayos de crecimiento tumoral *in vivo* permitieron determinar que la tumorigenicidad de células B16-H y F3II-H, con expresión estable de NGcGM3, se encontró disminuida en comparación con las líneas parentales. Cuando F3II-H fue inoculada en ratones atímicos, no se observaron diferencias en las curvas de crecimiento de los tumores desarrollados al comparar con F3II. Por otro lado, la incorporación de NGc a células 3LL incrementó su potencial metastásico, observándose una mayor cantidad de nódulos formados en el pulmón cuando son inoculadas en animales singénicos por vía i.v. Estos resultados permiten postular que la expresión estable de NGcGM3 en células de melanoma y mama induciría una respuesta inmunológica por parte del animal. Contrariamente, la expresión transitoria, durante los primeros días del desarrollo tumoral, podría promover la progresión del tumor.

Por último, los modelos B16-H y 3LL-NGc fueron empleados en la valoración de la actividad antitumoral de las vacunas NGcGM3/VSSP y racotumomab, respectivamente. Ambos preparados resultaron efectivos contra el desarrollo de tumores y dependientes de la expresión del blanco NGcGM3. Se obtuvieron evidencias que demuestran la factibilidad de la combinación de racotumomab con quimioterapia estándar, así como también la inducción de anticuerpos anti-NGcGM3 capaces de reconocer al tumor luego de la vacunación con la misma.

El presente trabajo pone de manifiesto la importancia que presenta el uso de modelos murinos adecuados en la investigación oncológica. Su correcto desarrollo permite comprender el papel que desempeñan blancos específicos como éste en la biología tumoral, así como también entender y validar el mecanismo de acción de terapias novedosas dirigidas contra los mismos. Los datos experimentales presentados en esta tesis refuerzan el significado biológico del gangliósido NGcGM3 como un blanco para inmunoterapia.

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

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

- Segatori VI, Otero LL, Fernandez LE, Gomez DE, Alonso DF, Gabri MR. Antitumor protection by NGcGM3/VSSP vaccine against transfected B16 mouse melanoma cells overexpressing N-glycosylated gangliosides. **In vivo** 26(4):609-617, **2012**.
- Segatori VI, Vazquez AM, Gomez DE, Gabri MR and Alonso DF. Preclinical evaluation of racotumomab, an anti-idiotypic monoclonal antibody to N- glycosyl-containing gangliosides, with or without chemotherapy in a mouse model of non-small cell lung cancer. **Frontiers in Oncology** 2:160, **2012**.
- Guthmann MD, Venier C, Toledo D, Segatori VI, Alonso DF, Fainboim L, Vazquez AM and Ostrowski H. Anti-ganglioside antibodies induced in chickens by an alum-adsorbed anti-idiotypic antibody targeting NeuGcGM3. **Frontiers in Immunology** 3:422, **2012**.

Los resultados presentados en esta tesis fueron presentados en los siguientes congresos nacionales e internacionales:

- Segatori V, Alberto M, Cuello H, Gomez D, Alonso D, Gabri M. La sobreexpresión de NGcGM3 modifica la composición de la membrana plasmática y estimula el perfil proliferativo aun cuando inhibe la señalización vía c-Src/Rac1 en células B16. LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 2013. Mar del Plata, Buenos Aires.
- Segatori VI, Alberto M, Gomez DE, Alonso DF, Gabri MR. Induced expression of N-glycosylneuraminic acid in B16 melanoma cells modulates caveolin-1 and Integrin $\alpha 5$ expression and promotes mesenchymal-like morphology. 2 Congreso Latinoamericano de Glicobiología. 2013. Mexico D.F., Mexico.

- Segatori VI, Gomez DE, Alonso DF, Gabri MR. Racotumomab antitumor activity in the murine model of non small cell lung carcinoma 3LL is related with the level of expression of NGcGM3. 103rd Annual Meeting, American Association for Cancer Research (AACR) 2012. Chicago, EE.
- Segatori VI, Cabrera M, Gomez DE, Alonso DF, Gabri MR. Evaluacion de la Combinacion de Inmunoterapia con Quimioterapia en un Modelo Metastatico de Cancer Pulmonar Murino. LVI Reunion Cientifica Anual de la Sociedad Argentina de Investigacion Clinica. 2011. Mar del Plata, Buenos Aires.
- Segatori VI, Otero LL, Gomez DE, Alonso DF, Gabri MR. Role of NGc-GM3 gangliosides in tumor biology in melanoma and breast cancer mouse models. Keystone Symposia: New Frontiers at the Interface of Immunity and Glycobiology. Fairmont Chateau.2011. Lake Louise, Alberta, Canada.
- Segatori VI., Otero LL., Gomez DE., Alonso DF, Gabri MR. La re-expresion de la enzima que cataliza la sintesis de gangliosidos N-glicolilados modula la tumorigenicidad en los tumores murinos B16 y F3II. LIV reunion anual de la Sociedad Argentina de Investigacion Clinica. 2009. Mar del Plata, Buenos Aires.
- Segatori VI, Otero LL, Gomez DE, Alonso DF, Gabri MR. Evaluacion del efecto antitumoral de la vacuna NeuGcGM3/VSSP en un modelo murino de melanoma con expresion estable de gangliosidos glicolilados. LIII reunion anual de la Sociedad Argentina de Investigacion Clinica. 2008. Mar del Plata, Buenos Aires.

Los resultados relacionados con la inmunoterapia activa a base de racotumomab (Vaxira®) formaron parte del conjunto de información preclínica del dossier del producto que durante 2013 obtuvo el registro condicional para su uso en el tratamiento de pacientes con carcinoma pulmonar en estadios avanzados en Argentina.

Índice

Abreviaturas

Introducción

Participación de los carbohidratos en la biología celular

Gangliósidos

Ácidos siálicos

Función biológica de los gangliósidos

Participación de los gangliósidos en microdominios de membrana y glicosinapsis

Interacción de gangliósidos con proteínas de membrana

Cáncer

Cáncer de pulmón

Melanoma

Biología del cáncer

Glicosilación aberrante en tumores

Gangliósidos en la biología tumoral

Inmunología del cáncer

Antígenos tumorales

Inmunogenicidad tumoral

Inmunovigilancia del cáncer

Inmunosupresión y progresión tumoral

Inmunoterapia del cáncer

Un poco de historia

Clasificación

Inmunoterapia pasiva

Inmunoterapia activa

Inmunoterapia a base de gangliósidos

Vacuna NAcGM3: experiencia de nuestro grupo con vacunas a base de gangliósidos

El gangliósido NGcGM3: biología tumoral e inmunoterapia

Objetivos

Objetivo general

Objetivos específicos

Materiales y Métodos

Resultados

Capítulo I

Participación de NGcGM3 en la biología de células tumorales

La transfección de la secuencia de CMAH aumenta la presencia de NGcGM3 en la membrana de

células de melanoma B16-H y carcinoma mamario F3II-H

La expresión de NGcGM3 desciende a lo largo de los pasajes in vitro durante el mantenimiento de B16-H en cultivo

La preincubación de células 3LL con NGc purificado aumenta la presencia en membrana de NGcGM3

La presencia de NGcGM3 aumenta los niveles de integrina $\alpha 5$ en la membrana celular

NGcGM3 disminuye los niveles de caveolina-1 e induce su internalización

NGcGM3 regula negativamente la vía Src/Rac1

NGcGM3 induce cambios en la morfología celular y modifica la reorganización del citoesqueleto de actina

Capítulo II

NGcGM3 modifica el comportamiento in vitro de las células

NGcGM3 incrementa el crecimiento a baja densidad en células B16-H asociado a un aumento en la expresión de ciclina D1

La expresión de NGcGM3 disminuye la tumorigenicidad de las células B16 y F3II transfectadas con CMAH

La expresión de NGcGM3 se asocia con la formación de nódulos pulmonares en células 3LL preincubadas con NGc

Capítulo III

La actividad antitumoral de NGcGM3/VSSP es dependiente de la expresión de NGcGM3

Protección contra la formación espontánea de nódulos pulmonares mediante inmunización con racotumomab

Combinación de la inmunización con racotumomab y quimioterapia estándar

Actividad antitumoral de Racotumomab en el modelo de metástasis experimentales de 3LL

Respuesta inmune específica en animales vacunados con racotumomab

Discusión

Expresión de NGcGM3 en cáncer

Participación de NGcGM3 en microdominios de membrana de células B16-H

NGcGM3 y tumorigenicidad de los modelos murinos

Modelos preclínicos de inmunoterapia basada en NGcGM3

Vacunas NGcGM3/VSSP y racotumomab

NGcGM3 como blanco de inmunoterapia

Conclusiones

Agradecimientos

Referencias

Abreviaturas

AAT	Antígeno asociado a tumor
ADCC	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AET	Antígeno específico de tumor
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina cav-
1	Caveolina-1
CDC	Citotoxicidad celular mediada por complemento
CMAH	CMP-NAC Hidroxilasa
CMP-Sias	Citidin monofosfato-Sias
GPI	Glicofosfatidilinositol GSL Glicosfingolípidos i.m Intramuscular
i.p	Intraperitoneal i.v Intravenoso
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
mAb	Anticuerpo monoclonal
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NAC	Ácido sialílico N-acetilneuramínico NGc Ácido sialílico N-glicolilneuramínico NGF Factor de crecimiento neuronal
NSCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Retrotranscripción s.c Subcutáneo
SCLC	Carcinoma pulmonar de células pequeñas
SFB	Suero fetal bovino
Sias	Ácidos siálicos
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
VSSP	Proteoliposomas de tamaño muy pequeño

Introducción

Participación de los carbohidratos en la biología celular

La adición de carbohidratos a macromoléculas biológicas es un proceso denominado glicosilación, y da lugar a una gran diversidad de moléculas conocidas como glicoconjugados, entre las que se encuentran glicoproteínas y glicolípidos.

La glicobiología es el área de conocimiento que estudia las características y la participación de los carbohidratos, glicanos y glicoconjugados en la biología celular. Constituye un campo de investigación que demuestra un marcado crecimiento en los últimos años.

Los glicoconjugados participan en diversos procesos celulares, particularmente en aquellos que relacionan a la célula con su entorno. Mayormente ubicados en la cara externa de la membrana plasmática, los glicoconjugados cumplen funciones de receptor, de co-receptor y de protección entre otras. Asimismo, la mayoría de las moléculas que son secretadas por las células se encuentran glicosiladas, además de la presencia de una gran variedad de glicanos y glicoconjugados en la matriz extracelular tisular. Aún cuando la glicobiología encuentra en la actualidad muchas preguntas sin resolver, la glicosilación encontrada en tan diversos escenarios biológicos constituye un fuerte indicio de la relevancia que los glicanos y glicoconjugados presentan en la biología celular y tisular.

Los glicoconjugados se definen por la naturaleza de la molécula glicosilada, pudiendo tratarse de una proteína o un lípido. Las glicoproteínas son glicoconjugados en el cual la cadena peptídica tiene unido covalentemente un glicano. Se describen dos tipos de uniones entre el aminoácido participante y el primer azúcar del oligosacárido dando lugar a las uniones de tipo N- y de tipo O-. En la unión N- el glicano se encuentra unido de manera covalente al átomo de nitrógeno libre del residuo del aminoácido asparagina. Por su parte, en la unión O- el glicano se encuentra unido al grupo hidroxilo del residuo de una serina o una treonina. Un tercer tipo de glicoproteínas lo constituyen los proteoglicanos, formados por una o más cadenas de glicosaminoglicanos unidas a un núcleo proteico a través de una región cuyo último residuo es una xilosa unida a una serina. Por último, existen proteínas ancladas a la membrana celular mediante un puente de glicanos denominado glicofosfatidilinositol (GPI), formado por la unión entre un fosfatidilinositol y una etanolamida unida al grupo carboxi- terminal de la proteína (figura 1).

Los glicolípidos o glicoesfingolípidos (GSL) (figura 1), resultan de la combinación de un glicano y una ceramida, usualmente unidos por intermedio de una glucosa o galactosa al grupo hidroxilo terminal de la ceramida. La porción ceramida está constituida por un aminoalcohol de cadena larga, denominado esfingosina, unido mediante un enlace

amida a un ácido graso (figura 2). Los glicolípidos pueden ser clasificados a su vez como neutros o aniónicos, y dentro de este tipo se encuentran los sulfátidos y los sialilados, caracterizados por contener uno o más residuos de ácido siálico.

Gangliósidos

Los glicosfingolípidos sialilados conforman un grupo de moléculas denominado gangliósidos. Estos compuestos fueron descubiertos por Ernst Klenk en la década de 1930 cuando analizaba muestras de tejido cerebral de un paciente con la enfermedad de Tay-Sachs. Klenk encontró una sustancial acumulación de estos glicolípidos en los ganglios nerviosos, derivando de ahí su nombre (Klenk, 1937; Klenk, 1939). Posteriormente, conforme avanzaron las técnicas de purificación, aislamiento y análisis, se identificaron a los gangliósidos como integrantes de diversos tipos de tejidos, en especial en aquellos de origen neuroectodérmico. Los gangliósidos son moléculas de naturaleza anfipática, constituidos por una porción hidrofóbica dada por la porción ceramida, y por una porción hidrofílica formada por un oligosacárido lineal de hasta cuatro residuos sacarídicos neutros, junto a uno o más residuos de ácido siálico (figura 2) (Svennerholm, 1964).

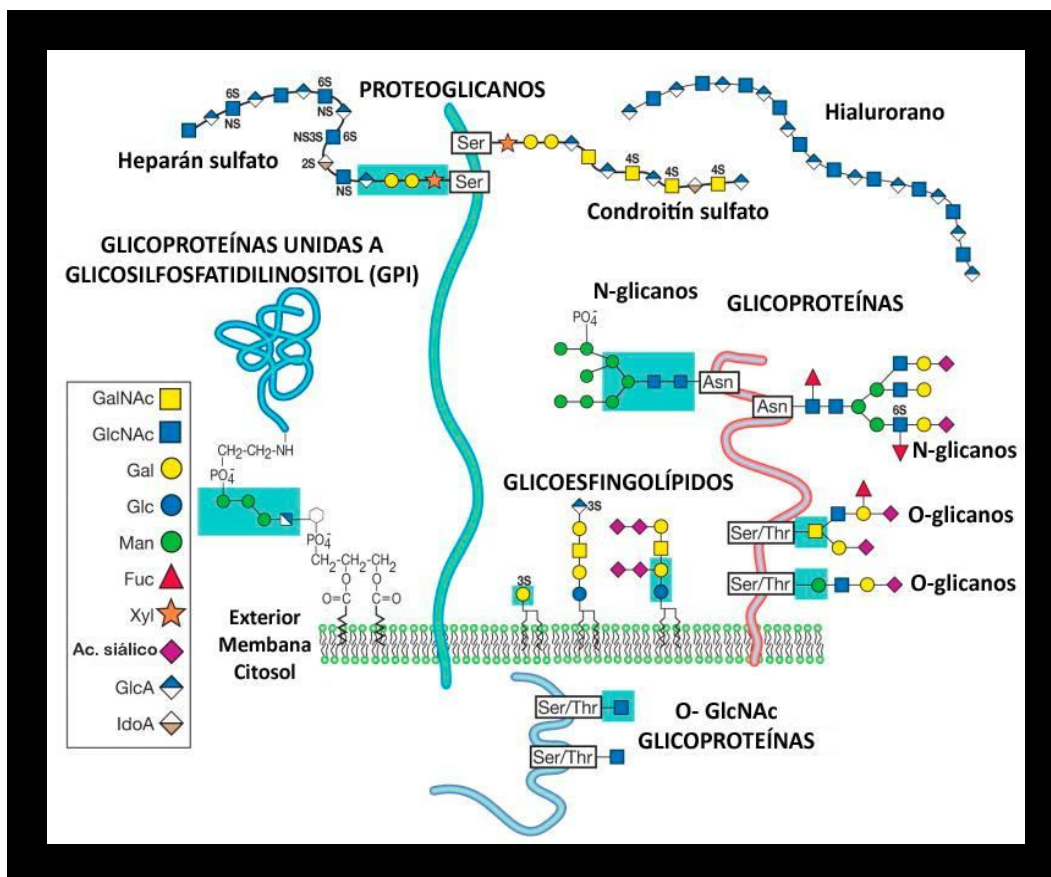


Figura 1 | Clases más comunes de glicanos en células animales. Representación de los diversos glicanos presentes en células animales y su ubicación celular o extracelular. Modificado de "Essentials of glycobiology", segunda edición.

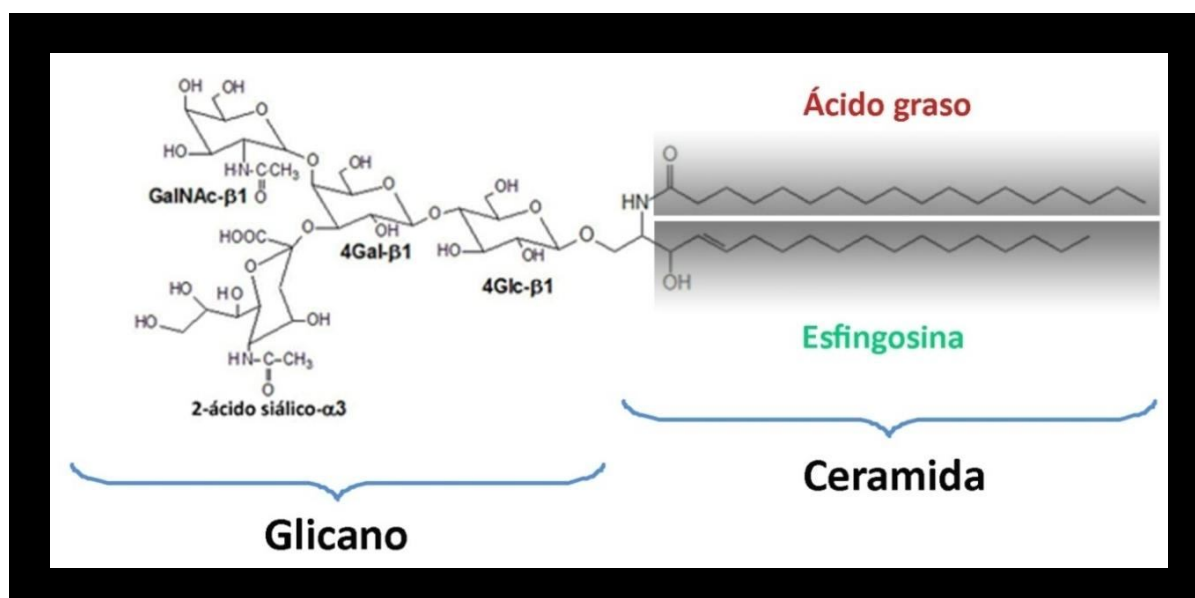


Figura 2| Estructura de un glicoesfingolípido. Los glicolípidos están formados por un motivo ceramida -esfingosina unida a un ácido graso- y diversos residuos de glicanos. En la figura se representa la estructura del gangliósido GM2.

Kolter y colaboradores denominaron al proceso secuencial de generación de los diversos gangliósidos bajo el término "biosíntesis combinacional", puesto que una gran variedad de biomoléculas pueden ser generadas mediante la combinación de bloques estructurales limitados. Este mecanismo permite la generación de patrones específicos en superficies de distintos tipos celulares dependiendo de la disponibilidad de moléculas precursoras, de la expresión de las enzimas biosintéticas participantes y de los mecanismos regulatorios que operan sobre ellas (Kolter et al., 2002). Como consecuencia, los gangliósidos no sólo se expresan en función del tipo celular, sino también diferencialmente en distintas etapas del desarrollo. Su síntesis es el resultado de un proceso coordinado que involucra pasos biosintéticos y catabólicos, así como también un variado y regulado tráfico intracelular.

La región hidrofóbica que ancla los gangliósidos a la membrana celular se forma en el retículo endoplásmico mediante la condensación entre una serina y una molécula de palmitoil-CoA. La ceramida consiste en un ácido graso que varía en su longitud y saturación, y en una esfingosina que difiere en el número y posición de los dobles enlaces y de grupos hidroxilos. Las glicosilaciones en cambio ocurren en el aparato de Golgi y en el trans-Golgi (Yamashita et al., 1999). Luego de la formación de una glucosilceramida (GlcCer) a partir de la ceramida en la región citosólica del aparato de Golgi (Coste et al., 1986; Jeckel et al., 1992), ocurre un movimiento de *flip flop* hacia el lumen del mismo y se produce el agregado de un residuo de galactosa, formándose así una lactosilceramida

(LacCer = Gal-Glc-Cer) (Lannert et al., 1994). En la superficie luminal del Golgi y en las membranas del trans-Golgi, LacCer es sialilado para formar el integrante más pequeño y el precursor biosintético de los gangliósidos: el monosialogangliósido GM3. Posteriormente, GM3 es convertido por glicosil y sialiltransferasas unidas a membrana, en gangliósidos de estructuras más complejas mediante la transferencia secuencial de residuos de glicanos, incluyendo ácidos siálicos (figura 3). En particular, el agregado de un segundo ácido siálico a GM3 da origen al disialogangliósido GD3 y un tercer residuo forma el trisialogangliósido GT3. GM3, GD3 y GT3 son los precursores de las series a, b y c de gangliósidos respectivamente.

El sistema más utilizado para nombrar a los gangliósidos es el sistema de Svennerholm (Svennerholm, 1963). La letra G designa que el compuesto es un gangliósido. Las letras M, D o T significan mono-, di- o trisialo respectivamente y se usan para especificar la cantidad de ácidos siálicos presentes en la estructura. Por último, los números 1, 2 o 3 hacen referencia al orden de migración en cromatografía en capa delgada, en la cual el 3 representa aquel que se encuentra más próximo al frente de corrida, por contener sólo un residuo de ácido siálico agregado al core precursor; el 2 al intermedio, por contener en su estructura un residuo de GalNAc; y el 1 al que menos migró por ser el más grande con el agregado de Gal-GalNAc (figura 3).

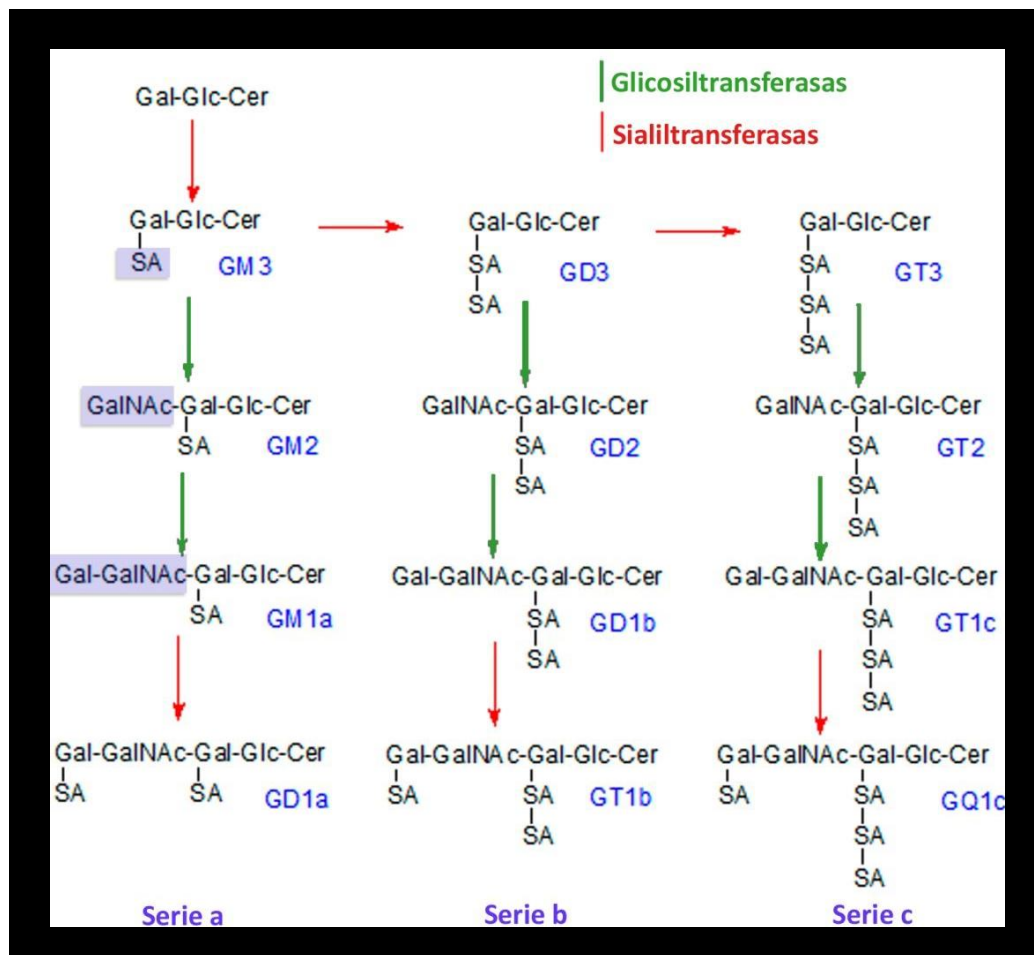


Figura 3 | Esquema de síntesis de gangliósidos. La porción ceramida es convertida en lactosilceramida, formando así el núcleo de síntesis de los gangliósidos. Posteriormente, éste es elongado mediante el agregado secuencial de diversos residuos para formar los distintos gangliósidos en el lumen del aparato de Golgi. Las series a, b y c corresponden a compuestos que tienen 1, 2 o 3 residuos de ácido siálico respectivamente, unidos a la Gal del core.

Ácidos siálicos

Como se mencionó anteriormente, los ácidos siálicos son los elementos distintivos en la estructura de los gangliósidos. Su nomenclatura convencional incluye el tipo de residuo sialilado que contiene. De esta manera, si el ácido siálico NAc se encuentra presente por ejemplo en el gangliósido GM2, su denominación completa es NAcGM2. El término *ácido siálico* proviene del griego "sialos" cuyo significado es saliva. Estos compuestos fueron descubiertos por Blix en 1936, cuando los aisló de mucina bovina de las glándulas submaxilares (Blix, 1936), y por Klenk, en 1941, al aislar un derivado del ácido neuramínico

(C₉H₁₇O₈N) a partir de glicolípidos del cerebro de pacientes con la enfermedad de Tay-Sachs (Klenk, 1941). El ácido siálico más común es el ácido N-acetilneuramínico, C₁₁H₁₉O₉N, abreviado habitualmente como Neu5Ac, NeuNAc, NeuAc, NAc o NANA. En un principio, los términos ácido siálico y NAc eran sinónimos; sin embargo, la aparición en los años 70 de otros compuestos derivados de este último, hizo que a partir de entonces no puedan ser utilizados indistintamente. En la actualidad se conocen más de 50 integrantes de la familia de ácidos siálicos.

Los Sias son una familia de monosacáridos ácidos de nueve carbonos, seis de los cuales se ubican formando un anillo (figura 4). Se encuentran muy representados en glicoconjugados presentes en la membrana plasmática de células animales (Varki, 1992), ocupando posiciones terminales como moléculas no reductoras en cadenas de N- y O-glicanos, y gangliósidos. Si bien son clasificados como carbohidratos, son estructuralmente distintos al resto de los azúcares debido a la complejidad que presentan. Como característica distintiva contienen un grupo ácido carboxílico en el C-1 y una cadena lateral de glicerol exocíclica. El grupo carboxílico les confiere una carga neta negativa a pH fisiológico, característica que modifica las propiedades fisicoquímicas de glicoconjugados individuales y de la superficie celular en general, permitiendo la interacción con otras moléculas. La posición externa de los ácidos siálicos en glicoproteínas y gangliósidos de superficie tiene una gran importancia en biología celular. De esta manera, estos monosacáridos ácidos pueden interaccionar con los componentes de otras superficies celulares, sustancias extracelulares y efectores, lo que se evidencia por los múltiples eventos de reconocimiento celular en los que están implicados (Vimr, 1994; Reglero et al., 1993; Schauer, 2004).

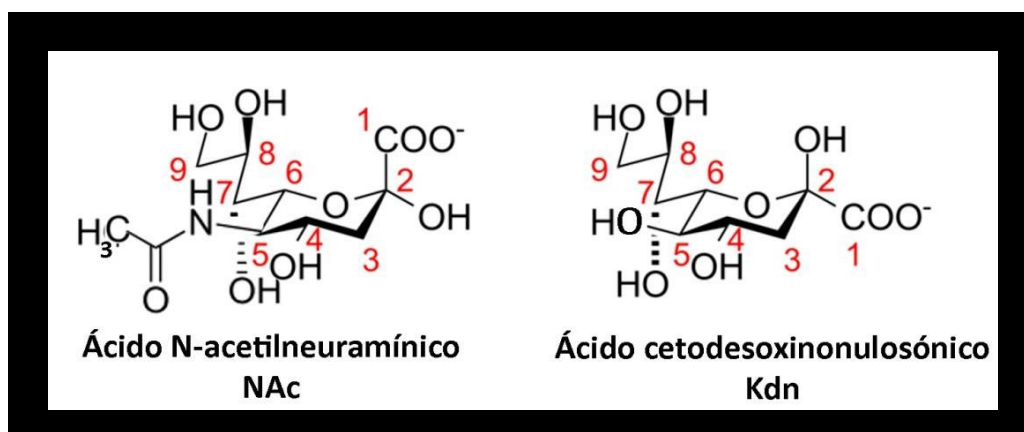


Figura 4| Estructura de dos ácidos siálicos. El ácido N-acetilneurámico presenta un grupo acetilo en posición 5, mientras que el ácido cetnonulosónico posee un grupo oxhidrilo. Se indican las posiciones de los distintos carbonos de la estructura.

Todos los miembros de esta familia de glicanos son derivados biosintéticos del NAc, el cual posee en su C-5 un grupo N-acetilo. La diversidad estructural de estos compuestos radica en el gran número de sustituciones que es posible realizar en los carbonos 4, 7, 8 y 9, y en el grupo amina del C-5. Los grupos hidroxilos presentes en dichas posiciones pueden ser modificados mediante acetilaciones, fosforilaciones, metilaciones y mediante el agregado de grupos sulfatos. Adicionalmente, son capaces de establecer distintos tipos de uniones a las cadenas glucídicas en el C-2 (Varki, 1992).

Los ácidos siálicos libres, derivados ya sea de la biosíntesis en el citoplasma celular o mediante la recuperación de lisosomas, pueden ser empleados en la síntesis de glicanos luego de su activación a la forma nucleotídica denominada citidin monofosfato-Sia (CMP-Sias). Esta reacción de formación del sustrato activado ocurre en el núcleo de la célula, para luego volver al citosol y ser transportado al aparato de Golgi donde será utilizado como donante de alta energía por las sialiltransferasas, para unir el ácido siálico al glicoconjugado recién sintetizado (Varki, 2001).

A pesar de la existencia de numerosos ácidos siálicos, la superficie de la mayoría de las células de mamíferos estudiadas hasta el momento presentan sólo dos de estos compuestos: el ácido siálico N-acetilneuramínico y el N-glicolilneuramínico (NGc). La única diferencia entre ambos radica en la adición de un sólo átomo de oxígeno al carbono del sustituyente acetilo presente en posición C-5 del NAc (figura 5) (Muchmore et al., 1989). La síntesis de NGc a partir de NAc se lleva a cabo utilizando la variante nucleotídica CMP-NAc. La oxidación del grupo N-acetilo a un grupo N-glicolilo es catalizada por la enzima CMP-NAc hidroxilasa (CMAH) que transfiere de manera irreversible un átomo de oxígeno al nucleótido azucarado, generando el producto CMP-NGc. Este último puede luego ser usado como donador para agregar NGc a moléculas destinadas a la superficie celular. Tanto CMP-NAc como su derivado glicolilado pueden ser utilizados indistintamente por las enzimas transportadoras de CMP-Sias del aparato de Golgi y por las sialiltransferasas (Higa y Paulson, 1985; Muchmore et al., 1989; Kawano et al., 1994).

Como se mencionó previamente, la enzima CMAH es la responsable de la síntesis de NGc. Esta monoxigenasa citosólica actúa como parte de un complejo multienzimático formado además por el citocromo *b5* y por citocromo *b5* reductasa dependiente de NADH (Kozutsumi et al., 1990). Posee además un motivo capaz de unir átomos de hierro y azufre, considerado crítico para el desarrollo de la actividad enzimática (Schlenzka et al., 1996). Muchmore y colaboradores demostraron que la afinidad de CMAH por CMP-NAc involucra tanto el reconocimiento específico de la base pirimidínica como del motivo fosfato (Muchmore et al., 1989).

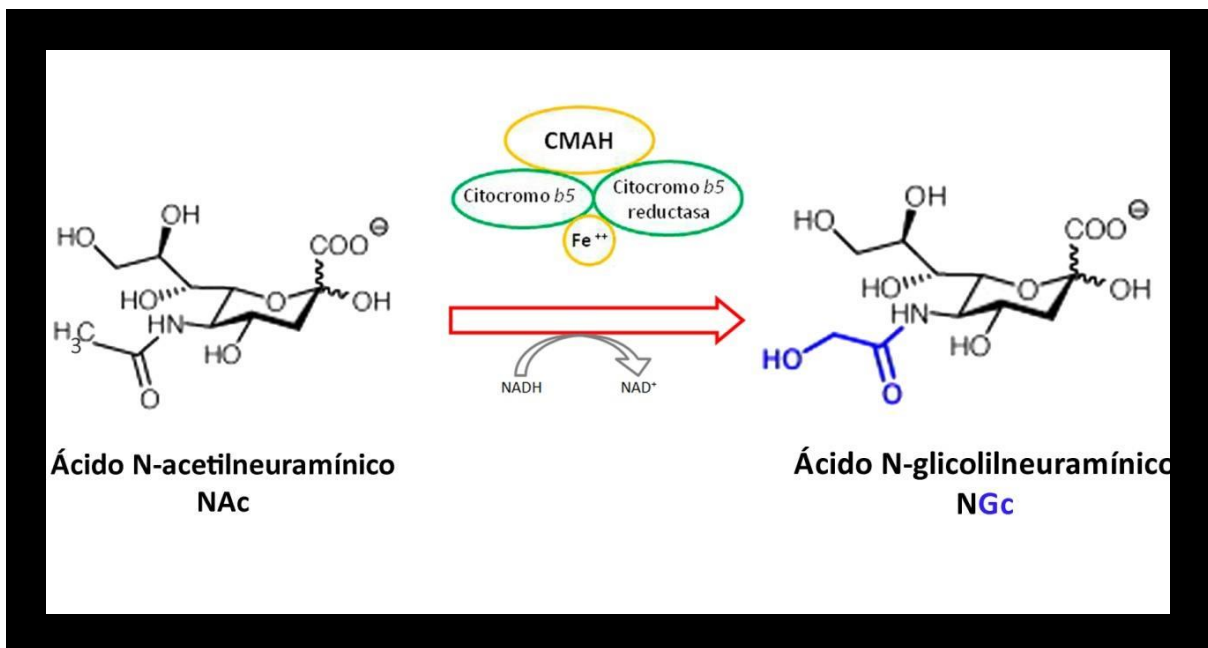


Figura 5| Síntesis de NGc a partir de NAc. Estructura de los ácidos siálicos N-acetil y N-glicolilneuramínico. La única diferencia entre ellos radica en el átomo de oxígeno agregado en el grupo N-acetilo de la posición C-5 por el complejo enzimático CMAH.

Los primeros investigadores en trabajar con ácidos siálicos descubrieron que, contrariamente a lo que ocurre en otros mamíferos, NGc representa menos del 0.1% del total de ácidos siálicos en tejidos humanos. Sumado a este hecho, las cantidades de NAc son mucho más elevadas que en el resto de los mamíferos. En el año 1998, dos grupos de científicos independientes concluyeron que el gen de CMAH se encuentra mutado en seres humanos (Irie et al. 1998; Chou et al., 1998) debido a la delección de un fragmento de 92 pares de bases en una región codificante de la enzima. Esta región se corresponde con el exón 6 de la secuencia murina, crítico para la funcionalidad de la misma (Schlenzka et al., 1996). Como consecuencia de esta delección se provoca un corrimiento en el marco de lectura del gen, desencadenando en una terminación prematura de la traducción (Chou et al., 1998). Todos estos estudios permitieron postular que la ausencia de NGc en humanos se debe a la ausencia de CMAH funcional (figura 6).

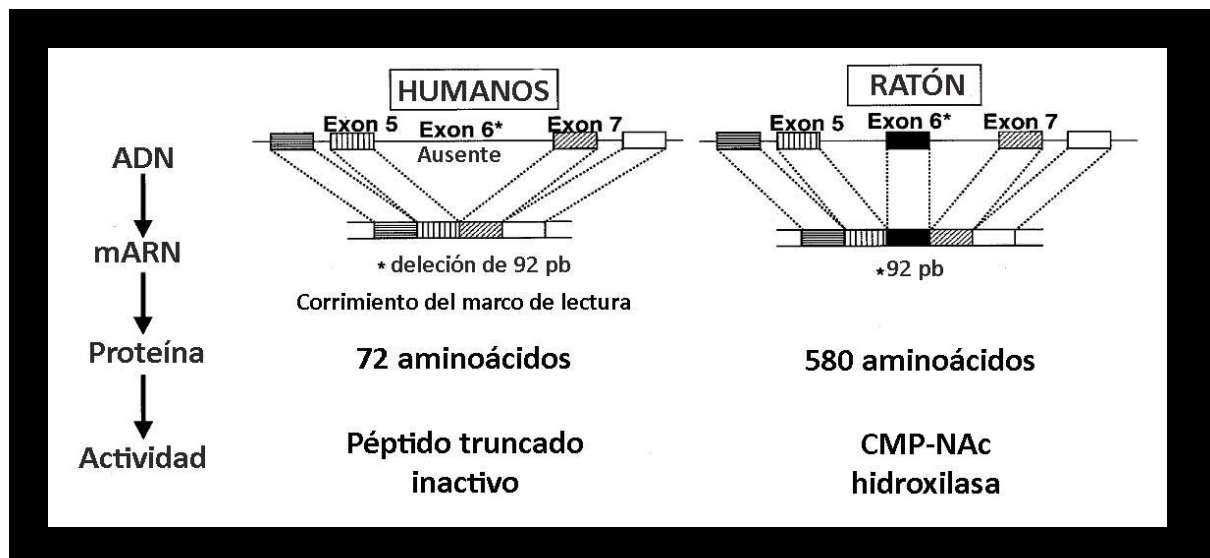


Figura 6 | Representación de la mutación de CMAH descrita para seres humanos.

La comparación de las secuencias de los genes humanos y murino demostró una delección de 92 pb que genera un producto truncado. Modificado de Varki, 2001.

Función biológica de los gangliósidos

Una vez finalizada la síntesis de gangliósidos, éstos alcanzan la superficie celular mediante transporte vesicular de la vía secretora. La orientación que presentan durante su síntesis permite luego que las cadenas de glicanos agregadas queden expuestas hacia el exterior celular, enfrentando de esta manera el medio extracelular donde desempeñarán sus funciones biológicas.

A los gangliósidos se les han atribuido múltiples funciones en los sistemas biológicos, tales como receptores de bacterias y de diversas toxinas bacterianas (Takamizawa et al., 1986; Karlsson, 1989), de virus (Markwell et al., 1981), participación en adhesión celular y modulación del crecimiento. También son muy importantes como moléculas señalizadoras, actuando como transmisores de señales intracelulares (Hakomori e Igarashi, 1993; Yates y Rampersaud, 1998). Los gangliósidos desempeñan un papel fundamental en la formación de los cuerpos celulares neuronales (Kotani et al., 1993) y en la transmisión del impulso nervioso (Lo et al., 2006). Constituyen moléculas esenciales en el mantenimiento de la homeostasis de las funciones biológicas puesto que su estructura sufre diversas alteraciones durante el desarrollo celular, la diferenciación, la ontogenia, las transformaciones oncogénicas y el envejecimiento, lo cual evidencia una acción reguladora por parte de estas moléculas sobre las funciones asociadas al crecimiento celular (Hakomori, 1985; Saito, 1993).

Una clasificación amplia engloba estas funciones biológicas de los gangliósidos como moduladores de procesos celulares en dos categorías principales. Por un lado median interacciones célula-célula a través de la unión a moléculas en células vecinas mediante asociaciones entre sus cadenas de oligosacáridos (reconocimiento *trans*). Por otro lado, modulan la actividad de proteínas ubicadas en la misma membrana plasmática (modulación *cis*) (Todeschini y Hakomori, 2008).

Resultados experimentales *in vitro*, demuestran que la expresión de gangliósidos no es determinante para la supervivencia celular. Mediante el empleo de inhibidores químicos o el silenciamiento génico de enzimas involucradas en su síntesis, las células que no expresan gangliósidos pueden sobrevivir e incluso proliferar y diferenciarse *in vitro*. Sin embargo, los gangliósidos han demostrado ser elementos de importancia para la correcta estructuración de los tejidos, al encontrarse involucrados en la modulación de las interacciones entre células en un organismo multicelular.

Participación de los gangliósidos en microdominios de membrana y glicosinapsis

Los gangliósidos se distribuyen en la superficie celular formando agregados específicos denominados microdominios de membrana. Resultados observados por Jain y White, relativo al comportamiento de la membrana plasmática en ciertas circunstancias, no se lograban explicar enteramente mediante el modelo de mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson en 1972, el cual postula una distribución aleatoria de las proteínas de la membrana en un mar homogéneo de lípidos. Estas observaciones derivaron en la propuesta en 1977 de la existencia de arreglos de membrana denominados originalmente "*Modelo de plato*", en el cual se plantea que las regiones ordenadas y rígidas de la membrana se encuentran separadas entre sí por zonas desordenadas y fluidas (Jain y White 1977). Las unidades estructurales y funcionales que componen este modelo poseen un rol en las interacciones celulares y en el transporte, y demuestran cooperativismo entre ellas con el propósito de mantener la función biológica de las membranas. Posteriormente, se descubre la existencia de vías de señalización desencadenadas a partir de ciertas zonas presentes en la membrana plasmática como consecuencia de la observación de dos hechos puntuales: la inhibición de la actividad tirosin kinasa de receptores de factores de crecimiento producida por gangliósidos cercanos (Bremer et al., 1984), y la asociación de la actividad de la kinasa Src con receptores anclados a la membrana mediante el motivo GPI (Stefanova et al., 1991).

Es así como surge el término "*microdominios de membrana*" para definir estructuras que constituyen regiones específicas de la bicapa lipídica en donde se producen interacciones entre diversas moléculas y cuyo agregado en estructuras más complejas recluta moléculas involucradas en vías de señalización, para luego iniciar cascadas intracelulares. Esta idea particular se fundamenta en la existencia de anticuerpos que

inducen el agregado de gangliósidos con la consecuente activación de vías de señalización asociadas a dichos microdominios (Tillack et al., 1983; Rock et al., 1990).

Un tipo particular de microdominios involucrado en adhesión celular, principalmente adhesión mediada por gangliósidos y acoplada a señalización, fue descrito luego como consecuencia de los trabajos publicados por Iwabuchi y Hakomori entre fines de los años 1990 y principios del 2000 (Iwabuchi et al., 1998a y Iwabuchi et al., 1998b; Hakomori et al. 1998; Hakomori, 2000). El camino que les permitió convertirse en los pioneros en determinar el rol funcional de los gangliósidos en los procesos adhesivos comenzó con el conocimiento de la existencia de microdominios de membrana específicos, denominados caveolas y *rafts* lipídicos. Los primeros se describen como invaginaciones de membrana morfológicamente distintas (Yamada, 1955), siendo su característica principal la presencia distintiva de la proteína caveolina como componente estructural (Okamoto et al., 1998). Se ha demostrado mediante numerosos estudios que las caveolas participan en procesos de endocitosis celular (Smart et al., 1996; Vey et al., 1996) así como también en transducción de señales (Liu et al., 1996; Mineo et al., 1996) al interactuar con diversas moléculas como ser pequeñas proteínas G, kinasas de la familia de Src y óxido nítrico sintasa endotelial (Okamoto et al., 1998). Por su parte, los *rafts* lipídicos poseen características bioquímicas y funcionales similares a las caveolas pero carecen de caveolina como proteína estructural, no formando invaginaciones en la membrana plasmática (Parton y Simons, 1995).

Los resultados obtenidos por Iwabuchi demostraron que existe una diferencia en la composición lipídica entre fracciones enriquecidas en gangliósidos o en caveolina, y que sus funciones se encuentran significativamente diferenciadas. Ni los microdominios *rafts* lipídicos ni las caveolas participaban en la adhesión celular, en particular aquella dependiente de carbohidratos.

De esta manera, los microdominios dominados por gangliósidos involucrados en adhesión y señalización celular fueron posteriormente denominados "glicosinapsis" o "microdominios glicosinápticos" por el Dr. Hakomori en 2002, en analogía con la "inmunosinapsis" en donde se describe el complejo mecanismo molecular que se encuentra asociado al receptor de linfocitos T (Hakomori, 2002).

En su trabajo, Hakomori postula la siguiente clasificación de glicosinapsis en función de su estructura y función (Hakomori, 2002):

- *Glicosinapsis tipo I*: clusters de GSL asociados con transductores de señales. Los GSL están involucrados en la adhesión entre células a través de interacciones carbohidrato-carbohidrato o mediante interacciones con proteínas capaces de reconocerlos.
- *Glicosinapsis tipo II*: glicoproteínas tipo mucinas con O-glicanos asociados a kinasas de la familia Src. Las glicosinapsis de este tipo participan en adhesión mediada por residuos de azúcares a través de Selectinas y Siglecs, con consecuente señalización que induce cambios fenotípicos en la célula.

- *Glicosinapsis tipo III*: formadas por un complejo entre integrinas N-glicosiladas, tetraspanina y gangliósidos, involucrado en la adhesión celular a la matriz mediante carbohidratos.

En la figura 7 se muestra un esquema de cada tipo de glicosinapsis.

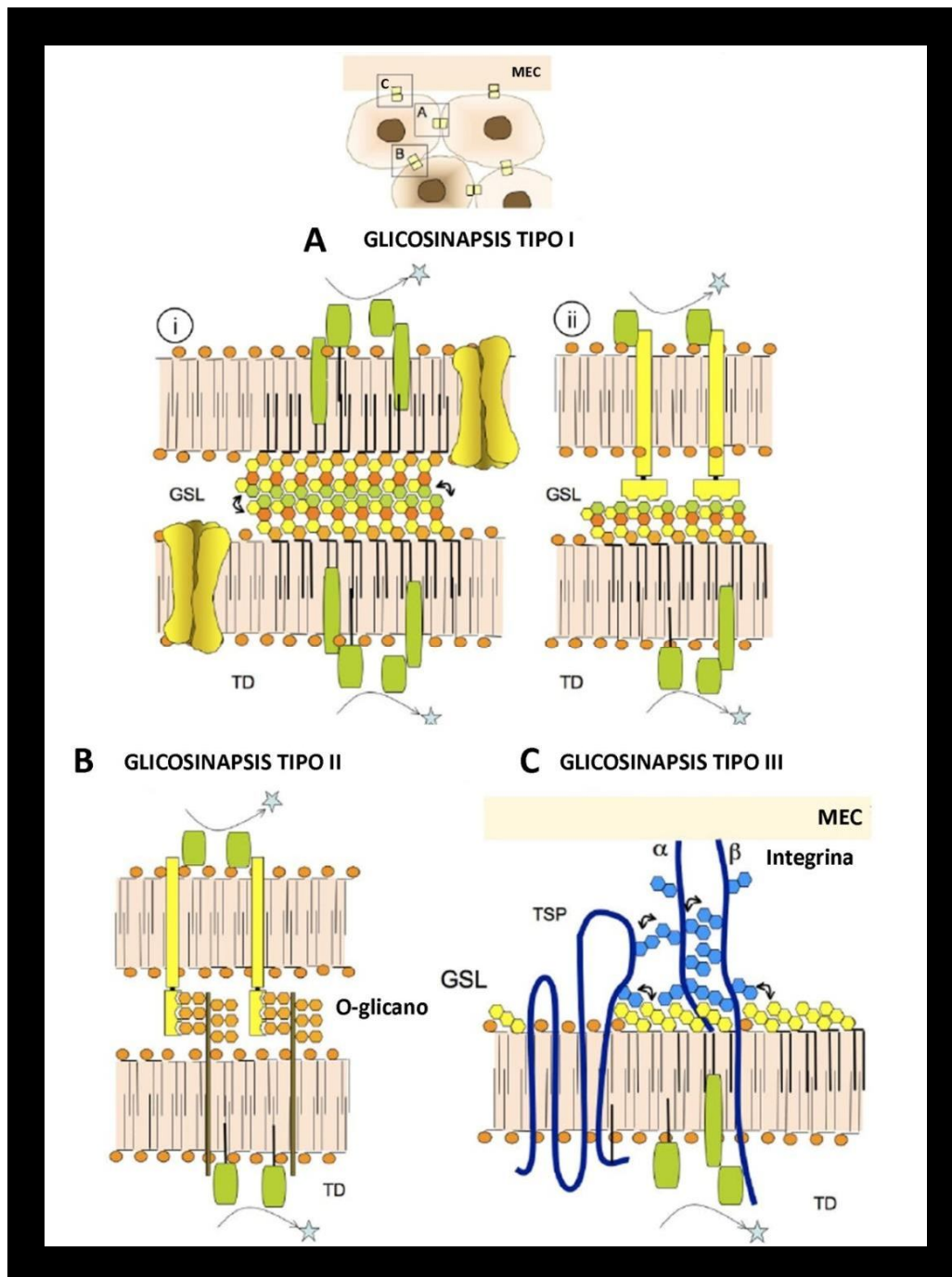


Figura 7 | Representación de los tipos de glicosinapsis propuestos por Hakomori.

(A) Glicosinapsis tipo I: basada en interacciones entre los carbohidratos presentes en GSL (i) ó entre carbohidratos y sus receptores (ii), con consecuente señalización (TD). **(B) Glicosinapsis tipo II**: interacciones entre O-glicanos presentes en mucinas y sus receptores acoplados a señalización. **(C) Glicosinapsis tipo III**: establecidas

Interacción de gangliósidos con proteínas de membrana

Los gangliósidos actúan como intermediarios en el flujo de información que ocurre entre el exterior e interior celular de diversas maneras. En la glicosinapsis, en particular como integrantes de los tipos I y III, se encuentran principalmente involucrados en adhesión celular y posterior señalización. Sin embargo, su participación también ha sido descrita en otros microdominios como caveolas y *rafts* lipídicos, cumpliendo funciones de estructura y señalización al asociarse a distintos componentes proteicos y lipídicos de la membrana (figura 8).

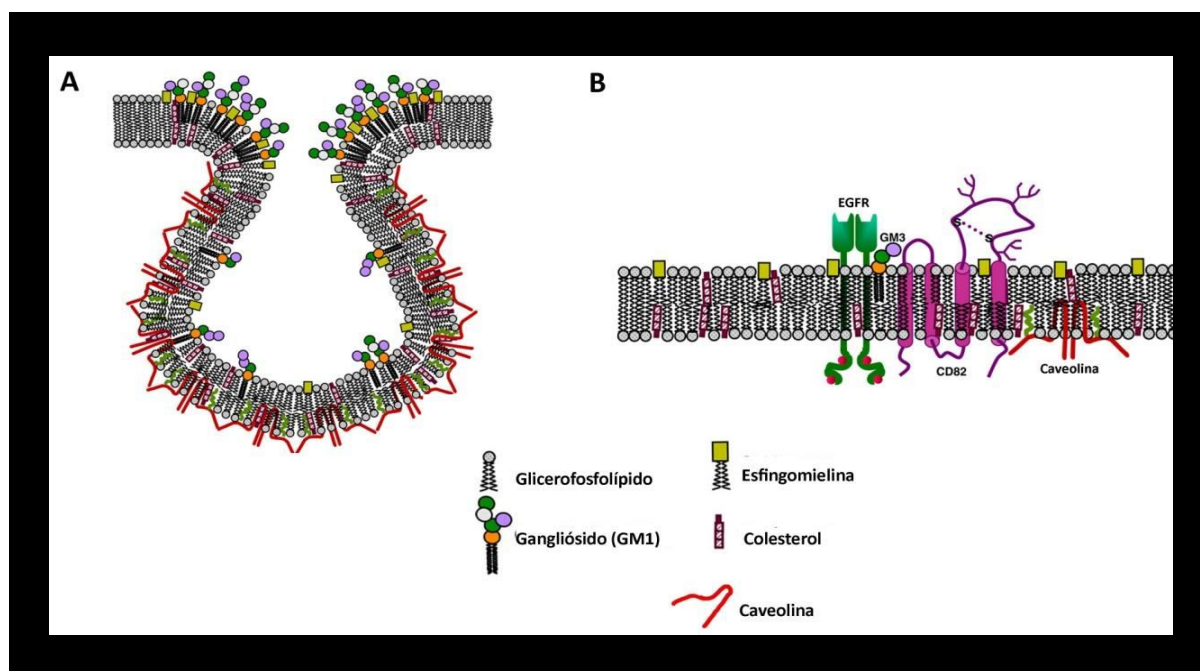


Figura 8| Representación de la estructura de caveolas y de un raft lipídico. (A)

Esquema de una caveola en donde se representa la estabilización de la misma por una capa de filamentos formados por oligómeros de la proteína caveolina. Existe una distribución asimétrica de gangliósidos en la estructura, con una mayor concentración de los mismos en zonas de la membrana con curvatura positiva. **(B)** Representación de un *raft* lipídico en el cual se forma un complejo de señalización dado por la asociación entre el receptor de EGF, caveolina-1, tetraspanina CD82 y el gangliósido GM3. Modificado de Sonnino y Prinetti, 2009.

Uno de los ejemplos más estudiados lo constituye la interacción entre el gangliósido GM3 y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual fue identificado como un blanco de la acción inhibitoria por parte de GM3 (Bremer et al., 1984; Bremer et al., 1986). Este glicolípido altera la capacidad de autofosforilación del receptor sin existir competencia con el ligando EGF por el sitio de unión (Hanai et al., 1988; Song et al., 1991) y sin alterar su dimerización (Zhou et al., 1994). El grupo de Huang, describió recientemente que la inhibición de EGFR induce la inactivación de la vía de señalización mediada por PI3K/AKT en un modelo murino de hepatoma (Huang et al., 2013). Otros gangliósidos presentan un efecto mucho menor en la actividad de EGFR, indicando una interacción altamente específica con este gangliósido en particular (Bremer et al., 1986; Miljan et al., 2002). El mecanismo molecular de esta asociación enfatiza la importancia de la interacción *cis* entre los carbohidratos presentes en GM3 y los N-glicanos del receptor, ricos en residuos GlcNac (Yoon, 2006a; Yoon, 2006b; Guan, 2011).

Adicionalmente, diversos estudios demuestran que GM3 se une al receptor de insulina mediante una interacción electrostática entre el residuo lisina 944, con carga positiva, y el ácido siálico, con carga negativa (Kabayama et al., 2007). En las células de adipocitos 3T3-L1, Kabayama y colaboradores demostraron que la resistencia a insulina se acompaña de un incremento en la enzima GM3 sintasa, con el consecuente aumento en los niveles de GM3. Como consecuencia, se produce una mayor asociación entre GM3 y el receptor de insulina, y un descenso entre éste y caveolina-1. De esta manera, GM3 induce un desplazamiento del receptor de insulina hacia el exterior de los microdominios caveolas, impidiendo su correcta interacción con los efectores celulares que desencadenan las vías de señalización en respuesta a insulina.

Existen también interacciones entre ciertos gangliósidos y componentes del sistema nervioso central. La evidencia experimental permite postular que GM1 actúa como un factor neurotrófico, ejerciendo un efecto contra el daño neuronal posiblemente a través de receptores Trk (Favaron et al., 1988; Skaper et al., 1989; Ferrari et al., 1993; Ferrari et al., 1995), responsables de la unión al factor de crecimiento neuronal (NGF por sus siglas en inglés). Trabajos realizados en células PC12, una línea celular de rata ampliamente utilizada en estudios de diferenciación neuronal, demostraron que el agregado exógeno de GM1 estimula la actividad del receptor Trk en presencia de NGF (Farooqui et al., 1997), además de unirse específicamente al mismo (Mutoh et al., 1995). Esta capacidad de unión y activación de distintos miembros de la familia Trk también se demostró en otros tipos celulares (Rabin et al., 2002), en tejido cerebral (Duchemin et al., 2008) y en modelos *in vivo* (Mo et al., 2005). Sumado a estos resultados, se ha reportado que los receptores Trk se encuentran asociados con *rafts* lipídicos (Pereira y Chao, 2007), lo que indica que la ubicación en zonas enriquecidas en GSL es relevante en la regulación de su función biológica.

Previamente se describió el término glicosinapsis como un microdominio de membrana involucrado en la adhesión celular dependiente de carbohidratos, a través de interacciones entre GSL en general y receptores proteicos involucrados en adhesión. Particularmente, la glicosinapsis tipo III se caracteriza por la presencia de dominios ricos en gangliósidos y tetraspaninas, proteínas integrales de membrana altamente hidrofóbicas capaces de interaccionar fuertemente con éstos (Kawakami et al., 2002). La asociación entre tetraspaninas e integrinas ha sido reportada (Hemler, 1998), más aun, se ha demostrado que la tetraspanina CD9 y las subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 5$ de integrina colocalizan en la glicosinapsis (Prinetti et al., 2009). En líneas celulares con altos niveles de GM3, éste modula la asociación entre CD9 e integrina, estabilizándola. Mediante microscopía confocal y ensayos de con inmunoprecipitación se demostró la formación de complejos multimoleculares integrados por integrinas $\alpha 3\beta 1$ ó $\alpha 5\beta 1$, CD9 y GM3 (Miura et al., 2004; Mitsuzuka et al., 2005). El grupo de Mitsuzuka demostró en un modelo de cáncer vesical, que la formación de dichos complejos conduce a la regulación negativa de la señalización mediada por integrinas, al inducir la inactivación de Src mediante su fosforilación en la tirosina 527. La familia de proteínas tirosin kinasas Src se encuentra involucrada en diversas funciones celulares como ser respuesta mitogénica a factores de crecimiento, migración celular, transición epitelio-mesenquimal y transformación neoplásica. Por su parte, Csk es el principal regulador negativo de esta familia de kinasas (Ingley, 2008). La inactivación inducida por GM3 se produce como consecuencia de la translocación de la kinasa Csk a los microdominios ricos en el gangliósido. Como consecuencia de la inhibición de Src se produce una disminución de la movilidad celular (Mitsuzuka et al., 2005).

Esta inactivación de Src no ocurre en presencia de otros gangliósidos relacionados a GM3 como ser GM1 y GD1a (Iwabuchi et al., 2000). Los resultados obtenidos demuestran que la función biológica de las glicosinapsis de este tipo, es decir la maquinaria de señalización derivada de integrinas, se encuentra modulada por complejos de membrana que contienen gangliósidos específicos, sugiriendo la existencia de interacciones puntuales entre los residuos sacarídicos presentes en ambas partes.

Cáncer

El término cáncer se utiliza para definir a un conjunto de más de 100 enfermedades caracterizadas por un crecimiento anormal de las células, que no respeta los patrones establecidos por el organismo y varían notablemente en cuanto a su desarrollo y respuesta al tratamiento. Es importante destacar que no todos los tumores dan origen a la enfermedad cáncer. Las neoplasias pueden catalogarse en benignas y malignas diferenciándose principalmente en su comportamiento biológico. En las neoplasias benignas las células suelen dividirse lentamente y ser similares a las normales, los tejidos mantienen su

arquitectura y el tumor está restringido a la zona donde se inició su proliferación, manteniendo un límite definido con los tejidos que lo rodean. Esta característica es tal vez la más importante, puesto que los tumores benignos no son capaces de diseminarse a otros sitios del organismo. Por su parte, las neoplasias malignas o cancerosas, están constituidas por células que tienden a perder su diferenciación y que se dividen rápidamente o de manera errática. Tienen la capacidad de infiltrar e invadir tejidos sanos cercanos, y eventualmente dispersarse en el organismo a través del sistema circulatorio o linfático para dar origen a la formación de focos secundarios de implantación o metástasis.

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo responsable de aproximadamente 8 millones de defunciones en el año 2008 (13%) (Proyecto Globocan, Organización Mundial de la Salud, 2008). Particularmente en Argentina, el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares. Según la Agencia internacional de Investigación sobre el cáncer (IARC), en el año 2008 se produjeron en nuestro país cerca de 105.000 nuevos casos de tumores malignos, lo que permitió calcular una incidencia de 206 casos por año cada 100.000 habitantes, de los cuales un porcentaje un poco mayor al 50% resultaron fatales. La mortalidad por cáncer en hombres argentinos se debe principalmente a cáncer de pulmón, colorrectal y próstata, mientras que en el caso de las mujeres se debe a cáncer de mama, seguido de pulmón y colorrectal. En magnitud, el volumen más importante de nuevos casos corresponde a cáncer de mama, con más de 18.000 casos nuevos por año, seguido por cáncer de próstata, con 13.000 casos reportados en 2008, excluyendo cáncer de piel no melanoma. A pesar de presentar la mayor incidencia, la mortalidad por cáncer de mama en Argentina ha disminuido en forma sostenida y estadísticamente significativa desde el año 1996 (Boletín de vigilancia epidemiológica, INC, 2013).

El cáncer constituye, junto con las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), una de las cuatro principales Enfermedades No Transmisibles, presentando factores de riesgo comunes como el tabaco, una dieta no saludable, obesidad e inactividad física. En el año 2005 se llevó a cabo en Argentina una encuesta nacional de factores de riesgo encontrándose resultados tan sorprendentes como registros de sobrepeso y obesidad en el 50% de los entrevistados, presión arterial elevada en el 35% de los casos, un consumo de tabaco en el 34% de las personas entre 18 y 64 años, y un porcentaje de baja actividad física en el 46% de las personas (Abriata G, 2009). Se estima que las defunciones por cáncer a nivel mundial continuarán incrementándose, con una proyección de 12 millones para el año 2030 por lo que se hace sumamente importante destinar esfuerzos a prevención y desarrollo de nuevos tratamientos.

El cáncer es una enfermedad compleja en donde intervienen factores propios tanto de las células malignas como del microambiente tumoral. El desarrollo exitoso de esta patología no depende solamente de las alteraciones moleculares que operan en las células malignas.

Además, se hace necesaria la participación del organismo que lo alberga. Involucra cambios genéticos, fisiológicos, inmunológicos y anatómicos complejos, que son difíciles de atacar en conjunto. Actualmente está tratando de cambiarse la visión que se tiene de esta enfermedad de modo de considerar al cáncer como una dolencia crónica, con la cual el paciente debe convivir. En este sentido, el enfoque terapéutico se orienta a focalizar los tratamientos no sólo en el tumor sino también en aspectos relativos a la invasión de los tejidos sanos, a la respuesta inmunológica del paciente y a los componentes genéticos propios de cada paciente.

Durante el desarrollo de esta tesis se trabajó principalmente con dos variantes tumorales: cáncer de pulmón y melanoma. A continuación se definirán y explicarán cada una de estas neoplasias.

Cáncer de pulmón

Este tipo de cáncer representa uno de los tumores con mayor impacto negativo tanto en la sobrevida como en la calidad de vida de los pacientes oncológicos que lo padecen. Si se consideran todos los estadios que puede presentar, la sobrevida a cinco años es menor al 13%. Los estudios epidemiológicos demostraron la existencia de una clara correlación entre factores ambientales, como la exposición al tabaco, y el desarrollo de cáncer de pulmón, poniendo de manifiesto que no sólo los fumadores son susceptibles a desarrollar la enfermedad, sino también aquellas personas expuestas pasivamente al tabaco.

El cáncer de pulmón se divide en dos tipos en función de cómo se clasifican las células en las que se origina: carcinoma de células pequeñas (SCLC, de *small cell lung cancer*) y carcinoma de células no pequeñas (NSCLC, de *non- small cell lung cancer*). El diagnóstico adecuado entre ambos tipos, así como también la correcta estadificación del tumor, tienen importantes implicancias terapéuticas puesto que las opciones de tratamiento y el pronóstico son diferentes de acuerdo al tipo y estadio tumoral.

La variante NSCLC es la más frecuente, con una incidencia de aproximadamente el 85% de los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón. Se divide a su vez en tres subtipos principales según el tipo celular que le da origen: adenocarcinoma, carcinoma escamoso o epidermoide y carcinoma de células grandes (figura 9). El adenocarcinoma es el subtipo más frecuente y representa aproximadamente el 40% de todos los carcinomas de células no pequeñas. Se origina en las células secretoras de mucinas del tejido pulmonar. Si bien está asociado al hábito de fumar, es el tipo más representado en personas que no tienen esa adicción. El carcinoma escamoso por su parte, representa el 30% de los tumores de este tipo, y es el que tiene mayor asociación con el tabaco. Se origina cuando el epitelio cilíndrico de los bronquios pierde sus cilios, transformándose en escamoso. Presenta células con distinto grado de diferenciación, siendo las más diferenciadas productoras de queratina. Por último, el carcinoma de células grandes representa el 20% de los NSCLC. Se

diferencia de los dos anteriores por su histología, puesto que no se trata de células secretoras de mucinas ni se asemejan a células escamosas con queratina. Cuando se observa en un microscopio, el carcinoma de células grandes consiste en una gran cantidad de células anormales con grandes áreas de muerte celular en el centro. Existen además variantes de NSCLC que se presentan con menor frecuencia y son: carcinoma adenoescamoso, indiferenciado y bronqueoalveolar.

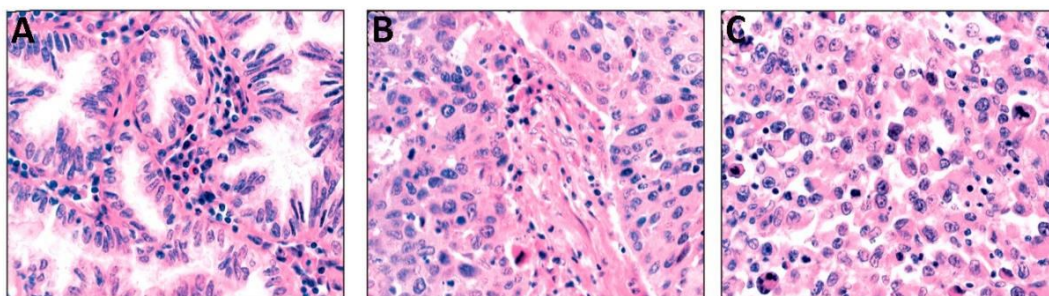


Figura 9| Imágenes histológicas de los distintos tipos de NSCLC. **(A)** Adenocarcinoma. **(B)** Carcinoma escamoso o epidermoide. **(C)** Carcinoma de células grandes.

El carcinoma de células pequeñas representa entre el 15 y el 20% de los cánceres de pulmón diagnosticados. Se produce como consecuencia de alteraciones en células de origen neuroendócrino. Generalmente se ubica peribronquial, formándose hacia el pulmón. Al observarlas en el microscopio, las células de SCLC son realmente pequeñas y de forma ovalada. Se diferencia del NSCLC por su rápido crecimiento y el desarrollo de metástasis en otros sitios del organismo. Sin un tratamiento adecuado, la expectativa de vida de los pacientes diagnosticados es menor a un mes. A pesar de su rápido crecimiento y agresividad, el carcinoma de células pequeñas responde a los tratamientos quimio y radioterapéuticos, y raramente se realiza cirugía debido a su localización de difícil acceso en el tejido pulmonar. Sin embargo, esto no necesariamente se correlaciona en un incremento de la supervivencia. Al momento del diagnóstico es muy frecuente que se encuentre diseminado ya que por su ubicación no genera síntomas hasta que se ha esparcido.

Las estrategias terapéuticas convencionales incluyen la administración de quimio y/o radioterapia, y en los estadios más tempranos la extirpación por cirugía. Existen varios agentes quimioterapéuticos eficaces en ambos tipos de cáncer de pulmón. Los más activos pertenecen a la familia del platino, y son cisplatino y carboplatino, este último análogo del primero. No existen diferencias terapéuticas entre los tres subtipos de carcinoma pulmonar de células no pequeñas, siendo la cirugía el tratamiento principal, particularmente para aquellos pacientes cuya enfermedad fue detectada en etapas tempranas.

Melanoma

El melanoma es un tipo de neoplasia que se origina en los melanocitos, células responsables de la pigmentación, derivadas de la cresta neural y que se ubican en la capa basal de la epidermis. La función biológica de estas células consiste en proteger la piel de la radiación ultravioleta (UV), mediante la secreción de melanina. Los melanomas pueden originarse en la piel, las mucosas y con menor frecuencia en los ojos, el sistema nervioso central y el oído interno. Presentan además una alta capacidad para formar metástasis. Junto con el carcinoma basocelular y el espinocelular, forman las patologías oncológicas de la piel.

El melanoma es el tipo de neoplasia que más ha incrementado su incidencia en las últimas décadas, especialmente en la población caucásica cercana a los trópicos o el Ecuador, siendo responsable de casi el 90% de las muertes producidas por los tumores cutáneos malignos, aun cuando representa un porcentaje menor al 5% de todos los cánceres de piel. Actualmente se acepta que el factor ambiental que más influencia presenta en la incidencia del melanoma es la radiación UV (Narayanan et al., 2010; Kanavy y Gerstenblith 2011). La relación directa que existe entre ambos se basa en que ésta última es capaz de inducir daño en el ADN de las células, conduciendo a mutaciones en la piel que derivan en la patología neoplásica. Como ejemplo, ha sido demostrado que el gen p53, con frecuencia mutado en melanoma, se ve afectado directamente por la radiación UV (Ouhtit et al., 1998).

A diferencia de lo que ocurre con otras neoplasias, se conocen los distintos pasos que conducen a la generación de un melanoma maligno. El proceso de melanogénesis comprende un conjunto de lesiones graduales que comienzan en un nevo benigno hasta finalizar en un melanoma metastásico. Debido a que los melanocitos tienen la capacidad única de producir melanina, la proliferación de un melanoma resulta evidente, permitiendo también el seguimiento de las lesiones formadas. Esta característica permitió establecer seis estadios durante la transformación maligna de los melanocitos (figura10):

1. Adquisición de un nevo melanocítico común.
2. Nevo melanocítico con hiperplasia.
3. Nevo melanocítico con diferenciación aberrante y estructura nuclear atípica, displasia de melanocitos.
4. Fase de crecimiento radial del melanoma primario.
5. Fase de crecimiento vertical del melanoma primario.
6. Melanoma metastásico.

La formación de un nevo melanocítico representa el paso inicial en la proliferación de los melanocitos. Las células que lo conforman derivan de melanocitos ubicados en la capa basal de la epidermis, que proliferan de manera controlada a lo largo de la unión entre la

misma y la dermis. En este estadio, las lesiones pueden permanecer estables o pueden continuar con su crecimiento siguiendo las vías de diferenciación normales que conducirán a la desaparición del lunar, o una diferenciación aberrante que inducirá una displasia en los melanocitos con cambios celulares y funcionales irreversibles. En la fase de crecimiento radial, se produce una proliferación secuencial de los melanocitos displásicos, pero a diferencia de los estadios anteriores, ocurre de manera indefinida y descontrolada. Esta fase constituye la primera etapa que conduce al cáncer melanoma puesto que las células adquieren autonomía de crecimiento. Sin embargo, las células se multiplican en las capas más superficiales de la piel, sin invadir las más profundas, y puede durar varios años con poca posibilidad de dar metástasis. Un melanoma en fase de crecimiento radial puede curarse con procedimientos sencillos. A partir de este estadio, la enfermedad puede convertirse en metastásica al avanzar a la fase de crecimiento vertical, en la cual las células tumorales cambian la tendencia a crecer en superficie y se transforman en células invasoras que pueden ocupar capas más profundas de la piel, atravesar la membrana basal, tomar contacto con los vasos sanguíneos y linfáticos, y diseminarse a otros sitios del organismo generando metástasis (Clark et al., 1984; Ackerman, 1980).

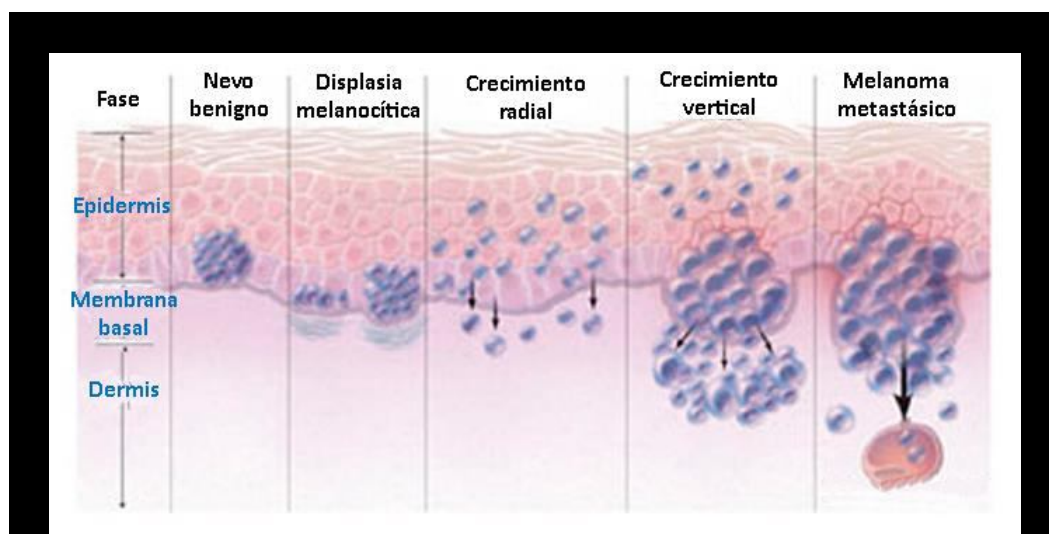


Figura 10| Formación de un melanoma maligno. Representación de los distintos estadios que conducen a la formación de un melanoma maligno.

Debido a su ubicación superficial, el tratamiento de los melanomas es esencialmente quirúrgico, removiendo un margen de tejido circundante al tumor junto con el mismo. Los pacientes sometidos a cirugía del tumor primario que presentan riesgo de recaída son susceptibles al tratamiento con terapias adyuvantes que consisten principalmente en la administración de Interferón- α . El tratamiento más adecuado para el melanoma en estadio

avanzado también consiste en la resección quirúrgica del tumor, sin embargo muy pocos pacientes son buenos candidatos para esta opción. En los casos en los que no es aplicable la cirugía se recurre a la administración de quimioterapia con drogas antineoplásicas que comprenden dacarbazina, cisplatino, vinblastina y paclitaxel entre otros. Si bien el tratamiento combinado con varias drogas demostró tasas de respuesta mejores que el tratamiento individual, estos valores no superaron el 40%, no obteniéndose diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes (Dunkley-Jacobs et al., 2013). La radioterapia no es aplicada de rutina para el tratamiento de melanoma, puesto que la tasa de respuesta es muy baja. De hecho, el melanoma es considerado una patología resistente a la radiación. No obstante, esta estrategia se ha empleado en algunos centros de salud con el objetivo de mejorar la diseminación local/regional. En el año 2012 se publicaron los resultados del primer ensayo clínico randomizado que demostró un beneficio de la radioterapia como terapia adyuvante en pacientes con melanoma con metástasis en nódulos linfáticos (Burmeister et al., 2012).

La comprensión de los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo del melanoma, como así también la profundización en el entendimiento de la participación del sistema inmunológico en su relación con esta enfermedad, fueron la base del desarrollo de novedosas estrategias antitumorales. Ipilimumab, un mAb IgG1 κ dirigido contra el antígeno CTLA4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), fue el primer agente en ser aprobado por la agencia reguladora FDA en 2011 para el tratamiento del melanoma metastásico (Hodi et al., 2010). CTLA4 participa activamente en los procesos de tolerancia inmunológica siendo uno de los reguladores negativos principales de la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T (Brunet et al., 1987). Su bloqueo a través del Ipilimumab, incrementa la respuesta T antitumoral e impide la recurrencia del tumor al inducir la secreción de Interferón γ (IFN- γ) (Hurwitz et al., 2000; Parais et al., 2001). En el mismo año, un segundo agente terapéutico fue aprobado como indicación para el tratamiento de melanoma metastásico. Vemurafenib inhibe la progresión tumoral en células de melanoma que presentan la mutación BRAF V600, reportada entre el 40 y 60 % de los melanomas cutáneos (Davies et al., 2002; Curtin et al., 2005). Los ensayos clínicos actuales buscan evaluar la efectividad de la combinación de ipilimumab con otras alternativas terapéuticas como ser terapias específicas (Vemurafenib), quimio y radioterapia e IFN- γ (Gogas et al., 2013).

A pesar de los avances en el tratamiento del melanoma y de los ensayos en fase clínica que se encuentran en curso, las opciones terapéuticas para la enfermedad en estadios avanzados son limitadas. Como consecuencia, el melanoma es considerado uno de los tumores malignos de más difícil tratamiento.

Biología del cáncer

Las mutaciones principales que conducen a la transformación celular ocurren en

genes vinculados directa o indirectamente con la regulación de mecanismos de recambio celular. De esta manera, además de la existencia de alteraciones genéticas que le permiten a una célula tumoral evadir los controles normales de división y proliferar indefinidamente, existen otras relacionadas con la alteración de genes que participan en los procesos de apoptosis y reparación del ADN. Es así como ocurre la activación de protooncogenes en oncogenes que dan a la célula una capacidad de crecimiento anormal; la inactivación de genes supresores de tumores que normalmente inactivan o detienen el crecimiento de células normales; se omiten genes que conducen a la célula a morir por apoptosis o se desregulan otros implicados en la senescencia celular, y se incrementa la capacidad de generación de nueva vasculatura para nutrirse.

Estas mutaciones en las vías de señalización pueden resultar en el silenciamiento o en la sobreexpresión de ciertas moléculas, alterando drásticamente el perfil de expresión de la célula transformada con respecto a una célula normal. Muchos de estos cambios se asocian directamente con la adquisición de nuevas capacidades por parte de la célula tumoral.

Los antígenos derivados de la sobreexpresión de denominan antígenos asociados a tumor (AAT) y constituyen elementos no alterados de la biología celular pero cuya expresión se encuentra exacerbada en una célula tumoral pudiendo ser reconocidos por el sistema inmune del paciente. Los antígenos específicos de tumor (AET) por su parte, aparecen exclusivamente en la célula transformada como consecuencia de las alteraciones genéticas que ocurren, constituyendo antígenos únicos (Steplewski et al., 1979). La sobreexpresión de gangliósidos en tejidos tumorales constituye un ejemplo de AAT (Fredman et al., 2003), mientras que la presencia del antígeno TIM-3 (*T cell immunoglobulin mucin-3*) puede considerarse un ejemplo de AET en leucemias mieloides agudas (Kikushige et al., 2010).

Las modificaciones genómicas descritas constituyen los pasos iniciales de la transformación neoplásica. El desarrollo del fenotipo transformado involucra gran cantidad de mutaciones posteriores que le permitirán al tumor adquirir características fenotípicas relacionadas con la capacidad invasiva y metastásica que terminan eventualmente por comprometer la vida del paciente. Estos cambios subsiguientes pueden involucrar alteraciones en el perfil de expresión de proteínas de membrana como moléculas de adhesión (Meier et al., 2006), síntesis de polipéptidos con acción angiogénica (Melnikova et al., 2008) e incremento de la secreción de proteasas que degradan la matriz extracelular (Ripoll et al., 2006).

Glicosilación aberrante en tumores

Además de presentar variaciones en los niveles de expresión de diversas proteínas, las células tumorales encuentran alterado el perfil de modificaciones post-traduccionales de las

mismas, así como también el procesamiento de lípidos. Como se mencionó antes, la glicosilación constituye la modificación covalente más común que ocurre en estos compuestos celulares luego de su síntesis. La existencia de una glicosilación alterada es una característica prevalente en las células tumorales.

Al igual que las células normales durante la embriogénesis, las tumorales sufren una activación y rápido crecimiento, se adhieren a una variedad de otros tipos celulares y matrices extracelulares e invaden tejidos. El desarrollo embrionario y la activación celular en vertebrados se encuentran acompañados por cambios en los perfiles de glicosilación celular. Manteniendo esta analogía, no es sorprendente que también se produzcan cambios en las glicosilaciones durante la transformación maligna y la progresión tumoral. La primera evidencia de este fenómeno surgió de la observación de que ciertas lectinas de plantas, particularmente la aglutinina de germen de trigo, presentan una mayor unión a células tumorales (Rostenberg et al., 1978). Luego, trabajos realizados en células transformadas *in vitro* mediante infección con el virus de Sarcoma de Rous demostraron que éstas presentan diferencias en los glicopéptidos obtenidos luego de un tratamiento enzimático con respecto a células sin transformar, siendo más grandes y con mayor contenido de ácido siálico (Glick, 1979). Con el advenimiento de la tecnología de anticuerpos monoclonales durante los años '70 (Köhler y Milstein, 1975), los investigadores descubrieron que muchos de los anticuerpos específicos de tumor están dirigidos contra epitopes de glicanos, especialmente en GSL. En muchos casos, estudios posteriores demostraron que estos epitopes constituyen antígenos onco-fetales, es decir expresados también en tejidos embrionarios y en algunos tipos celulares en adultos.

Durante mucho tiempo el estudio de la glicosilación se mantuvo a la sombra de temas de investigación más populares como oncogenes, genes supresores de tumor, apoptosis, angiogénesis, receptores de factores de crecimiento y función de integrinas y cadherinas, a pesar del hecho que la glicosilación aberrante afecta profundamente todos estos procesos. Un aumento del interés por su estudio surgió cuando se encontró que existe una correlación directa entre ciertos patrones de glicosilación alterada y el pronóstico de la enfermedad, tanto en modelos animales como en pacientes. El concepto de promoción o inhibición de la progresión tumoral dependiente de glicosilación se desarrolló de la mano de estudios histopatológicos, los que permitieron determinar que la expresión de algunos epitopes promueve la invasión y metástasis acortando la supervivencia de los pacientes, mientras que la expresión de otros inhibe la progresión tumoral, incrementando la tasa de supervivencia (Hakomori, 1996).

En la actualidad se sabe que la glicosilación aberrante es una consecuencia común dentro del proceso de transformación oncogénica y es considerada un paso crítico para la inducción de los procesos de invasión y metástasis (Hakomori, 2002).

Existen distintos tipos de alteraciones en glicanos de células malignas. Algunos

ejemplos consisten en pérdida o excesiva expresión de ciertas estructuras, presencia de formas truncadas o incompletas, acumulación de precursores y la aparición de estructuras nuevas. La alteración en puntos de ramificación tempranos de las rutas de síntesis normales puede afectar negativamente la cantidad de un tipo particular de glicano ó permitir la abundancia de otro. Sin embargo, esto no ocurre de manera aleatoria como consecuencia del desorden que representa la biología tumoral. De la totalidad de cambios biosintéticos que pueden ocurrir en la formación de glicanos, sólo algunos pocos se correlacionan con la transformación maligna y la posterior progresión tumoral. Si se considera que el desarrollo de cáncer constituye un proceso "microevolucionado" en el cual sólo las células que puedan adaptarse dentro de una población genéticamente heterogénea podrán sobrevivir (Greaves y Maley, 2012; Sánchez Alvarado, 2012), es posible pensar que estos cambios específicos en glicosilaciones son seleccionados durante la progresión tumoral.

Algunas de las alteraciones que ocurren con mayor frecuencia en glicanos consisten en la presencia de N-glicosilaciones con ramificaciones no convencionales. Este tipo de estructuras fueron las responsables de las observaciones que reportaron un incremento en el tamaño de glicanos de células transformadas con respecto a las normales descrito previamente (Glick, 1979). En la actualidad se sabe que el incremento en N-glicosilaciones es producto de la expresión exacerbada de la enzima que cataliza ramificaciones en N-glicanos mediante el agregado de residuos GlcNAc (GlcNAc transferasa V), lo que permite luego la elongación con poli N-acetilactosaminas (Gal-GlcNAc_n) (figura 11). Trabajos recientes realizados en un modelo de carcinoma gástrico, y posteriormente validado en muestras humanas, demostraron que la expresión de esta enzima se encuentra involucrada en la invasión tumoral (Pinho et al., 2013), posiblemente debido a que se reduce la interacción entre células tumorales y entre células y la matriz, favoreciendo la liberación de las mismas de la masa tumoral (Demetriou et al., 1995; Guo et al., 2001).

Otro ejemplo lo constituyen las alteraciones en la expresión y glicosilaciones de mucinas. Las mucinas son una familia de glicoproteínas altamente glicosiladas y de alto peso molecular, que pueden ubicarse ya sea en la cara externa de la membrana plasmática o constituir productos de secreción. En ambas presentaciones, las mucinas contribuyen a la formación de una película en la superficie de células epiteliales de los tractos respiratorios, gastrointestinal y reproductivo, que cumple funciones de protección frente a agente patógenos y proteasas, de hidratación y de lubricación (Hattrup y Gendler, 2008). La sobreexpresión de mucinas ha sido ampliamente reportada en diversos carcinomas; más aun, algunas se han postulado como buenos marcadores de progresión de la enfermedad y de respuesta a tratamientos en algunos tipos de tumores (Bast et al., 2005; Boltin y Niv, 2013).

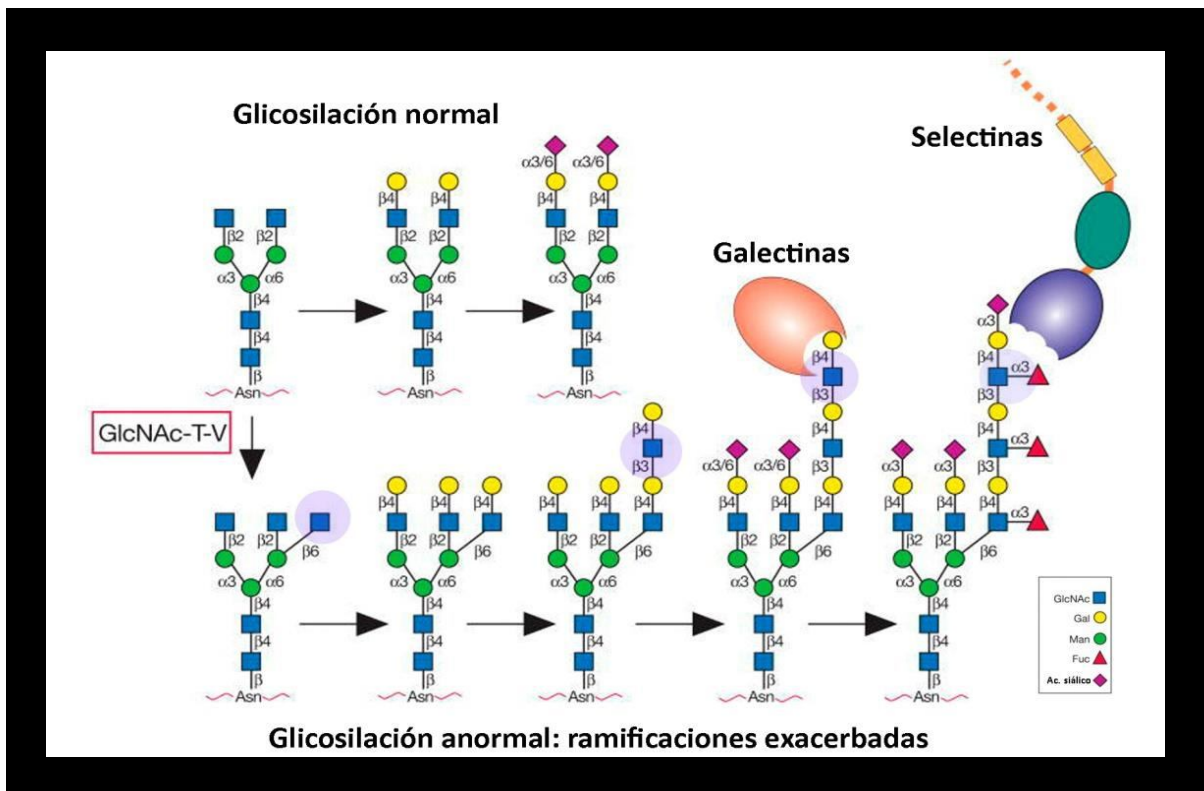


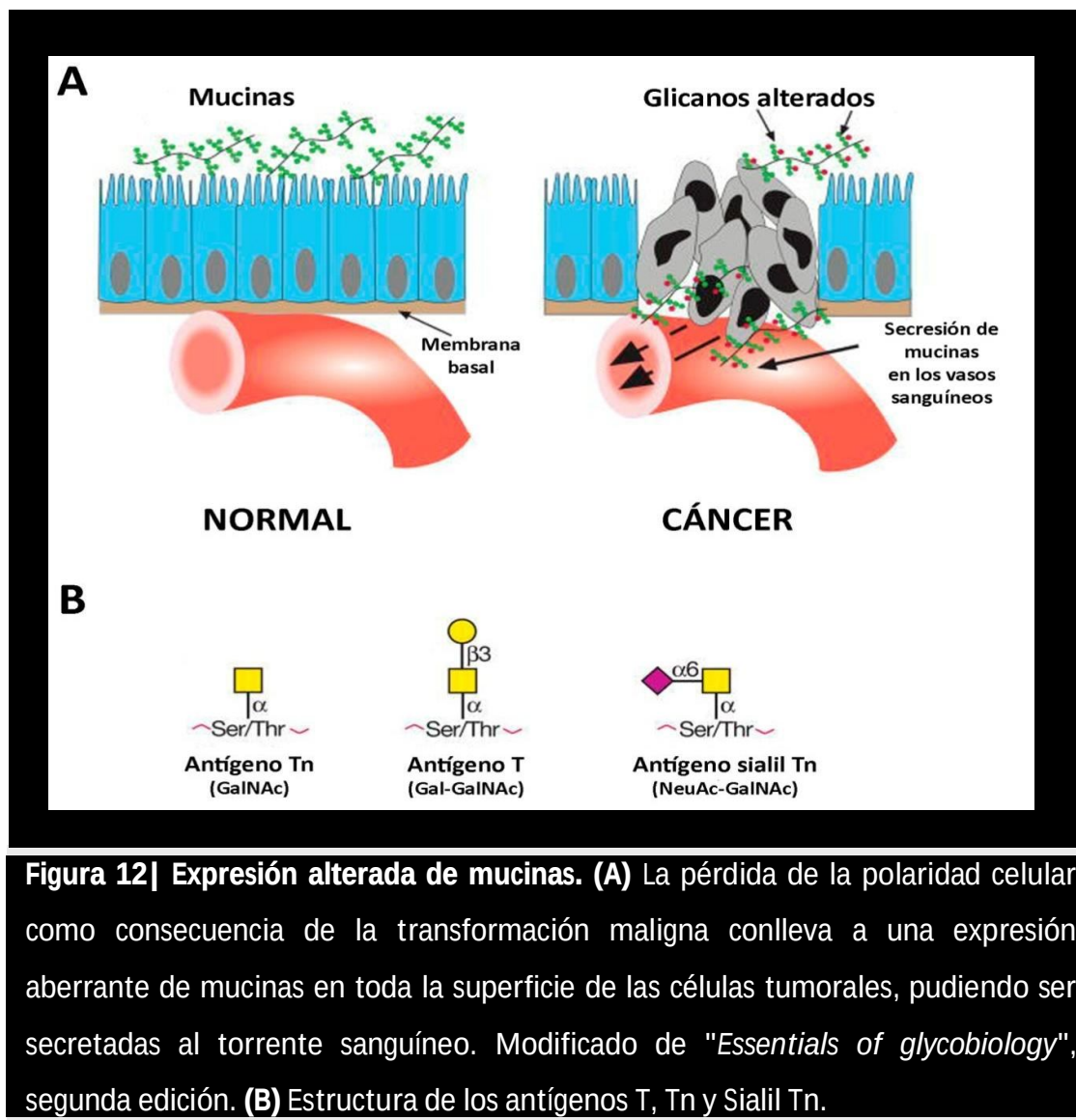
Figura 11 | Aumento de ramificaciones en N-glicanos. El incremento de glicosilaciones que ocurre luego de la transformación maligna se explica por la presencia de mayor cantidad de ramificaciones glucídicas producto de un aumento en la expresión de GlcNAc transferasa V. Esto permite el agregado de más residuos de glicanos y la posibilidad de reconocimiento por parte de galectinas y selectinas.

Modificado de "*Essentials of glycobiology*", segunda edición.

En el epitelio polarizado normal, las mucinas se expresan exclusivamente en el dominio apical, ubicadas hacia el lumen del órgano. Sin embargo, cuando ocurre la transformación maligna se pierde la estructura celular, permitiendo que las mucinas sean expresadas en toda la superficie de las células y que las variantes solubles sean volcadas al espacio extracelular y los fluidos corporales (figura 12A). En algunos casos, las mucinas actúan como moléculas anti- adhesivas, impidiendo la interacción de la célula tumoral con integrinas y cadherinas, promoviendo así el desplazamiento de las mismas desde el tumor primario durante el inicio del proceso de metástasis (Komatsu et al., 2000; Chauhan et al., 2009).

Adicionalmente a su expresión alterada, las mucinas también presentan alteraciones en los residuos de glicanos que las componen. Una de las principales modificaciones que ocurren en células de carcinomas es la glicosilación incompleta en O-glicanos de estas glicoproteínas, lo que genera como consecuencia la sobre expresión de pequeños

residuos como ser los antígenos T, Tn y Sialil Tn (figura 12B) (Ju et al., 2013). Estos antígenos nuevos pueden ser reconocidos por el sistema inmune del paciente, y esto se encuentra asociado con un mejor pronóstico de la enfermedad (Blixt et al., 2011; Stuchlová Horynová et al., 2013).



Las modificaciones en glicanos producidas como consecuencia de la glicosilación aberrante descritas previamente, también ocurren a nivel de los lípidos. De hecho, los cambios en el perfil de glicosilación de la célula asociados a la transformación oncogénica fueron demostrados inicialmente en GLS. Como ejemplo puede citarse a los gangliósidos, cuya expresión se encuentra frecuentemente alterada en células tumorales.

Gangliósidos en la biología tumoral

Como se describió previamente, ha sido demostrado que los gangliósidos cumplen un rol fundamental no solo en la regulación de procesos fisiológicos normales, como la embriogénesis, sino también en condiciones patológicas como ser el inicio de la transformación maligna y la progresión tumoral (Hakomori, 1996). Los primeros trabajos que relacionaron a los gangliósidos con marcadores asociados a tumor se obtuvieron en el año 1966, cuando se observó una expresión diferencial de los mismos en muestras de tumores cerebrales en comparación con tejido normal (Seifert, 1966). Años después se encontró que muchos de los anticuerpos monoclonales capaces de reconocer únicamente células tumorales, es decir, específicos de tumor, reaccionan con la porción glucídica de los GSL. Actualmente se sabe que los gangliósidos asociados a tumor son el resultado de la transformación oncogénica inicial y que tienen un papel fundamental en la inducción de la invasión y la metástasis. El concepto de promoción de la progresión dependiente de gangliósidos se desarrolló en conjunto con estudios clínico-patológicos que demostraron la expresión reducida de algunos de estos glicolípidos en tejidos normales y la sobreexpresión en tumores malignos particulares, especialmente en melanoma y tumores de origen neuroectodérmico (Dubois et al., 1986; Tsuchida et al., 1989; Hamilton et al., 1993). GD3, descrito como un antígeno específico de melanoma, es un ejemplo de este tipo de gangliósidos (Pukel et al., 1982). Todos los tejidos primarios al igual que las líneas celulares establecidas de melanoma contienen altas cantidades de GD3 como el principal gangliósido. Contrariamente, los melanocitos humanos normales expresan cantidades mínimas del mismo (Carubia et al., 1984). Adicionalmente, células con gran capacidad metastásica presentan un aumento en el contenido de gangliósidos en general, y en particular GD3, en comparación con células con poca capacidad de formación de metástasis (Ravindranath et al., 1991). Estos resultados, al igual que otros que demuestran la sobreexpresión de gangliósidos en diversos tumores en comparación con las contrapartes normales (Portoukalian et al. 1979; Mujoo et al., 1987), sugieren que los mismos participan en la transformación oncogénica inicial y en el mantenimiento de un fenotipo maligno en las células tumorales.

Gangliósidos en tumorigénesis. Una de las estrategias experimentales empleadas para determinar la función que desempeña una molécula dentro de la célula consiste en eliminar dicha molécula. El tratamiento de células de melanoma murino MEB4 con PPPP (d-1-treo-1-fenil-2-hexadecanoilamino-3-pirrodilino-1-propanol-HCl, un inhibidor de la síntesis de gangliósidos mediante bloqueo de la enzima glucosilceramida sintasa, ver figura 2) redujo significativamente el contenido de gangliósidos en las mismas y demostró un descenso en la capacidad de formación de tumores y metástasis en ratones (Deng y Ladisch, 2000). Por su parte, el uso de mAb reactivos contra GM2 indujo necrosis en un modelo de glioma humano *in vitro* (Bjerkvig et al., 1991), mientras que mAbs contra GD3 demostraron inhibir el crecimiento de células de melanoma *in vitro* (Dippold et al., 1984). Anticuerpos contra GD2 resultaron efectivos en la supresión del crecimiento de células positivas para este gangliósido en modelos *in vivo* (Alvarez-Rueda et al., 2007). La utilización de mAbs contra gangliósidos asociados a tumor también ha permitido obtener evidencias indirectas de que los mismos tienen una importante función en la tumorigénesis. Alternativas adicionales de modificación de expresión de gangliósidos, como la administración de nucleótidos antisentido y transfección de sialidasas, demostraron que estos compuestos presentan un papel fundamental en la modulación del comportamiento de la célula tumoral (Meuillet et al., 1999; Deng et al., 2002).

Gangliósidos como moléculas de adhesión y mediadores de metástasis. El rol de los gangliósidos en la biología tumoral también se ha asociado con funciones adhesivas, permitiendo la unión no sólo a diversas matrices extracelulares, sino también a otras células mediante interacciones *trans*, pudiendo promover el desarrollo del proceso metastásico (Handa y Hakomori, 2012). En un modelo de carcinoma renal *in vitro* se observó el agregado de las mismas con células mononucleares mediado por Siglecs (Ito et al., 2001) (proteínas de la familia de las lectinas capaces de reconocer residuos de ácido siálico), las cuales se encuentran altamente expresadas en diversas estirpes celulares sanguíneas (Crocker et al., 1998). Como consecuencia, fue posible especular que las metástasis producidas por carcinoma renal se encuentran favorecidas por la formación de dichos agregados, y que los mismos pueden incluir plaquetas estimuladas por las células tumorales para producir ciertos factores. Estos últimos estimulan a su vez a las células endoteliales a producir moléculas de adhesión intercelulares, vasculares o selectinas de los tipo P o E para iniciar la adhesión tumoral y posterior extravasación (Khatib et al., 1999).

Un ejemplo muy estudiado involucra la adhesión de células del melanoma murino B16 a células endoteliales, mediante la interacción del gangliósido GM3 con los GSL LacCer y Gb4 en el endotelio, promoviendo la adhesión y posterior invasión del tejido vascular (Kojima y Hakomori, 1991). Por su parte, Gg3, ha sido descrito como un ligando con alta afinidad por

GM3 y su expresión ha sido reportada en células de la vasculatura pulmonar, sugiriendo un mecanismo mediante el cual puede producirse diseminación del melanoma B16 a pulmón (Kojima et al., 1992). Resultados contradictorios se reportaron en modelos de carcinoma vesical y colorrectal, en los cuales GM3 forma un complejo con las tetraspaninas CD9 o CD82, inhibiendo la movilidad y la capacidad invasiva de las células (Satoh et al., 2001; Mitsuzuka et al., 2005). Esta correlación entre la expresión de GM3 y capacidad metastásica, opuesta según el modelo tumoral estudiado, sugiere que el papel de cada gangliósido en la biología de la célula tumoral varía drásticamente dependiendo del entorno molecular en el que se encuentre, el cual a su vez depende de la estirpe celular en la que se haya producido la transformación maligna.

Gangliósidos y angiogénesis. Las células tumorales tienen la capacidad de liberar de su superficie cantidades mayores de gangliósidos al microambiente que los tejidos normales, fenómeno que se conoce como *shedding* (Black, 1980; Chang y Ladisch, 1997). Esto permite elevar la concentración de los mismos en el suero de pacientes, lo que influye sobre la tasa de crecimiento al modularse diversos mecanismos de la biología tumoral (Hakomori, 1996). La incorporación de GD3 a cultivos de células de glioma permitió demostrar que el mismo estimula la producción de factores angiogénicos como VEGF (Koochekpour et al., 1996; Manfredi et al., 1999). En el caso de células que sobreexpresan, o son tratadas con GM3, se observa el fenómeno opuesto, produciéndose un descenso en la cantidad de moléculas que estimulan la formación de vasculatura (Seyfried y Mukherjee, 2010; Chung, 2009). Más aun, el efecto antiangiogénico demostrado por GM3 no es revertido por el agregado de gangliósidos más complejos con efecto reportado sobre el crecimiento vascular (Mukherjee et al., 2008).

Gangliósidos como inmunomoduladores. La hipótesis de que los gangliósidos actúan como supresores de la respuesta inmunológica se basa en estudios que demuestran que las células tumorales sintetizan y liberan gangliósidos en el microambiente (Black, 1980), actuando como moduladores directos de las interacciones entre células transformadas e inmunes, críticas para el crecimiento tumoral. Los gangliósidos derivados de tumores son capaces de inhibir múltiples pasos de la respuesta inmune incluyendo la activación de células T *helper* (Offner et al., 1987; Chu y Sharom, 1995; Crespo et al., 2006), modulación de la actividad citotóxica de células *natural killer* (Grayson y Ladisch, 1992) y la presentación antigénica por parte de monocitos (Ladisch et al., 1984).

Trabajos posteriores demostraron que estos glicolípidos son capaces de bloquear la producción de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Ziegler-Heitbrock et al., 1992), de modular negativamente la expresión constitutiva de moléculas del complejo mayor de

histocompatibilidad (MHC) inducible por IL-8 en astrocitos (Massa, 1993) y de inhibir la generación de células dendríticas activas (Shurin et al., 2001). Un mecanismo adicional de evasión del sistema inmune postula que los gangliósidos liberados pueden ser internalizados por células T activas conduciendo de esta manera a su apoptosis (Sa et al., 2009). El efecto negativo de los gangliósidos asociados a tumor sobre el sistema inmunológico también ha sido demostrados en modelos *in vivo* (McKallip et al., 1999).

Resulta interesante destacar que la actividad inmunomoduladora de los gangliósidos se encuentra fuertemente influenciada por la estructura de los mismos, siendo los residuos de glicanos y la porción ceramida determinantes en su actividad (Ladisch et al., 1992). Los gangliósidos producidos por células tumorales tienen asociada una actividad supresora del sistema inmune más fuerte que aquellos producidos por tejidos normales, debido principalmente a la reducción de la longitud de la cadena lipídica (Ladisch et al., 1994).

Por todo lo expuesto, resulta evidente que los gangliósidos expresados por células tumorales participan activamente en el fenotipo de la célula transformada, contribuyendo además a la progresión tumoral mediante la inducción de mecanismos que permiten evadir el control inmunológico impuesto por el organismo.

Inmunología del cáncer

Antígenos tumorales

El sistema inmune responde a las células tumorales de dos maneras: reaccionando contra AAT o contra AET. Para aquellos tumores de origen conocido resulta relativamente sencillo determinar sobre qué tipo de antígenos se monta la respuesta inmune. En el caso de tumores inducidos por carcinógenos en modelos animales, el sistema inmunológico es dirigido a productos proteicos normales de la célula que presentan mutaciones únicas, es decir, a proteínas específicas de tumor. Por otro lado, los tumores causados por virus exponen antígenos virales que actúan como tumorales. Algunos ejemplos bien estudiados los constituyen las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano, el agente causal del cáncer de cuello de útero, y EBNA-1, el antígeno nuclear de Epstein-Barr virus expresado por los linfomas de Burkitt.

Sin embargo, no resulta tan intuitivo determinar si un tumor originado por causas desconocidas, los cuales representan la mayoría de los desarrollados en humanos, expresa antígenos capaces de ser reconocidos por el sistema inmune. Gracias al desarrollo de la tecnología de hibridomas presentada por Köhler y Milstein en 1975, y a la posibilidad de amplificar células T específicas de tumor extraídas de pacientes con cáncer en el laboratorio (Gillis et al., 1978), fue posible identificar y caracterizar antígenos tumorales. El primero de ellos en ser identificado fue MAGE-1, un antígeno específico de melanoma capaz

de estimular células T *in vitro* (van der Bruggen et al., 1991). Utilizando células T antígeno-específicas como reactivos fue posible demostrar que el sistema inmunológico responde a determinadas moléculas expresadas por el tumor, comenzado así el camino hacia el estudio de los antígenos tumorales (Renkvist et al., 2001).

El mecanismo por el cual una célula T reconoce y reacciona específicamente contra un antígeno comienza cuando el proteosoma, tanto de células normales como de tumorales, degrada las proteínas en péptidos de menor tamaño para que células presentadoras de antígenos, a través de las moléculas MHC, las presenten a células T. Aquellos péptidos tumorales derivados de productos proteicos mutados o con diversas modificaciones, también son presentados a los linfocitos T. La reconstitución completa de la respuesta inmune *in vitro* fue posible cuando se logró la propagación de células dendríticas en el laboratorio (Banchereau y Steinman, 1998). Estas son susceptibles de ser cargadas con péptidos tumorales, proteínas o incluso con células tumorales completas y cultivarlas en conjunto con células T, imitando lo que ocurre en un organismo vivo. Mediante esta metodología, péptidos de interés fueron identificados gracias a su habilidad de expandir poblaciones de células T específicas de tumor (Kao et al., 2001). Algunos corresponden a productos de mutaciones únicas, mientras que la mayoría de ellos derivan de proteínas normales expresadas diferencialmente por células tumorales.

Otra de las estrategias para identificar antígenos tumorales involucra el análisis de sueros de pacientes con neoplasias particulares, de modo de detectar reactividad contra proteínas extraídas de células tumorales o producidas mediante bibliotecas de expresión (Sahin et al., 1997). De esta manera, proteínas reconocidas por los Abs presentes en el suero de pacientes, pero no por las muestras de voluntarios sanos, fueron identificadas como candidatas a antígenos tumorales. La proteína NY-ESO-1 por ejemplo, ampliamente estudiada como antígeno tumoral, fue descubierta mediante este método (Chen et al., 1997).

Con la identificación de tantos antígenos tumorales, se hizo necesario establecer criterios de selección de aquellos susceptibles a ser evaluados en la clínica como blanco de terapias inmunológicas. La seguridad constituye el principal interés, especialmente en aquellos autoantígenos expresados de manera aberrante en las células tumorales, pero de todas maneras presentes en las células normales. Como un primer criterio, resulta esencial asegurar que la respuesta inmune inducida contra éstos reconozca diferencialmente células tumorales pero no normales. El segundo criterio a considerar es el estado del antígeno en el tumor puesto que si se trata de una molécula cuya expresión presenta cierta tasa de variación debido a mutaciones, la respuesta inmune generada contra el mismo resultará irrelevante, evitando así el reconocimiento y destrucción inmunológico. Un último criterio a tener en cuenta es la posibilidad de aplicación de la terapia contra tumores de un mismo tipo o contra distintos tipos de tumores, basándose en la elección de antígenos compartidos sobre antígenos resultantes de mutaciones únicas.

Inmunogenicidad tumoral

Hasta hace algunos años se pensó que, aún cuando un tumor expresa antígenos específicos, no es capaz de inducir activación del sistema inmunológico porque no genera inflamación. Actualmente se conoce que ciertos productos de oncogenes expresados en etapas tempranas del desarrollo tumoral pueden iniciar una fuerte respuesta inflamatoria. Por ejemplo, tumores pulmonares cuyo origen se debe a mutaciones en el oncogén K-ras producen quemoquinas que reclutan células inmunes al microambiente tumoral (Ji et al., 2006). La proteína RET-PTC, producto de la fusión de dos oncogenes que conduce al desarrollo de cáncer de tiroides, modula el factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$, responsable de controlar la producción de citoquinas inmunoregulatorias creando de esta manera un microambiente proinflamatorio (Russell et al., 2004). Además, productos de células tumorales que se mueren como ser proteínas de *shock* térmico y cristales de ácido úrico, son algunas de las muchas sustancias inflamatorias en el entorno tumoral que representan señales de "peligro" para el sistema inmune (Rock et al., 2005).

Inmunovigilancia del cáncer

La hipótesis de la inmunovigilancia propone que el sistema inmunológico reconoce células malignas como extrañas y es capaz de eliminarlas. Conforme se avanzó con la comprensión de los mecanismos de inmunidad tumoral y con el desarrollo de técnicas y modelos animales, fue posible probar esta idea que resultaba controversial hasta ese momento. Sin embargo, todas las herramientas desarrolladas también permitieron demostrar que así como el sistema inmune puede proteger al huésped contra el desarrollo de tumores, también puede seleccionar tumores de baja tumorigenicidad promoviendo su crecimiento. Este efecto dual del sistema inmunológico condujo a incorporar el concepto de inmunovigilancia dentro de uno más amplio, la immunoedición. El encuentro entre el sistema inmune y un tumor naciente da comienzo al proceso denominado "*immunoedición*", el cual puede resultar en una de las siguientes tres posibilidades: eliminación de las células tumorales (inmunovigilancia); equilibrio del tumor, en donde períodos de crecimiento de la masa tumoral se acompañan de activación del sistema inmune y eliminación de algunas células malignas, repitiéndose este ciclo; y escape tumoral, definido como el crecimiento de variantes que resisten la destrucción por parte de las defensas del organismo (Dunn et al., 2004; Koebel et al., 2007) (figura13).

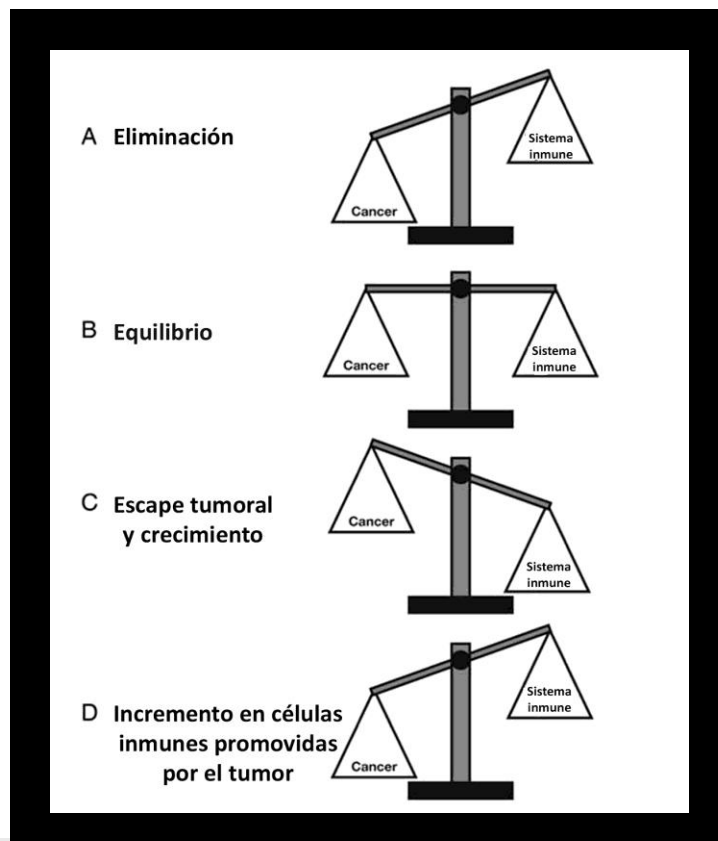


Figura 13| Representación del proceso de inmunoequilibrio. (A) Mediante la inmunovigilancia, el sistema inmune puede identificar y eliminar células tumorales. (B) Sin embargo, muchas veces esto no es posible y se produce un estado de equilibrio en el cual el tumor no crece ni produce metástasis. (C) Eventualmente, si la respuesta inmune falla, células tumorales que evadieron esa respuesta pueden ser seleccionadas permitiendo la progresión tumoral. (D) Adicionalmente, el tumor puede ser infiltrado por células inflamatorias que promueven el crecimiento del mismo y suprimen la respuesta antitumoral. Modificado de Finn, 2012.

Resulta difícil obtener evidencias experimentales de la inmunovigilancia en seres humanos puesto que se requiere un gran número de individuos así como también un seguimiento de los mismos a largo plazo. No obstante, estudios realizados para determinar la existencia de asociación entre funciones inmunológicas e incidencia de cáncer han implicado tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa. En el año 2007 se publicó un trabajo en donde se estudiaron 905 pacientes con trasplantes de corazón, pulmón o ambos durante 15 años para evaluar el efecto de la inmunosupresión, usada para prevenir el rechazo del nuevo órgano, en la incidencia de cáncer (Roithmaier et al., 2007). Los resultados

demostraron que esta población de individuos presenta una incidencia a desarrollar nuevos tumores 7 veces mayor que la población general. De la misma manera, un estudio previo realizado en Japón involucró el seguimiento de 3600 individuos sanos durante 11 años, demostrando que aquellos que presentan linfocitos con capacidad citotóxica mediana a alta poseen un riesgo significativamente menor de desarrollar cáncer que aquellos cuya actividad citotóxica es menor (Imai et al., 2000).

El sistema inmune también influye en la recurrencia del cáncer. Un trabajo realizado en 603 pacientes con cáncer de colon demostró que la presencia de células T infiltrantes en el tumor predice más adecuadamente la evolución clínica del paciente que los estándares actuales utilizados, como ser el estadio del tumor y la diseminación o no a nódulos linfáticos (Galon et al., 2006). Estas observaciones también fueron hechas en pacientes con cáncer de mama (Kohrt et al., 2005), urotelial (Sharma et al., 2007) y linfoma folicular (Wahlin et al., 2007).

Todos estos estudios demuestran que la presencia de ciertas células inmunes se asocia con un riesgo de recidiva menor y con supervivencia prolongada de los pacientes, poniendo de manifiesto la eficacia del sistema inmunológico para controlar la progresión y erradicación del tumor. Adicionalmente, resulta de suma importancia incluir la evaluación de la respuesta inmunológica, dentro y en los alrededores del tumor, en la valoración pronóstica, así como también en las decisiones relacionadas con el tratamiento a indicar.

Inmunosupresión y progresión tumoral

Cuando se analiza por qué se desarrolla un tumor en un organismo que aparentemente tiene un buen sistema inmunológico es necesario tener en cuenta numerosas variables que involucran tanto a la masa tumoral en crecimiento como al entorno en el que se ubica. Aún cuando opera el mecanismo de inmunovigilancia, un tumor puede inhibir la inmunidad en el microambiente tumoral y de manera sistémica (Rabinovich et al., 2007). Además de producir moléculas inmunosupresoras como TGF- β (del inglés *transforming growth factor β*) (Teicher, 2007) y el ligando Fas soluble (Houston et al., 2003), muchos tumores humanos producen la enzima inmunosupresora indolamina-2,3-dioxigenasa -IDO- (Muller y Prendergast, 2007). Esta enzima se conoce por su rol en la tolerancia materna a antígenos fetales (Munn et al., 1998) y como regulador de la autoinmunidad que media la inhibición de células T (Munn et al., 2002). La enzima IDO basa su acción en la degradación del triptofano, produciendo metabolitos que destruyen a los linfocitos. Cuando ratones portadores de tumor son inoculados con un RNA de interferencia específico para de IDO se recupera la actividad inmunológica de células T, induciendo un descenso en el tamaño de los tumores (Zheng et al., 2006).

El microambiente tumoral puede también estar dominado por células T regulatorias que

impiden la actividad antitumoral de células T efectoras mediante la producción de las citoquinas inmunosupresoras TGF- β e interleuquina-10 -IL-10- (Zou, 2006; Dennis et al., 2013). Gran cantidad de estas células pueden ser detectadas, por ejemplo, en el microambiente tumoral en pacientes con cáncer colorrectal (Lin et al., 2013). Tumores murinos que producen TGF- β son capaces de transformar una respuesta de células T efectoras en una respuesta regulatoria, escapando así de su destrucción por parte de células inmunes (Liu et al., 2007).

Los efectos inmunosupresores de un tumor también pueden ser sistémicos, como se comprueba mediante la detección de linfocitos T regulatorios en sangre periférica de pacientes con cáncer mamario (Decker et al., 2012) entre otros. Pacientes con tumores colorrectal o pancreático presentan un incremento en granulocitos activados (Schmielau y Finn, 2001) y en células mieloides supresoras (Nagaraj y Gabrilovich, 2007), las cuales inhiben la respuesta T específica de tumor en modelos murinos (Kusmartsev et al., 2005; Sinha et al., 2007).

Además de las propias sustancias sintetizadas y liberadas por el tumor para impedir una correcta actividad inmunológica, es necesario considerar las dificultades físicas que deben atravesar linfocitos y anticuerpos para llegar a contactarse con las células tumorales. Estas dificultades están representadas por los vasos sanguíneos y el estroma tumoral. Sin embargo, a pesar de todos los impedimentos existentes, el sistema inmune no sólo es capaz de reconocer y atacar al tumor, sino que también es susceptible a ser modulado mediante el empleo de numerosas terapias a fin de incrementar la respuesta inmunológica tumor-específica.

Inmunoterapia del cáncer

Un poco de historia

El primer estudio sistemático de aplicación de inmunoterapia para el tratamiento de tumores malignos fue realizado por un joven cirujano nacido en Nueva York llamado William Coley (1862-1936), cuyas investigaciones clínicas comenzaron en los años 1890. El interés de Coley por la inmunoterapia surgió luego de la pérdida de una paciente como consecuencia de padecer un sarcoma en uno de sus brazos. A pesar de haber sido exitoso en la extracción del tumor, el mismo desarrolló metástasis provocando la muerte de la joven poco tiempo después. Coley investigó los registros médicos del hospital y encontró los datos de un paciente con un sarcoma recurrente inoperable de cuello, el cual remitió luego de una infección posoperatoria causada por un estreptococo (Coley, 1891). Este incidente estimuló su trabajo posterior, el cual consistió en la infección de pacientes oncológicos con bacterias, dando origen así a la "toxina de Coley". La toxina estaba formada por la

combinación de *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens* inactivadas por calor (Coley, 1910). Coley comenzó a inocularla de manera intratumoral en 1891, y por más de 40 años trató a cientos de pacientes con sarcomas inoperables de hueso y tejidos blandos con inmunoterapia. A pesar de haber obtenido resultados notables en cuanto a la supervivencia en algunos de sus pacientes (44% de supervivencia luego de 5 años), su estrategia dejó de aplicarse gradualmente debido a que los procedimientos eran poco controlados, existía un escaso seguimiento de los pacientes y los resultados eran poco reproducibles en otros casos debido a las diversas formas de preparación y administración de las toxinas. Fue así como el interés clínico por la inmunoterapia aplicada al cáncer disminuyó en preferencia de estrategias que pudieran aplicarse más ampliamente como la quimio y la radioterapia.

Sin embargo, las observaciones de Coley y sus resultados clínicos alentadores permitieron entender que la respuesta inmunológica del paciente puede afectar el comportamiento biológico de los tumores malignos, y que un efectivo reconocimiento del tumor es posible mediante la manipulación del sistema inmunológico. De esta manera es posible iniciar una respuesta específica contra el tumor que eventualmente conduce a su destrucción.

A partir de los años 1950, el mundo científico retomó el interés por el estudio de la relación entre el sistema inmunológico y el cáncer, obteniéndose gran cantidad de evidencias de la antigenicidad tumoral y de la participación inmunológica en la evolución de ciertos tipos de tumores. Desde entonces, la estimulación de la respuesta inmunológica como tratamiento efectivo ha sido considerada una estrategia promisorio en la lucha contra el cáncer. Sin embargo, no fue hasta la década de 1990 que la inmunoterapia demostró evidencias certeras de efecto clínico en ciertos tipos de tumores, con la aprobación del uso de IL-2 para el tratamiento de cáncer renal en 1992 (Coppin et al., 2005), y la de rituximab para linfoma de células B en 1997 (Boyiadzis y Foon, 2008). Actualmente, muchos investigadores creen que la inmunoterapia debe considerarse, junto con la cirugía, la quimio y la radioterapia, la cuarta estrategia fundamental de tratamiento contra el cáncer (figura 14).

Inmunoterapia

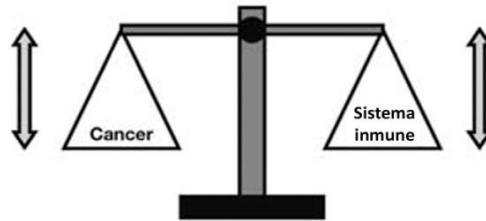


Figura 14| Inmunoterapia. El objetivo de la inmunoterapia es modular la inmunidad tumoral de manera de alterar la respuesta promotora del crecimiento del tumor y sustituirla por una de rechazo, favoreciendo así un control de la masa tumoral que perdure en el tiempo. Modificado de Finn, 2012.

Clasificación

La inmunoterapia del cáncer se clasifica en dos grandes grupos: activa y pasiva (figura 15). La inmunoterapia activa estimula directamente al sistema inmune del paciente para que responda contra las células tumorales, atacándolas. Puede a su vez subdividirse en dos tipos: específica y no específica.

La primera incluye tanto a las vacunas preventivas, dirigidas a agentes infecciosos que causan o contribuyen al desarrollo de cáncer como ser el virus de hepatitis B (HBV) o el de papiloma humano (HPV), como a las terapéuticas, dirigidas al tratamiento de tumores ya presentes en el organismo. Estas últimas pueden consistir en células tumorales completas y atenuadas, lisados tumorales o antígenos purificados, en presencia o no de adyuvantes inmunológicos para estimular la respuesta.

La inmunoterapia activa no específica en cambio, se basa en componentes del sistema inmune no específicos que incluyen adyuvantes inmunológicos como el bacilo *Calmette-Guérin* (BCG) y citoquinas como IL-2 e IL-12, factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), TNF- α e IFN - α -2b.

La inmunoterapia pasiva por su parte, se conforma de anticuerpos u otros componentes del sistema inmune, hechos fuera del organismo y administrados al paciente de manera de proveer una respuesta inmunológica contra el tumor. La inmunoterapia pasiva no estimula directamente al sistema inmunológico para que responda al tumor, puesto que evade los pasos necesarios para activarla. La transferencia pasiva de mAbs y células destinada a aumentar la inmunidad antitumoral constituye un tratamiento efectivo contra una gran variedad de neoplasias hematológicas y sólidas.

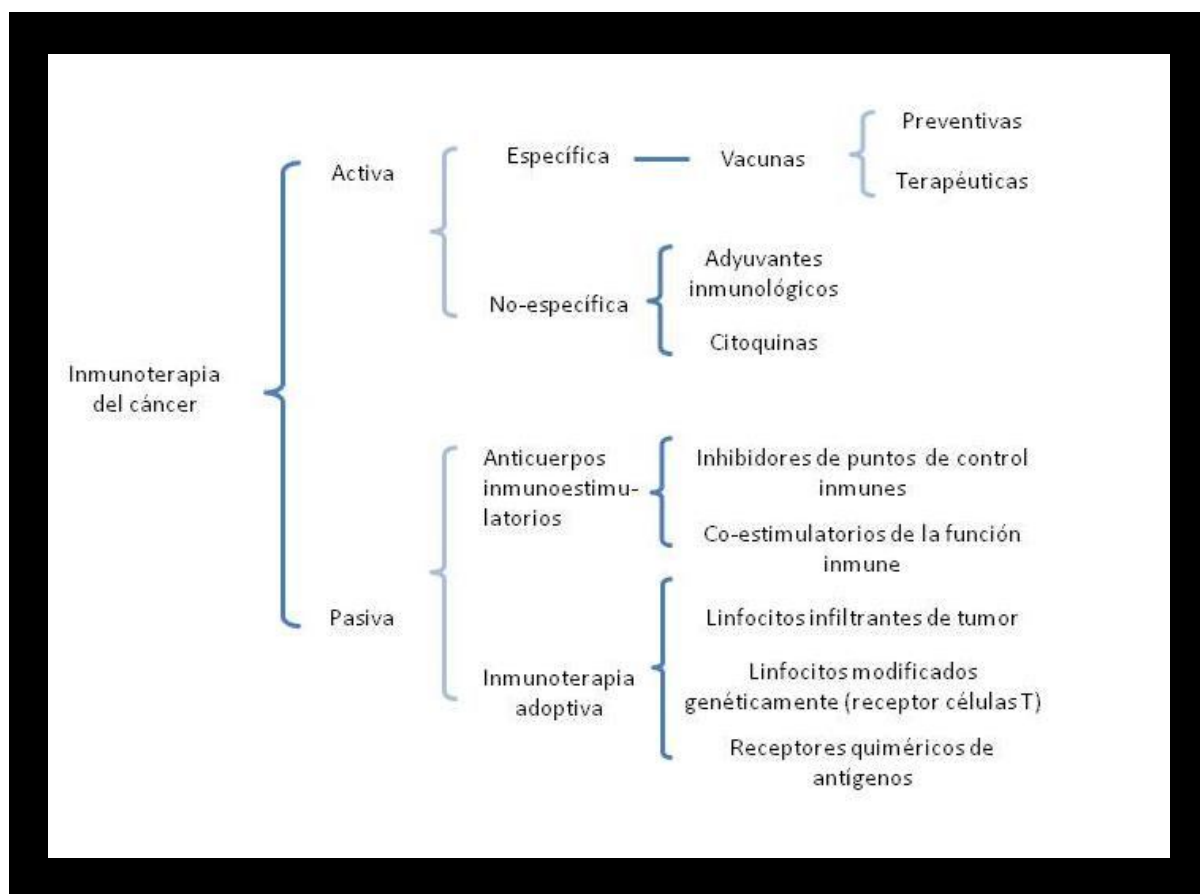


Figura 15| Clasificación de la inmunoterapia del cáncer. Modificado de Ito y Chang, 2013.

Inmunoterapia pasiva

Anticuerpos

Las inmunoterapias a base de anticuerpos se han convertido en una importante modalidad de tratamiento tanto para neoplasias hematológicas como para tumores sólidos. Esta terapia incluye anticuerpos sin conjugar, conjugados a drogas, a radioisótopos, fragmentos dirigidos a antígenos tumorales, y moléculas con más de un sitio de unión al antígeno (Beck et al., 2010).

Los anticuerpos monoclonales inhiben la proliferación tumoral al bloquear la unión de un ligando particular o impedir la dimerización de un factor de crecimiento, inhibiendo como consecuencia la señalización río abajo.

Adicionalmente, su mecanismo de acción también incluye la inducción de citotoxicidad mediada por células (ADCC), de fagocitosis y la activación de citotoxicidad mediada por complemento (CDC) (Golay e Introna, 2012; Weiner et al., 2010). Actualmente, la FDA ha aprobado el uso de 13 anticuerpos para distintas indicaciones oncológicas, ya sea solos o en combinación con quimioterapia (Tabla I) (Sliwkowski y Mellman, 2013). Entre ellos se pueden mencionar los anticuerpos dirigidos a receptores presentes en células tumorales como EGFR, HER-2, CD-20 y CD-52 (Scott et al., 2012).

Tabla I. Anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA para el tratamiento oncológico. Modificado de Sliwkowski y Mellman, 2013.

Blanco	Anticuerpo	Indicación
EGFR	Cetuximab	Colon, cabeza y cuello
EGFR	Panitumumab	Colon
HER2	Trastuzumab	Mama, gástrico
HER2	Pertuzumab	Mama
HER2	Ado-trastuzumab emtansina	Mama
VEGF	Bevacizumab	Colon, NSCLC, glioblastoma, riñón
CTLA4	Ipilimumab	Melanoma
CD20	Rituximab	Linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica
CD20	Ofatumumab	Leucemia linfocítica crónica
CD20	⁹⁰ Y-ibritumomab tiuxetan	Linfoma no Hodgkin: folicular de células B o de bajo grado
CD20	¹³¹ I-tositumomab	Linfoma no Hodgkin: folicular de células B o de bajo grado
CD52	Alemtuzumab	Leucemia linfocítica crónica
CD30	Brentuzumab vedotin	Linfoma de Hodgkin
CD33	Gentuzumab ozogamicin	Leucemia mieloide aguda

Terapia celular adoptiva

Uno de los principales desafíos de la inmunoterapia consiste en aumentar la activación de células T, redirigiéndolas contra el tumor y promoviendo su diferenciación a células de memoria (Sadelain et al., 2003). La terapia celular adoptiva consiste en el tratamiento de pacientes oncológicos con sus propios linfocitos T, los cuales son seleccionados por su capacidad de reconocimiento del tumor, expandidos *in vitro* y reinoculados en el mismo paciente (figura 16). La administración de linfocitos T infiltrantes de tumor (TILs) autólogos demostró una respuesta clínica favorable en pacientes con melanoma (Rosenberg et al., 2008).

Una estrategia más específica consiste en la utilización de células T modificadas genéticamente de manera que expresen receptores contra antígenos específicos de tumor o quiméricos. Estos últimos están formados por un sitio extracelular de reconocimiento antigénico -fragmento Fv de Ab- unido a un dominio de señalización (Eshhar, 1997). Si bien las terapias basadas en modificación de receptores T demostraron resultados alentadores en ensayos de laboratorio y en estudios clínicos, aún es necesario optimizar el método a fin de obtener una respuesta a largo plazo, evadir la inhibición inducida por el microambiente tumoral y activar una respuesta antitumoral endógena (Curran et al., 2012).

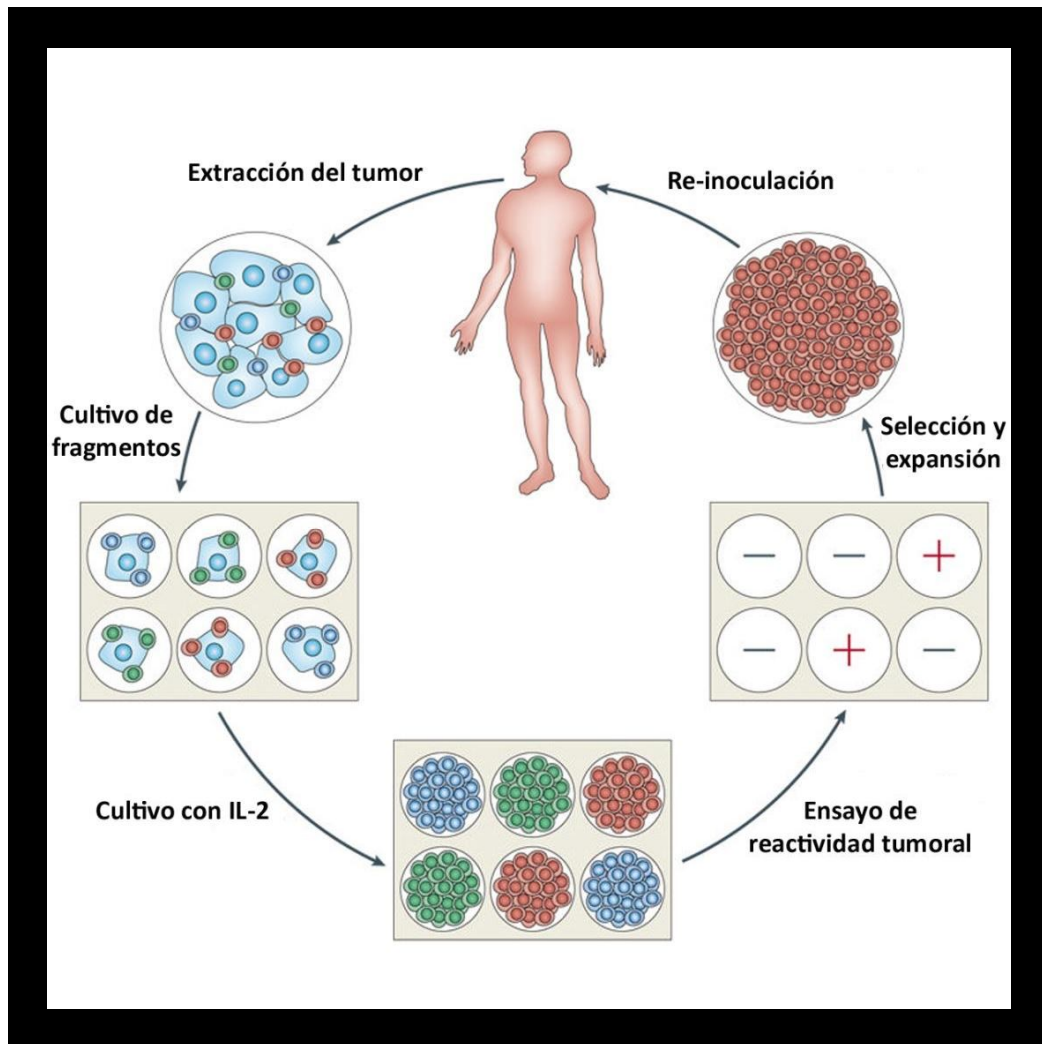


Figura 16| Terapia celular adoptiva. Un tumor es extraído y dividido en múltiples secciones para amplificar *in vitro* linfocitos infiltrantes. Luego son analizados para determinar su capacidad de reconocimiento del tumor. Aquellos cultivos celulares que resultaron reactivos son posteriormente amplificados y re-inoculados en el paciente. Modificado de Rosenberg et al., 2008.

Inmunoterapia activa

Vacunas preventivas y terapéuticas

Las vacunas preventivas han sido utilizadas exitosamente para la prevención de ciertos tipos de cánceres atribuidos a agentes infecciosos como el HBV y HPV. La agencia regulatoria FDA de Estados Unidos aprobó el uso de dos vacunas preventivas contra estos agentes. La vacuna HBV protege contra la infección con el virus de la hepatitis B y sus potenciales secuelas como ser cirrosis y carcinoma hepatocelular (McMahon et al., 2005). Su contraparte tetravalente HPV es eficaz en prevenir la infección con las variantes 6, 11, 16 y 18 del virus del papiloma humano y, como consecuencia, casos de neoplasias cervicales de alto grado causadas por los mismos (Garland et al., 2007). Recientemente ha sido demostrado que esta vacuna también protege contra lesiones precancerosas vaginales, vulvares y anales (Joura et al., 2007; Palefsky et al., 2011).

El desarrollo de vacunas terapéuticas para el tratamiento de tumores establecidos ha demostrado ser más complejo y desafiante. Este tipo de vacunas no están dirigidas al tumor directamente, sino al sistema inmunológico, el cual es activado para reconocer a las células tumorales y a su microambiente de manera de alterar el balance entre la tolerancia existente en favor del control tumoral. Para ser efectivas, las vacunas terapéuticas deben alcanzar dos objetivos. En primer lugar, al igual que las preventivas, deben ser capaces de estimular una respuesta inmune específica dirigida al blanco correcto. Luego, esa respuesta generada debe ser lo suficientemente fuerte para vencer las barreras que las células tumorales emplean para protegerse del ataque de células B y T citotóxicas.

La primer vacuna terapéutica aprobada por la FDA fue Sipuleucel-T, indicada para el tratamiento de cáncer de próstata metastásico (Kantoff et al., 2010). Esta vacuna celular constituye un producto hecho de manera específica para cada paciente puesto que está formada por células dendríticas autólogas cargadas *ex-vivo* con una proteína de fusión formada por GM-CSF y el antígeno PAP (de *prostatic acid phosphatase*), denominada PA2024 (So-Rosillo y Small, 2006). Las células cargadas son posteriormente re-inoculadas en el paciente con el propósito de generar una respuesta contra PAP.

La formulación de vacunas requiere el empleo de un adyuvante inmunológico, constituido por una sustancia que ayuda a estimular la respuesta del sistema inmune. El uso de adyuvantes radica en que los antígenos empleados en la realización de las vacunas no son lo suficientemente fuertes como para inducir una respuesta inmunológica por si solos. Los adyuvantes son sustancias que ayudan a la presentación antigénica al generar un foco inflamatorio en el sitio de inoculación. Los más utilizados en vacunas oncológicas provienen de distintas fuentes. Bacterias como el bacilo de *Calmette-*

Guérin; sustancias producidas por bacterias (Adkins et al., 2012) y productos derivados de organismos no bacterianos como la proteína KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) (Aarntzen et al., 2012) son ejemplos de sustancias usadas frecuentemente como adyuvantes inmunológicos. Sales minerales como el hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite y agua como Montanide ISA-51 (Mesa y Fernandez, 2004) y Adyuvante de Freund, y citoquinas como IL-2, INF- α (Berzofsky et al., 2012) y GM-CSF, también son ejemplos de sustancias inmunomoduladoras empleadas.

Inmunoterapia a base de gangliósidos

Los cambios que ocurren en la expresión de gangliósidos durante la transformación oncogénica los convierte en candidatos atractivos para la inmunoterapia del cáncer, pudiendo ser fácilmente reconocidos por los efectores inmunológicos debido a su ubicación en la superficie celular. Debido a su perfil de expresión, representa un interés especial el tratamiento de tumores de origen neuroectodérmico con inmunoterapia basada en gangliósidos. Sumado a esto, ha sido demostrado que anticuerpos que reconocen gangliósidos son capaces de inhibir el crecimiento tumoral, impedir el desarrollo de metástasis e inducir muerte celular (en apartado Gangliósidos y tumorigénesis). Sin embargo, la inmunización con antígenos sacarídicos en general desarrolla una respuesta de anticuerpos de baja afinidad y de corta duración, predominantemente del isotipo IgM, aún cuando se realizan repetidas inmunizaciones. Adicionalmente, como la mayoría de los GSL son antígenos propios expresados en bajos niveles en células normales, son capaces de inducir tolerancia por parte del sistema inmunológico. No obstante, en los últimos años se ha demostrado la presencia de células T específicas de gangliósidos (Mazorra, 2008), cuya activación requiere la presentación del motivo lipídico por parte de células presentadoras a través de la molécula CD1 (De Libero y Mori, 2005), demostrando que es posible la inducción de una respuesta inmunológica celular contra estos antígenos.

La posibilidad de romper la tolerancia inducida por gangliósidos en individuos sanos y en pacientes con melanoma surgió como consecuencia de la detección en el suero de Abs naturales específicos contra los mismos y de las células B que los producen (Watanabe et al., 1982; Furukawa et al., 1989). El uso de diferentes adyuvantes inmunológicos y el acoplamiento covalente a proteínas transportadoras han sido algunos de los métodos más empleados para incrementar la inmunogenicidad de estos GSL (Helling et al., 1994; Cipolla et al., 2008).

A fines de los años '80 se comenzó un ensayo clínico utilizando la vacuna GM2-BCG y bajas dosis de ciclofosfamida como inmunomodulador. Los resultados obtenidos demostraron la inducción de Abs IgM anti-GM2 en el 80% de los pacientes. Al comparar la evolución clínica de los pacientes que respondieron vs los no respondedores, los autores

concluyeron que la presencia de anticuerpos anti-GM2 representa un factor pronóstico favorable (Livingston et al., 1994). A partir de entonces, diversas vacunas a base de gangliósidos han llegado a etapas de evaluación clínica avanzadas, pudiendo mencionarse entre ellas la vacuna GD2-lactona KLH para melanoma (Ragupathi et al., 2003), fucosil GM1-KLH para carcinoma pulmonar de células no pequeñas (Krug et al., 2004) y GM2-KLH/QS-21, modificación de la vacuna GM2-BCG, para melanoma (Helling et al., 1995). Si bien se demostró una correlación entre la respuesta de anticuerpos anti-gangliósidos y la supervivencia, el ensayo fase III de esta última no demostró beneficio clínico por parte de la vacuna cuando se comparó contra el grupo placebo (Eggermont et al., 2013).

El uso de anticuerpos como parte de una estrategia inmunoterapéutica pasiva también ha sido explorado utilizando a los gangliósidos como blancos. Si bien existen gran cantidad de Abs que reconocen antígenos proteicos, solamente un número limitado de Abs anti-gangliósidos han sido identificados. Sin embargo, muchos de ellos despertaron gran interés al haber demostrado inducir muerte celular directa mediante oncosis, así como también ser mediadores de ADCC y CDC. Como ejemplo es posible mencionar anticuerpos anti-GD2 para el tratamiento de neuroblastoma (Barker et al., 1991; Frost et al., 1997; Kramer et al., 2007; Nakamura et al., 2001); anti-GM2 para carcinomas pulmonar de células pequeñas y no pequeñas (Hanibuchi et al., 2000), melanoma y linfoma de células T (Retter et al., 2005) y Abs anti-GD3 para el tratamiento de melanoma (Kirkwood et al., 2000).

A pesar de la naturaleza de los gangliósidos se han llevado a cabo múltiples estrategias vacunales con el objetivo de volverlos más inmunogénicos y, por ende, eficaces. La mayoría de las inmunoterapias a base de gangliósidos se han valido de la utilización de moléculas inmunoestimuladores para su correcta actividad, así como también de la combinación con terapias oncológicas convencionales como la quimioterapia. Los resultados obtenidos en los distintos ensayos clínicos realizados demuestran que aun restan establecer las condiciones óptimas en las que la inmunoterapia a base de gangliósidos sea efectiva, teniendo en cuenta el estadio de la enfermedad en que se encuentre el paciente, el tratamiento previo que haya recibido y la posibilidad de combinación con terapias convencionales.

Vacuna NAcGM3: experiencia de nuestro grupo con vacunas a base de gangliósidos

La vacuna NAcGM3 se desarrolló mediante la conjugación hidrofóbica del gangliósido NAcGM3 con el complejo proteico de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* para formar un proteoliposoma de tamaño pequeño denominado VSSP (del inglés *very small size proteoliposomes*). La actividad antitumoral del preparado vacunal NAcGM3/VSSP administrado en conjunto con el adyuvante Montanide ISA51, fue evaluada en el modelo de melanoma murino B16, puesto que estas células se caracterizan por expresar casi exclusivamente el gangliósido blanco de la vacuna. La administración

quincenal vía i.m. de la vacuna redujo el tamaño de los tumores de B16 inducidos en el flanco de ratones C57BL/6 singénicos, y prolongó la supervivencia de los mismos (Alonso et al., 1999). Carr y colaboradores demostraron que esta vacuna también fue efectiva en un modelo de melanoma más agresivo, reportando un incremento en la supervivencia de los ratones vacunados, protección frente a una nueva inoculación de células y descenso en el crecimiento de tumores formados por la administración de células B16F10 (Carr et al., 2001).

La actividad antitumoral del preparado NAcGM3/VSSP en el modelo B16 fue altamente específica y dependiente del adyuvante. La vacuna indujo una respuesta de isotipos IgM e IgG en ratones, y una fuerte actividad CDC contra células B16 (Alonso et al., 1999). Adicionalmente el efecto antitumoral demostró ser dependiente de la expresión del gangliósido en la superficie de las células.

Los resultados preclínicos obtenidos por nuestro grupo permitieron la realización del primer ensayo clínico fase I de la vacuna NAcGM3/VSSP en pacientes de melanoma en estadios avanzados. 26 pacientes con confirmación histológica de melanoma maligno, en estadios III y IV, fueron incluidos en el ensayo. Los eventos adversos más frecuentes consistieron en la aparición de endurecimiento e inflamación en el sitio de inoculación asociados con fiebre y escalofríos. En la mayoría de los pacientes, los linfocitos de sangre periférica aislados luego de la vacunación demostraron un índice proliferativo superior al de los obtenidos previo a las inmunizaciones, y un incremento en la secreción de IFN- γ *in vitro* luego de la estimulación con NAcGM3 (Guthmann et al., 2004).

El gangliósido NGcGM3: biología tumoral e inmunoterapia

Como se describió previamente, los ácidos siálicos más comunes en mamíferos son NAc y NGc. Sin embargo, debido a una mutación en la enzima CMAH, responsable de la síntesis de la variante glicosilada a partir del precursor acetilado, los seres humanos carecemos de glicoconjugados N-glicosilados. No obstante, ha sido demostrado que esta variante de ácido siálico se encuentra selectivamente expresada en células tumorales (Malykh et al., 2001). En particular, el gangliósido NGcGM3 ha sido reportado en tumores de melanoma (Carr et al., 2000), mama (Oliva et al., 2006), carcinoma pulmonar de células no pequeñas (van Cruysen et al., 2009), tumor de Wilms (Scursoni et al., 2010) y neuroblastoma (Sampor et al., 2012) entre otros. Si bien se han postulado varias teorías que explican la expresión de NGcGM3 en células tumorales (Vamecq et al., 1992; Malykh et al., 2001), el mecanismo más aceptado se basa en un incremento de la capacidad metabólica de las mismas de incorporarlo de la dieta (Tangvoranuntakul et al., 2003; Bardor et al., 2005) (figura 17). Estudios realizados en células tumorales indicaron que cultivos mantenidos en condiciones de hipoxia demostraron un incremento en la expresión del ARNm de sialina, una enzima involucrada en el transporte de ácidos siálicos. Este incremento se

correlacionó con un aumento en la incorporación de NGc del medio de cultivo (Yin et al., 2006).

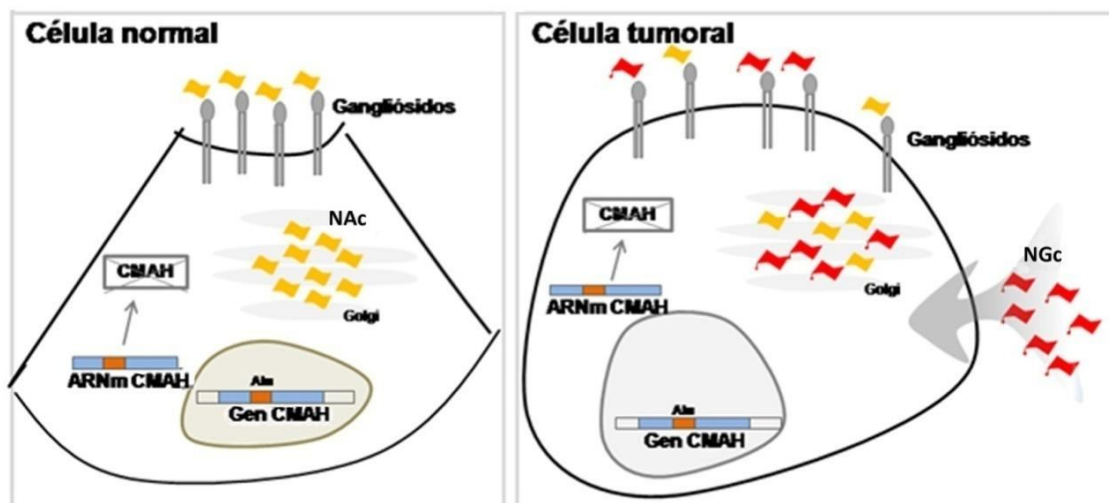


Figura 17| Incorporación de NGc a partir de la dieta. NGcGM3 es prácticamente indetectable en células normales. Sin embargo, las células de ciertos tumores son capaces de incorporar el ácido siálico NGc a partir de la dieta y procesarlo de manera de expresarlo en glicoconjugados como NGcGM3. Modificado de Fernandez et al., 2010.

Existen numerosas evidencias de que la presencia de NGc en tumores humanos representa ciertas ventajas para las células tumorales. Nuestro grupo reportó que células murinas que no expresan CMAH son capaces de incorporar NGc del medio de cultivo incrementando su fenotipo metastásico (Gabri et al., 2009). Adicionalmente, de León y colaboradores reportaron que este ácido siálico presenta propiedades inmunosupresoras al modular negativamente células T $CD4^{+}$ en el microambiente tumoral (de León et al., 2006) y al inhibir la actividad de células dendríticas (de León et al., 2008). Sin embargo, el mismo grupo reportó que la capacidad proliferativa e inhibitoria de poblaciones linfocitarias regulatorias $CD4^{+}CD25^{+}$ no se ven afectadas cuando se estimulan con IL-2 en presencia de NGc (de León et al., 2008). Asimismo, Varki propuso que la inducción de Abs anti-NGc en pacientes con determinados tumores puede mediar procesos inflamatorios facilitando la progresión tumoral (Varki, 2010).

La presencia de Abs anti-NGc en muestras de suero de pacientes fue descrita inicialmente por Hanganutziu y Deicher en los años 1920, cuando, de manera independiente, ambos observaron que luego de la administración terapéutica de suero de animales se

producen anticuerpos capaces de aglutinar eritrocitos. Cincuenta años después, los grupos de Higashi y Merrick demostraron que los epitopes reconocidos por los anticuerpos de Hanganutziu-Deicher (Abs-HD) constituyen gangliósidos N-glicolilados (Higashi et al., 1977; Merrick et al., 1978). A partir de entonces comenzó a reportarse la presencia de Abs-HD en muestras de suero y antígenos N-glicolilados en tejido tumoral de pacientes oncológicos, confirmándose que los mismos constituían antígenos específicos de tumor.

Aun considerando la hipótesis propuesta por Varki en cuanto a la relación entre Abs anti-NGc y la progresión tumoral mencionada anteriormente, se han reportado en más de una oportunidad que altos títulos de estos anticuerpos pueden inducir la muerte celular (Roque-Navarro et al., 2008; Varki, 2010; Hernandez et al., 2011).

Teniendo en cuenta la expresión selectiva de este antígeno en células tumorales y su ausencia en tejidos normales, el papel aparente que representan para la biología tumoral, que los mismos son capaces de ser reconocidos por el sistema inmune y que altos títulos de los anticuerpos específicos pueden ser perjudiciales para el desarrollo tumoral, NGc y particularmente el gangliósido NGcGM3, son considerados blancos específicos contra los cuales dirigir terapias oncológicas, en especial inmunoterapias.

Actualmente, dos vacunas a base del gangliósido NGcGM3 están siendo evaluadas en ensayos clínicos: racotumomab y NGcGM3/VSSP.

Vacuna racotumomab: está formada por un anticuerpo monoclonal anti-idiotipo dirigido contra gangliósidos N-glicolilados. Para su obtención se llevó adelante una estrategia que consistió en dos etapas. En primer lugar se inmunizaron ratones Balb/c con el gangliósido NGcGM3 incluido en liposomas, obteniéndose un Ab del isotipo IgM denominado P3, capaz de reconocer y unirse a gangliósidos y sulfátidos N-glicolilados (Vazquez et al., 1995). En una segunda etapa, se realizaron inmunizaciones de la misma cepa de animales con P3, también denominado Ab1, conjugado a KLH y en presencia del adyuvante de Freund, obteniéndose una respuesta específica del isotipo IgG, contra el idiotipo del primero. Estos anticuerpos también se conocen como Ab2. Racotumomab consiste en un clon particular seleccionado de ese *pool* de Ab2, capaz de bloquear la unión de P3 con NGcGM3 y de inducir una respuesta anti-idiotipo (Ab3) cuando es inoculado en animales singénicos (Vazquez et al., 1998). Por ser un anti-idiotipo, racotumomab es la imagen especular del idiotipo del mAb P3. De esta manera, al ser inoculado es capaz de actuar como el propio antígeno, induciendo una respuesta inmunológica contra compuestos N-glicolilados (figura 18).

Los ensayos preclínicos de racotumomab en tres modelos singénicos distintos demostraron su actividad antitumoral. Por un lado, animales Balb/c fueron vacunados con dosis i.p. de racotumomab conjugado a KLH en presencia de adyuvante de Freund. Los resultados obtenidos demostraron un descenso en la tasa de crecimiento tumoral de células

de carcinoma mamario F3II y una reducción en el número de nódulos pulmonares desarrollados de manera espontánea. Por otro lado, ratones de la cepa C57BL/6 fueron tratados con racotumomab por vía i.v., demostrando un descenso dramático en la colonización pulmonar de células de melanoma B16 (Vazquez et al., 2000). El último modelo consistió en la administración de racotumomab en conjunto con hidróxido de aluminio (racotumomab-alum) en animales C57BL/6, induciendo un efecto antitumoral al disminuir la cantidad de nódulos pulmonares formados por células de NSCLC 3LL-D122. El efecto obtenido se asoció a un incremento en la cantidad de células T infiltrantes en el tumor, en la apoptosis y una reducción en la formación de vasos sanguíneos en los nódulos pulmonares (Díaz et al., 2009).

La vacuna racotumomab también demostró ser efectiva contra el desarrollo tumoral cuando fue administrada en combinación con quimioterapia en modelos preclínicos. Fuentes y colaboradores trataron animales Balb/c con dosis bajas de ciclofosfamida y racotumomab-alum demostrando un descenso en el crecimiento de los tumores F3II. La combinación de ambas terapias también promovió el infiltrado de células TCD8⁺ y la apoptosis tumoral (Fuentes et al., 2010).

En el año 2002, Alfonso y colaboradores reportaron los resultados del ensayo clínico fase I de racotumomab realizado en 20 pacientes de melanoma demostrando no sólo la seguridad de la vacuna racotumomab-alum, sino también la inducción de una respuesta de Ab3 específica contra gangliósidos N- glicolilados en 16 de los 17 pacientes incluidos (Alfonso et al., 2002). Por su parte, el grupo de Hernández también reportó la generación de una respuesta anti-gangliósido en el 80% de los pacientes de NSCLC tratados con la vacuna, demostrando que aquellos que desarrollaron Abs IgG y/o IgM contra NGcGM3 presentaron una sobrevida mayor. Asimismo, comprobaron que el suero de los pacientes era capaz de inducir muerte celular independiente de complemento en células X-63, NGcGM3 positivas (Hernández et al., 2008).

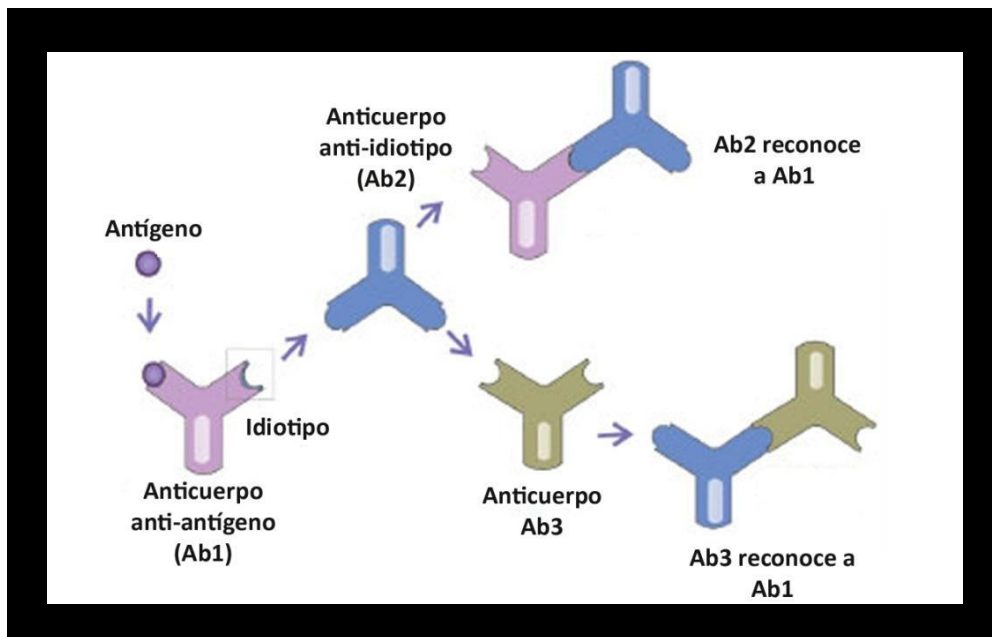


Figura 18| Red idiotípica. Representación de la obtención de un anticuerpo anti-idiotipo. El anti-idiotipo puede finalmente actuar como el antígeno induciendo una respuesta contra el mismo (Ab3).

Vacuna NGcGM3/VSSP: al igual que la vacuna a base de NAcGM3, esta vacuna fue desarrollada mediante la combinación del gangliósido NGcGM3 con el complejo proteico de la membrana externa de *N. meningitidis* para formar las VSSP (figura 19). La incorporación del gangliósido en las VSSP indujo la producción de una respuesta IgG en ratones, pollos e incluso monos, venciendo así la tolerancia que presentan estos GSL naturales cuando se administran en conjunto con un adyuvante inmunológico (Estevez et al., 1999). VSSP ha demostrado ser un potente adyuvante en favor de una respuesta Th1. La incubación de células dendríticas murinas derivadas de médula ósea y humanas derivadas de monocitos con VSSP, induce un aumento de expresión en membrana de la molécula MHC-II y de moléculas co-estimuladoras importantes para la función presentadora como CD80, CD86 y CD40 (Mesa et al., 2004), así como también un incremento en la secreción de IL-2. También fue demostrado que no existen diferencias entre las propiedades estimuladoras de VSSP y el lipopolisacárido de bacterias, utilizado frecuentemente como control positivo de activación de células dendríticas. El grupo de Mesa reportó que la inmunización de ratones con células tumorales irradiadas en conjunto con VSSP, seguido de la inoculación de células tumorales produce una respuesta antitumoral, mientras que animales inmunizados sólo con las células irradiadas no desarrollan respuesta (Mesa et al., 2006).

En el año 2003 se publicaron los resultados de un ensayo clínico fase I realizado para la vacuna NGcGM3/VSSP en 21 pacientes con carcinoma mamario avanzado (estadios

III o IV) administrado conjuntamente con el adyuvante Montanide ISA51. Habiéndose obtenido efectos adversos mínimos que incluyeron dolor en el sitio de inoculación y fiebre, todas las pacientes estadio III y la mitad de las estadio IV desarrollaron altos títulos de anticuerpos IgM anti- gangliósido. El 90% de las pacientes en estadio III y el 33% de las estadio IV desarrolló títulos IgG específicos. Anticuerpos IgA también fueron detectado en el suero de las pacientes (Carr et al., 2003). Los resultados obtenidos sugieren que el esquema de vacunación podría ser más efectivo en estadios menores de la enfermedad debido a la respuesta obtenida en las pacientes estadio III en comparación con las de estadio IV. Actualmente en Cuba se está realizando un ensayo clínico fase III en pacientes con cáncer de mama estadio II-III.

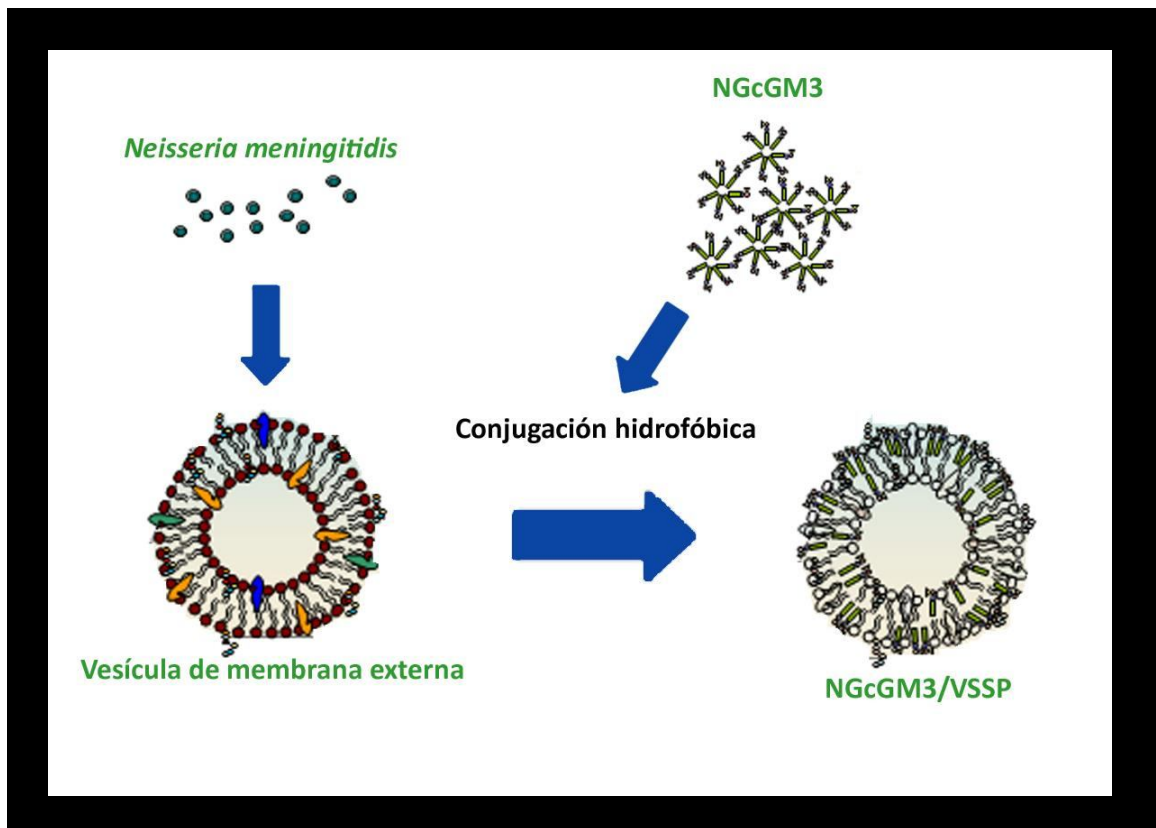


Figura 19| Vacuna NGcGM3/VSSP. Esquema de generación de la vacuna a base del gangliósido NGcGM3 conjugado a proteínas de la membrana externa de *N. meningitidis*.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis se centra en el estudio de la participación del ácido siálico NGc, en particular como componente del gangliósido GM3, en los procesos biológicos involucrados en la progresión del cáncer, utilizando modelos celulares y tumorales murinos con expresión homogénea y estable de NGc. Adicionalmente, dichos modelos son utilizados en la evaluación a nivel preclínico de la actividad antitumoral de preparados vacunales dirigidos contra NGc.

La hipótesis general del presente trabajo consiste en determinar la importancia de NGcGM3 en la biología de la célula tumoral y así validarlo como blanco para la inmunoterapia del cáncer.

Objetivos específicos

I- Participación de NGcGM3 en la biología de células tumorales.

- Determinar el perfil de expresión de NGcGM3 en los modelos celulares en estudio.
- Valorar las consecuencias de la expresión efectiva del NGcGM3 en la modulación de componentes de la membrana plasmática y de vías de señalización relacionadas.
- Estudiar el efecto de la expresión del NGcGM3 en la morfología celular.

II- Impacto de la expresión de NGcGM3 en la tumorigénesis.

- Determinar *in vitro* el comportamiento de células con expresión positiva de NGcGM3.
- Valorar si la presencia de NGcGM3 provoca cambios en la tumorigenicidad.
- Estudiar las características de crecimiento *in vivo* en modelos singénicos de las distintas líneas celulares con expresión de NGcGM3.

III. NGcGM3 como blanco de inmunoterapia en modelos murinos.

- Evaluar la respuesta antitumoral de la vacuna NGcGM3/VSSP en un modelo singénico de melanoma, con expresión de NGcGM3.

- Determinar la respuesta antitumoral desarrollada por la vacuna racotumomab en un modelo singénico de NSCLC, con expresión de NGcGM3.

Materiales

Anticuerpos monoclonales

14F7 es un anticuerpo monoclonal (mAb) murino del isotipo IgG1 dirigido contra el gangliósido NGcGM3. Fue desarrollado en el Centro de Inmunología Molecular de La Habana, Cuba, mediante la inmunización de ratones Balb/c con NGcGM3 conjugado hidrofóticamente a lipoproteínas de baja densidad en presencia de adyuvante de Freund (Car et al., 2000; Rodríguez et al., 2003). El sitio de reconocimiento del residuo azucarado está formado exclusivamente por residuos presentes en la cadena pesada de 14F7. La alta especificidad de unión por NGcGM3 radica en la existencia de una cavidad hidrofílica en dicho sitio de unión en la cual se producen interacciones del tipo puente de hidrógeno entre el grupo hidroximetilo del ácido siálico y diversos aminoácidos presentes en la estructura. Debido a la hidrofobicidad del grupo metilo en NAc, no es posible el reconocimiento de NAcGM3, de estructura similar a NGcGM3. Se sugiere que 14F7 tampoco es capaz de reconocer al gangliósido NGcGM2 debido a una posible interferencia estérica entre el residuo GalNAc terminal (figura 3) y las argininas 98 y 100 (Krengel et al., 2004).

El mAb M2590 es una IgM murina dirigida contra NAcGM3 (Cosmo bio Co. Ltd., Tokio, Japón).

Vacunas

NGcGM3/VSSP. La vacuna NGcGM3/VSSP fue producida y generosamente cedida por el Centro de Inmunología Molecular (La Habana, Cuba). Para su producción, NGcGM3 fue purificado a partir de glóbulos rojos de caballo y conjugado hidrofóticamente al complejo proteico de membrana externa de *N. meningitidis*, como fue reportado previamente por Estevez y colaboradores (Estevez et al., 1999). Este método permite que el gangliósido se incorpore de manera hidrofóbica en las VSSP, confiriéndole una alta solubilidad al conjugado. El grupo de Estevez evaluó la respuesta inmune inducida por NGcGM3/VSSP en dos modelos animales: pollos y ratones de la cepa Balb/c, mediante la inmunización por vía i.m. con una mezcla de volúmenes iguales de la vacuna y solución de hidróxido de aluminio (alum) ó adyuvantes inmunológicos, según el modelo empleado. Se utilizaron dos tipos de adyuvantes: completo de Freund y Montanide ISA 51. Este último consiste en una modificación del adyuvante incompleto de Freund al cual se le reemplazó el agente emulsificante Alarcel A altamente irritante. De esta manera, Montanide ISA 51 presenta menor toxicidad, siendo ampliamente utilizado en diversos ensayos preclínicos y clínicos (Ahlers et al., 1996; van Poelgeest et al., 2013). El esquema de inmunización evaluado en ambos modelos consistió en 4 dosis de la vacuna quincenalmente. El estudio serológico

reveló que los pollos no desarrollaron anticuerpos contra NGcGM3 cuando la vacuna se administró en hidróxido de aluminio. Por el contrario, todos los animales inmunizados en presencia de adyuvante completo de Freund desarrollaron altos títulos de anticuerpos. Cuando se evaluó la respuesta en ratones, los autores encontraron que la inmunización en presencia de Montanide ISA 51 indujo una respuesta en el 80% de los animales (Estevez et al., 1999). Trabajos previos realizados por el mismo grupo demostraron que una formulación basada en la conjugación del gangliósido a lipoproteínas de baja densidad no induce una respuesta inmunológica aun cuando es administrada en conjunto con adyuvantes.

Racotumomab. Racotumomab, originalmente denominado 1E10, es un mAb anti-idiotipo del isotipo IgG1κ producido en el Centro de Inmunología Molecular (La Habana, Cuba) mediante la inmunización de ratones Balb/c con el mAb P3 conjugado a KLH. P3 es una IgM que reconoce gangliósidos N-glicolilados y sulfátidos (Vazquez et al., 1995). Racotumomab reconoce el idiotipo de P3, es capaz de bloquear la unión de P3 con NGcGM3 y de inducir una respuesta inmunológica específica cuando es inoculado en animales (Vazquez et al., 1995; Vazquez et al., 1998). Racotumomab fue purificado a partir de líquido ascítico de ratones siguiendo buenas prácticas de manufactura, como fue descrito por Alfonso y colaboradores (Alfonso et al., 2002). Brevemente, la purificación fue realizada por cromatografía de intercambio en una columna de DEAE, seguido de una cromatografía de afinidad y exclusión molecular en una columna de Sephadex G-25.

Vazquez y colaboradores realizaron los primeros ensayos preclínicos de racotumomab en modelos animales murinos utilizando una formulación en la cual el anti-idiotipo se conjugó a KLH y se administró en conjunto con adyuvante de Freund. Los animales recibieron 7 dosis de 50 µg de racotumab por vía i.p. a intervalos de 14 días (Vazquez et al., 2000). Si bien los resultados obtenidos demostraron un efecto antitumoral por parte de la vacuna, se realizó un cambio en la formulación del preparado vacunal considerando los efectos presentados por KLH en los modelos animales y que el mismo no es utilizado en el tratamiento de pacientes. Diaz y colaboradores evaluaron luego el efecto de racotumomab conjugado a hidróxido de aluminio (racotumomab-alum) como adyuvante. La vacuna consistió en 1 mg/ml de racotumomab y 5 mg/ml de alum final, y fue administrada por vía s.c. en un esquema de 4 dosis de 50 µg de racotumomab-alum cada una, dos previas (días -28 y -14) y dos posteriores al desafío tumoral (días +7 y +21). Los resultados obtenidos demostraron un descenso en el número de nódulos pulmonares formados por diseminación espontánea (Diaz et al., 2009).

El preparado vacunal utilizado en este trabajo fue producido mezclando

Racotumomab purificado con hidróxido de aluminio como adyuvante hasta una concentración final de 1mg/ml de mAb. Algunos experimentos fueron realizados usando Racotumomab

obtenido por tecnología de fermentación en tanque agitado, recientemente descrito por Machado y colaboradores (Machado et al., 2011).

Ensayos *in vitro*

Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Para este trabajo se utilizaron tres variantes tumorales murinas, el melanoma B16F0 (B16) el carcinoma mamario F3II y el carcinoma de Lewis de células no pequeñas de pulmón 3LL. Para los ensayos *in vitro* se utilizaron además las células de mieloma murino X-63.

Melanoma. La línea celular B16 fue adquirida de la firma ATCC (ATCC CRL-6322).

Esta línea fue establecida mediante la adaptación de células obtenidas de un melanoma murino espontáneo de un ratón de la cepa C57BL/6, a las condiciones de crecimiento *in vitro* (Fidler, 1975). Las células B16 crecen adheridas al sustrato formando monocapas y son mantenidas *in vitro* en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, California, Estados Unidos) en presencia de 10% de suero fetal bovino (SFB) (PAA, Pasching, Austria) inactivado por calor y 80 µg/ml de gentamicina. Al ser inoculadas en ratones singénicos, B16 tiene la capacidad de originar tumores que semejan la patología del melanoma maligno.

La variante transfectada B16-H se mantuvo en las mismas condiciones que la línea parental, suplementando el medio de cultivo con 600µg/ml de geneticina (Gibco BRL) como antibiótico de selección.

Carcinoma mamario. La línea celular F3II de carcinoma mamario murino es una variante sarcomatoide altamente agresiva y metastásica establecida a partir de una subpoblación clonal de un tumor espontáneo originado en un ratón BALB/c (Alonso et al., 1996). Las células F3II crecen *in vitro* adheridas al sustrato hasta formar una monocapa confluyente. Esta línea es mantenida en cultivos en monocapa en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB inactivado por calor y 80 µg/ml de gentamicina. En ensayos *in vivo*, F3II forma tumores altamente invasivos localmente de manera similar en hembras y machos. *Carcinoma de pulmón Lewis.* El carcinoma de células no pequeñas de pulmón (NSCLC) 3LL fue establecido como línea celular a partir de un tumor originado espontáneamente en el pulmón de un ratón C57BL/6. En este trabajo se utilizó el clon D122, de inmunogenicidad baja y altamente metastásico en ratones singénicos (Eisenbach et al., 1984). Al igual que las líneas celulares anteriores, las células 3LL crecen *in vitro* adheridas al sustrato, formando monocapas y son mantenidas en cultivo en DMEM suplementado con 10% SFB y 80 µg/ml de gentamicina.

Mieloma. La línea celular X-63 deriva de un mieloma desarrollado en un ratón de la cepa BALB/c y crece formando una suspensión celular que no se adhiere al sustrato. Las células X-63 fueron utilizadas como control positivo de expresión del gangliósido NGcGM3 (Müthing et al., 1994).

Todas las células utilizadas fueron subcultivadas aproximadamente tres veces por

semana, usando una solución de disociación enzimática de tripsina-EDTA (Gibco BRL) en caso de que crezcan formando monocapas. La viabilidad celular fue evaluada usando la técnica de exclusión con el colorante vital azul tripán.

Transfección de la secuencia de CMAH

Extracción y amplificación de la secuencia. El ARN mensajero (ARNm) de CMAH fue amplificado por retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir de ARN total de hígado de ratón. El mismo fue obtenido mediante la utilización del kit RNAqueous Midi RNA (Ambion, Austin, Texas, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los ensayos de RT-PCR se utilizaron *primers* específicos de la secuencia (*primer forward*: 5'- CGCCTTCCTGGTGTGA-3'; *primer reverse*: 5'- GTTGGGTGGTGTAGAGG-3'). Para el paso de RT se emplearon 5 µg de ARN total, 10 mM dNTPs, 50 ng de hexámeros al azar pd(N)6 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK) como primers de primer cadena, 0.1 M ditioneitol (DTT), 40 U RNAsaOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) y 200 U de transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. La RT fue realizada a 50°C durante 1 h. Luego, la secuencia de CMAH fue amplificada mediante una reacción de PCR que consistió en 45 µl de mezcla de PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen), 10 pm de cada uno de los primers específicos y 1 µg de cADN obtenido en el paso de RT. El protocolo de ciclado utilizado fue el siguiente:

Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
Desnaturalización	95°C	30 s	} 35 ciclos
Hibridación	53.7°C	1 min	
Extensión	72°C	1.5 min	
Extensión final	72°C	5 min	

Clonado. Los productos de amplificación fueron clonados en el vector pcDNA3.1/V5-His TOPO (Invitrogen). Luego de confirmar la identidad de los insertos, la línea celular B16 fue transfectada usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen).

Análisis de expresión. La expresión del RNAm de CMAH fue evaluada mediante ensayo de RT-PCR, usando ARN total de hígado normal de ratón, de B16 o B16-H como molde de la reacción. Para obtener ARN total se utilizó el kit RNAqueous Midi RNA (Ambion) y se siguieron las instrucciones del fabricante. El protocolo de amplificación por RT-PCR utilizado fue el mismo que se describió anteriormente.

Preincubación con NGc purificado

Células 3LL fueron despegadas del sustrato con una solución de Tripsina-EDTA y resuspendidas en DMEM libre de SFB suplementado con 100 µg/ml de NGc purificado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). Luego de 1 h de incubación a 37°C, las células fueron lavadas extensivamente y resuspendidas en DMEM fresco para su uso.

Citometría de flujo

Las células fueron despegadas del sustrato utilizando una solución de tripsina- EDTA, resuspendidas en medio de cultivo libre de suero e incubadas a una concentración de 5×10^5 a 1×10^6 células por muestra con 5 o 1 µg de mAbs M2590 o 14F7 respectivamente, por 30 min a 4°C (M2590) o a temperatura ambiente (14F7). Anticuerpos controles del mismo isotipo que los primarios (IgM e IgG respectivamente) fueron incluidos. A continuación, las células fueron lavadas con *buffer* fosfato salino (PBS) y luego incubadas con una dilución 1:100 del anticuerpo secundario anti inmunoglobulinas de ratón conjugado a R- Ficoeritrina (PE) (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) por 30 min a 4°C.

Para la determinación de la expresión de integrina α5 las células fueron despegadas del sustrato empleando una solución de disociación no enzimática (Sigma-Aldrich). Luego se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente. Se utilizó una dilución 1:50 de un anticuerpo primario anti- integrina α5 de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Abcam, Cambridge, Inglaterra).

Para evaluar la respuesta humoral específica contra NGcGM3, 5×10^5 células X-63 fueron incubadas con una dilución 1:50 de sueros de ratón durante 30 min a temperatura ambiente. El protocolo continuó como se describió anteriormente. Un total de 2×10^4 células

fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU). El análisis de los resultados se realizó con el programa WinMDI 2.9 (en.bio-soft.net).

PCR en tiempo real

Extracción y retrotranscripción del ARN. Se sembraron 5×10^5 células por *well* en placa de 6 *wells* y se crecieron por 48 h en presencia de DMEM suplementado con 5% SFB. Luego de lavar la monocapa, se extrajo el ARN total de las células utilizando una solución de Trizol (Invitrogen) y siguiendo las indicaciones provistas por el fabricante. 1 μ g de ARN fue sometido a retrotranscripción utilizando *buffer* de unión y oligo dT como *primers* de primer cadena. Se realizó una desnaturalización inicial a 65°C durante 5 min y a continuación se agregaron 2 μ l de transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen), completando el volumen de reacción con *buffer* provisto por la misma. Se realizó el ciclado a 50°C durante 50 min y las muestras se guardaron a -70°C hasta su uso.

Amplificación por PCR en tiempo real. 2 μ l de cADN fueron sometidos a reacción de PCR. La mezcla de reacción consistió en 10 μ l de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies), 1 μ l *primer forward* (Fw) y 1 μ l *primer reverse* (Rev) en un volumen final de 20 μ l. Se amplificó la secuencia de ciclina D1 y como control endógeno se utilizó β -actina. Los primers utilizados fueron los siguientes:

Rev CD1: 5'-TAGTTCATGGCCAGCGGGAAG- 3'

Fw CD1: 5'-AGTGCGTGCAGAAGGAGATTG- 3'

Rev β -Act: 5'-AGCACTTGCGGTGCACGATG- 3'

Fw β -Act: 5'-CAAGATCATTGCTCCTCCTG- 3'

Western blot

Se sembraron 5×10^5 células por *well* en placa de 6 *wells* y se crecieron por 48 h en presencia de DMEM suplementado con 5% SFB. Luego de lavar la monocapa, se realizó una extracción de proteínas totales utilizando en *buffer* 150-GPLB (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% NP40, 10% glicerol, pH 7.4) suplementado con inhibidor de proteasas y de fosfatasas (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU). Los lisados fueron clarificados y la concentración de proteínas normalizada. Una muestra de 20 μ g de proteínas totales se resuspendió en *buffer* de siembra, se hirvió y se sometió a SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas y la membrana se inubó con anticuerpos anti caveolina-1 (Abcam), Src y pSrc Tyr 416 (Cell Signaling, Boston, MA, EEUU) y Rac1 (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones provistas por los fabricantes. Como control de carga se utilizó tubulina (Abcam).

Inmunofluorescencias

Se sembraron un total de 1×10^5 células por *well* en placa de 24 *wells* y se crecieron por 48 h en presencia de DMEM suplementado con 5% SFB. Luego de lavar, las células fueron fijadas con una solución al 3% de paraformaldehído en PBS a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con una solución de 20 $\mu\text{g/ml}$ de 14F7 ó con una dilución 1:50 de anti integrina $\alpha 5$ conjugado a FITC en PBS 0.1% BSA durante 1 h a 37°C. La unión del anticuerpo primario fue detectada mediante incubación con una dilución 1:400 del anticuerpo secundarios anti IgG de ratón conjugado a FITC en PBS 0.1% BSA (Caltag, Burlingame, CA, EEUU). Finalmente, las células fueron montadas en medio con 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para contrastar núcleos (Laboratorios Vector Inc., Burlingame, CA, EEUU).

Para la marcación de filamentos de actina, células sembradas en las mismas condiciones fueron incubadas por 16 h en DMEM libre de suero y luego estimuladas con el EGF (100 ng/ml) (Invitrogen) durante 15 min. Las células fueron posteriormente fijadas e incubadas con una solución de faloidina conjugada a AlexaFluor 555 (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse T2000.

Proliferación celular

Estimación por determinación de la cantidad de proteínas. Se sembraron un total de 1×10^4 células por *well* en placas de 96 *wells* y se crecieron en presencia de DMEM suplementado con 5% SFB. Luego de 48 h de incubación, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con una solución de formalina al 10%, teñidas con una solución al 5% de azul de toluidina y solubilizadas con una solución al 0.1% de SDS. El número de células fue estimado midiendo absorbancia a 595 nm.

Estimación por determinación de actividad metabólica. Se sembraron un total de 2.5×10^3 células por *well* en placas de 96 *wells* y se crecieron en presencia de DMEM suplementado con 5% o 10% SFB para F3II o 3LL respectivamente. 24 h luego de ser sembradas, las células 3LL se trataron con pemetrexed y se incubaron durante 72 h para determinar la concentración de quimioterapéutico que provoca el 50% de mortalidad (IC_{50}). Las células F3II fueron incubadas por 72 h en ausencia de droga. La citotoxicidad o la proliferación celular respectivamente fueron evaluada mediante el ensayo colorimétrico de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), (Sigma-Aldrich).

Crecimiento a baja densidad

Se sembraron 600 células por *wells* en placa de 24 *wells* y se crecieron en presencia de DMEM suplementado con 5% SFB. Luego de una semana de incubación, las colonias formadas se fijaron y tiñieron con una solución de cristal violeta y metanol. Para el recuento de las mismas se utilizó un microscopio invertido.

Adhesión celular

Se sembraron un total de 4×10^4 células por *well* en placas de 96 *wells* y se crecieron en presencia de DMEM suplementado con 2% SFB. En el caso de células 3LL, el medio de cultivo se suplementó con 100 µg/µl de NGc purificado. Luego de distintos tiempos de incubación, las células fueron lavadas cuidadosamente con PBS, fijadas con metanol, teñidas con una solución al 0.1% de cristal violeta y finalmente solubilizadas en una solución al 10% metanol 5% ácido acético. El número de células fue estimado midiendo absorbancia a 570 nm.

Inmunohistoquímica

Cortes histológicos de muestras de tumores de NSCLC humano fueron gentilmente cedidos por la Dra. Gabriela Cinat del Instituto de Oncología Ángel Roffo. Se estudiaron dos casos de adenocarcinoma y uno de carcinoma escamoso. Las muestras de tejido fueron desparafinadas con xilol e hidratadas mediante una serie de alcoholes de concentración decreciente. Los cortes hidratados se sometieron a bloqueos con suero normal, avidina y biotina (Laboratorios Vector Inc). Luego se incubaron con una dilución 1:100 de los sueros a evaluar durante 30 min, seguido por una incubación de 1 h con el anticuerpo secundario anti IgY de pollos conjugado a biotina (Abcam). La detección de los anticuerpos unidos se realizó por incubación con diaminobenzidina (DAB) (Vector). Finalmente, se realizó una tinción nuclear de contraste con hematoxilina. Se incluyeron controles negativos por omisión del anticuerpo primario.

Los sueros se obtuvieron de un protocolo de inmunreactividad de racotumomab en un modelo de pollos. Los animales fueron vacunados vía s.c. en un esquema de tres dosis de la vacuna racotumomab-alum los días 0, 7 y 21, siendo 0 el día de la primer administración. Las dosis evaluadas fueron entre 25 y 1600 µg de la vacuna cuya concentración fue 1 mg/ml. La recolección de las muestras se realizó 14, 21, 28 y 35 días después de la primer inmunización, mediante extracción de sangre de la vena del ala de los animales. Para los ensayos de inmunoreactividad contra muestras histológicas de NSCLC, se evaluó el suero de animales inmunizados con una dosis de 400 µg de racotumomab, tomado el día 28 del protocolo. La elección de las muestras se basó en los resultados de ensayos de ELISA

que demostraron la inducción de la mejor respuesta humoral anti-NGcGM3 en las condiciones mencionadas. Tanto la ejecución del protocolo en pollos, como el análisis de los sueros por ELISA se llevaron adelante en el Laboratorio de Inmunogenética, INIGEM-CONICET.

Ensayos *in vivo*

Animales

Se utilizaron ratones de las cepas C57BL/6 en la experimentación con los modelos singénicos de melanoma B16 y carcinoma pulmonar 3LL, y BALB/c para el modelo de carcinoma mamario F3II. Adicionalmente, también se utilizaron ratones de la cepa NUDE. Los ratones utilizados en este trabajo tenían una edad aproximada de 10 semanas de edad y un peso de entre 20 y 25 g. Fueron adquiridos en el bioterio de la Facultad de Veterinaria de La Plata y mantenidos en condiciones estándar en cajas de no más de 6 animales con libre acceso al agua y alimento.

Recolección de sueros

Los ratones controles y tratados fueron anestesiados, sangrados por punción cardíaca e inmediatamente sacrificados por dislocación cervical. La sangre se dejó cuagular a 4°C *over night* y luego se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min. Se obtuvieron pools de sueros de cada grupo experimental y se guardaron a -20°C hasta su uso.

Inoculación de células tumorales

Tumor primario. Se inocularon de 5×10^3 a 5×10^5 células B16 o B16-H, y 4×10^5 células 3LL viables/200 µl de DMEM en el flanco derecho de ratones C57BL/6 por vía s.c., según el diseño experimental que corresponda. Para el modelo de mama, ratones BALB/c ó NUDE fueron inoculados con 2×10^5 células F3II viables/200 µl de DMEM en el flanco derecho por vía s.c. En todos los casos se evaluó la latencia, toma y crecimiento tumoral. La formación de tumores fue monitoreada mediante palpación periódica. El tamaño tumoral fue medido con calibre tres veces por semana. El diámetro tumoral fue calculado utilizando la fórmula $\sqrt{(\text{ancho} \times \text{largo})}$ y el volumen tumoral fue determinado mediante la fórmula $\pi/6 \times \text{largo} \times \text{ancho}^2$. Los animales fueron sacrificados por dislocación

cervical entre 50 y 60 días luego de la inoculación tumoral o cuando manifestaron signos de no encontrarse en buen estado de salud.

Metástasis espontáneas. En los experimentos que así lo requerían, luego del sacrificio de los animales, los pulmones fueron extraídos, fijados en solución de Bouin y los nódulos pulmonares superficiales fueron contados y medidos con la ayuda de una lupa estereoscópica.

Metástasis experimentales. Se inocularon 7.5×10^4 células 3LL viables/300 μ l de DMEM incubadas previamente con NGc purificado como se describió anteriormente. La inoculación se realizó en la vena lateral de la cola de ratones C57BL/6. Luego de tres semanas los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los nódulos pulmonares se cuantificaron como se describió.

Inmunización con la vacuna NGcGM3/VSSP

Para los ensayos de actividad antitumoral, los ratones fueron vacunados con 200 μ g del gangliósido conjugado a VSSP (NGcGM3/VSSP) diluido en un volumen igual del adyuvante inmunológico Montanide ISA 51 (Seppic, Paris, Francia). Se administraron cuatro dosis de la vacuna con una frecuencia quincenal, por vía i.m. Los animales del grupo control recibieron solución salina como placebo respetando el mismo esquema de tratamiento. Una semana luego de la tercer dosis, los animales fueron inoculados con 5×10^3 o 2×10^4 células B16 o B16-H/200 μ l de DMEM (día 0) (figura A). El crecimiento tumoral fue monitoreado como se describió anteriormente. La elección de la dosis administrada se basó en resultados previos de nuestro grupo con la vacuna NAcGM3/VSSP, similar en su formulación a NGcGM3/VSSP. 200 μ g del gangliósido conjugado a VSSP fue la menor dosis que induce una respuesta óptima en los animales (Gabri et al., 2006).

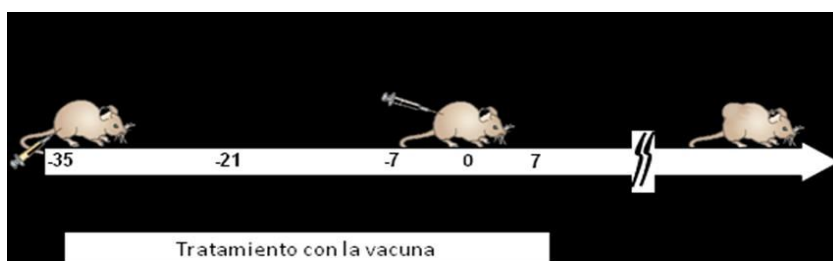


Figura A|Tumor primario. Esquema de inmunización con la vacuna NGcGM3/VSSP.

Inmunización con la vacuna racotumomab

Metástasis espontáneas. Los animales fueron vacunados con cuatro dosis de 50 µg de racotumomab cada una, administradas quincenalmente. La vacunación comenzó el día de la inoculación de las células 3LL (día 0). En el caso de los ensayos combinados con quimioterapia, cuando los tumores fueron palpables, entre los días 10 y 12, los animales recibieron 3 ciclos con una frecuencia semanal de pemetrexed (100 mg/kg) o docetaxel (20 mg/kg) por vía i.p. (figura B)

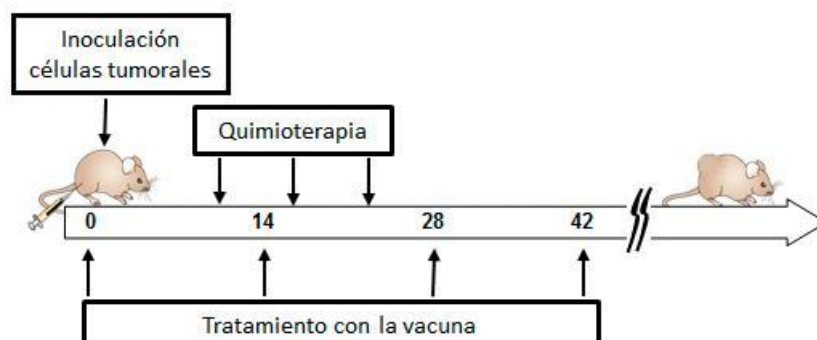


Figura B | Metástasis espontáneas. Esquema de inmunización con la vacuna racotumomab combinada a quimioterapia.

Metástasis experimentales. Los animales fueron vacunados con 50 o 200 µg de racotumomab, recibiendo dos dosis previas (días -14 y -7) y una dosis luego de la inoculación i.v de células 3LL (+7) (figura C)

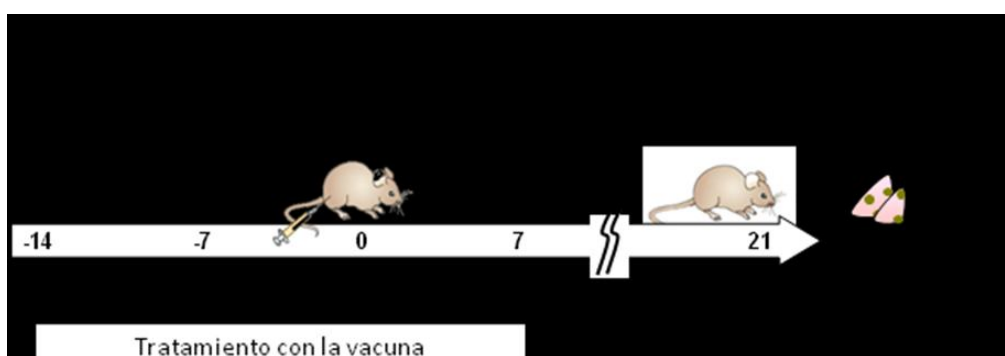


Figura C | Metástasis experimentales. Esquema de inmunización con la vacuna racotumomab.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas GraphPad Prism (GraphPad Prism Software, La Jolla, CA, Estados Unidos) e Instat.

Resultados

Capítulo I

Participación de NGcGM3 en la biología de células tumorales

Desarrollo de modelos con expresión de NGcGM3

• Modelos de expresión estable

Un primer paso en el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas basadas en un nuevo blanco específico de tumor consiste en su validación preclínica mediante el empleo de modelos animales. Los modelos animales tumorales -en particular los modelos murinos- resultan en una herramienta de innegable valor en la investigación oncológica. Permiten estudiar fenómenos relacionados con la biología tumoral, así como también evaluar la actividad antitumoral de distintas estrategias en etapas preclínicas de investigación puesto que tienen como objetivo imitar las características de la enfermedad humana.

Contrariamente a lo que ocurre en seres humanos, los tumores murinos no suelen expresar NGc. Debido a la diferencia en el perfil de expresión del mismo que se presenta entre humanos y ratones, se plantea un desafío adicional en el diseño de las estrategias de evaluación y validación preclínica de terapias que hagan blanco en gangliósidos glicosilados.

Con el objetivo de contar con líneas murinas que sean capaces de expresar NGc de manera estable, y así poder desarrollar modelos animales que puedan ser extrapolables a la enfermedad humana, en nuestro laboratorio se obtuvo y clonó la secuencia de CMAH, enzima encargada de la síntesis de NGc. Mediante el empleo de técnicas de biología molecular fue posible amplificar el marco de lectura completo de la enzima (1776 pb) a partir de ARN extraído de células de hígado de ratón y clonarlo en un vector apropiado para su correcta expresión en células eucariotas. Finalmente, se transfectaron células B16 y F3II con dicho vector. Las células que se obtuvieron como resultado de la transfección se denominaron B16-H y F3II-H respectivamente.

El primer paso en la caracterización de estas células consistió en la evaluación de la correcta expresión del gen de CMAH en ambas líneas celulares. Para ello se realizó un ensayo de RT-PCR, utilizando *primers* específicos de la secuencia. El producto de amplificación obtenido se correspondió con la secuencia completa del ADNc de CMAH. Como control positivo de la reacción se utilizó ARN extraído de hígado de ratón y como control de la integridad del ARN se realizó la amplificación de una región de 457 pb para el gen GAPDH

(gliceraldehído fosfato deshidrogenasa). Tanto B16-H como F3II-H demostraron ser capaces de transcribir correctamente el gen correspondiente a CMAH (figura I.1 A y B).

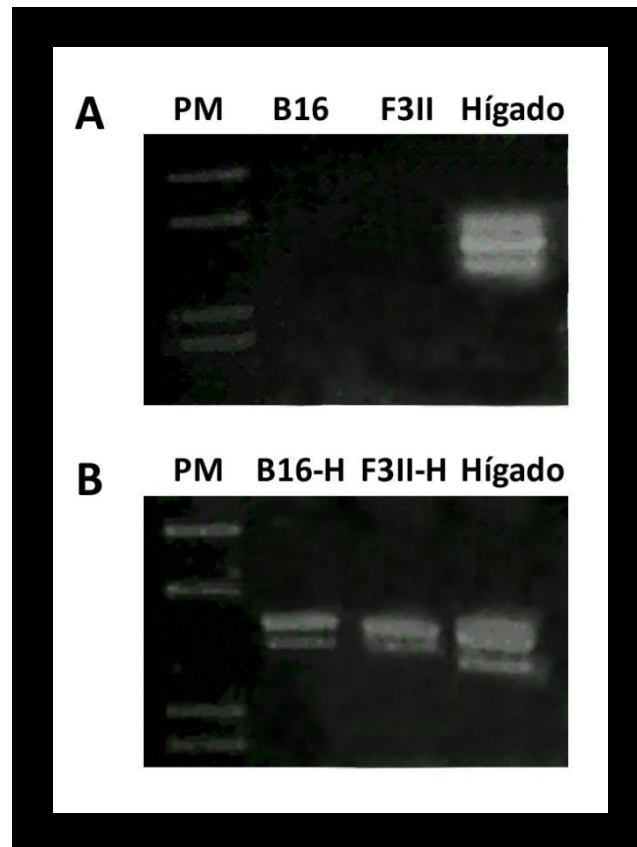


Figura II.1| Expresión de la enzima CMAH en células B16 y F3II transfectadas.

ARN de células B16 y F3II fue extraído y sometido a una reacción de RT-PCR como se describió en Materiales y Métodos. **(A)** RT-PCR de células B16 y F3II con *primers* específicos de la secuencia de CMAH. Ambas líneas celulares son negativas para la misma. **(B)** RT-PCR de células B16-H y F3II-H con *primers* específicos. La transfección resultó en la expresión de la enzima, obteniéndose una banda del peso molecular esperado (1776 pb). Como control positivo de amplificación se utilizó ARN extraído a partir de hígado de ratón.

La transfección de la secuencia de CMAH aumenta la presencia de NGcGM3 en la membrana de células de melanoma B16-H y carcinoma mamario F3II-H

Luego de haber corroborado que CMAH se expresa correctamente en las líneas transfectadas, se evaluó si dicha enzima presenta actividad biológica. Para esto se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y citometría de flujo utilizando el mAb 14F7, específico para el gangliósido NGcGM3. Como puede observarse en la figura I.2A, se obtuvo un

incremento en la fluorescencia correspondiente a la sobreexpresión de NGcGM3 en B16-H. Interesantemente, los resultados obtenidos por citometría de flujo mostraron que NAcGM3, un gangliósido altamente expresado en células B16 (Gabri et al., 2002) y precursor de la síntesis de NGcGM3, fue modulado negativamente en B16-H, disminuyendo su expresión a un 60% de células positivas. Adicionalmente, la expresión de NGcGM3 fue significativamente mayor en células B16-H, aumentando su expresión de 2% a 80% aproximadamente (figura I.2B). Estos resultados demuestran que la presencia de CMAH en B16-H altera la ruta de síntesis de gangliósidos, conduciendo a un aumento de la presencia de GM3 en su forma glicolilada a expensas de un descenso en la forma acetilada precursora.

De manera similar, la evaluación por citometría de flujo de células F3II-H demostró un aumento en la expresión de NGcGM3 de cinco veces, incrementando de un 6% de células positivas en la línea parental a un 30% en las células transfectadas. Este resultado confirma la existencia de actividad biológica de la enzima CMAH y la sobreexpresión del antígeno en esta línea celular (figura I.3). En todos los casos se incluyeron controles negativos de isotipo y positivos de expresión de NGcGM3.

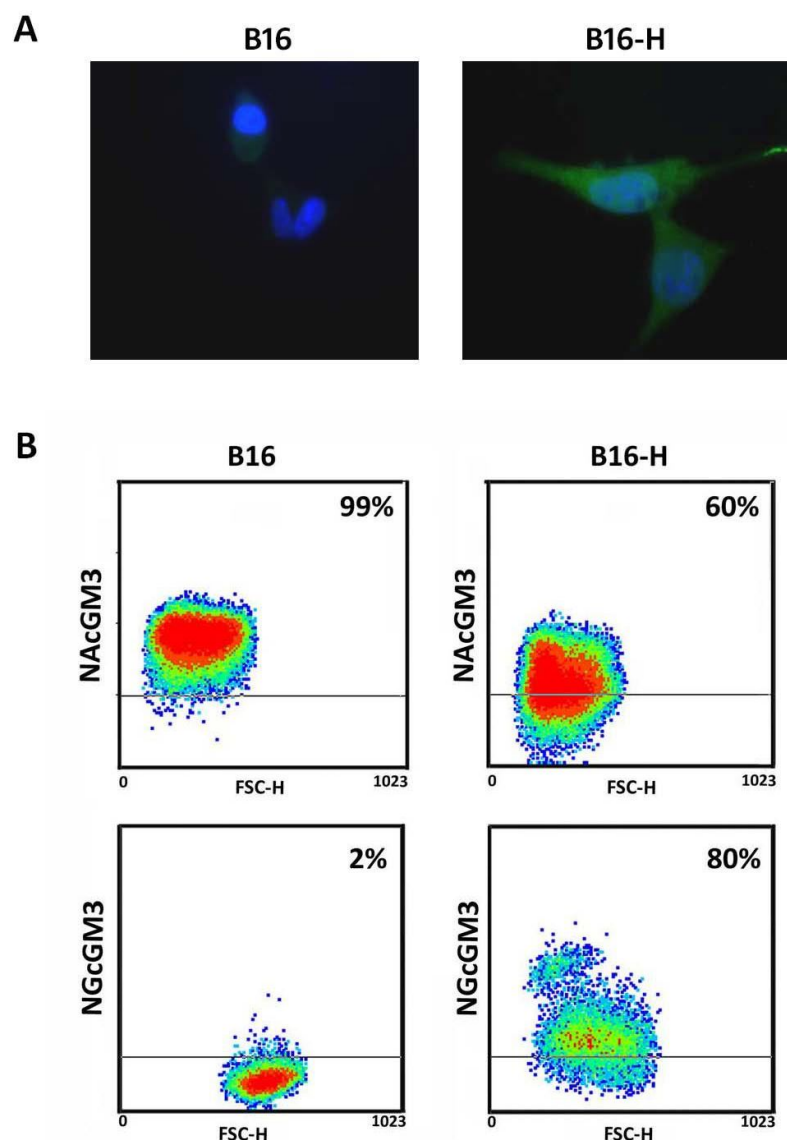


Figura 1.2| Expresión del gangliósido NGcGM3 como resultado de la transfección de la secuencia de CMAH en células B16. Células B16 y B16-H mantenidas *in vitro* fueron analizadas para determinar la expresión de NGcGM3 en sus membranas celulares como se describió en Materiales y Métodos **(A)** Inmunofluorescencia utilizando el mAb específico 14F7. Como resultado de la transfección, se detectó un incremento en la cantidad de NGcGM3 expresado en la membrana celular de B16-H. Aumento final: 1000X. **(B)** Citometría de flujo utilizando los mAb específicos M2590 y 14F7, que reconocen NAcGM3 y NGcGM3 respectivamente. Las células B16-H demostraron un descenso en la expresión de NAcGM3 y un incremento

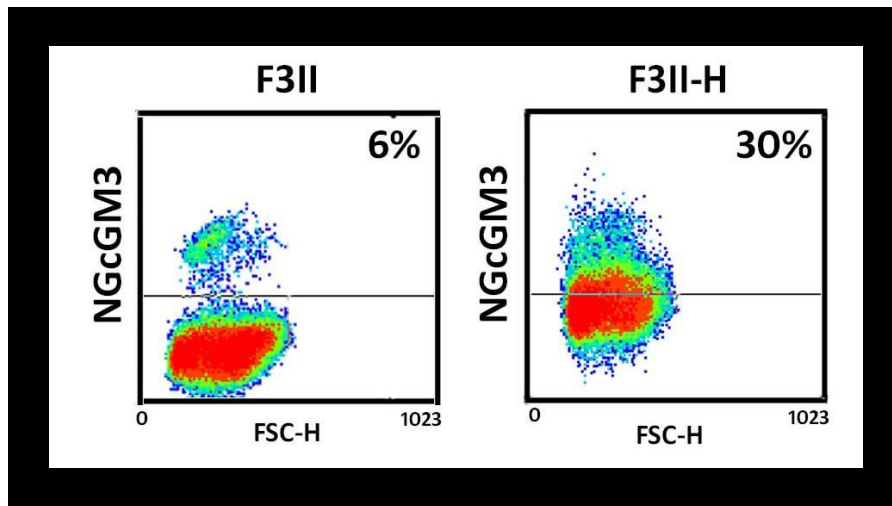


Figura I.3| Expresión del gangliósido NGcGM3 como resultado de la transfección de la secuencia de CMAH en células F3II. Células F3II y F3II-H fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar la expresión de NGcGM3 en sus membranas celulares como se describió en Materiales y Métodos. Para la marcación se utilizó el mAb 14F7. Fue posible detectar un aumento en la expresión de NGcGM3 en las células transfectadas.

La expresión de NGcGM3 desciende a lo largo de los pasajes *in vitro* durante el mantenimiento de B16-H en cultivo

El vector de expresión utilizado para transfectar la secuencia de CMAH fue diseñado para ser mantenido en líneas celulares eucariotas de manera estable. Para ello, el mantenimiento *in vitro* de las líneas transfectadas se llevó a cabo en presencia de geneticina, antibiótico empleado como presión de selección. Sin embargo, como consecuencia de los sucesivos pasajes *in vitro* observamos un descenso en la expresión de NGcGM3 en B16-H hasta que no fue posible detectarlo por las técnicas utilizadas de rutina. En la figura I.4 se representan los niveles de expresión del gangliósido en función del número de pasaje. Es posible observar que luego de aproximadamente 30 pasajes *in vitro*, la expresión de NGcGM3 se detectó sólo en un 5% de las células totales analizadas. Esta disminución en el número de células B16-H positivas para NGcGM3 se correlacionó inversamente con los pasajes *in vitro* de los cultivos ($p < 0.005$, test de Pearson). Aún cuando las células transfectadas se mantuvieron bajo la presión de selección adecuada, la expresión del gen CMAH sufrió un proceso de silenciamiento. Una explicación posible a este proceso

sería la integración del gen de resistencia en el genoma de B16 y la pérdida de actividad del resto de información contenida en el vector. Por otro lado, la síntesis de CMAH podría estar ocurriendo en bajas proporciones sin que sea detectada por el sistema utilizado para evaluar su expresión.

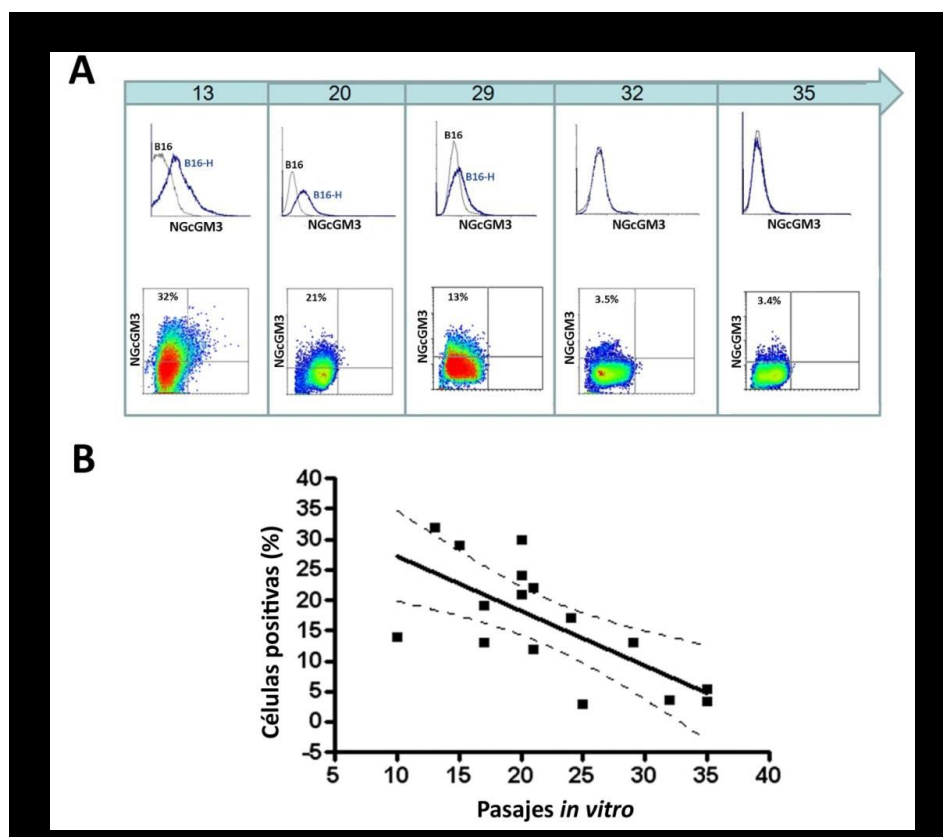


Figura 1.4| Expresión de NGcGM3 en células B16-H en relación al número de pasaje. Células B16-H fueron mantenidas *in vitro* y analizadas por citometría de flujo como se describió en Materiales y Métodos. **(A)** Citometría de flujo de distintos cultivos de células B16-H utilizando en mAb 14F7. **(B)** Relación entre el porcentaje de expresión de NGcGM3 y el número de pasaje. La expresión de NGcGM3 en la membrana celular se relaciona de manera inversa con el número de pasaje. $p < 0.005$, test de Pearson.

- **Modelo de expresión transitoria**

La participación de NGcGM3 como un blanco relevante para inmunoterapia fue inicialmente sugerida por experimentos llevados a cabo en el modelo altamente metastásico de carcinoma de Lewis de células no pequeñas de pulmón (NSCLC) 3LL. La inoculación de animales singénicos por vía subcutánea conduce al desarrollo de nódulos espontáneos en el pulmón. Resultados previos de nuestro grupo demostraron un aumento en la expresión del antígeno específico en nódulos diseminados con respecto al tumor primario s.c. o a células crecidas *in vitro* (figura 1.5) (Labrada et al., 2010), confirmando que el gangliósido es incorporado por las células tumorales durante su tránsito por los vasos del hospedador en el camino al órgano blanco. Este fenómeno de incorporación y expresión de NGcGM3 en la membrana de células tumorales fue descrito previamente por nuestro grupo y por otros (Gabri et al., 2009; Fernandez et al., 2010). La capacidad de células 3LL de carcinoma pulmonar de Lewis de expresar NGcGM3 las convierte en un modelo preclínico validado de NSCLC.

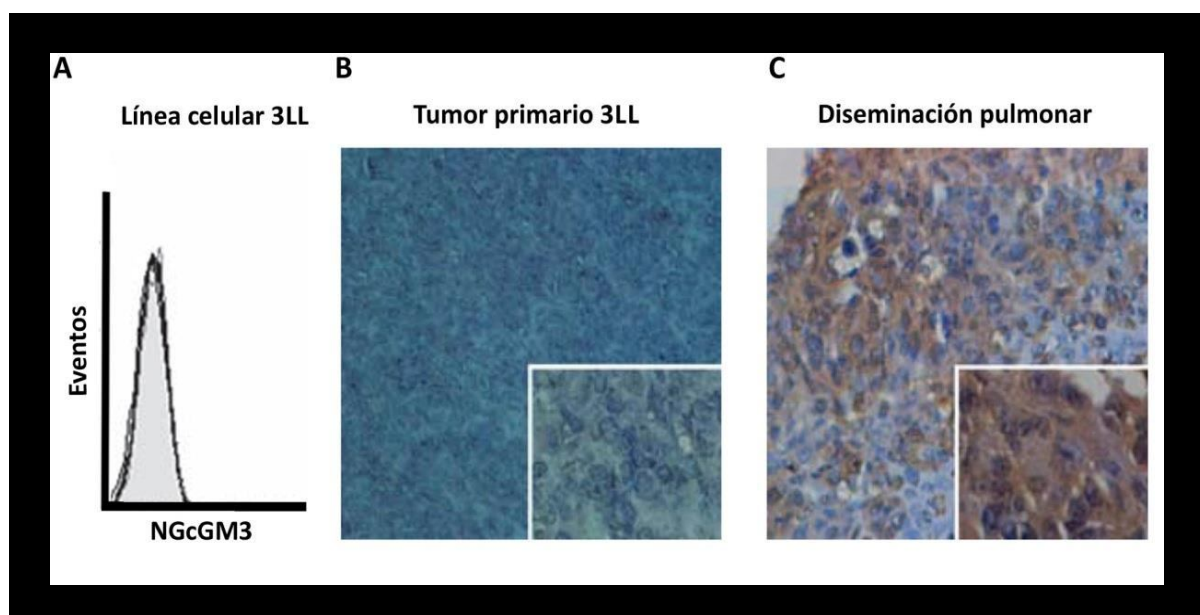


Figura 1.5| Detección de NGcGM3 mediante citometría de flujo e IHQ en células 3LL crecidas *in vitro* y formando tumores respectivamente. Células 3LL y cortes histológicos de tejido tumoral fueron procesadas e inmunomarcadas con el mAb 14F7. **(A)** Citometría de flujo sobre monocapa de células 3LL crecidas *in vitro*. **(B)** IHQ sobre corte de tumor primario de 3LL. **(C)** IHQ sobre corte de nódulos diseminados en pulmón. Puede observarse un incremento en la expresión de NGcGM3 en el corte histológico de tumor diseminado en pulmón. Aumento final: 400X, Insets: 1000X. Modificado de Labrada et al., 2010

La preincubación de células 3LL con NGc purificado aumenta la presencia en membrana de NGcGM3

Teniendo en cuenta la capacidad que presentan células 3LL de incorporar NGc del entorno del hospedador y expresarlo en los nódulos diseminados, nos propusimos establecer un modelo de NSCLC con sobreexpresión de NGcGM3 con el cual poder valorar de manera más contundente las terapias dirigidas a este blanco. Se siguió un método que se sabe induce la expresión de gangliósidos N-glicolilados en la membrana celular (Gabri et al., 2009). Células 3LL fueron preincubadas con NGc purificado y la presencia del mismo en la membrana fue evaluada mediante citometría de flujo. Como puede observarse en la figura 1.6, 3LL incorporó de manera efectiva el ácido siálico del medio extracelular, metabolizándolo de manera de agregarlo a glicoconjugados de membrana como gangliósidos. Utilizando el anticuerpo específico 14F7 fue posible detectar

la expresión de NGcGM3 en la superficie celular, mientras que células 3LL sin incubar demostraron ser negativas para el mismo. Controles negativos de isotipo y positivos de expresión de NGcGM3 fueron incluidos en el ensayo.

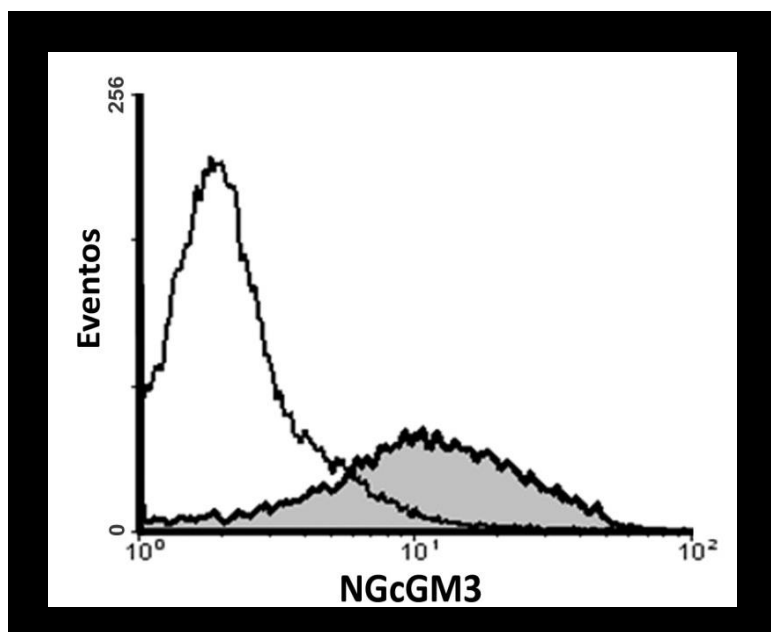


Figura I.6| Expresión del gangliósido NGcGM3 como consecuencia de la incorporación exógena de NGc purificado. Células 3LL fueron preincubadas *in vitro* con NGc purificado y luego evaluadas por citometría de flujo, como se describió en Materiales y Métodos. Se observó un incremento en la expresión del gangliósido NGcGM3 en la membrana celular, detectado mediante el mAb 14F7. La curva blanca representa los resultados obtenidos para el control, mientras que la gris para células tratadas con NGc purificado.

Es sabido que los gangliósidos forman parte de microdominios de membrana específicos, y como integrantes de estas unidades funcionales, son capaces de modular diferentes procesos celulares (Hakomori, 2010). Particularmente, la participación de NAcGM3 en los mismos está ampliamente descrita en numerosas publicaciones científicas (Hakomori, 2002; Yoon et al., 2006a; Yoon et al., 2006b). Como se mencionó previamente, las células B16 expresan casi exclusivamente el gangliósido NAcGM3. Esta característica las convierte en una herramienta adecuada para el estudio de la participación del mismo en distintos fenómenos celulares. Adicionalmente, el grupo de Arpaia describió recientemente para esta línea celular, la vía de señalización integrina $\alpha 5$ /caveolina-1/Scr/Rac1 asociada a crecimiento dependiente de anclaje (Arpaia et al., 2012). Teniendo en cuenta estos resultados, a continuación nos propusimos evaluar cómo se modifica la expresión de los distintos componentes de la vía como consecuencia de la expresión de NGcGM3 en

nuestro modelo B16-H.

La presencia de NGcGM3 aumenta los niveles de integrina $\alpha 5$ en la membrana celular

Las integrinas pertenecen a una familia de receptores transmembrana, que se encargan de mediar la interacción entre las células y la matriz. Su ubicación permite captar y responder a los estímulos del medio extracelular mediante la organización del citoesqueleto. La adhesión mediada por integrinas inicia una cascada de señalización hacia el interior celular en respuesta a factores de crecimiento. Particularmente, los fenómenos de migración, progresión del ciclo celular, expresión de ciertos genes y supervivencia celular se regulan mediante estas proteínas. La función de las integrinas se lleva adelante en el contexto de microdominios de membrana, en los cuales están presentes de manera determinante para su función ciertos gangliósidos como el GM3 y el GM2.

Utilizando las células B16-H con expresión confirmada del gangliósido NGcGM3, se buscó determinar los niveles de expresión de la integrina $\alpha 5$. Los resultados obtenidos demuestran que efectivamente existen diferencias en la cantidad de integrina expresada entre la línea parental y B16-H. En la figura I.7A puede observarse un incremento en la fluorescencia en células B16-H correspondiente a una mayor expresión de integrina, detectada mediante un anticuerpo específico dirigido a la subunidad $\alpha 5$ de la misma. Las fotografías de la inmunomarcación permiten observar la distribución de esta proteína preferencialmente en la membrana plasmática.

La cuantificación realizada por citometría de flujo utilizando el mismo Ab (figura I.7B) arrojó un incremento del 57% en la cantidad de células positivas, en comparación con las células B16. La representación mediante el gráfico de histograma demuestra el aumento en la intensidad media de fluorescencia correspondiente a una mayor expresión de la integrina $\alpha 5$ en B16-H.

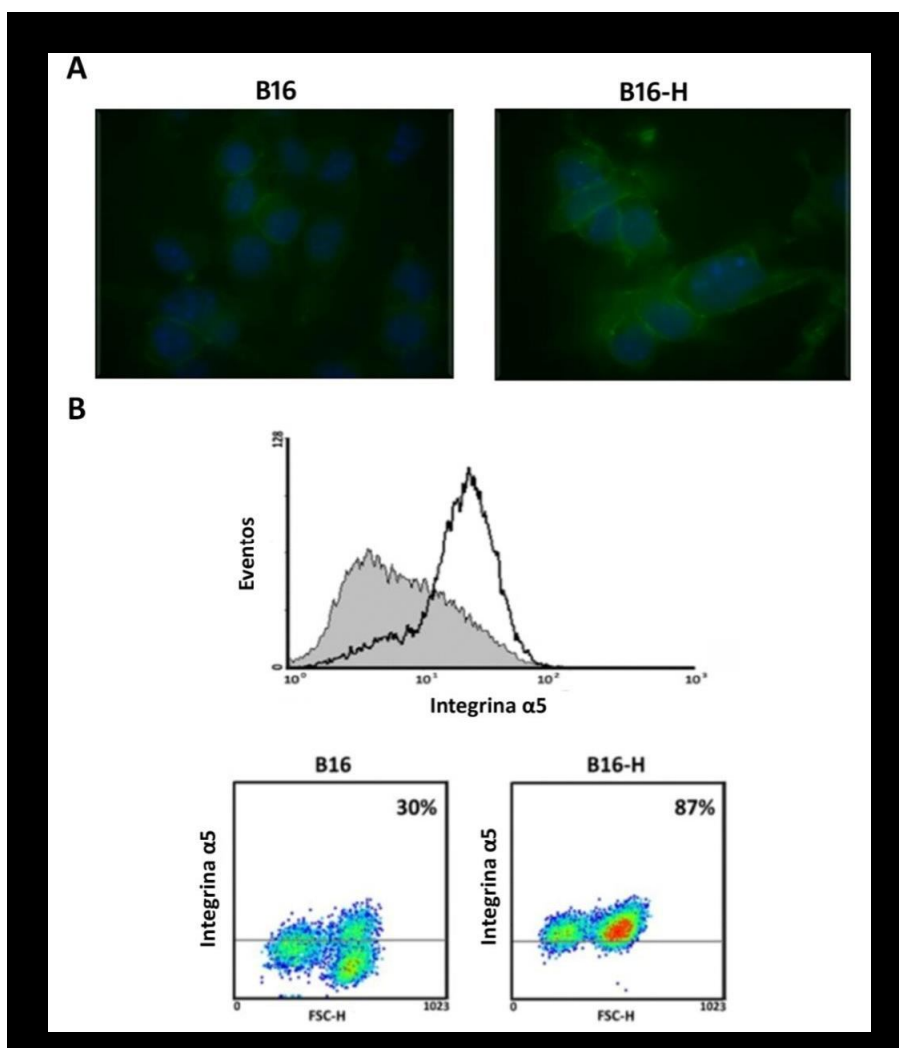


Figura I.7 | Expresión de integrina $\alpha 5$ en células B16 y B16-H. Células B16 y B16-H mantenidas *in vitro* fueron analizadas para determinar la expresión de la proteína integrina $\alpha 5\beta 1$ como se describió en Materiales y Métodos. **(A)** Inmunofluorescencia utilizando un mAb específico. Como resultado de la transfección, se detectó un incremento en la cantidad de integrina expresada en la membrana celular de B16-H. Aumento final: 1000X. **(B)** Citometría de flujo. Las células B16-H demostraron un incremento en la expresión de integrina $\alpha 5$, así como también mayor cantidad de células positivas para la misma. Histograma: la curva gris representa a B16, la curva blanca a B16-H.

NGcGM3 disminuye los niveles de caveolina-1 e induce su internalización

En la introducción de este trabajo se describió la existencia de diversos microdominios de membrana, uno de los cuales está representado por las caveolas. La proteína caveolina-1 (cav-1) es el elemento distintivo de estos microdominios (Echarri y Del Pozo, 2012). Sin embargo, su presencia ha sido descrita en otras estructuras funcionales de membrana y su papel biológico asociado a la interacción con integrinas. Específicamente, algunas de las vías de señalización asociadas a integrinas se encuentran reguladas por cav-1.

En función de los resultados obtenidos en cuanto a la modulación de la expresión de la integrina $\alpha 5$ en las células B16-H, nos propusimos estudiar si cav-1 también se encuentra modulada diferencialmente como consecuencia de la expresión de NGcGM3. En la figura I.8 se muestran imágenes representativas de una inmunofluorescencia con doble marcaje para cav-1 y el gangliósido NGcGM3. Como puede observarse, el perfil de expresión de cav-1 resultó distinto para cada una de las células evaluadas, demostrando una menor intensidad de fluorescencia y un desplazamiento hacia el interior de la célula en B16-H. Por su parte, B16 presentó una marcación definida en la membrana plasmática y una mayor intensidad. Asimismo, la marcación con el mAb 14F7, específico para NGcGM3, corroboró la efectiva expresión del mismo en células B16-H.

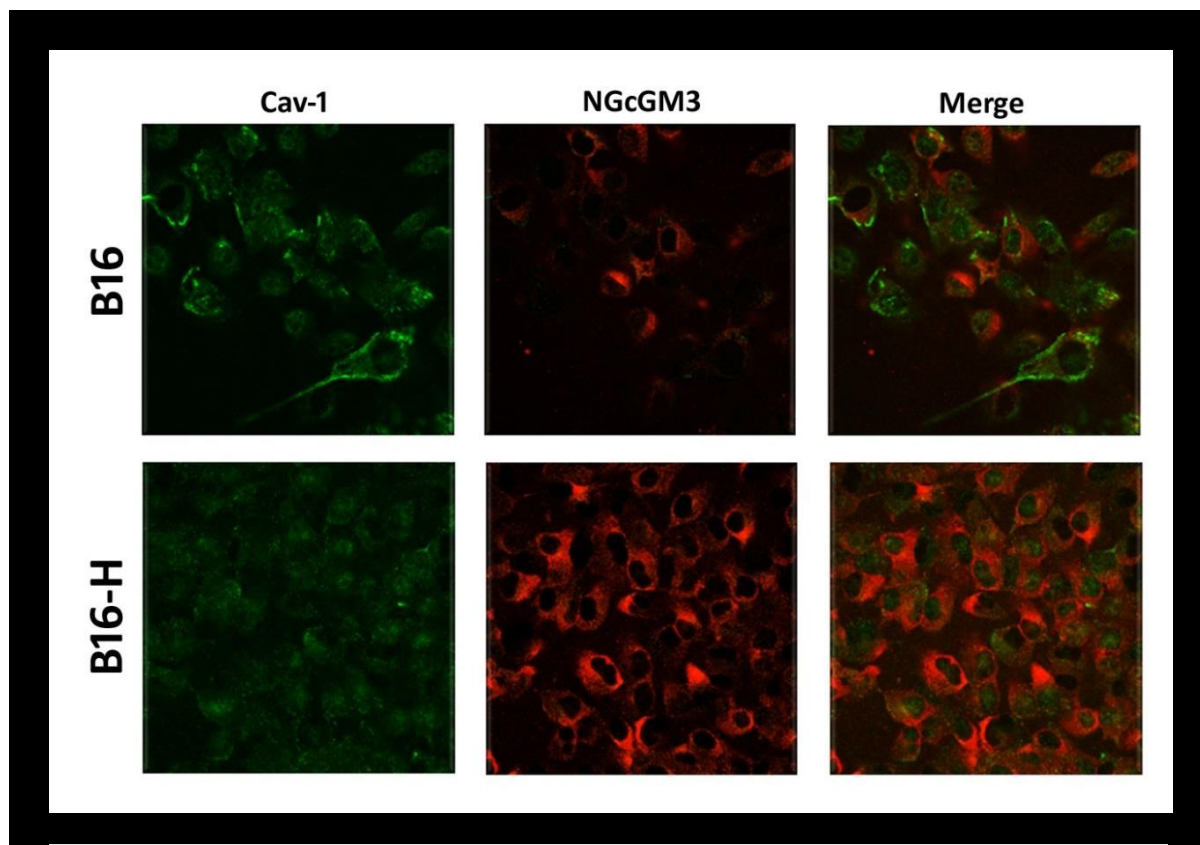


Figura I.8|Expresión de caveolina-1. Células B16 y B16-H fueron sembradas en placa de 24 wells y analizadas por microscopía confocal como se describió en Materiales y Métodos. En verde se representa la marcación correspondiente a cav-1 mientras que en rojo se representa a NGcGM3. Las células B16 expresan cav-1 en la membrana plasmática, en tanto que B16-H presenta un perfil de marcación más difuso, con un desplazamiento de la misma hacia el citoplasma celular y una menor intensidad de fluorescencia. Se observa la presencia de NGcGM3 en células B16-H.

La determinación cuantitativa de los niveles de la proteína cav-1 confirmó el descenso en la cantidad de la misma expresada por células B16-H. En la figura I.9A se muestra el resultado del ensayo de *western blot* y la cuantificación por densitometría de las bandas, expresadas como valores relativizados al control (figura I.9B).

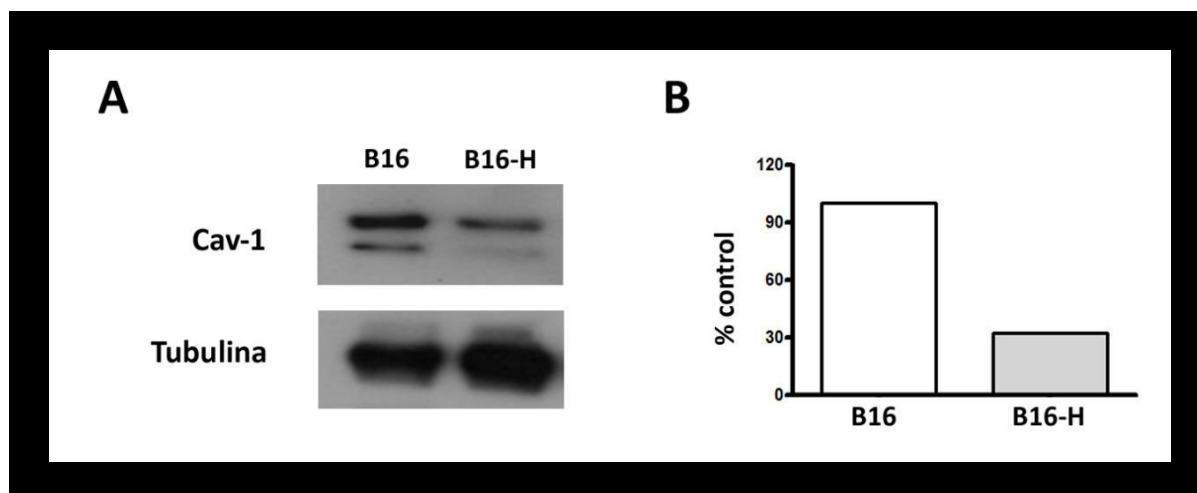


Figura I.9| Expresión de caveolina-1. Extractos proteicos de células B16 y B16-H fueron obtenidos y analizados por *western blot* como se describió en Materiales y Métodos. **(A)** Descenso en los niveles de cav-1 en células B16-H comparados con los presentados por B16. Como control de carga se utilizó tubulina. **(B)** Cuantificación por densitometría del *western blot* mostrado en A. Cada valor se relativizó a la expresión de tubulina en la misma muestra y se expresa como % del control, representado por B16.

NGcGM3 regula negativamente la vía Src/Rac1

Las principales vías de señalización desencadenadas como consecuencia del anclaje a la matriz extracelular mediado por integrinas involucran a las proteínas Src y a la familia de las Rho GTPasas (Martin et al., 2002). Adicionalmente ha sido descrito que estas últimas pueden interaccionar con cav-1 a través de un dominio de unión específico (Couet et al., 1997). Diversos trabajos sugieren la existencia de una relación entre la organización de microdominios de membrana y la modulación de vías de señalización que regulan numerosos procesos celulares. Teniendo esto en cuenta, y considerando los resultados obtenidos en cuanto a la modificación de la expresión de proteínas clave para el funcionamiento celular en células con expresión del gangliósido NGcGM3, se continuó con la evaluación de los niveles de expresión de Src y Rac1 en B16-H.

En la figura I.10 se muestran los resultados del ensayo de *western blot* para las proteínas de interés. Como puede observarse, tanto la expresión de Src como Rac1 mostraron menores niveles de expresión en las células transfectadas.

Particularmente, al detectarse menor expresión de Src, el descenso en los niveles

de la proteína activa, fosforilada en el residuo Tir 416, mostró una diferencia significativa al comparar B16-H contra B16 ($p < 0.05$, test de t no pareado).

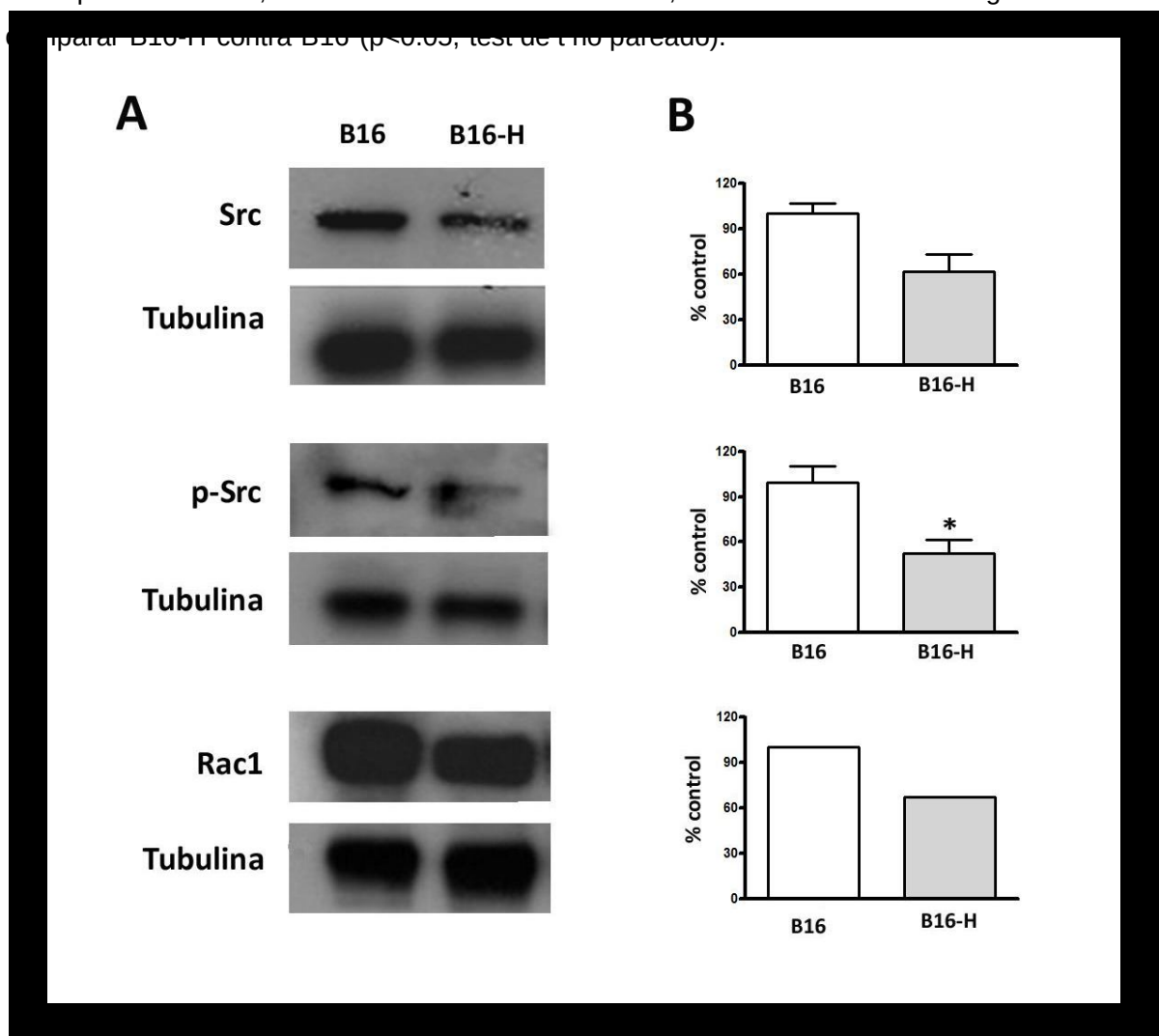


Figura I.10| Expresión de Scr, pScr y Rac1. Extractos proteicos de células B16 y B16-H fueron obtenidos y analizados por *western blot* como se describió en Materiales y Métodos. **(A)** Descenso en los niveles de las proteínas evaluadas en células B16-H comparados con los presentados por B16. Como control de carga se utilizó tubulina. **(B)** Cuantificación por densitometría de los *western blot* mostrados en A. * $p < 0.05$, B16-H vs B16, test de t no pareado. Cada valor se relativizó a la expresión de tubulina en la misma muestra y se expresa como % del control, representado por B16.

NGcGM3 induce cambios en la morfología celular y modifica la reorganización del citoesqueleto de actina

Teniendo en cuenta la relación existente entre integrinas, Rac1 y el citoesqueleto celular, la siguiente pregunta que surgió fue si la morfología de las células B16-H presenta cambios con respecto a B16. Para ello, células de ambas líneas fueron marcadas con faloidina y observadas en un microscopio de fluorescencia, una técnica ampliamente reportada en la bibliografía (Cerezo et al., 2009; Sharili et al., 2013; Cardama et al., 2013). Como se representa en la figura I.11, fue posible observar diferencias entre la morfología de células con y sin expresión de NGcGM3. Mientras que B16 presentó una estructura más estrellada, característica de la línea celular, la morfología de B16-H se modificó hacia un tipo más ahusado (figura I.11A). La cuantificación de prolongaciones celulares mostrada en la figura I.11B indicó que la población de células B16-H presenta mayor cantidad de células con 2 o menos prolongaciones, y un menor porcentaje de células con más de 4 prolongaciones al compararse con la línea parental.

El análisis cualitativo de los resultados obtenidos luego de la tinción con faloidina también permitió determinar que las células B16-H presentan una menor cantidad de filamentos de actina en comparación con la línea parental. Como puede observarse en el panel presentado en la figura I.12, los filamentos del citoesqueleto de actina son más notorios en células B16, sin expresión de NGcGM3. Por su parte, B16-H demostró un perfil de marcación más difuso, correspondientes a una menor reorganización de los haces de actina.

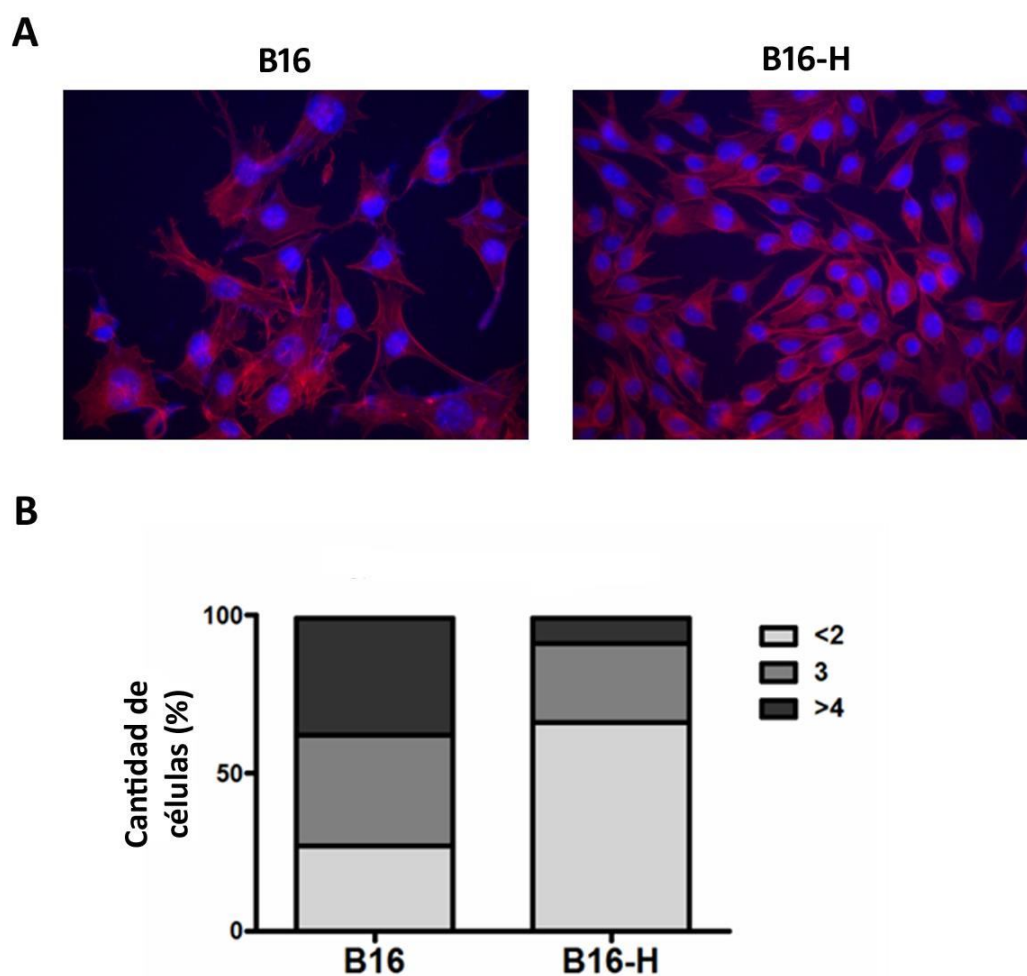


Figura I.11 | Morfología celular de B16 y B16-H. Análisis de la morfología de ambas variantes celulares, como se describió en Materiales y Métodos. **(A)** Fotografías de las monocapas de B16 y B16-H. Puede observarse la diferencia en la estructura de cada una de las dos líneas analizadas. Aumento final: 400X. **(B)** Cuantificación de las prolongaciones celulares expresada como porcentaje de células por campo.

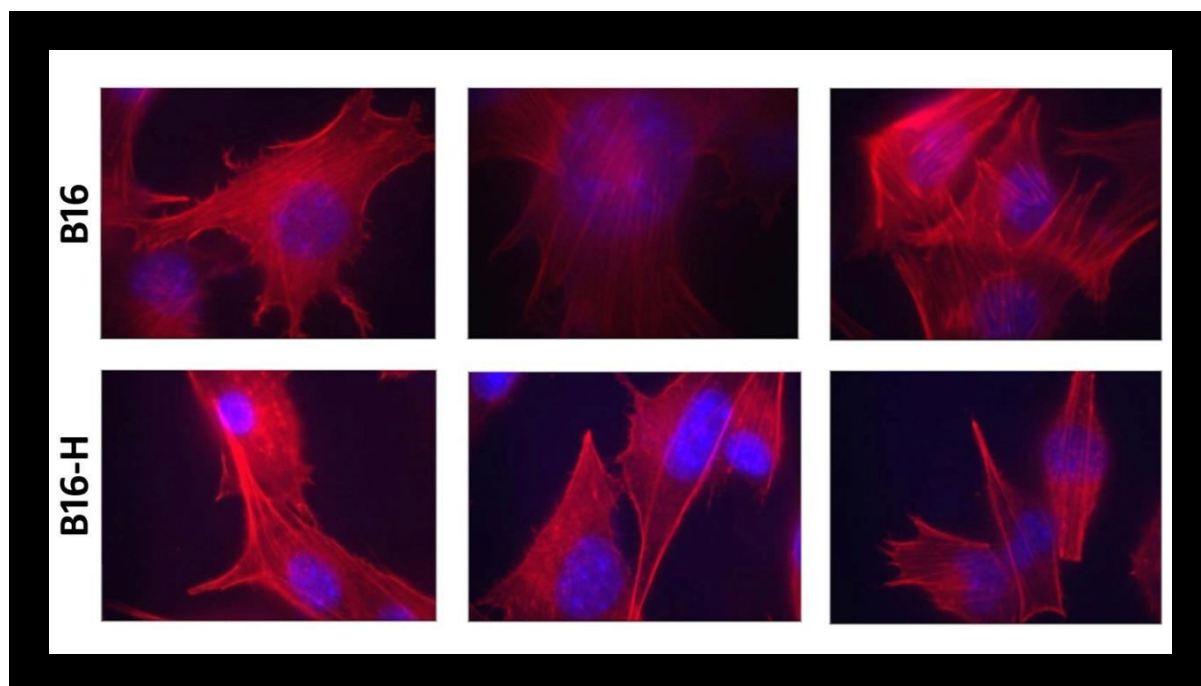


Figura I.12|Filamentos de actina en células B16 y B16-H. Imágenes representativas de células B16 y B16-H marcadas con faloidina conjugada a AlexaFluor555. B16 presenta mayor cantidad de filamentos de actina mientras que B16-H expone un patrón más difuso, no observándose el mismo perfil en la generación de haces de actina. Aumento final: 1000X.

Resultados

Capítulo II

Impacto de la expresión de NGcGM3 en la tumorigénesis

Se encuentra ampliamente reportado que la sobreexpresión o la síntesis *de novo* de residuos azucarados provoca alteraciones en el comportamiento *in vitro* de las células (Hakomori, 1996; Wang et al., 2006). Como se describió en el capítulo anterior, los modelos de expresión estable del gangliósido NGcGM3 desarrollados presentan un perfil de expresión de glicoconjugados que poseen ácidos siálicos distinto al de las líneas celulares de las cuales derivan. Teniendo en cuenta los resultados presentados para el modelo B16-H en relación a las modificaciones a nivel de la biología molecular, nos propusimos evaluar si la presencia de dicho gangliósido induce cambios en el fenotipo de la célula tumoral considerando el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de las mismas.

NGcGM3 modifica el comportamiento in vitro de las células

Células B16, F3II y sus variantes transfectadas fueron sembradas en placa de 96 *wells*, incubadas por 48 y 72 h respectivamente, y analizadas por ensayo colorimétrico para determinar la capacidad proliferativa. Como consecuencia de la síntesis y expresión de NGcGM3 en la membrana de células B16-H y F3II-H, la proliferación celular de las mismas se vio significativamente incrementada en las condiciones de cultivo ensayadas. En la tabla II.1 se indican los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las células evaluadas. De los resultados se desprende que la presencia de NGcGM3 promovió un incremento significativo, aproximadamente un 40%, en la capacidad proliferativa de B16-H ($p < 0.0001$, test de t no pareado), mientras que en el caso de células F3II-H este incremento fue algo menor, de aproximadamente un 15% ($p < 0.005$, test de t no pareado).

Tabla II.1| Proliferación de células B16-H y F3II-H. Células parentales y sus variantes transfectadas con CMAH fueron evaluadas mediante ensayo colorimétrico para determinar su capacidad proliferativa. La determinación se realizó 48 h (B16) y 72 h (F3II) posteriores a la siembra.

Células	Proliferación (Abs $\pm$ SEM)
B16	0.5140 $\pm$ 0.00704
B16-H	0.7257 $\pm$ 0.02452 ***
F3II	0.5499 $\pm$ 0.01394
F3II-H	0.6320 $\pm$ 0.01795 **

*** p<0.0001, test de t no pareado, B16 vs B16-H

** p<0.005, test de t no pareado, F3II vs F3II-H

NGcGM3 incrementa el crecimiento a baja densidad en células B16-H asociado a un aumento en la expresión de ciclina D1

La realización de ensayos clonogénicos de crecimiento a baja densidad constituye una alternativa adicional empleada en la determinación de características de crecimiento *in vitro* de una línea o variante celular. Se utilizaron células B16-H como modelo de expresión estable del gangliósido NGcGM3, y se evaluó la capacidad de las mismas de crecer y establecer colonias en un ensayo clonogénico. Para ello, células B16 y B16-H se sembraron a una concentración de 600 células por *well*, y luego de 7 días de incubación se analizó la cantidad de colonias formadas. Como puede observarse en la figura II.1, B16-H presentó un incremento significativo en la cantidad de colonias, demostrando una mejor capacidad de crecimiento en condiciones de baja densidad celular.

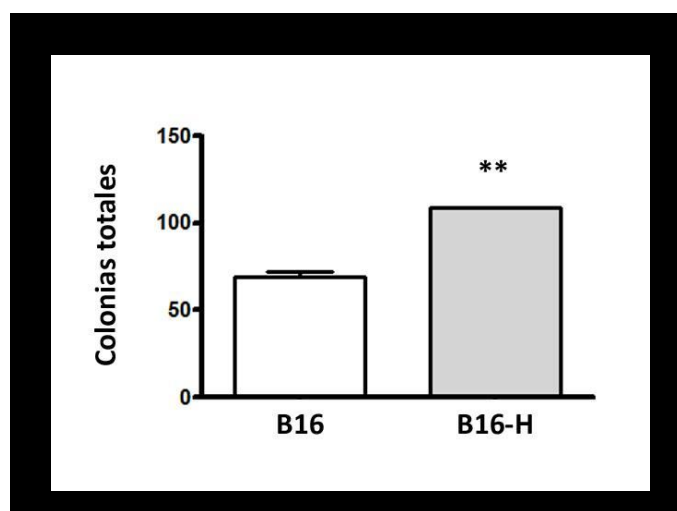


Figura II.1| Crecimiento a baja densidad. Células B16 y B16-H fueron sembradas en placas de 24 wells como se describió en Materiales y Métodos. El recuento de las colonias formadas resultó significativamente mayor para B16- H. **p=0.0059, test de t no pareado. Los valores representan la media ± SEM.

Considerando los resultados obtenidos en los ensayos anteriores de evaluación de las capacidades proliferativa y de formación de colonias a baja densidad, se evaluó la expresión de la proteína ciclina D1 en el modelo B16-H, puesto que la misma actúa como mediadora en la progresión entre las fases G0/G1 y S del ciclo celular. Como se representa en la figura II.2, la expresión del RNAm de ciclina D1 medida por PCR en tiempo real resultó significativamente mayor en B16-H que en la línea parental.

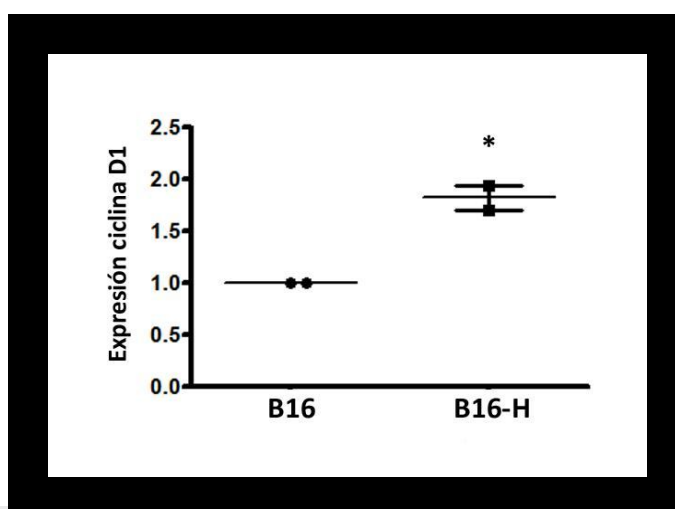


Figura II.2| Expresión de ciclina D1. El ARN total de células B16 y B16-H fue extraído y sometido a amplificación por PCR en tiempo real como se describió en Materiales y Métodos. La cuantificación del ARNm de ciclina D1 fue significativamente mayor para B16- H. * $p < 0.05$, test de t no pareado. Los valores representan la media $\pm$ SEM.

Comportamientos celulares adicionales a la proliferación se ven también afectados por la modificación en el perfil de expresión de gangliósidos. Como se muestra en la figura II.3, la capacidad adhesiva de todas las líneas celulares evaluadas se vio alterada por la presencia de NGcGM3. En el caso de células B16 y F3II, el incremento en la adhesión celular fue consecuencia de la expresión estable de NGcGM3, obtenido mediante la transfección de la secuencia de CMAH (figura II.3A y B). Se observó el mismo resultado en el modelo de expresión transitoria de NGcGM3 constituido por células 3LL preincubadas con NGc (3LL-NGc), al comparar con 3LL sin tratar (figura II.3C). Este resultado demuestra que dicha modificación en el comportamiento celular corresponde a la sola presencia del gangliósido, sin importar si es sintetizado por la propia célula o incorporado a partir del medio.

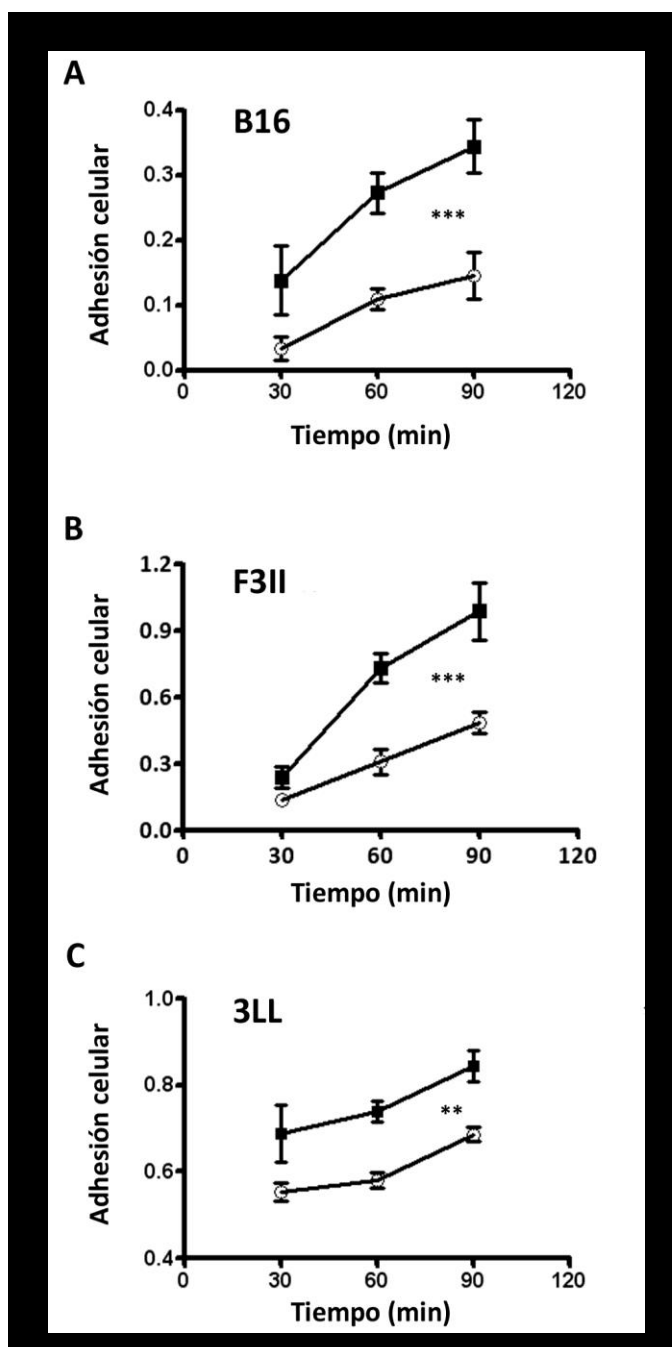


Figura II.3 | Efecto de la expresión de NGcGM3 en la adhesión *in vitro*. Las células fueron sembradas y procesadas como se describió en Materiales y Métodos. **(A)** Células B16 (círculos blancos) y B16-H (cuadrados negros). *** $p < 0,0001$. **(B)** Células F3II (círculos blancos) y F3II-H (cuadrados negros). *** $p < 0,0001$. **(C)** Células 3LL (círculos blancos) y 3LL-NGc (cuadrados negros) ** $p = 0.003$. En los tres modelos evaluados la adhesión de células con expresión de NGcGM3 fue significativamente mayor que la de células que no lo expresan. Los valores se representan como la media de 6 determinaciones + SEM. En todos los casos se

La expresión de NGcGM3 disminuye la tumorigenicidad de las células B16 y F3II transfectadas con CMAH

La expresión de NGcGM3 demostró tener un efecto significativo en el comportamiento *in vitro* de las células. A continuación, se evaluó si la presencia del mismo también induce cambios en el comportamiento *in vivo* de las líneas transfectadas en comparación con las parentales.

La expresión de NGcGM3 en células de melanoma B16 y carcinoma mamario F3II modificó el comportamiento *in vivo* de las mismas. Al inocular 5×10^3 células de melanoma en ratones singénicos C57, la línea parental desarrolla tumores palpables luego de aproximadamente 19 días, logrando una incidencia tumoral (ratones que desarrollan tumor/ratones total inoculados) del 80% (Gabri et al., 2006). Esta incidencia tumoral fue alcanzada luego de inocular al menos 2×10^4 células B16-H (Tabla II.2). Si bien fue posible promover el desarrollo de tumores de melanoma en hospedadores singénicos, se encontró que B16-H presenta una tumorigenicidad menor puesto que es necesario un mayor número de células para obtener una incidencia tumoral similar a la lograda con la línea parental.

En la figura II.4 se representan gráficamente las curvas de crecimiento de tumores desarrollados en animales C57BL/6 luego de la inoculación con distintas cantidades de células B16-H (figura II.4A). Se representa también la incidencia tumoral obtenida luego de 60 días transcurrida la inoculación (figura II.4B).

La administración de F3II-H en ratones singénicos BALB/c arrojó un resultado similar al obtenido en el modelo de melanoma B16-H. Las células transfectadas demostraron una menor tumorigenicidad que la línea parental. Aun cuando la incidencia tumoral no se vio modificada en este modelo de carcinoma mamario (Tabla II.3), la curva de crecimiento de los tumores F3II-H fue significativamente menor ($p < 0,0001$, test de t para pendientes) que la presentada por los tumores formados a partir de la inoculación de F3II parental en ratones BALB/c (figura II.5A). Sin embargo, al inocularlas en ratones atímicos inmunodeficientes no se observaron diferencias en el crecimiento tumoral entre ambos grupos ($p > 0,05$, test de t para pendientes) (figura II.5B).

Tabla II.2| Incidencia tumoral de células B16 y B16-H en ratones singénicos. Las células fueron inoculadas en el espacio subcutáneo de ratones C57BL/6. La incidencia tumoral se expresa como la relación entre animales positivos/animales totales inoculados luego de 60 días transcurridos la inoculación.

Cantidad de células	Incidencia tumoral	
	B16	B16-H
5×10^3	7/8 (87%)	2/5 (40%)
1×10^4	7/8 (87%)	2/5 (40%)
2×10^4	8/8 (100%)	4/5 (80%)

Tabla II.3| Incidencia tumoral de células F3II y F3II-H en ratones singénicos. Las células fueron inoculadas en el espacio subcutáneo de ratones Balb/c.

Cantidad de células	Incidencia tumoral	
	F3II	F3II-H
2×10^5	5/5 (100%)	5/5 (100%)

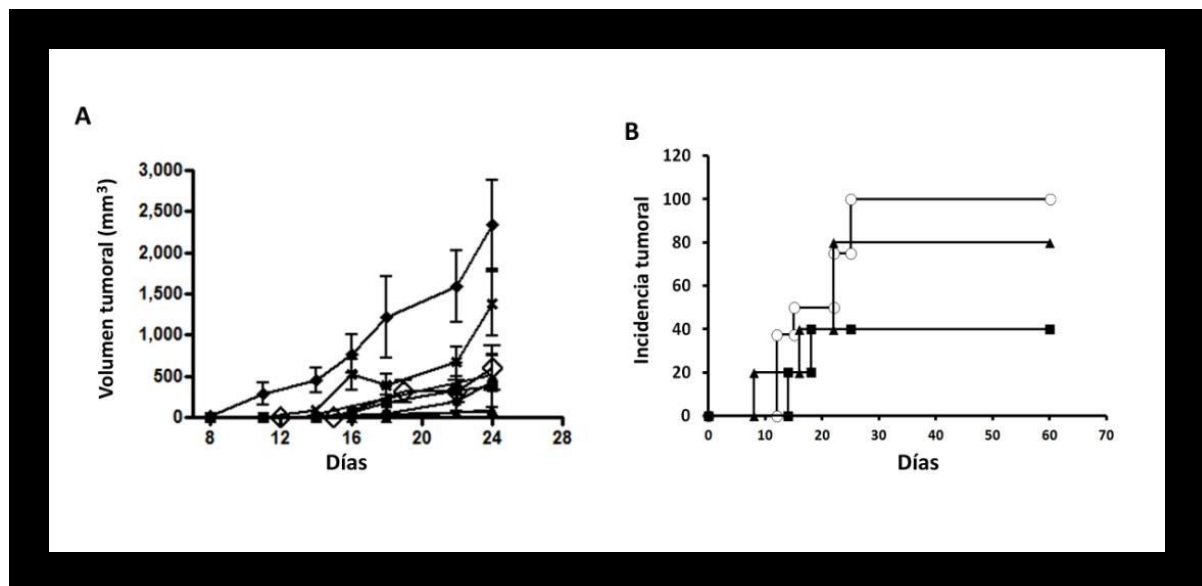


Figura II.4 | Crecimiento tumoral subcutáneo de células B16 y B16-H en animales singénicos. Diferentes grupos de animales fueron inoculados por vía s.c con células B16 o B16-H como se describió en Materiales y Métodos **(A)** Curva de crecimiento tumoral en animales inoculados con 5×10^3 (círculos negros), 1.5×10^4 (triángulos negros), 2×10^4 (cuadrados negros), 5×10^4 (cruces) o 5×10^5 (rombos negros) células B16-H. Como control se incluyó la curva de crecimiento de tumores desarrollados en animales inoculados con 5×10^3 (rombos blancos) células B16. **(B)** Incidencia tumoral de 5×10^3 (cuadrados negros), 2×10^4 (triángulos negros) células B16-H y 5×10^3 (círculos blancos) células B16. No se observaron diferencias significativas entre el crecimiento tumoral presentado por animales inoculados con 5×10^3 células B16 y 2×10^4 células B16-H. ANOVA contrastado con test de comparación múltiple de Bonferroni. Los resultados se expresan como la media de 5 animales por grupo.

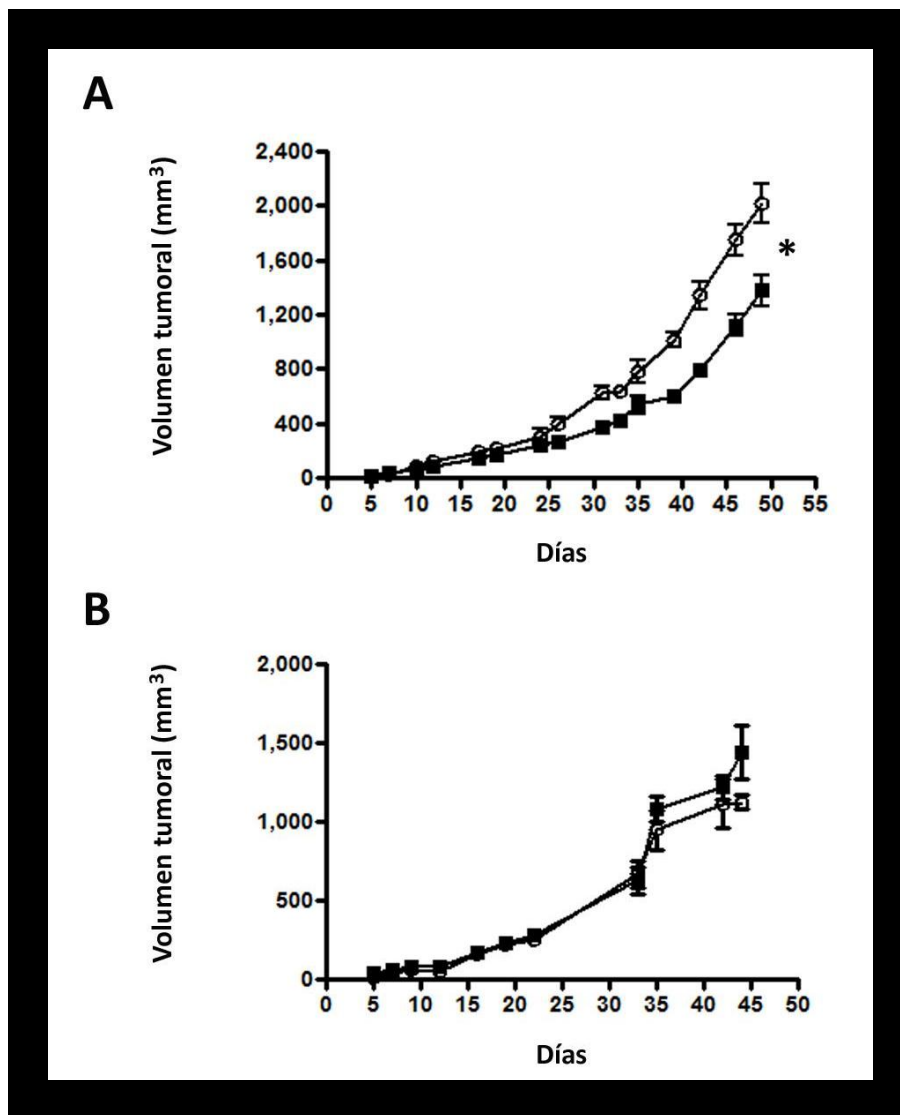


Figura II.5 | Crecimiento tumoral *in vivo* de células F3II y F3II-H. Las células fueron inoculadas en el flanco derecho de los ratones como se describió en Materiales y Métodos. **(A)** Crecimiento tumoral de F3II (círculos blancos) y F3II-H (cuadrados negros) en ratones singénicos BALB/c. **(B)** Crecimiento tumoral de F3II (círculos blancos) y F3II-H (cuadrados negros) en ratones atímicos. La tasa de crecimiento tumoral de F3II-H fue significativamente menor que la presentada por F3II en el modelo singénico, * $p < 0,0001$, test de t para pendientes. Cuando los tumores fueron desarrollados en ratones atímicos, no se observaron diferencias entre los grupos, $p > 0.05$, test de t para pendientes. Los valores representan la media $\pm$ SEM.

La expresión de NGcGM3 se asocia con la formación de nódulos pulmonares en células 3LL preincubadas con NGc

La presencia de NGcGM3 exógeno en células de carcinoma pulmonar altamente agresivo 3LL también fue capaz de inducir cambios en el comportamiento *in vivo* de las mismas, aunque en un sentido opuesto a lo observado respecto de la tumorigenicidad en los modelos de expresión estable presentados anteriormente. Cuando células 3LL preincubadas con NGc purificado fueron inoculadas en animales singénicos se observó un incremento significativo en la formación de nódulos pulmonares inducidos experimentalmente, particularmente aquellos macronódulos mayores a 2 mm de diámetro (figuras II.6 A y B).

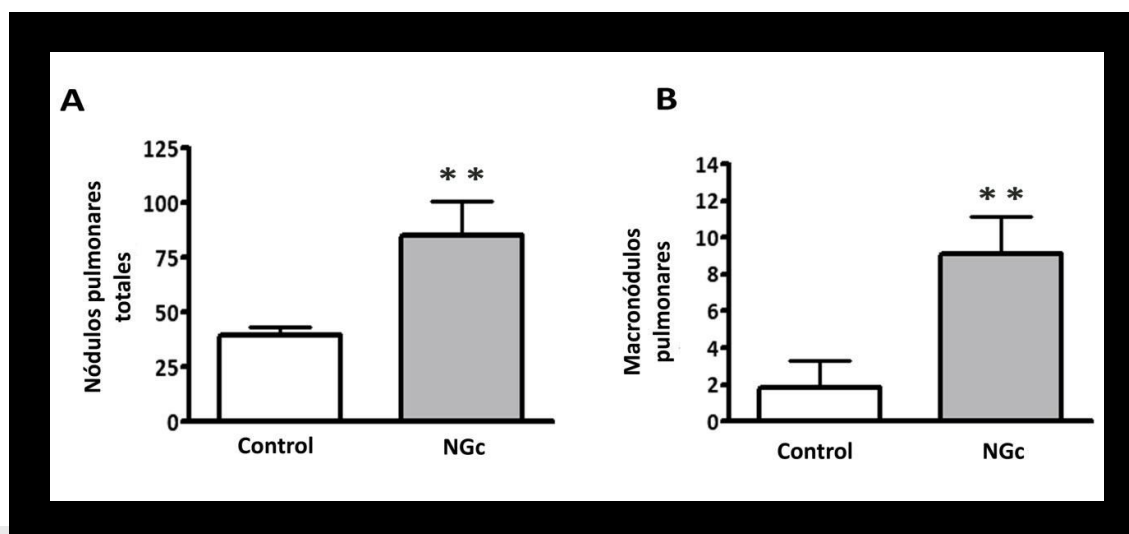


Figura II.6| Efecto de la incorporación exógena de NGc en la formación de nódulos pulmonares experimentales. Células 3LL fueron preincubadas *in vitro* con NGc purificado y luego inoculadas en los animales, como se describió en Materiales y Métodos. **(A)** Nódulos pulmonares experimentales totales formados por células 3LL control o preincubadas con NGc. **(B)** Formación experimental de macronódulos pulmonares (diámetros > 2 mm) en animales control o inoculados con células 3LL preincubadas con NGc. ** $p < 0.01$ test de t no pareado con corrección de Welch. Las lesiones pulmonares se presentan como media + SEM.

Resultados

Capítulo III

NGcGM3 como blanco de inmunoterapia en modelos murinos

NGcGM3 ha sido descrito como un antígeno tumoral en diversos tipos de tumores humanos incluyendo melanoma y pulmón (Carr et al., 2000; van Crujsen et al., 2009; Blanco et al., 2012). Contrariamente, la mayoría de las líneas celulares tumorales de ratón son negativas para la expresión de este antígeno, aun cuando las células somáticas lo expresan con frecuencia. Como se mencionó previamente, nuestro grupo publicó resultados que demuestran la nula expresión de NGcGM3 en la línea celular de melanoma B16 (Gabri et al., 2009). Sumado a esto, en el Capítulo I de este trabajo se presentaron resultados que confirman la ausencia del antígeno en la línea de carcinoma pulmonar de células no pequeñas 3LL, ya reportado por Labrada y colaboradores (Labrada et al., 2010).

Teniendo en cuenta la importancia clínica de estas dos variantes tumorales y considerando la relevancia que presenta el antígeno de estudio en las mismas, se desarrollaron los modelos murinos descritos en los capítulos previos, a fin de ser utilizados en la validación de la actividad terapéutica de dos vacunas dirigidas contra gangliósidos glicosilados. Los preparados vacunales que se utilizaron en el desarrollo de este trabajo fueron la vacuna NGcGM3/VSSP y la vacuna racotumomab. El principal objetivo de este capítulo se centra en la evaluación de la participación del antígeno blanco en la actividad antitumoral de las vacunas dirigidas contra NGcGM3. Adicionalmente, se utilizará el modelo de carcinoma pulmonar desarrollado para llevar adelante la validación preclínica de la vacuna racotumomab, en combinación o no con pemetrexed o quimioterapia basada en taxanos.

• Vacuna NGcGM3/VSSP

La actividad antitumoral de NGcGM3/VSSP es dependiente de la expresión de NGcGM3

Con el objetivo de evaluar el potencial uso del modelo B16-H en la validación de la actividad antitumoral de la vacuna NGcGM3/VSSP, se inocularon 5×10^3 o 2×10^4 células en ratones singénicos previamente incluidos en un protocolo de inmunización de cuatro dosis quincenales de la vacuna, cada una de 200 µg de gangliósido conjugado. En trabajos previos se demostró que la vacuna NGcGM3/VSSP no presenta actividad antitumoral en animales portadores de tumores B16 (Carr et al., 2001). Sin embargo, los resultados obtenidos demostraron que el modelo murino B16-H es adecuado para la evaluación preclínica de dicha vacuna. La inoculación de la cantidad óptima de células en animales

singénicos permite el desarrollo de tumores en los mismos. Adicionalmente, y como puede observarse en la tabla III.1, la diferencia obtenida en la incidencia tumoral entre animales vacunados y no vacunados sugiere una respuesta antitumoral por parte de NGcGM3/VSSP.

Tabla III.1| Efecto de la vacuna NGcGM3/VSSP en la formación de tumores utilizando células B16-H. Las células fueron inoculadas en el espacio subcutáneo de ratones C57BL/6, 7 días posteriores a la tercer inmunización con NGcGM3/VSSP. La incidencia tumoral se expresa como la relación entre animales positivos/animales totales inoculados luego de 60 días transcurridos la inoculación.

Cantidad de células	Incidencia tumoral	
	Control	NGcGM3/VSSP
5×10^3	2/5 (40%)	1/11 (9%)
2×10^4	4/5 (80%)	0/9 (0%)*

* $p < 0.005$, animales vacunados vs animales control inoculados con 2×10^4 células, Test Exacto de Fisher.

El desarrollo del modelo B16-H implicó la transfección de las células de la línea parental con un vector de expresión que contiene clonada la secuencia de CMAH, enzima responsable de la síntesis de residuos glicolilados a partir de sus precursores acetilados. Para mantener la expresión del antígeno exógeno en el tiempo es necesario someter el cultivo celular a la presión de selección incluida en el vector. Aun con esta consideración, la expresión de NGcGM3 en células B16-H disminuyó conforme se avanzó con el mantenimiento de la línea celular generada en cultivos *in vitro* (figura I.4).

Utilizando estas células con menor expresión de NGcGM3, se evaluó la actividad antitumoral de la vacuna NGcGM3/VSSP en animales inoculados con las mismas a fin de determinar si la vacuna era efectiva aún en presencia de una menor cantidad de antígeno blanco en las células. Como puede observarse en la figura III.1, no se observaron diferencias en la incidencia presentada por

animales tratados o no con la vacuna e inoculados con células con poca expresión. Este resultado valida el hecho que la protección antitumoral presentada por esta vacuna depende fuertemente de la presencia de NGcGM3 en las células tumorales, demostrando su especificidad por el blanco tumoral contra el cual fue desarrollada.

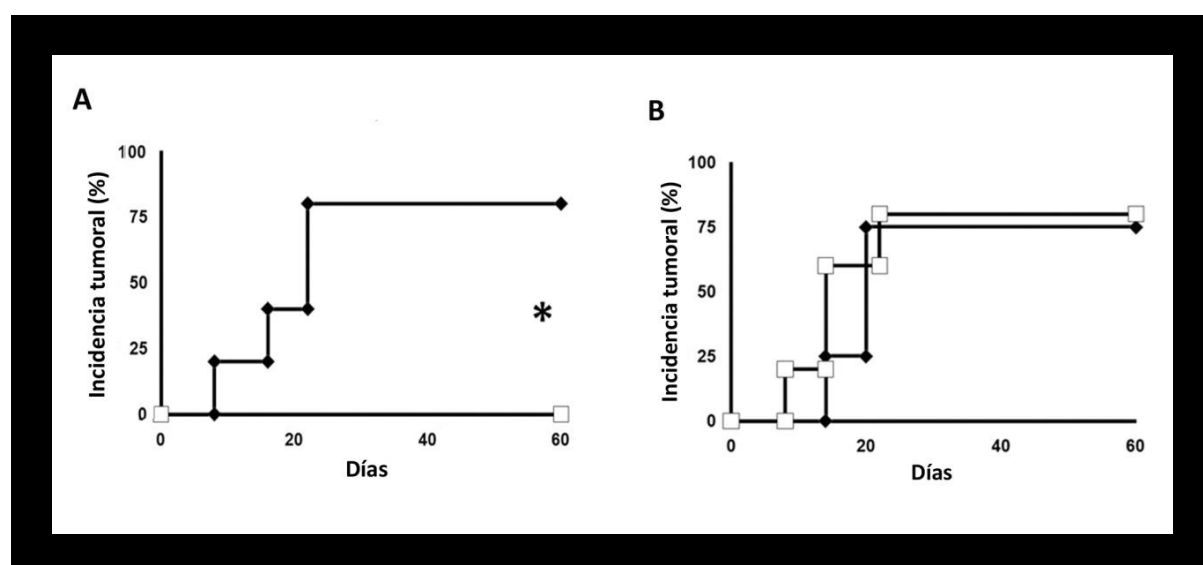


Figura III.1 | Respuesta antitumoral de NGcGM3/VSSP en ratones inoculados con células B16-H con expresión o no de NGcGM3. 2×10^4 células B16-H con distintos niveles de expresión de NGcGM3 fueron inoculadas en ratones C57BL/6 vacunados o no con NGcGM3/VSSP como se describió en Materiales y Métodos. **(A)** Incidencia tumoral de animales inoculados con B16-H con alta expresión de NGcGM3, correspondientes a un pasaje 20, vacunados (cuadrados blancos) o no (rombos negros) con NGcGM3/VSSP. * $p < 0.005$, Test Exacto de Fisher. **(B)** Incidencia tumoral de animales inoculados con B16-H con baja expresión de NGcGM3, pasaje 35, vacunados (cuadrados blancos) o no (rombos negros) con NGcGM3/VSSP. La vacuna demostró efecto antitumoral en los animales tratados inoculados con B16-H con alta expresión de NGcGM3.

- **Vacuna racotumomab**

Nuestro grupo también participó en la evaluación preclínica de la actividad antitumoral de un segundo preparado vacunal basado en el anticuerpo anti-idiotipo racotumomab dirigido a gangliósidos N-glicolilados, incluyendo NGcGM3. Previamente, la vacuna racotumomab había sido testeada en distintas formulaciones en un modelo murino singénico de cáncer mamario. La vacunación i.p. con varias dosis quincenales de racotumomab conjugado a KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) en adyuvante de Freund, disminuyó de manera significativa el crecimiento subcutáneo de tumores F3II y la diseminación espontánea a pulmón (Vazquez et al., 2000). No obstante, esta formulación con KLH resultó algo tóxica en las condiciones empleadas (Vazquez et al., 2000). La administración de bajas dosis de ciclofosfamida (150 mg/m^2) en combinación con la inmunización con racotumomab, en este caso conjugado a hidróxido de aluminio (racotumomab-alum), redujo significativamente el crecimiento de tumores primarios de F3II (Fuentes et al., 2010). La respuesta antitumoral fue comparable a la obtenida con dosis altas de quimioterapia estándar en el mismo modelo de cáncer mamario, sin presentarse signos evidentes de toxicidad.

Utilizando el modelo de expresión transitoria de NGcGM3 de NSCLC desarrollado en este trabajo, se realizaron los ensayos preclínicos de valoración de la actividad antitumoral del preparado vacunal racotumomab-alum, en combinación o no con quimioterapia.

Protección contra la formación espontánea de nódulos pulmonares mediante inmunización con racotumomab

Previamente se describió que las células tumorales son capaces de incorporar NGc a partir del hospedador y expresarlo en sus membranas celulares mediante incorporación en diversos glicoconjugados, como ser el gangliósido GM3 (Labrada et al., 2010; Fernandez et al., 2010,). Las células de carcinoma pulmonar murino 3LL respetan este comportamiento, convirtiéndose así en un modelo adecuado para la evaluación preclínica del anti-idiotipo racotumomab. Por otro lado, se cuenta con evidencia robusta que valida la acción terapéutica de esta vacuna en otros modelos murinos que expresan el blanco molecular. Teniendo esto en cuenta, se evaluó la actividad antitumoral de racotumomab en la formación de nódulos pulmonares. Los tumores fueron crecidos en el flanco de los ratones mediante la inoculación subcutánea de células 3LL y las lesiones pulmonares se formaron por diseminación espontánea a partir del tumor primario. Como se muestra en la figura III.2A, la tasa de crecimiento del tumor primario no fue afectada por la vacunación con dosis quincenales con $50 \mu\text{g}$ de racotumomab comenzando el día de la inoculación ($p > 0.05$, test de t para pendientes). Este resultado es consistente con el hecho de que los tumores primarios que forma 3LL son negativos para NGcGM3. Sin embargo, la inmunización redujo

de manera significativa la formación de nódulos pulmonares (figura III.2B), indicando posiblemente un aumento en la expresión del antígeno NGcGM3 en los focos metastásicos en comparación con el tumor primario, en concordancia con lo reportado por Labrada y colaboradores. (Labrada et al., 2010).

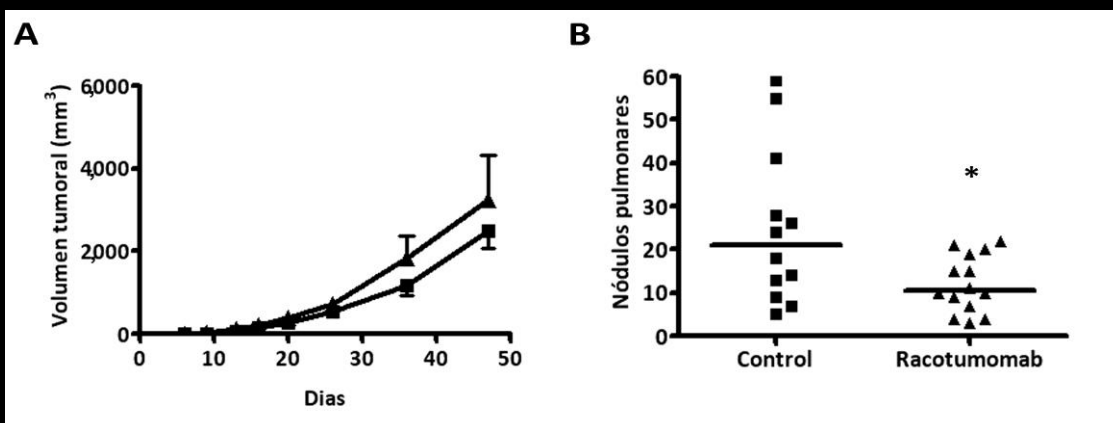


Figura III.2 | Protección antitumoral contra la formación de nódulos pulmonares espontáneos por la inmunización con racotumomab. Los ratones fueron inoculados vía subcutánea con células 3LL e inmunizados con dosis de 50 μ g de racotumomab, como se describió en Materiales y Métodos. **(A)** Crecimiento subcutáneo del tumor primario. Los valores representan media $\pm$ SEM. No se detectaron diferencias significativas en las curvas de crecimiento de ratones controles y vacunados. $p > 0.05$, test de t para pendientes. **(B)** Formación de nódulos pulmonares. La inmunización redujo significativamente el número de nódulos pulmonares comparado con el grupo control. * $p = 0.0377$, test de t no pareado con corrección de Welch. Cada dato individual representa un animal y las líneas horizontales indican las medianas de los valores. Los valores corresponden a un pool de dos ensayos independientes con resultados similares.

Los experimentos iniciales de evaluación de racotumomab, así como los presentados en trabajos previos de otros autores, fueron realizados empleando racotumomab producido en líquido ascítico murino (LAM). A modo de comparación, se llevaron adelante ensayos de actividad antitumoral en nódulos diseminados espontáneamente utilizando un producto realizado mediante la tecnología de tanque agitado (TA). Como puede observarse en la figura III.3, no se encontraron diferencias entre ambas metodologías de producción. Más aun, las dos formulaciones presentaron una actividad antitumoral similar, con una reducción en la cantidad de nódulos pulmonares espontáneos de aproximadamente un 40% (Tabla III.2).

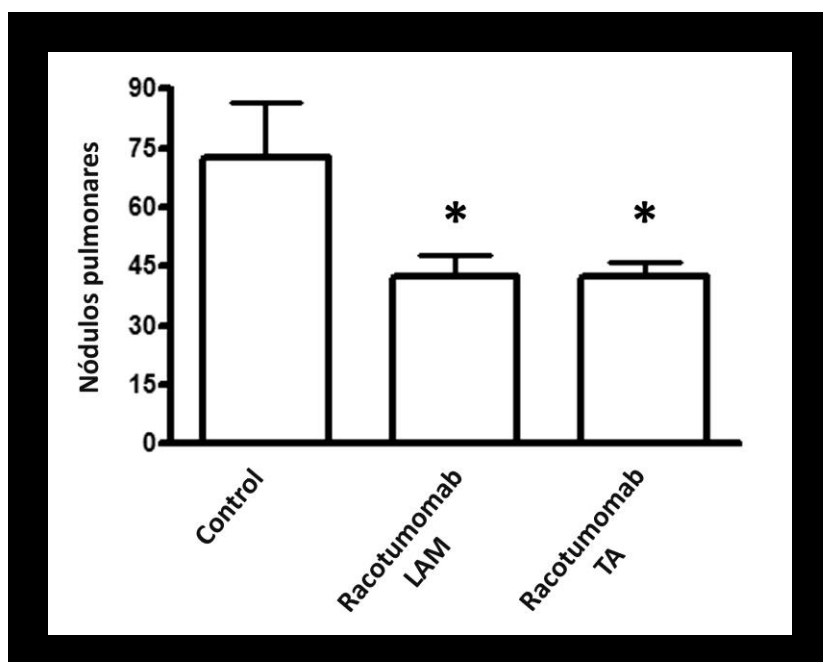


Figura III.3| Protección contra la formación de nódulos pulmonares espontáneos por la inmunización con racotumomab producidos en LAM o por tecnología TA.

Ratones singénicos C57BL/6 fueron inoculados con células 3LL y vacunados con dosis de 50 o 200 μg de racotumoab LAM o TA como se describió en Materiales y Métodos. Ambas formulaciones inducen un descenso significativo de la cantidad de nódulos totales. * $p < 0.05$, test de comparación múltiple de Dunnett, Análisis de varianza (ANOVA). Los valores representan la media y el error estándar.

Tabla III.2| Nódulos pulmonares totales en ratones C57BL/6 portadores de tumor 3LL, tratados con distintos lotes de la vacuna racotumomab. Los animales fueron inoculados con células 3LL en el espacio subcutáneo y luego vacunados con racotumomab producido en LAM o por TA, como se describió en Materiales y Métodos. Se determinó la cantidad de nódulos diseminados de manera espontánea a pulmón.

Grupo de tratamiento (n)	Nódulos pulmonares totales (media $\pm$ SEM)	Reducción porcentual promedio respecto del control
Control (n=8)	72 $\pm$ 14	----
Racotumomab LAM (n=20)	42 $\pm$ 5	41.6 %
Racotumomab TA (n=19)	42 $\pm$ 4	41.6 %

Combinación de la inmunización con racotumomab y quimioterapia estándar

A continuación se estudió la respuesta inducida por racotumomab en combinación o no con quimioterapia. En primera instancia, se diseñaron protocolos de combinación de racotumomab con pemetrexed. Pemetrexed es un quimioterapéutico del tipo anti antifolato, indicado para tratamiento de segunda línea de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Se evaluó la sensibilidad *in vitro* de células tumorales 3LL preincubadas con NGc a quimioterapia. La IC₅₀ de células 3LL para pemetrexed luego de un tratamiento de 72 h resultó ser cercana a 200 nM (193 $\pm$ 6 nM), mientras que un

valor similar se obtuvo para 3LL preincubadas con NGc (192 ± 31 nM) (figura III.4). Este resultado sugiere que la expresión del antígeno blanco no presenta efectos directos en la efectividad de la quimioterapia, permitiendo el uso del modelo en la evaluación terapéutica de la combinación racotumomab-quimioterapia a base de pemetrexed.

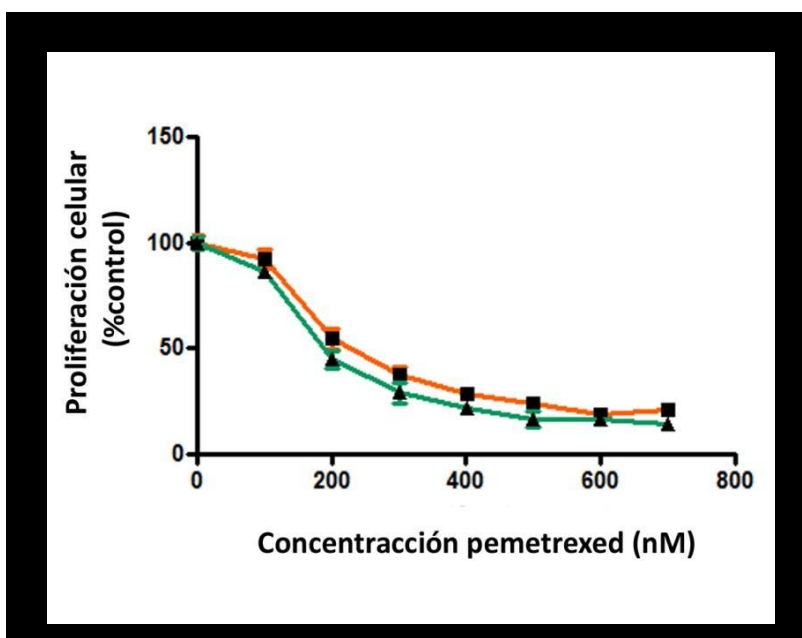


Figura III.4] Curvas de determinación de IC_{50} de pemetrexed en células 3LL preincubadas o no con NGc purificado. Las células se sembraron en placa de 96 wells y se trataron con distintas concentraciones de pemetrexed como se describió en Materiales y Métodos. Células 3LL (línea naranja) y células 3LL-NGc (línea verde) no mostraron diferencias entre los valores de IC_{50} calculados. Los resultados representan dos experimentos independientes con resultados similares. Los valores se muestran como media $\pm$ SEM.

Una vez establecido que las células 3LL preincubadas con NGc respondieron de la misma manera que la línea parental al tratamiento *in vitro* con pemetrexed, se procedió a la realización del ensayo *in vivo* con la combinación de ambas estrategias terapéuticas. Al igual que racotumomab, pemetrexed no presentó efecto significativo en el desarrollo de tumores primarios subcutáneos de 3LL (figura III.5). La inmunización con dosis quincenales de la vacuna demostró un efecto comparable en la formación de lesiones pulmonares espontáneas a aquel presentado por el tratamiento con ciclos semanales de pemetrexed administrado por vía i.p. en una dosis de 100mg/kg (figura III.6). En las

condiciones experimentales ensayadas, la combinación de racotumomab con pemetrexed no presentó un efecto sinérgico al comparar con cada tratamiento por separado. Sin embargo, la administración de la combinación resultó altamente efectiva contra la diseminación de nódulos a pulmón ($p < 0.001$, control vs raco+pemetrexed, ANOVA seguido de test de comparación múltiple de Bonferroni) (figura III.6).

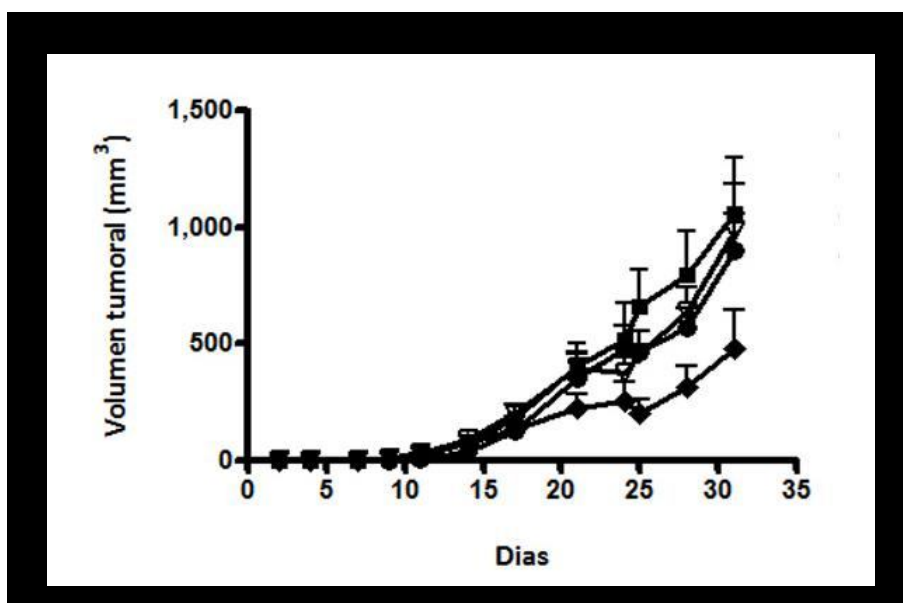


Figura III. 5 | Efecto de la inmunización con Racotumomab y el tratamiento con pemetrexed en el crecimiento de tumores primarios. Los ratones fueron inoculados vía subcutánea con células 3LL y luego inmunizados con 50 μg de racotumomab y/o tratados con 100 mg/kg de pemetrexed como se describió en Materiales y Métodos. Animales control (círculos), animales vacunados con racotumomab (cuadrados), animales tratados con pemetrexed (rombos) y animales vacunados y tratados con la quimioterapia (triángulos blancos). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los tumores entre los distintos grupos experimentales. $p > 0.05$, ANOVA. Los valores se muestran como media $\pm$ SEM.

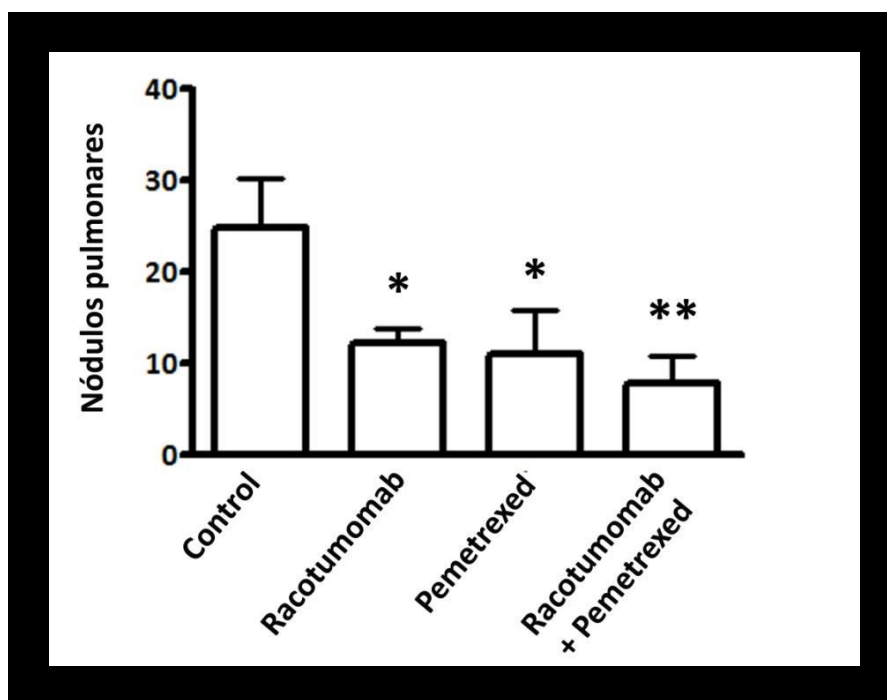


Figura III.6| Efecto de la inmunización con Racotumomab y el tratamiento con quimioterapia en la formación de nódulos pulmonares. Los ratones fueron inoculados vía subcutánea con células 3LL y luego inmunizados con 50 µg de racotumomab y/o tratados con 100 mg/kg de pemetrexed como se describió en Materiales y Métodos. Se observaron diferencias significativas entre la cantidad de nódulos del grupo control en comparación con los grupos vacunados y tratados con pemetrexed. * $p < 0.05$, control vs raco y control vs pemetrexed, ANOVA seguido de test de comparación múltiple de Bonferroni. Los animales que recibieron la combinación de tratamientos demostraron un efecto antitumoral aun mejor. ** $p < 0.001$, control vs raco+pemetrexed, ANOVA seguido de test de comparación múltiple de Bonferroni. Los resultados representan dos experimentos independientes con resultados similares. Los valores se muestran como media $\pm$ SEM.

En una segunda estrategia de combinación, se evaluó la existencia de efecto terapéutico al administrar conjuntamente racotumomab con quimioterapia a base de taxanos, utilizando Docetaxel para el tratamiento de los animales. Como puede observarse en la figura III.7, no se observó efecto antitumoral utilizando quimioterapia a base de taxanos, administrando dosis semanales 20 mg/kg de docetaxel.

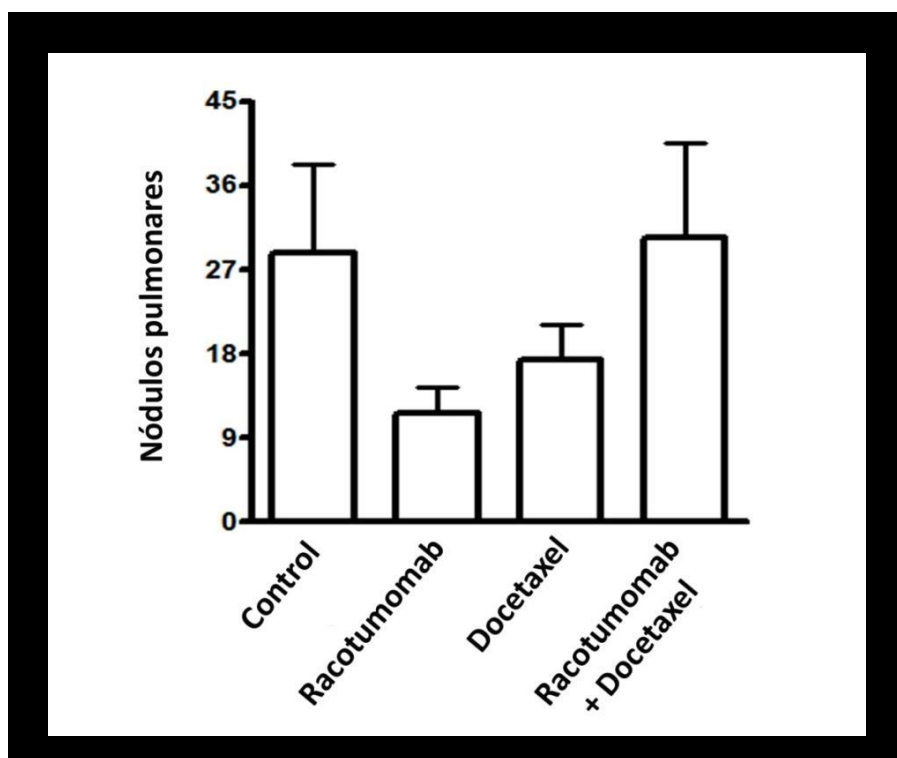


Figura III.7| Efecto de la inmunización con Racotumoab y el tratamiento con quimioterapia en la formación de nódulos pulmonares. Los ratones fueron inoculados vía subcutánea con células 3LL y luego inmunizados con 50 µg de racotumomab y/o tratados con 20 mg/kg de docetaxel como se describió en Materiales y Métodos. No se observaron diferencias significativas entre los animales control y aquellos tratados con Docetaxel. Los valores se muestran como media ± SEM.

En todos los casos, los protocolos combinados de quimio-inmunoterapia con pemetrexed o docetaxel fueron bien tolerados por los animales, no observándose diferencias en el peso de los ratones, en el consumo de agua y comida y ningún otro signo de toxicidad.

Actividad antitumoral de Racotumomab en el modelo de metástasis experimentales de 3LL

La inoculación i.v. de células 3LL promueve el crecimiento de focos tumorales múltiples en el pulmón de los animales. Las lesiones pulmonares así generadas progresaron rápidamente generando una sobrevida de los animales que no superó los 25 días luego de la inoculación.

Se evaluó la actividad antitumoral de racotumomab bajo estas condiciones experimentales. La vacuna no mostró actividad antitumoral alguna sobre las células 3LL, aun empezando el proceso de inmunización de los animales antes de la inoculación de las mismas.

Sin embargo, cuando se utilizaron células 3LL previamente incubadas con NGc (figuras I.6 y II.6), la inmunización de los animales con 200 µg por dosis de racotumomab en un esquema de 3 dosis comenzando dos semanas antes de la inoculación i.v. de las células, demostró una reducción significativa en los macronódulos pulmonares formados (figura III.8).

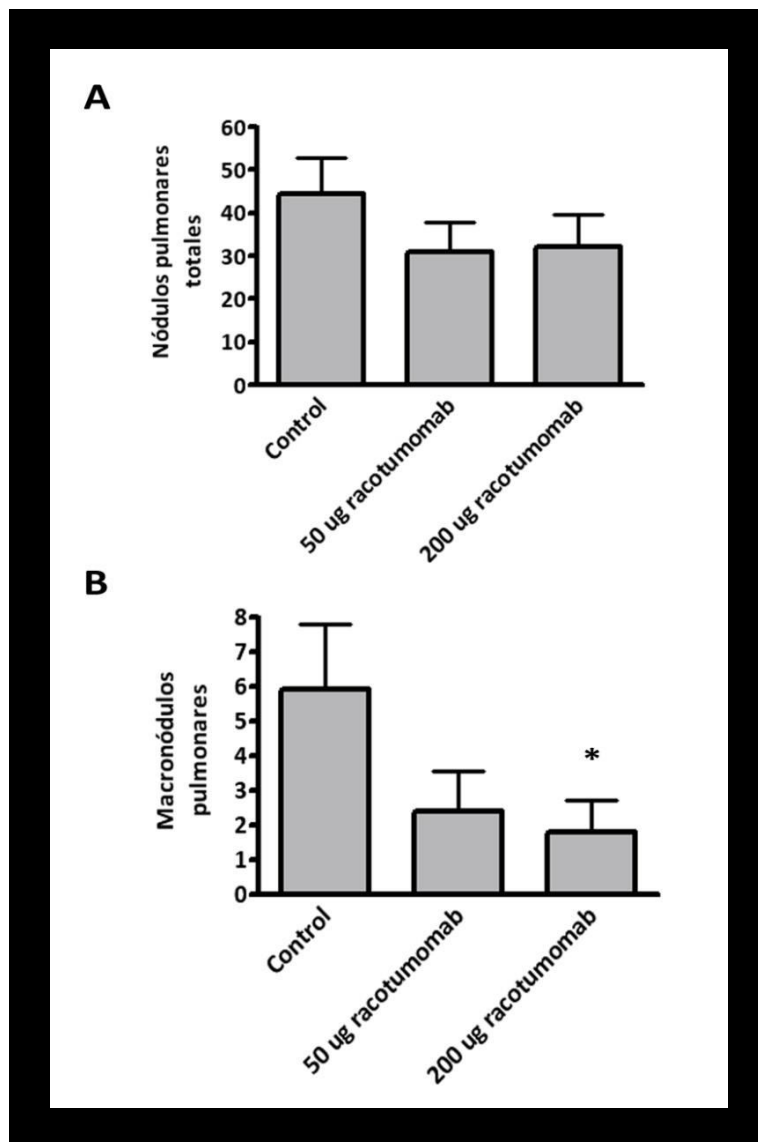


Figura III.8 Efecto antitumoral de la vacunación con racotumomab en nódulos pulmonares experimentales altamente agresivos, positivos para NGcGM3. Los animales fueron vacunados con racotumomab y luego inoculados por vía endovenosa con 3LL o 3LL preincubadas con NGc, como se describió en Materiales y Métodos. **(A)** Nódulos pulmonares totales. **(B)** Macronódulos pulmonares (> 2 mm). * $p < 0.05$, control vs racotumomab 200 μg /dosis, ANOVA seguido de test de comparación múltiple de Bonferroni. Las lesiones pulmonares se muestran como la media $\pm$ SEM.

Respuesta inmune específica en animales vacunados con racotumomab

Por último, se evaluó la respuesta inmune específica para NGcGM3 inducida por racotumomab en dos modelos animales diferentes. Por un lado, ratones C57BL/6 fueron inoculados con células 3LL preincubadas o no con NGc y vacunados o no con racotumomab. Se permitió que la enfermedad tumoral progrese, se recolectó el suero de los animales y éste se analizó por citometría de flujo utilizando las células murinas X-63 como blanco de unión, en las cuales NGcGM3 es el gangliósido mayoritario expresado en la membrana celular (Hernandez et al., 2008). Como se muestra en la figura III.9, no se observó reactividad de los sueros de ratones portadores de tumores 3LL ricos en NGcGM3 ni de tumores controles, demostrando un porcentaje de reconocimiento de células X-63 similar al de ratones no tratados. Por el contrario, el suero de los animales portadores de tumores 3LL ricos en NGcGM3, que fueron inmunizados con racotumomab, reaccionó contra X-63 demostrando la existencia de anticuerpos específicos contra el gangliósido glicolilado como resultado de la inmunización (Figura III.9)

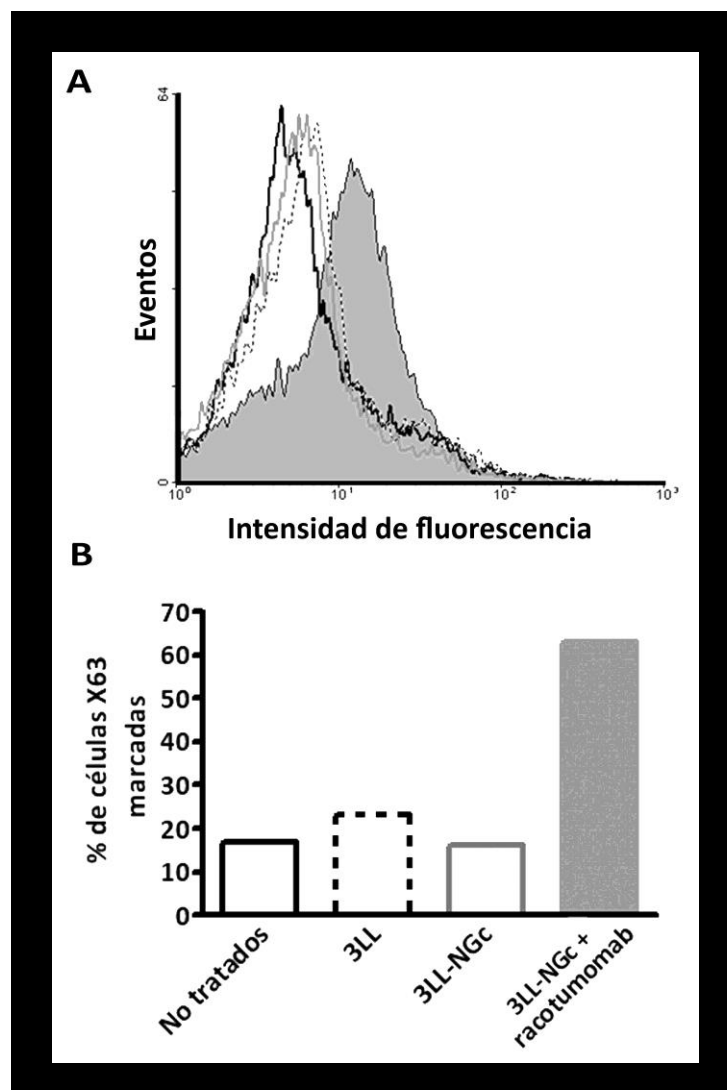


Figura III.9| Respuesta humoral específica contra NGcGM3 inducida por vacunación con racotumomab. Los ratones fueron inoculados por vía subcutánea con células 3LL preincubadas o no con NGc, e inmunizados con 50 µg/dosis de racotumomab como se describe en Materiales y Métodos. Luego del crecimiento tumoral, se extrajeron los órganos de los animales, se realizó un pool de cada grupo experimental y se analizaron por citometría de flujo contra células X-63, positivas para la expresión del gangliósido NGcGM3. **(A)** Análisis por citometría de flujo. **(B)** Porcentaje de células X-63 conocidas. Los valores corresponden a animales sanos no tratados (línea continua negra); animales portadores de tumor 3LL (línea punteada); animales portadores de tumor 3LL-NGc (línea continua gris) y animales portadores de tumor 3LL-NGc vacunados con racotumomab (barra llena).

Por otro lado, se utilizó un modelo de pollos reportado por Hernandez y colaboradores como adecuado para estudiar la respuesta específica Ab3 inducida por racotumomab (Hernandez et al., 2005). Al igual que los seres humanos, los pollos son incapaces de sintetizar NGc por lo que este ácido siálico se encuentra ausente en los glicoconjugados que expresan (Fujii et al., 1982). Los animales fueron inmunizados con tres dosis de 400 µg de racotumomab cada una y el suero obtenido 28 días posteriores a la primer inmunización se analizó mediante IHQ sobre cortes histológicos de tejido pulmonar humano. En la figura III.10 se muestran imágenes representativas de la inmunoreactividad presentada por el suero de un animal vacunado con 400 µg de racotumomab- alum en un corte de adenocarcinoma pulmonar. La tinción obtenida en los cortes estudiados demostró un reconocimiento de los sueros hacia los mismos. Teniendo en cuenta que NGcMG3 ha sido reportado como un antígeno tumoral en NSCLC humano (van Cruijsen et al., 2009; Blanco et al., 2012; Hayashi et al., 2013), y considerando que los sueros analizados demostraron contener anticuerpos anti-NGcGM3, es posible postular que éstos últimos fueron capaces de reaccionar contra el gangliósido glicolilado presente en los cortes histológicos.

Como control se utilizó suero obtenido previo a las inmunizaciones. Para el análisis de los sueros también se emplearon muestras de carcinoma escamoso y un segundo caso de adenocarcinoma, observándose en todos la misma intensidad en la inmunomarcación.

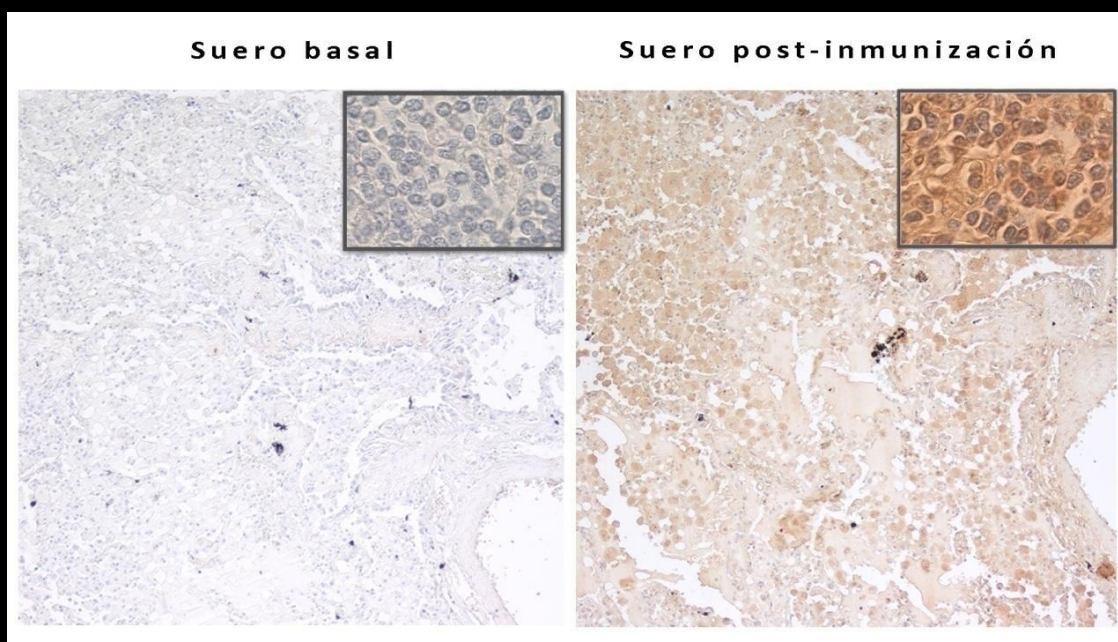


Figura III.10 | Inmunoreactividad de sueros sobre cortes histológicos de pulmón. Sueros pre (panel izquierdo) y post inmunización (panel derecho) con racotumomab fueron evaluados sobre muestras histológicas de pulmón humano como se describió en Materiales y Métodos. Se observa una respuesta anti NGcGM3 en la muestra sérica obtenida luego de las inmunizaciones con la vacuna. Aumento final: 400X, Insets: 1000X.

Discusión

Expresión de NGcGM3 en cáncer

Los gangliósidos han sido identificados como antígenos tumorales en diversos tipos de neoplasias humanas como melanoma y cáncer pulmonar (Hakomori, 1996; Birkle et al., 2003; Alfonso et al., 2007; Durrant et al., 2012). La transformación maligna está frecuentemente asociada con cambios en las estructuras de glicanos, incluyendo alteraciones en la expresión de gangliósidos. Actualmente, muchos de estos glicolípidos como ser GM2, GD3 y NGcGM3 son considerados blancos atractivos para la inmunoterapia del cáncer (Blanco et al., 2011a; Heimbürg-Molinari et al., 2011; Hevey y Ling, 2012). Su participación en la progresión tumoral y en la formación de metástasis ha sido ampliamente reportada (Deng y Ladisch, 2000), así como también su fuerte capacidad de ser estimuladores del crecimiento tumoral *in vivo* (Alessandri et al., 1987) y de modular múltiples eventos de la respuesta inmune (Ladisch, 1987a; Ladisch et al., 1987b; Ladisch et al., 1987c).

NGcGM3 ha sido considerado un blanco interesante para el desarrollo de inmunoterapias en oncología debido a que se encuentra expresado en ciertos tumores humanos pero está ausente en tejidos normales debido a una mutación en la enzima responsable de su síntesis (Malykh et al., 2001; Fernandez et al., 2010). Los tumores son capaces de incorporar NGc a partir de la dieta y del microambiente tisular, y se sabe que células tumorales resistentes pueden sobreexpresar gangliósidos N-glicosilados bajo condiciones de hipoxia al inducir sialina, un transportador específico de ácidos siálicos (Yin et al., 2006).

Numerosos trabajos describen que la presencia de NGc en células tumorales les confiere ciertas ventajas. En modelos murinos de melanoma y mama, nuestro grupo describió que la incorporación del ácido siálico a partir de SFB incrementa la capacidad metastásica de las células (Gabri et al., 2006). Por otra parte, de León y colaboradores reportaron que NGc actúa como inmunosupresor al modular de manera negativa células T CD4⁺ sin afectar poblaciones linfocitarias con fenotipo regulador, y al disminuir la actividad de células dendríticas (de León et al., 2006; de León et al., 2008). La incorporación de dicho ácido siálico constituye uno de los ejemplos específicos de alteraciones en glicanos presentes en células tumorales relacionados con la transformación maligna y la progresión tumoral. Los resultados descritos permiten postular que el metabolismo de ciertas células tumorales pudo ser seleccionado durante el proceso microevolutivo que representa el desarrollo de un tumor (Greaves y Maley, 2012; Sánchez Alvarado, 2012) en favor de incorporar NGc, adquiriendo de esta manera capacidades que le confieren ventajas durante la progresión tumoral.

En otros mamíferos como los ratones, se observa un perfil de expresión distinto al

descrito en seres humanos. Los tejidos murinos normales expresan CMAH, y por consiguiente sus glicoconjugados contienen NGc (Kawano et al., 1994; Kawano et al., 1995). En un modelo murino mutante para CMAH, se encontró que los fetos incorporan NGc a partir de madres heterocigotas, y que el mismo se acumula en tumores inducidos experimentalmente (Hedlund et al., 2007). Asimismo, fue descrito que células de melanoma y cáncer pulmonar murinos, que carecen de CMAH, son capaces de procesar e incorporar NGc a partir de distintas fuentes como el suero fetal bovino, mucinas ricas en NGc o NGc purificado. Como resultado, la presencia de NGcGM3 en la membrana celular promueve la proliferación y la adhesión *in vitro*, así como también el crecimiento celular *in vivo* (Gabri et al., 2009).

Utilizando el modelo de expresión transitoria desarrollado con células B16 se evaluó la actividad de la vacuna NGcGM3/VSSP, no obteniéndose una respuesta antitumoral por parte de la misma. Este resultado se debió posiblemente a la presencia temprana y transitoria del gangliósido en las células, restringida a los días iniciales del desarrollo tumoral.

Teniendo en cuenta que el modelo descrito previamente no permitió la validación de terapias inmunoterapéuticas dirigidas a NGcGM3, se decidió generar modelos de expresión estable de este glicolípido. Para ello, se amplificó la secuencia del ARNm de CMAH mediante RT-PCR a partir de hígado de ratón y se transfectó en células de las líneas murinas B16 y F3II. Ambas líneas celulares fueron capaces de transcribir correctamente el gen de la enzima y mostraron actividad de la misma. La transfección resultó en un incremento significativo en la presencia de NGcGM3 en la membrana celular en las dos líneas empleadas.

Las células B16 se caracterizan por expresar NAcGM3 como gangliósido mayoritario. Los resultados obtenidos demostraron que B16-H presentó un descenso en la expresión del mismo como consecuencia del incremento en NGcGM3. El ácido N-acetil neuramínico puede ser producido metabólicamente o incorporado de manera exógena por las células. Todo el NAc es transformado en ácido citidin monofosfo-N-acetil neuramínico (CMP-NAc) por acción de la enzima CMP-NAc sintasa dentro del núcleo celular, y finalmente transferido a glicoconjugados recientemente sintetizados por sialil transferasas dentro del aparato de Golgi (Altheide et al., 2006). La presencia de CMAH en células B16-H promueve la conversión de CMP-NAc a CMP-NGc, el cual a su vez es transferido a nuevos glicanos como ser el gangliósido NGcGM3.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado previamente por Kawano y colaboradores. Los autores demostraron que la transfección de la secuencia de CMAH en fibroblastos renales se correlaciona directamente con el incremento en los niveles de ácido siálico en su forma NGc, y con un descenso en los de NAc. Adicionalmente, reportaron que muestras de tejidos murinos que carecen de NGc resultan negativas para la expresión de CMAH (Kawano et al., 1995).

Participación de NGcGM3 en microdominios de membrana de células B16-H

Los esfingolípidos en general, y particularmente los glicosfingolípidos (GSL), son lípidos complejos de membrana ubicados preferentemente en la superficie de la célula de manera de mediar diversos aspectos relacionados con la interacción entre éstas, ó entre una célula y su microambiente. Los GSL, en conjunto con el colesterol y la esfingomielina, son responsables de la organización de microdominios de membrana en los cuales se modulan cascadas de señalización a través de la interacción con proteínas que poseen actividad kinasa. Las alteraciones en las propiedades de la superficie celular producidas como consecuencia de cambios en la composición de GSL poseen un rol importante como determinantes de la agresividad en células tumorales. Dentro de estas modificaciones se ha prestado especial atención a la función que desempeñan los cambios en vías de sialilación. Como consecuencia, ha sido descrita la participación biológica que desempeñan los gangliósidos -glicolípidos sialilados- en la regulación de la función de complejos de señalización que afectan profundamente el crecimiento, la sobrevivencia, la movilidad y la capacidad invasiva de células tumorales, actuando como moduladores del comportamiento celular. Esta modulación se lleva a cabo mediante la regulación de dos fenómenos específicos: por un lado la actividad tirosin-kinasa asociada a receptores de factores de crecimiento y por el otro, la distribución de los mismos en la membrana celular.

Recientemente, Arpaia y colaboradores describieron la vía de señalización integrada por cav-1/Src/Rac1 asociada a crecimiento dependiente de anclaje en células B16. Los autores demostraron que la interacción cav-1- RhoGTPasas es crítica para la expresión de integrina $\alpha 5$ y para la activación de Rac1 dependiente de la kinasa Src. Asimismo, reportaron que al alterar esta interacción se ve afectada la capacidad migratoria e invasora de las células *in vitro*, así como también se perjudica la capacidad metastásica de B16 (Arpaia et al., 2012). Adicionalmente, el grupo de Cerezo reportó en un modelo de fibroblastos mutantes para cav-1 un incremento en la proliferación independiente de anclaje a sustrato y una mayor capacidad de las células de progresar en el ciclo celular (Cerezo et al., 2009).

Debido al perfil de expresión de gangliósidos que presenta B16, descrito en párrafos anteriores, y a la modulación del mismo observada en B16-H, este modelo resulta apropiado para el estudio de la participación de NGcGM3 en la biología molecular. Particularmente, cómo se modula la vía reportada por Arpaia, relacionada con comportamientos celulares como proliferación y adhesión celular.

Las células B16-H presentaron un incremento en la expresión de integrina $\alpha 5$ en la membrana. Por su parte, la cuantificación de la expresión de cav-1 resultó menor, pudiendo asociar esta disminución con un desplazamiento de la misma hacia el interior celular. Resultados similares fueron descritos por Singh y colaboradores en un modelo de fibroblastos de piel. Los autores reportaron que ciertos gangliósidos pueden selectivamente regular la

endocitosis de cav-1, siendo necesarios para la localización de esta proteína en la membrana celular, así como también de los microdominios denominados caveolas (Singh, et al., 2010).

La expresión de la kinasa Src, su activación determinada por la cuantificación de la variante fosforilada en el residuo tirosina 416, y la expresión de Rac1, también se encontraron disminuidas en B16-H. Sumado a estos resultados, la adhesión celular y la capacidad proliferativa de B16-H, determinada mediante cuantificación de proteínas y ensayo clonogénico de crecimiento a baja densidad, resultaron incrementadas luego de la transfección de CMAH. Este aumento se asoció con un incremento en la expresión del transcripto de ciclina D1.

Los resultados obtenidos demuestran que aún cuando el crecimiento celular y la expresión de integrina $\alpha 5$, asociada a una mayor adhesión, se encuentran incrementados, las vías de señalización desencadenadas en respuesta al anclaje a sustrato se ven reguladas de manera negativa como consecuencia de la expresión de NGc. Este hecho se debe posiblemente a la activación de vías proliferativas que se relacionan con mecanismos independientes de anclaje. Adicionalmente, la morfología celular presentada por células B16 con y sin expresión de NGcGM3 resultó distinta, con una menor cantidad de prolongaciones celulares en B16-H. Este resultado sugiere, por un lado, la asociación de la morfología de estas células con un fenotipo tipo fibroblastoide, en concordancia con células que poseen menor diferenciación. Por otro lado, células que presentan menor cantidad de prolongaciones y un citoesqueleto de actina con menor generación de haces pueden ser más independientes del anclaje a sustrato. La ejecución de ensayos tendientes a cuantificar la capacidad celular de crecimiento en dichas condiciones permitirá corroborar la hipótesis propuesta.

En un modelo de carcinoma de ovario, Prinetti y colaboradores observaron que un incremento en la expresión de la enzima NAcGM3 sintasa se correlaciona con un aumento en la proteína caveolina-1 (Prinetti et al., 2010). Cav-1 actúa como una proteína adaptadora, facilitando la localización de moléculas involucradas en procesos de señalización en microdominios de membrana ricos en GSL y colesterol. El efecto de esta proteína hidrofóbica de membrana en el fenotipo tumoral parece ser sumamente heterogéneo y dependiente del entorno molecular con el cual interaccione (Prinetti et al., 2008). Sin embargo, cav-1 posee un importante rol en la organización de la transducción de señales derivada de receptores integrinas y en vías de proliferación celular dependientes de anclaje (Wary et al., 1998). Particularmente, permite la interacción entre integrina y Src (Prinetti et al., 2010), y ha sido demostrado que estas tres proteínas co-inmunoprecipitan. La kinasa Src puede fosforilar a caveolina en el residuo tirosina 14 (Mastick et al., 1995; Li et al., 1996; Aoki et al., 1999) induciendo su relocalización en la célula.

Cav-1 fosforilada se encuentra a su vez involucrada en la modulación de Csk, regulador negativo de Src, sugiriendo un mecanismo de regulación negativa sobre la actividad de la misma. Por otro lado, esta modificación también ha sido asociada a una mayor capacidad de crecimiento en condiciones de independencia a anclaje observada en células transformadas luego de la regulación negativa de cav-1 (Lee et al., 2001; Volonte et al., 2001).

Nuestros resultados permiten postular que la alteración en la expresión de gangliósidos en B16 en favor de un incremento de NGcGM3 y un descenso en NAcGM3, conduce a una disminución de cav-1 y por consiguiente al desacople de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ de las vías de señalización que modula, desencadenando vías de proliferación celular independientes de anclaje. La determinación de los niveles de cav-1 fosforilada y la expresión de Csk permitirán corroborar esta hipótesis así como también postular un mecanismo mediante el cual NGcGM3 modula la capacidad proliferativa de células de melanoma B16.

Si bien no se conoce la composición de glicolípidos en el modelo de carcinoma mamario F3II, se ha descrito la presencia de NAcGM3 como uno de los gangliósidos con mayor abundancia en células de la línea 3LL (Inokuchi et al., 1990; Inokuchi et al., 1993). En estas células de carcinoma pulmonar, NAcGM3 se encuentra involucrado en la fosforilación de proteínas necesarias para el crecimiento celular, y por consiguiente es propuesto como un elemento esencial en la formación y funcionalidad de los microdominios (Inokuchi et al., 2000).

Los cambios encontrados en el comportamiento celular de variantes de B16 con expresión de NGc también fueron observados en los modelos murinos F3II -con expresión estable de CMAH- y de carcinoma de pulmón de células no pequeñas 3LL -con expresión transitoria del gangliósido NGcGM3. Las células F3II-H presentaron una mayor capacidad de crecimiento celular *in vitro*, mientras que la adhesión resultó incrementada en los dos modelos de expresión, confirmando que la presencia de glicoconjugados con residuos N- glicosilados altera estos parámetros asociados con un incremento en la malignidad celular *in vitro*, posiblemente mediante la inducción de alteraciones en la estructura y/o composición de microdominios de membrana específicos.

En la figura IV.1 se representan esquemáticamente los resultados obtenidos en el modelo B16-H en relación a la participación de NGcGM3 en microdominios de membrana y en la modulación de la vía de señalización cav-1/Src/Rac1.

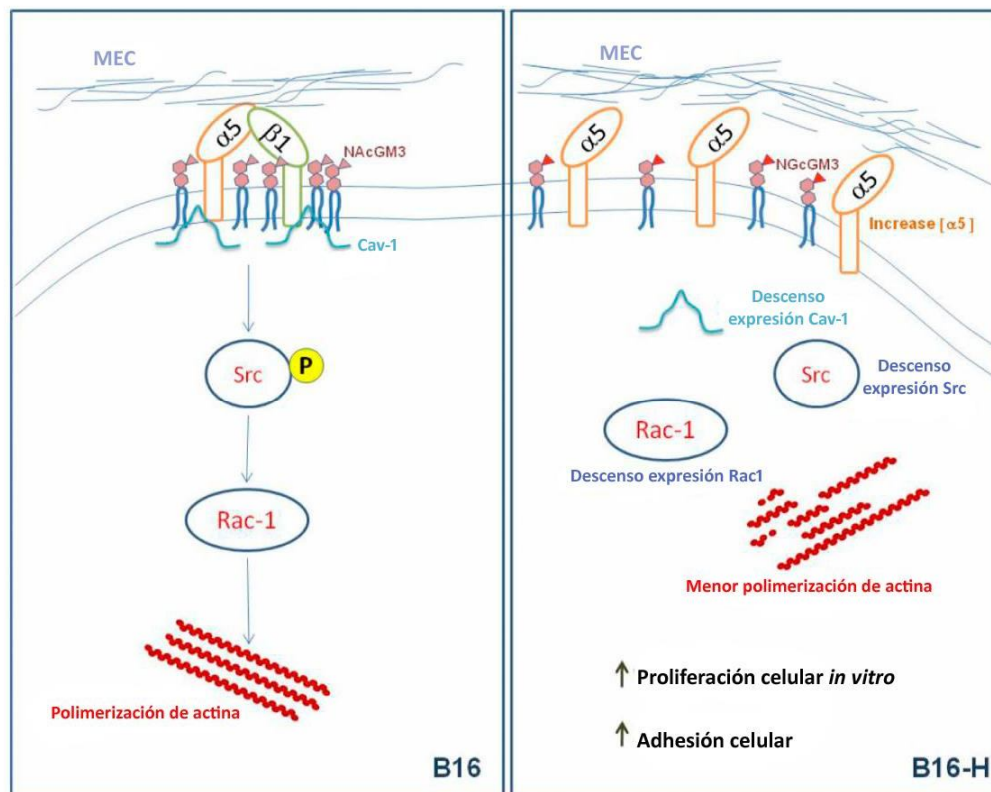


Figura IV.1] Modelo propuesto de participación de NGcGM3 en microdominios de membrana en células B16-H. En células B16 (panel izquierdo), NAcGM3 interacciona con la integrina $\alpha 5$ y con cav-1 en la membrana plasmática. En B16-H (panel derecho), la presencia de NGcGM3 incrementa la expresión de integrina $\alpha 5$, con el consecuente aumento en la adhesión celular, induciendo un descenso en la expresión, y la internalización de cav-1. La Kinasa Src y Rac1 disminuyen su expresión y se observa una menor generación de haces de actina. Sin embrago, la proliferación celular se encuentra incrementada en B16-H, sugiriendo la activación de vías de crecimiento celular independientes de anclaje.

NGcGM3 y tumorigenicidad de los modelos murinos

La evaluación del comportamiento *in vitro* demostró que las células con expresión estable de NGcGM3 presentan mayor capacidad adhesiva y proliferativa que las líneas de las cuales derivan. Considerando estos parámetros relacionados con mayor malignidad por parte de las variantes transfectadas, la hipótesis propuesta inicialmente consistió en que la presencia de NGcGM3 induce un fenotipo más agresivo. Sin embargo, cuando B16-H fue inoculada en animales singénicos, éstas fueron menos tumorigénicas. Para obtener la misma incidencia tumoral que la lograda con B16, fue necesario inocular los animales con una cantidad de B16-H cuatro veces mayor. No obstante, fue posible promover el desarrollo de tumores de melanoma mediante un incremento en el número de células a inocular.

Los ensayos *in vivo* realizados con el modelo de expresión estable F3II-H arrojaron como resultado un comportamiento similar al descrito anteriormente. Los tumores desarrollados por estas células presentaron una tasa de crecimiento significativamente menor que los formados a partir de la inoculación de células parentales.

Es interesante destacar que según el modelo utilizado los parámetros de crecimiento tumoral que se modifican como consecuencia de la expresión de NGcGM3 varían. En el caso de células B16-H la incidencia tumoral es la principal variable afectada, provocando como consecuencia una alteración en la tasa de crecimiento cuyo valor es representado considerando el total de animales tratados. Por su parte, el modelo de carcinoma F3II-H presenta una incidencia similar a la mostrada por las células parentales, logrando el desarrollo de tumores en la totalidad de los animales inoculados. Sin embargo, la tasa de crecimiento obtenida resulta significativamente menor.

Cuando F3II-H fue inoculada en ratones atímicos inmunodeficientes se encontró que el crecimiento tumoral fue similar al presentado por F3II parental, con valores de incidencia y de volumen tumoral similares entre ambas variantes. Estos resultados sugieren un rol protagónico del sistema inmunológico en el rechazo de las células transfectadas en la etapa de organización tumoral inicial montado sobre la expresión positiva de NGc.

Los resultados obtenidos en la evaluación del comportamiento *in vivo* de células 3LL con expresión de NGcGM3 de manera transitoria fueron opuestos a los descritos previamente. 3LL-NGc presenta mayor capacidad tumorigénica al demostrar un incremento en el potencial metastásico. Los animales inoculados por vía i.v. en un protocolo de metástasis experimentales desarrollaron mayor cantidad de nódulos pulmonares que aquellos que recibieron células 3LL. Interessantemente, resultados previos demostraron que al preincubar B16 y F3II con NGc purificado se produjo un incremento en la capacidad metastásica de las células. En el modelo de melanoma también se encontró un aumento en el tamaño de los tumores subcutáneos luego de 35 días posteriores a la inoculación, y un descenso en la latencia obtenida (Gabri et al., 2009).

Estas observaciones permiten postular que la presencia de concentraciones iniciales altas de NGc en la membrana de células preincubadas estimula la formación de los tumores favoreciendo el desarrollo de los mismos. Esto sucede ya sea en el sitio primario de inoculación, o al inducir su anidación en un sitio distante, como ocurre en el modelo de metástasis experimentales. La presencia temporal del gangliósido en los modelos de expresión transitoria, parece no ser lo suficientemente inmunogénica como para inducir una respuesta que desencadene el reconocimiento del tumor, con el consecuente descenso en el crecimiento del mismo. Resultados reportados por de León y colaboradores demostraron que el tratamiento de células del mieloma murino X-63 con el inhibidor de la síntesis de gangliósidos D-PDMP, disminuye el contenido de NGcGM3 en las mismas y reduce significativamente el crecimiento tumoral (de León et al., 2006). Por su parte, Casadesus y colaboradores demostraron que células de la línea de leucemia linfocítica de células B L1210 mutantes para CMAH, presentan menor tumorigenicidad que la línea parental (Casadesus et al., 2013). Los resultados obtenidos con el modelo de expresión transitoria 3LL se relacionan con los descritos anteriormente, demostrando una relación directa entre la presencia de NGcGM3 y la tumorigenicidad *in vivo*. Sin embargo, los modelos singénicos de expresión estable de melanoma y carcinoma mamario arrojaron resultados opuestos al demostrar que la presencia del gangliósido es perjudicial para el desarrollo tumoral. En la figura IV.2 se representan esquemáticamente los resultados obtenidos en relación a la tumorigenicidad de los modelos murinos desarrollados y empleados durante el presente trabajo.

Ensayos que permitan evaluar el desarrollo de una respuesta inmune en estos modelos permitirán determinar si efectivamente la expresión estable de NGcGM3 es capaz de activar al sistema inmunológico de modo de reconocer y disminuir el crecimiento tumoral.

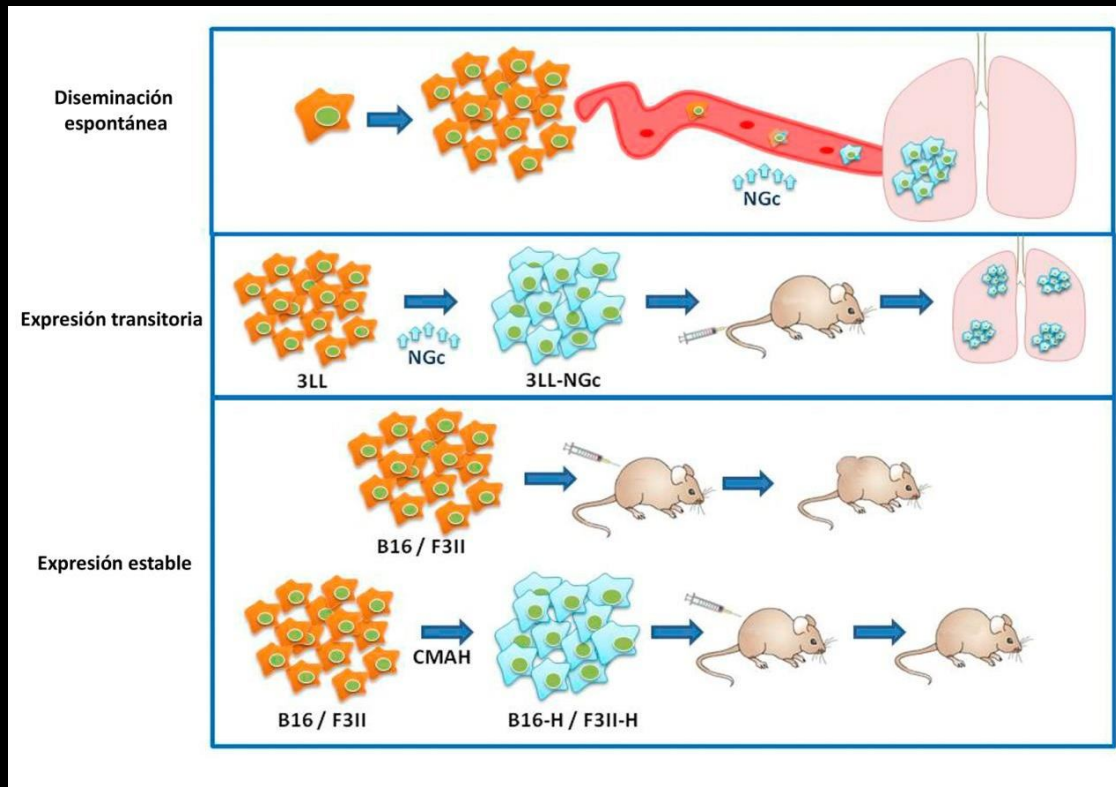


Figura IV.2| Modelos murinos de expresión de NGcGM3 utilizados durante el desarrollo de la presente tesis. En el modelo de **Diseminación espontánea** (panel superior) células 3LL inoculadas el espacio s.c de animales singénicos pueden diseminarse de manera espontánea y formar nódulos en el pulmón. Durante el tránsito por la vasculatura del hospedador, incorporan y metabolizan NGc de manera de agregarlo a glicoconjugados como NGcGM3. En el modelo de **Expresión transitoria** (panel intermedio) células 3LL son preincubadas con NGc purificado e inoculadas por vía i.v. en animales singénicos. Estas células presentan mayor tumorigenicidad que las parentales. Por último, en el modelo de **Expresión estable** (panel inferior) células B16 y F3II transfectadas con CMAH presentan menor tumorigenicidad que las líneas parentales cuando son inoculadas por vía s.c. en animales singénicos.

Modelos preclínicos de inmunoterapia basada en NGcGM3

El desarrollo de vacunas contra el cáncer, destinadas a incrementar la respuesta inmune contra tumores, es un área de investigación de gran prevalencia. Los estudios preclínicos avalan el desarrollo de estrategias de vacunación con eficacia clínica superior (Palena et al., 2006). En este sentido, los modelos murinos son excelentes herramientas para evaluar la eficacia de terapias novedosas y para entender los mecanismos biológicos que gobiernan una respuesta antitumoral efectiva.

Uno de los principales desafíos en el desarrollo de terapias contra el cáncer dirigidas a glicolípidos es encontrar blancos atractivos, con expresión específica en tumores y que presenten un papel relevante durante la progresión tumoral. No resulta sencillo demostrar esto experimentalmente en modelos murinos puesto que los tumores que desarrollan no siempre presentan los mismos glicolípidos que los tumores humanos. Adicionalmente, sólo es posible inducir la formación de tumores humanos en ratones atímicos inmunodeficientes, por lo que resulta inapropiado para la evaluación de inmunoterapias.

En el año 2009 Cheever y colaboradores publicaron los resultados de un estudio que establece una lista de antígenos tumorales prioritarios para avanzar con la investigación traslacional. El trabajo fue desarrollado por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos y estuvo basado, entre otros aspectos, en la determinación de aquellos blancos susceptibles de ser atacados mediante inmunoterapia. Entre los primeros 50 antígenos se encuentran tres gangliósidos: GD2, fucosil-GM1 y NAcGM3 (Cheever et al., 2009). Si bien no se incluye a NGcGM3 -la variante glicolilada de NAcGM3 y blanco de estudio de este trabajo doctoral- entre estos antígenos prioritarios, en el artículo publicado por Fernandez y colaboradores un año después se listan las características que cumple este GSL pudiendo considerarse como un antígeno relevante para el desarrollo de vacunas oncológicas (Fernandez et al., 2010).

La transfección de la secuencia de CMAH en células B16 permitió responder la pregunta que plantea el rol de NGcGM3 en la actividad de la vacuna NGcGM3/VSSP. El modelo B16-H fue utilizado para evaluar la actividad antitumoral de la misma, demostrándose un descenso en la incidencia tumoral con respecto a ratones no tratados como efecto del tratamiento con la vacuna. Ningún animal vacunado e inoculado con 2×10^4 B16-H, una carga tumoral que genera una incidencia del 80%, desarrolló tumor palpable.

Al cuantificar la expresión del gangliósido en B16-H se observó una reducción en los niveles de NGcGM3 a lo largo de los sucesivos pasajes del cultivo, aun cuando las células se mantuvieron en presencia del antibiótico de selección. Esto posibilitó la evaluación de la actividad antitumoral de la vacuna en un modelo constituido por células B16-H sin expresión del antígeno blanco. Los resultados confirmaron el papel fundamental que desempeña NGcGM3 en la respuesta a la vacunación, permitiendo validarlo como blanco de la misma.

El modelo murino de carcinoma de Lewis altamente metastásico 3LL- D122 presenta como característica la capacidad de generar nódulos pulmonares cuando las células son inoculadas por vía subcutánea en animales singénicos. En este modelo, la presencia de NGcGM3 es detectada en las lesiones pulmonares pero no en el tumor primario, sugiriendo la hipótesis de que la incorporación del gangliósido por parte de las células ocurre durante el tránsito de las mismas a través de la vasculatura del animal (Labrada et al., 2010). Interesantemente, el tratamiento con la vacuna NGcGM3/VSSP inhibe la formación de nódulos pulmonares pero no tiene efecto en el crecimiento del tumor primario, lo que sugiere una participación activa del antígeno en el alcance de una respuesta antitumoral efectiva.

En el presente trabajo se obtuvieron evidencias que demuestran que la incorporación exógena de NGc promueve el potencial metastásico de células de cáncer pulmonar 3LL y que la actividad antitumoral de la vacuna anti-idiotipo racotumomab está asociada a la presencia de NGcGM3 en nódulos pulmonares. En primer lugar se confirmó que la vacunación con el anti-idiotipo no genera un efecto terapéutico en el crecimiento del tumor primario, por tratarse de células sin expresión de NGcGM3. Sin embargo, la inmunización quincenal con racotumomab fue altamente efectiva contra nódulos pulmonares de 3LL, ya sea administrada sola o en combinación con ciclos de quimioterapia de pemetrexed (AlimtaTM). Por su parte, la combinación con quimioterapia a base de taxanos no demostró efecto antitumoral en este modelo de carcinoma pulmonar.

La actividad antitumoral de racotumomab también se evaluó en el modelo altamente agresivo de diseminación experimental a pulmón de células 3LL-NGc, demostrándose la efectividad del producto al obtener una cantidad significativamente menor de macronódulos en los animales vacunados.

Como se describió en la Introducción de esta tesis, el efecto terapéutico de racotumomab está asociado al aumento de células T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ infiltrantes, una reducción de la angiogénesis y un aumento de la apoptosis de células tumorales en nódulos pulmonares. Sin embargo, no se detectaron anticuerpos contra NGcGM3 mediante ensayo de ELISA en ratones C57BL/6 (Díaz et al., 2009). Los resultados presentados en este trabajo demuestran que el tratamiento con racotumomab induce una respuesta humoral específica en los animales tratados. Mediante citometría de flujo se evaluaron los sueros de ratones portadores de tumor inmunizados con racotumomab y se encontró que los mismos reconocen células X-63 con sobreexpresión de NGcGM3. Es importante remarcar que los sueros de animales portadores de tumores 3LL enriquecidos o no con NGc, no vacunados, no reaccionaron con X-63 indicando que la respuesta inmune específica contra células NGc positivas no es provocada por la progresión tumoral en sí misma.

Adicionalmente, se empleó un segundo modelo animal con características de expresión de NGcGM3 similares a las descritas para seres humanos, constituido por pollos de la

raza Leghorn. La evaluación de muestras de suero de animales inmunizados con racotumomab ratificó la efectividad de la vacuna en la inducción de anticuerpos específicos contra el blanco NGcGM3, presente en cortes histológicos de adenocarcinomas pulmonar y carcinoma escamoso.

En pacientes de NSCLC vacunados con racotumomab se sugiere una correlación entre la inducción de anticuerpos de isotipos IgG o IgM contra NGcGM3 y un incremento en la sobrevida (Hernandez et al., 2008). Anticuerpos específicos contra el blanco fueron capaces de reconocer y matar células que expresan el antígeno mediante un mecanismo que se asemeja a la necrosis oncótica (Hernandez et al., 2011). Los resultados preclínicos obtenidos con el modelo 3LL-NGc contribuyen a determinar la importancia de la inducción de una respuesta humoral en la efectividad terapéutica de racotumomab.

Vacunas NGcGM3/VSSP y racotumomab

Al comparar los productos inmunoterapéuticos ensayados en este trabajo doctoral se pone de manifiesto que la especificidad por los blancos a los que están dirigidos difiere entre ambos. El producto NGcGM3/VSPSP está dirigido únicamente al gangliósido glicolilado. Los ensayos mostrados en esta tesis sobre el modelo B16-H permiten postular que la efectividad lograda contra el desarrollo de los tumores se fundamenta en la expresión casi única del gangliósido NAcGM3 por parte de las células. En este sentido, la modificación genética introducida induce un cambio en el perfil de expresión en favor de un incremento de NGcGM3 en la membrana celular, con escasa probabilidad de que se estén expresando GSL glicolilados adicionales. La alta especificidad de la vacuna permitirá obtener una mayor efectividad terapéutica cuando la indicación de la misma se realice en pacientes con patologías en las cuales se haya comprobado la expresión del antígeno NGcGM3 como gangliósido mayoritario.

Por otro lado, racotumomab es un producto con menor especificidad, dirigido al residuo NGc presente en diversos gangliósidos, entre ellos NGcGM3. Esta menor especificidad no se contrapone en absoluto con su eficacia terapéutica, ya que la identidad de los GSL expresados dependerá del tipo de tumor del que se trate. Como ejemplo puede mencionarse que la expresión del ácido siálico NGc en tumores de NSCLC humano no se limita solamente a NGcGM3. Cantidades relevantes de NGcGD1a también son detectadas en esta variante tumoral (Hayashi et al., 2013). La vacuna racotumomab puede entonces ser indicada en pacientes que presenten tumores en los que haya sido demostrada la expresión de más de un gangliósido glicolilado. Los anticuerpos inducidos por la vacunación serán capaces de reconocer los residuos NGc presentes en los distintos GSL, maximizando de esta manera la efectividad terapéutica de racotumomab.

NGcGM3 como blanco de inmunoterapia

Como se mencionó anteriormente, el gangliósido NGcGM3 ha sido descrito en numerosas neoplasias humanas. En particular, el grupo de van Cruisen examinó 176 muestras provenientes de pacientes con carcinoma pulmonar de células no pequeñas mediante inmunohistoquímica y encontró que NGcGM3 está ampliamente expresado en más del 90% de los casos (van Cruisen et al., 2009). Hayashi y colaboradores también reportaron la presencia de gangliósidos N-glicolilados en 86 muestras de NSCLC de un total de 93 estudiadas (93.5%). Los autores describieron por primera vez que los pacientes con alto contenido de NGc presentan una sobrevida menor, y un periodo libre de enfermedad significativamente inferior que aquellos con menor expresión de gangliósidos N-glicolilados. Ha sido reportado que la selección de células tumorales en un microambiente hipóxico, en el cual se induce la expresión de sialina y el incremento de NGc (Yin et al., 2006), conduce a la expansión de células con un fenotipo más invasivo y a la formación de metástasis (Harris, 2002; Semenza, 2007). La expresión de gangliósidos N-glicolilados en células de NSCLC podría ocurrir en condiciones de hipoxia, lo que se relacionaría con una menor sobrevida como fue descrito.

Tumores mamarios clasificados histológicamente como carcinomas ductales invasivos fueron evaluados en relación a la expresión anormal de gangliósidos por inmunohistoquímica. Si bien el nivel total de los mismos fue significativamente mayor en las muestras tumorales en comparación con el tejido normal, la presencia de NGcGM3 fue reportada en la mayoría de los casos estudiados (Marquina et al., 1996). La expresión de este GSL también fue demostrada "*in vivo*" en pacientes de cáncer mamario mediante la incorporación en el tumor de 14F7 marcado con Tecnecio radiactivo (Oliva et al., 2006).

De la misma manera, este antígeno fue estudiado en muestras de piel normal, nevos benignos y displásicos, melanoma cutáneo maligno, metástasis en nódulos linfáticos y carcinomas basales y de células escamosas, mediante inmunohistoquímica utilizando el mAb 14F7. Mientras que los cortes histológicos de tejido normal resultaron negativos para la expresión de NGcGM3 (Car et al., 2000; Blanco et al., 2011a), se observó una baja reactividad de 14F7 en las muestras correspondientes a nevos benignos y displásicos, y carcinomas basales y de células escamosas. Por el contrario, todas las muestras correspondientes a melanomas cutáneos malignos y a metástasis resultaron reactivas contra el mAb (Blanco et al., 2011a). Los resultados encontrados sugieren que la reactividad de 14F7, y por consiguiente la expresión de NGcGM3, podrían estar estrechamente relacionadas con el fenotipo más agresivo que presentan los melanomas cutáneos en comparación con otras neoplasias de la piel.

Adicionalmente, Blanco y colaboradores reportaron por primera vez la expresión de

NGcGM3 en tumores de sistema digestivo y en linfomas. La reactividad de 14F7 fue detectada en todas las muestras evaluadas de adenocarcinomas de estómago, colon y páncreas. Muestras de tumores de esófago, carcinomas epidermoide y basal de recto, y carcinomas hepatocelular también resultaron positivas para NGcGM3 (Blanco et al., 2011b). En un trabajo publicado recientemente, los autores reportaron la expresión de NGcGM3 en linfocitos B malignos, en linfomas de Hodgkin y en muestras correspondientes a metástasis en nódulos linfáticos, demostrando como localización principal del gangliósido la membrana celular (Blanco et al., 2013).

Por otra parte, Scursoni y colaboradores reportaron por primera vez la expresión de NGcGM3 en tumores sólidos pediátricos. Mediante el empleo del anticuerpo monoclonal 14F7, específico de NGcGM3, detectaron la presencia del gangliósido en el 88% de los casos de tumor de Wilms (nefroblastoma) (Scursoni et al., 2010), en el 81 % de las muestras de neuroblastoma y en la totalidad de muestras correspondientes a tumores de la familia de sarcoma de Ewing. Asimismo, los resultados obtenidos en neuroblastoma sugieren que la expresión de NGcGM3 se mantiene en las muestras correspondientes a casos más agresivos o con menor diferenciación, indicando que el antígeno constituye un blanco óptimo para estadios avanzados de la enfermedad (Scursoni et al., 2011). Muchos de los pacientes que padecen neuroblastoma logran una remisión de la enfermedad luego de ser sometidos a quimioterapia y cirugía. Sin embargo, la erradicación de la enfermedad mínima residual continúa siendo el mayor desafío cuando se intenta mejorar el pronóstico de los neuroblastomas de alto riesgo (Kramer, et al., 2001). En este sentido, en la actualidad se encuentran disponibles terapias con altas dosis de quimioterapia y células madre autólogas, pero aun es necesario el desarrollo de estrategias novedosas para el tratamiento de la enfermedad residual. Los resultados reportados por Scursoni y colaboradores fueron considerados para la ejecución de un ensayo clínico fase I de racotumomab en pacientes pediátricos con neuroblastoma en el Hospital "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", poniendo de manifiesto que la inmunoterapia dirigida a antígenos N-glicolilados constituye una estrategia terapéutica interesante en el tratamiento de neuroblastoma y otros tumores pediátricos.

En el presente trabajo se demuestra que la presencia de NGcGM3 en la membrana celular es un factor crítico para asegurar la actividad antitumoral de las vacunas NGcGM3/VSSP y racotumomab, estableciéndose una clara relación entre las mismas y su blanco molecular. Estos resultados resaltan la importancia de asegurar la expresión del blanco en muestras de tumor como marcadores biológicos, para así poder realizar una adecuada selección de pacientes susceptibles a ser respondedores de terapias que involucren vacunas oncológicas. Del mismo modo, este trabajo demuestra la factibilidad de la combinación del anticuerpo monoclonal anti idiotipo racotumomab con drogas quimioterapéuticas tales como pemetrexed, brindando un racional para las combinaciones quimio-inmunoterapéuticas en NSCLC. Los datos experimentales presentados en esta tesis

refuerzan el significado biológico del gangliósido NGcGM3 como un blanco para inmunoterapia.

Durante 2013 se obtuvo en nuestro país el registro bajo condiciones especiales de racotumomab, denominado comercialmente Vaxira® (ANMAT, Disposición Nro. 1446/2013). La vacuna se indica para el tratamiento de pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas en estadios avanzados. El estudio clínico más relevante realizado con Vaxira® en pacientes con NSCLC constituye un estudio doble ciego, multicéntrico, aleatorizado (1:1) con placebo, en el que se evaluó la eficacia del tratamiento con la vacuna en 176 pacientes. El objetivo primario de este estudio clínico consistió en evaluar el impacto del tratamiento con Vaxira® en la sobrevida global.

Los pacientes incluidos fueron diagnosticados de NSCLC (36% carcinoma de células escamosas, 31.5% adenocarcinoma, 19.1% carcinoma de células grandes y el 13.4% otros NSCLC), estadios IIIb (61.8%) y IV (38.2%), con una respuesta parcial, completa o estabilización de la enfermedad luego de la primera línea de quimioterapia basada en cisplatino. El esquema de vacunación consistió en la administración de 1 dosis de Vaxira® o placebo cada 14 días hasta completar las 5 dosis (periodo de inducción), seguido de un periodo de mantenimiento en el cual los pacientes recibieron una dosis cada 28 días, hasta completar 15 dosis. Luego de un año de tratamiento, se procedió a abrir el ciego y solo los pacientes pertenecientes al grupo Vaxira® continuaron la vacunación, independientemente de la progresión de la enfermedad.

El análisis de la sobrevida a la inclusión por protocolo incluyó 135 pacientes que recibieron al menos 5 dosis de la vacuna o de placebo, es decir, que completaron el periodo de inducción. Los resultados obtenidos demostraron una media de 18.9 vs 11.45 meses y una mediana de 10.9 vs 6.9 meses para los grupos tratados con Vaxira® y placebo respectivamente. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p=0.002$). La Tasa de Supervivencia Global a los 12 y 24 meses fue de 48 y 22% para el grupo que recibió Vaxira®, frente a 28 y 8% del grupo placebo, demostrando por primera vez en un ensayo clínico controlado y aleatorizado la superioridad de Vaxira® frente al grupo placebo (Tabla IV.1). Por otro lado, se demostró que la vacunación con este producto aumenta significativamente la sobrevida ($p<0.005$) luego de la progresión de la enfermedad, obteniéndose una media de 11 meses (IC 95% 7-15) y una mediana de 4 (IC 95% 3-6) para el grupo de los pacientes vacunados, mientras que para el grupo placebo se obtuvo una media de 4 meses (IC 95% 2, 6) y una mediana de 2 (IC 95% 1,3).

Tabla IV.1| Mediana y tasa de sobrevida de pacientes vacunados con Vaxira® o con placebo. 135 pacientes fueron incluidos en el análisis de sobrevida a la inclusión por protocolo. Se representan los valores de mediana y tasa de sobrevida obtenidos para cada grupo de pacientes.

Sobrevida		Tasa de sobrevida	6	12	18	24
Grupo	Mediana (meses)		meses	meses	meses	meses
Vaxira (n=70)	10.90 (IC 95% 6.82 - 14.98)	Vaxira	83	48	30	22
Placebo (n=65)	6.90 (IC 95% 4.43 - 9.37)	Placebo	62	26	12	8

La buena tolerancia y la eficacia mostrada por Vaxira® en los ensayos clínicos la convierten en una alternativa válida para tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadios avanzados.

Conclusiones

Participación de NGcGM3 en la biología de células tumorales

- La sobreexpresión de CMAH incrementa la expresión de NGcGM3 en la membrana plasmática de células de melanoma B16 y de carcinoma mamario F3II. Siendo que B16 expresa casi exclusivamente NAcGM3, la expresión de CMAH en estas células modificó significativamente el perfil de gangliósidos en membrana a favor de la variante glicolilada.
- Las células de carcinoma pulmonar de Lewis 3LL son capaces de incorporar NGc del medio de cultivo y agregarlo a sus glicoconjugados de membrana aumentando significativamente la expresión de NGcGM3 de manera transitoria.
- La presencia de NGcGM3 en células B16-H provoca un incremento en la expresión de integrina $\alpha 5$ en la membrana. Adicionalmente, su expresión resulta en una disminución en la expresión de caveolina-1, induciendo su internalización celular. Asimismo, los niveles de Src, su variante activa fosforilada en el residuo tirosina 416, y Rac1 también se encuentran disminuidas en B16-H en comparación con la línea parental.
- La expresión de NGcGM3 en el modelo B16-H promovería un fenotipo altamente proliferativo independiente de las señales de anclaje como consecuencia de la desarticulación de la vía Src/Rac1.
- La morfología celular de B16 se afecta como resultado de la incorporación de NGcGM3 en la membrana plasmática.

Impacto de la expresión de NGcGM3 en la tumorigénesis

- La presencia del gangliósido provoca un incremento en la adhesión y proliferación celular asociado a una mayor expresión de ciclina D1 en el modelo de melanoma. Se observa un comportamiento similar por parte de células F3II y 3LL con expresión de NGcGM3.
- Tanto B16-H como F3II-H demuestran una menor tumorigenicidad *in vivo* como consecuencia de la expresión estable de NGcGM3. Se modifican la incidencia y la tasa de crecimiento tumoral respectivamente.

- En ratones inmunodeficientes, los tumores F3II-H presentan un perfil de crecimiento similar a los desarrollados como consecuencia de la inoculación de células de la línea parental F3II. Esto sugiere la participación del sistema inmune en el reconocimiento del residuo NGcGM3 en los modelos singénicos de expresión estable.
- Como consecuencia de la presencia transitoria de NGcGM3 en células 3LL se promueve su capacidad metastásica, observándose un incremento en la cantidad de nódulos formados en el pulmón en un modelo de diseminación experimental.

NGcGM3 como blanco de inmunoterapia en modelos murinos

- El modelo B16-H resulta adecuado para la valoración de la actividad antitumoral del preparado vacunal NGcGM3/VSSP. La administración de una dosis de 200 µg de gangliósido conjugado provoca el rechazo tumoral en la totalidad de los animales vacunados.
- La actividad de la vacuna NGcGM3/VSSP depende fuertemente de la expresión del antígeno. Los ensayos de valoración de la respuesta no demuestran efecto antitumoral cuando los animales son inoculados con células que perdieron la expresión de NGcGM3.
- Es posible utilizar el modelo de expresión transitoria de NGcGM3 obtenido mediante la incubación de células 3LL con NGc purificado en la valoración preclínica de la vacuna racotumomab. La inoculación de dosis quincenales de la misma resulta efectiva contra la formación de nódulos espontáneos en el pulmón de los animales.
- El efecto antitumoral también se logra utilizando un modelo altamente agresivo de diseminación mediante la inoculación i.v de células 3LL preincubadas con NGc. Cuando los animales son tratados con tres dosis de 200 µg cada una de racotumomab se obtiene una disminución significativa en la cantidad de macronódulos formados en el pulmón.
- Los resultados demuestran que racotumomab es susceptible de ser combinada con agentes quimioterapéuticos como pemetrexed. La administración conjunta de ambas estrategias terapéuticas resulta en un descenso significativo en la cantidad de nódulos formados por diseminación espontánea a pulmón.
- La vacunación con racotumomab induce la formación de anticuerpos específicos

contra el blanco NGcGM3 en los modelos animales utilizados.

Agradecimientos

Es muy emocionante haber llegado a esta parte de la tesis. Estoy segura que de haber escrito esto en papel, estaría repleto de lágrimas.

Hace unos pocos meses me parecía que faltaba una eternidad, pero acá estoy.

Terminar este trabajo me lleva a pensar en todo el tiempo que pasó y toda la gente que me acompañó durante tantos años.

En primer lugar quiero agradecer a los Dres. Daniel Alonso y Daniel Gomez por permitirme formar parte del Laboratorio de Oncología Molecular desde hace 7 años; por haberme elegido para que continué creciendo profesionalmente junto a ellos, y por su enorme capacidad de trabajo y enseñanza, cualidades que admiro profundamente.

A Marian, por confiar plenamente en mí desde el principio, y por permitirme progresar como científica a su lado. Por enseñarme todo lo que se sobre este proyecto que fuimos comprendiendo juntos. Gracias también por haberme dado la oportunidad de ser parte del equipo de trabajo involucrado con raco. Me llena de satisfacción pensar en lo logrado.

A Gi, una de las personas más maravillosas y humildes que conozco. Por haberme regalado su hermosa amistad y por compartir tantas cosas conmigo. Un ejemplo dentro y fuera del trabajo para mí.

A Car, por su perfecta amistad. Creo que eso resume todo lo que siento por ella. Por hacer que sea tan fácil compartir cualquier cosa que me pasa. Y por supuesto por haber ayudado, y mucho, a que los experimentos de esta tesis terminaran.

A Georgi. No puedo imaginar mi trabajo sin ella por ser una de las personas más importantes para mí. Quiero agradecerle por estos 6 años compartidos, que nos convirtieron en grandes amigas. Por tantas charlas, tantos consejos, por confiarme cosas que sé no son fáciles, y por tenerme en cuenta. Gracias por su invaluable ayuda en cada experimento que surgió. Es genial saber que la próxima etapa sigue a su lado.

Mari, sin darme cuenta un día nos encontramos amigas. Gracias por acercarte en el momento justo, y por no haberte alejado más. Por las hermosas palabras, responsables de lágrimas de emoción más de una vez, por ser una de las personas más transparentes que conozco, y por tenerme tan en cuenta. Te admiro enormemente por tus ideales tan valiosos para mí. Gracias también por toda la ayuda con las cuestiones estadísticas.

A Naza, por demostrarme día a día todo su cariño. Por haber estado siempre presente y por darse cuenta de casi todo lo que me pasa. Por ser otra de las personas más transparentes que conozco, una cualidad que considero invaluable, y por su hermosa amistad. Por haberme ayudado tantas veces con los western y con tantos otros ensayos que ya ni me acuerdo.

A Juanch, él sabe, pero por las dudas lo escribo. Gracias capo por haberte transformado en un amigo increíble. Nunca pensé que atrás de esa persona que se fue

aturdida el primer día podía haber alguien tan copado y que me haga reír tanto. Gracias por la ayuda con los ratones.

A Diego, por habernos elegido. Por prestarme su oreja en los momentos más complicados y por ser mi mejor confidente. Gracias por resolver todos los problemas mecánicos del laboratorio y por su infinita paciencia para enseñarme a usar EndNote.

A Romi, la bondad y la dulzura personificadas. Creo que la persona más pura que conozco. Deberían darle el Nobel de la Paz. Nunca conocí a alguien tan dispuesta a dejar todo por los demás. Es maravilloso trabajar con ella. Gracias por hacer del laboratorio un lugar tan agradable para estar.

A Maru, por ser la primera en aguantarme desde otro lado. Espero haberlo hecho bien. Por enseñarme con sus preguntas y por seguir a mi lado para que juntas continuemos aprendiendo. Por su increíble y divertida honestidad.

A Hec, me alcanzaron unas pocas palabras para saber que trabajar con vos iba a ser genial. Gracias por hacerme sentir tan cómoda desde el principio y por haberte bancado la escritura de esta tesis con tu independencia.

A Fer, por ser mi gran compañero. Terminamos la carrera juntos, empezamos y nos doctoramos juntos. Sé que te voy a extrañar.

A Hernan, gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme y enseñarme.

A Pablo, por decirme las cosas como son y hacerme entender que, a veces, las cosas no son tan terribles como parecen.

A Adri, por el increíble trabajo que hace al mantener el papelerío en orden y lidiar con proveedores.

A Ale Zinni por haberme elegido para trabajar en el aula a su lado. Por confiar en mí, por su optimismo y por las maravillosas oportunidades que me dio.

A Lau y Pochi, mi querido círculo. Aun sin estar presente en el laboratorio siguen siendo parte de él. Gracias por haberme ayudado tanto cuando era una tímida estudiante que empezaba a hacer ciencia.

A la gente de Crono y LIGBCM, en especial a Ceci, por estar siempre dispuestos a ayudar y por tantas charlas de ciencia y no tan de ciencia.

A mi hermosa familia por el apoyo y el amor incondicional. A mis viejos por haber apoyado sin ninguna objeción mis ganas de irme lejos para hacer lo que me gusta. A mi hermana, mi primer gran amiga, por quererme tanto, por estar siempre y por ponerme en mi lugar cuando me lo merezco. Gracias por haberme hecho el regalo más maravilloso que existe, Tomás. A mi cuñado por cuidarla y quererla como se merece.

A mi abuela, esa maravillosa persona de hierro que me cuida y se preocupa a lo lejos. Por interesarse y sorprenderse tanto de lo que hago, y por sentirse orgullosa de mí. Esta tesis está dedicada a ella.

A la familia que elegí. Gracias a los Maiarú por haberme hecho sentir una más desde el

principio. Por quererme y extrañarnos tanto. Por intentar comprender este trabajo tan difícil y por haber compartido conmigo la alegría de la vacuna. A Mari y Martín por la belleza de Joaquín, mi otro regalo maravilloso.

A mis eternos amigos de allá por ser justamente eso, eternos. Porque la distancia no ha hecho más que unirnos y por estar tan presentes como si nunca nos hubiésemos alejado.

A Bel y Jesi por haber hecho que esos primeros años lejos de casa y de los amigos fueran tan fáciles de llevar. Por haber compartido juntas todas las cosas buenas, y no tan buenas, que nos pasaron, y por saber que siempre van a estar, aunque ya no nos veamos tanto.

Y por supuesto a él... Mi último agradecimiento es para la persona que más me conoce en este mundo y sabe exactamente todo lo que siento en este momento, y en cualquier otro. Esta tesis es tan suya como mía, porque la disfrutamos y sufrimos juntos. Gracias Ni por el apoyo incondicional, por bancarme todo, por cuidarme, por soñar conmigo y por amarme tanto. Te elegí hace más de 12 años y lo sigo haciendo día tras día.

Muchas gracias a todos! Estoy feliz...

Referencias

Aarntzen, E. H., de Vries, I. J., Goertz, J. H., Beldhuis-Valkis, M., Brouwers, H. M., van de Rakt, M. W., van der Molen, R. G., Punt, C. J., Adema, G. J., Tacken, P. J., Joosten, I., & Jacobs, J. F. 2012. Humoral anti-KLH responses in cancer patients treated with dendritic cell-based immunotherapy are dictated by different vaccination parameters. *Cancer Immunol Immunother*, 61(11): 2003-2011.

Abriata, G. 2013. Boletín de vigilancia epidemiológica del Instituto Nacional del Cáncer Vol. 1.

Abriata, G., & Loria, D. 2009. Boletín epidemiológico periódico | Enfermedades No Transmisibles, Vol. 1.

Ackerman, A. B. 1980. Malignant melanoma: a unifying concept. *Hum Pathol*, 11(6): 591-595.

Adkins, I., Holubova, J., Kosova, M., & Sadilkova, L. 2012. Bacteria and their toxins tamed for immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*, 13(8): 1446-1473.

Ahlers, J. D., Dunlop, N., Pendleton, C. D., Newman, M., Nara, P. L., & Berzofsky, J. A. 1996. Candidate HIV type 1 multideterminant cluster peptide-P18MN vaccine constructs elicit type 1 helper T cells, cytotoxic T cells, and neutralizing antibody, all using the same adjuvant immunization. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12(4): 259-272.

Alessandri, G., Filippeschi, S., Sinibaldi, P., Mornet, F., Passera, P., Spreafico, F., Cappa, P. M., & Gullino, P. M. 1987. Influence of gangliosides on primary and metastatic neoplastic growth in human and murine cells. *Cancer Res*, 47(16): 4243-4247.

Alfonso, M., Diaz, A., Hernandez, A. M., Perez, A., Rodriguez, E., Bitton, R., Perez, R., & Vazquez, A. M. 2002. An anti-idiotypic vaccine elicits a specific response to N-glycolyl sialic acid residues of glycoconjugates in melanoma patients. *J Immunol*, 168(5): 2523-2529.

Alfonso, S., Diaz, R. M., de la Torre, A., Santiesteban, E., Aguirre, F., Perez, K., Rodriguez, J. L., Barroso Mdel, C., Hernandez, A. M., Toledo, D., Gabri, M. R., Alonso, D. F., Viada, C., Gomez, R. E., Suarez, E., Vazquez, A. M., Perez, R., & Macias, A. E. 2007. 1E10 anti-idiotypic vaccine in non-small cell lung cancer: experience in stage IIIb/IVpatients. *Cancer Biol Ther*, 6(12): 1847-1852.

Alonso, D. F., Farias, E. F., Urtreger, A., Ladeda, V., Vidal, M. C., & Bal De Kier Joffe, E. 1996. Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J Surg Oncol*, 62(4): 288-297.

Alonso, D. F., Gabri, M. R., Guthmann, M. D., Fainboim, L., & Gomez, D. E. 1999. A novel hydrophobized GM3 ganglioside/Neisseria meningitidis outer-membrane- protein complex vaccine induces tumor protection in B16 murine melanoma. *Int J Oncol*, 15(1): 59-66.

Altheide, T. K., Hayakawa, T., Mikkelsen, T. S., Diaz, S., Varki, N., & Varki, A. 2006. System-wide genomic and biochemical comparisons of sialic acid biology among primates and rodents: Evidence for two modes of rapid evolution. *J Biol Chem*, 281(35): 25689-25702.

Alvarez-Rueda, N., Leprieur, S., Clemenceau, B., Supiot, S., Sebillé-Rivain, V., Faivre-Chauvet, A., Davodeau, F., Paris, F., Barbet, J., Aubry, J., & Birkle, S. 2007.

Binding activities and antitumor properties of a new mouse/human chimeric antibody specific for GD2 ganglioside antigen. *Clin Cancer Res*, 13(18 Pt 2): 5613s-5620s.

Aoki, T., Nomura, R., & Fujimoto, T. 1999. Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium. *Exp Cell Res*, 253(2): 629-636.

Ariga, T., McDonald, M. P., & Yu, R. K. 2008. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review. *J Lipid Res*, 49(6): 1157-1175.

Arpaia, E., Blaser, H., Quintela-Fandino, M., Duncan, G., Leong, H. S., Ablack, A., Nambiar, S. C., Lind, E. F., Silvester, J., Fleming, C. K., Rufini, A., Tusche, M. W., Brustle, A., Ohashi, P. S., Lewis, J. D., & Mak, T. W. 2012. The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of alpha5-integrin and the activation of Src, Ras and Erk. *Oncogene*, 31(7): 884-896.

Banchereau, J., & Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673): 245-252.

Bardor, M., Nguyen, D. H., Diaz, S., & Varki, A. 2005. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem*, 280(6): 4228-4237.

Barker, E., Mueller, B. M., Handgretinger, R., Herter, M., Yu, A. L., & Reisfeld, R. A. 1991. Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Res*, 51(1): 144-149.

Bassi, R., Chigorno, V., Fiorilli, A., Sonnino, S., & Tettamanti, G. 1991. Exogenous gangliosides GD1b and GD1b-lactone, stably associated to rat brain P2 subcellular fraction, modulate differently the process of protein phosphorylation. *J Neurochem*, 57(4): 1207-1211.

Bast, R. C., Jr., Badgwell, D., Lu, Z., Marquez, R., Rosen, D., Liu, J., Baggerly, K. A., Atkinson, E. N., Skates, S., Zhang, Z., Lokshin, A., Menon, U., Jacobs, I., & Lu, K. 2005. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer*, 15 Suppl 3: 274-281.

Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., & Corvaia, N. 2010. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol*, 10(5): 345-352.

Berzofsky, J. A., Terabe, M., & Wood, L. V. 2012. Strategies to use immune modulators in therapeutic vaccines against cancer. *Semin Oncol*, 39(3): 348-357.

Birkle, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R. K., & Aubry, J. 2003. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie*, 85(3-4): 455-463.

Bjerkvig, R., Engebraaten, O., Laerum, O. D., Fredman, P., Svennerholm, L., Vrionis, F. D., Wikstrand, C. J., & Bigner, D. D. 1991. Anti-GM2 monoclonal antibodies induce necrosis in GM2-rich cultures of a human glioma cell line. *Cancer Res*, 51(17): 4643-4648.

Black, P. H. 1980. Shedding from normal and cancer-cell surfaces. *N Engl J Med*, 303(24): 1415-1416.

Blanco, R., Blanco, D., Quintana, Y., Escobar, X., Rengifo, C. E., Osorio, M., Gutierrez, Z., Lamadrid, J., Cedeno, M., Frometa, M., Carr, A., & Rengifo, E. 2013. Immunoreactivity of the 14F7 Mab Raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Primary Lymphoid Tumors and Lymph Node Metastasis. *Patholog Res Int*, 2013: 920972.

Blanco, R., Rengifo, C. E., Cedeno, M., Frometa, M., Rengifo, E., & Carr, A. 2012.

Immunoreactivity of the 14F7 Mab (Raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside) as a Positive Prognostic Factor in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Patholog Res Int*, 2012: 235418.

Blanco, R., Rengifo, E., Cedeno, M., Rengifo, C. E., Alonso, D. F., & Carr, A. 2011a. Immunoreactivity of the 14F7 Mab Raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Epithelial Malignant Tumors from Digestive System. *ISRN Gastroenterol*, 2011a: 645641.

Blanco, R., Rengifo, E., Rengifo, C. E., Cedeno, M., Frometa, M., & Carr, A. 2011b. Immunohistochemical Reactivity of the 14F7 Monoclonal Antibody Raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Some Benign and Malignant Skin Neoplasms. *ISRN Dermatol*, 2011b: 848909.

Blix, G. 1936. Uber die kohlenhydratgruppen des submaxillaris mucins. *Z. Physiol. Chem*(240): 43-54.

Blixt, O., Bueti, D., Burford, B., Allen, D., Julien, S., Hollingsworth, M., Gammernan, A., Fentiman, I., Taylor-Papadimitriou, J., & Burchell, J. M. 2011. Autoantibodies to aberrantly glycosylated MUC1 in early stage breast cancer are associated with a better prognosis. *Breast Cancer Res*, 13(2): R25.

Boltin, D., & Niv, Y. 2013. Mucins in Gastric Cancer - An Update. *J Gastrointest Dig Syst*, 3(123): 15519.

Boyadzis, M., & Foon, K. A. 2008. Approved monoclonal antibodies for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 8(8): 1151-1158.

Bremer, E. G., Hakomori, S., Bowen-Pope, D. F., Raines, E., & Ross, R. 1984. Ganglioside-mediated modulation of cell growth, growth factor binding, and receptor phosphorylation. *J Biol Chem*, 259(11): 6818-6825.

Bremer, E. G., Schlessinger, J., & Hakomori, S. 1986. Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 261(5): 2434-2440.

Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G., & Golstein, P. 1987. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature*, 328(6127): 267-270.

Burmeister, B. H., Henderson, M. A., Ainslie, J., Fisher, R., Di Iulio, J., Smithers, B. M., Hong, A., Shannon, K., Scolyer, R. A., Carruthers, S., Coventry, B. J., Babington, S., Duprat, J., Hoekstra, H. J., & Thompson, J. F. 2012. Adjuvant radiotherapy versus observation alone for patients at risk of lymph-node field relapse after therapeutic lymphadenectomy for melanoma: a randomised trial. *Lancet Oncol*, 13(6): 589-597.

Cardama, G. A., Comin, M. J., Hornos, L., Gonzalez, N., Defelipe, L., Turjanski, A. G., Alonso, D. F., Gomez, D. E., & Menna, L. P. 2013. Preclinical development of novel Rac1-GEF signaling inhibitors using a rational design approach in highly aggressive breast cancer cell lines. *Anticancer Agents Med Chem*.

Carr, A., Mazorra, Z., Alonso, D. F., Mesa, C., Valiente, O., Gomez, D. E., Perez, R., & Fernandez, L. E. 2001. A purified GM3 ganglioside conjugated vaccine induces specific, adjuvant-dependent and non-transient antitumour activity against B16 mouse melanoma in vitro and in vivo. *Melanoma Res*, 11(3): 219-227.

Carr, A., Mullet, A., Mazorra, Z., Vazquez, A. M., Alfonso, M., Mesa, C., Rengifo, E., Perez, R., & Fernandez, L. E. 2000. A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma*,

19(3): 241-247.

Carr, A., Rodriguez, E., Arango Mdel, C., Camacho, R., Osorio, M., Gabri, M., Carrillo, G., Valdes, Z., Bebelagua, Y., Perez, R., & Fernandez, L. E. 2003. Immunotherapy of advanced breast cancer with a heterophilic ganglioside (NeuGcGM3) cancer vaccine. *J Clin Oncol*, 21(6): 1015-1021.

Carubia, J. M., Yu, R. K., Macala, L. J., Kirkwood, J. M., & Varga, J. M. 1984. Gangliosides of normal and neoplastic human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 120(2): 500-504.

Casadesus, A. V., Fernandez-Marrero, Y., Clavell, M., Gomez, J. A., Hernandez, T., Moreno, E., & Lopez-Requena, A. 2013. A shift from N-glycolyl- to N-acetyl-sialic acid in the GM3 ganglioside impairs tumor development in mouse lymphocytic leukemia cells. *Glycoconj J*, 30(7): 687-699.

Cerezo, A., Guadamillas, M. C., Goetz, J. G., Sanchez-Perales, S., Klein, E., Assoian, R. K., & del Pozo, M. A. 2009. The absence of caveolin-1 increases proliferation and anchorage- independent growth by a Rac-dependent, Erk- independent mechanism. *Mol Cell Biol*, 29(18): 5046-5059.

Chang, F., Li, R., & Ladisch, S. 1997. Shedding of gangliosides by human medulloblastoma cells. *Exp Cell Res*, 234(2): 341-346.

Chauhan, S. C., Vannatta, K., Ebeling, M. C., Vinayek, N., Watanabe, A., Pandey, K. K., Bell, M. C., Koch, M. D., Aburatani, H., Lio, Y., & Jaggi, M. 2009. Expression and functions of transmembrane mucin MUC13 in ovarian cancer. *Cancer Res*, 69(3): 765-774.

Cheever, M. A., Allison, J. P., Ferris, A. S., Finn, O. J., Hastings, B. M., Hecht, T. T., Mellman, I., Prindiville, S. A., Viner, J. L., Weiner, L. M., & Matrisian, L. M. 2009. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res*, 15(17): 5323-5337.

Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., & Old, L. J. 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5): 1914-1918.

Chou, H. H., Takematsu, H., Diaz, S., Iber, J., Nickerson, E., Wright, K. L., Muchmore, E. A., Nelson, D. L., Warren, S. T., & Varki, A. 1998. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20): 11751-11756.

Chu, J. W., & Sharom, F. J. 1995. Gangliosides interact with interleukin-4 and inhibit interleukin-4-stimulated helper T-cell proliferation. *Immunology*, 84(3): 396-403.

Chung, T. W., Kim, S. J., Choi, H. J., Kim, K. J., Kim, M. J., Kim, S. H., Lee, H. J., Ko, J. H., Lee, Y. C., Suzuki, A., & Kim, C. H. 2009. Ganglioside GM3 inhibits VEGF/VEGFR-2- mediated angiogenesis: direct interaction of GM3 with VEGFR-2. *Glycobiology*, 19(3): 229-239.

Cipolla, L., Peri, F., & Airolidi, C. 2008. Glycoconjugates in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 8(1): 92-121.

Clark, W. H., Jr., Elder, D. E., Guerry, D. t., Epstein, M. N., Greene, M. H., & Van Horn, M. 1984. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*, 15(12): 1147-1165.

Cohen, A. W., Razani, B., Wang, X. B., Combs, T. P., Williams, T. M., Scherer, P. E., & Lisanti, M. P. 2003. Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285(1): C222-235.

Coley, W. B. 1891. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg*, 14(3): 199-220.

Coley, W. B. 1910. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc R Soc Med*, 3(Surg Sect): 1-48.

Coppin, C., Porzsolt, F., Awa, A., Kumpf, J., Coldman, A., & Wilt, T. 2005. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD001425.

Coste, H., Martel, M. B., & Got, R. 1986. Topology of glucosylceramide synthesis in Golgi membranes from porcine submaxillary glands. *Biochim Biophys Acta*, 858(1): 6-12.

Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T., & Lisanti, M. P. 1997. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem*, 272(10): 6525-6533.

Crespo, F. A., Sun, X., Cripps, J. G., & Fernandez-Botran, R. 2006. The immunoregulatory effects of gangliosides involve immune deviation favoring type-2 T cell responses. *J Leukoc Biol*, 79(3): 586-595.

Crocker, P. R., Clark, E. A., Filbin, M., Gordon, S., Jones, Y., Kehrl, J. H., Kelm, S., Le Douarin, N., Powell, L., Roder, J., Schnaar, R. L., Sgroi, D. C., Stamenkovic, K., Schauer, R., Schachner, M., van den Berg, T. K., van der Merwe, P. A., Watt, S. M., & Varki, A. 1998. Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology*, 8(2): v.

Curran, K. J., Pegram, H. J., & Brentjens, R. J. 2012. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *J Gene Med*, 14(6): 405-415.

Curtin, J. A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H. N., Busam, K. J., Kutzner, H., Cho, K. H., Aiba, S., Brocker, E. B., LeBoit, P. E., Pinkel, D., & Bastian, B. C. 2005. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*, 353(20): 2135-2147.

Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R., & Futreal, P. A. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892): 949-954.

de Leon, J., Fernandez, A., Clavell, M., Labrada, M., Bebelagua, Y., Mesa, C., & Fernandez, L. E. 2008. Differential influence of the tumour-specific non-human sialic acid containing GM3 ganglioside on CD4+CD25- effector and naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells function. *Int Immunol*, 20(4): 591-600.

de Leon, J., Fernandez, A., Mesa, C., Clavel, M., & Fernandez, L. E. 2006. Role of

tumour-associated N-glycolylated variant of GM3 ganglioside in cancer progression: effect over CD4 expression on T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 55(4): 443-450.

De Libero, G., & Mori, L. 2005. Recognition of lipid antigens by T cells. *Nat Rev Immunol*, 5(6): 485-496.

Decker, T., Fischer, G., Bucke, W., Bucke, P., Stotz, F., Gruneberger, A., Gropp-Meier, M., Wiedemann, G., Pfeiffer, C., Peschel, C., & Gotze, K. 2012. Increased number of regulatory T cells (T-regs) in the peripheral blood of patients with Her-2/neu-positive early breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 138(11): 1945-1950.

Demetriou, M., Nabi, I. R., Coppolino, M., Dedhar, S., & Dennis, J. W. 1995. Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. *J Cell Biol*, 130(2): 383-392.

Deng, W., Li, R., Guerrero, M., Liu, Y., & Ladisch, S. 2002. Transfection of glucosylceramide synthase antisense inhibits mouse melanoma formation. *Glycobiology*, 12(3): 145-152.

Deng, W., Li, R., & Ladisch, S. 2000. Influence of cellular ganglioside depletion on tumor formation. *J Natl Cancer Inst*, 92(11): 912-917.

Dennis, K. L., Blatner, N. R., Gounari, F., & Khazaie, K. 2013. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr Opin Oncol*, 25(6): 637-645.

Diaz, Y., Gonzalez, A., Lopez, A., Perez, R., Vazquez, A. M., & Montero, E. 2009. Anti-ganglioside anti-idiotypic monoclonal antibody-based cancer vaccine induces apoptosis and antiangiogenic effect in a metastatic lung carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 58(7): 1117-1128.

Dippold, W. G., Knuth, A., & Meyer zum Buschenfelde, K. H. 1984. Inhibition of human melanoma cell growth in vitro by monoclonal anti-GD3-ganglioside antibody. *Cancer Res*, 44(2): 806-810.

Donta, S. T. 1976. Interactions of cholera toxin and GM1 ganglioside with enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in cultured adrenal cells. *J Infect Dis*, 133 Suppl: 115-119.

Dubois, C., Magnani, J. L., Grunwald, G. B., Spitalnik, S. L., Trisler, G. D., Nirenberg, M., & Ginsburg, V. 1986. Monoclonal antibody 18B8, which detects synapse-associated antigens, binds to ganglioside GT3 (II3 (NeuAc)3LacCer). *J Biol Chem*, 261(8): 3826-3830.

Duchemin, A. M., Ren, Q., Neff, N. H., & Hadjiconstantinou, M. 2008. GM1- induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors. *J Neurochem*, 104(6): 1466-1477.

Dunki-Jacobs, E. M., Callender, G. G., & McMasters, K. M. 2013. Current management of melanoma. *Curr Probl Surg*, 50(8): 351-382.

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

Durrant, L. G., Noble, P., & Spendlove, I. 2012. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: glycolipids as targets for tumour immunotherapy. *Clin Exp Immunol*, 167(2): 206-215.

Echarri, A., & Del Pozo, M. A. 2012. Caveolae. *Curr Biol*, 22(4): R114-116.

Eggermont, A. M., Suci, S., Rutkowski, P., Marsden, J., Santinami, M., Corrie, P., Aamdal, S., Ascierto, P. A., Patel, P. M., Kruit, W. H., Bastholt, L., Borgognoni, L., Bernengo, M. G., Davidson, N., Polders, L., Praet, M., & Spatz, A. 2013. Adjuvant Ganglioside GM2-KLH/QS-21 Vaccination Versus Observation After Resection of Primary Tumor > 1.5 mm in Patients With Stage II Melanoma: Results of the EORTC 18961 Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*, 31(30): 3831-3837.

Eisenbach, L., Hollander, N., Greenfield, L., Yakor, H., Segal, S., & Feldman, M. 1984. The differential expression of H-2K versus H-2D antigens, distinguishing high-metastatic from low-metastatic clones, is correlated with the immunogenic properties of the tumor cells. *Int J Cancer*, 34(4): 567-573.

Eshhar, Z. 1997. Tumor-specific T-bodies: towards clinical application. *Cancer Immunol Immunother*, 45(3-4): 131-136.

Estevez, F., Carr, A., Solorzano, L., Valiente, O., Mesa, C., Barroso, O., Sierra, G. V., & Fernandez, L. E. 1999. Enhancement of the immune response to poorly immunogenic gangliosides after incorporation into very small size proteoliposomes (VSSP). *Vaccine*, 18(1-2): 190-197.

Farooqui, T., Franklin, T., Pearl, D. K., & Yates, A. J. 1997. Ganglioside GM1 enhances induction by nerve growth factor of a putative dimer of TrkA. *J Neurochem*, 68(6): 2348-2355.

Favaron, M., Manev, H., Alho, H., Bertolino, M., Ferret, B., Guidotti, A., & Costa, E. 1988. Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(19): 7351-7355.

Fernandez, L. E., Gabri, M. R., Guthmann, M. D., Gomez, R. E., Gold, S., Fainboim, L., Gomez, D. E., & Alonso, D. F. 2010. NGcGM3 ganglioside: a privileged target for cancer vaccines. *Clin Dev Immunol*, 2010: 814397.

Ferrari, G., Anderson, B. L., Stephens, R. M., Kaplan, D. R., & Greene, L. A. 1995. Prevention of apoptotic neuronal death by GM1 ganglioside. Involvement of Trk neurotrophin receptors. *J Biol Chem*, 270(7): 3074-3080.

Ferrari, G., Batistatou, A., & Greene, L. A. 1993. Gangliosides rescue neuronal cells from death after trophic factor deprivation. *J Neurosci*, 13(5): 1879-1887.

Fidler, I. J. 1975. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res*, 35(1): 218-224.

Finn, O. J. 2012. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol*, 23 Suppl 8: viii6-9.

Finn, O. J., Gantt, K. R., Lepisto, A. J., Pejawar-Gaddy, S., Xue, J., & Beatty, P. L. 2011. Importance of MUC1 and spontaneous mouse tumor models for understanding the immunobiology of human adenocarcinomas. *Immunol Res*, 50(2-3): 261-268.

Fragaki, K., Ait-El-Mkadem, S., Chaussonot, A., Gire, C., Mengual, R., Bonesso, L., Beneteau, M., Ricci, J. E., Desquiere-Dumas, V., Procaccio, V., Rotig, A., & Paquis-Flucklinger, V. 2013. Refractory epilepsy and mitochondrial dysfunction due to GM3 synthase deficiency. *Eur J Hum Genet*, 21(5): 528-534.

Fredman, P., Hedberg, K., & Brezicka, T. 2003. Gangliosides as therapeutic targets for cancer. *BioDrugs*, 17(3): 155-167.

Frost, J. D., Hank, J. A., Reaman, G. H., Friedrich, S., Seeger, R. C., Gan, J.,

Anderson, P. M., Ettinger, L. J., Cairo, M. S., Blazar, B. R., Krailo, M. D., Matthay, K. K., Reisfeld, R. A., & Sondel, P. M. 1997. A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group. *Cancer*, 80(2): 317-333.

Fuentes, D., Avellanet, J., Garcia, A., Iglesias, N., Gabri, M. R., Alonso, D. F., Vazquez, A. M., Perez, R., & Montero, E. 2010. Combined therapeutic effect of a monoclonal anti-idiotypic tumor vaccine against NeuGc-containing gangliosides with chemotherapy in a breast carcinoma model. *Breast Cancer Res Treat*, 120(2): 379-389.

Fujii, Y., Higashi, H., Ikuta, K., Kato, S., & Naiki, M. 1982. Specificities of human heterophilic Hanganutziu and Deicher (H-D) antibodies and avian antisera against H-D antigen-active glycosphingolipids. *Mol Immunol*, 19(1): 87-94.

Furukawa, K., Yamaguchi, H., Oettgen, H. F., Old, L. J., & Lloyd, K. O. 1989. Two human monoclonal antibodies reacting with the major gangliosides of human melanomas and comparison with corresponding mouse monoclonal antibodies. *Cancer Res*, 49(1): 191-196.

Gabri, M. R., Mazorra, Z., Ripoll, G. V., Mesa, C., Fernandez, L. E., Gomez, D. E., & Alonso, D. F. 2006. Complete antitumor protection by perioperative immunization with GM3/VSSP vaccine in a preclinical mouse melanoma model. *Clin Cancer Res*, 12(23): 7092-7098.

Gabri, M. R., Otero, L. L., Gomez, D. E., & Alonso, D. F. 2009. Exogenous incorporation of neugc-rich mucin augments n-glycolyl sialic acid content and promotes malignant phenotype in mouse tumor cell lines. *J Exp Clin Cancer Res*, 28: 146.

Gabri, M. R., Ripoll, G. V., Alonso, D. F., & Gomez, D. E. 2002. Role of cell surface GM3 ganglioside and sialic acid in the antitumor activity of a GM3-based vaccine in the murine B16 melanoma model. *J Cancer Res Clin Oncol*, 128(12): 669-677.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoue, F., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., & Pages, F. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313(5795): 1960-1964.

Garland, S. M., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Harper, D. M., Leodolter, S., Tang, G. W., Ferris, D. G., Steben, M., Bryan, J., Taddeo, F. J., Railkar, R., Esser, M. T., Sings, H. L., Nelson, M., Boslego, J., Sattler, C., Barr, E., & Koutsky, L. A. 2007. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med*, 356(19): 1928-1943.

Gillis, S., Baker, P. E., Ruscetti, F. W., & Smith, K. A. 1978. Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. *J Exp Med*, 148(4): 1093-1098.

Glick, M. C. 1979. Membrane glycopeptides from virus-transformed hamster fibroblasts and the normal counterpart. *Biochemistry*, 18(12): 2525-2532.

Gogas, H., Polyzos, A., & Kirkwood, J. 2013. Immunotherapy for advanced melanoma: fulfilling the promise. *Cancer Treat Rev*, 39(8): 879-885.

Golay, J., & Introna, M. 2012. Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays. *Arch Biochem Biophys*, 526(2): 146-153.

Grayson, G., & Ladisch, S. 1992. Immunosuppression by human gangliosides. II. Carbohydrate structure and inhibition of human NK activity. *Cell Immunol*, 139(1): 18-29.

Greaves, M., & Maley, C. C. 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381): 306-313.

Guan, F., Handa, K., & Hakomori, S. I. 2011. Regulation of epidermal growth factor receptor through interaction of ganglioside GM3 with GlcNAc of N-linked glycan of the receptor: demonstration in Id1D cells. *Neurochem Res*, 36(9): 1645-1653.

Guo, H. B., Zhang, Y., & Chen, H. L. 2001. Relationship between metastasis-associated phenotypes and N-glycan structure of surface glycoproteins in human hepatocarcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 127(4): 231-236.

Gustavsson, J., Parpal, S., Karlsson, M., Ramsing, C., Thorn, H., Borg, M., Lindroth, M., Peterson, K. H., Magnusson, K. E., & Stralfors, P. 1999. Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J*, 13(14): 1961-1971.

Guthmann, M. D., Bitton, R. J., Carnero, A. J., Gabri, M. R., Cinat, G., Koliren, L., Lewi, D., Fernandez, L. E., Alonso, D. F., Gomez, D. E., & Fainboim, L. 2004. Active specific immunotherapy of melanoma with a GM3 ganglioside-based vaccine: a report on safety and immunogenicity. *J Immunother*, 27(6): 442-451.

Hakomori, S. 1981. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem*, 50: 733-764.

Hakomori, S. 1985. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res*, 45(6): 2405-2414.

Hakomori, S. 1996. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res*, 56(23): 5309-5318.

Hakomori, S. 2002. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(16): 10231-10233.

Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S., & Prinetti, A. 1998. New insights in glycosphingolipid function: "glycosignaling domain," a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules, involved in cell adhesion coupled with signaling. *Glycobiology*, 8(10): xi-xix.

Hakomori, S., & Igarashi, Y. 1993. Gangliosides and glycosphingolipids as modulators of cell growth, adhesion, and transmembrane signaling. *Adv Lipid Res*, 25: 147-162.

Hakomori, S. I. 2000. Cell adhesion/recognition and signal transduction through glycosphingolipid microdomain. *Glycoconj J*, 17(3 -4): 143-151.

Hakomori, S. I. 2010. Glycosynaptic microdomains controlling tumor cell phenotype through alteration of cell growth, adhesion, and motility. *FEBS Lett*, 584(9): 1901-1906.
232.

Hak
omor
i Si,
S. I.
2002

.
The
glyc
osyn
apse

.
Proc
Natl
Acad
Sci
U S
A,
99(1
):
225-

Hamilton, W. B., Helling, F., Lloyd, K. O., & Livingston, P. O. 1993. Ganglioside expression on human malignant melanoma assessed by quantitative immune thin-layer chromatography. *Int J Cancer*, 53(4): 566-573.

Hanai, N., Nores, G. A., MacLeod, C., Torres-Mendez, C. R., & Hakomori, S. 1988. Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 and lyso-GM3 in tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 263(22): 10915-10921.

Handa, K., & Hakomori, S. I. 2012. Carbohydrate to carbohydrate interaction in development process and cancer progression. *Glycoconj J*, 29(8-9): 627-637.

Hanibuchi, M., Nishioka, Y., Yanagawa, H., Yano, S., Parajuli, P., Bando, M., & Sone, S. 2000. Human interferon-gamma enhances expression of ganglioside GM2 on human lung cancer cells and their susceptibility for antiganglioside GM2 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Oncol Res*, 12(4): 173-179.

Hao, Q., Saida, T., Kuroki, S., Nishimura, M., Nukina, M., Obayashi, H., & Saida, K. 1998. Antibodies to gangliosides and galactocerebroside in patients with Guillain-Barre syndrome with preceding *Campylobacter jejuni* and other identified infections. *J Neuroimmunol*, 81(1-2): 116-126.

Harris, A. L. 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2(1): 38-47.

Hattrup, C. L., & Gendler, S. J. 2008. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol*, 70: 431-457.

Hayashi, N., Chiba, H., Kuronuma, K., Go, S., Hasegawa, Y., Takahashi, M., Gasa, S., Watanabe, A., Hasegawa, T., Kuroki, Y., Inokuchi, J., & Takahashi, H. 2013. Detection of N-glycosylated gangliosides in non-small-cell lung cancer using GMR8 monoclonal antibody. *Cancer Sci*, 104(1): 43-47.

Hedlund, M., Tangvoranuntakul, P., Takematsu, H., Long, J. M., Housley, G. D., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Wynshaw-Boris, A., Ryan, A. F., Gallo, R. L., Varki, N., & Varki, A. 2007. N-glycolylneuraminic acid deficiency in mice: implications for human biology and evolution. *Mol Cell Biol*, 27(12): 4340-4346.

Heimburg-Molinaro, J., Lum, M., Vijay, G., Jain, M., Almogren, A., & Rittenhouse-Olson, K. 2011. Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. *Vaccine*, 29(48): 8802-8826.

Helling, F., Shang, A., Calves, M., Zhang, S., Ren, S., Yu, R. K., Oettgen, H. F., & Livingston, P. O. 1994. GD3 vaccines for melanoma: superior immunogenicity of keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines. *Cancer Res*, 54(1): 197-203.

Helling, F., Zhang, S., Shang, A., Adluri, S., Calves, M., Koganty, R., Longenecker, B. M., Yao, T. J., Oettgen, H. F., & Livingston, P. O. 1995. GM2-KLH conjugate vaccine: increased immunogenicity in melanoma patients after administration with immunological adjuvant QS-21. *Cancer Res*, 55(13): 2783-2788.

Hemler, M. E. 1998. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 10(5): 578-585.

Hernandez, A. M., Rodriguez, M., Lopez-Requena, A., Beausoleil, I., Perez, R., & Vazquez, A. M. 2005. Generation of anti-Neu-glycolyl-ganglioside antibodies by immunization with an anti-idiotypic monoclonal antibody: A self versus non-self-matter. *Immunobiology*, 210(1): 11-21.

Hernandez, A. M., Rodriguez, N., Gonzalez, J. E., Reyes, E., Rondon, T., Grinan, T., Macias, A., Alfonso, S., Vazquez, A. M., & Perez, R. 2011. Anti-NeuGcGM3 antibodies, actively elicited by idiotypic vaccination in nonsmall cell lung cancer patients, induce tumor cell death by an oncosis-like mechanism. *J Immunol*, 186(6): 3735-3744.

Hernandez, A. M., Toledo, D., Martinez, D., Grinan, T., Brito, V., Macias, A., Alfonso, S., Rondon, T., Suarez, E., Vazquez, A. M., & Perez, R. 2008. Characterization of the antibody response against NeuGcGM3 ganglioside elicited in non-small cell lung cancer patients immunized with an anti-idiotypic antibody. *J Immunol*, 181(9): 6625-6634.

Hevey, R., & Ling, C. C. 2012. Recent advances in developing synthetic carbohydrate-based vaccines for cancer immunotherapies. *Future Med Chem*, 4(4): 545-584.

Higa, H. H., & Paulson, J. C. 1985. Sialylation of glycoprotein oligosaccharides with N-acetyl-, N-glycolyl-, and N-O-diacylneuraminic acids. *J Biol Chem*, 260(15): 8838-8849.

Higashi, H., Naiki, M., Matuo, S., & Okouchi, K. 1977. Antigen of "serum sickness" type of heterophile antibodies in human sera: indentification as gangliosides with N-glycolylneuraminic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 79(2): 388-395.

Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A., & Urba, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363(8): 711-723.

Houston, A., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., & O'Connell, J. 2003. Fas ligand mediates immune privilege and not inflammation in human colon cancer, irrespective of TGF-beta expression. *Br J Cancer*, 89(7): 1345-1351.

Huang, X., Li, Y., Zhang, J., Xu, Y., Tian, Y., & Ma, K. 2013. Ganglioside GM3 inhibits hepatoma cell motility via down-regulating activity of EGFR and PI3K/AKT signaling pathway. *J Cell Biochem*, 114(7): 1616-1624.

Hurwitz, A. A., Foster, B. A., Kwon, E. D., Truong, T., Choi, E. M., Greenberg, N. M., Burg, M. B., & Allison, J. P. 2000. Combination immunotherapy of primary prostate cancer in a transgenic mouse model using CTLA-4 blockade. *Cancer Res*, 60(9): 2444-2448.

Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., & Nakachi, K. 2000. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*, 356(9244): 1795-1799.

Ingle, E. 2008. Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1784(1): 56-65.

Inokuchi, J., Jimbo, M., Kumamoto, Y., Shimeno, H., & Nagamatsu, A. 1993. Expression of ganglioside GM3 and H-2 antigens in clones with different metastatic and

growth potentials isolated from Lewis lung carcinoma (3LL) cell line. *Clin Exp Metastasis*, 11(1): 27-36.

Inokuchi, J., Jimbo, M., Momosaki, K., Shimeno, H., Nagamatsu, A., & Radin, N. S. 1990. Inhibition of experimental metastasis of murine Lewis lung carcinoma by an inhibitor of glucosylceramide synthase and its possible mechanism of action. *Cancer Res*, 50(20): 6731-6737.

Inokuchi, J. I., Uemura, S., Kabayama, K., & Igarashi, Y. 2000. Glycosphingolipid deficiency affects functional microdomain formation in Lewis lung carcinoma cells. *Glycoconj J*, 17(3-4): 239-245.

Irie, A., Koyama, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., & Suzuki, A. 1998. The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans. *J Biol Chem*, 273(25): 15866-15871.

Ito, A., Handa, K., Withers, D. A., Satoh, M., & Hakomori, S. 2001. Binding specificity of siglec7 to disialogangliosides of renal cell carcinoma: possible role of disialogangliosides in tumor progression. *FEBS Lett*, 504(1-2): 82-86.

Ito, F., & Chang, A. E. 2013. Cancer immunotherapy: current status and future directions. *Surg Oncol Clin N Am*, 22(4): 765-783.

Iwabuchi, K., Handa, K., & Hakomori, S. 1998a. Separation of "glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. *J Biol Chem*, 273(50): 33766-33773.

Iwabuchi, K., Yamamura, S., Prinetti, A., Handa, K., & Hakomori, S. 1998b. GM3-enriched microdomain involved in cell adhesion and signal transduction through carbohydrate-carbohydrate interaction in mouse melanoma B16 cells. *J Biol Chem*, 273(15): 9130-9138.

Iwabuchi, K., Zhang, Y., Handa, K., Withers, D. A., Sinay, P., & Hakomori, S. 2000. Reconstitution of membranes simulating "glycosignaling domain" and their susceptibility to lyso-GM3. *J Biol Chem*, 275(20): 15174-15181.

Jacobs, B. C., van Doorn, P. A., Schmitz, P. I., Tio-Gillen, A. P., Herbrink, P., Visser, L. H., Hooijkass, H., & van der Meche, F. G. 1996. *Campylobacter jejuni* infections and anti-GM1 antibodies in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, 40(2): 181-187.

Jain, M. K., & White, H. B., 3rd. 1977. Long-range order in biomembranes. *Adv Lipid Res*, 15: 1-60.

Jeckel, D., Karrenbauer, A., Burger, K. N., van Meer, G., & Wieland, F. 1992. Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J Cell Biol*, 117(2): 259-267.

Ji, H., Houghton, A. M., Mariani, T. J., Perera, S., Kim, C. B., Padera, R., Tonon, G., McNamara, K., Marconcini, L. A., Hezel, A., El-Bardeesy, N., Bronson, R. T., Sugarbaker, D., Maser, R. S., Shapiro, S. D., & Wong, K. K. 2006. K-ras activation generates an inflammatory response in lung tumors. *Oncogene*, 25(14): 2105-2112.

Jobling, M. G., Yang, Z., Kam, W. R., Lencer, W. I., & Holmes, R. K. 2012. A single native ganglioside GM1-binding site is sufficient for cholera toxin to bind to cells and complete the intoxication pathway. *MBio*, 3(6).

Joura, E. A., Leodolter, S., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G.,

Koutsky, L. A., Garland, S. M., Harper, D. M., Tang, G. W., Ferris, D. G., Steben, M., Jones, R. W., Bryan, J., Taddeo, F. J., Bautista, O. M., Esser, M. T., Sings, H. L., Nelson, M., Boslego, J. W., Sattler, C., Barr, E., & Paavonen, J. 2007. Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet*, 369(9574): 1693-1702.

Ju, T., Wang, Y., Aryal, R. P., Lehoux, S. D., Ding, X., Kudelka, M. R., Cutler, C., Zeng, J., Wang, J., Sun, X., Heimbürg-Molinaro, J., Smith, D. F., & Cummings, R. D. 2013. Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers. *Proteomics Clin Appl*.

Kabayama, K., Sato, T., Kitamura, F., Uemura, S., Kang, B. W., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. 2005. TNF α -induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: involvement of ganglioside GM3. *Glycobiology*, 15(1): 21-29.

Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Loberto, N., Prinetti, A., Sonnino, S., Kinjo, M., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. 2007. Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(34): 13678-13683.

Kanavy, H. E., & Gerstenblith, M. R. 2011. Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin Cutan Med Surg*, 30(4): 222-228.

Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., Redfern, C. H., Ferrari, A. C., Dreicer, R., Sims, R. B., Xu, Y., Frohlich, M. W., & Schellhammer, P. F. 2010. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*, 363(5): 411-422.

Kao, H., Amoscato, A. A., Ciborowski, P., & Finn, O. J. 2001. A new strategy for tumor antigen discovery based on in vitro priming of naive T cells with dendritic cells. *Clin Cancer Res*, 7(3 Suppl): 773s-780s.

Karlsson, K. A. 1989. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu Rev Biochem*, 58: 309-350.

Kawakami, Y., Kawakami, K., Steelant, W. F., Ono, M., Baek, R. C., Handa, K., Withers, D. A., & Hakomori, S. 2002. Tetraspanin CD9 is a "proteolipid," and its interaction with α 3 integrin in microdomain is promoted by GM3 ganglioside, leading to inhibition of laminin-5-dependent cell motility. *J Biol Chem*, 277(37): 34349-34358.

Kawano, T., Koyama, S., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Kawasaki, H., Kawashima, S., Kawasaki, T., & Suzuki, A. 1995. Molecular cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase. Regulation of species- and tissue-specific expression of N-glycolylneuraminic acid. *J Biol Chem*, 270(27): 16458-16463.

Kawano, T., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., & Suzuki, A. 1994. Biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid-containing glycoconjugates. Purification and characterization of the key enzyme of the cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylation system. *J Biol Chem*, 269(12): 9024-9029.

Khatib, A. M., Kontogiannea, M., Fallavollita, L., Jamison, B., Meterissian, S., & Brodt, P. 1999. Rapid induction of cytokine and E-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res*, 59(6): 1356-1361.

Kikushige, Y., Shima, T., Takayanagi, S., Urata, S., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Takenaka, K., Teshima, T., Tanaka, T., Inagaki, Y., & Akashi, K. 2010. TIM-3 is a

promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*, 7(6): 708-717.

Kirkwood, J. M., Mascari, R. A., Edington, H. D., Rabkin, M. S., Day, R. S., Whiteside, T. L., Vlock, D. R., & Shipe-Spotloe, J. M. 2000. Analysis of therapeutic and immunologic effects of R(24) anti-GD3 monoclonal antibody in 37 patients with metastatic melanoma. *Cancer*, 88(12): 2693-2702.

Klenk, E. 1937. Die Fettstoffe des Gehirns bei Amaurotischer Idiotie und Niemann-Pick'scher Krankheit. *Ber Ges Physiol* 659-660.

Klenk, E. 1939. Niemann-Pick'sche Krankheit und Amaurotische Idiotie. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*: 128-143.

Klenk, E. 1941. Neuraminsäure, das sapltproduct eines neuen gehirnlipoids. *Z. Physiol. Chem.* (268): 50-58.

Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J., & Schreiber, R. D. 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450(7171): 903-907.

Kohler, G., & Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517): 495-497.

Kohrt, H. E., Nouri, N., Nowels, K., Johnson, D., Holmes, S., & Lee, P. P. 2005. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Med*, 2(9): e284.

Kojima, N., & Hakomori, S. 1991. Cell adhesion, spreading, and motility of GM3-expressing cells based on glycolipid-glycolipid interaction. *J Biol Chem*, 266(26): 17552-17558.

Kojima, N., Shiota, M., Sadahira, Y., Handa, K., & Hakomori, S. 1992. Cell adhesion in a dynamic flow system as compared to static system. Glycosphingolipid-glycosphingolipid interaction in the dynamic system predominates over lectin- or integrin-based mechanisms in adhesion of B16 melanoma cells to non-activated endothelial cells. *J Biol Chem*, 267(24): 17264-17270.

Kolter, T., Proia, R. L., & Sandhoff, K. 2002. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem*, 277(29): 25859-25862.

Komatsu, M., Tatum, L., Altman, N. H., Carothers Carraway, C. A., & Carraway, K. L. 2000. Potentiation of metastasis by cell surface sialomucin complex (rat MUC4), a multifunctional anti-adhesive glycoprotein. *Int J Cancer*, 87(4): 480-486.

Koochekpour, S., Merzak, A., & Pilkington, G. J. 1996. Vascular endothelial growth factor production is stimulated by gangliosides and TGF-beta isoforms in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett*, 102(1-2): 209-215.

Kotani, M., Kawashima, I., Ozawa, H., Terashima, T., & Tai, T. 1993. Differential distribution of major gangliosides in rat central nervous system detected by specific monoclonal antibodies. *Glycobiology*, 3(2): 137-146.

Kozutsumi, Y., Kawano, T., Yamakawa, T., & Suzuki, A. 1990. Participation of cytochrome b5 in CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylation in mouse liver cytosol. *J Biochem*, 108(5): 704-706.

Kramer, K., Humm, J. L., Souweidane, M. M., Zanzonico, P. B., Dunkel, I. J., Gerald, W. L., Khakoo, Y., Yeh, S. D., Yeung, H. W., Finn, R. D., Wolden, S. L., Larson, S.

M., & Cheung, N. K. 2007. Phase I study of targeted radioimmunotherapy for leptomeningeal cancers using intra-Ommaya 131-I-3F8. *J Clin Oncol*, 25(34): 5465-5470.

Kramer, K., Kushner, B., Heller, G., & Cheung, N. K. 2001. Neuroblastoma metastatic to the central nervous system. The Memorial Sloan-kettering Cancer Center Experience and A Literature Review. *Cancer*, 91(8): 1510-1519.

Krengel, U., Olsson, L. L., Martinez, C., Talavera, A., Rojas, G., Mier, E., Angstrom, J., & Moreno, E. 2004. Structure and molecular interactions of a unique antitumor antibody specific for N-glycolyl GM3. *J Biol Chem*, 279(7): 5597-5603.

Krug, L. M., Ragupathi, G., Hood, C., Kris, M. G., Miller, V. A., Allen, J. R., Keding, S. J., Danishefsky, S. J., Gomez, J., Tyson, L., Pizzo, B., Baez, V., & Livingston, P. O. 2004. Vaccination of patients with small-cell lung cancer with synthetic fucosyl GM-1 conjugated to keyhole limpet hemocyanin. *Clin Cancer Res*, 10(18 Pt 1): 6094-6100.

Kusmartsev, S., Nagaraj, S., & Gibrilovich, D. I. 2005. Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol*, 175(7): 4583-4592.

Labrada, M., Clavell, M., Bebelagua, Y., Leon, J., Alonso, D. F., Gabri, M. R., Veloso, R. C., Verez, V., & Fernandez, L. E. 2010. Direct validation of NGcGM3 ganglioside as a new target for cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*, 10(2): 153-162.

Ladisch, S. 1987a. Tumor cell gangliosides. *Adv Pediatr*, 34: 45-58.

Ladisch, S., Becker, H., & Ulsh, L. 1992. Immunosuppression by human gangliosides: I. Relationship of carbohydrate structure to the inhibition of T cell responses. *Biochim Biophys Acta*, 1125(2): 180-188.

Ladisch, S., Kitada, S., & Hays, E. F. 1987b. Gangliosides shed by tumor cells enhance tumor formation in mice. *J Clin Invest*, 79(6): 1879-1882.

Ladisch, S., Li, R., & Olson, E. 1994. Ceramide structure predicts tumor ganglioside immunosuppressive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(5): 1974-1978.

Ladisch, S., Ulsh, L., Gillard, B., & Wong, C. 1984. Modulation of the immune response by gangliosides. Inhibition of adherent monocyte accessory function in vitro. *J Clin Invest*, 74(6): 2074-2081.

Ladisch, S., Wu, Z. L., Feig, S., Ulsh, L., Schwartz, E., Floutsis, G., Wiley, F., Lenarsky, C., & Seeger, R. 1987c. Shedding of GD2 ganglioside by human neuroblastoma. *Int J Cancer*, 39(1): 73-76.

Lannert, H., Bunning, C., Jeckel, D., & Wieland, F. T. 1994. Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus. *FEBS Lett*, 342(1): 91-96.

Lee, H., Woodman, S. E., Engelman, J. A., Volonte, D., Galbiati, F., Kaufman, H. L., Lublin, D. M., & Lisanti, M. P. 2001. Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine kinase: targeting of dually acylated molecules (GPI-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (TYR-14). *J Biol Chem*, 276(37): 35150-35158.

Li, S., Seitz, R., & Lisanti, M. P. 1996. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem*, 271(7): 3863-3868.

Lin, Y. C., Mahalingam, J., Chiang, J. M., Su, P. J., Chu, Y. Y., Lai, H. Y., Fang, J.

H., Huang, C. T., Chiu, C. T., & Lin, C. Y. 2013. Activated but not resting regulatory T cells accumulated in tumor microenvironment and correlated with tumor progression in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*, 132(6): 1341-1350.

Liu, P., Ying, Y., Ko, Y. G., & Anderson, R. G. 1996. Localization of platelet- derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J Biol Chem*, 271(17): 10299-10303.

Liu, V. C., Wong, L. Y., Jang, T., Shah, A. H., Park, I., Yang, X., Zhang, Q., Lonning, S., Teicher, B. A., & Lee, C. 2007. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol*, 178(5): 2883-2892.

Livingston, P. O., Wong, G. Y., Adluri, S., Tao, Y., Padavan, M., Parente, R., Hanlon, C., Calves, M. J., Helling, F., Ritter, G., & et al. 1994. Improved survival in stage III melanoma patients with GM2 antibodies: a randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside. *J Clin Oncol*, 12(5): 1036-1044.

Lo, Y. L., Leoh, T. H., Dan, Y. F., Lim, L. L., Seah, A., Fook-Chong, S., & Ratnagopal, P. 2006. Presynaptic neuromuscular transmission defect in the Miller Fisher syndrome. *Neurology*, 66(1): 148-149.

Machado, Y. J., Rabasa, Y., Montesinos, R., Cremata, J., Besada, V., Fuentes, D., Castillo, A., de la Luz, K. R., Vazquez, A. M., & Himly, M. 2011. Physicochemical and biological characterization of 1E10 anti-idiotypic vaccine. *BMC Biotechnol*, 11: 112.

Malykh, Y. N., Schauer, R., & Shaw, L. 2001. N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie*, 83(7): 623-634.

Manfredi, M. G., Lim, S., Claffey, K. P., & Seyfried, T. N. 1999. Gangliosides influence angiogenesis in an experimental mouse brain tumor. *Cancer Res*, 59(20): 5392-5397.

Markwell, M. A., Svennerholm, L., & Paulson, J. C. 1981. Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(9): 5406-5410.

Marquina, G., Waki, H., Fernandez, L. E., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., Perez, R., & Ando, S. 1996. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res*, 56(22): 5165-5171.

Martin, K. H., Slack, J. K., Boerner, S. A., Martin, C. C., & Parsons, J. T. 2002. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science*, 296(5573): 1652-1653.

Massa, P. T. 1993. Specific suppression of major histocompatibility complex class I and class II genes in astrocytes by brain-enriched gangliosides. *J Exp Med*, 178(4): 1357-1363.

Mastick, C. C., Brady, M. J., & Saltiel, A. R. 1995. Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J Cell Biol*, 129(6): 1523-1531.

Mazorra, Z., Mesa, C., Fernandez, A., & Fernandez, L. E. 2008. Immunization with a GM3 ganglioside nanoparticulated vaccine confers an effector CD8(+) T cells-mediated protection against melanoma B16 challenge. *Cancer Immunol Immunother*, 57(12): 1771-1780.

McKallip, R., Li, R., & Ladisch, S. 1999. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J Immunol*, 163(7): 3718-3726.

McMahon, B. J., Bruden, D. L., Petersen, K. M., Bulkow, L. R., Parkinson, A. J.,

Nainan, O., Khristova, M., Zanis, C., Peters, H., & Margolis, H. S. 2005. Antibody levels and protection after hepatitis B vaccination: results of a 15-year follow-up. *Ann Intern Med*, 142(5): 333-341.

Meier, F., Busch, S., Gast, D., Goppert, A., Altevogt, P., Maczey, E., Riedle, S., Garbe, C., & Schitteck, B. 2006. The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression. *Int J Cancer*, 119(3): 549-555.

Melnikova, V. O., Villares, G. J., & Bar-Eli, M. 2008. Emerging roles of PAR-1 and PAFR in melanoma metastasis. *Cancer Microenviron*, 1(1): 103-111.

Merrick, J. M., Zadarlik, K., & Milgrom, F. 1978. Characterization of the Hanganutziu-Deicher (serum-sickness) antigen as gangliosides containing n-glycolylneuraminic acid. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 57(5): 477-480.

Mesa, C., de Leon, J., & Fernandez, L. E. 2006. Very small size proteoliposomes derived from *Neisseria meningitidis*: An effective adjuvant for generation of CTL responses to peptide and protein antigens. *Vaccine*, 24(14): 2692-2699.

Mesa, C., De Leon, J., Rigley, K., & Fernandez, L. E. 2004. Very small size proteoliposomes derived from *Neisseria meningitidis*: an effective adjuvant for Th1 induction and dendritic cell activation. *Vaccine*, 22(23-24): 3045-3052.

Mesa, C., & Fernandez, L. E. 2004. Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol*, 82(6): 644-650.

Meuillet, E. J., Kroes, R., Yamamoto, H., Warner, T. G., Ferrari, J., Mania-Farnell, B., George, D., Rebbaa, A., Moskal, J. R., & Bremer, E. G. 1999. Sialidase gene transfection enhances epidermal growth factor receptor activity in an epidermoid carcinoma cell line, A431. *Cancer Res*, 59(1): 234-240.

Miljan, E. A., Meuillet, E. J., Mania-Farnell, B., George, D., Yamamoto, H., Simon, H. G., & Bremer, E. G. 2002. Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. *J Biol Chem*, 277(12): 10108-10113.

Mineo, C., James, G. L., Smart, E. J., & Anderson, R. G. 1996. Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J Biol Chem*, 271(20): 11930-11935.

Mitsuzuka, K., Handa, K., Satoh, M., Arai, Y., & Hakomori, S. 2005. A specific microdomain ("glycosynapse 3") controls phenotypic conversion and reversion of bladder cancer cells through GM3-mediated interaction of alpha3beta1 integrin with CD9. *J Biol Chem*, 280(42): 35545-35553.

Miura, Y., Kainuma, M., Jiang, H., Velasco, H., Vogt, P. K., & Hakomori, S. 2004. Reversion of the Jun-induced oncogenic phenotype by enhanced synthesis of sialosyllactosylceramide (GM3 ganglioside). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(46): 16204-16209.

Mo, L., Ren, Q., Duchemin, A. M., Neff, N. H., & Hadjiconstantinou, M. 2005. GM1 and ERK signaling in the aged brain. *Brain Res*, 1054(2): 125-134.

Muchmore, E. A., Milewski, M., Varki, A., & Diaz, S. 1989. Biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid. The primary site of hydroxylation of N-acetylneuraminic acid is the cytosolic sugar nucleotide pool. *J Biol Chem*, 264(34): 20216-20223.

Mujoo, K., Cheresch, D. A., Yang, H. M., & Reisfeld, R. A. 1987. Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity and suppression of tumor growth. *Cancer Res*, 47(4): 1098-1104.

Mukherjee, P., Faber, A. C., Shelton, L. M., Baek, R. C., Chiles, T. C., & Seyfried, T. N. 2008. Thematic review series: sphingolipids. Ganglioside GM3 suppresses the proangiogenic effects of vascular endothelial growth factor and ganglioside GD1a. *J Lipid Res*, 49(5): 929-938.

Muller, A. J., & Prendergast, G. C. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase in immune suppression and cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 7(1): 31-40.

Munn, D. H., Sharma, M. D., Lee, J. R., Jhaver, K. G., Johnson, T. S., Keskin, D. B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S. J., Burgess, R., Slingluff, C. L., Jr., & Mellor, A. L. 2002. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*, 297(5588): 1867-1870.

Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., Brown, C., & Mellor, A. L. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, 281(5380): 1191-1193.

Muthing, J., Steuer, H., Peter-Katalinic, J., Marx, U., Bethke, U., Neumann, U., & Lehmann, J. 1994. Expression of gangliosides GM3 (NeuAc) and GM3 (NeuGc) in myelomas and hybridomas of mouse, rat, and human origin. *J Biochem*, 116(1): 64-73.

Mutoh, T., Tokuda, A., Miyadai, T., Hamaguchi, M., & Fujiki, N. 1995. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11): 5087-5091.

Nagaraj, S., & Gabrilovich, D. I. 2007. Myeloid-derived suppressor cells. *Adv Exp Med Biol*, 601: 213-223.

Nakamura, K., Tanaka, Y., Shitara, K., & Hanai, N. 2001. Construction of humanized anti-ganglioside monoclonal antibodies with potent immune effector functions. *Cancer Immunol Immunother*, 50(5): 275-284.

Narayanan, D. L., Saladi, R. N., & Fox, J. L. 2010. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*, 49(9): 978-986.

Offner, H., Thieme, T., & Vandenbark, A. A. 1987. Gangliosides induce selective modulation of CD4 from helper T lymphocytes. *J Immunol*, 139(10): 3295-3305.

Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E., & Lisanti, M. P. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 273(10): 5419-5422.

Oliva, J. P., Valdes, Z., Casaco, A., Pimentel, G., Gonzalez, J., Alvarez, I., Osorio, M., Velazco, M., Figueroa, M., Ortiz, R., Escobar, X., Orozco, M., Cruz, J., Franco, S., Diaz, M., Roque, L., Carr, A., Vazquez, A. M., Mateos, C., Rubio, M. C., Perez, R., & Fernandez, L. E. 2006. Clinical evidences of GM3 (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14F7 monoclonal antibody labelled with (99m)Tc. *Breast Cancer Res Treat*, 96(2): 115-121.

Ouhtit, A., Nakazawa, H., Armstrong, B. K., Krickler, A., Tan, E., Yamasaki, H., & English, D. R. 1998. UV-radiation-specific p53 mutation frequency in normal skin as a predictor of risk of basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 90(7): 523-531.

Palefsky, J. M., Giuliano, A. R., Goldstone, S., Moreira, E. D., Jr., Aranda, C., Jessen, H., Hillman, R., Ferris, D., Coutlee, F., Stoler, M. H., Marshall, J. B., Radley, D., Vuocolo, S., Haupt, R. M., Guris, D., & Garner, E. I. 2011. HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med*, 365(17): 1576-1585.

Palena, C., Abrams, S. I., Schlom, J., & Hodge, J. W. 2006. Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies. *Adv Cancer Res*, 95: 115-145.

Paradis, T. J., Floyd, E., Burkwit, J., Cole, S. H., Brunson, B., Elliott, E., Gilman, S., & Gladue, R. P. 2001. The anti-tumor activity of anti-CTLA-4 is mediated through its induction of IFN gamma. *Cancer Immunol Immunother*, 50(3): 125-133.

Parton, R. G., & Simons, K. 1995. Digging into caveolae. *Science*, 269(5229): 1398-1399.

Pender, M. P., Csurhes, P. A., Wolfe, N. P., Hooper, K. D., Good, M. F., McCombe, P. A., & Greer, J. M. 2003. Increased circulating T cell reactivity to GM3 and GQ1b gangliosides in primary progressive multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*, 10(1): 63-66.

Pereira, D. B., & Chao, M. V. 2007. The tyrosine kinase Fyn determines the localization of TrkB receptors in lipid rafts. *J Neurosci*, 27(18): 4859-4869.

Pinho, S. S., Figueiredo, J., Cabral, J., Carvalho, S., Dourado, J., Magalhaes, A., Gartner, F., Mendonça, A. M., Isaji, T., Gu, J., Carneiro, F., Seruca, R., Taniguchi, N., & Reis, C. A. 2013. E-cadherin and adherens-junctions stability in gastric carcinoma: functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and V. *Biochim Biophys Acta*, 1830(3): 2690-2700.

Portoukalian, J., Zwingelstein, G., & Dore, J. F. 1979. Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur J Biochem*, 94(1): 19-23.

Prinetti, A., Aureli, M., Illuzzi, G., Prioni, S., Nocco, V., Scandroglio, F., Gagliano, N., Tredici, G., Rodriguez-Menendez, V., Chigorno, V., & Sonnino, S. 2010. GM3 synthase overexpression results in reduced cell motility and in caveolin-1 upregulation in human ovarian carcinoma cells. *Glycobiology*, 20(1): 62-77.

Prinetti, A., Loberto, N., Chigorno, V., & Sonnino, S. 2009. Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1788(1): 184-193.

Prinetti, A., Prioni, S., Loberto, N., Aureli, M., Chigorno, V., & Sonnino, S. 2008. Regulation of tumor phenotypes by caveolin-1 and sphingolipid-controlled membrane signaling complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1780(3): 585-596.

Pukel, C. S., Lloyd, K. O., Travassos, L. R., Dippold, W. G., Oettgen, H. F., & Old, L. J. 1982. GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and characterisation by mouse monoclonal antibody. *J Exp Med*, 155(4): 1133-1147.

Rabin, S. J., Bachis, A., & Mocchetti, I. 2002. Gangliosides activate Trk receptors by inducing the release of neurotrophins. *J Biol Chem*, 277(51): 49466-49472.

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

Ragupathi, G., Livingston, P. O., Hood, C., Gathuru, J., Krown, S. E., Chapman, P. B., Wolchok, J. D., Williams, L. J., Oldfield, R. C., & Hwu, W. J. 2003. 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*, 9(14): 5214-5220.

- Ravindranath, M. H., Tsuchida, T., Morton, D. L., & Irie, R. F. 1991. Ganglioside GM3:GD3 ratio as an index for the management of melanoma. *Cancer*, 67(12): 3029-3035.
- Rees, J. H., Soudain, S. E., Gregson, N. A., & Hughes, R. A. 1995. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med*, 333(21): 1374-1379.
- Regina Todeschini, A., & Hakomori, S. I. 2008. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochim Biophys Acta*, 1780(3): 421-433.
- Reglero, A., Rodriguez-Aparicio, L. B., & Luengo, J. M. 1993. Polysialic acids. *Int J Biochem*, 25(11): 1517-1527.
- Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P. F., & Parmiani, G. 2001. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 50(1): 3-15.
- Retter, M. W., Johnson, J. C., Peckham, D. W., Bannink, J. E., Bangur, C. S., Dresser, K., Cai, F., Foy, T. M., Fanger, N. A., Fanger, G. R., Woda, B., & Rock, K. L. 2005. Characterization of a proapoptotic antiganglioside GM2 monoclonal antibody and evaluation of its therapeutic effect on melanoma and small cell lung carcinoma xenografts. *Cancer Res*, 65(14): 6425-6434.
- Ripoll, G. V., Farina, H. G., Yoshiji, H., Gomez, D. E., & Alonso, D. F. 2006. Desmopressin reduces melanoma lung metastasis in transgenic mice overexpressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *In Vivo*, 20(6B): 881-885.
- Rock, K. L., Hearn, A., Chen, C. J., & Shi, Y. 2005. Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin Immunopathol*, 26(3): 231-246.
- Rock, P., Allietta, M., Young, W. W., Jr., Thompson, T. E., & Tillack, T. W. 1990. Organization of glycosphingolipids in phosphatidylcholine bilayers: use of antibody molecules and Fab fragments as morphologic markers. *Biochemistry*, 29(36): 8484-8490.
- Rodriguez, M., Llanes, L., Perez, A., Perez, R., & Vazquez, A. M. 2003. Generation and characterization of an anti-idiotypic monoclonal antibody related to GM3(NeuGc) ganglioside. *Hybrid Hybridomics*, 22(5): 307-314.
- Roithmaier, S., Haydon, A. M., Loi, S., Esmore, D., Griffiths, A., Bergin, P., Williams, T. J., & Schwarz, M. A. 2007. Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience. *J Heart Lung Transplant*, 26(8): 845-849.
- Roque-Navarro, L., Chakrabandhu, K., de Leon, J., Rodriguez, S., Toledo, C., Carr, A., de Acosta, C. M., Hueber, A. O., & Perez, R. 2008. Anti-ganglioside antibody-induced tumor cell death by loss of membrane integrity. *Mol Cancer Ther*, 7(7): 2033-2041.
- Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A., & Dudley, M. E. 2008. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 8(4): 299-308.

Rostenberg, I., Guizar-Vazquez, J., Suarez, P., Rico, R., Nungaray, L., & Dominguez, C. 1978. Distinct glycosylation of serum proteins in patients with cancer: brief communication. *J Natl Cancer Inst*, 60(1): 83-87.

Russell, J. P., Engiles, J. B., & Rothstein, J. L. 2004. Proinflammatory mediators and genetic background in oncogene mediated tumor progression. *J Immunol*, 172(7): 4059-4067.

Sa, G., Das, T., Moon, C., Hilston, C. M., Rayman, P. A., Rini, B. I., Tannenbaum, C. S., & Finke, J. H. 2009. GD3, an overexpressed tumor-derived ganglioside, mediates the apoptosis of activated but not resting T cells. *Cancer Res*, 69(7): 3095-3104.

Sadatipour, B. T., Greer, J. M., & Pender, M. P. 1998. Increased circulating antiganglioside antibodies in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 44(6): 980-983.

Sadelain, M., Riviere, I., & Brentjens, R. 2003. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer*, 3(1): 35-45.

Sahin, U., Tureci, O., & Pfreundschuh, M. 1997. Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, 9(5): 709-716.

Saito, M. 1993. Bioactive gangliosides: differentiation inducers for hematopoietic cells and their mechanism(s) of actions. *Adv Lipid Res*, 25: 303-327.

Sampor, C., Guthmann, M. D., Scursoni, A., Cacciavillano, W., Torbidoni, A., Galluzzo, L., Camarero, S., Lopez, J., de Davila, M. T., Fainboim, L., & Chantada, G. L. 2012. Immune response to racotumomab in a child with relapsed neuroblastoma. *Front Oncol*, 2: 195.

Sanchez Alvarado, A. 2012. Cellular hyperproliferation and cancer as evolutionary variables. *Curr Biol*, 22(17): R772-778.

Satoh, M., Ito, A., Nojiri, H., Handa, K., Numahata, K., Ohyama, C., Saito, S., Hoshi, S., & Hakomori, S. I. 2001. Enhanced GM3 expression, associated with decreased invasiveness, is induced by brefeldin A in bladder cancer cells. *Int J Oncol*, 19(4): 723-731.

Schauer, R. 2004. Victor Ginsburg's influence on my research of the role of sialic acids in biological recognition. *Arch Biochem Biophys*, 426(2): 132-141.

Schlenzka, W., Shaw, L., Kelm, S., Schmidt, C. L., Bill, E., Trautwein, A. X., Lottspeich, F., & Schauer, R. 1996. CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase: the first cytosolic Rieske iron-sulphur protein to be described in Eukarya. *FEBS Lett*, 385(3): 197-200.

Schmielau, J., & Finn, O. J. 2001. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res*, 61(12): 4756-4760.

Schwerer, B. 2002. Antibodies against gangliosides: a link between preceding infection and immunopathogenesis of Guillain-Barre syndrome. *Microbes Infect*, 4(3): 373-384.

Scott, A. M., Allison, J. P., & Wolchok, J. D. 2012. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun*, 12: 14.

Scursoni, A. M., Galluzzo, L., Camarero, S., Lopez, J., Lubieniecki, F., Sampor, C.,

Segatori, V. I., Gabri, M. R., Alonso, D. F., Chantada, G., & de Davila, M. T. 2011. Detection

of N-glycolyl GM3 ganglioside in neuroectodermal tumors by immunohistochemistry: an attractive vaccine target for aggressive pediatric cancer. *Clin Dev Immunol*, 2011: 245181.

Scursoni, A. M., Galluzzo, L., Camarero, S., Pozzo, N., Gabri, M. R., de Acosta, C. M., Vazquez, A. M., Alonso, D. F., & de Davila, M. T. 2010. Detection and characterization of N-glycolyated gangliosides in Wilms tumor by immunohistochemistry. *Pediatr Dev Pathol*, 13(1): 18-23.

Seifert, H. 1966. [On an additional ganglioside characteristic of brain tumors]. *Klin Wochenschr*, 44(8): 469-470.

Semenza, G. L. 2007. Hypoxia and cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 26(2): 223-224.

Seyfried, T. N., & Mukherjee, P. 2010. Ganglioside GM3 Is Antiangiogenic in Malignant Brain Cancer. *J Oncol*, 2010: 961243.

Sharili, A. S., Allen, S., Smith, K., Price, J., & McGonnell, I. M. 2013. Snail2 promotes osteosarcoma cell motility through remodelling of the actin cytoskeleton and regulates tumor development. *Cancer Lett*, 333(2): 170-179.

Sharma, P., Shen, Y., Wen, S., Yamada, S., Jungbluth, A. A., Gnjjatic, S., Bajorin, D. F., Reuter, V. E., Herr, H., Old, L. J., & Sato, E. 2007. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10): 3967-3972.

Shurin, G. V., Shurin, M. R., Bykovskaia, S., Shogan, J., Lotze, M. T., & Barksdale, E. M., Jr. 2001. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res*, 61(1): 363-369.

Siebert, O. M., Heinemann, K., & Tomlinson, I. P. 2003. Genomic instability--the engine of tumorigenesis? *Nat Rev Cancer*, 3(9): 701-708.

Simpson, M. A., Cross, H., Proukakis, C., Priestman, D. A., Neville, D. C., Reinkensmeier, G., Wang, H., Wiznitzer, M., Gurtz, K., Verganelaki, A., Pryde, A., Patton, M. A., Dwek, R. A., Butters, T. D., Platt, F. M., & Crosby, A. H. 2004. Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nat Genet*, 36(11): 1225-1229.

Singer, S. J., & Nicolson, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023): 720-731.

Singh, R. D., Marks, D. L., Holicky, E. L., Wheatley, C. L., Kaptzan, T., Sato, S. B., Kobayashi, T., Ling, K., & Pagano, R. E. 2010. Gangliosides and beta1-integrin are required for caveolae and membrane domains. *Traffic*, 11(3): 348-360.

Sinha, P., Clements, V. K., Bunt, S. K., Albelda, S. M., & Ostrand-Rosenberg, S. 2007. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol*, 179(2): 977-983.

Skaper, S. D., Facci, L., Milani, D., & Leon, A. 1989. Monosialoganglioside GM1 protects against anoxia-induced neuronal death in vitro. *Exp Neurol*, 106(3): 297-305.

Sliwkowski, M. X., & Mellman, I. 2013. Antibody therapeutics in cancer. *Science*, 341(6151): 1192-1198.

Smart, E. J., Mineo, C., & Anderson, R. G. 1996. Clustered folate receptors deliver 5-methyltetrahydrofolate to cytoplasm of MA104 cells. *J Cell Biol*, 134(5): 1169-

So-Rosillo, R., & Small, E. J. 2006. Sipuleucel-T (APC8015) for prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 6(9): 1163-1167.

Song, W. X., Vacca, M. F., Welti, R., & Rintoul, D. A. 1991. Effects of gangliosides GM3 and De-N-acetyl GM3 on epidermal growth factor receptor kinase activity and cell growth. *J Biol Chem*, 266(16): 10174-10181.

Sonnino, S., & Prinetti, A. 2009. Sphingolipids and membrane environments for caveolin. *FEBS Lett*, 583(4): 597-606.

Stefanova, I., Horejsi, V., Ansotegui, I. J., Knapp, W., & Stockinger, H. 1991. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science*, 254(5034): 1016-1019.

Stemplewski, Z., Herlyn, M., Herlyn, D., Clark, W. H., & Koprowski, H. 1979. Reactivity of monoclonal anti-melanoma antibodies with melanoma cells freshly isolated from primary and metastatic melanoma. *Eur J Immunol*, 9(1): 94-96.

Stuchlova Horynova, M., Raska, M., Clausen, H., & Novak, J. 2013. Aberrant O-glycosylation and anti-glycan antibodies in an autoimmune disease IgA nephropathy and breast adenocarcinoma. *Cell Mol Life Sci*, 70(5): 829-839.

Svennerholm, L. 1963. Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. *J Neurochem*, 10: 613-623.

Svennerholm, L. 1964. The Gangliosides. *J Lipid Res*, 5: 145-155.

Takamizawa, K., Iwamori, M., Kozaki, S., Sakaguchi, G., Tanaka, R., Takayama, H., & Nagai, Y. 1986. TLC immunostaining characterization of Clostridium botulinum type A neurotoxin binding to gangliosides and free fatty acids. *FEBS Lett*, 201(2): 229-232.

Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A., & Muchmore, E. 2003. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(21): 12045-12050.

Teicher, B. A. 2007. Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res*, 13(21): 6247-6251.

Tillack, T. W., Allietta, M., Moran, R. E., & Young, W. W., Jr. 1983. Localization of globoside and Forssman glycolipids on erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta*, 733(1): 15-24.

Tsuchida, T., Saxton, R. E., Morton, D. L., & Irie, R. F. 1989. Gangliosides of human melanoma. *Cancer*, 63(6): 1166-1174.

Vamecq, J., Mestdagh, N., Henichart, J. P., & Poupaert, J. 1992. Subcellular distribution of glycolyltransferases in rodent liver and their significance in special reference to the synthesis of N-glycolyneuraminic acid. *J Biochem*, 111(5): 579-583.

van Cruijssen, H., Ruiz, M. G., van der Valk, P., de Gruijl, T. D., & Giaccone, G. 2009. Tissue micro array analysis of ganglioside N-glycolyl GM3 expression and signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 activation in relation to dendritic cell infiltration and microvessel density in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 9: 180.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., & Boon, T. 1991. A gene encoding an antigen recognized by

cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254(5038): 1643-1647.

van Poelgeest, M. I., Welters, M. J., van Esch, E. M., Stynenbosch, L. F., Kerpershoek, G., van Persijn van Meerten, E. L., van den Hende, M., Lowik, M. J., Berends-van der Meer, D. M., Fathors, L. M., Valentijn, A. R., Oostendorp, J., Fleuren, G. J., Melief, C. J., Kenter, G. G., & van der Burg, S. H. 2013. HPV16 synthetic long peptide (HPV16-SLP) vaccination therapy of patients with advanced or recurrent HPV16-induced gynecological carcinoma, a phase II trial. *J Transl Med*, 11: 88.

Varki, A. 1992. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology*, 2(1): 25-40.

Varki, A. 2001. Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution. *Am J Phys Anthropol*, Suppl 33: 54-69.

Varki, A. 2010. Colloquium paper: uniquely human evolution of sialic acid genetics and biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 Suppl 2: 8939-8946.

Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., & Etzler, M. E. 2009. *Essentials of Glycobiology* (Second ed.). La Jolla, California: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Vazquez, A. M., Alfonso, M., Lanne, B., Karlsson, K. A., Carr, A., Barroso, O., Fernandez, L. E., Rengifo, E., Lanio, M. E., Alvarez, C., & et al. 1995. Generation of a murine monoclonal antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids. *Hybridoma*, 14(6): 551-556.

Vazquez, A. M., Gabri, M. R., Hernandez, A. M., Alonso, D. F., Beausoleil, I., Gomez, D. E., & Perez, R. 2000. Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to N-glycolyl-containing gangliosides. *Oncol Rep*, 7(4): 751-756.

Vazquez, A. M., Perez, A., Hernandez, A. M., Macias, A., Alfonso, M., Bombino, G., & Perez, R. 1998. Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody. *Hybridoma*, 17(6): 527-534.

Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A., & Prusiner, S. B. 1996. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25): 14945-14949.

Vimr, E. R. 1994. Microbial sialidases: does bigger always mean better? *Trends Microbiol*, 2(8): 271-277.

Volonte, D., Galbiati, F., Pestell, R. G., & Lisanti, M. P. 2001. Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J Biol Chem*, 276(11): 8094-8103.

Wahlin, B. E., Sander, B., Christensson, B., & Kimby, E. 2007. CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*, 13(2 Pt 1): 388-397.

Wakley, S. U. 2004. Secondary accumulation of gangliosides in lysosomal storage disorders. *Semin Cell Dev Biol*, 15(4): 433-444.

Wang, X. Q., Sun, P., Go, L., Koti, V., Fliman, M., & Paller, A. S. 2006. Ganglioside GM3 promotes carcinoma cell proliferation via urokinase plasminogen activator-induced extracellular signal-regulated kinase-independent p70S6 kinase signaling. *J Invest*

Dermatol, 126(12): 2687-2696.

Wang, X. Q., Sun, P., & Paller, A. S. 2002. Ganglioside induces caveolin-1 redistribution and interaction with the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 277(49): 47028-47034.

Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C., & Giancotti, F. G. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell*, 94(5): 625-634.

Watanabe, T., Pukel, C. S., Takeyama, H., Lloyd, K. O., Shiku, H., Li, L. T., Travassos, L. R., Oettgen, H. F., & Old, L. J. 1982. Human melanoma antigen AH is an autoantigenic ganglioside related to GD2. *J Exp Med*, 156(6): 1884-1889.

Weiner, L. M., Surana, R., & Wang, S. 2010. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 10(5): 317-327.

Yamada, E. 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*, 1(5): 445-458.

Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., & Proia, R. L. 1999. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16): 9142-9147.

Yates, A. J., & Rampersaud, A. 1998. Sphingolipids as receptor modulators. An overview. *Ann N Y Acad Sci*, 845: 57-71.

Yin, J., Hashimoto, A., Izawa, M., Miyazaki, K., Chen, G. Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Furuhashi, K., Cheng, F. L., Lin, C. H., Sato, C., Kitajima, K., & Kannagi, R. 2006. Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Res*, 66(6): 2937-2945.

Yoon, S. J., Nakayama, K., Hikita, T., Handa, K., & Hakomori, S. I. 2006a. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(50): 18987-18991.

Yoon, S. J., Nakayama, K., Takahashi, N., Yagi, H., Utkina, N., Wang, H. Y., Kato, K., Sadilek, M., & Hakomori, S. I. 2006b. Interaction of N-linked glycans, having multivalent GlcNAc termini, with GM3 ganglioside. *Glycoconj J*, 23(9): 639-649.

Zheng, X., Koropatnick, J., Li, M., Zhang, X., Ling, F., Ren, X., Hao, X., Sun, H., Vladau, C., Franek, J. A., Feng, B., Urquhart, B. L., Zhong, R., Freeman, D. J., Garcia, B., & Min, W. P. 2006. Reinstalling antitumor immunity by inhibiting tumor-derived immunosuppressive molecule IDO through RNA interference. *J Immunol*, 177(8): 5639-5646.

Zhou, Q., Hakomori, S., Kitamura, K., & Igarashi, Y. 1994. GM3 directly inhibits tyrosine phosphorylation and de-N-acetyl-GM3 directly enhances serine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, independently of receptor-receptor interaction. *J Biol Chem*, 269(3): 1959-1965.

Ziegler-Heitbrock, H. W., Kafferlein, E., Haas, J. G., Meyer, N., Strobel, M., Weber, C., & Flieger, D. 1992. Gangliosides suppress tumor necrosis factor production in human monocytes. *J Immunol*, 148(6): 1753-1758.

Zou, W. 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 6(4): 295-307.

Para citar este documento

Segatori, Valeria. (2015) Rol del ácido neuramínico glicolilado (NGc) en la biología tumoral. Desarrollo de nuevos modelos murinos (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina: Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto. Disponible en: <http://ridaa.demo.unq.edu.ar>

