

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I



TESIS DOCTORAL

**Estudio sobre la reactividad de anticuerpos IgM naturales e
inducidos frente al carbohidrato tumoral definido por el
AcMo A10**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Ignacio Tudela García

DIRECTOR

José Luis Subiza Garrido-Lestache

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DPTO. MICROBIOLOGÍA I



**ESTUDIO SOBRE LA REACTIVIDAD DE
ANTICUERPOS IgM NATURALES E INDUCIDOS
FRENTA AL CARBOHIDRATO TUMORAL
DEFINIDO POR EL AcMo A10**

JOSE IGNACIO TUDELA GARCÍA

DIRECTOR: JOSE LUIS SUBIZA GARRIDO-LESTACHE

MADRID, 2015



Informe del Director de la Tesis Doctoral

| DATOS DE LA TESIS DOCTORAL | |
|-----------------------------------|--|
| Nombre del Doctorando | JOSE IGNACIO TUDELA GARCÍA |
| Título de la Tesis | ESTUDIO SOBRE LA REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS IGM NATURALES E INDUCIDOS FRENTE AL CARBOHIDRATO TUMORAL DEFINIDO POR EL ACMO A10 |
| Facultad o Centro | MEDICINA |

| DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL | |
|--|--|
| Nombre Completo | JOSE LUIS SUBIZA GARRIDO-LESTACHE |
| Centro al que pertenece y dirección | HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS |
| D.N.I./Pasaporte | 50282726B |
| e-mail | jose Luis.subiza@salud.madrid.org |

| | VALORACIÓN DE LA TESIS | | | |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|
| | Muy Buena | Buena | Suficiente | Deficiente |
| Originalidad | X | | | |
| Definición Objetivos | X | | | |
| Metodología | X | | | |
| Relevancia Resultados | X | | | |
| Discusión / Conclusiones | X | | | |

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El trabajo de investigación “Estudio sobre la reactividad de anticuerpos IgM naturales e inducidos frente al carbohidrato tumoral definido por el AcMo A10” presentado por D. José Ignacio Tudela García, describe la presencia de estructuras de tipo carbohidrato compartidas por tumores murinos y humanos, relacionadas con el AcMo A10 y definidas por la presencia de anticuerpos IgM naturales humanos e inducidos murinos, reactivos frente a ellas.

El trabajo se completa con la caracterización preliminar de la molécula murina Ca10, siendo estos resultados muy interesantes de cara a considerar esta molécula como posible candidata para el desarrollo de una vacuna antineoplásica, para el tratamiento de tumores humanos de origen epitelial. Considero que tanto el doctorando como la memoria cumplen todos los requisitos formales y de contenido exigidos para optar al título de Doctor.

Madrid, a 27 de octubre de 2015

Fdo.:

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.

A mis padres, a mi esposa

Pilar y a mis dos peques,

Nacho y Marta

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido a que este trabajo haya sido posible.

Al Dr. Jose Luis Subiza, director de esta tesis, por darme la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación. Es una satisfacción haber podido ver como el equipo, los proyectos y el reconocimiento por una labor profesional impecable han ido creciendo y he podido aportar mi granito de arena. Gracias por enseñarme a investigar, por tu calidad humana y por la facilidad para tratar contigo.

A todos mis compañeros y personal técnico del Servicio de Inmunología, con los que he compartido el trabajo diario que ha desembocado en la consecución de esta tesis doctoral.

A toda la gente del Departamento de Medicina y Cirugía Experimental que estuvo a mi lado mientras realicé este trabajo. Entre ellos Maribel, Teresa, Arancha O, Arancha M, Marie, Celia, Esther, Elena, Jorge y Fernando. En especial quería agradecer a los veterinarios Pablo González y Mari Cruz Rodríguez-Bobada por el tiempo que dedicaron ayudándome con los ratones.

Al Dr. Jose Antonio Lopez García Asenjo y a la Dr. Susana Hernández, del Servicio de Anatomía Patológica, por colaborar con nosotros consiguiéndonos todas las piezas tumorales que necesitamos para las inmunohistoquímicas.

Al Dr. Javier Palacín, del Animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, por su inestimable ayuda con los modelos murinos inmunodeficientes.

Al Dr. Javier Cañada, al Dr. Jesús Jiménez, y en especial a la Dra. Ana Manzano, del laboratorio de RMN y Reconocimiento Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas, por su inestimable ayuda con los experimentos de caracterización de la molécula Ca10. También quería darle las gracias a la Dra. Dolores Solís, del Instituto Química-Física Rocasolano (CSIC), por su colaboración en el experimento de microarray de lectinas.

También quería dar las gracias a mis compañeros actuales Bárbara, Eva y José Fernando y a Enrique Fernández Caldas por su apoyo moral, que no es poco, en los meses que he empleado en la redacción de esta tesis.

A Pilar, por creer en mí y apoyarme de forma incondicional tanto en los buenos momentos como en los no tan buenos. Sin tu fuerza jamás habría podido terminar este trabajo. Tú me diste ánimos en los momentos de flaqueza.

Y en especial a toda mi familia, los que están y los que desgraciadamente nos abandonaron. Sin vosotros no sería lo que soy, en lo bueno y en lo malo. Además, gracias a vuestro apoyo he podido desarrollarme profesionalmente llegando al punto donde estoy.

Si he olvidado a alguien, por favor, que se dé por incluido en esta línea.

A todos de corazón, muchas gracias.

INDICE

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATURAS..... | 13 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 17 |
| 1. EL CÁNCER..... | 19 |
| 2. EL CÁNCER Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO..... | 27 |
| 2.1. De la teoría de la inmunovigilancia al concepto de la inmunoedición...27 | |
| 2.2. Mecanismos inmunológicos frente al cáncer.....33 | |
| 2.2.1. La inmunidad innata.....34 | |
| 2.2.2. La inmunidad adquirida.....36 | |
| 2.2.3. Mecanismos efectores antitumorales.....37 | |
| 2.2.4. Células T reguladoras y células naturales supresoras.....38 | |
| 2. LOS ANTICUERPOS NATURALES (NAb)..... | 39 |
| 3. EL TUMOR DE EHRLICH..... | 47 |
| 4. CARBOHIDRATOS TUMORALES..... | 50 |
| 5. EL ANTICUERPO MONOCLONAL A10..... | 55 |
| II. HIPÓTESIS..... | 59 |
| III. OBJETIVOS..... | 67 |
| IV. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 71 |
| 1. REACTIVOS Y MEDIOS..... | 73 |
| 2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN..... | 74 |
| 3. TUMOR DE EHRLICH..... | 74 |
| 3.1. In vivo.....75 | |
| 3.2. In vitro.....75 | |
| 4. CULTIVOS CELULARES..... | 75 |
| 5. OBTENCIÓN DE CARBOHIDRATOS LIBERADOS POR LAS CÉLULAS ET (HC-ET)..... | 76 |
| 5.1. Método químico con fenol-cloroformo.....76 | |
| 5.2. Ultrafiltración tangencial.....76 | |
| 6. CUANTIFICACIÓN DEL Ca10..... | 77 |
| 7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS HC-ET PURIFICADOS..... | 78 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 8. | IRRADIACIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES..... | 78 |
| 9. | EXPERIMENTOS DE INMUNIZACIÓN..... | 78 |
| 10. | OBTENCIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL A10..... | 79 |
| 11. | OBTENCIÓN DEL SUERO DE LOS RATONES INMUNIZADOS..... | 79 |
| 12. | OBTENCIÓN DE LOS SUEROS HUMANOS..... | 79 |
| 13. | VALORACIÓN DE LA IgM TOTAL SÉRICA EN LOS SUEROS HUMANOS..... | 80 |
| 14. | OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS TUMORALES HUMANAS..... | 80 |
| 15. | CRECIMIENTO DEL TUMOR XENOGÉNICO HT-29..... | 80 |
| 16. | CORTES DE TEJIDO EN CRIOSTATO..... | 80 |
| 17. | DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM REACTIVOS FRENTE AL Ca10..... | 81 |
| | 17.1. Enzimoimmunoensayo (ELISA)..... | 81 |
| | 17.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)..... | 81 |
| | 17.2.1. Citometría de flujo..... | 82 |
| | 17.2.2. Histología en cortes en criostato..... | 82 |
| 18. | INHIBICIÓN DE ANTICUERPOS IgM ESPECÍFICOS..... | 83 |
| 19. | ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD MEDIADA POR COMPLEMENTO..... | 84 |
| 20. | ANÁLISIS MOLECULAR POR CROMATOGRAFÍA DE GASES..... | 84 |
| | 20.1. Acetatos de alditol..... | 85 |
| | 20.2. TMS-oximas..... | 85 |
| | 20.3. Análisis de aminoácidos..... | 86 |
| 21. | ENSAYO DE INTERACCIÓN CON LECTINAS..... | 87 |
| 22. | ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL ACMO A10 CON AZÚCARES..... | 88 |
| 23. | ENSAYOS CON N- Y O-GLICOSIDASAS..... | 89 |
| 24. | ENSAYOS CON INHIBIDORES METABÓLICOS DE LA GLICOSILACIÓN..... | 89 |
| 25. | TRATAMIENTO ESTADÍSTICO..... | 90 |
| V. | RESULTADOS..... | 91 |
| 1. | VALORACIÓN DE ANTICUERPOS NATURALES (NAb) | |
| | REACTIVOS FRENTE A MOLÉCULAS A10..... | 93 |
| | 1.1. Carbohidratos procedentes de células ET (HC-ET) | 93 |
| | 1.2. Líneas celulares murinas..... | 97 |
| | 1.3. Tumores humanos..... | 101 |
| | 1.3.1. Tumor HT-29..... | 101 |
| | 1.3.2. Tejido tumoral de biopsias/piezas quirúrgicas de colon humano..... | 104 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 2. | TITULACIÓN DE ANTICUERPOS DE CLASE IgM ESPECÍFICOS FRENTE A MOLÉCULAS A10+, EN RATONES INMUNIZADOS CON CÉLULAS ET..... | 109 |
| 2.1. | Carbohidratos procedentes de células ET (HC-ET)..... | 109 |
| 2.2. | Líneas celulares/células..... | 111 |
| 2.2.1. | Líneas murinas..... | 112 |
| 2.2.2. | Líneas humanas mieloides..... | 114 |
| 2.2.3. | Líneas de adenocarcinomas colorrectales humanos..... | 115 |
| 2.3. | Tumores humanos..... | 116 |
| 2.3.1. | Tumor HT-29..... | 116 |
| 2.3.2. | Tejido tumoral de biopsias/piezas quirúrgicas de colon humano..... | 119 |
| 2.4. | Inhibición de la reactividad IgM específica..... | 124 |
| 3. | EFECTO BIOLÓGICO DE LOS ANTICUERPOS DE CLASE IgM..... | 126 |
| 3.1. | Efecto citotóxico de los NAb humanos..... | 126 |
| 3.2. | Efecto citotóxico de los anticuerpos presentes en los sueros de los ratones inmunizados..... | 127 |
| 4. | TITULACIÓN DE ANTICUERPOS DE CLASE IgM ESPECÍFICOS FRENTE CÉLULAS ET EN RATONES INMUNIZADOS CON CÉLULAS TUMORALES HUMANAS A10+..... | 129 |
| 5. | PURIFICACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS LIBERADOS AL MEDIO CELULAR POR EL ET (HC-ET)..... | 131 |
| 6. | CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS HC-ET..... | 133 |
| 6.1. | Caracterización inicial..... | 133 |
| 6.2. | Interacción con lectinas de plantas e inhibición con oligosacáridos.... | 135 |
| 6.3. | Inhibición de la reactividad A10 en presencia de azúcares específicos..... | 138 |
| 6.4. | Ruptura del enlace glicosídico (carbohidrato-proteína)..... | 139 |
| 6.5. | Ensayos con inhibidores metabólicos de la N y O-glicosilación..... | 142 |
| VI. | DISCUSIÓN..... | 145 |
| VII. | CONCLUSIONES..... | 157 |
| VIII. | BIBLIOGRAFÍA..... | 165 |
| IX. | SUMMARY..... | 207 |

ABREVIATURAS

AcMo: Anticuerpo monoclonal

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

BSA: Albúmina sérica bovina

BSTFA: N O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

Ca10: Carbohidrato reconocido por el AcMo A10

CDC: Citotoxicidad dependiente de complemento

CEA: Antígeno carcinoembriogénico

Célula NK: Células asesina natural

Célula NKT: Células T asesina natural

Células TIL: linfocito infiltrante de tumor

CSC: Célula madre del cáncer

DC: Célula dendrítica

DMSO: Dimetil sulfóxido

ELISA: enzimoimmunoensayo

ET: Tumor de Ehrlich

FCS: Suero de ternera fetal

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

Gal: Galactosa

GalNAc: N-Acetil galactosamina

Glc: Glucosa

GlcNAc: N-Acetil glucosamina

GC-MS: Cromatografía de gases-espectrometría de masas

GMCSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

Gy: Gray

HC-ET: Carbohidratos liberados por el tumor de Ehrlich

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IFN: Interferón

IgA: Inmunoglobulina A

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL: Interleuquina

iNOS: Oxido nítrico sintasa inducible

LB: Linfocito B

LBMZ: Linfocitos B de la zona marginal del bazo

LDCC: Citotoxicidad celular dependiente de lectina

MDSC: Célula supresora mieloide

LPS: Lipopolisacárido

LT: Linfocito T

LTreg: Linfocito T regulador

MCA: Metilcolantreno

MDSC: Célula mieloide supresora

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

MTT: Bromuro de 3-(4 5- dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazol

MUC-1: Mucina 1

NAb: Anticuerpo natural

NANA: Ácido N-acetilneuramínico

PBS: Tampón fosfato salino

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PSA: Antígeno prostático específico

PVH: Papilomavirus humano

RAG-1/2: Gen activador de la recombinación 1/2

RMN: Resonancia magnética nuclear

SLe^{a/x/y}: Sialil Lewis a/x/y

STn: Sialil-Tn

TAA: Antígeno asociado a tumor

TCR: Receptor de célula T

TLR: Receptor de tipo toll

TMS: Trimetilsilil

TNF: Factor de necrosis tumoral

UA: Unidades arbitrarias

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

LECTINAS

BSL: Lectina de *Bandeiraea simplicifolia*

Con-A: Concanavalina A

DSL: Lectina de *Datura stramonium*

HPA: Lectina de *Arachis hypogaea*

LEA: Aglutinina de *Lycopersicon esculentum*

LPA: Aglutinina de *Limulus polyphemus*

MAA: Lectina de *Maackia amurensis*

PNA: Aglutinina de cacahuete

SBA: Aglutinina de soja

SNA: Aglutinina de *Sambucus nigra*

WFA: Aglutinina de *Wisteria floribunda*

WGA: Aglutinina de germen de trigo

AMINOÁCIDOS

Ala: Alanina

Arg: Arginina

Asp: Asparagina

Cys: Cisteína

Glu: Glutamina

Gly: Glicina

His: Histidina

Ile: Isoleucina

Leu: Leucina

Lys: Lisina

Met: Metionina

Phe: Fenilalanina

Ser: Serina

Thr: Treonina

Tyr: Tirosina

Val: Valina

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1- EL CÁNCER

"Cáncer" es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de "tumores malignos" o "neoplasias malignas". Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales, que extendiéndose más allá de sus límites habituales, pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos. A este proceso de invasión y generación de nuevos tumores se le denomina metástasis y constituye la principal causa de muerte.

Los avances científicos y tecnológicos de los últimos años han proporcionado nuevos conocimientos sobre la aparición, desarrollo y crecimiento del cáncer, a pesar de lo cual, esta enfermedad es la principal causa de muerte a escala mundial. En el año 2012 se le atribuyeron un total de 8,2 millones de defunciones (1). Se puede afirmar que el cáncer es hoy en día una de las enfermedades más traumáticas de los países industrializados, ya que ocasiona un gran número de muertes y de secuelas, provocando enormes pérdidas para la sociedad. Además del dolor y el sufrimiento que causa esta enfermedad entre los pacientes que la padecen y en sus familiares, el cáncer es el mayor causante de pérdidas relacionadas con la productividad laboral debido a la mortalidad prematura y la morbilidad (incapacidad temporal y permanente) derivadas de los tumores. Debido al importante coste social y económico que el cáncer está teniendo en nuestra sociedad, la Comisión Europea decidió apoyar a los Estados Miembros en sus esfuerzos para proteger la salud de los ciudadanos, mediante la adopción de medidas concretas y se ha fijado el ambicioso objetivo de reducir la incidencia de cáncer en un 15% en 2020. Por otra parte, la Comisión puso en marcha la EPAAC, European Partnership for Action Against Cancer. Esta iniciativa finalizó en febrero de 2014 y en mayo de ese mismo año se lanzó una nueva acción conjunta "Development of the European Guide on Quality Improvement in Comprehensive Cancer Control" (Cancon).

Introducción

Los datos y cifras más relevantes son los siguientes:

- El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes (1).
- Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años.
- En 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el hombre fueron los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado.
- En la mujer fueron los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago.
- Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol.
- El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante, y es la causa de más del 20% de las muertes mundiales por cáncer en general, y alrededor del 70% de las muertes mundiales en el caso del cáncer de pulmón.
- Los cánceres causados por infecciones víricas, tales como las infecciones por virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por papilomavirus humanos (PVH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos medios y bajos (2).
- Más del 60% de los nuevos casos a nivel mundial se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. Estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer totales.
- Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas (1).

La Tabla 1 describe los principales tipos de cánceres y el número de defunciones a nivel mundial, según datos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) del año 2012.

Tabla 1. Tipos más frecuentes de cánceres y número de defunciones en el año 2012.

| Cáncer | Número de defunciones |
|-------------|-----------------------|
| Pulmonar | 1.590.000 |
| Hepático | 745.000 |
| Gástrico | 723.000 |
| Colorrectal | 694.000 |
| Mamario | 521.000 |
| Esófago | 400.000 |

A nivel europeo, según refleja la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo) en su informe “Health at a Glance: Europe 2014”, en 2012 se diagnosticaron 2,7 millones de nuevos casos de cáncer (54% hombres y 46% mujeres).

Las cifras del cáncer en España son revisadas cada año por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Los datos de incidencia del cáncer en España en 2012 fueron de 215.534 casos (2/3 eran pacientes mayores de 65 años), con una tasa estandarizada por edad de 215,5 casos por 100.000 habitantes por año, y un riesgo de presentar cáncer antes de los 75 años del 25,1%. La predicción para 2015 es de 227.076 casos, con un crecimiento de nuevos casos que se produce, en mayor medida, a costa de la población mayor de 65 años. El crecimiento de la población y su envejecimiento explicarían fundamentalmente este incremento.

La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos, a tener en cuenta:

- Carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes.
- Carcinógenos químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua).
- Carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta muchísimo con la edad, muy probablemente

Introducción

porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad.

El consumo de tabaco y alcohol, la dieta malsana y la inactividad física son los principales factores de riesgo de cáncer en todo el mundo. Algunas infecciones crónicas también constituyen factores de riesgo, y son más importantes en los países de ingresos medios y bajos.

A su vez, los virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) y algunos tipos de papilomavirus humanos (PVH) aumentan el riesgo de cáncer de hígado y cuello uterino, respectivamente. La infección por el VIH también aumenta considerablemente el riesgo de algunos cánceres, como los del cuello uterino.

En vista de los datos aportados, queda patente que la terapéutica existente hasta la fecha no cubre las necesidades de los pacientes ni de los profesionales que tratan la enfermedad, lo que hace necesario que se continúe investigando en nuevas terapias y tratamientos que permitan mejorar las cifras de supervivencia de la enfermedad y que disminuyan los efectos secundarios de los tratamientos. En este sentido hay que señalar que hay gran expectativa en el campo de la investigación de vacunas contra el cáncer.

La terapia convencional del cáncer (cirugía, quimioterapia y radioterapia) tienen dos grandes limitaciones que son su falta de especificidad y/o su ineficiencia para el control de la enfermedad residual. Ambas podrían superarse aprovechando el potencial que ofrece el sistema inmunitario y su capacidad de respuesta frente a las células tumorales.

En los últimos años ha surgido una nueva teoría, respecto al cáncer, cuyo eje principal es la existencia de una población de células a las que se les ha denominado “células madre del cáncer” (CSC). Este concepto fue propuesto por Sagar y colaboradores en el año 2007 (3). Las células madre del cáncer se pueden definir como células que, en un número muy pequeño (3, 4), están en la zona de crecimiento del tumor y que poseen la capacidad de generar nuevos tumores. Estas células, al igual que las células madre normales, tienen la capacidad de perpetuarse para generar células maduras por medio de su diferenciación (5). Pero, al contrario que las células madre normales, se cree que las células madre de cáncer no tienen ningún control en su proliferación.

El modelo estocástico o tradicional del cáncer postula que una o varias células del tejido adquieren una mutación y que, a partir de ésta y a través de un proceso de división no controlado, van acumulándose nuevas alteraciones genéticas que, mediante la selección de los clones más aptos, alcanzan el estado de célula tumoral, dando finalmente lugar al tumor. Según este modelo, cualquier célula del tumor resultante sería capaz de mantener y expandir el mismo, así como de dar lugar a nuevos tumores. Por el contrario, el modelo jerárquico de las CSC implica la existencia de una célula de origen en el tumor con propiedades de célula madre, capaz de proliferar y mantenerse en él de forma indefinida gracias a su capacidad autorrenovadora (6). En este modelo, tan sólo la población de CSC tiene la capacidad de generar y mantener el tumor, a diferencia del resto de células que lo forman que no tienen esa habilidad (Figura. 1).

Según el modelo de las CSC, dentro de los tumores hay una población celular capaz de autorrenovarse y de generar toda la variabilidad celular que compone un tumor. Las CSC dentro del tumor presentan la capacidad de dividirse tanto de forma simétrica, generando células del mismo tipo, como asimétrica, originando progenitores de amplificación rápida, pero transitoria. Estos progenitores darán lugar a precursores comprometidos con un linaje que formarán células tumorales diferenciadas y sin capacidad tumorigénica, que compondrán el grueso del tumor (7, 8).

Introducción

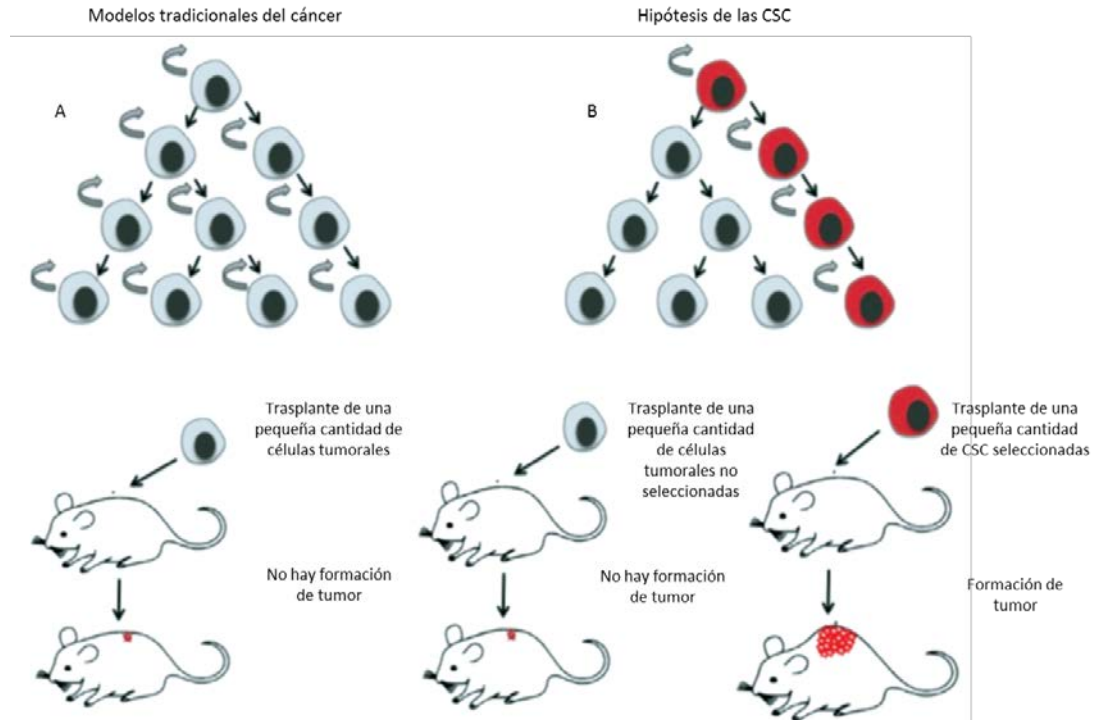


Figura 1. Representación gráfica de los modelos de cáncer.

A. El modelo tradicional o estocástico mantiene que todas las células tumorales tienen las mismas capacidades para mantener y expandir el tumor. B. El modelo jerárquico de las células madre del cáncer (CSC) sostiene que tan sólo una subpoblación celular del tumor es capaz de generar nuevos tumores.

Toda célula con características de “madre” tiene al menos dos rasgos que la distinguen del resto de las otras células: nunca pierden su capacidad de mantenerse como célula madre a lo largo de toda la vida del organismo (concepto definido como autorrenovación), y su capacidad de generar células diferenciadas y, en sus etapas finales, células maduras completamente funcionales. Esta actividad la logran al poder sufrir una división de tipo asimétrica, donde una célula da lugar en su proceso de división a dos células hijas diferentes, una que presenta una total capacidad de mantenerse como célula madre, y otra que se convierte en un progenitor con menor actividad de autorrenovarse, y que será de la que derive la célula diferenciada propia de los tejidos.

La hipótesis de las CSC, está basada en los primeros datos que apuntaban que el origen de cada tipo diferente de cáncer se debe encontrar entre las poblaciones de células madre específicas de cada tejido. Si consideramos algunas de las características

que tienen las células tumorales, éstas son muy parecidas a las que tienen las células madre adultas. Entre estas características están la capacidad de auto-renovación, la replicación ilimitada, las divisiones asimétricas, la larga vida con diferente tipo de envejecimiento, la baja sensibilidad a los fármacos, la presencia de marcadores celulares específicos, etc.

Actualmente se han podido identificar distintos tipos de células, en distintos tipos de cánceres, que parecen ser CSCs. Se han visto en leucemias (9-11), cáncer de mama (12-15), cerebro (16-19), colorrectal (20-22), cabeza y cuello (23, 24), páncreas (25) y próstata (26-29). Cada una de estas células presentan marcadores celulares específicos. Por ejemplo, las CSCs de mama son CD24-CD44+ Lin⁻, ALDH1⁺, las de colon son CD133⁺, Lgr5⁺, ALDH1⁺ y las de próstata expresan A2β1^{hi}CD133⁺, Lin⁻Sca-1⁺CD49f^{hi}.

Desde hace años se sabe que muchos tratamientos antineoplásicos no generan una total eliminación de las células malignas y, por lo tanto, no producen su curación. Tradicionalmente, los tratamientos antitumorales se basan en el ataque masivo y no discriminado frente a las poblaciones celulares con un alto grado proliferativo, donde los efectos primarios se traducen en la detección de una fuerte bajada de la masa tumoral. En muchas ocasiones, un pequeño grupo de células resiste el envite de los tratamientos de quimioterapia y radioterapia y logra escapar. Estas células residuales se comportan como células activas tumorales, aunque a veces de bajo índice mitótico, es decir crecen lentamente, por lo que la mayoría de los fármacos antitumorales clásicos les afectan en menor grado. Sabemos que las poblaciones tumorales tumorigénicas y no tumorigénicas tienen una diferente sensibilidad a muchas drogas genotóxicas (30, 31). Por ejemplo, las células CD34⁺ y CD38⁻ son significativamente menos sensibles a danorubicina (31) o citarabina (32). Todo esto nos indica varias cosas importantes, 1) que los tumores son masas celulares heterogéneas, constituidos por diferentes tipos celulares y con diferente grado de diferenciación, 2) que las células más resistentes a los fármacos antitumorales son, en general, una porción menor dentro de un tumor, y 3) que estas células tienen características similares a las células madre adultas del tejido correspondiente.

2- EL CÁNCER Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

A finales del siglo XIX, William B. Coley observó la regresión de tumores humanos tras la administración de patógenos de origen bacteriano (bacterias de erisipela), o tras la inoculación de sus productos (33-35). Anteriormente, Robert Koch, Louis Pasteur y Emil von Behring ya habían descrito casos similares en pacientes diagnosticados de erisipela. A raíz de los resultados de Coley, comenzaron los esfuerzos para demostrar la existencia de una inmunidad específica antitumoral; pero la evidencia sobre la capacidad del sistema inmunitario para reconocer y eliminar las células tumorales no se obtuvo hasta mediados del siglo pasado, cuando se observó que ratones inoculados con dosis subletales de un tumor singénico quedaban protegidos frente al inóculo posterior de dosis mayores del mismo (36, 37). Años antes, Paul Ehrlich ya había propuesto la idea de que la transformación maligna de las células, es un fenómeno que sucede con una frecuencia mucho mayor que la aparición de tumores propiamente dicha (38). Y hacia 1970, Burnet postuló que debían existir mecanismos inmunológicos de resistencia capaces de controlar el crecimiento de estos tumores incipientes, surgiendo así el concepto de la inmunovigilancia (39).

Actualmente se puede asegurar que la relación entre sistema inmunitario y cáncer ha sido suficientemente demostrada, aunque el conocimiento acumulado sobre la compleja biología y heterogeneidad de las células neoplásicas y de la diversidad de respuestas que el sistema inmune despliega frente a ellas, también permite justificar que el resultado de la interacción entre sistema inmunitario y tumores sea tan variable, según qué tumor y qué mecanismo inmunológico efector estén implicados en el modelo estudiado (40-42).

Aunque el origen de la mayoría de los tumores se debe probablemente a la activación de oncogenes y/o a la inactivación de genes supresores (43, 44), el posterior crecimiento del tumor *in vivo* está potenciado por la activación de otros genes, cuyos productos permiten a las células neoplásicas eludir o escapar de los efectos inmunológicos antitumorales, como pueden ser la producción de determinadas citoquinas con efecto inmunosupresor (TNF- α , IL-10) y la producción de gangliósidos (45-50).

2.1. De la teoría de la inmunovigilancia al concepto de la inmunoedición

Paul Ehrlich fue uno de los primeros investigadores que propuso la idea de que el sistema inmunitario presenta el suficiente potencial para poder contener la aparición de tumores (38). En los años 50, los trabajos de Medawar describieron el papel crítico que tenía el componente celular inmunitario en el rechazo de los trasplantes alogénicos (51). Estos trabajos fueron la base para que surgiera la sospecha de la existencia de los antígenos tumorales. La demostración de que era posible la inmunización de ratones utilizando trasplantes de tumores singénicos, dio pie a la idea de la existencia de los antígenos tumorales (52, 53), y constituyó la piedra angular en la que se apoyó la teoría de la inmunovigilancia del cáncer. Obviamente, no podría haber inmunovigilancia tumoral sin la existencia de estructuras diferentes (antígenos tumorales), que pudieran ser reconocidos por el sistema inmunitario.

Estos descubrimientos fueron incorporados a la hipótesis de la inmunovigilancia del cáncer, propuesta por Macfarlane Burnet y Lewis Thomas. En 1957, Burnet afirmó que no era inconcebible que pequeñas acumulaciones de células tumorales pudiera promover, dado que contienen antígenos nuevos, una reacción inmunológica eficaz que desembocara en la regresión tumoral, y que estos microtumores eliminados pasaran desapercibidos desde un punto de vista clínico (54). Al mismo tiempo, Thomas sugirió que la función primaria de la inmunidad celular no era promover el rechazo de los trasplantes alogénicos, sino la protección frente a las neoplasias, manteniendo de este modo la homeostasis tisular (55). Estas premisas formaron el borrador que, en última instancia, permitió el nacimiento del concepto de la inmunovigilancia, definido por Burnet en 1970 (39, 56, 57).

Tanto Burnet con Thomas postularon que los linfocitos actuaban como centinelas, reconociendo y eliminando de forma continua las células neoplásicas nacientes (56).

La teoría de la inmunovigilancia fue rápidamente aceptada y se llevaron a cabo una gran cantidad de experimentos buscando su confirmación. Los primeros abordajes exploraron si el desarrollo tumoral en ratones se veía influido por la inmunosupresión

Introducción

experimental del huésped (58, 59). No se obtuvieron resultados muy concluyentes (60-62).

El descubrimiento del ratón atímico nude (63, 64), proporcionó a los investigadores una nueva herramienta para poder estudiar el desarrollo tumoral en un individuo inmunodeprimido. Osaias Stutman observó que los ratones nude de la cepa CBA/H no presentaban una mayor incidencia de tumores inducidos químicamente que los wild-type, y que no mostraban un periodo de latencia menor tras la inoculación del carcinógeno (65-67). Además, Stutman no encontró diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de tumores espontáneos no víricos, entre los animales nude y los wild-type (68).

Estos resultados se vieron apoyados por el estudio de Rygaard y Povlsen, en el cual no se obtuvieron diferencias en la formación de tumores espontáneos, en una serie de 10.800 ratones nude, durante un periodo de estudio de 3-7 meses (69, 70).

A pesar de los pocos conocimientos que se tenían en esa época sobre el defecto inmunológico de la mutación nude, los resultados que se obtuvieron fueron lo suficientemente concluyentes como para abandonar la idea o concepto de la inmunovigilancia del cáncer, al no poder apoyar las predicciones claves de esta teoría.

Con el paso de los años, se vio que existían importantes lagunas conceptuales en el desarrollo de estos experimentos. Por ejemplo, se creía que los ratones nude no presentaban LT. Ahora se sabe que los ratones nude no están completamente inmunocomprometidos, ya que poseen niveles bajos, aunque detectables de linfocitos T $\alpha\beta$ funcionales (71-73)

Entre la mitad de los años 70 y los años 90, se realizaron varios experimentos con la intención de recuperar la teoría de la inmunovigilancia. El descubrimiento de las células NK y la repetición de los experimentos de Stutman con otras cepas de ratones (BALB/c background) arrojaron datos esperanzadores (74).

Entre los años 1994 y 1998 se hicieron dos descubrimientos que fueron claves para que volviera el interés por el concepto de la inmunovigilancia del cáncer. El

primero de ellos fue el hallazgo de que el interferón- γ endógeno (IFN- γ) era capaz de proteger al huésped del crecimiento de tumores trasplantados y de la formación de tumores espontáneos o inducidos químicamente (75-77). El segundo fue la observación de que los ratones C57BL/6 deficientes en la molécula perforina, uno de los componentes de los gránulos citolíticos de los linfocitos T citotóxicos y de las células NK, era más propensos a la aparición de tumores inducidos por metilcolantreno (MCA) que los wild-type (77-79).

La herramienta definitiva que permitió confirmar, con resultados inequívocos, la teoría de la inmunovigilancia fue el uso de los ratones deficientes en los genes activadores de la recombinación 1 y 2 (RAG-1 y RAG-2). Los animales deficientes en cualquiera de estos genes fallan completamente en la recombinación de los receptores linfocitarios presentes en las células T, B y NKT (80). Tras la inyección de MCA, los animales RAG-2^{-/-} desarrollaron sarcomas, de forma más rápida y con mucha mayor frecuencia (30/52 RAG-2^{-/-} vs. 11/57 wild-type), que los controles (81). Además, en otro estudio, la totalidad (26/26) de los animales RAG-2^{-/-} desarrollaron neoplasias espontáneas, entre los 13 y los 24 meses de edad. Sin embargo, solo 5 de los 20 animales wild-type tuvieron neoplasias transcurridos esos meses, y fueron fundamentalmente benignas (81).

Se han realizado otros estudios en los que se han usado un gran número de cepas de ratones singénicos con mutaciones claves en genes codificantes para funciones críticas del sistema inmunitario, como LT $\alpha\beta$ ^{-/-}, LT $\gamma\delta$ ^{-/-}, IL-12^{-/-}, IFN- γ R1^{-/-}, STAT1^{-/-}. Los resultados obtenidos no sólo apoyan la idea de la importancia del sistema inmunológico en relación al desarrollo tumoral, sino que también sugieren la implicación tanto de la inmunidad innata como de la adquirida, en la inmunovigilancia del cáncer. Específicamente, la ablación genética, inmunoquímica o funcional de las células NKT, NK, linfocitos T $\gamma\delta$, T $\alpha\beta$, IFN- γ o IL-12 conllevan un incremento de la susceptibilidad a la aparición de tumores (77, 81-84).

Estos resultados sugieren que la inmunovigilancia debe ser un proceso heterogéneo en el que se requiere la acción de diferentes efectores inmunológicos,

Introducción

siendo dependiente del tipo de origen celular, mecanismo de transformación, localización anatómica y mecanismo inmunológico de reconocimiento.

Pero, el concepto de la inmunovigilancia del cáncer presente en los ratones, ¿es aplicable a humanos? La lógica nos haría pensar que en aquellos individuos inmunodeprimidos o con defectos en el sistema inmune, la incidencia de aparición de tumores debería ser mayor. Varios estudios de seguimiento con pacientes trasplantados (que fueron inmunodeprimidos) (85) y con individuos con inmunodeficiencias primarias (86), mostraron la existencia de un riesgo mucho mayor al desarrollo de tumores. Los estudios de larga duración con pacientes, revelaron que parte de este alto riesgo se debe al desarrollo de tumores de origen vírico (87). Pero también se observó que los pacientes con déficits inmunitarios severos, presentan una alta probabilidad de desarrollar varios tipos de cánceres no asociados a etiologías de origen vírico.

Tras la confirmación de la inmunovigilancia del cáncer, una pregunta normal que nos debemos plantear es por qué se desarrollan tumores en individuos completamente inmunocompetentes. Hace tiempo que se piensa que el sistema inmunitario funciona, durante la formación del tumor, seleccionando aquellas variantes tumorales más preparadas para sobrevivir al ambiente hostil de un sistema inmunitario intacto, como sucede con los virus, las bacterias y los parásitos. Varios estudios han mostrado los efectos inmunoselectivos de los trasplantes continuos de tumores a través de huéspedes inmunocompetentes, y la generación de variantes tumorales con una inmunogenicidad reducida (88, 89). De esta forma, los tumores mantenidos en ausencia de un sistema inmune intacto, son más inmunogénicos que los tumores crecidos en huéspedes inmunocompetentes. Tomando estos resultados en conjunto, se puede decir que los tumores son editados por el entorno inmunológico en el cual crecen. Este proceso de edición, a veces conlleva la generación de tumores que son capaces de coexistir mejor con la acción supresora del sistema inmunitario, mediante la eliminación de las células tumorales altamente inmunogénicas. La edición del tumor, vía sistema inmunitario, sucede de forma continua, pero el efecto mayor de

este proceso es más importante en fases tempranas, cuando el tumor es quizá histológica pero no clínicamente detectable.

Dado que el sistema inmunitario tiene efectos, tanto protectores para el huésped, como perjudiciales por medio de la edición de los tumores, quizá el término de inmunovigilancia del cáncer no es el apropiado para describir exactamente el proceso, ya que en su forma original se pensaba funcionaba sólo para proteger al huésped, actuando sólo en las etapas más tempranas de la transformación celular. Por este motivo, Robert Schreiber propuso en el año 2002 el uso del término más amplio de “inmunoedición del cáncer”, que describe de una forma más apropiada este fenómeno dual. Este amplio proceso, podría promover la eliminación total de algunos tumores, generar un estado de no protección frente a otros o favorecer el desarrollo de un estadio de anergia, tolerancia o indiferencia inmunológica. La Figura 2 representa un modelo para explicar el proceso de la inmunoedición del cáncer. Como se puede ver, la inmunoedición se presenta como resultado de tres fases: eliminación, equilibrio y escape. El fenómeno de la inmunovigilancia se produce durante la fase de eliminación, mientras que la selección darwiniana de las variantes tumorales sucede en la fase de equilibrio. Esta fase puede, por último, conducir al escape con la aparición de tumores con implicación clínica.

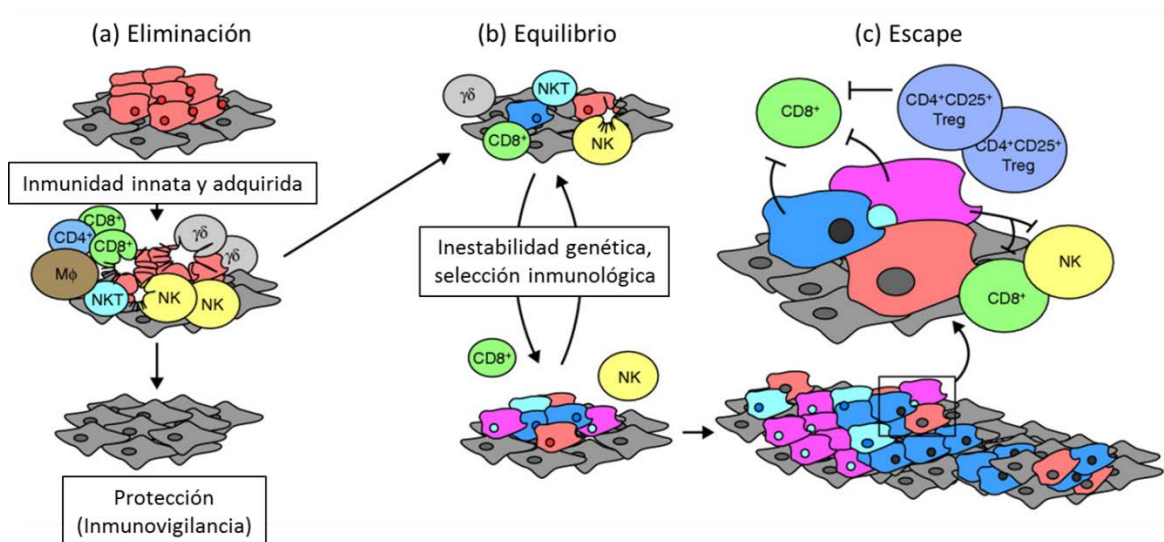


Figura 2. Representación del proceso de inmunoedición del cáncer descrito por Robert D. Schreiber.

Introducción

La fase de eliminación incluye el concepto original de inmunovigilancia. Por definición, cuando es capaz de eliminar completamente el tumor, representa el proceso de edición completo, sin progresión a las fases siguientes. Al principio de la fase de eliminación, una vez que los tumores sólidos alcanzan un cierto tamaño, comienzan a crecer de manera invasiva, lo que hace que necesite un aumento del suministro sanguíneo que se produce como consecuencia de la producción de proteínas angiogénicas y estromagénicas (90). La invasión del tejido adyacente al tumor induce ciertas señales inflamatorias, que desencadenan la activación de varios mecanismos de las respuestas inmunitarias innatas (NKT, NK, $LT\gamma\delta$, macrófagos y células dendríticas) (83, 91, 92) y adquiridas (células TIL, LT CD4+ helper, LT CD8+) (93-96), además de la producción de IFN- γ (97-99) e IL-12 (82). Esto induce más muerte de células tumorales a través de la acción del TNF, perforinas y metabolitos reactivos de oxígeno y nitrógeno (79, 100-103).

En la fase de equilibrio, el sistema inmunológico del huésped y aquellas células tumorales que hayan sobrevivido al proceso de eliminación, entran en un equilibrio dinámico. En este proceso, los linfocitos y el IFN- γ , ejercen una potente presión selectiva sobre las células tumorales, que es suficiente para contenerlas, pero no para eliminarlas completamente, permaneciendo un remante de células genéticamente inestables y con una alta capacidad de mutación. Durante este periodo de selección darwiniana, la mayoría de las variantes tumorales aparecidas son destruidas, pero otras variantes pueden llegar a resistir el ataque del sistema inmunológico. Este es el motivo por el cual el equilibrio es el proceso más largo de los tres procesos descritos y puede suceder durante un periodo de varios años.

En el proceso de escape, las variantes tumorales supervivientes que han adquirido una resistencia al reconocimiento y a la eliminación mediada por el sistema inmunitario, comienzan a expandirse de forma descontrolada. El resultado es la aparición de la enfermedad maligna clínicamente observable que, en muchas ocasiones, termina con la muerte del huésped.

2.2. Mecanismos inmunológicos frente al cáncer

Existen frente a los tumores, como frente a cualquier estructura “no propia”, dos tipos de respuesta inmune de características cuantitativa y cualitativamente diferentes: la inmunidad innata o respuesta natural y la inmunidad adquirida o adaptativa (104). La primera es aquella que se posee en ausencia de inmunización o contacto previo con el/los antígenos; por el contrario, la inmunidad adquirida se desarrolla tras el reconocimiento del antígeno y no sólo no existe en el momento del primer contacto, sino que requiere un tiempo posterior hasta su establecimiento (105). El componente celular de la inmunidad innata incluye a granulocitos, macrófagos, mastocitos, células dendríticas y células NK. En el caso de la respuesta adaptativa, las células o componentes implicados son los linfocitos B productores de anticuerpos y los linfocitos T CD4+ y CD8+. Las células NKT y los linfocitos $T\gamma\delta$ operan interconectando ambos tipos de respuestas (Figura 3). Además, dentro de la respuesta inmunitaria innata hay que reseñar el papel que tienen el IFN- γ , el sistema del complemento y los anticuerpos naturales (NAb).

Pese que a las moléculas de reconocimiento y las células que participan en la inmunidad natural se consideran menos específicas, de menor afinidad y en general menos potentes que las que aparecen en la inmunidad inducida (105-107), siempre tienen la ventaja de estar presentes desde el comienzo de la transformación maligna, cuando el número de células en el foco tumoral es muy pequeño. Los mecanismos inmunes adquiridos aparecen cuando el tumor ya ha proliferado y una parte de sus células pueden, mediante sus mecanismos de escape, sobrepasar la capacidad de la respuesta que se haya inducido (108). Una respuesta inicial rápida, posteriormente mantenida y amplificada por otros sistemas de reconocimiento más específicos, constituye la secuencia ideal de una buena defensa frente lo extraño (109). Debido a las características biológicas de las células tumorales, la adquisición de los mecanismos de inmunidad natural es de extraordinaria importancia en la lucha contra el cáncer (110, 111).

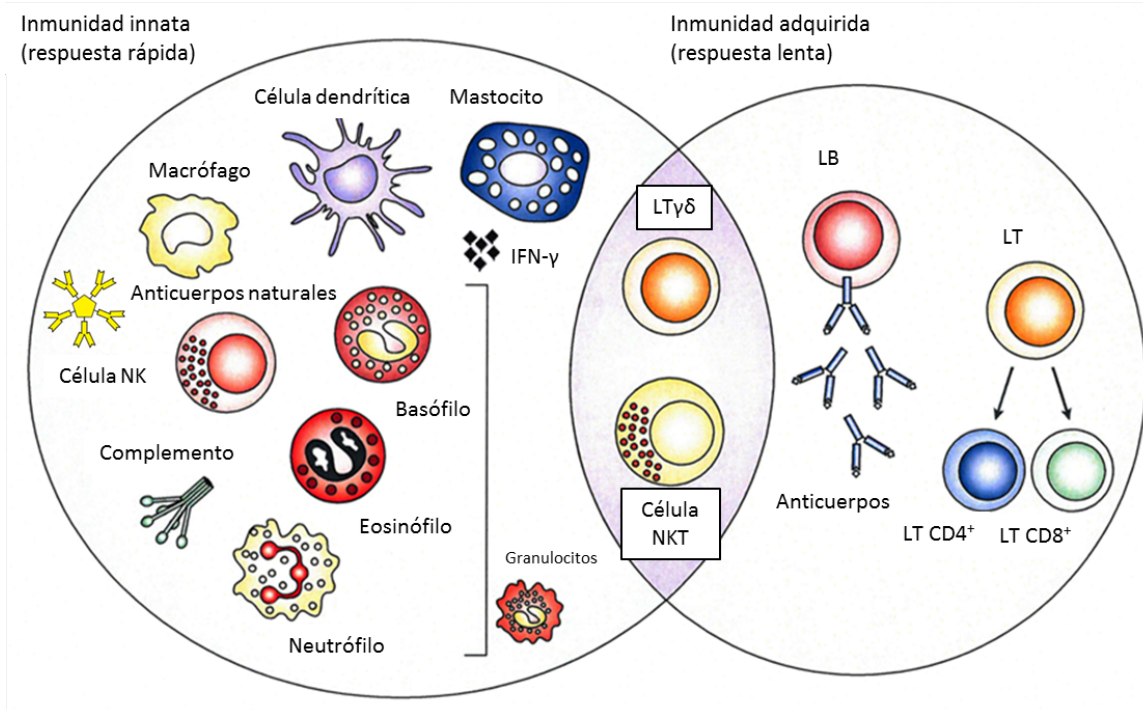


Figura 3. Representación de los mecanismos inmunológicos frente al cáncer. Interconexión entre inmunidad Innata e inmunidad adquirida.

2.2.1. La inmunidad innata

Los mecanismos T-independientes son los que han demostrado tener mayor importancia en el fenómeno de la inmunovigilancia del cáncer (110, 112, 113). Actúan a través de células con actividad citotóxica natural (incluyendo células NK, NC, macrófagos, granulocitos, células T no restringidas por MHC), caracterizadas por su capacidad para lisar células tumorales sin inmunización previa, no estar restringidas por MHC y no tener memoria inmunológica (110, 112-114); y moléculas solubles específica (anticuerpos naturales) o inespecíficas (complemento) (115).

La activación de las células T, NK y NKT, a través de su función citotóxica y de la producción de IFN- γ , produce la inhibición del crecimiento tumoral. Además, la liberación al medio extracelular de moléculas de estrés induce la activación de los macrófagos y de las células dendríticas, lo que desemboca en la producción de IL-12 y la transición a procesos de inmunidad adquirida.

Las células NK constituyen una pieza clave en las respuestas innatas contra los tumores. Se sabe que la falta de células NK se asocia a una mayor frecuencia de malignidad (116). Las células NK se caracterizan por su habilidad para lisar células tumorales deficientes en MHC de clase I. Son capaces de detectar células transformadas al reconocer de forma específica, a través de receptores como el NKG2D, a moléculas que aparecen en fenómenos neoplásicos o de estrés (117). Estas células utilizan varios mecanismos efectores, como la molécula perforina y la producción de IFN- γ .

Las células NKT presentan una forma constante del receptor α de la célula T, específico de antígenos glicolípidicos, y marcadores de células NK, como el CD161 o el NKR-P1 (118). Se ha observado un defecto, tanto en número como a nivel funcional, en una gran cantidad tumores sólidos y hematopoyéticos. La eliminación de las células tumorales se produce por medio de la producción de IFN- γ , lo que contribuye a la activación de las células NK y los LT CD8+. En función de su vía de activación, son capaces de producir tanto citoquinas Th1 como Th2.

Los LT $\gamma\delta$ son una población celular pequeña que integra características tanto de la inmunidad innata como de la adquirida. Su TCR presenta una capacidad de reconocimiento mucho menor que los linfocitos convencionales $\alpha\beta$, reconociendo patrones fundamentalmente de lípidos y fosfoantígenos (119). Están presentes en la piel, el tracto gastrointestinal y el genitourinario. Los LT $\gamma\delta$ sirven como fuente principal de IFN- γ durante las fases iniciales del desarrollo del tumor, pudiendo mediar fenómenos de citotoxicidad directa. Además, estas células pueden funcionar como presentadoras de antígeno preparando a los LT $\alpha\beta$ frente a los antígenos solubles (120).

Los macrófagos son un componente fundamental de la respuesta celular frente a los tumores. Constituyen el componente mayoritario del infiltrado leucocitario presente en muchas lesiones tumorales (121, 122). La liberación de moléculas de estrés induce la activación macrofágica, vía TLR, desencadenando la producción de metabolitos reactivos de oxígeno y nitrógeno y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Los macrófagos activados están dotados de una potente actividad citotóxica *in vitro*, selectiva para células tumorales (123, 124); tanto en ausencia como

Introducción

en presencia de anticuerpos (125, 126). Sin embargo, se ha visto que los macrófagos, además de estos efectos antitumorales, pueden mediar efectos perniciosos por medio de la secreción de moléculas angiogénicas, factores de crecimiento y metaloproteasas (127).

Los granulocitos también son capaces de inducir la muerte tumoral a través de las moléculas tóxicas liberadas en sus gránulos (mieloperoxidasa, lisozima, defensinas, catepsina G, fosfatasa alcalina), la generación de metabolitos reactivos de oxígeno. Además, median la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. En algunos casos, la eficacia de la respuesta de neutrófilos, requiere la acción de una respuesta adaptativa (128). Se ha visto que, por otro lado, los neutrófilos pueden potenciar el crecimiento tumoral mediante la secreción de metaloproteasas o elastasas (129, 130).

2.2.2. La inmunidad adquirida

La respuesta adquirida frente al tumor, comienza generalmente con la captación de antígenos tumorales por las células dendríticas. Estas, procesan los antígenos, los presentan a través de las moléculas MHC de clase I y II, migran a los nódulos linfáticos, y estimulan a los LT y LB antígeno-específicos. Una respuesta de células T CD4+ productiva promueve una potente y duradera respuesta LT CD8+ lo que contribuye, a su vez, a una mayor maduración de las células dendríticas (131). La expresión del ligando de CD40 en los LT CD4+ desencadena la señalización a través del CD40 en las células dendríticas, lo que promueve la producción de IL-12 y la diferenciación de las células Th1 productoras de IFN- γ y de los LT citotóxicos. Los LT CD4+ también estimulan la producción de anticuerpos antitumorales, a través de las células B. Estos anticuerpos tienen una gran variedad de funciones. Pueden cooperar con componentes del sistema inmunitario innato presentes en el microambiente tumoral, como el complejo del complemento o pueden mediar fenómenos de ADCC (citotoxicidad celular mediada por anticuerpos). Los anticuerpos, además, pueden opsonizar células tumorales (132).

La importancia de la respuesta adaptativa en la inmunovigilancia del cáncer se confirmó, como antes señalamos, en los animales RAG-2^{-/-}, carentes de LB, LT $\alpha\beta$, LT $\gamma\delta$ y células NKT (81). Estos animales manifiestan una susceptibilidad mayor a la aparición de tumores inducidos químicamente. Estudios posteriores realizados en animales deficientes en LT $\alpha\beta$ o LT $\gamma\delta$ revelaron un aumento de la susceptibilidad similar a la observada en los RAG-2^{-/-}, resaltando el papel clave de los LT en la protección frente los tumores. De forma consecuente con estos datos, la presencia de LT infiltrantes en los tumores, en varios tipos de cánceres, correlaciona con la ausencia de metástasis tempranas y con el aumento del periodo libre de enfermedad.

2.2.3. Mecanismos efectores antitumorales

Las citoquinas presentes en el microambiente tumoral van a determinar, en gran medida, la evolución del mismo induciendo su rechazo o promoviendo su crecimiento. En este sentido, y como antes hemos indicado, el IFN- γ es crítico para la supresión del tumor. Esta función se lleva a cabo por varias vías, como la inhibición de la angiogénesis, la activación de células fagocíticas y la producción de IL-12 por medio de las células dendríticas, lo que a su vez promueve respuestas Th1 y respuestas T citotóxicas.

Existen otras citoquinas que desempeñan papeles muy importantes y variados, como la IL-2, IL-15, IL-21, IL-12, IL-18, IL-17, IL-23 y el GM-CSF. La IL-2 activa potentemente las células citotóxicas de la inmunidad innata y las de la adquirida. Las IL-15 e IL-21 regulan la homeostasis y promueven la proliferación de las células NK, NKT y LT CD8⁺ (133). La IL-12 y la IL-18 estimulan a las células de la inmunidad adquirida para que secreten IFN- γ (117). La IL-23 promueve la expansión y activación de las células Th17, un subgrupo de linfocitos CD4⁺ que es crítico en fenómenos de inflamación, y la expresión de IL-17. (134, 135). El GM-CSF es capaz de estimular la producción, maduración y activación de los granulocitos, macrófagos y células dendríticas.

Entre los mecanismos citotóxicos más importante existentes frente a las células tumorales, las perforinas-granzimas desempeñan un papel crítico, tanto en la inmunidad innata como la adquirida (79). Los receptores de muerte celular

Introducción

relacionados con la superfamilia del TNF, constituyen el segundo mecanismo en importancia de la citotoxicidad celular. Estos receptores incluyen a la molécula TRAIL, al sistema fas-fas ligando, etc.

2.2.4. Células T reguladoras y células naturales supresoras

Es importante mencionar un par de poblaciones celulares que, en los últimos años, han demostrado ser claves en el fenómeno de inmunosupresión que permite a los tumores esquivar al sistema inmunitario. Estas células son los linfocitos T reguladores (Treg) y las naturales supresoras.

Las células T reguladoras (Treg) fueron identificadas por primera vez por Gershon y colaboradores en 1974 (136) y corresponden con una población de linfocitos con propiedades tolerogénicas. Las células Treg incluyen a células tanto CD4+ como CD8+. La población de células Treg más estudiada expresa las moléculas CD4+, CD25+ y Foxp3+ (137, 138). Los LTreg son responsables de la tolerancia inmunológica frente al desarrollo del tumor y tienen la capacidad de inducir el crecimiento tumoral en la mayoría de los diferentes tipos de cánceres (139-142). Además, en todos ellos se ha visto que hay un incremento de los linfocitos Treg CD4+/CD25+, en aquellos pacientes con cánceres avanzados (143-147), existiendo una correlación inversa entre el número de células Treg y el tiempo de supervivencia del paciente (148).

Las células naturales supresoras (MDSC) corresponden con una población heterogénea de células mieloides mononucleares inmaduras, derivada de médula ósea, que poseen una actividad supresora. Esta actividad es capaz de suprimir, de forma inespecífica, la respuesta proliferativa de los linfocitos (149-153). Dentro de estas células podemos encontrar precursores de granulocitos, macrófagos y células dendríticas. En ratones, se caracterizan por la expresión de los marcadores CD11b y Gr-1 y en humanos por la expresión de los marcadores mieloides CD33 y CD11b y por la falta de marcadores de linfocitos, células NK, monocitos y células dendríticas (154, 155). Estas células supresoras son activadas por los linfocitos T, para posteriormente inhibir la función de las células T CD4+, CD8+, células NK (a través de la producción de arginasa 1 y de la iNOS) e inducir a los LTreg (153). Se ha observado un incremento de

las células MDSC en pacientes con cáncer y que este mayor número correlaciona con un peor pronóstico (156-159).

3- LOS ANTICUERPOS NATURALES (NAb)

Durante el siglo pasado, se observó que el suero normal animal y humano contenía sustancias capaces de neutralizar toxinas y de aglutinar bacterias y eritrocitos (160, 161). A estas sustancias se les denominó anticuerpos. Con el transcurso de los años, se han visto anticuerpos dirigidos frente bacterias, virus, protozoos, parásitos y toxinas (162). Además, desde un primer momento, se vio que estos anticuerpos eran capaces de reconocer constituyentes del propio organismo. Este fenómeno hizo que Karl Landstainer, gracias a la existencia de anticuerpos específicos anti-eritrocitos en el suero de individuos sanos, pudiera descubrir los denominados grupos sanguíneos. Observó que el suero de individuos de grupo sanguíneo A, contenía anticuerpos (isohemoaglutininas), que reconocían sustancias del grupo B, y viceversa. Este descubrimiento fue importante por su significado inmunológico. Las isohemoaglutininas se encuentran ampliamente distribuidas, siendo una característica de cada especie y variando entre individuos. Al contrario de lo observado con los anticuerpos antibacterianos, no hay diferencias importantes entre la actividad de los anticuerpos no inducidos (naturales) y los inducidos contra los eritrocitos, lo que indica que la inmunización juega un papel secundario en la formación de anticuerpos naturales (NAb) frente a estas células. Las isohemoaglutininas reaccionan contra los eritrocitos de individuos de la misma especie, participando en el proceso de rechazo y constituyendo una barrera en las transfusiones sanguíneas. Además, el suero de todas las especies animales examinadas contiene anticuerpos capaces de reconocer los eritrocitos de otras especies animales. La clase, número y actividad de esos anticuerpos varían entre especies, y entre individuos de la misma especie (161-163).

En general, se habla de NAb porque están presentes en el suero de individuos sanos (en humanos, ratones, ratas, conejos, peces) sin inducción previa aparente de las células B por antígenos o mitógenos (164, 165).

Introducción

De acuerdo con la teoría de la selección clonal de Burnet (166), los clones autoreactivos no existen ya que son eliminados durante la ontogenia. En consecuencia, los NAb que reaccionan con antígenos propios, deberían corresponder con situaciones aberrantes o anormales.

Estudios más recientes han aportado nuevos e importantes datos. El mensaje principal de esta información es que el repertorio normal o pre-inmunizado está constituido principalmente por anticuerpos polireactivos capaces de reconocer tanto antígenos propios como no propios. Este descubrimiento, completamente contradictorio con la teoría de Burnet, todavía se acepta con cierto grado de escepticismo.

La mayor parte de los NAb, independientemente de su especificidad, son IgM y con menor frecuencia IgG e IgA (165, 167, 168); aunque Avrameas y colaboradores encontraron una importante actividad natural de autoanticuerpos IgG en fracciones séricas libre de IgM, que en condiciones fisiológicas suponen estaría “enmascarada” (169). La inmunoglobulina M (IgM) es uno de los cinco isotipos de inmunoglobulina (G, A, M, E, D) presentes en mamíferos, constituyendo un 6% de la población presente en sangre. También se encuentra presente en elasmobranchios, teleósteos, anfibios, reptiles y aves, siendo uno de los anticuerpos más antiguos en la historia evolutiva. Es la inmunoglobulina más grande (950 KDa), aunque el tamaño no se debe exclusivamente al peso molecular real de la molécula, sino que ésta presenta la capacidad, a través de su región Fc, de interaccionar con otras cuatro moléculas de IgM, formando un complejo de alto peso molecular de cinco moléculas (Figura 4).

La capacidad de la IgM para formar estos complejos - lo cual le da gran facilidad para unir el complemento - es la que le posibilita la opsonización de determinados antígenos, provocando la lisis de bacterias, cubiertas víricas y otros agentes patógenos. La IgM es el primer tipo de inmunoglobulina sintetizada en respuesta a una infección.

El origen de los anticuerpos naturales sigue siendo un tema controvertido: parte puede ser resultado de estimulación por agentes exógenos (bacterias y otros microorganismos o sus productos, macromoléculas de los alimentos) (170, 171), pero

se ha demostrado que los ratones crecidos en condiciones libres de gérmenes tienen también células B productoras en bazo, e IgM en suero, con especificidad para antígenos con los que no han tenido nunca contacto (167, 171).

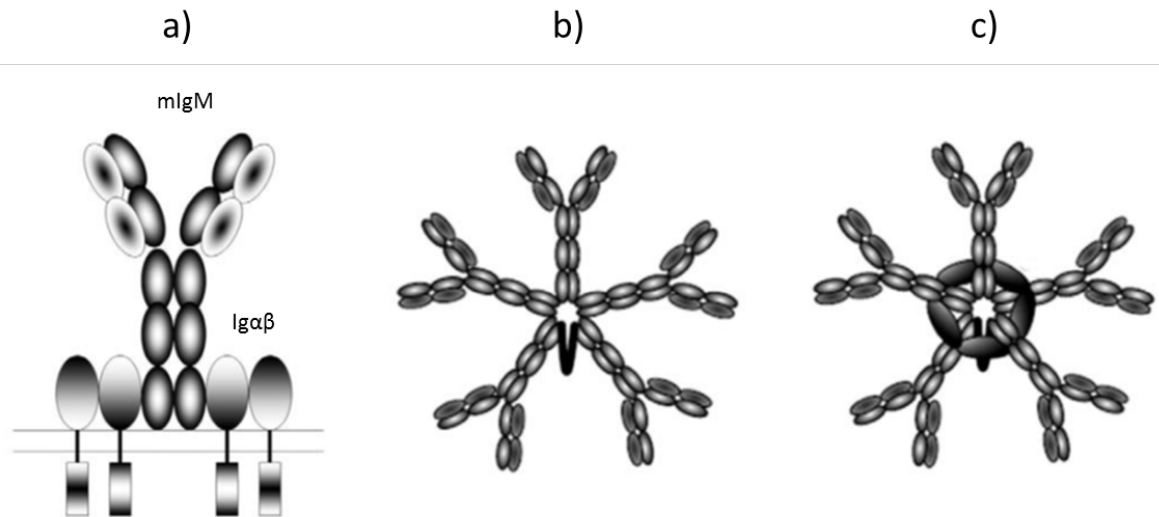


Figura 4. Estructura del receptor de célula B (a), IgM pentamérica (b), e IgM secretada (c).

Por este motivo se habla de una “actividad interna” del sistema inmune, resultado de la estimulación por antígenos endógenos, incluyendo las interacciones idiotípicas de los linfocitos B entre sí (167, 169). Hay descritos NAb con especificidades frente a una gran variedad de antígenos, como proteínas citoplasmáticas, de membrana, circulantes, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y haptenos (172-175).

Los NAb se caracterizan por ser, generalmente, anticuerpos polireactivos que presentan una baja afinidad y una alta avidéz, y cada uno de ellos corresponde con el producto de un único clon (176). Son sintetizados usando segmentos VH y VL no mutados o con escasas mutaciones, ya codificados en la línea germinal (177, 178). No es extraño, por tanto, que NAb con distintas especificidades expresen idiotipos comunes (179). Con frecuencia, Las células responsables de la síntesis de estos NAb son linfocitos B que tienen alta expresión de IgM y baja de IgD en su superficie y que se encuentran en mayor número en peritoneo y cavidad pleural, que en sangre periférica o bazo en el ratón; denominados linfocitos B1. Algunos de ellos (B1a) expresan además un antígeno propio de células T - el CD5 en humanos y Ly-1 en ratón -, y los que son

Introducción

negativos se denominan B1b (180-182), aunque las células B convencionales, entre ellas una subpoblación de LB alojados en la zona marginal del bazo los (LB MZ) (183), también pueden participar en sus síntesis.

No hay duda de que la mayoría de los NAb presentan una actividad contra antígenos dispares. Es posible que esta polireactividad refleje en realidad una capacidad extrema de diferenciar estructural tridimensionales presentes en diferentes moléculas. Si es así, hoy en día, los anticuerpos naturales podrían ser la única herramienta para discriminar diferencias mínimas entre estructuras biológicas altamente conservadas.

La idea previa de que los NAb son abundantes durante el periodo neonatal y no durante la vida adulta es simplemente errónea. Es correcto e interesante que los anticuerpos naturales aparecen pronto en la ontogenia, a pesar de la todavía inmadurez del sistema inmune, pero no existe una disminución durante la vida del adulto, ni en su número ni en su espectro.

En la misma línea, con frecuencia se establece que la interconectividad idiotípica establecida durante la ontogenia temprana es una característica del repertorio de células B neonatales. Sin embargo, se ha observado que los adultos también poseen una densa red idiotípica que funciona no sólo entre el isotipo IgM, como en recién nacidos, sino también entre los anticuerpos naturales IgG e IgG, e IgM e IgG.

Los NAb se unen con antígenos propios con mucha constancia y facilidad. Avrameas y colaboradores observaron que el mismo anticuerpo era capaz de reaccionar con antígenos externos, y que la mayoría de las células provenientes de bazo de ratones normales sintetizan estos anticuerpos polireactivos. Este autor, lanzó la hipótesis (parcialmente confirmada) de que estos anticuerpos polireactivos deben estar codificados directamente por genes germinales y pueden ser los precursores de los anticuerpos monoreactivos específicos de los antígenos externos ambientales (184-186). Así, para responder a un estímulo externo, el sistema inmune debe ser capaz primero de reconocer lo propio.

Los NAb efectúan múltiples funciones. Las funciones biológicas que han sido descritas son las siguientes:

- Inmunoregulación
 - Interacciones idiotípicas (169, 187-189)
 - Modulación de la acción de citoquinas (190-195)
 - Interacción con células B y T (196-198)
- Fenómenos autoinmunes (199-206)
- Fenómenos de glomerulonefritis (203-206)
- Rechazo/protección frente injertos (171, 206-208)
- Eliminación de constituyentes propios alterados (209-211)
- Modulación tumoral (212, 213)
- Presentación antigénica (214-216)
- Eliminación/protección frente agentes patogénicos (194, 217-222)
- Expresión de actividades catalíticas (223-225)

Dependiendo de la situación, un anticuerpo natural puede desempeñar un papel fisiológico beneficioso, o patológico.

Por otro lado, los NAb son capaces de interactuar con moléculas presentes en la superficie de las células B y T, inhibiendo su crecimiento (LB) o suprimiendo su activación (LT) (196-198). De forma similar, existen NAb capaces de reconocer citoquinas, y por tanto, con funciones inmunoreguladoras (190-193). Las células B que presentan como receptores NAb desempeñan funciones importantes en el procesamiento y presentación de antígenos (214-216). En relación con los componentes propios alterados, estos anticuerpos contribuyen a la eliminación de los productos del catabolismo (209-211). De forma similar, los NAb incrementan la opsonización de los agentes patogénicos, contribuyendo a su eliminación del organismo (217-219).

La existencia de NAb que reconocen componentes de superficie de células tumorales es un hecho conocido ya antes del descubrimiento de las células NK y de la participación macrofágica en la reacción antitumoral (226).

Introducción

Su papel en la inmunovigilancia ha sido confirmado en varias revisiones y trabajos (227-229). Por ejemplo, existen modelos murinos en los que la proliferación tumoral se correlaciona con la reactividad de los NAb sobre las células tumorales (230-233). Por otra parte, resulta muy demostrativo que la especificidad de los NAb con actividad antitumoral está dirigida generalmente frente a carbohidratos (230-233), y que los ratones Xid, deficientes en la respuesta humoral a antígenos timo-independientes y cuyo suero presenta escasa reactividad frente a un amplio panel de tumores (234), tienen menor resistencia al desarrollo de algunos cánceres (233, 234). Los niños con la inmunodeficiencia de Wiskott-Aldrich, que tampoco producen anticuerpos frente a antígenos polisacáridos timo-independientes, sufren asimismo mayor incidencia de tumores (235). Por el contrario, la estimulación de los linfocitos B en ratones normales con activadores policlonales (LPS) aumenta los niveles de NAb con reactividad antitumoral y disminuye la frecuencia de crecimiento, cuando se trasplantan pequeñas dosis de tumores singénicos (230-236).

El mecanismo de acción de los Nab específicos de tumores no se conoce en profundidad. Se han propuesto mecanismos directos, en los que la simple interacción del anticuerpo y la célula diana tumoral sería suficiente para su efecto sobre la proliferación; por ejemplo por reconocimiento de receptores para factores de crecimiento (165, 234), o bien por la inhibición del anclaje de las células tumorales a la matriz extracelular (234). También existen mecanismos indirectos, en los que los Nab deben a la vez interactuar con otros sistemas efectores del huésped para ejercer su influencia sobre el crecimiento del tumor (165, 234, 237). Se ha demostrado experimentalmente que la primera posibilidad sería más bien excepcional (168), considerándose que, posiblemente, el anticuerpo sirve como molécula de reconocimiento que se une a la célula tumoral y coopera con otros efectores como macrófagos, linfocitos, plaquetas y complemento (237, 238). Respecto a la inmunidad humoral adquirida frente a los tumores, su existencia es dudosa para muchos autores; otros, aun demostrándola, indican que produce una escasa o nula protección, o incluso que potencia su crecimiento (239); pero hay modelos en los que los mecanismos efectores humorales pueden ser los más importantes en el control del crecimiento del tumor (240). En algunos modelos de leucemia y linfoma, los anticuerpos generados

podrían actuar directamente, bien por un mecanismo de supresión antiidiotípica (241) o por la inducción de apoptosis, al interactuar con antígenos relacionados con la diferenciación celular (242, 243).

Pero en general, los anticuerpos con efecto antitumoral (sean naturales, inducidos o transferidos pasivamente) actuarían activando funciones efectoras como la lisis por complemento o ADCC. La mayoría de los NAb con actividad antitumoral descritos son de clase IgM (168, 230, 234). Asimismo, muchos de los anticuerpos monoclonales obtenidos inmunizando con tumores humanos o frente a tumores espontáneos murinos son de este isotipo, y presentan especificidad contra determinantes de tipo carbohidrato expuestos en glicoconjugados de alto peso molecular (glicolípidos o glicoproteínas) (244, 245). Los antígenos reconocidos pertenecen al grupo de los llamados “antígenos asociados a tumores” (TAA). Estas moléculas se presentan en baja, aunque amplia expresión, en células no transformadas (células normales en determinados estados de diferenciación, células fetales), pero pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario (244-246). Los anticuerpos anticarbohidratos tienen algunas características que los diferencian de los anticuerpos contra proteínas u otros inmunógenos (247). Los anticuerpos contra antígenos timo-independientes tipo 2 son producidos por linfocitos B1 (248). La respuesta inmune que aparece, al ser estructuras polisacáridas repetitivas, no requiere la cooperación de linfocitos T, dando lugar a la producción de anticuerpos restringidos a las clases IgM e IgG3 en ratón; e IgM e IgG2 en humanos (107, 247, 248). Además, anticuerpos generados frente a carbohidratos diferentes expresan idiotipos comunes, y se ha sugerido que su síntesis está regulada por la red idiotípica, igual que la de los NAb (249).

El papel de los NAb durante la inmunovigilancia (en relación con la inmunidad innata) es importante (227-229), y aunque previamente se ponía en duda, constituye una de las primeras línea de defensa en la lucha contra las células tumorales. El mecanismo mediante el cual ejercen este papel no está todavía del todo aclarado, pero se sabe de la participación de la cascada del complemento, por medio de la unión de la molécula C1q (250-252). No está claro si existen mecanismos de citotoxicidad

Introducción

celular mediada por complemento (ADCC) en los que participe la IgM natural, aunque parece que en este sentido, los NAb de clase IgG sí deberían participar. Recientemente se ha demostrado la presencia del receptor $Fc\alpha/\mu R$, además de en la mayoría de los linfocitos B, en los macrófagos (253), lo que posibilitaría un mecanismo de ADCC en el que participarían la IgM natural y las células macrofágicas.

Independientemente de esta posible ADCC, nuestro grupo describió hace unos años, en el modelo experimental del tumor murino de Ehrlich, un mecanismo mediante el cual los anticuerpos IgM que reconocen carbohidratos asociados a tumores, pueden aumentar la adhesión celular entre macrófagos y células tumorales por un mecanismo de tipo lectina (254, 255). Este mecanismo sería similar al ya conocido y denominado citotoxicidad celular dependiente de lectina (LDCC). Una lectina es una proteína que une azúcares por varios lugares, pudiendo hacer de puente entre la célula tumoral y la célula efectora del sistema inmunitario. Al unir ambas poblaciones celulares, la IgM podría potenciar la actuación de los mecanismos efectores citostáticos del macrófago, dando lugar a la inhibición de la proliferación tumoral (256).

Otros autores han descrito la apoptosis como el mecanismo efector principal de muerte celular de los NAb (257-260). Vollmers y colaboradores observaron cómo anticuerpos monoclonales derivados de NAb eran capaces de lisar células neoplásicas de origen epitelial, a través de la inducción de la apoptosis. Este mecanismo de muerte celular está mediado por la unión de los anticuerpos a receptores específicos de superficie que inducen estrés celular. Se han encontrado anticuerpos que, por ejemplo, se unen con receptores del complemento, bloquean receptores de crecimiento celular o incrementan los niveles intracelulares de lípidos neutros. En este sentido, el anticuerpo monoclonal IgM SAM-6, que deriva de un anticuerpo natural IgM de un paciente con cáncer gástrico, se une específicamente a un carbohidrato (O-linked) localizado en un receptor de membrana presente sólo en tumores. Esta unión induce la apoptosis, por medio de la acumulación de lípidos intracelulares, como colesterol y triglicéridos, que promueven la liberación del citocromo-c y la activación de las caspasas 3, 6, 8 y 9 (261, 262).

4- EL TUMOR DE EHRLICH

Nuestro modelo experimental, el tumor de Ehrlich (ET), es un adenocarcinoma mamario de origen espontáneo, surgido a principios del siglo pasado (263). A través de su paso por múltiples cepas de ratones se han originado numerosas variantes (264). Las más estudiadas son la hiperdiploide (45 cromosomas) o de Ehrlich-Lettré y la hipotetraploide. Ambas exhiben alta estabilidad en su patrón cromosómico (265). Las células ET no expresan antígenos H-2 (266), por lo que es trasplantable entre ratones de cepas abiertas o de distintas cepas singénicas, creciendo prácticamente en todas las probadas (265, 267), aunque el comportamiento del tumor varíe entre ellas. El ET crece en forma sólida habiendo sido adaptado a forma ascítica en 1932. Así es como se ha mantenido fundamentalmente en los laboratorios desde entonces. Requiere muy pocas células para su crecimiento, siendo la DL_{50} 102 células por vía intraperitoneal (ip) en ratones A2G (265). El ET crece rápidamente y acaba matando a los animales en poco tiempo; la inyección de 10^6 células ip causa su muerte entre 8 y 20 días tras el inóculo (265). Este comportamiento agresivo ha hecho que se le considere un tumor poco o nada inmunogénico. Sin embargo, varios grupos han investigado la respuesta inmune frente al tumor, y demostrado que los portadores del ET presentan cambios característicos de estimulación antigénica en las células de bazo y ganglios, así como la presencia de inmunoglobulinas del huésped absorbidas en la superficie de las células tumorales (268). Además, los ratones en los que, de modo excepcional, el tumor no crece, quedan protegidos frente a un inóculo posterior del tumor, y es fácil inmunizar animales con células desvitalizadas (269, 270). En los animales así inmunizados, se ha asociado la presencia de aglutininas en suero a la protección frente al crecimiento del ET (271). En nuestro laboratorio, la respuesta inmune contra la variante hiperdiploide de Ehrlich-Lettré ha sido objeto de estudio en los últimos años. Sabemos que existe relación entre el desarrollo de una respuesta humoral y el crecimiento del ET en distintas cepas de ratones: la presencia de anticuerpos IgM contra el tumor en el suero es determinante para que, tras la inmunización (activa o pasiva), los ratones queden protegidos (272).

Introducción

Todos estos datos sugieren que el ET es potencialmente inmunogénico, pero que la respuesta inmune generada no es capaz de evitar su crecimiento en ratones no inmunizados; probablemente debido a los mecanismos de escape que nuestro grupo y otros autores hemos descrito en este modelo: disminución de la actividad NK a lo largo de la evolución del tumor (273), presencia de factores inmunosupresores - inhibidores de la producción de IFN, de la función de macrófagos y linfocitos - (274, 275), liberación de los antígenos asociados al tumor y aparición de células mieloides naturales supresoras (MDSC) (150). Así, el tumor puede inducir un estado de inmunodepresión en los portadores, que de hecho se manifiesta en un descenso de la inmunidad humoral (276), retraso en el rechazo de trasplantes e inhibición de las reacciones de hipersensibilidad retardada (277).

El ET comparte con otros tumores la capacidad de liberar, rápida y espontáneamente, material de su superficie al medio extracelular. El 50% de sus glicoproteínas de membrana se libera a 4°C en 60 minutos (278, 279). Entre este material se liberan gangliósidos, asociándose este hecho a un mayor crecimiento tumoral (280). Además, se ha visto que los gangliósidos presente influyen notablemente en la biología y en el patrón de crecimiento del tumor (281, 282). Las células tienen una composición alterada en los carbohidratos del glicocalix (278); sus azúcares han sido estudiados en términos de aglutinación con lectinas vegetales (283, 284). Además, se ha visto que entre el material de la membrana celular de naturaleza carbohidrato, que se libera de forma espontánea al medio, hay una alta proporción de residuos galactosidados, estando contenidos en glicoproteínas de un tamaño molecular alto y heterogéneo (285, 286).

La especificidad de los anticuerpos IgM del suero de ratones inmunizados, y de anticuerpos monoclonales IgM contra el ET obtenidos en el laboratorio (287), ha sido parcialmente caracterizada, estando dirigida frente a carbohidratos de la superficie del tumor (272, 287). Estos antígenos carbohidratados asociados al tumor son liberados, en estructuras de alto peso molecular, al medio extracelular a medida que el tumor progresa, apareciendo en el suero y líquido ascítico de los animales portadores (150). Debido a la absorción de la actividad IgM por este antígeno libre; las inmunoglobulinas

específicas, aunque producidas en los portadores del tumor, resultan indetectables en sus sueros (150).

Al ser alotrasplantable, el ET ofrece la posibilidad de comparar la resistencia al crecimiento de dosis umbrales del tumor y la presencia de NAb en distintas cepas de ratones, de las que se conocen sus diferencias en otros mecanismos efectores de la inmunidad natural (por ejemplo; actividad NK, activación macrofágica, actividad lítica del complemento). En este sentido, nuestro grupo descubrió que los niveles de anticuerpos naturales IgM correlacionan de forma positiva con esta resistencia, y que además estos anticuerpos reconocen una estructura de membrana de tipo carbohidrato relacionada con D-Galactosa (150). Además, se ha descrito la presencia de anticuerpos naturales IgM en sueros humanos normales, con afinidad por residuos D-Galactosa, y con capacidad para lisar las células ET por medio del complejo del complemento (288). En experimentos posteriores, observamos que tanto la IgM policlonal específica obtenida tras inmunización con el ET, como el anticuerpo monoclonal A10 (IgM), presentaban la capacidad de inhibir la proliferación del tumor tanto *in vivo* como *in vitro* (287). Como antes mencionamos, los macrófagos participaban en esta inhibición, igual que había sido descrito para la resistencia mediada por NAb con actividad antineoplásica, en otros modelos tumorales (236, 256). Los macrófagos llevarían a cabo esta función promoviendo la citostasis de la célula tumoral mediante un mecanismo parecido al LDCC, en el que la IgM actuaría como enlace entre la célula tumoral y el macrófago (256).

5- CARBOHIDRATOS TUMORALES

El proceso de glicosilación es la modificación postranscripcional, junto con la fosforilación, más importante descrita en las células de mamíferos. La formación de las estructuras sacáridas complejas contenidas en las glicoproteínas y glicolípidos se produce en el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático. Este fenómeno afecta directamente a procesos fundamentales, como el plegamiento y el tráfico proteico, las interacciones célula-célula y célula-matriz, la diferenciación celular y la respuesta inmunitaria (289-293). La glicosilación requiere la acción específica de las enzimas glicosiltransferasas. Su número es muy grande, conociéndose en la actualidad cerca de 200 enzimas con esta actividad (294).

En humanos, el proceso de glicosilación se puede clasificar en dos tipos: la N-glicosilación, que se produce a través del grupo amida de los residuos de asparagina en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr; y la O-glicosilación, unión de azúcares por medio del grupo hidroxilo de los aminoácidos serina, lisina o hidroxilisina.

Estos carbohidratos pueden existir como componentes de las proteínas de membrana o como componentes de las moléculas secretadas que forman la matriz extracelular.

Se sabe que algunos cambios en las estructuras sacáridas están asociados a algunos eventos fisiológicos y/o patológicos, como el crecimiento, la migración y la diferenciación celular. Además la glicosilación aberrante que se produce en las células tumorales puede influir en la proliferación, la movilidad celular y en fenómenos de adhesión, angiogénesis y metástasis (295, 296). La transformación neoplásica se asocia frecuentemente con la expresión de antígenos oncofetales, que no aparecen en tejidos adultos sanos. Además, en numerosos estudios se ha observado una correlación entre la expresión de estas estructuras de tipo carbohidrato alteradas y el pronóstico de la enfermedad. Estas alteraciones, como la sobreexpresión, la aparición de estructuras truncadas o el cambio de los patrones de las ramificaciones de las cadenas de azúcares, correlacionan con el crecimiento celular potenciando la capacidad proliferativa de las células tumorales.

La glicosilación aberrante es un fenómeno ampliamente estudiado que se produce durante el proceso oncogénico (297-299). La O-glicosilación de las mucinas comienza con la adición de una molécula GalNac a un residuo de Ser o Thr, y representa una de las formas de glicosilación más frecuentes en animales. Entre un 50-90% del peso de una mucina corresponde con la parte sacárida unida mediante enlaces O-glicosídicos. Las mucinas pueden clasificarse en mucinas secretadas o mucinas transmembrana. Los carbohidratos presentes en las mucinas de la superficie de la célula modulan la interacción con el entorno, a través de la unión con lectinas y antígenos. En función de las cadenas sacáridas presentes, las mucinas pueden presentar propiedades pro- o anti-adhesivas.

Desde hace años se sabe que las mucinas se encuentran sobreexpresadas en las células tumorales (300-302). Además, las estructuras sacáridas aberrantes presentes en las mucinas pueden modificar las propiedades antigénicas y adherentes de las células neoplásicas, potenciando su capacidad para migrar al facilitar su liberación desde el tumor primario, promoviendo los procesos de metástasis.

Otro de los fenómenos que se encuentran de forma habitual en las mucinas tumorales es la glicosilación incompleta. En varios tipos de tumores humanos se ha visto la expresión de estructuras truncadas, como los antígenos T, Tn y sialil-Tn (303-307). La Figura 5 representa las principales estructuras de los core glicanos descritas que aparecen en la molécula MUC-1 tumoral.

Dado que estas estructuras no aparecen en tejidos sanos, pueden inducir respuestas inmunológicas en los pacientes. De hecho, la expresión de los antígenos Tn (GalNac) y T (Gal β 1-3GalNac), en varios tipos de carcinomas, correlaciona con la aparición de anticuerpos específicos y con el pronóstico de la enfermedad.

La aparición de estas estructuras sacáridas aberrantes puede deberse a defectos en los orgánulos que participan en este proceso (retículo endoplasmático y Golgi) y a la expresión defectuosa de las glicosiltransferasas implicadas.

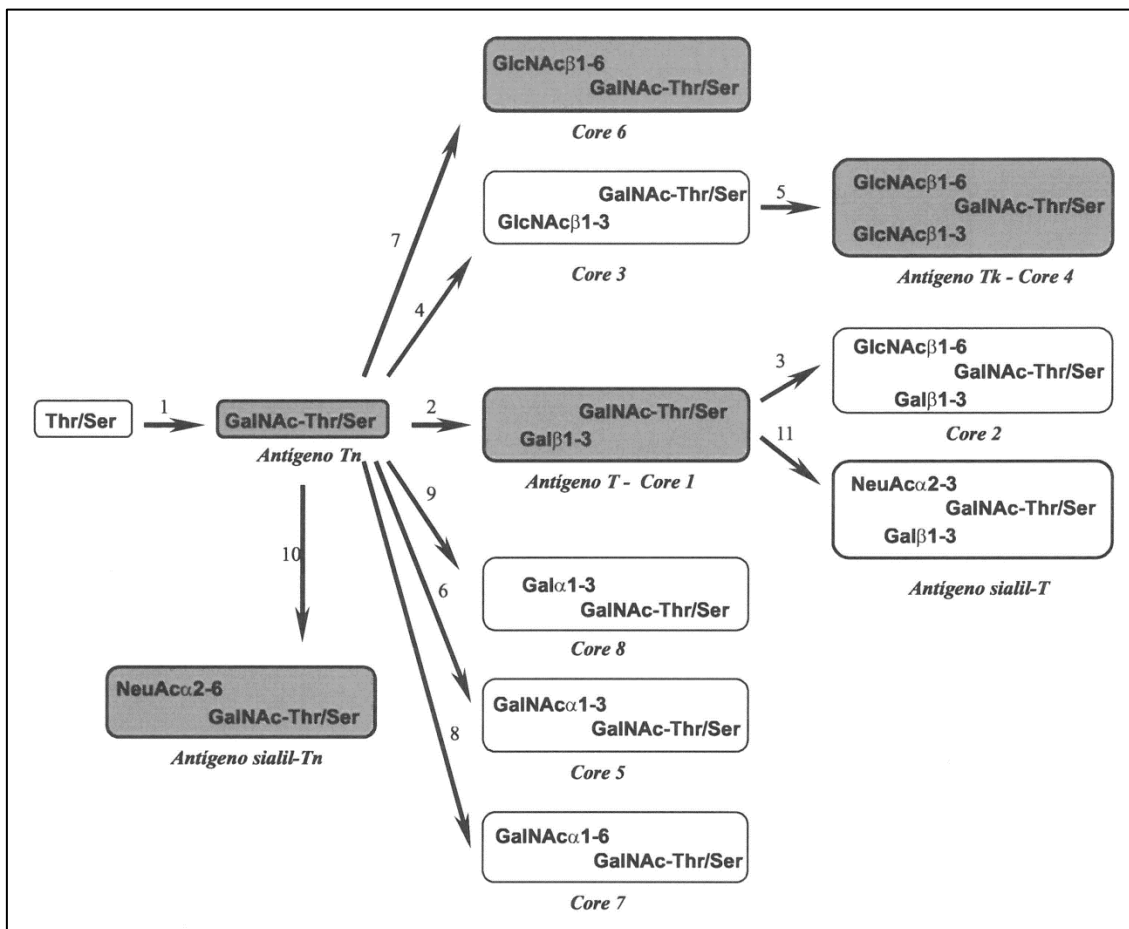


Figura 5. Estructuras de los core glicanos de los antígenos asociados a tumores en mucinas.

El primer paso de la O-glicosilación consiste en la adición de GalNAc a un residuo de Thr o Ser de la cadena polipeptídica por efecto de la ppGalNAc-T (paso 1). Posteriormente se pueden formar 8 cores glicanos por la acción de diferentes glicosiltransferasas: core 1 β3Gal-T (paso 2), core 2 β6GlcNAc-T (paso 3), core 3 β3GlcNAc-T (paso 4), core 4 β6GlcNAc-T (paso 5), core 5 α3GalNAc-T (paso 6), core 6 β6GlcNAc-T (paso 7), core 7 α6GalNAc-T (paso 8) y core 8 α3Gal-T (paso 9). La sialización de los antígenos Tn y T por las enzimas α6-sialyl-T (paso 10) y α3-sialyl-T (paso 11) respectivamente, conlleva el bloqueo de la O-glicosilación y por tanto de la elongación.

De la misma forma que hay descritos fallos en la O-glicosilación, también existen, en diferentes patologías, en la N-glicosilación. Además, la mayoría de los biomarcadores empleados para el diagnóstico, el pronóstico y la predicción son proteínas N-glicosiladas (308, 309). Entre estos marcadores están la α1-antiquimiotripsina (310, 311), la Gal3BP (312, 313), etc. Se han encontrado también alteraciones en las ramificaciones N-glicosiladas presentes en muchas neoplasias, encontrándose un aumento de la estructura β1-6. Estas alteraciones afectan a varias funciones biológicas, como la son la transducción de señales, la adhesión, la movilidad y la proliferación celular. De esta forma, es razonable pensar que la alteración de la

actividad de las diferentes glicosiltransferasas pueda afectar a los procesos tumorales, influyendo en la capacidad de migración, invasión y la generación de metástasis de las células cancerosas (314). La Tabla 2 resume las estructuras de tipo carbohidrato descritas en la actualidad, que aparecen con mayor frecuencia en las células tumorales.

Tabla 2. Estructuras de tipo sacárido más importantes presentes en cáncer.

| Estructura | Expresión |
|--|---------------------|
| T (TF, core 1) (Gal β 1-3GalNAc) | Alta expresión |
| Sialil-T (NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc) | Alta expresión |
| Tn (GalNAc) | Alta expresión |
| Sialil-Tn (NeuAc α 2-6GalNAc) | Alta expresión |
| Sialil-Lewis ^a (NeuAc α 3Gal β 3(Fuc α 4)Gal β -) | Alta expresión |
| Sialil-Lewis ^x ((NeuAc α 3Gal β 4(Fuc α 3)Gal β -)) | Alta expresión |
| Core-2 (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc) | Alta/baja expresión |
| Core-3 (GlcNAc β 1-3GalNAc) | Baja expresión |
| Core-4 (GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc) | Baja expresión |
| Ramificaciones β 1-6 (N-glicanos) | Alta expresión |
| Fucosilación (Fuc) | Alta expresión |
| Sialización (NeuAc) | Alta expresión |

La glicosilación incompleta o aberrante de componentes de membrana o carbohidratos secretados se asocia con la transformación neoplásica pudiendo emplearse como biomarcadores tumorales. De esta forma, existen pruebas serológicas, que se utilizan en la práctica clínica, para detectar y cuantificar estas estructuras en el suero de pacientes con cáncer. La cuantificación de estos carbohidratos circulantes se utiliza para el diagnóstico, monitorización y terapia, detección de recidivas y pronóstico de la enfermedad. Entre los marcadores existentes, se encuentran los glicoconjugados SLe^a (CA19-9), STn (CA72-4) y las mucinas MUC-1 (CA15-3) y MUC-16 (CA125) (305, 315-317).

El marcador CA125 se emplea para cáncer de ovario. El 80% de las pacientes con adenocarcinomas de ovario presentan niveles de CA125 elevados (315, 318, 319).

Introducción

Por otro lado, los niveles de CA125 correlacionan directamente con la progresión de la enfermedad y los niveles de CA125 preoperatorios se usan para el pronóstico.

La molécula MUC-1 (CA15-3) se ha visto que se sobreexpresa y se glicosila de forma aberrante en el 90% de los tumores humanos de mama. Este marcador se usa para monitorizar la respuesta a la terapia, detectar las recidivas de forma temprana y evaluar el pronóstico en cáncer de mama (316, 320-322). Los niveles elevados se asocian con un mal pronóstico.

El CA19-9 o Sialil-Lewis^a (SLe^a) se encuentra expresado en glicoproteínas y glicolípidos de pacientes con tumores gastrointestinales (páncreas, vesícula biliar, estómago y colorrectales). Este marcador es útil para monitorizar la respuesta clínica a la terapia y evaluar el pronóstico. Se trata del marcador tumoral con mayor sensibilidad y especificidad en cáncer de páncreas (317, 323, 324).

El marcador CA72-4 corresponde con el antígeno tumoral Sialil-Tn (STn) presente en mucinas. Sus niveles están elevados en el suero de pacientes con varios de cánceres de origen epitelial (gástrico, colorrectal, páncreas, pulmón y mama) y generalmente se asocia con un peor pronóstico, la aparición de metástasis y un descenso de la supervivencia global (305, 325-327).

Además otro marcador muy utilizado son los niveles séricos del antígeno carcinoembriónico (CEA), un miembro de las N-glicoproteínas, que se encuentra sobreexpresado en una gran cantidad de carcinomas humanos, como estómago, colorrectal, páncreas, pulmón y mama (316, 321, 322, 324, 328-330).

Aunque, como hemos visto, la expresión de muchas estructuras de tipo carbohidrato que están asociados a tumores (T, Tn, STn, SLe^a, SLe^x, Le^y) se relaciona con un peor pronóstico, existen algunos epitopos de tipo glicano que se asocian a un pronóstico favorable.

Por otro lado, la aparición de estas nuevas estructuras de tipo carbohidrato, con capacidad antigénica, posibilita la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas

para la lucha contra el cáncer. Se han probado ya varias vacunas frente algunos de estas estructuras de tipo carbohidrato, como el T, Tn, STn, SLe^a, GM1-3, etc (331-334).

6- EL ANTICUERPO MONOCLONAL A10

A10 es un anticuerpo monoclonal (AcMo) IgM K dirigido frente células ET, que inhibe su crecimiento tanto *in vivo* (335) como *in vitro* (256). Fue obtenido en ratones Balb/c inmunizados con células desvitalizadas de ET y seleccionado por su fuerte reactividad frente los carbohidratos de membrana presentes en estas células (HC-ET) (335). Reconoce un epitopo de tipo carbohidrato presente en una glicoproteína de membrana de alto peso molecular (Ca10) (150). En este sentido, no sabemos mucho de la estructura de esta molécula, a excepción de que es de alto peso molecular; que contiene D-galactosa, como demuestran los experimentos de oxidación con metaperiodato, que eliminan el epitopo reconocido por el A10 (150); y que es un glicoproteína de membrana, ya que desaparece de la superficie de la célula ET, tras tratarla con tripsina (272, 335). Además, es liberada de forma espontánea desde la membrana celular y se puede medir en el sobrenadante de cultivo y en el fluido ascítico de los ratones portadores. Los anticuerpos de clase IgM obtenidos en ratones inmunizados con células ET, y los anticuerpos IgM naturales murinos son capaces de reconocer esta molécula (Figura 6), desempeñando un importante papel en la resistencia frente al crecimiento tumoral (272, 336).

Introducción

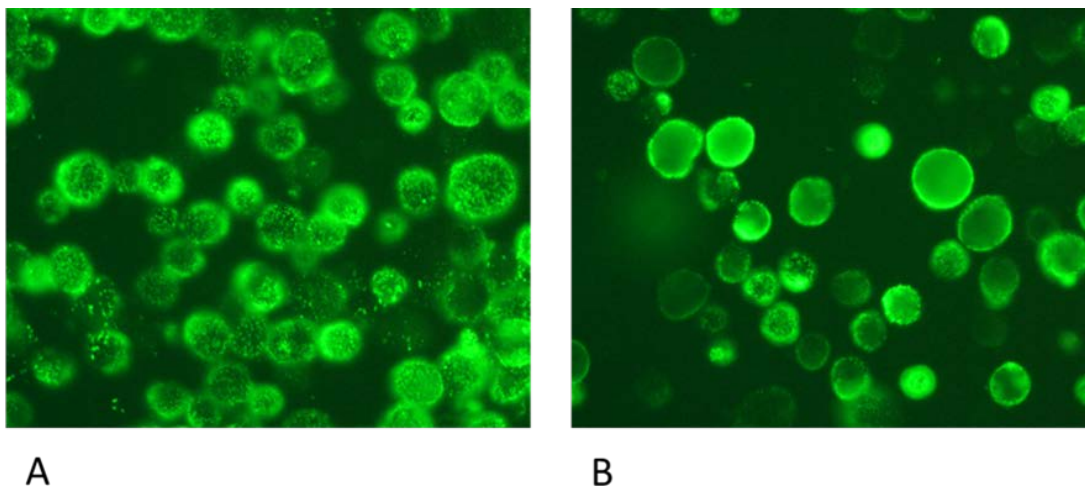


Figura 6. Reactividad IgM sobre células ET.

Marcaje fluorescente con FITC.

- A. A10 (+++).
- B. Suero de ratón inmunizado con células ET desvitalizadas (++)

Una gran cantidad de los anticuerpos monoclonales selectivos de adenocarcinomas reconocen epitopos expresados en las mucinas. Estas moléculas están presentes en el glicocáliz de las células epiteliales de muchos tejidos secretores (297, 337). Como antes mencionamos, las mucinas son glicoproteínas altamente glicosiladas que con frecuencia portan alteraciones asociadas a tumores. Estas alteraciones han sido utilizadas como marcadores tumorales. Los anticuerpos monoclonales que reconocen mucinas tumorales se unen a epitopos del esqueleto proteico (apomucina) o de las cadenas laterales de oligosacáridos (297, 337). Algunos de estos epitopos asociados a tumores son antígenos crípticos que quedan expuestos tras la glicosilación incompleta o aberrante que se produce en las células malignas. Esta glicosilación parcial puede derivar en la síntesis de antígenos de grupo sanguíneo aberrantes o incompatibles (338). Estos epitopos aparecen con frecuencia en una amplia variedad de adenocarcinomas de distinto origen tisular (297). Además, algunos de éstos se consideran antígenos oncofetales y se expresan en tejidos fetales normales (339).

Por otro lado, hemos visto que el AcMo A10 es reactivo frente una gran variedad de adenocarcinomas humanos, mostrando una reactividad mucho menor con

tejidos normales. La Figura 7 representa dos ejemplos de adenocarcinomas humanos positivos para el A10 (colon y próstata). El A10 reconoce intensamente a la mayoría (85%) de los adenocarcinomas de colon y no al colon normal sano (340). Además, es capaz de reconocer adenocarcinomas de próstata, pulmón, estómago y páncreas, así como algunos tejidos no malignos, como los fibroadenomas, los ductus del tejido mamario y las hiperplasias benignas de próstata (340).

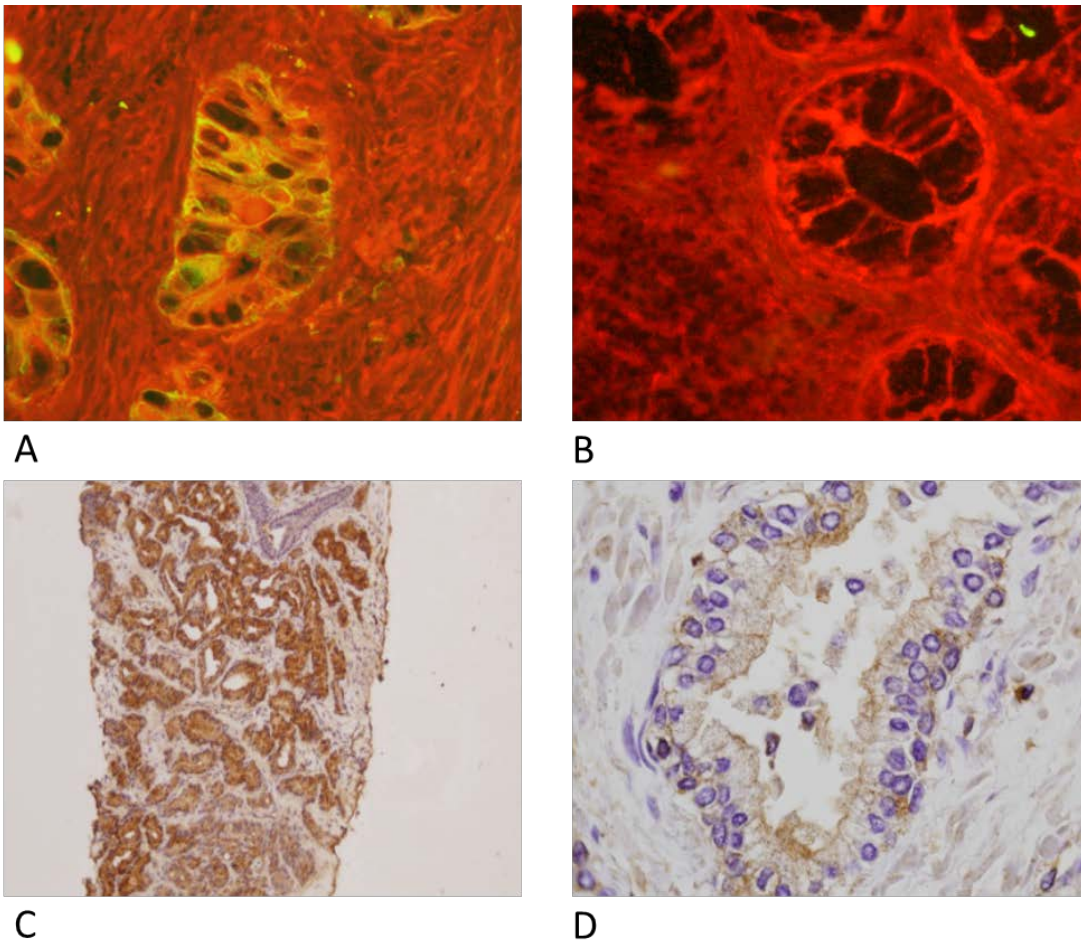


Figura 7. Reactividad del anticuerpo monoclonal A10 sobre tumores humanos.

Marcaje fluorescente con FITC y contra-tinción con Azul de Evans (A y B) o con peroxidasa (C y D).

- A. Adenocarcinoma de colon (+++).
- B. Tejido sano de colon (-).
- C. Adenocarcinoma de próstata (+++).
- D. Tejido sano de próstata (-).

Introducción

La Tabla 3 resume los resultados obtenidos con tejidos tumorales de diferente origen.

Tabla 3. Reactividad del anticuerpo monoclonal A10 con tejidos tumorales humanos malignos y no malignos.

| Tejido | Número de casos positivos | Intensidad |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Adenocarcinomas | | |
| Colon | 36/42 | +++ 21/36 ++ 14/36 + 1/36 |
| Pulmón | 13/14 | +++ 12/13 ± 1/13 |
| Páncreas | 3/4 | ++ |
| Estómago | 3/3 | ++ |
| Mama | 0/8 | |
| Ovario | | |
| Mucinoso | 2/2 | ++ |
| Seroso | 0/2 | |
| Endometrio | 4/4 | ++ |
| Próstata | 3/3 | ++/+++ |
| No adenocarcinomas | | |
| Pulmón | | |
| Carcinoma epidermoide | 0/4 | |
| Carcinoma de células grandes | 0/2 | |
| Ovario | | |
| Desmoides | 0/1 | |
| Teratomas | 0/1 | |
| Mama | | |
| Fibroadenoma | 5/5 | +++ |
| Otros | | |
| Melanoma | 0/2 | |
| Mieloma | 0/2 | |
| Linfoma de Hodgkin | 0/2 | |
| Leiomiocarcinoma | 0/3 | |
| Osteoblastoma | 0/1 | |
| Fibrosarcoma | 0/2 | |
| Carcinoma tímico | 0/1 | |
| Carcinoma de tiroides | 0/1 | |
| Mesotelioma pleural | 0/1 | |

En el tejido de colon, la reactividad A10 es virtualmente nula en el epitelio normal y en la llamada mucosa de transición. Los pólipos con bajo potencial maligno son también A10 negativos, lo que indica que el epitopo A10 actúa como marcador de transición maligna en el epitelio del colon (340), como esta descrito para el antígeno T (341) y otros antígenos relacionados con el grupo sanguíneo (342). En este sentido, A10 carece de reactividad contra los antígenos sanguíneos A1, A2, B, H, Le^a, Le^b e i o a-like (Forssman). Además, la falta de reactividad de A10 frente granulocitos, túbulos proximales renales, epitelio gastrointestinal normal, células acinares pancreáticas, carcinomas de mama, linfocitos y eritrocitos tratados con neuranimidasa y mucinas provenientes de glándulas submaxilares bovinas, hace muy improbable que A10 estuviera reaccionando con los antígenos T, Tn (1, 9, 11), Le^x, Le^y y/o sus formas extendidas.

La distribución tisular del epitopo A10 humano propone a las mucinas como las dianas de esta reactividad. En el caso de los adenocarcinomas de colon existen varias evidencias que corroboran esto: la distribución subcelular del epitopo A10 está restringida a las gotas de mucinas y a las microvellosidades de las células de adenocarcinomas de colon; las características físico-químicas de las moléculas A10 reactivas derivadas de colon, como su alto peso molecular por filtración en gel, su densidad en gradientes de CsCl, o su solubilidad en ácido perclórico, todas ellas típicas de las mucinas (343, 344). El epitopo A10 se encuentra presente tanto en la molécula MUC-1 obtenida de adenocarcinomas de colon como en la línea celular de colon HT-29 (crecida en forma de tumor xenogénico), lo que indica una relación directa entre el epitopo A10 y esta mucina. De esta forma, el monoclonal A10 define un epitopo asociado a tumores de tipo carbohidrato portado en la molécula de MUC-1 presente en tejidos tumorales de colon. Este epitopo está asociado al core 6 glicano de MUC-1 que contiene GlcNAc β (1-6)GalNAc (340).

Hay que tener en cuenta el origen del hibridoma A10 ya que para obtenerlo se utilizaron células ET desvitalizadas como inmunógeno (335). No debe sorprendernos ya que los epitopos asociados a tumores de tipo carbohidrato, incluido el antígeno T, pueden expresarse tanto en células tumorales murinas como humanas (339, 345). De

Introducción

forma paralela, se ha descrito la presencia de NAb en el suero de ratones normales capaces de reaccionar con antígenos oncofetales humanos, incluidos aquellos que contienen el core 6 (346). Aunque no se sabe si el monoclonal A10 en su origen era un anticuerpo natural o en realidad se trata de un anticuerpo inducido por la inmunización, hay que contemplar ambas posibilidades. Además el monoclonal A10 presenta similitudes con los NAb, como el isotipo, las propiedades antitumorales y las moléculas diana que reconocen en las células ET (256, 335).

Una característica muy importante de este anticuerpo monoclonal es que el grado de expresión del epitopo reconocido por A10 en tumores colorrectales y en tumores de próstata está asociado al pronóstico de los pacientes.

En tumores de colon, tanto el intervalo libre de enfermedad, como la supervivencia global se ven favorecidos por la expresión del epitopo A10, siendo por ello un marcador de factor pronóstico positivo. Mediante análisis multivariante de Cox, A10 se reveló, además, como un marcador de factor pronóstico independiente, lo que implica que su expresión no está asociada a factores pronóstico convencionales (estadio, grado de diferenciación y tipo histológico). En este sentido, la ausencia de expresión de A10 define un RR=3,4 ($p=0,02$) para fallecer por la enfermedad en la serie de 46 pacientes estudiados, lo que hace a A10 uno de los factores pronósticos independientes del estadiaje convencional con más fuerza en cáncer colorrectal.

En el caso de los adenocarcinomas de próstata, se ha visto que su expresión también está relacionada con la evolución del paciente. Mediante análisis univariante de Cox se vió que la expresión del epitopo A10, en el momento del diagnóstico, al igual que la escala de Gleason y el marcador sérico PSA, se comportaba como factor pronóstico independiente en relación con la supervivencia global y el periodo de tiempo libre de metástasis ($p=0,002$). En este caso, también comportándose como un marcador de factor pronóstico positivo. Además, observamos que existía una correlación significativa (Rho de Spearman) entre la expresión del epitopo reconocido por el A10, el grado de Gleason y el nivel sérico de PSA, en el momento del diagnóstico ($p=0,004$). A mayor grado de expresión del epitopo A10, menor score de la escala de Gleason y menores niveles de PSA sérica.

Esto distingue A10 de la mayoría de los marcadores descritos en la actualidad, generalmente asociados a peor pronóstico.

Estudios preliminares indican que el mejor pronóstico para los tumores A10 reactivos, como en el caso del modelo experimental murino, puede depender de la presencia de Nab que reaccionan con el epitopo A10. Esto está apoyado tanto por estudios previos nuestros (335), como de otros laboratorios (233, 347), que han relacionado significativamente la presencia de Nab en ratones con la resistencia al crecimiento de tumores inoculados en dosis umbrales.

Además, como se mencionó anteriormente, varios autores han remarcado la importancia de los NAb de clase IgM en la inmunovigilancia del cáncer (227, 228, 348).

De forma interesante, recientemente se ha visto la presencia de NAb en la mayoría de los sueros humanos, reactivos frente una gran cantidad de estructuras de tipo carbohidratos, y entre ellos se encuentra los antígenos Tn, Sialil-Tn, Taa y los core glicano 1 (TF), 3, 4 y 6 (349).

Es importante remarcar que el core 6 (GlcNAc β (1-6)GalNAc) es la estructura que reconoce el anticuerpo monoclonal A10 en adenocarcinomas de colon humano (340), ya que estos anticuerpos podrían estar relacionados, en mayor o menor medida, con la evolución de la enfermedad.

II. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

La hipótesis de partida de esta tesis doctoral es que existen estructuras de naturaleza carbohidrato, compartidas entre células del tumor murino de Ehrlich y tumores humanos de origen epitelial, definidas por el anticuerpo monoclonal A10. Se pretende demostrar que estas estructuras pueden ser dianas de anticuerpos naturales o ser utilizadas para la inducción de anticuerpos específicos que permitan aumentar la resistencia antitumoral.

III. OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1- Valorar la presencia de anticuerpos naturales humanos de clase IgM reactivos frente a los carbohidratos de membrana del tumor de Ehrlich (HC-ET), líneas celulares y tumores humanos A10+.
- 2- Valorar la presencia de anticuerpos de clase IgM murinos, inducidos mediante inmunización con células ET, reactivos frente a los HC-ET, líneas celulares y tumores humanos A10+.
- 3- Evaluar una posible función biológica de estos anticuerpos de clase IgM.
- 4- Estudiar la capacidad de líneas tumorales humanas A10+ para generar anticuerpos de clase IgM reactivos frente a líneas murinas A10+.
- 5- Optimizar la purificación de los carbohidratos que liberan de forma espontánea al medio extracelular los cultivos de células ET (HC-ET).
- 6- Definir la estructura y composición de los carbohidratos A10+ (Ca10), procedentes de las células ET.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1- REACTIVOS Y MEDIOS

El medio de cultivo RPMI-1640, piruvato sódico, suero de ternera fetal (FCS), glutamina, tripsina, colorante vital Azul Tripán, tween-20, albúmina bovina (BSA), OPD, pristano, glicerol, PMSF, azida sódica, los anticuerpos conjugados (anti IgM-humana Po, anti-IgM-murina-Po, anti IgM-humana-FITC y anti-IgM-murina-FITC), yoduro de propidio (IP), Azul de Evans, MTT, dimetil sulfóxido (DMSO), borohidruro sódico (NaBH_4), piridina, cloruro de hidroxilamina, BSTFA, las lectinas (MAA, DSL, LEA, SBA, BSL, WFA, Con-A, SNA, PNA, LPA, HPA y WGA), MUC-1, ribonucleasa A y B, fetuína, fibrinógeno los inhibidores metabólicos de la glicosilación y los kits con las enzima N- y O-glicosidasas eran de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

La gentamicina añadida a los cultivos era de la casa Normon (Tres Cantos, Madrid, España).

Las sales para preparar los tampones PBS (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 y NaCl), Tris-HCl, carbonato/bicarbonato (Na_2CO_3 y NaHCO_3) y fosfato/citrato (ácido cítrico y Na_2HPO_4), NaOH, HCl, sulfato amónico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, los solventes orgánicos para la purificación de los HC-ET (fenol, cloroformo y éter), metanol, anhídrido acético, agua oxigenada (H_2O_2) eran de Panreac (Barcelona, España).

La membrana de diálisis de celulosa usada era de Serva Electrophoresis (Heidelberg, Alemania).

La conjugación del AcMo A10 con la enzima peroxidasa se hizo usando el kit Lynx-Rapid-HRP (ABD Serotec, Raleigh, NC, USA).

El reactivo de Bradford (Coomassie-blue G-250) y la gelatina eran de Biorad (Hercules, CA, USA).

Los filtros de peonza de acetato de celulosa de 0,45 y 0,2 μm empleados eran de (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania) y los de filtros (1, 0,45 y 0,2 μm) para el soporte de embudo eran de Sartorius stedim biotech (Goettingen, Alemania).

El complemento de conejo empleado en los experimentos de citotoxicidad era de la casa comercial Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Alemania).

Material y Métodos

Los azúcares utilizados en la cromatografía de gases y en los estudios de inhibición del AcMo A10 (arabinosa, xilosa, ribosa, fucosa, ramnosa, 2-desoxi-glucosa, manosa, galactosa, glucosa, glucosamina, galactosamina, ácido glucurónico, ácido galacturónico, inositol, mio-inositol, trehalosa, fructosa, sacarosa, lactosa, maltulosa, maltosa, GlcNAc, GalNAc, quitotriosa ([GlcNAc- β (1-4)]₃), lacto-N-triaosa (GlcNAc- β (1-3)-Gal- β (1-4)-Glc), el core 3 de mucinas (GlcNAc- β (1-3)-GalNAc), NANA, sialilactosa y melobiosa) eran de Carbosynth (Compton, Reino Unido).

La columna de cromatografía TR-CN100 era de Teknokroma (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España) y la HP5-MS de Agilent (Santa Clara, CA, USA).

2- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones hembra de 8 a 12 semanas. Las cepas C57BL/6J y Swiss Hsd:ICR (CD-1) (Harlan Laboratories, Barcelona, España) fueron suministradas por el animalario de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Clínico San Carlos. Para el crecimiento del tumor humano HT-29 y el hibridoma A10, se emplearon ratones inmunodeficientes de la cepa RAG-2 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), estabulados en aisladores libres de patógenos. Estos animales fueron obtenidos del animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Universidad Autónoma de Madrid). Los ratones fueron alimentados ad libitum y se acondicionaron, cumpliendo la normativa vigente. Todos los estudios y procedimientos de esta tesis, que implican el uso de animales, han sido aprobados previamente por el Comité de Ética de Experimentación Animal del Hospital Clínico San Carlos.

3- TUMOR DE EHRLICH

Se utiliza la línea hiperdiploide ET (272). Esta línea tiene ausencia de antígenos H-2 (266) y capacidad de desarrollar un tumor, ascítico o sólido, en casi cualquier cepa de ratón (267). Originalmente, se estableció en 1906 como un carcinoma mamario de origen espontáneo en un ratón de genealogía desconocida (263). Desde entonces, se ha mantenido en muchos laboratorios. En el caso de nuestro laboratorio, las células ET se han mantenido tanto *in vivo* como *in vitro*.

3.1 In vivo

Como tumor ascítico de Ehrlich. El pase *in vivo* consiste en la inoculación en un ratón, vía intraperitoneal (ip), de un volumen de 250 μ L de solución salina estéril que contiene 10^7 células ET viables (>90% de viabilidad según la prueba de exclusión del Azul Tripán). El tumor ascítico se desarrolla en 8-10 días desde el inóculo inicial y las células ET se obtienen del fluido extraído en condiciones estériles de la cavidad peritoneal de un ratón, tras su previa eutanasia. Estas células ET se usan para mantener la línea *in vivo* y como fuente de Ca10.

3.2 In vitro

Se cultivaron a una concentración de $2-3 \times 10^5$ células ET/mL en medio de cultivo RPMI 1640 al 10% de FCS, 1% de L-glutamina, 1% de gentamicina y 1% de piruvato sódico. A una temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5% de CO₂.

4- CULTIVOS CELULARES

Se trabajaron con varias líneas celulares murinas, humanas y con células de bazo provenientes de ratones C57BL6/J y linfocitos de sangre periférica (PBL) humanos. Las líneas celulares fueron (Tabla 4):

Tabla 4. Líneas celulares empleadas.

| Línea celular | Origen | Descripción |
|--------------------|--------|--|
| Ehrlich | Murino | Adenocarcinoma de origen mamario (263) |
| Sarcoma 180 (S180) | Murino | Sarcoma derivado de metástasis (350) |
| Células de bazo | Murino | Células de bazo de ratones C57BL/6J |
| B16 | Murino | Melanoma (351) |
| A10 | Murino | Hibridoma (335) |
| PBL | Humano | Células de sangre periférica |
| K562 | Humano | Eritroblastoma (352) |
| Raji | Humano | Linfoblastoma (353) |
| Colo 205 | Humano | Adenocarcinoma de colon (354) |
| Snu-c1 | Humano | Adenocarcinoma de colon (355) |
| Colo 320 | Humano | Adenocarcinoma de colon (356) |
| HT-29 | Humano | Adenocarcinoma de colon (357) |
| H-1355 | Humano | Adenocarcinoma de pulmón (355) |

Material y Métodos

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en cultivo en medio RPMI 1640 al 10% de FCS, 1% de L-glutamina, 1% de gentamicina y 1% de piruvato sódico. A una temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5 % de CO₂. Las líneas celulares adherentes fueron despegadas del frasco donde crecían utilizando la enzima tripsina.

5- OBTENCIÓN DE CARBOHIDRATOS LIBERADOS POR LAS CÉLULAS ET (HC-ET)

Las células ET liberan al medio extracelular, de manera espontánea, las estructuras carbohidratadas que reconocen la IgM del suero de los ratones inmunizados contra las células ET (150) y el AcMo A10 (287). Gracias a esto, las moléculas anteriormente mencionadas pudieron obtenerse a partir del sobrenadante del cultivo de células ET. Células ET procedentes de pase *in vivo* se lavaron tres veces con PBS, se contaron y se pusieron en cultivo en las siguientes condiciones: $0,5 \times 10^6$ células/mL en medio de cultivo RPMI 1640 completo y libre de suero, a 37°C y una atmósfera al 5 % de CO₂. Tras mantener las células ET en cultivo durante 3 días se separó el sobrenadante del componente celular mediante centrifugación (2x3.000 rpm, 10 min) y se filtró hasta 0,2 µm. Los sobrenadantes así recogidos se conservaron congelados a -80°C hasta su uso.

5.1 Método químico con fenol-cloroformo

Una vez obtenido el sobrenadante de cultivo, se procedió a realizar la separación con los solventes orgánicos. El proceso de extracción constó de varias fases: liofilización del sobrenadante y reconstitución/concentración con H₂O destilada, diálisis frente tampón Tris 10 mM pH=7,2, liofilización, extracción con fenol-cloroformo (50% de cada uno) + tampón Tris 10 mM, pH=7,5 (relación 1:1), lavado con cloroformo, lavado con éter dietílico, diálisis frente agua destilada y liofilización.

5.2 Ultrafiltración tangencial

En este caso, los HC-ET se purificaron en base a su peso molecular. Para ello se empleó un sistema de ultrafiltración tangencial Pall Life Sciences con un casete Pall Omega de un tamaño de poro de 300 kDa, estableciendo un flujo de

500 mL/min y una $\Delta P < 20$ psi. Utilizamos un volumen de 4 L del sobrenadante, libre de células ET. En un primer paso, la muestra se concentra hasta un volumen de 250 mL. Una vez concentrada, se procede a una diafiltración en presencia de NaCl 1M, pasando un total de 40 volúmenes de sal, y recuperando la fracción de >300 kDa. En esta fracción se encuentran los HC-ET, y entre ellos el Ca10. A continuación se eliminan las sales haciendo pasar 20 volúmenes de H₂O destilada, hasta alcanzar una conductividad <100 μ S. Finalmente el volumen obtenido del retenido se filtra hasta $0,2$ μ m, se liofiliza y almacena a 4°C hasta su uso.

6- CUANTIFICACIÓN DEL Ca10

El Ca10 se cuantificó por medio de un ensayo ELISA tipo sándwich utilizando placas de alta absorción (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania). El AcMo A10 se usa tanto de anticuerpo de captura como trazador (A10 previamente conjugado con peroxidasa). La fase de tapizado se realiza a 4°C *overnight*, utilizando monoclonal A10 purificado a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM; pH $9,6$. Tras lavar con PBS-Tween 20 al $0,25\%$, las muestras diluidas en PBS-Tween 20 al $0,25\%$, son incubadas *overnight* a 4°C . Al día siguiente, y tras lavar la placa, se añade una solución de A10 conjugado con peroxidasa diluido $1/500$ en PBS-Tween 20 al $0,25\%$ con suero de ternera al 10% . La conjugación del anticuerpo con la actividad enzimática se realizó utilizando el kit Lynx-Rapid-HRP (ABD Serotec, Raleigh, NC, USA). Tras una incubación de 2 h a 25°C , y 3 lavados, se añade una solución sustrato ($0,3\%$ H₂O₂ 30 vol- $0,02\text{M}$ OPD, $0,1\text{M}$ tampón citrato; pH $5,5$). La reacción enzimática se deja desarrollar 30 min y se detiene con la adición de una solución de HCl 1N . Las OD se miden a 492 nm con un equipo de espectrofotometría-colorimetría (Biotek Synergy Mx). La concentración de las muestras se cuantifica en unidades arbitrarias (UA/mL) extrapolando las OD obtenidas a una curva de referencia que se establece con un patrón interno de Ca10 purificado utilizado como estándar.

Material y Métodos

7- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS HC-ET PURIFICADOS

El contenido proteico presente en la muestra de HC-ET purificada mediante ultrafiltración tangencial fue valorado mediante la utilización del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250. Para ello utilizamos el kit comercial de BioRad para la cuantificación de proteínas que está basado en el método Bradford. Tras preparar las muestras y la curva estándar (albúmina bovina – BSA), añadimos 200 μ L de la muestra sobre 50 μ L del reactivo de Bradford 5x, según procedimiento descrito por fabricante, en placas de 96 pocillos (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania). Transcurridos 5 minutos y una vez que estabilizada la aparición de color, se procede a realizar una lectura de las muestras en el lector Biotek Synergy Mx, a una λ de 595 nm. Como muestra patrón usamos una solución de BSA a una concentración conocida.

8- IRRADIACIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES

Las células ET procedían de pase *in vivo* mediante crecimiento ip. En el caso de las células B16, se obtuvieron mediante cultivo *in vitro*. Tras centrifugar las células y una vez lavadas 3 veces con PBS estéril, se prepararon un total de 10^9 células ET, a razón de 2×10^7 células/mL. La desvitalización de las células ET y B16 se realizó por irradiación, en la Fundación Jiménez Díaz, con una dosis total de 100 Gy.

9- EXPERIMENTOS DE INMUNIZACIÓN

Se inmunizaron una serie de animales C57BL/6J con las células ET o B16 desvitalizadas mediante irradiación. Se les inoculó, por via ip, una dosis total de 10^6 células. Se procedió a administrar un total de 5 dosis de células irradiadas, con un intervalo de 14 días entre cada dosis. En el caso de la inmunización con la línea humana A10+ H-1355, se procedió a utilizar el mismo protocolo descrito para las células ET y B16, empleando ratones Swiss Hsd:ICR (CD-1), pero sin la necesidad de la desvitalización. Al tratarse de células de origen humano no crecen pueden crecer en ratones.

10- OBTENCIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL A10

Tras expandir el hibridoma A10 *in vitro* en medio completo RPMI, se creció *in vivo* en ratones inmunodeficientes RAG-2. Un total de 10^6 células del hibridoma fueron expandidas ip en animales tratados con pristano (0,3 mL ip 7 días antes), obteniéndose 10-14 días después el sobrenadante de la tumoración ascítica como fuente de anticuerpo monoclonal. Tras centrifugar, los sobrenadantes se filtraron a $0,45 \mu\text{m}$. Para purificar el monoclonal IgM, se hizo una precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40%. Tras lavar con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%, se dializó frente PBS 10 mM. A la muestra resultante se le añadió 0,1% de BSA como estabilizador, pues en ausencia de otras proteínas la IgM es inestable y tiende a la agregación, perdiendo su actividad como anticuerpo.

11- OBTENCIÓN DEL SUERO DE LOS RATONES INMUNIZADOS

Una vez finalizados los protocolos de inmunización, los animales fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de 0,1 mL/animal de la siguiente mezcla: 2 mL de ketamina; 50 mg/mL, 0,3 ml de xilacina; 20 mg/mL, 2 mL de diazepam; 5 mg/mL, 1 mL de atropina; 1 mg/mL y 4.7 mL de suero fisiológico. Se les mantuvo dormidos con el uso de isoflurano 1%. Durante este tiempo, se les extrajo 0.7-1 mL de sangre mediante punción cardiaca. Tras la obtención de la sangre, los animales fueron convenientemente eutanasiados. La sangre se dejó coagular en contenedores eppendorf, a 37°C durante 1 hora. Se centrifugó a 2.000 rpm, 10 minutos, 4°C y recuperó el suero. Los sueros fueron alicuotados y congelados a -80°C hasta su uso.

12- OBTENCIÓN DE LOS SUEROS HUMANOS

Se obtuvieron un total de 82 sueros del Banco de Sangre del Hospital Clínico San Carlos. Procedían de individuos sanos que acudieron a dicha unidad para realizar una donación voluntaria. Tras añadir glicerol al 50%, PMSF 1 mM y azida sódica al 0,1% final, se almacenaron a 4°C hasta su uso. Una pequeña fracción de cada suero se almacenó congelada a -80°C , sin glicerol, PMSF, ni azida sódica para utilizar en los experimentos de CDC.

Material y Métodos

13- VALORACIÓN DE LA IgM TOTAL SÉRICA EN LOS SUEROS HUMANOS

Se midieron los niveles de IgM totales presentes en los sueros procedentes de los 82 individuos sanos a estudiar. La cuantificación de las inmunoglobulinas se realizó en el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico San Carlos mediante el uso de un nefelómetro Beckman-Coulter Image.

14- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS TUMORALES HUMANAS

Las muestras de adenocarcinomas colorrectales humanos, así como su tejido sano adyacente fueron amablemente cedidas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos. Dichas piezas tumorales se encontraban almacenadas en el Banco de Tumores del Hospital, como parte de la red del Banco de Tumores del Instituto de Salud Carlos III.

15- CRECIMIENTO DEL TUMOR XENOGÉNICO HT-29

Tras expandir la línea HT-29 *in vitro* en medio completo RPMI, se creció *in vivo* en ratones inmunodeficientes. Se creció en forma de tumor xenogénico en ratones RAG-2 (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid) Se inocularon 2×10^6 células en cada pata trasera. Tras esperar 30 días se procedió a eutanasiar al animal, se extrajeron las piezas del tumor HT-29 (1 cm de diámetro) y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

16- CORTES DE TEJIDO EN CRIOSTATO

El Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos realizó los cortes en criostato de los tejidos a estudiar. Las muestras procesadas fueron las piezas del tumor xenogénico HT-29, los adenocarcinomas de colon humano del Banco de Tumores y sus tejidos sanos adyacentes y el control de hígado murino. Se realizaron cortes con un grosor de 5 μm y los cristales con las muestras fueron almacenados a una temperatura de -80°C .

17- DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM REACTIVOS FRENTE AL Ca10

17.1 Enzimoimmunoensayo (ELISA)

Se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA, USA) con 100 μ L por pocillo de una solución tamponada (PBS 10 mM) que contenía los HC-ET a una concentración de 25 μ g/mL. Se incubaron toda la noche. Al día siguiente y tras lavar tres veces en citrato salino-Tween 20, se bloqueó con gelatina 0,3% en PBS 10 mM durante 1 hora a 37°C. Tras lavar tres veces en citrato salino-Tween 20 se incubó con los sueros a una dilución 1/20 (sueros humanos) o 1/50 (sueros murinos) en PBS-gelatina 0,3% durante dos horas a temperatura ambiente. Para eliminar las moléculas que no se unieron al antígeno se volvió a lavar tres veces en citrato salino-Tween 20. Para detectar la IgM unida a los carbohidratos se incubó con una dilución 1/2.000 en PBS-gelatina 0,3% de anti IgM-humana o murina conjugada con Po durante 45 minutos. Finalmente se lavó en tampón citrato salino-Tween 20. El color se midió tras añadir OPD/H₂O₂ en tampón citrato 1 M pH=5.5. La reacción se paró con HCl 1N. Por último, se introdujo la muestra en un espectrofotómetro (Labsystems iEMC Reader MF) y se midió la absorbancia a 492 nm. En el caso de los sueros humanos, se consideraron positivas las muestras cuya reactividad fue mayor de 45 UA/mL (percentil 20). Se consideró este valor porque ningún suero dio una señal mayor cuando se realizó el ELISA sin sensibilizar la placa con los HC-ET. La recta patrón usada consistía en una mezcla de sueros humanos con IgM reactiva frente a los HC-ET, valorada anteriormente. Cuando se cuantificaron los sueros murinos, se utilizó como recta patrón el AcMo A10 purificado, a una concentración conocida (valorado mediante Bradford – Apartado 7).

17.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La reactividad de los anticuerpos IgM naturales e inducidos específicos frente las líneas celulares o frente los tumores, fue analizada mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Las células o los tejidos fueron probados con 3 μ g/mL del AcMo A10 purificado. Tras lavar con PBS se incubó con un

Material y Métodos

anticuerpo anti-mouse IgM conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una concentración final de 20 µg/mL.

17.2.1 Citometría de flujo

Se trabajaron con las líneas celulares descritas en la Tabla 1, a excepción del hibridoma A10. Tras concentrar las células a razón de 5×10^6 cel/mL en PBS 10 mM, un volumen de 100 µL (5×10^5 células) se incubó con 100 µL de una dilución 1/25 en PBS 10 mM de los sueros humanos o murinos a probar (dilución final de los sueros, 1/50). Se incubó durante 1 hora a 4°C. Tras lavar tres veces en PBS 10 mM las células se incubaron con una dilución 1/20 de anti IgM humana o murina conjugada con FITC y en presencia de 20 µg/mL de yoduro de propidio (IP), para la evaluación de la viabilidad celular, durante 1 hora a 4°C. Por último, se lavaron tres veces en PBS 10 mM y se adquirió en un citómetro de flujo (Beckman-Coulter Epics XL). Se hicieron pasar 10.000 eventos antes de parar el análisis. En el caso de los NAb, se consideraron positivas aquellas muestras cuyo valor medio de fluorescencia era superior al valor obtenido con el control isotópico. Este control fue una muestra de suero proveniente de un enfermo diagnosticado de un mieloma IgM. Los valores de fluorescencia presentados llevan restado el valor obtenido con este control.

17.2.2 Histología en cortes en criostato

HT-29 es una línea celular humana de adenocarcinoma de colon. Esta línea es positiva para el AcMo A10 cuando crece *in vivo*. Además, sabemos que el 85% de los adenocarcinomas humanos de colon son positivos para este monoclonal (340). Probamos el tejido tumoral xenogénico HT-29 y una serie de tumores de colon humano, con los sueros humanos y los sueros de los ratones inmunizados. En el caso de los NAb IgM y los tumores de colon humano, sólo probamos cuatro sueros. Tres de ellos eran positivos frente al tejido HT-29 y uno era negativo/baja reactividad. Como control de tejido no tumoral A10-, utilizamos tejido hepático murino (HT-29) o el propio tejido sano de colon del paciente en cuestión (adenocarcinomas colorrectales). En los tejidos epiteliales

también se expresan los llamados antígenos de grupo sanguíneo ABO. Para no tener problemas con las isohemoaglutininas, sólo utilizamos tejidos provenientes de individuos con grupo sanguíneo A o 0 (los anticuerpos que reconocen los grupos sanguíneos son de clase IgM). Los sueros escogidos pertenecían a individuos del grupo A. El Rh no nos importó por tratarse de un antígeno reconocido por anticuerpos IgG y no IgM. Añadimos 50 μ L en cada corte de tejido de una dilución 1/10 de los sueros humanos, o 1/50 para los sueros murinos, diluidos en PBS 10 mM. Incubamos durante 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente en atmósfera húmeda. Tras lavar con PBS, añadimos en el tejido 50 μ L de una solución que contenía el anticuerpo secundario. La solución estaba compuesta por dilución 1/20 de anti IgM humana o murina conjugada con FITC y Azul de Evans 1/100 en PBS 10 mM. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en atmósfera húmeda. Por último se lavó en PBS 10 mM y se midió semicuantitativamente en un microscopio de fluorescencia (Nikon ECLIPSE E400).

El criterio empleado para su valoración fue el siguiente:

- - \Rightarrow No se observó fluorescencia.
- + \Rightarrow Se observó fluorescencia a 40x.
- ++ \Rightarrow Se observó fluorescencia a 40x y 20x.
- +++ \Rightarrow Se observó fluorescencia a 40x, 20x y 10x.

18- INHIBICIÓN DE ANTICUERPOS IgM ESPECÍFICOS

Como tejido humano A10+, usamos el tumor xenogénico HT-29. Como inhibidor A10+ empleamos a las células ET y como inhibidor A10-, las células del tumor B16. Se analizaron un total de 9 sueros murinos, procedentes del grupo de animales inmunizados con células ET. Los sueros, diluidos 1/50 en PBS, fueron incubados toda la noche, en agitación, a 4°C, con una solución de 10^6 células ET o B16. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 2.000 rpm, durante 10 minutos. El pellet celular fue desechado y el sobrenadante se probó frente el tejido HT-29 en criostato siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 17.2.2 - Histología en cortes en criostato.

19- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD MEDIADA POR COMPLEMENTO

Tras preparar el cultivo de células ET, se ajustó a una concentración de 5×10^5 células/mL. Se añadieron un total 5×10^4 células por pocillo, en una microplaca de cultivo (Costar, Cambridge, MA, USA), contenidas en 100 μ L de medio RPMI completo. Se añadió el suero humano o murino, a una dilución final de 1/20 o 1/50, respectivamente. Finalmente se añadió complemento de conejo diluido 1/10 e incubó toda la noche. Al día siguiente, se añadieron al cultivo 10 μ L del reactivo MTT a una concentración de 5 mg/mL. Se incubaron las muestras durante 1 hora a 37°C. Transcurrido ese tiempo se centrifugó la placa, se retiró el sobrenadante y los complejos de formazán creados, junto con las células se disolvieron en 200 μ L de DMSO/pocillo. Por último, se midió la densidad óptica a una λ de 570 nm y se calculó la lisis producida con la fórmula:

$$\% \text{ lisis} = (1 - (A_{\text{muestra}}/A_{\text{máx}})) \times 100$$

Donde la $A_{\text{máx}}$ es la obtenida en la muestra que no llevaba suero pero sí complemento de conejo, lo que representa la lisis mínima producida de forma específica.

20- ANÁLISIS MOLECULAR POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Esta técnica se usó para la determinación de los carbohidratos, los ácidos grasos y los aminoácidos presentes en la muestra de HC-ET. Se prepararon soluciones stock de los monosacáridos a 1 mg/mL, como estándares de monosacáridos para la cromatografía: arabinosa, xilosa, ribosa, fucosa, ramnosa, 2-desoxi-glucosa, manosa, galactosa, glucosa, glucosamina, galactosamina, ácido glucurónico, ácido galacturónico y mio-inositol (Patrón interno). Para los monosacáridos neutros se usó la técnica de acetatos de alditol. Para el análisis de los ácidos grasos y los aminoácidos no neutros, se usó la técnica de TMS-oximas. Además, se realizó un análisis de aminoácidos (en el servicio del CIB-CSIC).

20.1 Acetatos de alditol

Se toma 1 mL de la mezcla de patrones en agua y se añade borohidruro sódico (NaBH_4) como agente reductor. Se deja la reacción entre 2 y 24 horas y se elimina el exceso de borohidruro por adición de HCl concentrado. En este proceso se produce efervescencia. Se evapora a sequedad. Se lava con metanol (3 mL, 2 lavados), evaporando cada vez el rotavapor. Se añaden 250 μL de piridina y 250 μL de anhídrido acético y se deja reaccionar a 100°C durante 1h. Se evapora a sequedad. Se resuspende en cloroformo y se analiza mediante CGL con helio (30 psi) como gas portador, inyectando 1 μL de muestra con división de flujo (relación 50:1).

Columnas:

- TR-CN100 (30m x 0,25 mm ID x 0,22 μm espesor de la película), y un detector de ionización de llama (FID). Las condiciones de análisis son: temperatura inicial 210°C (3 min) seguido de una rampa de $15^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta una temperatura final de 240°C , que se mantiene durante 7 min.
- HP5-MS (30m x 0,25 mm ID x 0,22 μm espesor de la película), y un detector de masas MSD. Las condiciones de análisis son: temperatura inicial 190°C (2 min), rampa de 2°C min^{-1} hasta una temperatura final de 225°C .

El análisis cuantitativo de los azúcares se llevó a cabo calculando los factores de respuesta de los monosacáridos con respecto al inositol. Para el cálculo de los factores de respuesta se utilizaron mezclas de patrones en distinta concentración con una misma cantidad de inositol en todos ellos (358).

20.2 TMS-oximas

En una primera fase se procedió a la preparación de los TMS-derivados. Una vez se generaron, añadir a las muestras 1 mg de mio-inositol y 1,2 mg de trehalosa como patrones internos para la cuantificación de mono y disacáridos respectivamente. Tras evaporar hasta sequedad, se añadieron 0,5 mL de una solución de cloruro de hidroxilamina en piridina al 2,5%, para formar las oximas de los azúcares a 70°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se

añadieron 0,3 mL de BSTFA para formar los derivados trimetilsililados a 80°C durante 10 minutos (359).

El análisis de los monosacáridos se realizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) en un equipo Agilent 5975C-7890A utilizando una columna HP5-MS (30 m x 0,2 µm x 0,25 mm) y un programa de temperaturas que comienza a 180°C para subir a razón de 2°C/min hasta 280°C (1 min) y luego hasta 290°C (15 min). El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, utilizando para ello los compuestos mio-inositol y trehalosa, que presentan un solo pico cromatográfico que no interfiere con los carbohidratos presentes en las muestras.

El análisis cuantitativo de los azúcares se llevó a cabo calculando los factores de respuesta de los monosacáridos con respecto al mio-inositol y de los disacáridos con respecto a la trehalosa. Para el cálculo de los factores de respuesta se utilizaron mezclas de patrones en distinta concentración, obteniéndose los factores de respuesta 1,032; 1,240; 1,202; 0,939; 0,928; 1,015 y 1,074 para fructosa, galactosa, glucosa, sacarosa, lactosa, maltulosa y maltosa respectivamente.

Para el análisis de los ácidos grasos, una vez se obtuvieron los TMS-derivados de los posibles ácidos grasos, la muestra se resuspendió en cloroformo. Posteriormente la fase orgánica fue inyectada en el GC-MS, para evaluar la presencia de ácidos grasos libres.

20.3 Análisis de aminoácidos

Se procede a hidrolizar la muestra con HCl 6N, durante 24h, en vacío, a 110°C. Posteriormente, la composición de aminoácidos presente en el hidrolizado es analizada de forma cuantitativa usando el analizador de Biochrom 30. En este proceso, los aminoácidos son separados por medio de una cromatografía de intercambio catiónico y luego son derivatizados con ninhidrina.

21- ENSAYO DE INTERACCIÓN CON LECTINAS

Las diferentes fracciones del proceso de purificación del Ca10 por ultrafiltración tangencial (Apartado 5.2) fueron ensayadas frente un panel de lectinas para valorar las estructuras sacáridas presentes en ellas. Las fracciones fueron las siguientes:

- Sobrenadante \Rightarrow Sobrenadante de cultivo sin fraccionar
- Filtrado I \Rightarrow Fracción <300 KDa de fase de concentración
- Filtrado II \Rightarrow Fracción <300 KDa de fase de diafiltración con NaCl 1M
- Retenido \Rightarrow Fracción >300 KDa

Para ello se utilizó un sistema de microarrays de lectinas (non-contact arrayer; Sprint, Arrayjet Ltd., Roslin, Scotland), adsorbiendo a la fase sólida las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación. Tras el lavado y neutralización de los pocillos se añadieron las diferentes lectinas conjugadas con fluorocromos (Tabla 5).

Tabla 5. Panel de lectinas empleado y sus especificidades.

| Lectina (acrónimo) | Carbohidrato específico (ligando) |
|--------------------|---|
| MAA | NeuAc α (2-3)Gal β (1-4)GlcNAc |
| DSL | GlcNAc |
| LEA | GlcNAc |
| SBA | GalNAc |
| BSL | Gal |
| WFA | GalNAc |
| Con-A | α Man |
| SNA | NeuAc α (2-6)Gal |
| PNA | Gal β (1-3)GalNAc |
| LPA | Ácido siálico |
| HPA | GalNAc α (1-3)GalNAc |
| WGA | Ácido siálico |

Como muestras control utilizamos glicoproteínas cuyos epítopos de unión y de reconocimiento molecular están perfectamente estudiados (Mucina 1, ribonucleasa A y B, fetuina, fibrinógeno...). Para su detección se utilizó un equipo de microarrays GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices).

22- ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL ACMO A10 CON AZÚCARES

Se realizaron ensayos de ELISA de competición con azúcares en fase líquida con objeto de valorar la pérdida de reactividad del AcMo A10 sobre el Ca10 adsorbido a la superficie sólida (placa de poliestireno de la casa Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania). El AcMo A10 diluido a la concentración de trabajo de ELISA (1/20.000) fue preincubado con diferentes concentraciones de cada azúcar (4 horas a 25°C) antes de añadirlo a las placas tapizadas con el Ca10. Los azúcares que se probaron fueron los siguientes: glucosa, galactosa, GlcNAc, GalNAc, quitotriosa ([GlcNAc- β (1-4)]₃), lacto-N-triaosa (GlcNAc- β (1-3)-Gal- β (1-4)-Glc), el core 3 de mucinas (GlcNAc- β (1-3)-GalNAc), manosa, NANA, fucosa, lactosa, sialilactosa y melobiosa. La reactividad del A10 se valoró utilizando un anticuerpo anti-mouse IgM (específico para la cadena pesada μ) conjugado con peroxidasa diluido 1/10.000 en PBS-1% BSA (1 h a 25°C). Tras la incubación y posterior lavado, los pocillos fueron incubados con el sustrato de la peroxidasa como se explica en el Apartado 17.1 – Enzimoinmunoensayo (ELISA).

Para el cálculo de la inhibición obtenida se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = (1 - (A_{\text{muestra}}/A_{\text{máx}})) \times 100$$

Donde la $A_{\text{máx}}$ es la obtenida en la muestra que no llevaba ningún azúcar como inhibidor, lo que el 0% de inhibición. Los resultados se expresan de forma cualitativa en función del grado de inhibición en comparación con el control sin inhibidor:

- - \Rightarrow <5%
- \pm \Rightarrow 5-20%
- + \Rightarrow 20-40%
- ++ \Rightarrow 40-60%
- +++ \Rightarrow >60%

23- ENSAYOS CON N- Y O-GLICOSIDASAS

Un total de 1 mg de material liofilizado se disuelve en 500 μL en agua mili-Q. En el caso de la enzima O-glicosidasa, se cogen 130 μL de esta disolución y se le añade 150 μL del buffer de reacción (5x), se ajusta el pH 5,0. Se deja incubar durante 1h a 37°C. Posteriormente se le añade 2 μL de O-glicosidasa. Para la reacción de la N-glicosidasa, se añaden 25 μL de la solución desnaturalizante, se deja incubando a 100°C durante 10 min. Lo dejamos enfriar a temperatura ambiente y añadimos 25 μL del buffer de reacción junto con 10 μL de la enzima N-glicosidasa. Una vez añadida las enzimas, se deja incubar durante toda la noche (O-glicosidasa), o durante 3 horas (N-glicosidasa) a 37°C. Posteriormente, para desactivar la enzima, lo calentamos a 100°C durante 10-15 min. Dializamos por un centricon de 10 KDa (Millipore, Billerica, MA, USA) en PBS (1x). Liofilizamos.

El material liofilizado y obtenido de la digestión enzimática se disuelve en 500 μL de agua deuterada para llevar a cabo experimento de RMN (espectros monodimensionales de ^1H) en un espectrómetro Bruker Avance de 500/600MHZ a 310K (37°C).

24- ENSAYOS CON INHIBIDORES METABÓLICOS DE LA GLICOSILACIÓN

Se realizaron cultivos de células ET en presencia de inhibidores selectivos de cada tipo de glicosilación: tunicamicina (N-linked) o bencil- α -GalNAc (O-linked), respectivamente. Las células ET fueron previamente tripsinizadas (0,35 mg/mL; 30 min a 37°C). Una vez tripsinizadas y lavadas, se pusieron en cultivo durante toda la noche en ausencia o presencia de bencil- α -GalNAc (2, 3 y 4 mM) o tunicamicina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La expresión del carbohidrato A10 en membrana se determinó por citometría de flujo (ver Apartado 17.2.1 – Citometría de flujo).

Material y Métodos

25- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron con el programa informático XLSTAT (Addinsoft), usando los siguientes métodos de análisis:

- Coeficiente de correlación de Spearman: en la valoración de los NAb humanos reactivos frente a los HC-ET y los niveles séricos de IgM humana. También en la comparación de la medida de los NAb reactivos frente a los HC-ET (ELISA) y frente las líneas tumorales A10+ (citometría de flujo).
- Test de Student: en la valoración de la citotoxicidad mediada por complemento frente células ET empleando sueros humanos.
- Test de Kruskal-Wallis: En la valoración de la reactividad de NAb humanos (grupos de sueros de alta, media y baja reactividad) frente a células A10+ y A10-, los niveles de NAb reactivos frente a los HC-ET y el grupo sanguíneo del donante, los niveles de IgM específica frente a los HC-ET y las distintas líneas celulares en los distintos grupos de ratones, en el experimento de citotoxicidad mediada por complemento frente células ET con sueros murinos y en el estudio de generación de anticuerpos IgM específicos con células humanas A10+.

Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

V. RESULTADOS

RESULTADOS

1- VALORACIÓN DE ANTICUERPOS NATURALES (NAb) REACTIVOS FRENTE A MOLÉCULAS A10+

1.1. Carbohidratos procedentes de células ET (HC-ET)

Se diseñó un ensayo para poder valorar la presencia de IgM reactiva frente a los HC-ET, en los sueros humanos. Para detectar estos NAb, utilizamos un tipo de ELISA indirecto. Como recta patrón usamos una mezcla de sueros que habíamos analizado previamente y que vimos que presentaban una alta reactividad frente a los HC-ET. Dicha reactividad fue expresada en UA/mL (unidades arbitrarias por mL). La Figura 8 muestra la recta de regresión empleada para el cálculo de la reactividad de los sueros analizados posteriormente.

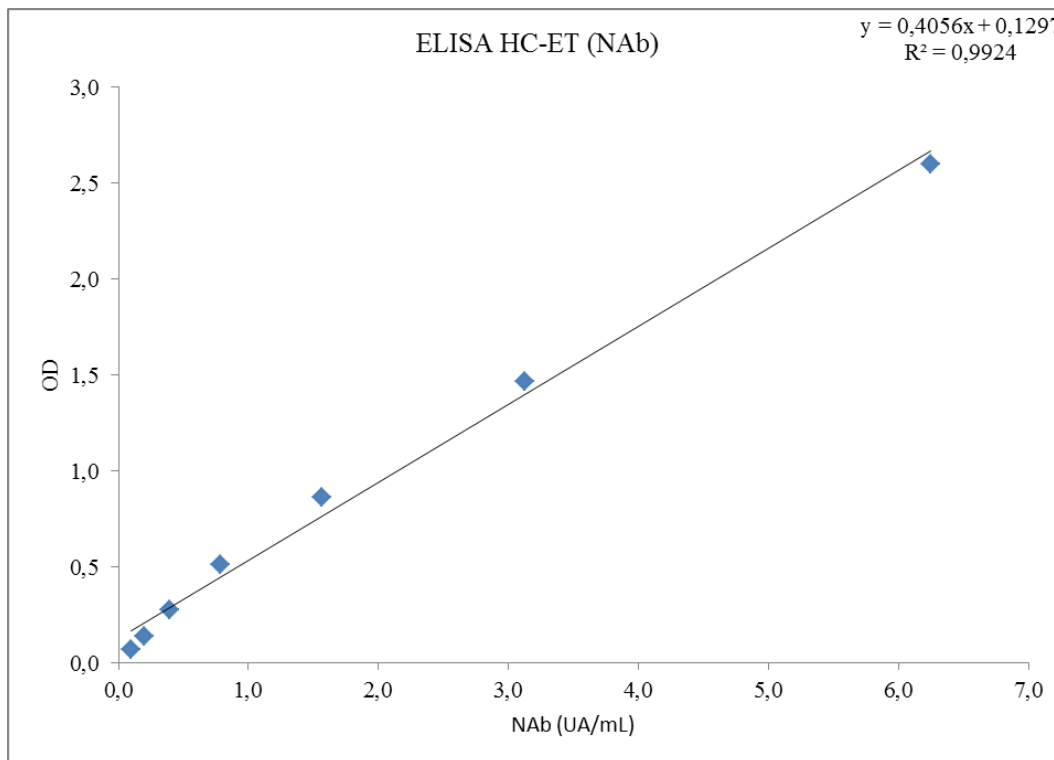


Figura 8. Recta de regresión empleada para calcular los niveles de NAb reactivos frente a los HC-ET en el suero de individuos sanos.

Resultados

Se analizaron una serie de 82 sueros humanos. Todos los sueros, se obtuvieron del Banco de Sangre del Hospital Clínico San Carlos y procedían de individuos sanos. Además, se valoró la IgM sérica total por nefelometría. Los valores obtenidos fueron de 112 ± 54 mg/dL y de 309 ± 462 UA/mL, para la IgM total y los NAb, respectivamente (Figura 9).

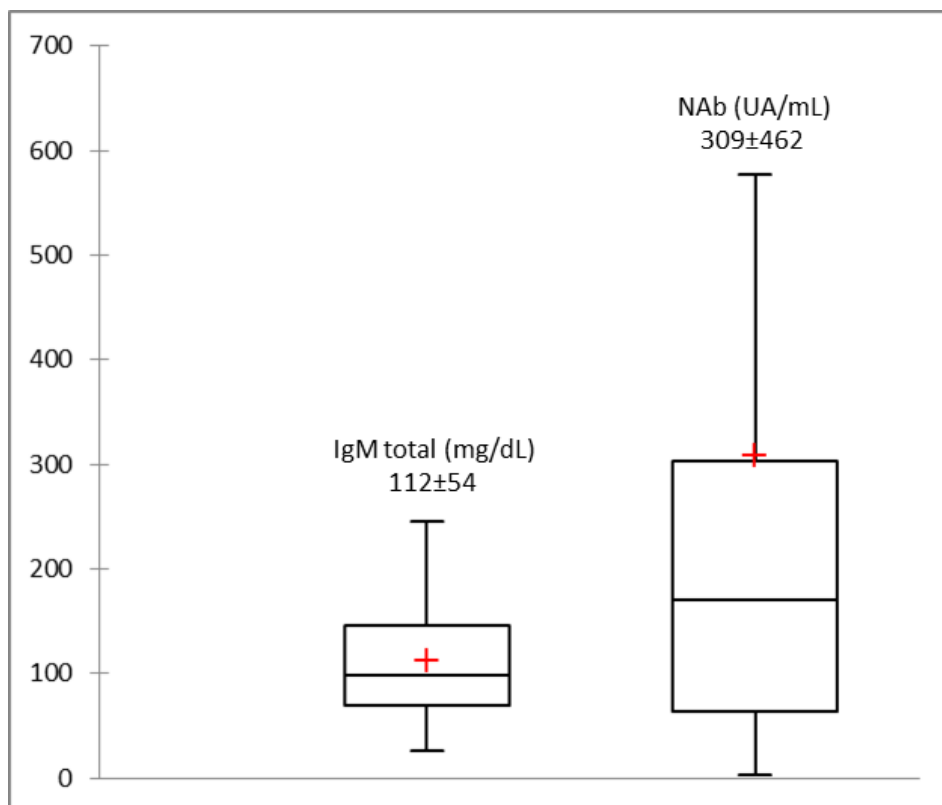


Figura 9. Titulación IgM total y de NAb frente a los HC-ET en el suero de individuos sanos.

Como primer dato, obtuvimos que la mayoría de los sueros humanos presentaban reactividad de NAb frente a los HC-ET. Tras hacer un análisis de percentiles, consideramos positivos los sueros cuya reactividad estaba por encima del percentil 20 (42 UA/mL). Los resultados obtenidos indicaron que alrededor del 80% (66/82) de los individuos testados presentaban anticuerpos naturales de clase IgM reactivos, en menor o mayor medida, frente a los HC-ET (Figura 10).

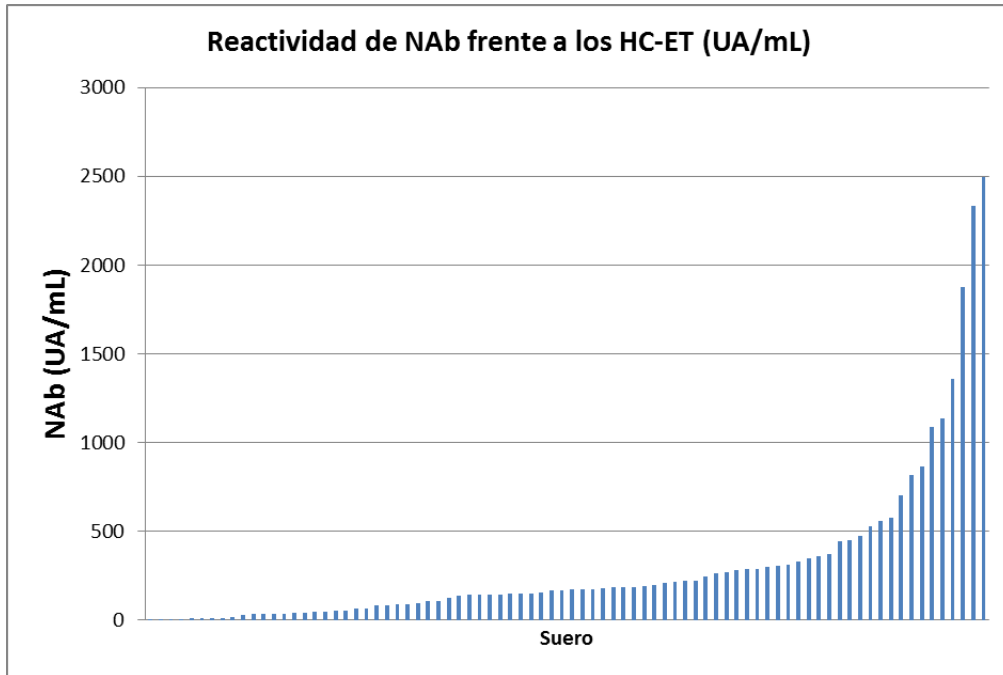


Figura 10. Reactividad de NAb en los sueros de individuos sanos.

Además, encontramos una correlación moderada entre los niveles séricos de IgM y los niveles de NAb reactivos frente a dichos carbohidratos (Rho de Spearman de 0,582; $p < 0,001$) (Figura 11).

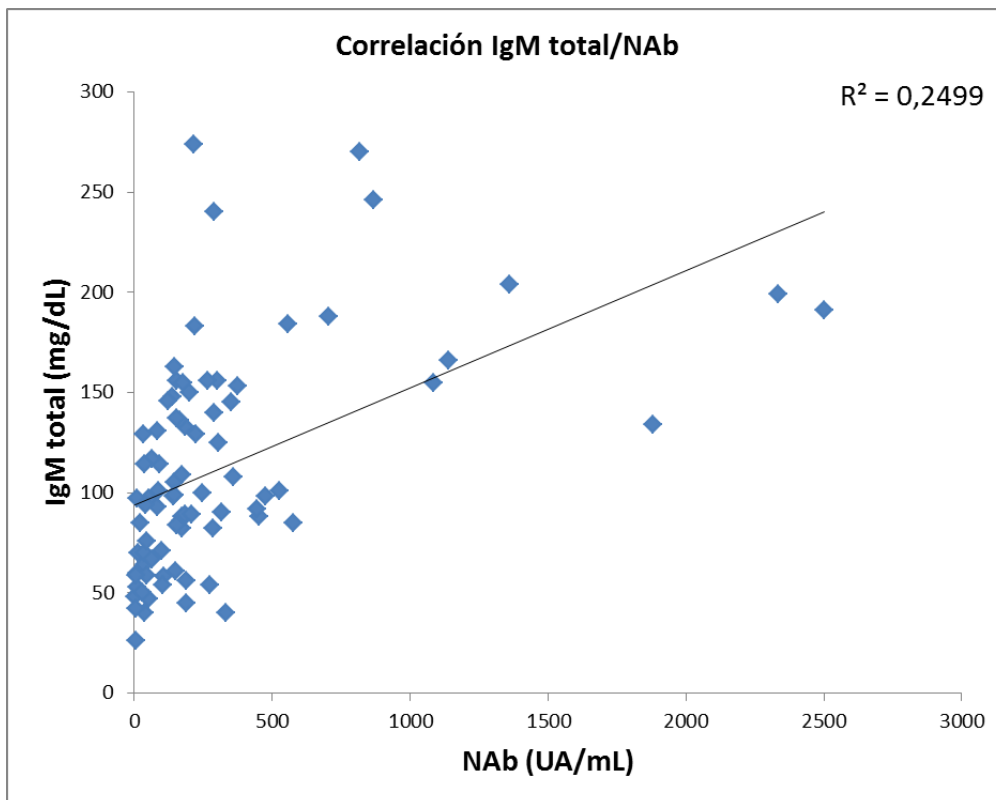


Figura 11. Gráfica de correlación entre los niveles de IgM total y los NAb reactivos frente a los HC-ET.

Resultados

Los datos obtenidos de la titulación de NAb reactivos frente a los HC-ET nos permitieron establecer 4 grupos de sueros (Figura 12):

- 1) Sueros negativos: <42 UA/mL (n=16)
- 2) Sueros con reactividad baja: 42-200 UA/mL (n=33)
- 3) Sueros con reactividad media: 200-500 UA/mL (n=21)
- 4) Sueros con reactividad alta: >500 UA/mL (n=12)

Esta distribución nos sería de ayuda para realizar los siguientes estudios.

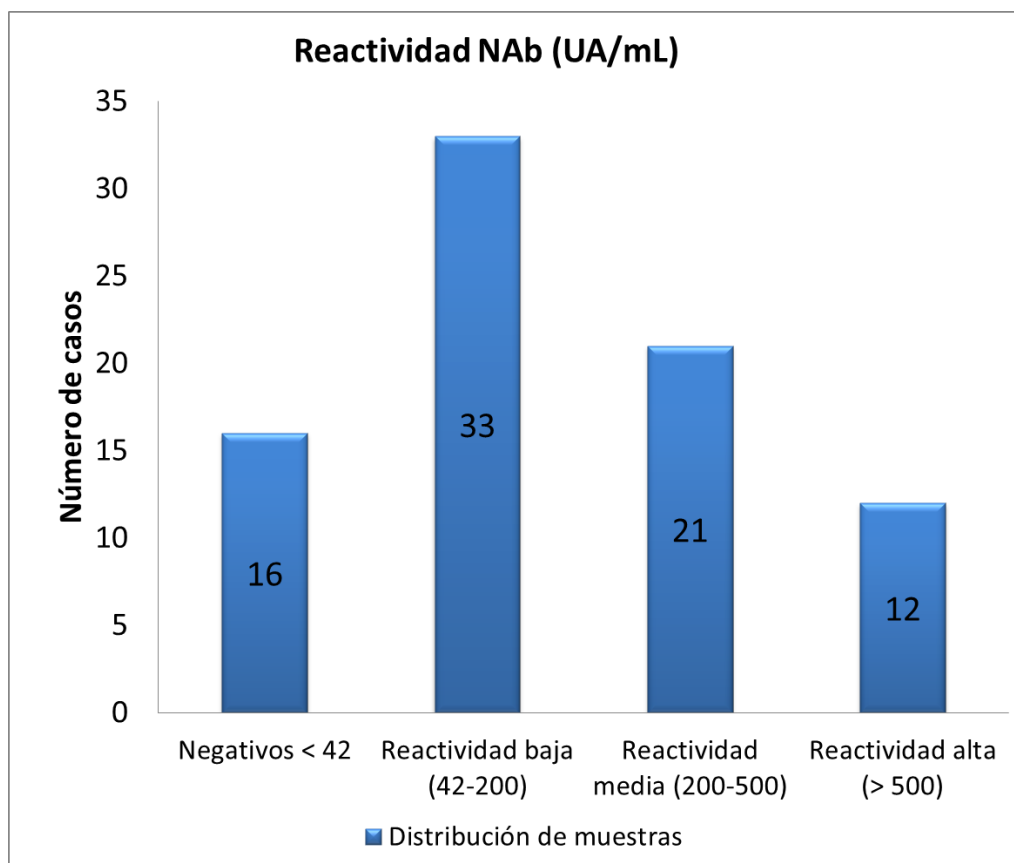


Figura 12. Distribución de muestras por los niveles de NAb reactivos frente a los HC-ET.

Por otro lado, no se observó ninguna relación entre el grado de reactividad de los NAb frente a los HC-ET y el grupo sanguíneo del donante (Tabla 6).

Tabla 6. Relación entre la reactividad de los NAb reactivos frente los HC-ET y el grupo sanguíneo del donante.

| NAb | Grupo sanguíneo | | | |
|-------------------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|
| | A n=34 | B n=14 | AB n=7 | O n=27 |
| Reactividad NAb (UA/mL) | 316 | 327 | 297 | 293 |
| p^* | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |

Estadística: Prueba de Kruskal-Wallis usando comparación múltiple por pares de Dunn.
n.s.: no significativo.

1.2. Líneas celulares murinas

Tras los resultados obtenidos en el punto anterior, el siguiente paso fue valorar la correlación entre el título de NAb frente a HC-ET y su reactividad frente a líneas tumorales murinas, con diferente grado de positividad con el AcMo A10. La descripción de las líneas celulares que se usaron se puede ver en la Tabla 7:

Tabla 7. Líneas celulares empleadas.

| Línea celular | Descripción | Resultado AcMo A10 (Mnl X) |
|--------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Ehrlich | Adenocarcinoma de origen mamario | 973 |
| Sarcoma 180 (S180) | Sarcoma derivado de metástasis | 116 |
| B16 | Melanoma | 20 |

Se utilizaron los 82 sueros que habíamos titulado previamente por ELISA frente a los HC-ET, agrupados según su grado de reactividad.

La valoración de la presencia de NAb reactivos frente a las líneas celulares descritas se realizó mediante citometría de flujo. Como parámetro a evaluar se utilizó la media de la fluorescencia obtenida (Mnl X).

Como se puede ver en la Figura 13, los resultados que obtuvimos indicaron claramente la existencia de NAb reactivos sólo frente a las líneas celulares A10+ (ET y S180). Además, esos NAb reactivos se encontraban presentes en los grupos de sueros de reactividad media y reactividad alta y no en los sueros de reactividad baja. Los

Resultados

valores obtenidos, en el caso de las células ET, fueron de $25,2 \pm 14,3$ y $45,4 \pm 25,6$, para los sueros de los grupos de reactividad media y alta respectivamente. En el caso del Sarcoma 180, los resultados fueron de $33,1 \pm 7,8$ y de $48,1 \pm 27,9$, para estos mismos grupos de sueros. La diferencia entre los valores de NAb reactivos obtenidos en los grupos de reactividad baja y alta fue estadísticamente significativa, para las líneas celulares S180 y ET ($p < 0,001$, en ambos casos).

No se se encontró reactividad IgM frente a la línea A10- (B16), ni en el caso del grupo de sueros con reactividad más alta.

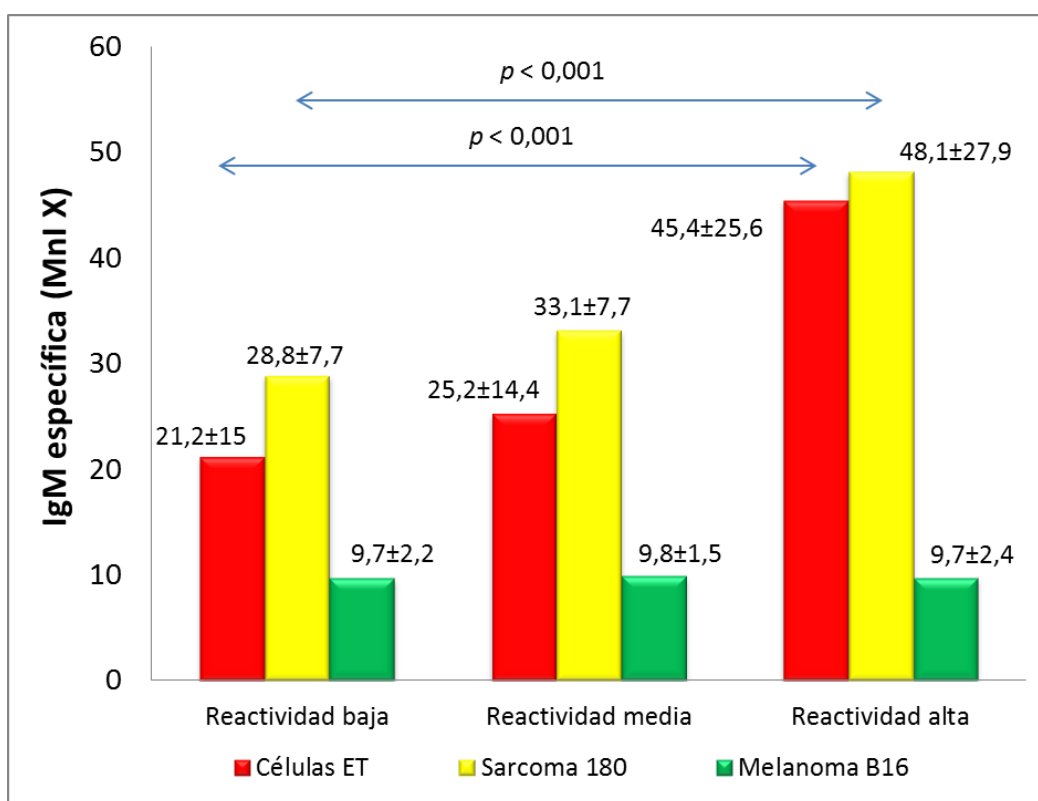


Figura 13. Reactividad de NAb frente células A10+ y A10- en sueros humanos. Grupos de sueros de alta, media y baja reactividad.

Estadística: Prueba de Kruskal-Wallis usando comparación múltiple por pares de Dunn.
Significación comparando con grupo sueros humanos con reactividad IgM baja.

La Figura 14 representa el histograma de un suero negativo y otro con reactividad alta y frente a la línea tumoral ET. Como se puede ver, la diferencia de señal entre los dos sueros es notable.

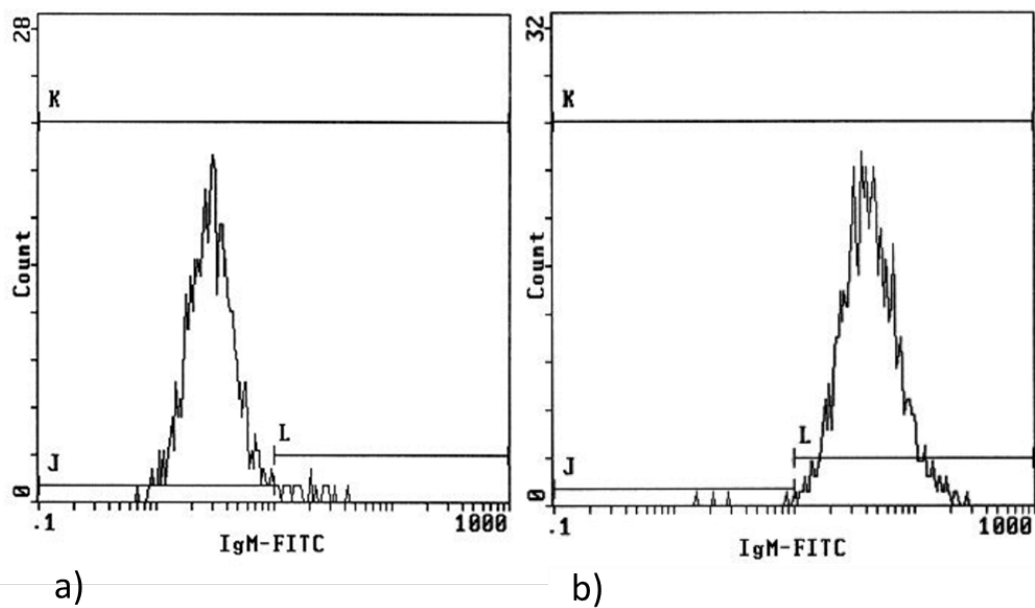


Figura 14. Ejemplo de histogramas de reactividad de NAb en sueros humanos frente células ET medida por citometría de flujo.

- a) Inmunofluorescencia de un suero negativo frente a ET.
- b) Inmunofluorescencia de un suero positivo frente a ET.

Con los datos de fluorescencia obtenidos y la reactividad encontrada por ELISA se hizo un estudio de correlación (Figura 15).

Como se observa en la Tabla 8, hubo una correlación moderada entre los anticuerpos IgM anti HC-ET valorados por ELISA y la citometría de flujo, en el caso de las líneas celulares ET y S180 (Rho de Spearman de 0,451; 0,532; $p < 0,001$ en los dos casos). Cuando se analizó la correlación existente usando la línea tumoral B16, se encontró un valor bajo sin significación estadística (Rho de Spearman de 0,213; $p = 0,055$).

Resultados

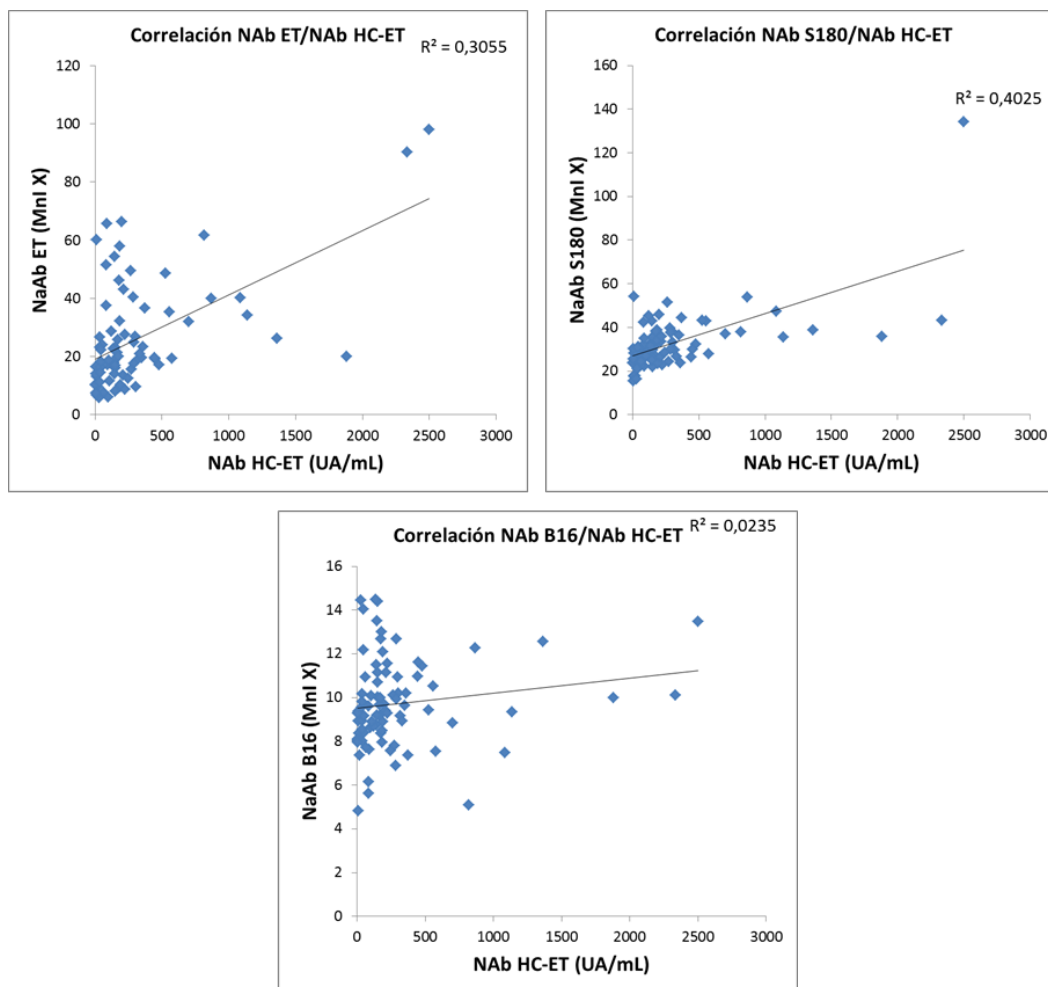


Figura 15. Correlación entre los NAb reactivos frente a los HC-ET y las líneas tumorales murinas.

Tabla 8. Correlación entre los valores de NAb reactivos frente a los HC-ET (ELISA) y los NAb contra las líneas tumorales (citometría) (Correlación de Spearman).

| ET | | |
|------------------------|-------------------|------------------------|
| Variabes | NAb ELISA (UA/mL) | NAb citometría (Mni X) |
| NAb ELISA (UA/mL) | 1 | 0,451 |
| NAb citometría (Mni X) | 0,451 | 1 |
| p-valores: | | |
| NAb ELISA (UA/mL) | 0 | <0,001 |
| NAb citometría (Mni X) | <0,001 | 0 |

S180

| S180 Variables | NAb ELISA (UA/mL) | NAb citometría (Mnl X) |
|------------------------|-------------------|------------------------|
| NAb ELISA (UA/mL) | 1 | 0,532 |
| NAb citometría (Mnl X) | 0,532 | 1 |
| p-valores: | | |
| NAb ELISA (UA/mL) | 0 | <0,001 |
| NAb citometría (Mnl X) | <0,001 | 0 |

B16

| Variables | NAb ELISA (UA/mL) | NAb citometría (Mnl X) |
|------------------------|-------------------|------------------------|
| NAb ELISA (UA/mL) | 1 | 0,213 |
| NAb citometría (Mnl X) | 0,213 | 1 |
| p-valores: | | |
| NAb ELISA (UA/mL) | 0 | 0,055 |
| NAb citometría (Mnl X) | 0,055 | 0 |

1.3. Tumores humanos

Tras haber valorado la presencia de NAb de clase IgM, reactivos frente a los HC-ET y haber confirmado su correlación con líneas tumorales murinas según la positividad o negatividad frente el AcMo A10, a continuación quisimos valorar lo mismo frente a células tumorales humanas de origen colorrectal.

Para la realización de este estudio, utilizamos dos tipos de tumores:

- 1- Línea tumoral de colon humano HT-29, crecida "in vivo" en forma de tumor xenogénico en ratones inmunodeficientes (RAG-2). HT-29 es una línea tumoral de adenocarcinoma de colon humano positiva para el AcMo A10.
- 2- Piezas quirúrgicas/biopsias de tumores humanos (tejido tumoral y tejido sano adyacente).

Tanto el tumor HT-29 como las piezas quirúrgicas de cáncer colorrectales, fueron evaluados semi-cuantitativamente mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta en cortes de tejido en criostato.

1.3.1. Tumor HT-29

En este estudio valoramos la reactividad de los sueros agrupados según su titulación por ELISA frente a los HC-ET.

Se analizaron los 82 sueros valorados en los experimentos anteriores.

Resultados

Como control negativo se utilizó un tejido no tumoral A10- de procedencia murina. En concreto cortes de hígado de C57BL/6J.

Los resultados obtenidos se pueden ver resumidos en la Tabla 9. En el caso del grupo de sueros caracterizado por su baja reactividad frente a los HC-ET, el 18% de los sueros fueron positivos. Para el grupo de reactividad media, el resultado fue del 62%. En el grupo de alta reactividad obtuvimos un 92% de sueros positivos. Como se observa en dicha tabla, había correlación entre la frecuencia de casos positivos en cada grupo de sueros y la intensidad de señal obtenida ($p < 0,01$). En el caso del tejido control A10- (tejido hepático), todos los sueros fueron negativos.

Tabla 9. NAb reactivos frente el tumor HT-29 en suero de individuos sanos medida mediante IFI en corte de criostato.

| Tejido | Sueros grupo reactividad baja n=49 | Sueros grupo reactividad media n=21 | Sueros grupo reactividad alta n=12 |
|------------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
| <u>Tumor HT-29 (A10+++)</u> | 9/49 (18%) | 13/21 (62%) | 11/12 (92%) |
| | 9+ | 1++ | 6++ |
| | 40- | 12+ | 5+ |
| | | | 1- |
| <u>Tejido hepático</u> | 0/49 (0%) | 0/21 (0%) | 0/12 (0%) |
| <u>C57BL/6J (A10-)</u> | 49- | 21- | 12- |

- Negativo.
- + Reactividad moderada.
- ++ Reactividad alta.

En la Figura 16 se muestran ejemplos de IFI frente al tumor HT-29 o al tejido control con el AcMo A10, con un suero de reactividad alta y uno de reactividad baja. Como se puede ver, la fluorescencia con el suero de reactividad alta y el AcMo A10 es muy intensa frente a HT-29, en contraposición al suero de baja reactividad o cuando se prueban frente al tejido control.

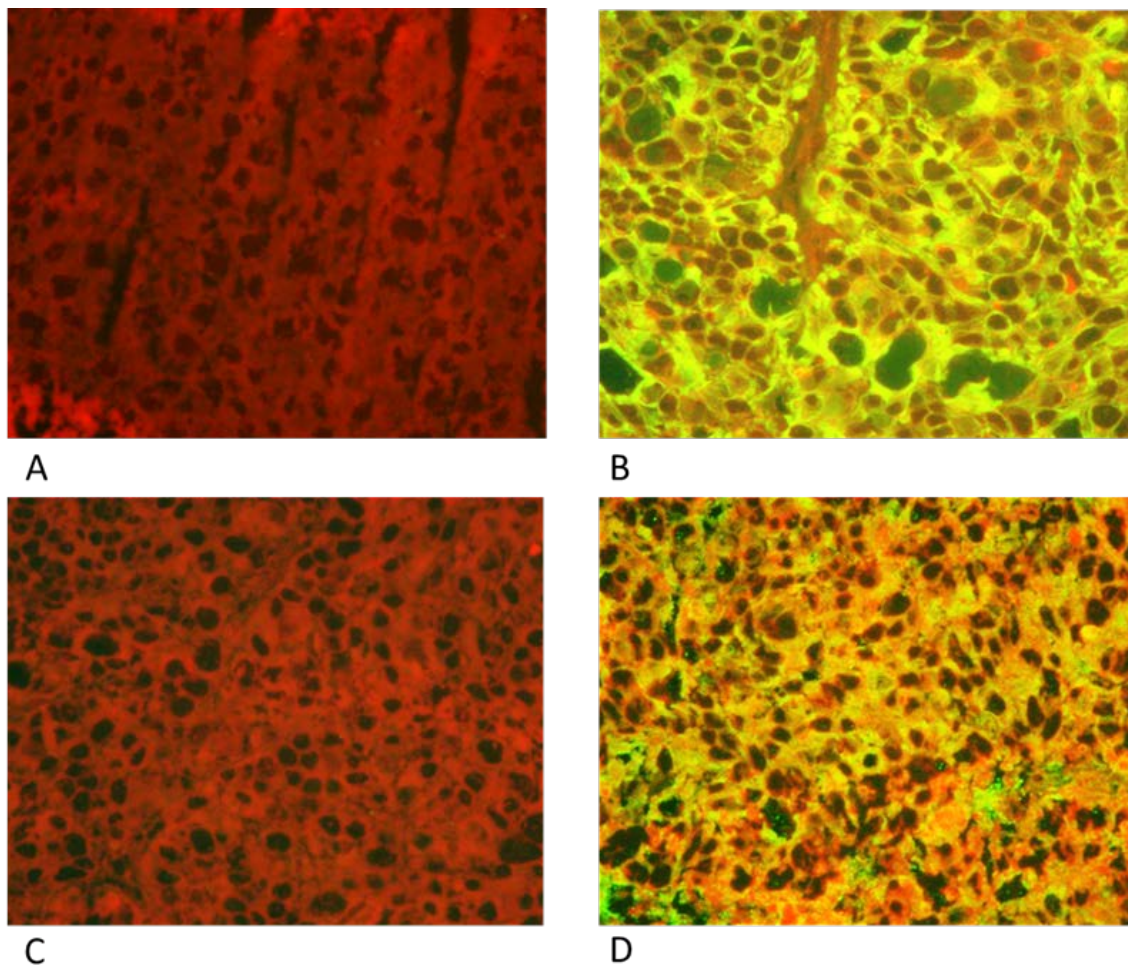


Figura 16. NAb reactivos frente al tumor HT-29 en suero de individuos sanos medido mediante IFI en cortes de tejido en criostato.

Imágenes captadas con un aumento 40X. El AcMo A10 se utilizó a una dilución 1/200 y los sueros a una dilución 1/20. IFI con FITC y contratinción con Azul de Evans.

- A. Control - (Tejido hepático murino con un suero del grupo de reactividad alta).
- B. Control + (HT-29 con el AcMo A10).
- C. Suero del grupo de reactividad baja con tejido HT-29 (-).
- D. Suero del grupo de reactividad alta con tejido HT-29 (++)

Resultados

1.3.2. Tejido tumoral de biopsias/piezas quirúrgicas de colon humano

Tras analizar los datos obtenidos en el punto anterior, quisimos confirmar esos resultados usando tejido colorrectal tumoral humano. Con este fin, utilizamos tejido proveniente de piezas quirúrgicas o biopsias.

Dentro de este panel de tumores se seleccionaron tejidos A10+ y tejidos A10-. En el estudio incluimos 15 adenocarcinomas de colon humano A10+ y 6 adenocarcinomas A10-. Como control negativo, utilizamos el tejido normal de colon proveniente del mismo paciente (tejido adyacente al tumor). Para evitar reactividades contra grupos sanguíneos se escogieron tumores procedentes de pacientes con grupo sanguíneo A o O y sueros de individuos del grupo A.

Testamos 4 de los sueros analizados anteriormente, seleccionados por sus niveles de NAb reactivos frente a los HC-ET. De estos sueros, uno tenía unos niveles muy altos de NAb reactivos (2.500 UA/mL), dos presentaban niveles altos o moderados (868 y 527, respectivamente) y el último tenía un título bajo (153). La Tabla 10 resume los resultados obtenidos con estos sueros en los experimentos anteriores.

Tabla 10. Resultados obtenidos anteriormente con los 4 sueros empleados en el estudio de colon humano.

| Resultados obtenidos | Suero 1 | Suero 2 | Suero 3 | Suero 4 |
|------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| <u>IgM total (mg/dL)</u> | 191 | 246 | 101 | 156 |
| <u>NAb reactivos HC-ET (UA/mL)</u> | 2.500 | 868 | 527 | 153 |
| <u>NAb reactivos (MnIX)</u> | | | | |
| ET | 97,87 | 39,34 | 48,58 | 16,10 |
| S180 | 134,30 | 53,71 | 43,32 | 21,93 |
| B16 | 13,47 | 12,27 | 9,43 | 10,02 |
| <u>IFI (HT-29)</u> | ++ | ++ | ++ | - |

Los resultados obtenidos en el estudio con los adenocarcinomas de colon humano se pueden ver de forma detallada en la Tabla 11. Los sueros 1 y 2, que presentaban unos niveles de NAb reactivos contra los HC-ET altos, detectaban el 100% de los tumores A10+. Por el contrario, el suero 4, que fue seleccionado como suero con baja reactividad, sólo era capaz de reconocer un 7 % de los tumores positivos para el AcMo A10. En el caso del suero con una reactividad intermedia el 27% de los tumores A10+ fueron detectados. Sin embargo, estos sueros eran mayoritariamente negativos cuando se incubaban con tumores de colon A10- y también con el tejido sano negativo circundante al tumor.

Tabla 11. Resultados de NAb reactivos contra adenocarcinomas de colon en suero de individuos sanos (IFI en corte en criostato).

| Muestra | Tumores A10+ n=15 | | Tumores A10- n=6 | |
|----------|----------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| | Tejido tumoral | Tejido normal | Tejido tumoral | Tejido normal |
| AcMo A10 | 15/15 (100%) 12++ 3+ | 0/15 (0%) 15- | 0/6 (0%) 6- | 0/6 (0%) 6- |
| Suero 1 | 15/15 (100%) 6++ 9+ | 0/15 (0%) 15- | 0/6 (0%) 6- | 1/6 (17%) 1+ 5- |
| Suero 2 | 15/15 (100%) 6++ 9+ | 2/15 (13%) 2+ 13- | 0/6 (0%) 6- | 0/6 (0%) 6- |
| Suero 3 | 4/15 (27%) 4+ 9- | 0/15 (0%) 15- | 0/15 (0%) 15- | 1/6 (17%) 1+ 5- |
| Suero 4 | 1/15 (7%) 1+ 14- | 0/15 (0%) 15- | 0/15 (0%) 15- | 0/6 (0%) 6- |

- Negativo.
- + Reactividad moderada.
- ++ Reactividad alta.

Resultados

La Figura 17 representa un ejemplo de IFI de un tumor A10+, otro A10- y tejido sano circundante, con el AcMo A10 y los sueros 1 y 2 (S1 y S2). Los dos sueros empleados sólo reconocen el tumor A10+, siendo negativos los tejidos sanos adyacentes, en todos los casos. Se puede ver que el patrón de reactividad, usando el A10 y los sueros es muy parecido, reconociendo fundamentalmente la zona glandular.

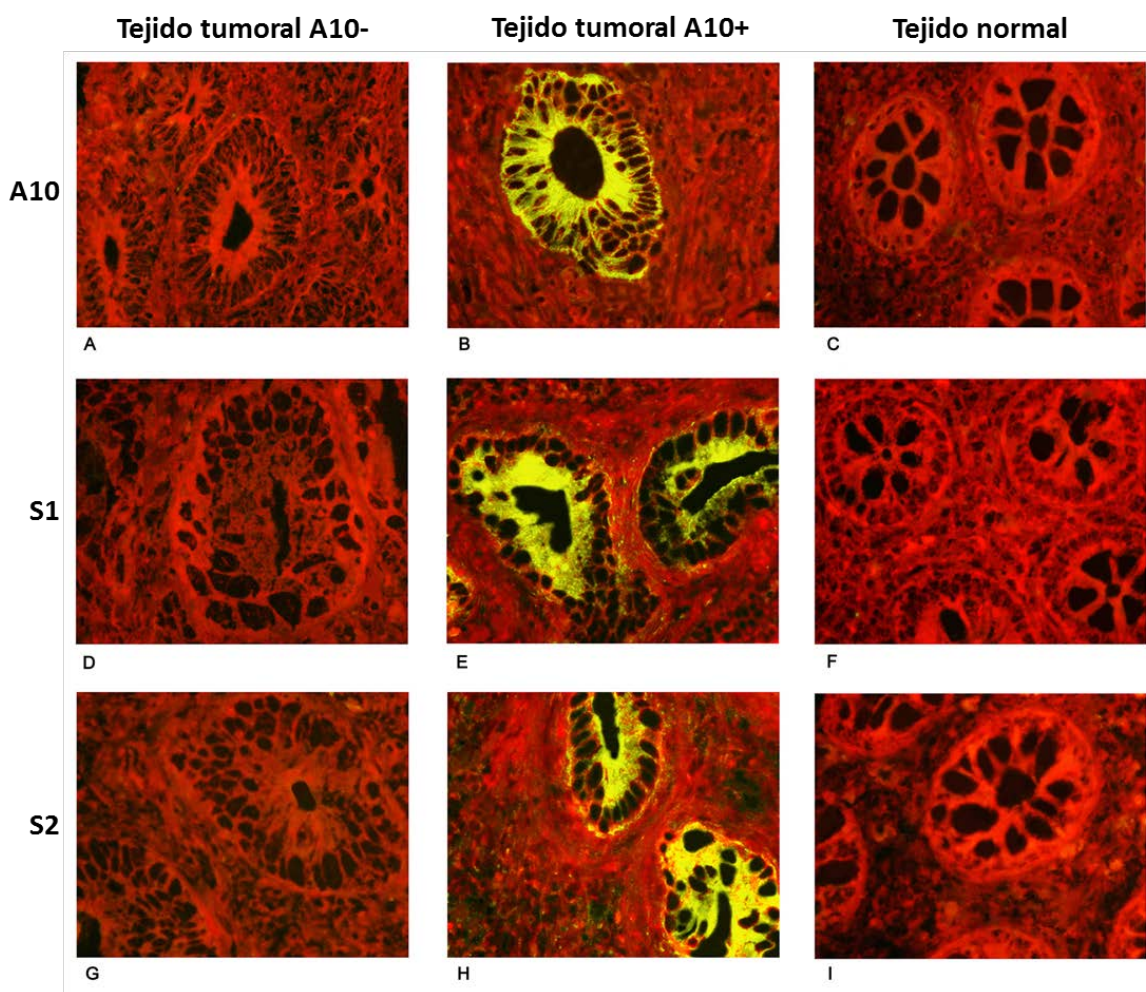


Figura 17. NAb reactivos contra adenocarcinomas de colon humano en suero de individuos sanos medida mediante IFI en corte de criostato.

Imágenes captadas con un aumento de 40X (tejido tumoral) y 100X (tejido normal adyacente). El AcMo A10 se utilizó a una dilución 1/200 y los sueros (S1 y S2) a una dilución 1/20. IFI con FITC y contratinción con Azul de Evans.

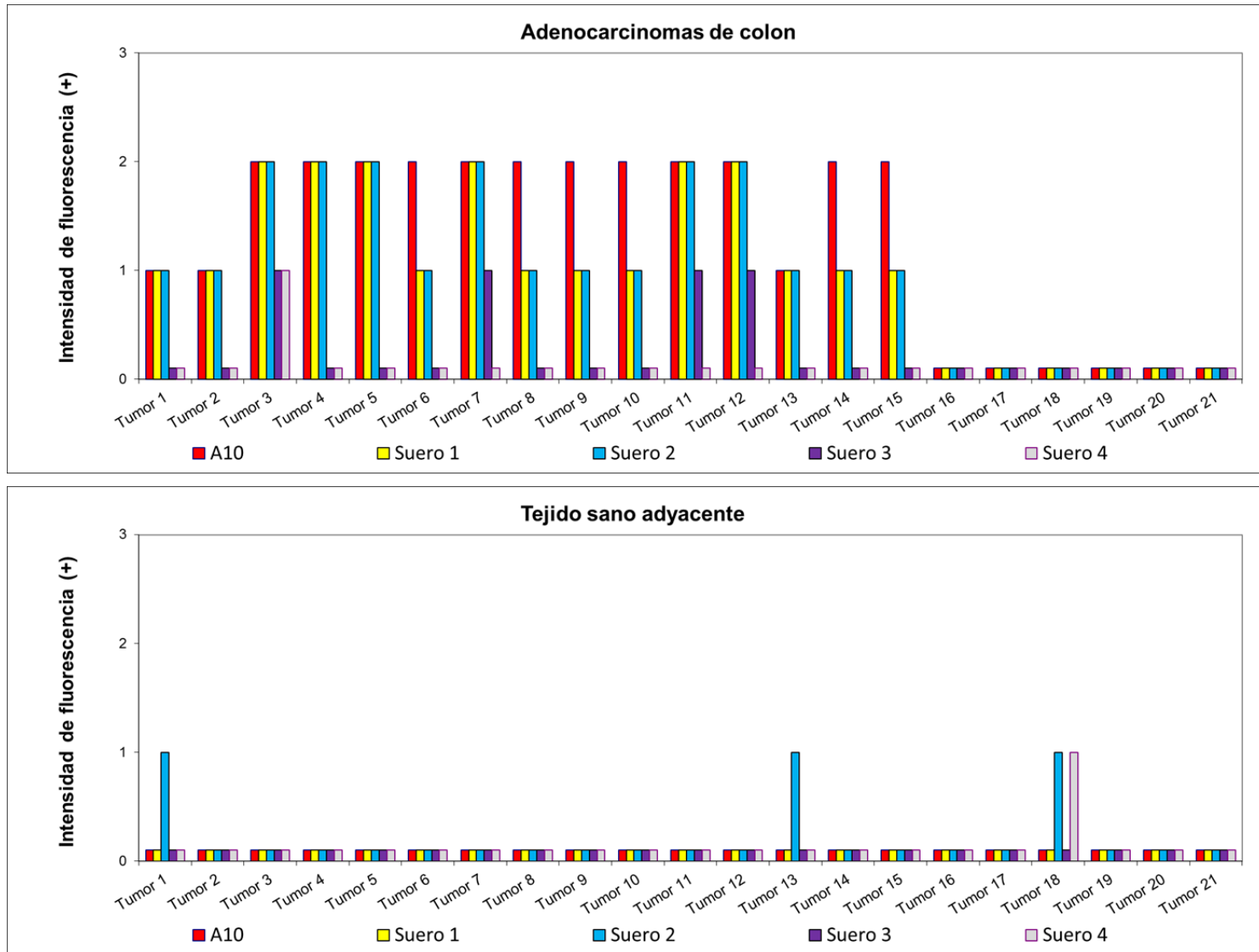
- A. AcMo A10 con tejido tumoral A10-.
- B. AcMo A10 con tejido tumoral A10+.
- C. AcMo A10 con tejido de colon normal.
- D. Suero 1 con tejido tumoral A10-.
- E. Suero 1 con tejido tumoral A10+.
- F. Suero 1 con tejido de colon normal.
- G. Suero 2 con tejido tumoral A10-.
- H. Suero 2 con tejido tumoral A10+.
- I. Suero 2 con tejido de colon normal.

En la Figura 18 se puede observar la correlación existente entre el grado de positividad de los diferentes tejidos frente al AcMo A10 y los niveles de NAb reactivos frente a los tumores, presentes en los 4 sueros analizados. Como se puede ver, existe una fuerte correlación entre la positividad frente a este anticuerpo y la presencia de IgM natural reactiva en los sueros. Estos niveles de NAb son mayores en los sueros muy positivos frente a los HC-ET (sueros 1 y 2), menores en el suero con un título moderado (suero 3), y prácticamente nulos para el suero negativo (suero 4).

Resultados

Figura 18. Correlación entre el grado de reactividad del AcMo A10 y los niveles de NAb reactivos presentes en 4 sueros de individuos sanos, frente adenocarcinomas colorrectales humanos.

Los sueros humanos fueron seleccionados por su título de NAb reactivos frente a los HC-ET (Sueros 1-2: alto. Suero 3: moderado. Suero 4: bajo). Los tejidos empleados corresponden con 15 adenocarcinomas colorrectales humanos A10+, 6 tumores A10-, y sus correspondientes tejidos normales adyacentes.



2- TITULACIÓN DE ANTICUERPOS DE CLASE IgM ESPECÍFICOS FRENTE A MOLÉCULAS A10+, EN RATONES INMUNIZADOS CON CÉLULAS ET

Tras haber observado una correlación entre los tumores humanos y el HC-ET a nivel de su reactividad con el AcMo A10 o NAb, quisimos valorar la posibilidad de confirmarla mediante la producción de anticuerpos IgM específicos. Para ello, inmunizamos ratones con células ET como fuente de HC-ET A10 reactivos. Como controles negativos empleamos células A10- (B16), el vehículo en el que iban suspendidas las células (PBS) y suero de ratones no inmunizados.

2.1. Carbohidratos procedentes de células ET (HC-ET)

Una vez concluidos los protocolos de inmunización y tras obtener el suero de los animales tratados, procedimos a titular la IgM específica frente a los HC-ET. La valoración de estos anticuerpos se hizo mediante ELISA, utilizando una recta patrón con el AcMo A10 y expresando los resultados en microgramos de IgM específica por mL. La Figura 19 muestra la recta de regresión empleada para el cálculo de la reactividad de los sueros analizados.

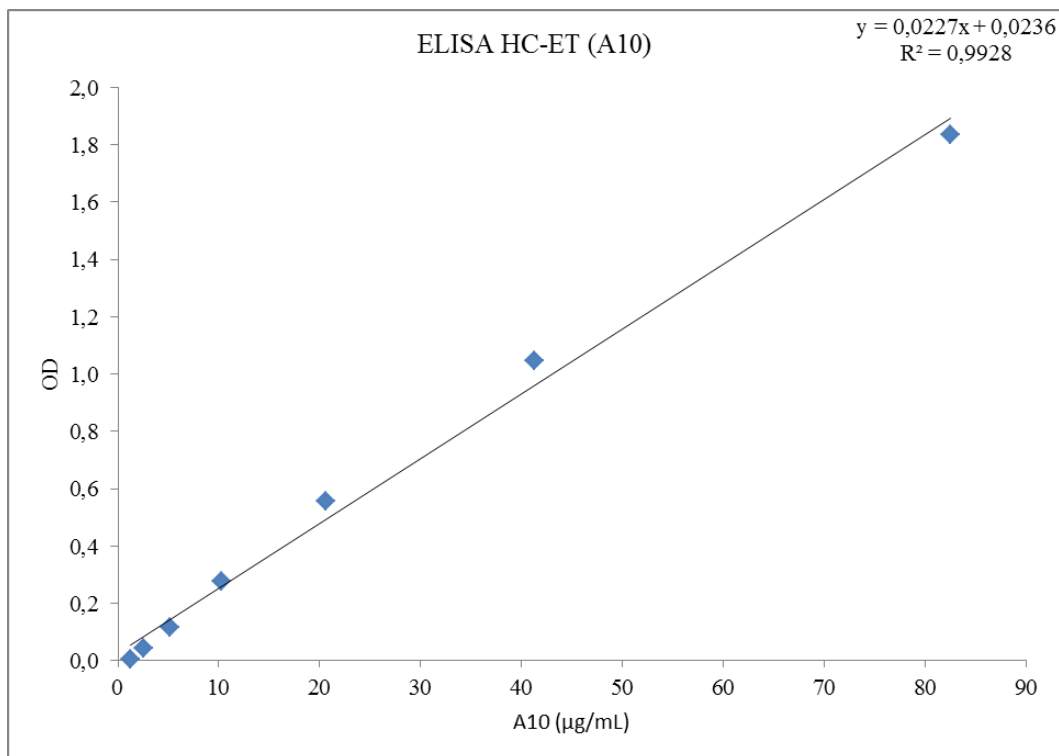


Figura 19. Recta de regresión empleada para calcular la reactividad de anticuerpos IgM específicos frente a los HC-ET en el suero de ratones inmunizados. La recta se hizo con el AcMo A10.

Resultados

Los resultados obtenidos se pueden ver detallados en la Tabla 12 y la Figura 20. Como era de esperar, los niveles de IgM específica frente a los HC-ET se incrementaron de manera significativa en los animales inmunizados con la células ET irradiadas, respecto los animales no inmunizados ($22,3\pm 8,2$ vs. $3,8\pm 3,2$ $\mu\text{g/mL}$; $p=0,003$). No sucedió lo mismo con los animales a los que se les inoculó PBS o la línea celular B16 (A10-).

Tabla 12. Titulación IgM específica frente a los HC-ET en ratones inmunizados con ET.

| Valor | Ratones inoculados con | | | |
|-------------------|------------------------|---------------|---------------|----------------|
| | Nada n=5 | PBS n=5 | B16 n=5 | ET n=18 |
| Media $\pm\sigma$ | 3,8 \pm 3,2 | 3,3 \pm 1,7 | 4,8 \pm 3,3 | 22,3 \pm 8,2 |
| p^* | | n.s. | n.s. | 0,003 |

*: Prueba de Kruskal-Wallis usando comparación múltiple por pares de Dunn.
Significación comparando con grupo de ratones no inmunizados.
n.s.: no significativo.

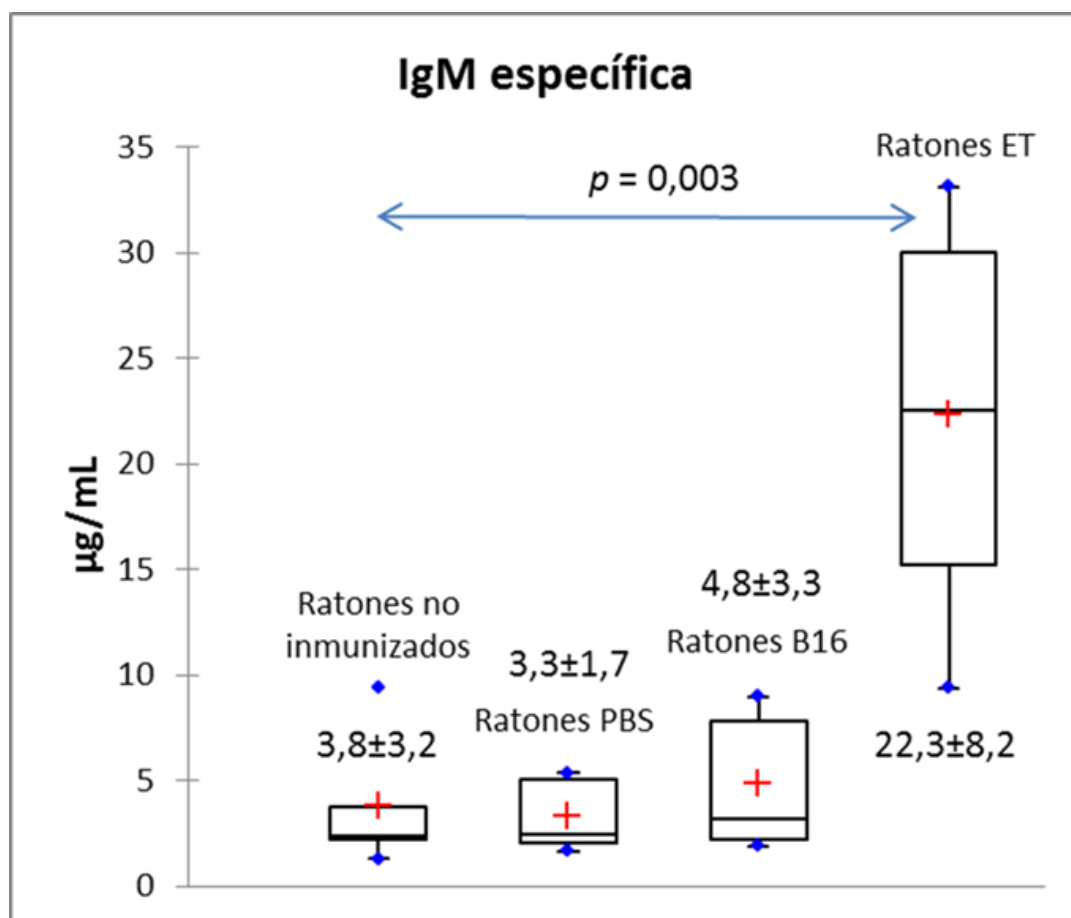


Figura 20. Titulación IgM específica frente a los HC-ET en sueros de animales inmunizados con células ET.

2.2. Líneas celulares/células

El siguiente paso fue valorar la presencia de IgM específica frente varias líneas celulares tumorales y células no tumorales, con distinta expresión del epitopo reconocido por el AcMo A10, mediante experimentos de citometría de flujo. Como parámetro, se evaluó la media de la fluorescencia obtenida (Mni X). Utilizamos los sueros de los grupos de animales inmunizados con las células ET. Como controles, usamos los sueros de los animales inmunizados con la línea B16, los no inmunizados y los sueros de grupo al que se le inyectó PBS ip.

Con este experimento intentamos establecer una correlación entre los valores de estos anticuerpos inducidos y el grado de positividad de la línea celular frente al AcMo A10.

Utilizamos una serie de líneas celulares murinas y humanas, tanto A10+ como A10-. Dentro de la batería de líneas celulares humanas, analizamos 3 líneas diferentes de adenocarcinomas colorrectales, con diferente grado de expresión del epitopo reconocido por el AcMo A10.

La descripción de las células que empleamos y su reactividad con el AcMo A10 se puede ver en la Tabla 13:

Tabla 13. Líneas celulares/células empleadas y su reactividad con el AcMo A10.

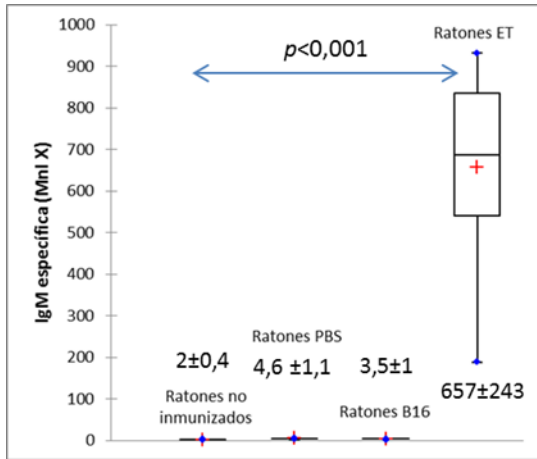
| Línea celular/células | Origen | Descripción | Resultado AcMo A10 (Mni X) |
|-----------------------|--------|-------------------------------------|----------------------------|
| Ehrlich | Murino | Adenocarcinoma de origen mamario | 943,60 |
| Sarcoma 180 (S180) | Murino | Sarcoma derivado de metástasis | 49,20 |
| Células de bazo | Murino | Células de bazo de ratones C57BL/6J | 1,77 |
| B16 | Murino | Melanoma | 3,78 |
| PBL | Humano | Células de sangre periférica | 4,08 |
| K562 | Humano | Eritroblastoma | 4,61 |
| Raji | Humano | Linfoblastoma | 2,70 |
| Colo 205 | Humano | Adenocarcinoma de colon | 4,28 |
| Snu-c1 | Humano | Adenocarcinoma de colon | 22,4 |
| Colo 320 | Humano | Adenocarcinoma de colon | 34,8 |

Resultados

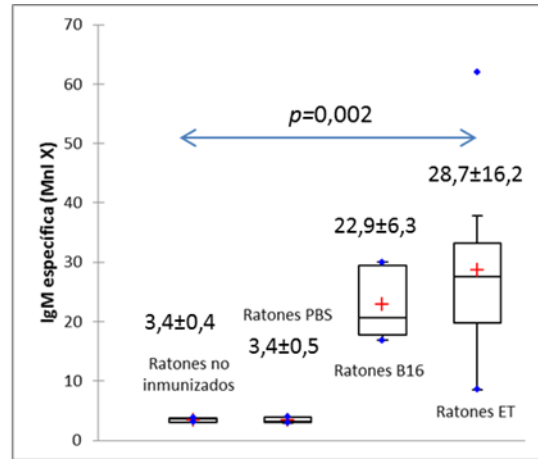
2.2.1. Líneas murinas

Como se puede ver en la Figura 21, los resultados que obtuvimos indicaron que sólo los animales inmunizados presentaron un aumento de la IgM específica. En el caso de los ratones inmunizados con las células ET, se vio un incremento significativo de la IgM específica frente las líneas celulares A10+ (ET y S180), respecto los valores basales. Los valores obtenidos, en el caso de las células ET, fueron de 657 ± 243 y $2 \pm 0,4$ ($p < 0,001$). Cuando se analizó la IgM específica frente al S180, los resultados fueron de $28,7 \pm 16,2$ y de $3,4 \pm 0,4$, para estos mismos grupos de sueros ($p = 0,002$). Por otro lado, los animales inmunizados con las células tumorales B16 presentaron un título alto de IgM específica frente estas células, comparando con los valores basales ($51,8 \pm 10,4$ vs. $2,3 \pm 0,1$; $p < 0,001$).

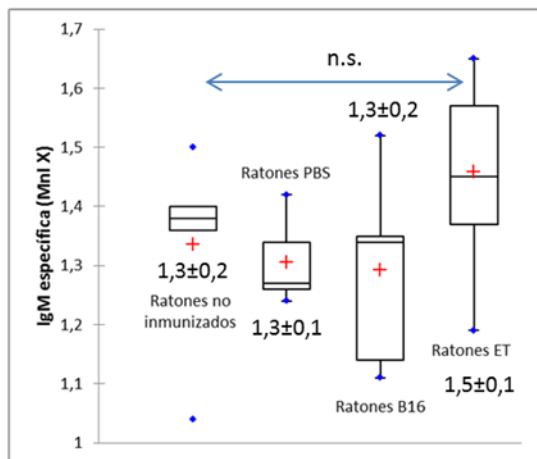
No se encontraron apenas niveles de IgM específica frente aquellas líneas que eran A10-, ni en el caso de los animales control.



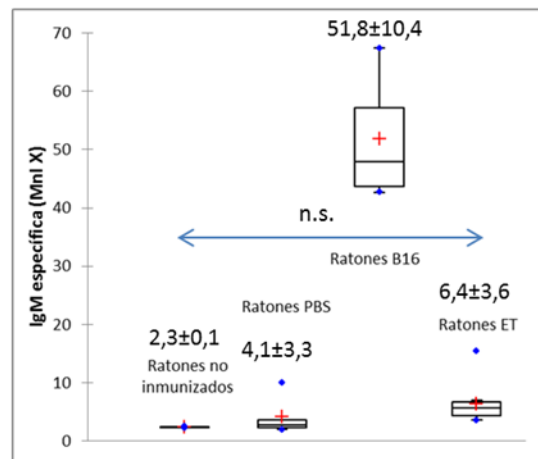
a) ET



b) S180



c) Células de bazo



d) B16

Figura 21. Reactividad IgM específica en sueros de ratones inmunizados. Líneas tumorales o células murinas.

Estadística: Prueba de Kruskal-Wallis usando comparación múltiple por pares de Dunn.
Significación comparando con grupo de ratones no inmunizados.
n.s.: no significativo.

Resultados

2.2.2. Líneas humanas mieloides

Cuando analizamos la IgM específica frente células humanas, de estirpe mieloide o linfoide (A10-), los niveles de anticuerpos de clase IgM específicos se mantuvieron cerca de los valores basales que presentaban los ratones no inmunizados. La Figura 22 detalla estos resultados. No se encontraron diferencias significativas entre la IgM de los ratones inmunizados con las células ET y los controles, frente ninguna de las células probadas.

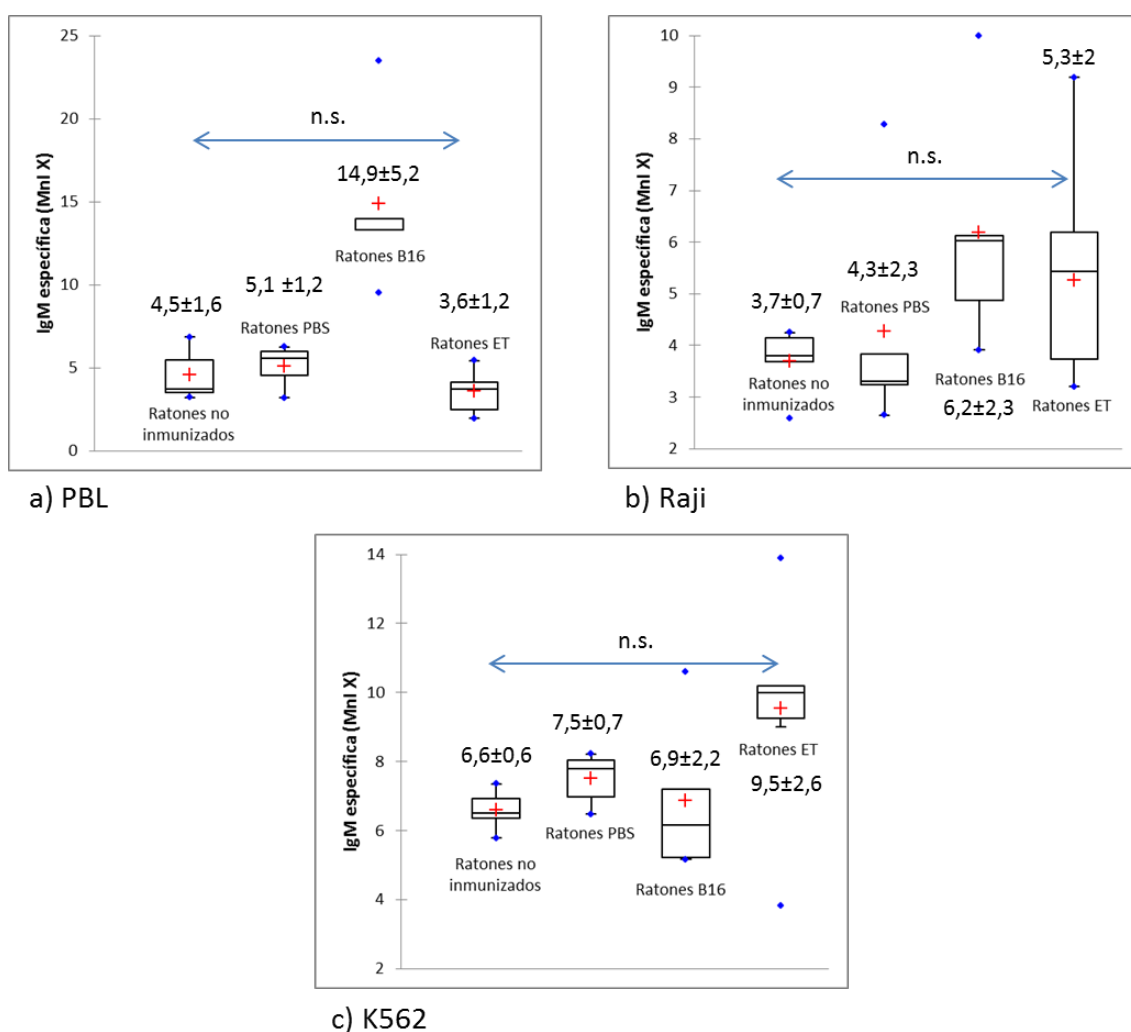


Figura 22. Reactividad IgM específica en sueros de ratones inmunizados. Líneas tumorales o células humanas mieloides.

Estadística: Prueba de Kruskal-Wallis usando comparación múltiple por pares de Dunn.
Significación comparando con grupo de ratones no inmunizados.
n.s.: no significativo.

2.2.3. Líneas de adenocarcinomas colorrectales humanos

Por último, valoramos la presencia de IgM específica frente varias líneas celulares de adenocarcinomas colorrectales humanos. Como se puede ver en la Figura 23, sólo los animales inmunizados con las células ET presentaron un incremento significativo de los valores de IgM específica respecto los valores basales, y sólo frente a las líneas celulares A10+. Este incremento fue de $13,2 \pm 1,9$ vs. $2,1 \pm 0,4$ ($p < 0,001$) para la línea celular A10+ (AcMo A10=22,4). En el caso de la línea Colo-320 (AcMo A10=34,8), los resultados fueron de $15,9 \pm 7,1$ vs. $4 \pm 0,5$, ($p < 0,001$). No se observó ningún aumento de los niveles de IgM específica contra la línea Colo-205, que era A10- (AcMo A10=4,28).

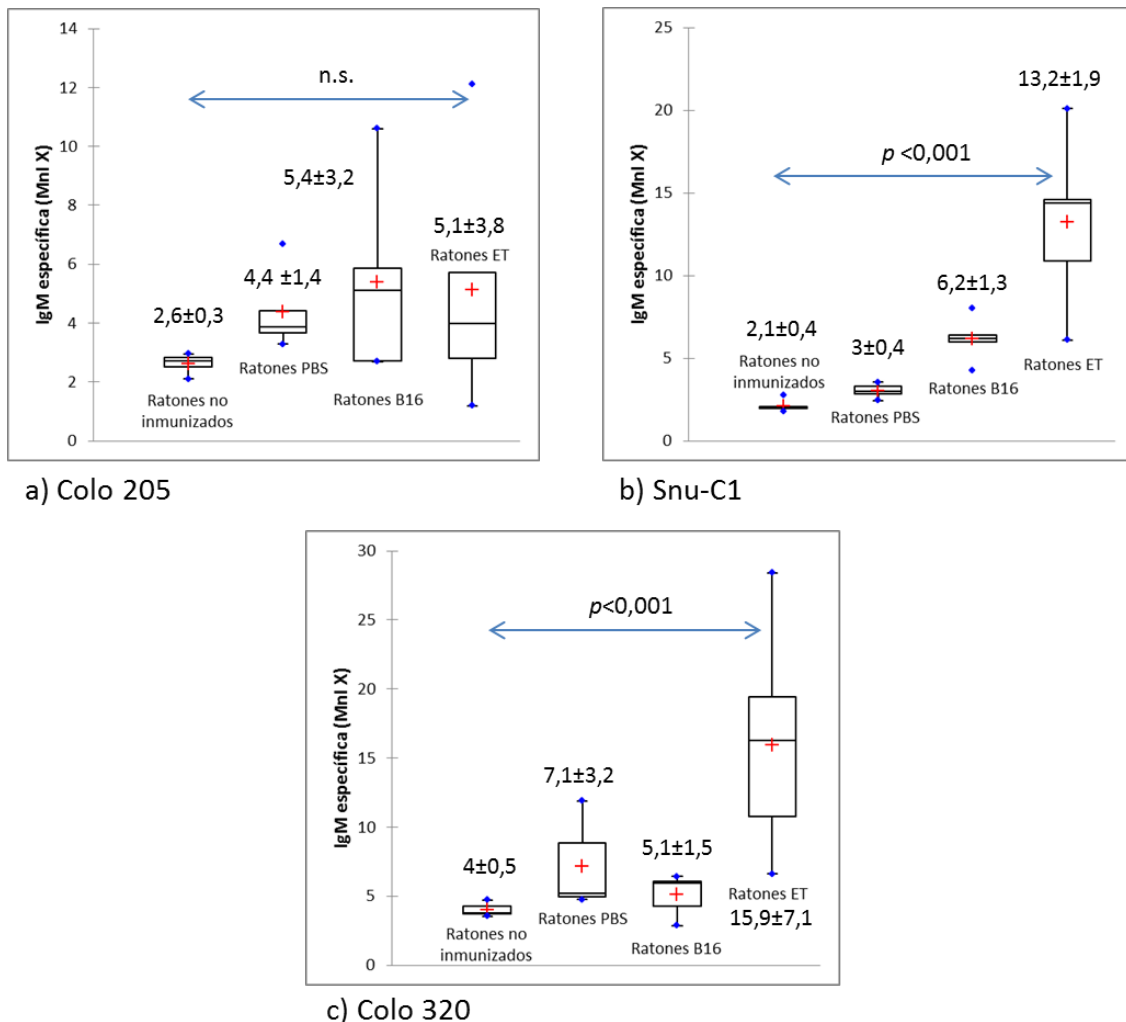


Figura 23. Reactividad IgM específica en sueros de ratones inmunizados. Líneas celulares de adenocarcinomas de colon humano.

Estadística: Prueba de Kruskal-Wallis usando comparación múltiple por pares de Dunn.
 Significación comparando con grupo de ratones no inmunizados.
 n.s.: no significativo

Resultados

2.3. Tumores humanos

Por último, se valoró si los sueros de los animales inmunizados presentaban IgM específica frente al tejido tumoral de colon humano y si esta reactividad correlacionaba con la expresión del epítipo reconocido por el AcMo A10.

Para la realización de este estudio, y como en el caso de los NAb, utilizamos dos tipos de tejido tumoral colorrectal:

- 1- Línea tumoral de colon humano HT-29, crecida “in vivo” en forma de tumor xenogénico.
- 2- Piezas quirúrgicas/biopsias de tumores de colorrectales humanos (tejido tumoral y tejido sano adyacente).

Además, realizamos un ensayo de adsorción, intentando bloquear la IgM específica presente en los sueros de los animales inmunizados. Para ello, empleamos las células ET como fuente de Ca10.

Tanto el tumor HT-29 como las piezas quirúrgicas de cáncer colorrectales, fueron evaluados semi-cuantitativamente mediante ensayos de inmunofluorescencia en cortes en criostato.

2.3.1. Tumor HT-29

Se valoraron los sueros de los animales inmunizados utilizados en los experimentos anteriores. Como control negativo se utilizaron los sueros de los grupos de ratones no inmunizados y de los ratones a los que se les inoculó PBS.

La Tabla 14 resume los resultados obtenidos. Los sueros de los ratones inmunizados con las células ET fueron mayoritariamente positivos (94,44%). Además, los sueros control de los ratones no inmunizados y de los animales a los que se les administró PBS no presentaron IgM específica frente al tumor HT-29.

Tabla 14. IgM específica frente el tumor HT-29 en suero de ratones inmunizados medida mediante IFI en corte de criostato.

| Tejido | No inmunizados n=5 | PBS n=5 | Inmunizados con ET n=18 |
|---|-----------------------|------------|----------------------------|
| <u>Tumor HT-29</u> <u>(A10+++)</u> | 0/5 (0%) | 0/5 (0%) | 17/18 (94,44%) |
| | 5- | 5- | 5+++ 6++ 6+ 1- |

- Negativo.
- + Reactividad baja.
- ++ Reactividad moderada.
- +++ Reactividad alta.

La Figura 24 representa varios ejemplos de IFI usando el tumor HT-29 con el AcMo A10, un suero de un ratón no inmunizado, un suero de un ratón al que se le inoculó PBS y un suero de un animal inmunizado con las células ET. Como se puede ver, la fluorescencia con el animal inmunizado es muy intensa si se compara con los sueros control.

Resultados

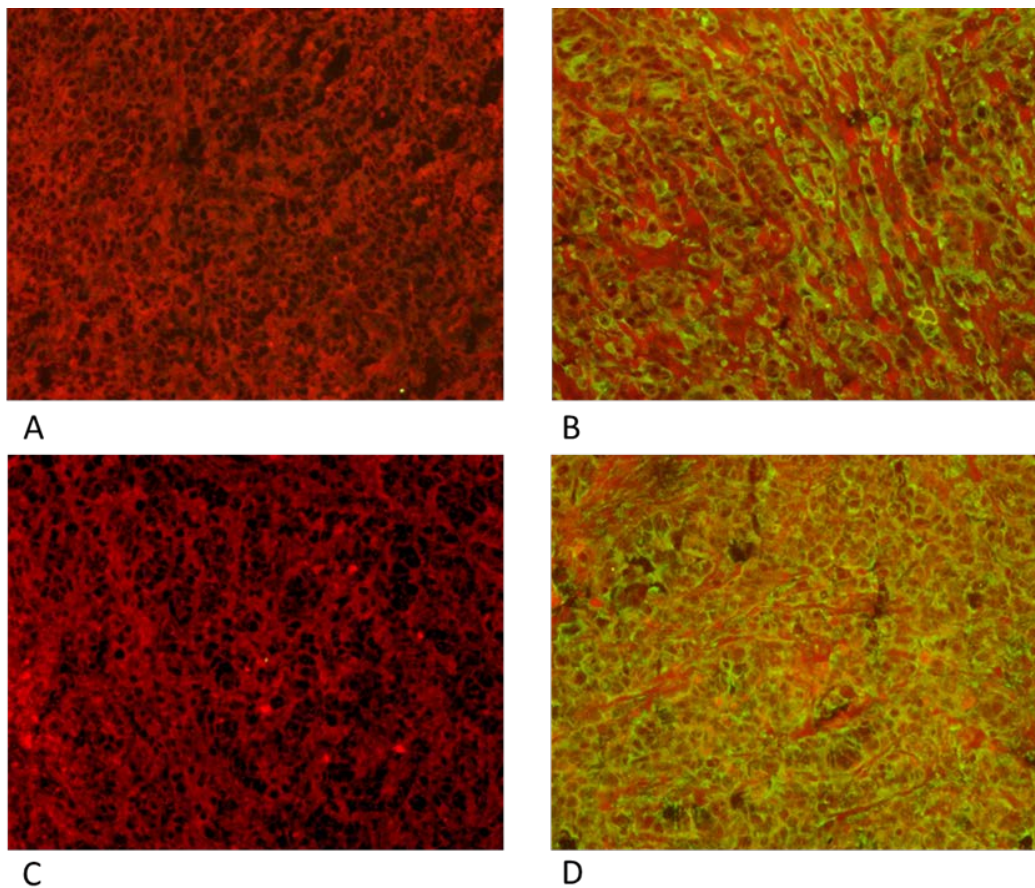


Figura 24. IgM específica frente el tumor HT-29 en suero de ratones inmunizados medida mediante IFI en corte en criostato.

Imágenes captadas con un aumento 200X. El A10 se utilizó a una dilución 1/200 y los sueros a una dilución 1/50. IFI con FITC y contratinción con Azul de Evans.

- A. Control - (HT-29 con suero de ratón no inmunizado).
- B. Control + (HT-29 con el AcMo A10).
- C. Suero de animal inoculado con PBS con tejido HT-29 (-).
- D. Suero de animal inmunizado 10^7 células ET (++)

2.3.2. Tejido tumoral de biopsias/piezas quirúrgicas de colon humano

Tras analizar los datos obtenidos en el punto anterior, quisimos ampliar el estudio utilizando tejido colorrectal tumoral humano. Como en el caso de los NAb, usamos tejido proveniente de piezas quirúrgicas o biopsias.

En el estudio se incluyeron 15 adenocarcinomas colorrectales. De ellos, 14 eran A10+ y 1 era A10-. Como control negativo, se utilizó el tejido normal de colon proveniente del mismo paciente (tejido adyacente al tumor).

Analizamos la IgM específica presente en el suero de 8 ratones del grupo inmunizado con células ET, 2 a los que se les inoculó PBS y 2 ratones control sin inmunizar.

En la Tabla 12 se puede ver un resumen de los resultados obtenidos con estos sueros. La mayoría de los sueros de los animales inmunizados con las células ET (78%) presentaron IgM específica frente a los tumores colorrectales, con diferente grado de intensidad. Por otro lado, algunos de los animales inoculados con PBS (7/30) también presentaron reactividad IgM, aunque con una señal baja. Todos los sueros de los animales control no inmunizados fueron negativos, cuando se incubaron con los tejidos tumorales.

Cuando se valoró la IgM específica frente el tejido sano adyacente, solo alguno de los sueros del grupo de los animales inmunizados con las células ET, presentaron reactividad (30/120). Como se puede ver en la Tabla 15, el porcentaje de muestras positivas obtenidas, fue muy parecido al porcentaje de tejidos aparentemente sanos, que a su vez eran A10+. Todos los sueros control analizados fueron negativos frente al tejido normal de colon.

Resultados

Tabla 15. Resumen de resultados de IgM específica frente adenocarcinomas de colon humano en el suero de ratones, medida mediante IFI en corte en criostato.

| <u>Tejido</u> | <u>AcMo A10</u> | <u>Suero de ratones inmunizados</u> | | |
|--------------------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | | <u>n.i. n=30</u> | <u>PBS n=30</u> | <u>ET n=120</u> |
| Adenocarcinoma de colon | 14/15 (93%) | 0/30 (0%) | 7/30 (23%) | 94/120 (78%) |
| | 14+ | 30- | 7+ | 13+++ |
| | 1- | | 23- | 30++ |
| | | | | 51+ |
| | | | | 26- |
| Colon sano | 4/15 (27%) | 0/30 (0%) | 0/30 (0%) | 30/120 (25%) |
| | 4+ | 30- | 30- | 1++ |
| | 9- | | | 29+ |
| | | | | 90- |

n.i.: ratón no inmunizado.

- Negativo.

+ Reactividad baja.

++ Reactividad moderada.

+++ Reactividad alta.

En las Figuras 25 y 26 se representa un ejemplo de IFI de un tumor de colon A10+ y su tejido normal adyacente, incubados con el AcMo A10 y con cada uno de los grupos de animales estudiados.

En la Figura 27 se puede observar la correlación existente entre el grado de positividad de los diferentes tejidos frente el AcMo A10 y los niveles de IgM específica presente en un suero elegido al azar de cada uno de los grupos analizados. Como se puede ver, existe una fuerte correlación entre la positividad frente a este anticuerpo monoclonal y la presencia de IgM específica en los sueros. Estos niveles de IgM son altos en el suero del animal inmunizado con las células ET y prácticamente nulos en los sueros de los animales control no inmunizado o tratados con PBS.

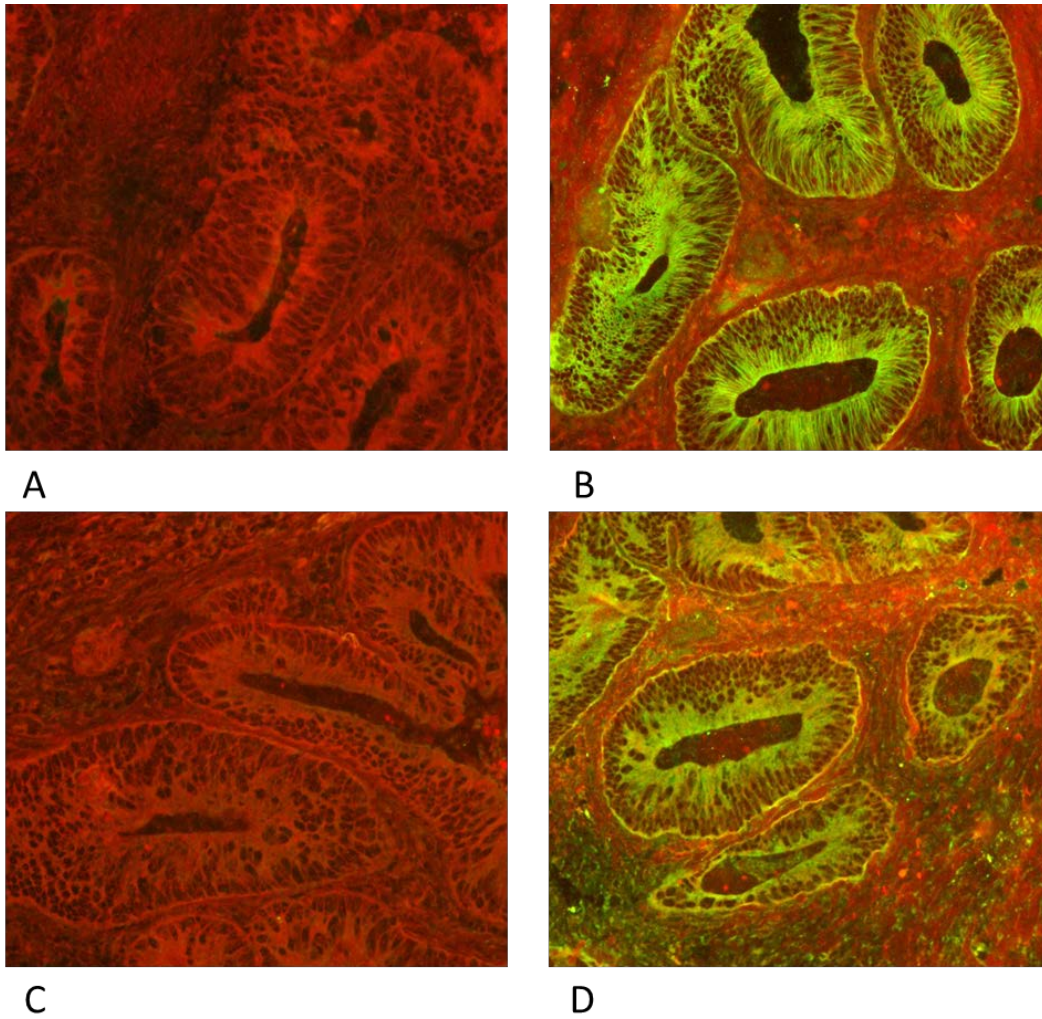


Figura 25. IgM específica frente adenocarcinomas de colon humano en suero de ratones. IFI en corte en criostato. Tejido tumoral.

Imágenes captadas con un aumento de 200X. El AcMo A10 se utilizó a una dilución 1/200 y los sueros a una dilución 1/50. IFI con FITC y contratinción con Azul de Evans.

- A. Suero de ratón no inmunizado (-).
- B. AcMo A10 (++)
- C. Suero de animal inoculado con PBS (-).
- D. Suero de animal inmunizado 10^7 células ET (++)

Resultados

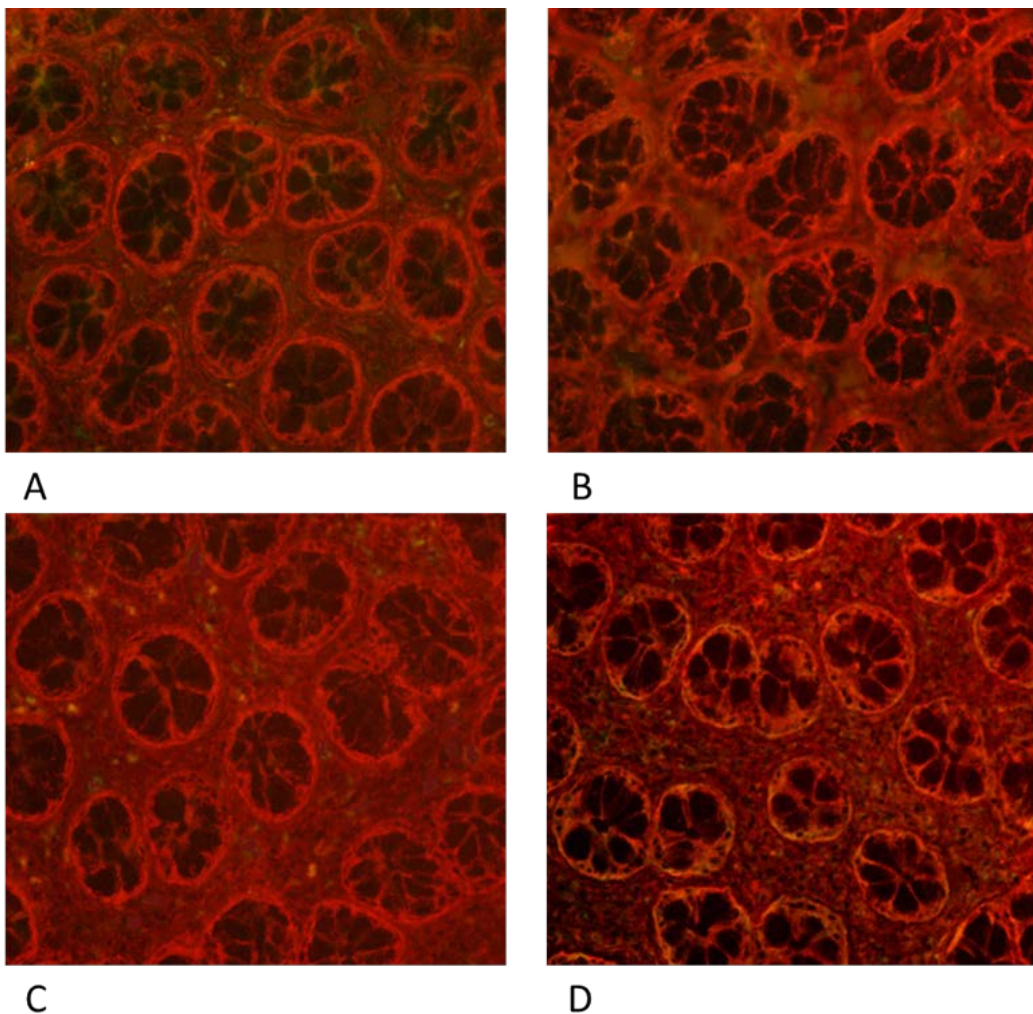


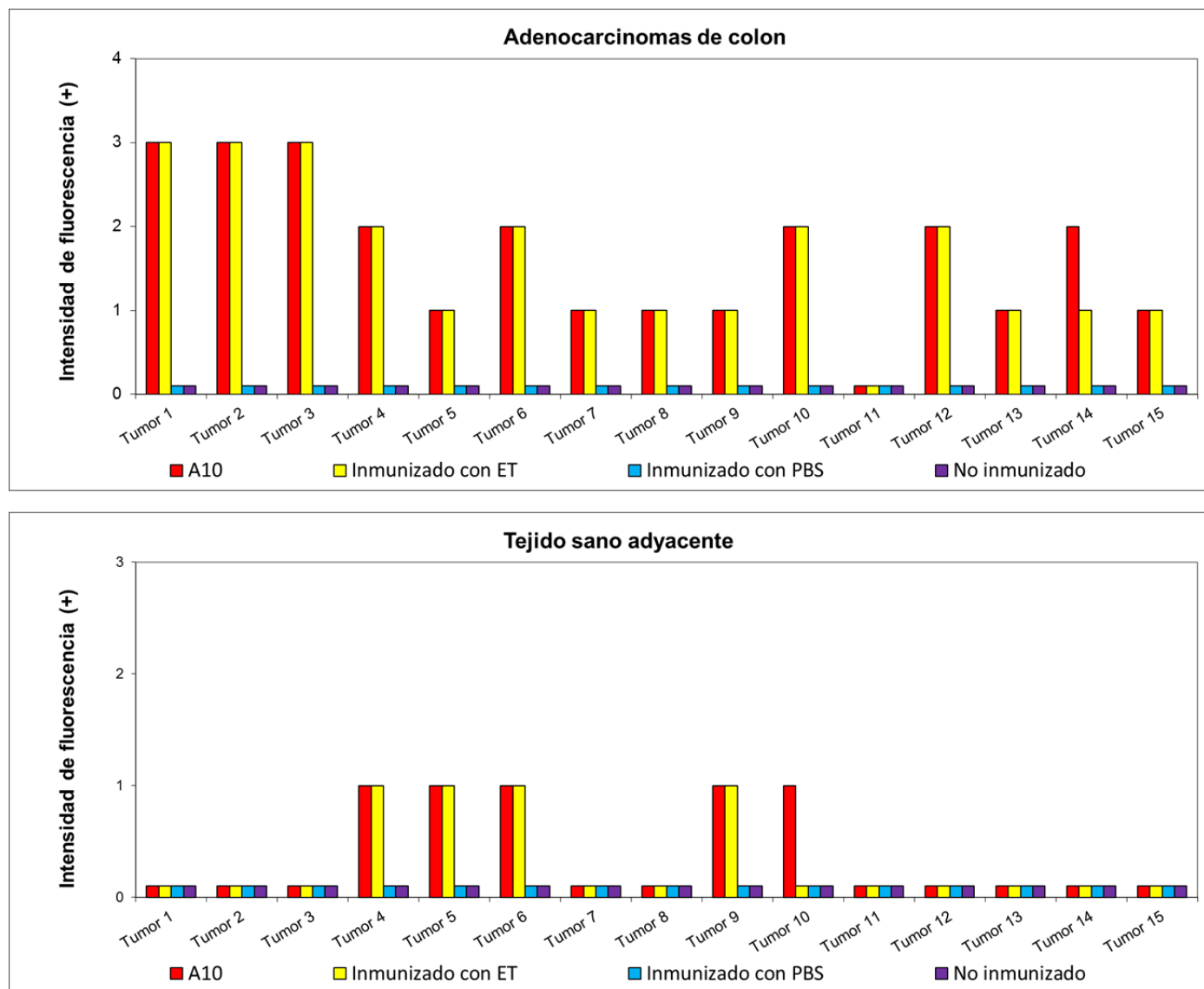
Figura 26. IgM específica frente adenocarcinomas de colon humano en suero de ratones. IFI en corte de criostato. Tejido sano adyacente.

Imágenes captadas con un aumento de 100X. El A10 se utilizó a una dilución 1/200 y los sueros a una dilución 1/50. IFI con FITC y contratinción con Azul de Evans.

- A. Suero de ratón no inmunizado (-).
- B. AcMo A10 (-).
- C. Suero de animal inoculado con PBS (-).
- D. Suero de animal inmunizado 10^7 células ET (-).

Figura 27. Correlación entre el grado de reactividad con el AcMo A10 y el grado de reactividad IgM frente adenocarcinomas colorrectales humanos, en los sueros de los ratones inmunizados (IFI en corte de criostato).

Los sueros murinos empleados corresponden con un caso al azar de cada uno de los grupos de animales estudiados: ratones normales no inmunizados, inoculados con PBS e inmunizados con células ET. Los tejidos testados fueron 15 adenocarcinomas colorrectales humanos y sus correspondientes tejidos normales adyacentes.



Resultados

2.3.4. Inhibición de la reactividad IgM específica

Con objeto de verificar la especificidad de los anticuerpos presentes en el suero de los animales inmunizados frente las células ET, y poder demostrar que el/los epitopo/s reconocidos por ellos, se encuentran tanto en células murinas, como en células humanas, diseñamos un ensayo de inhibición.

Como tejido humano A10+, usamos el tumor xenogénico de colon HT-29. Como inhibidor A10+ empleamos a las células ET y como inhibidor A10-, las células del tumor B16. Se analizaron un total de 9 sueros murinos, procedentes del grupo de animales inmunizados con células ET.

La Tabla 16 detalla los resultados obtenidos. Todos los sueros eran positivos con el tumor de HT-29. Cuando estos sueros se preincubaban con las células ET, la reactividad IgM específica frente este tumor desaparecía completamente. Sin embargo, cuando la línea celular que se empleaba era la B16 no se perdía la reactividad IgM, en ninguna de las muestras.

Tabla 16. Resultados de inhibición de IgM específica frente el tumor HT-29 presente en el suero de ratones inmunizados con células ET, medida mediante IFI en corte de criostato.

| <u>Muestra</u> | <u>Muestra sin adsorber</u> n=9 | <u>Muestra adsorbida con</u> | |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | | <u>Células ET</u> n=9 | <u>Células B16</u> n=9 |
| Control - | - | - | - |
| AcMo A10 | +++ | - | +++ |
| Sueros ratones ET (9) | 9/9 (100%) 1+++ 5++ 3+ | 0/9 (0%) 9- | 9/9 (100%) 1+++ 5++ 3+ |

- Negativo.
- + Reactividad baja.
- ++ Reactividad moderada.
- +++ Reactividad alta.

En la Figura 28 se puede observar la inhibición del AcMo A10, junto con un ejemplo de suero de animal inmunizado con las células ET e inhibido con células ET o B16.

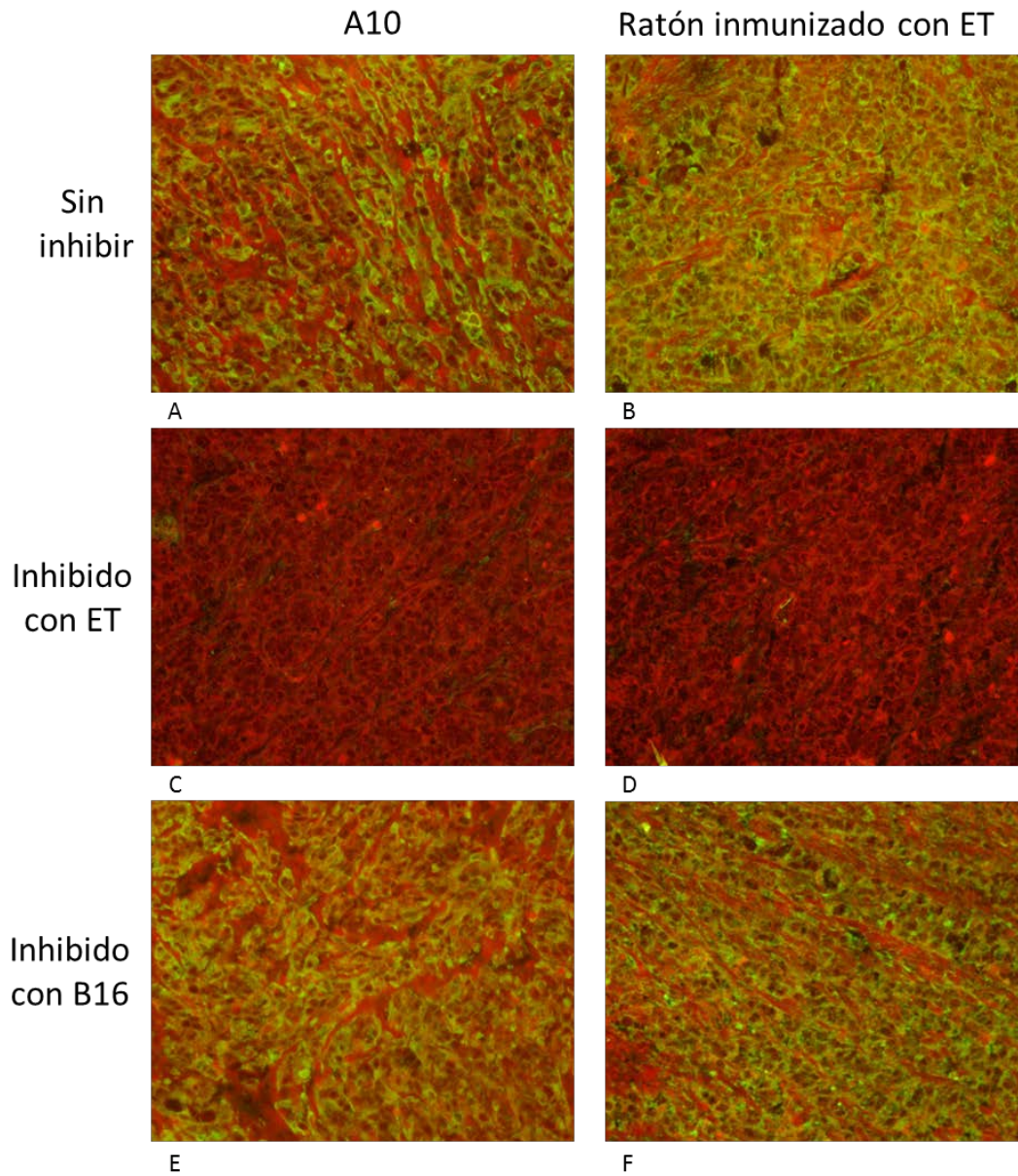


Figura 28. IgM específica frente el tumor HT-29 en el suero de ratones. IFI en corte de criostato. Experimentos de inhibición.

Imágenes captadas con un aumento 200X. El A10 se utilizó a una dilución 1/200 y los sueros a una dilución 1/50. IFI con FITC y contratinción con Azul de Evans.

- A. AcMo A10 sin inhibir (++)
- B. Suero de animal inmunizado 10^7 células ET sin inhibir (++)
- C. AcMo A10 inhibido con células ET (-)
- D. Suero de animal inmunizado 10^7 células ET e inhibido con células ET (-)
- E. AcMo A10 inhibido con células B16 (++)
- F. Suero de animal inmunizado 10^7 células ET e inhibido con células B16 (++)

3- EFECTO BIOLÓGICO DE LOS ANTICUERPOS DE CLASE IgM

3.1. Efecto citotóxico de los NAb humanos

Tras confirmar la existencia de NAb reactivos frente a los HC-ET, en el suero de individuos sanos, quisimos valorar si podían tener algún efecto biológico frente las células tumorales, como puede ser la aparición de fenómenos de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

Para la consecución de este objetivo, seleccionamos una serie de 15 sueros con reactividad de NAb baja y 15 con reactividad media/alta frente a los HC-ET. Tras optimizar una técnica para medir el posible efecto citotóxico de los sueros (ensayo colorimétrico del MTT), valoramos *in vitro* dicho efecto, utilizando estos sueros humanos, complemento de conejo y células A10+. Las células que empleamos fueron las ET.

En el apartado de Material y Métodos se describe la fórmula que aplicamos para el cálculo del efecto citotóxico.

Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la Figura 29. Los sueros con reactividad media/alta presentaron una capacidad de lisis significativamente mayor que los sueros con un reactividad baja ($33,4 \pm 8,9$ vs. $16,5 \pm 13,5$, respectivamente; $p < 0,001$).

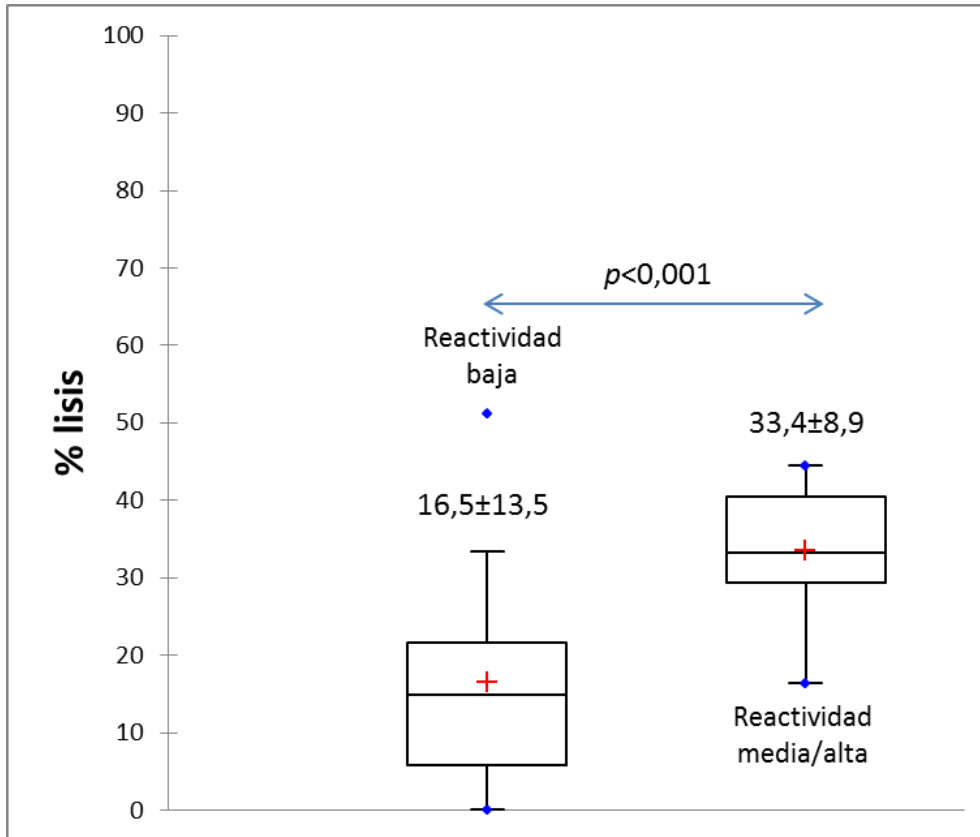


Figura 29. Citotoxicidad mediada por complemento de sueros humanos frente células ET. Grupos de media/alta y baja reactividad.

3.2. Efecto citotóxico de los anticuerpos presentes en los sueros de los ratones inmunizados

Además, se valoró si los sueros de los animales inmunizados con las células ET irradiadas, tenían un efecto citotóxico mayor que los sueros de los otros grupos de animales empleados.

Los sueros que se analizaron fueron: animales control sin inmunizar, control inoculado con PBS, inmunizados con células B16 e inmunizados con ET. El efecto citotóxico fue valorado *in vitro* (MTT), utilizando los sueros de los ratones, complemento de conejo y células A10+. Las células utilizadas fueron las del tumor murino de Ehrlich.

La Figura 30 representa los resultados obtenidos. Dichos resultados nos indicaron que los sueros tenían capacidad para lisar, en presencia de complemento, las

Resultados

células ET. Los sueros de los ratones inmunizados con las células ET, presentaron una capacidad de lisis significativamente mayor que los sueros de los ratones sin inmunizar ($67,5 \pm 18$ vs. $15,7 \pm 4,7$ respectivamente; $p=0,002$). Cuando se comparó con los sueros de los animales inmunizados con las células B16 se obtuvo también una diferencia significativa ($67,5 \pm 18$ vs. $15,5 \pm 6,4$; $p=0,003$), quedando descartado un posible efecto citotóxico inespecífico.

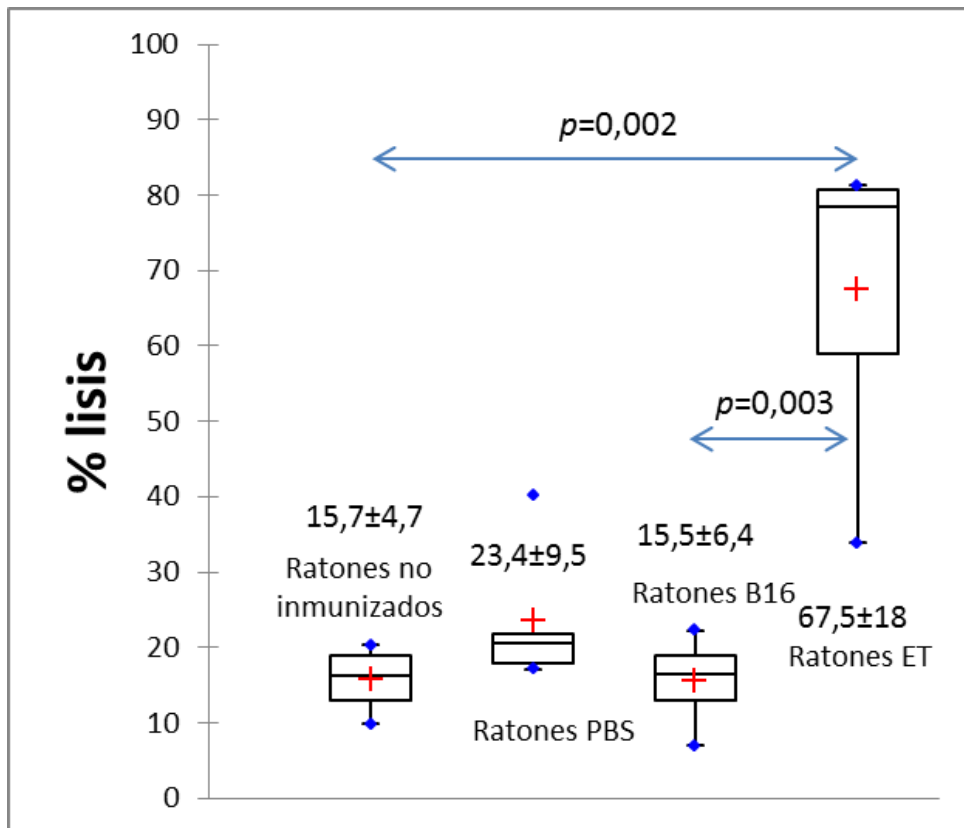


Figura 30. Citotoxicidad mediada por complemento frente células ET usando los sueros de los ratones inmunizados.

Estadística: Prueba de Kruskal-Wallis usando comparación múltiple por pares de Dunn.
Significación comparando con grupo de ratones no inmunizados o inmunizados con células B16.
n.s.: no significativo.

4- TITULACIÓN DE ANTICUERPOS DE CLASE IgM ESPECÍFICOS FRENTE CÉLULAS ET EN RATONES INMUNIZADOS CON CÉLULAS TUMORALES HUMANAS A10+

Se estudió si era posible inmunizar a ratones con una línea tumoral A10+ humana y generar una respuesta de anticuerpos de clase IgM específicos frente células murinas A10+.

Inmunizamos un grupo de ratones con la línea tumorales de pulmón humana H-1355, que es A10+. Como control positivo inmunizamos a varios animales con las células ET. Como control negativo se utilizó un grupo de ratones inmunizados con células B16 y otro de animales no inmunizados.

La descripción de las líneas tumorales utilizadas se puede ver detallada en la Tabla 17.

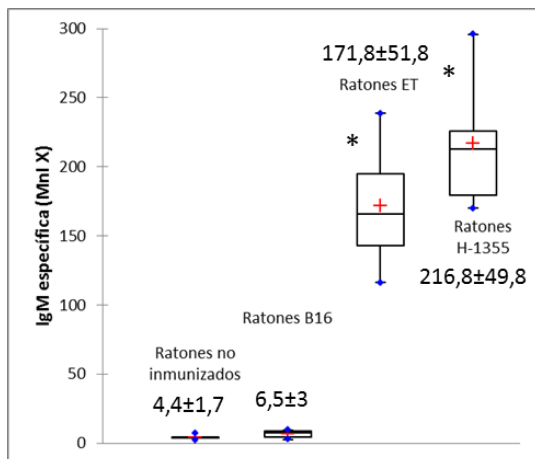
Tabla 17. Líneas celulares empleadas en las inmunizaciones.

| Línea celular | Origen | Descripción | Resultado AcMo A10 (Mnl X) |
|---------------|--------|----------------------------------|----------------------------|
| H-1355 | Humano | Adenocarcinoma de pulmón | 296,4 |
| Ehrlich | Murino | Adenocarcinoma de origen mamario | 369,8 |
| B16 | Murino | Melanoma | 3,8 |

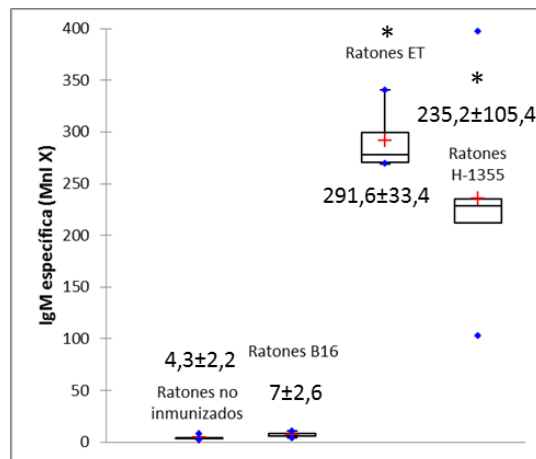
Tras finalizar los protocolos de inmunización se cuantificó la IgM específica frente las líneas tumorales empleadas. Como se puede ver en la Figura 31, los animales inmunizados con la línea tumoral H-1355 experimentaron un incremento significativo de la IgM específica frente a la línea celular ET y contra ella misma, respecto los animales sin inmunizar. A su vez, los animales inmunizados con las células ET presentaron un aumento de la IgM específica frente ella misma y contra las células H-1355. Por el contrario, en los animales inmunizados con las células B16 no se encontró aumento de la IgM específica frente las otras líneas tumorales.

Como esperábamos, la inmunización con células A10+ humanas induce un incremento de los niveles de IgM específica frente a las células tumorales A10+ murinas, y viceversa.

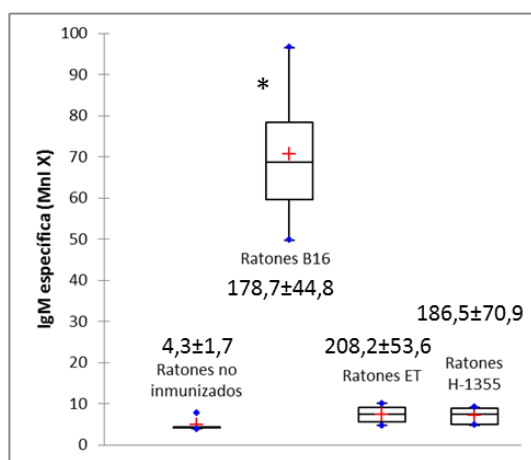
Resultados



a) H-1355



b) ET



c) B16

Figura 31. Reactividad IgM en sueros de ratones inmunizados. Células humanas y murinas A10+.

* Diferencia estadísticamente significativa: $p > 0,05$.

Prueba de Kruskal-Wallis usando comparación múltiple por pares de Dunn.

Significación comparando con grupo de ratones no inmunizados.

5- PURIFICACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS LIBERADOS AL MEDIO CELULAR POR EL ET (HC-ET)

Con objeto de poder caracterizar el HC-ET reconocido por el AcMo A10, que denominamos Ca10, se diseñó y optimizó una técnica, alternativa a la empleada anteriormente, que nos permitiera la obtención de una mayor cantidad de estos carbohidratos. Como fuente, utilizamos aquellos que son liberados de forma espontánea al medio extracelular en los cultivos ET.

Como procedimiento de purificación utilizamos un método exclusivamente físico (ultrafiltración tangencial), aprovechando el alto peso molecular que tiene el Ca10. Tras probar varios protocolos, el que dio mejor resultado fue aquel que se encuentra descrito en el apartado de Material y Métodos.

Para la caracterización del Ca10 y para estudiar la consistencia del método, purificamos un total de 5 lotes de HC-ET. Se procedió a medir las proteínas presentes en la muestra, para comprobar que habíamos conseguido eliminarlas. Además, para confirmar que habíamos retenido el Ca10 realizamos una cuantificación mediante un ELISA tipo sándwich, usando el AcMo A10. Como recta patrón de Ca10 usamos un lote que había sido purificado con el método anterior del fenol-cloroformo.

Como se pueden ver en la Tabla 18, los valores finales de proteína obtenidos fueron de $2,87 \pm 2,44$ mg y los de Ca10 fueron de $4,08 \times 10^6 \pm 0,67 \times 10^6$ UA.

Tabla 18. Cuantificación de proteína total y de Ca10 en la muestra antes y después del proceso de purificación mediante ultrafiltración tangencial.

| Lotes de Ca10 n=5 | Proteína (mg) | Ca10 (UA) |
|---------------------------|---------------------|---|
| Media $\pm\sigma$ inicial | 296,68 \pm 125,43 | 6,86 $\times 10^6 \pm 2,23 \times 10^6$ |
| Media $\pm\sigma$ final | 2,87 \pm 2,44 | 4,08 $\times 10^6 \pm 0,67 \times 10^6$ |

La Figura 32 representa el rendimiento obtenido, en términos de proteína y actividad Ca10. Los valores fueron $0,95 \pm 0,62\%$ y $63,92 \pm 21,16\%$, respectivamente. En

Resultados

otras palabras, la cantidad de proteínas que conseguimos eliminar se acercó al 99% y la cantidad de Ca10 que conservamos fue del 64%, respecto a la cantidad inicial.

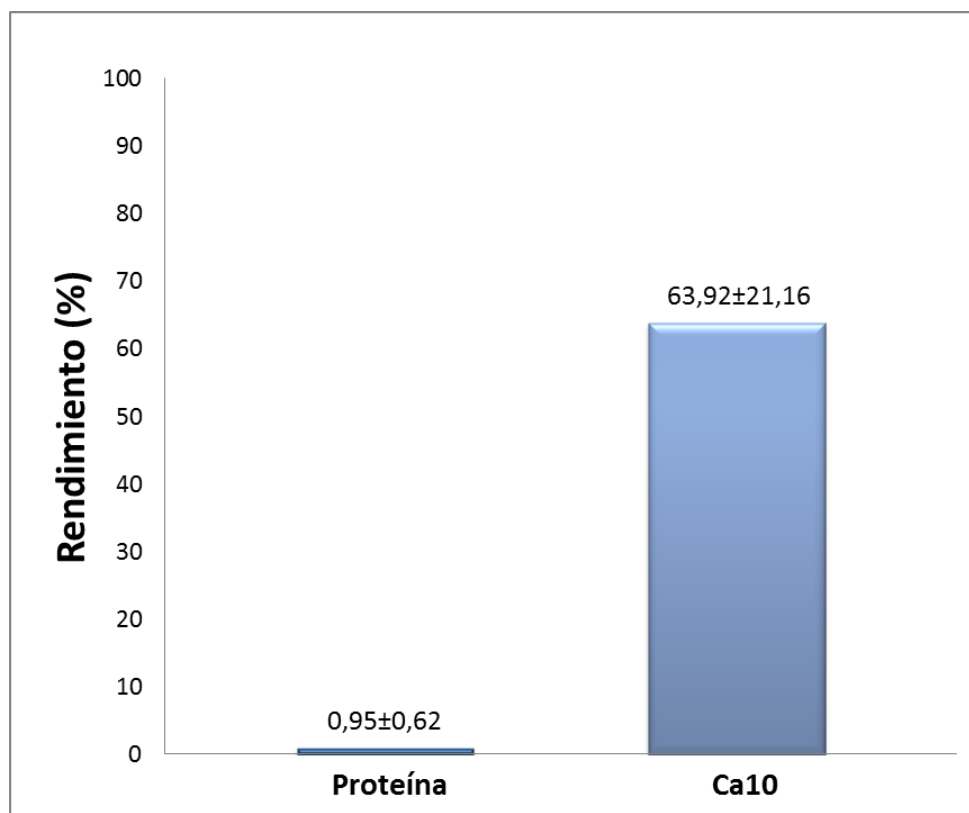


Figura 32. Rendimiento de la purificación del Ca10 mediante ultrafiltración tangencial.

En la Tabla 19, se describe el análisis de la actividad específica de uno de los lotes escogidos al azar (Lote 4). Mediante el proceso de ultrafiltración tangencial fuimos capaces de incrementar 86 veces la actividad específica del Ca10, desde las 5,9 UA/μg de liofilizado inicial hasta las 508,9 UA/μg de liofilizado final. Tomando como criterio las UA por unidad de masa proteica (medida por Bradford), esta actividad se ve incrementada 173 veces, desde las 25,5 UA/μg inicial hasta las 4403,8 UA/μg final.

Tabla 19. Purificación de Ca10 mediante ultrafiltración tangencial. Actividad específica.

| Ca10 | Volumen muestra (mL) | Masa liofilizada (μg) | Masa proteína (μg) | Actividad total (UA) | Actividad específica (UA/μg masa total) | Actividad específica (UA/μg proteína) |
|---------|----------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|---|---------------------------------------|
| Inicial | 4000 | 2,36x10 ⁶ | 548,31x10 ³ | 14x10 ⁶ | 5,9 | 25,5 |
| Final | 250 | 13,5x10 ³ | 1,56x10 ³ | 6,87x10 ⁶ | 508,9 | 4403,8 |

6- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS HC-ET

Tras ver la correlación existente entre la reactividad IgM (natural o inducida) frente los HC-ET, y el grado de positividad frente el AcMo A10, quisimos hacer una caracterización más detallada de estos carbohidratos de superficie. Entre ellos se encuentra la molécula reconocida por el AcMo A10 en el ET (Ca10).

Una vez obtenida la fracción mayor de 300 KDa, enriquecida en Ca10, el siguiente paso fue su caracterización molecular. Para ello, realizamos los siguientes estudios:

- *Caracterización inicial*
- *Interacción con lectinas de plantas y con oligosacáridos*
- *Inhibición de la reactividad del AcMo A10 con azúcares*
- *Estudios de ruptura del enlace glicosídico*
- *Estudios con inhibidores metabólicos de la N y O-glicosilación*

6.1. Caracterización inicial

Se realizó un análisis preliminar del HC-ET para obtener una información general de su composición. La caracterización de la muestra se hizo mediante cromatografía de gases y resonancia magnética nuclear, según se describe en el apartado de Material y Métodos. La caracterización de los monosacáridos presentes en la muestras nos indicó que los residuos que la componen son principalmente galactosa, glucosa, glucosamina y manosa (Tabla 20).

Tabla 20. Monosacáridos presentes en la muestra enriquecida en los HC-ET.

| Monosacárido | Porcentaje (%) |
|---------------|----------------|
| Galactosa | 15,03 |
| Glucosa | 14,74 |
| Glucosamina | 9,85 |
| Galactosamina | 0,45 |
| Manosa | 4,83 |
| Ramnosa | 0,80 |
| Arabinosa | 0,52 |

Resultados

Haciendo un análisis de metilación pudimos ver que las uniones de los monosacáridos que comprenden la parte oligosacáridica de la muestra, en los extremos no reductores, eran en su mayoría [-3)-Galp-(1-], [-4)-GlcNH₂-(1-] y [-4)-Glc-(1-] (Tabla 21).

Tabla 21. Monosacáridos presentes en los extremos no reductores de la muestra enriquecida en los HC-ET.

| Monosacárido | Porcentaje (%) |
|-----------------------------|----------------|
| -Hexp-(1- (Glc/Man) | 10,69 |
| -Galp-(1- | 12,53 |
| -4)-Glc-(1- | 11,23 |
| -3)-Galp-(1- | 29,80 |
| -6)-Galp-(1- | 2,59 |
| -3,6)-Manp-(1- | 6,29 |
| -3,6)-Galp-(1- | 8,68 |
| -4)-GlcNH ₂ -(1- | 18,19 |

El componente de naturaleza proteico contenido en la muestra era bajo, con una mayor proporción de los aminoácidos glutamina, asparagina y leucina (Tabla 22).

Tabla 22. Aminoácidos presentes en la muestra enriquecida en los HC-ET.

| Aminoácido | Masa (ng) | Porcentaje (%) |
|------------|-----------|----------------|
| Asp | 2.674,77 | 10,53 |
| Thr | 1.481,26 | 5,83 |
| Ser | 1.875,13 | 7,39 |
| Glu | 3.698,85 | 14,57 |
| Gly | 1.189,86 | 4,69 |
| Ala | 1.435,69 | 5,65 |
| Cys | 222,33 | 0,88 |
| Val | 1.558,68 | 6,14 |
| Met | 699,05 | 2,75 |
| Ile | 1.439,59 | 5,67 |
| Leu | 2.656,85 | 10,46 |
| Tyr | 943,20 | 3,71 |
| Phe | 1.521,86 | 5,99 |
| His | 677,27 | 2,67 |
| Lys | 1.987,45 | 7,83 |
| Arg | 1.328,28 | 5,23 |

No se encontraron niveles significativos de ácidos grasos en la muestra.

De esta forma, se pudo concluir que nuestra muestra presentaba una alta proporción de componente sacárido, con bajo contenido en proteínas y nula presencia de ácidos grasos (Tabla 23). Los experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) nos confirmaron estos resultados. Se observó una alta heterogeneidad del material de la muestra, encontrando dos claros componentes, localizados en las regiones de los carbohidratos y de las proteínas.

Tabla 23. Composición de la fracción enriquecida en los HC-ET.

| Componente | Porcentaje (%) |
|--------------|----------------|
| Carbohidrato | 88,2 |
| Proteína | 11,7 |
| Lípidos | < 0,1 |

6.2. Interacción con lectinas de plantas e inhibición con oligosacáridos

Se analizó el sobrenadante de cultivo celular y las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de los HC-ET (>300 KDa y <300 KDa). Para ello se utilizó una técnica de microarrays de lectinas, con distintas especificidades. Como muestras control utilizamos glicoproteínas cuyos epítomos de unión y de reconocimiento molecular están perfectamente estudiados (Mucina 1, ribonucleasa A y B, fetuina, fibrinógeno...). El sobrenadante de cultivo y todas las fracciones obtenidas fueron preparadas para ser impresas en la membrana de nitrocelulosa (soporte/porta donde se lleva a cabo la incubación), a diferentes concentraciones.

Para conocer y tener información acerca de la composición de las diferentes fracciones, las membranas de nitrocelulosa con las muestras impresas fueron incubadas con diferentes lectinas de plantas (SBA, LEA, DSL, ConA, WFA, etc). Se hicieron dos experimentos en paralelo, uno para ver la unión de las fracciones con las diferentes lectinas y otro de inhibición, añadiendo al mismo tiempo que las lectinas el azúcar o ligando específico que reconoce cada una de ellas.

Resultados

Como se puede ver en la Tabla 24, las lectinas que reconocen GlcNAc (DSL y LEA) interaccionaron con los HC-ET, tanto en el sobrenadante completo como en la fracción del retenido (>300 KDa). Además, esta interacción era fuerte, ya que en presencia del inhibidor (GlcNAc) se mantuvo la unión (Figura 34). Por otro lado, el resto de las lectinas utilizadas tenían escasa reactividad, lo que sugiere que estos residuos de azúcares no están presentes en la muestra.

Tabla 24. Resultados de la reactividad frente los HC-ET usando a un panel de lectinas.

| Lectina (acrónimo) | Carbohidrato específico (ligando) | Reactividad con Ca10 |
|--------------------|---|----------------------|
| MAA | NeuAc α (2-3)Gal β (1-4)GlcNAc | Baja |
| DSL | GlcNAc | Alta |
| LEA | GlcNAc | Alta |
| SBA | GalNAc | Baja |
| BSL | Gal | Baja |
| WFA | GalNAc | Baja |
| Con-A | α Man | Baja |
| SNA | NeuAc α (2-6)Gal | Baja |
| PNA | Gal β (1-3)GalNAc | Baja |
| LPA | Ácido siálico | Baja |
| HPA | GalNAc α (1-3)GalNAc | Baja |
| WGA | Ácido siálico | Baja |

En la Figura 33 se representa la interacción con las lectinas LEA y Con-A. Como se puede ver, la lectina LEA sólo reconoce su ligando en el sobrenadante de cultivo y en la fracción >300 KDa (HC-ET purificado), con y sin inhibidor. Sin embargo, la lectina Con-A sólo se une al sobrenadante. Además, en presencia de manosa (inhibidor) desaparece su unión, teniendo la lectina más afinidad por la manosa que por el sobrenadante. Por otro lado, el grado de reconocimiento es dependiente de la concentración de los HC-ET fijado a la membrana. Estos resultados nos indicaron que la estructura reconocida por la lectina LEA, sólo está presente en la fracción de alto peso molecular.

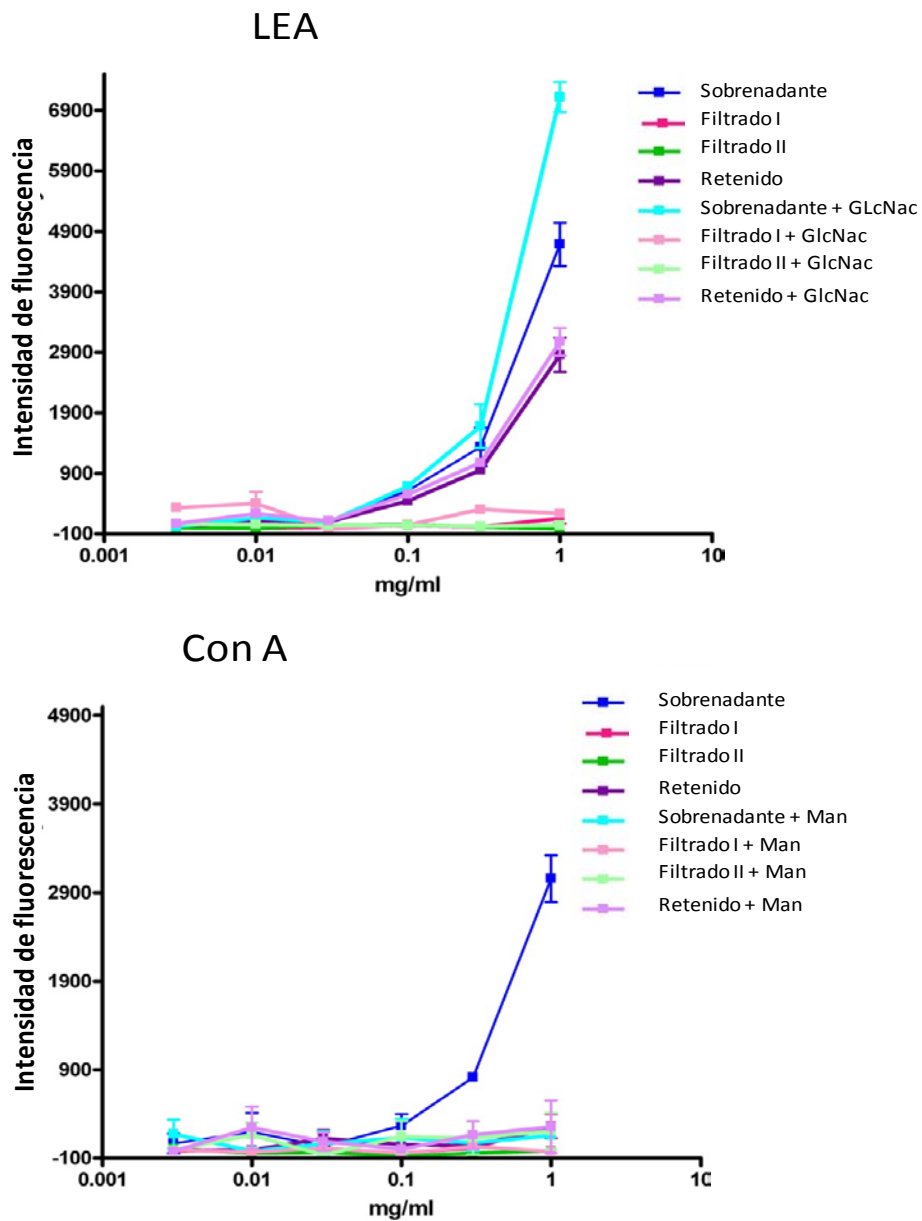


Figura 33. Representación gráfica de las lectinas LEA y Con A y su unión con las diferentes fracciones en el proceso de purificación del carbohidrato Ca10.

Las lectinas LEA y Con-A se probaron con cada fracción, en ausencia y presencia de su inhibidor/ligando natural (GlcNac y manosa, respectivamente).

Resultados

6.3. Inhibición de la reactividad A10 en presencia de azúcares específicos

Al igual que en el experimento anterior, las muestras con las distintas fracciones fueron impresas en la membrana de nitrocelulosa. Se estudió la unión del AcMo A10 a estas fracciones. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con el AcMo A10 y con diferentes azúcares (de diferente tamaño y complejidad), para hacer ensayos de competición. Como se observa en la Figura 34, existe una unión específica del AcMo A10 con el sobrenadante completo y la fracción del retenido (>300 KDa), y no con las otras fracciones.

Además, en presencia de algunos de los azúcares, se produce una inhibición de la unión entre las fracciones y el anticuerpo.

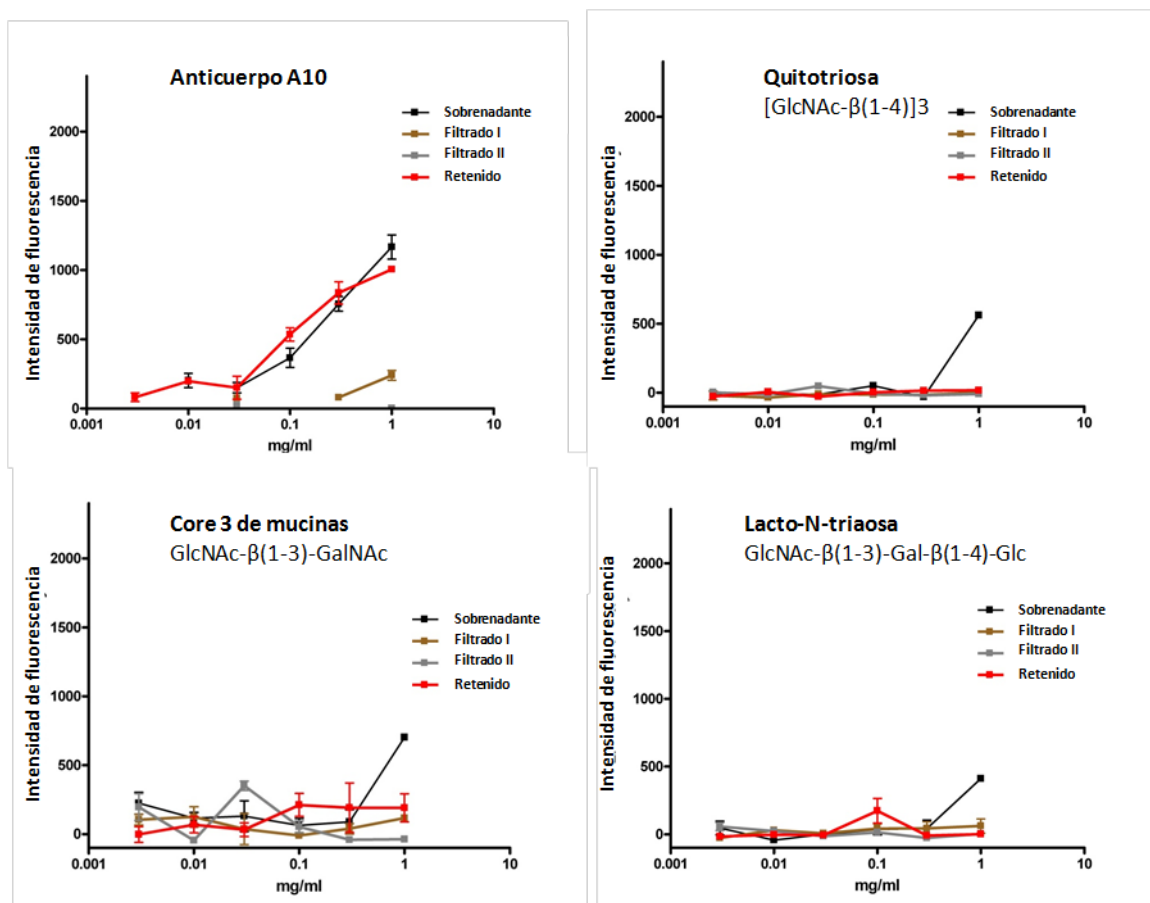


Figura 34. Resultados de la inhibición de la unión del AcMo A10 a los extractos en presencia de azúcares específicos.

En la Tabla 25 se puede ver como la quitotriosa, la lacto-N-triaosa y el core 3 glicano de mucinas inhiben la unión del AcMo A10 al Ca10 purificado (++; entre un 40 y 60% de inhibición sobre el control sin inhibir). Por el contrario, el resto de los azúcares testados no producían inhibición o era muy débil.

Tabla 25. Resultados de los ensayos de inhibición del AcMo A10 con diferentes azúcares.

| Azúcar | Grado de inhibición |
|--|---------------------|
| Glucosa | ± |
| Galactosa | - |
| GlcNAc | - |
| GalNAc | - |
| Quitotriosa ([GlcNAc-β(1-4)] ₃) | ++ |
| Lacto-N-triaosa (GlcNAc-β(1-3)-Gal-β(1-4)-Glc) | ++ |
| Core 3 de mucinas (GlcNAc-β(1-3)-GalNAc) | + |
| Manosa | - |
| NANA | - |
| Fucosa | - |
| Lactosa | - |
| Sialilactosa | - |
| Melobiosa | - |

6.4. Ruptura del enlace glicosídico (carbohidrato-proteína)

Se utilizaron varios tratamientos para intentar romper el enlace glicosídico presente entre la parte proteica y la parte oligosacáridica. Se llevaron a cabo dos tipos de abordaje, uno químico mediante el uso de NaOH y otro enzimático, usando N-/O-glicosidasas. Para valorar la ruptura de este enlace utilizamos técnicas de RMN.

El tratamiento químico con NaOH, produjo la ruptura del enlace proteína-carbohidrato. En la Figura 35, se puede apreciar la aparición de un nuevo protón en la zona anomérica del espectro de la muestra tratada (línea roja), que se corresponde con la ruptura del enlace glicosídico, en comparación con una muestra control sin tratar (línea azul).

Resultados

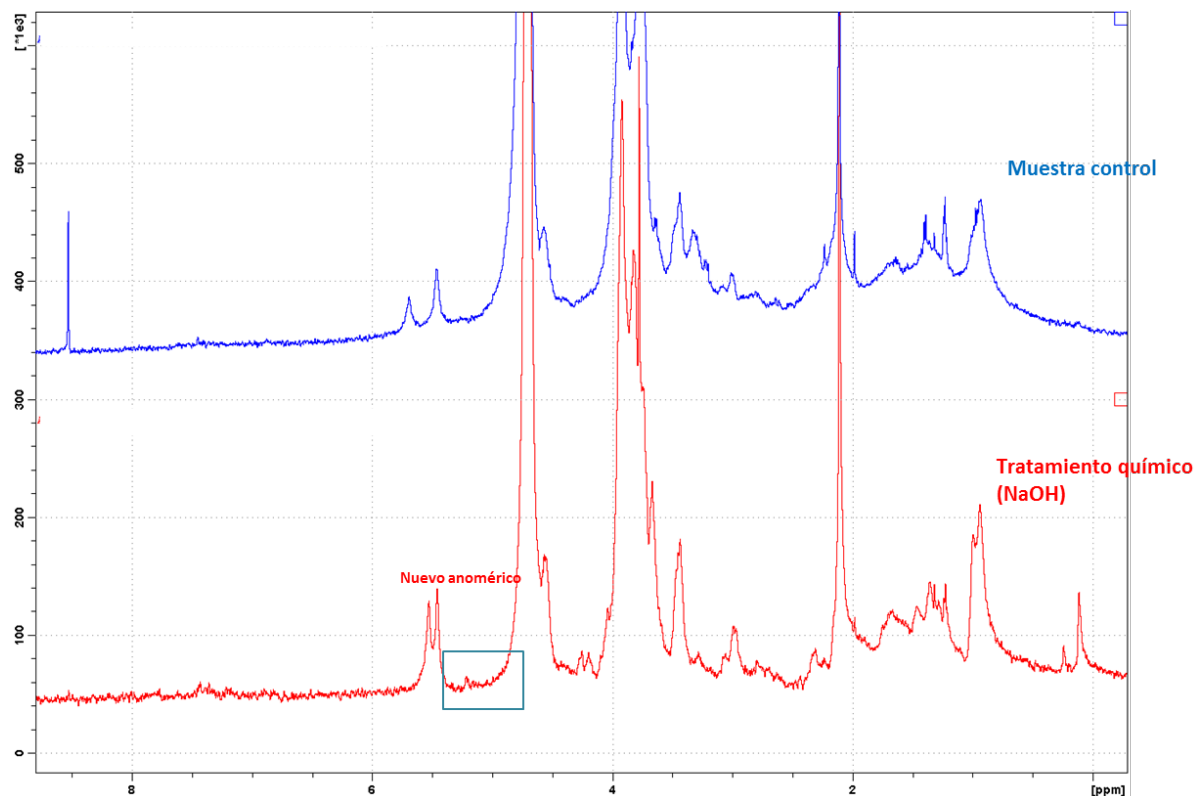


Figura 35. Estudio por RMN de los HC-ET purificados tras tratar la muestra con NaOH
Espectros monodimensionales adquiridos con un imán de 500MHz, donde se representan los desplazamientos químicos de los protones de la muestra en una sola dimensión.

Por otra parte, los resultados obtenidos tras los tratamientos enzimáticos mostraron la ruptura proteína-carbohidrato sólo cuando se utilizaron las N-glicosidasas (Figura 36A). Se puede observar, al igual que con el tratamiento químico, la aparición de un nuevo protón anomérico en la muestra tratada (línea azul), respecto la muestra control (línea roja). Por el contrario, no se encontraron diferencias en caso del tratamiento con O-glicosidasas, comparado con la muestra control (Figura 36B).

Los resultados indicaron que la muestra contenía mayoritariamente enlaces N-glicosídicos.

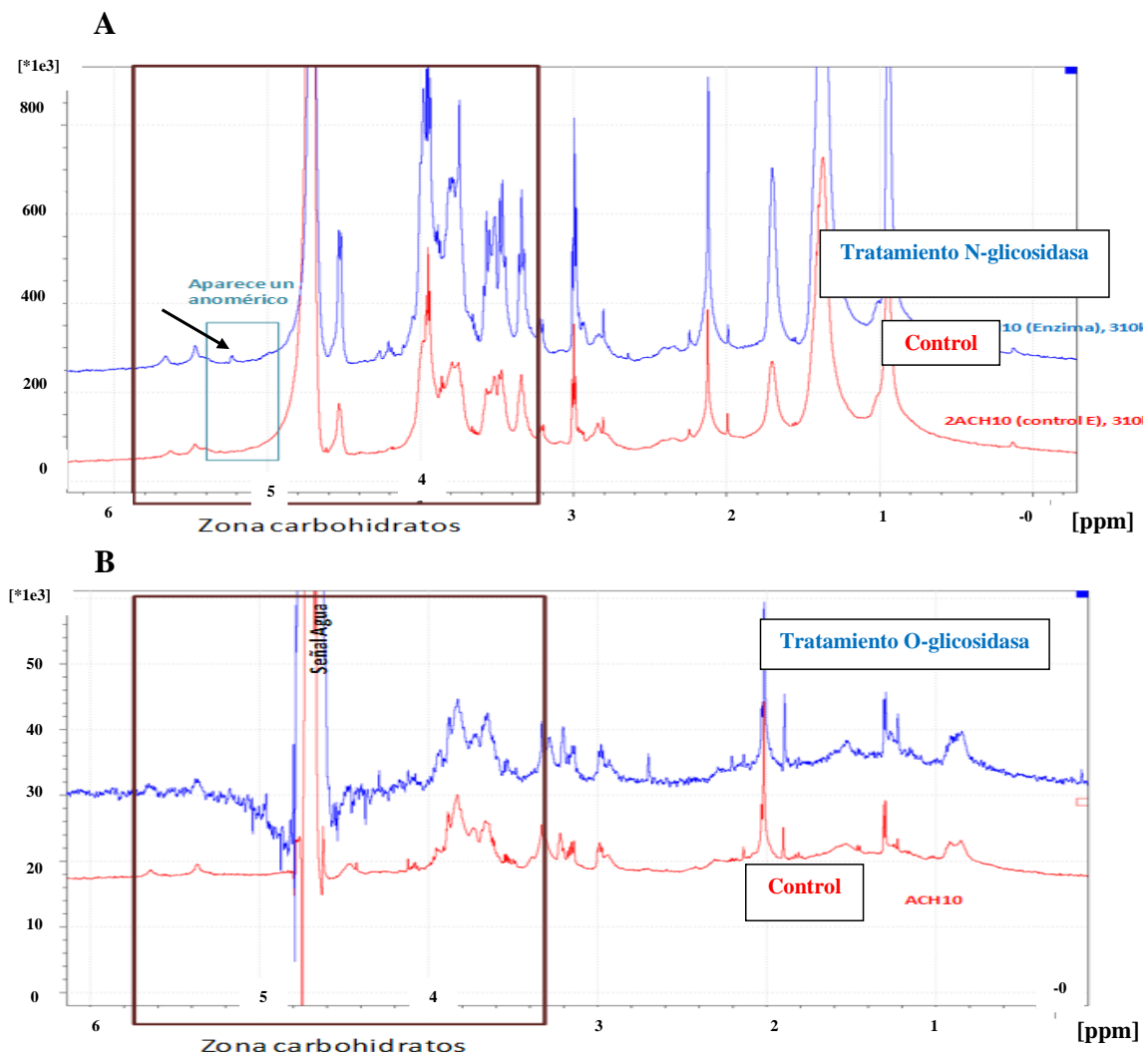


Figura 36. Estudio por RMN de los HC-ET purificados tras tratar la muestra con endo-glicosidasas. Espectros monodimensionales adquiridos con un imán de 500MHz, donde se representan los desplazamientos químicos de los protones de la muestra en una sola dimensión.
 A: Tratamiento con N-glicosidasas y B: tratamiento con O-glicosidasas.

6.5. Ensayos con inhibidores metabólicos de la N y O-glicosilación

Por último, y tras los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, quisimos confirmar la presencia de N-glicoconjugados en la estructura del Ca10. Para ello, se realizaron varios experimentos de inhibición metabólica de la N- y O-glicosilación. Para la inhibición de la N-glicosilación utilizamos la molécula tunicamicina y para la O-glicosilación, el compuesto bencil- α -GalNAc.

Antes del tratamiento con los inhibidores, las células ET fueron tripsinizadas, con el objetivo de eliminar todo el Ca10 de la superficie celular. Como puede verse en la Figura 37, la tripsinización de las células ET elimina de forma notable la presencia de las moléculas Ca10 en su superficie.



Figura 37. Efecto de la tripsinización sobre la expresión del Ca10 en la superficie de las células ET.

El cultivo de células ET fue tratado con tripsina (0,35 mg/mL) durante 30 min a 37°.

Tras la tripsinización, se añadieron a los cultivos los inhibidores tunicamicina o bencil- α -GalNAc y se incubó toda la noche. A la mañana siguiente, se recogieron las células y se valoró la expresión del Ca10 en su superficie celular. Como puede verse en la Figura 38, el tratamiento con tunicamicina inhibió la expresión del carbohidrato

Ca10, comparado con el cultivo control sin tratar. Sin embargo, con la molécula bencil- α -GalNAc, se produjo una recuperación de la expresión del Ca10, durante el tiempo que estuvo de incubación (Figura 39). Los resultados obtenidos confirmaron que la molécula reconocida por el AcMo A10 es dependiente de N-glicosilación y no de O-glicosilación.

Nivel de expresión Ca10 en la superficie celular

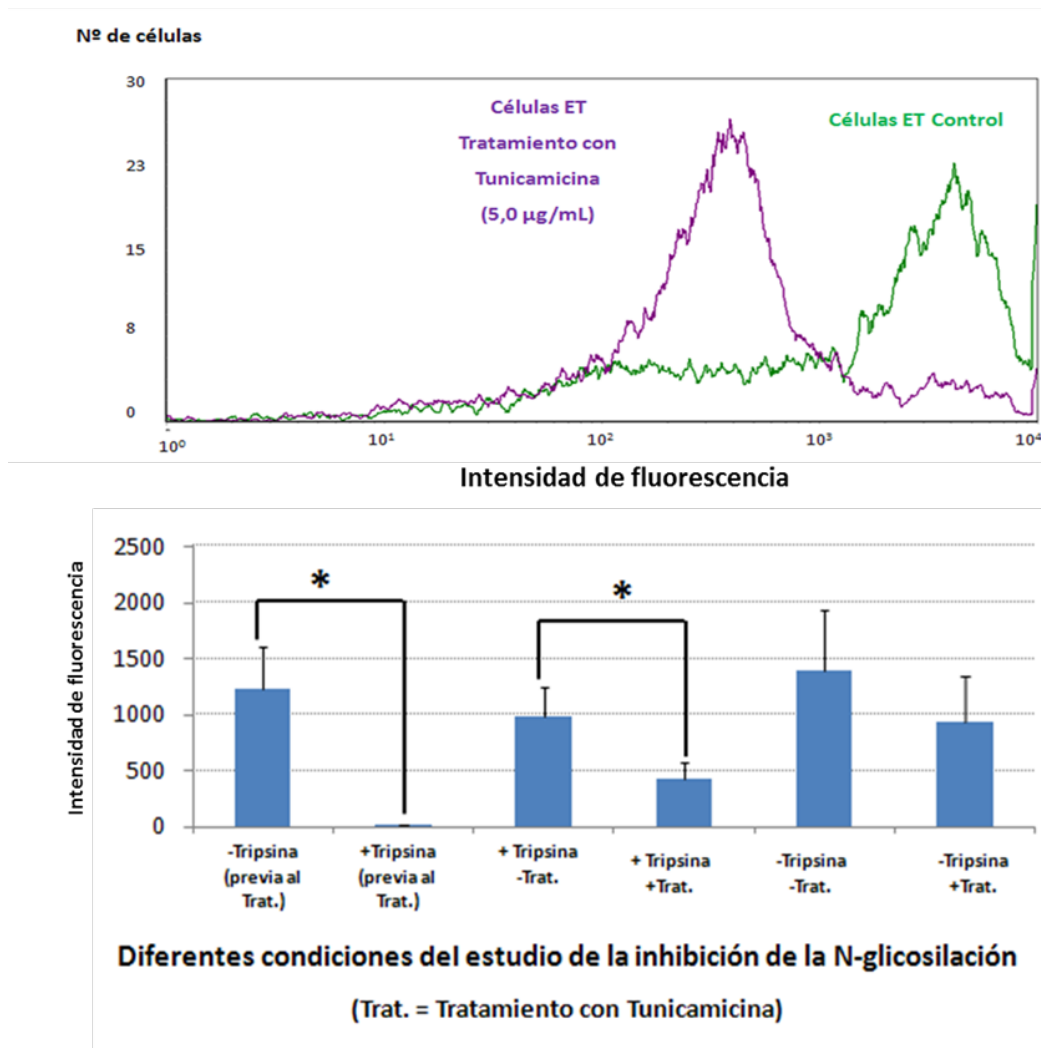


Figura 38. Inhibición de la N-glicosilación mediante tratamiento con tunicamicina.

El cultivo de células ET fue tratado con tripsina (0,35 mg/mL) durante 30 min a 37°. Posteriormente fueron tratadas con 5 µg/mL de tunicamicina y cultivadas durante toda la noche. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes (n = 3).

* $p < 0,05$.

Nivel de expresión Ca10 en la superficie celular

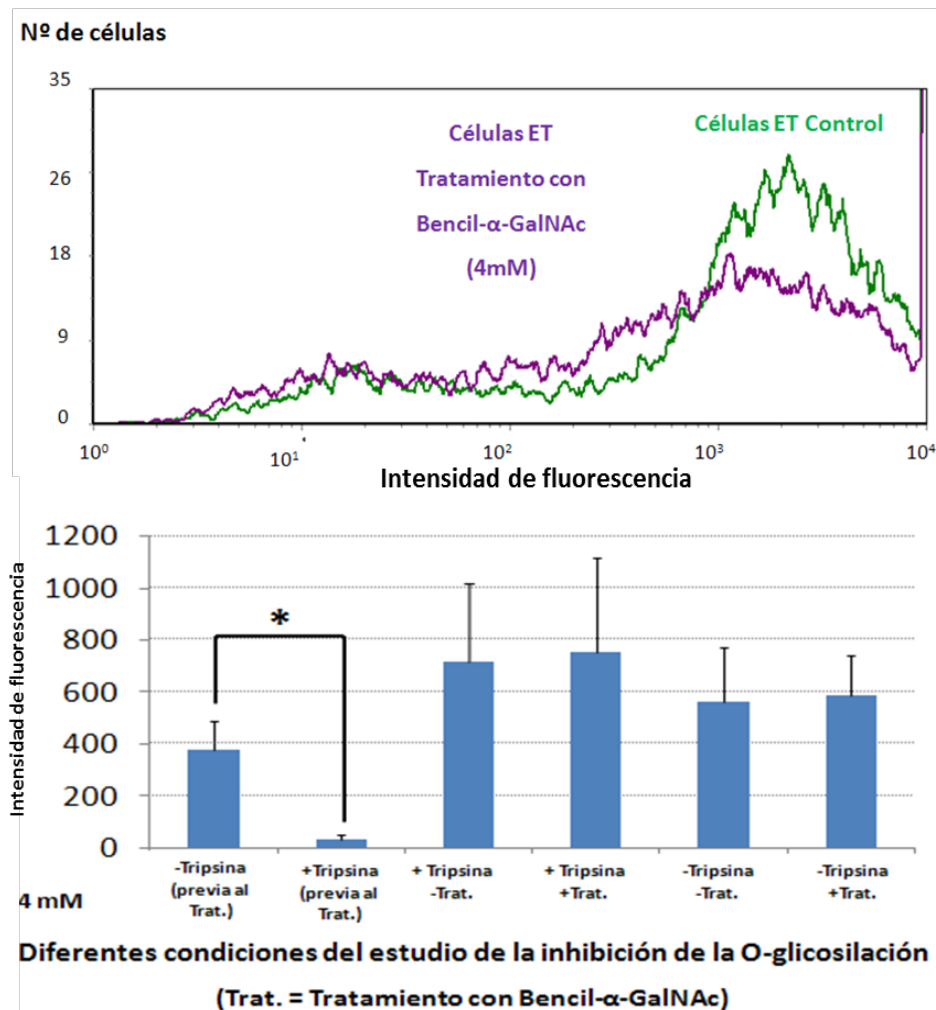


Figura 39. Inhibición de la O-glicosilación mediante tratamiento con bencil- α -GalNAc .

El cultivo de células ET fue tratado con tripsina (0,35 mg/mL) durante 30 min a 37°. Posteriormente fueron tratadas con bencil- α -GalNAc (4 mM) y cultivadas durante toda la noche. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes (n = 3).

* $p < 0,05$.

VI. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El estudio de la respuesta antitumoral que se produce tras la inmunización con células ET desvitalizadas, permitió a nuestro grupo establecer que la respuesta que se genera es fundamentalmente de anticuerpos de clase IgM específicos frente a carbohidratos del tumor (272). Este incremento de IgM está relacionado con la protección frente a un inóculo posterior de células vivas (272). Además, sabemos que existen cepas de ratones incapaces de generar esta respuesta de clase IgM, y por tanto de quedar inmunizadas y protegidas (272).

En otros sistemas experimentales, se ha descrito la falta de respuesta a la inmunización frente antígeno de naturaleza carbohidrato en las cepas que no tienen anticuerpos naturales (NAb) contra los azúcares estudiados (179). En este contexto, sabemos que existen, en ratones no inmunizados, NAb contra componentes expresados en la superficie de ET, que son de clase IgM, como la mayoría de los NAb (165, 167, 168, 230), y que están dirigidos fundamentalmente frente a determinantes carbohidratos. El título de NAb frente a carbohidratos de superficie de las células ET es variable entre diferentes cepas de ratones, habiendo una correlación inversa entre su título y la resistencia a la formación de tumores tras la inoculación de dosis umbrales de células ET (336).

La protección frente al crecimiento del tumor ET es posible transferirla de un animal a otro. Se puede transferir utilizando los anticuerpos policlonales de clase IgM presente en los ratones inmunizados con el ET (272). Además, se puede reproducir el comportamiento de esta IgM mediante el uso de un anticuerpo monoclonal (A10) de clase IgM dirigido contra un carbohidrato de la superficie de las células ET (287, 335). Existen varios estudios realizados por otros grupos, en los que se observó la presencia de NAb humanos de clase IgM reactivos frente a determinantes de tipo carbohidrato presentes en el ET (288, 360). La reactividad de esos anticuerpos era frente a grupos de tipo galactosa (288). Estos anticuerpos se podían encontrar en personas sanas, sin ninguna patología aparente y sus niveles eran variables entre individuos. También se encontraron en pacientes con patologías crónicas no malignas y en pacientes con cáncer. Se vio que los niveles de IgM reactiva eran significativamente menores en los

Discusión

pacientes con cáncer que en los individuos sanos o con enfermedades crónicas no malignas. Pero lo más interesante de este estudio, es que estos sueros eran capaces de lisar el tumor ET mediante un mecanismo dependiente de complemento, y que esta capacidad lítica era dependiente de los niveles de anticuerpos. A mayor título de NAb de clase IgM, mayor capacidad para lisar las células tumorales ET, de tal forma que se encontró que la capacidad de lisar las células neoplásicas ET estaba muy reducida en los pacientes con cáncer.

Nuestros resultados confirman la presencia en humanos de NAb de clase IgM frente a carbohidratos de la superficie de las células ET. Aproximadamente el 80% de sueros de donantes sanos presentaban anticuerpos IgM específicos frente a estos carbohidratos, por encima del punto de corte establecido (Figura 12). Además, encontramos una cierta correlación entre los niveles séricos de IgM total y los niveles de NAb reactivos frente a dichos carbohidratos ($r=0,582$; $p<0,001$). Es decir, que a mayores niveles de IgM sérica, mayores niveles de NAb reactivos. Por otro lado, no se observó ninguna relación entre el grado de reactividad de la IgM específica frente a los HC-ET y el grupo sanguíneo (ABO) del donante, por lo que los NAb dirigidos frente a HC-ET no eran asimilables a las isohemaglutininas séricas (Tabla 6). Esto es interesante ya que en las células transformadas aparecen estructuras de tipo carbohidrato relacionadas con los grupos sanguíneos, como epitopos crípticos reconocidos por anticuerpos a raíz de una glicosilación incompleta (361, 362).

Los NAb presentes en los sueros humanos, eran capaces de reconocer la superficie de las células murinas A10+, no encontrándose IgM específica frente a aquellas células que eran negativas para el AcMo A10 (Figura 13). Además, hubo una correlación moderada entre los anticuerpos anti HC-ET y los presentes frente a la superficie de las células A10+, ($r=0,451$; $0,532$; $p<0,001$ en ambos casos) (Tabla 8).

Los resultados que obtuvimos con los tumores humanos fueron similares a los descritos con las líneas celulares murinas. Muchos de los sueros humanos presentaban NAb reactivos frente al tumor HT-29, existiendo una correlación positiva entre esta reactividad y la encontrada frente a los HC-ET (Tabla 9). Observamos un mayor número de positivos, y con un título más elevado, en el grupo de sueros con alta reactividad,

comparando con los de reactividad moderada o baja (92% vs. 62% vs. 18%, respectivamente). En el caso de las biopsias o piezas quirúrgicas humanas, los sueros más positivos frente los HC-ET presentaban más reactividad de NAb frente al tumor (Tabla 11). Esta reactividad de NAb sólo aparecía frente a los tumores A10+, y además, la intensidad de señal obtenida correlacionaba con el título de NAb frente a los HC-ET y con la señal con el AcMo A10 frente al tejido (Figura 18). Cuando se analizaron los tejidos sanos, encontramos alguna muestra positiva con los sueros, lo que probablemente se debió al reconocimiento de una estructura no relacionada con la estructura reconocida por el AcMo A10.

La correlación observada entre el grado de reactividad frente a los HC-ET y las células o tumores A10+, nos indica que estos NAb reactivos deben estar dirigidos frente a una estructura o epitopo asociado al reconocido por el AcMo A10. La naturaleza policlonal y polireactiva de los NAb (363-365), sugeriría una mayor crosreactividad de estos anticuerpos, pero los resultados indican una sorprendente restricción en su reactividad frente al epitopo A10. Además, los NAb humanos parecen reaccionar contra este epitopo, tanto en muestras tumorales murinas como en humanas. Este hecho no es sin embargo de extrañar, ya que los NAb se han descrito reconociendo carbohidratos presentes en estructuras compartidas por diferentes tejidos y especies (366-368), como puede ser nuestro caso.

En los estudios pioneros de Avrameas se analizaron de forma exhaustiva las reactividades de los NAb frente una gran cantidad de moléculas, muchas de ellos de naturaleza carbohidrato (369-371). Es un hecho bien conocido que en todos los tumores, a través de fenómenos de glicosilación incompleta o aberrante, aparecen nuevas estructuras de tipo carbohidrato (372). Varios autores han descrito en humanos la presencia de anticuerpos IgM, con la capacidad de reconocer antígenos tumorales, entre los que se encuentran estas estructuras de tipo sacárido (259, 289, 290, 307, 339, 373-378). En los últimos años, Bovin y colaboradores describieron NAb de clase IgM en casi la totalidad de los individuos sanos analizados, con reactividad frente una enorme cantidad de estructuras sacáridas, incluidos estos carbohidratos

Discusión

tumorales. Entre estas estructuras están los cores glicanos de mucinas (cores-1, 3, 4 y 6), el antígeno T, TF, Tn, Lewis, LacdiNAc, etc (349).

Se ha visto que la aparición de estos epitopos tumorales está relacionada con la inhibición o progresión del proceso tumoral, la invasión y la aparición de metástasis (379-383). Hay un gran número de estudios que relacionan la aparición de estas nuevas estructuras (como los antígenos T, Tn y sialil Tn), con el pronóstico y la evolución de la enfermedad, asociándose la mayoría de las veces a una peor evolución (384-387). Además, se sabe que estas nuevas estructuras pueden ser dianas de anticuerpos, existiendo una relación entre la presencia de estos NAb reactivos, en varios tipos de cánceres, y la evolución del paciente (229, 388). En humanos, según los resultados obtenidos por nuestro grupo, la diana reconocida por el AcMo A10 parece ser el core-6 de MUC-1 tumoral (340), estructura frente a la que actualmente hay descritos NAb en individuos sanos (349).

Es importante reseñar que nuestro grupo ha estudiado, en los últimos años, la relación existente entre la expresión del epitopo reconocido por el AcMo A10 en cáncer humano, la evolución de la enfermedad y su pronóstico. Durante este tiempo hemos visto una estrecha relación en cáncer colorrectal y de próstata.

En tumores de colon, tanto el intervalo libre de enfermedad, como la supervivencia global se ven favorecidos por la expresión del epitopo A10 en el tumor, comportándose como un marcador de factor pronóstico positivo independiente, lo que implica que su expresión no está asociada a factores pronóstico convencionales (estadio, grado de diferenciación y tipo histológico). En este sentido, la ausencia de expresión de A10 define un RR=3,4 ($p=0,02$) para fallecer por la enfermedad en la serie de pacientes estudiados (datos no publicados).

En el caso de los adenocarcinomas de próstata, su expresión en el momento del diagnóstico está relacionada con la evolución del paciente, comportándose también como un marcador de factor pronóstico positivo independiente, en relación con la supervivencia global y el periodo de tiempo libre de metástasis ($p=0,002$) Además, existe una correlación significativa entre la expresión del epitopo A10, el grado de

Gleason y el nivel sérico de PSA, en el momento del diagnóstico ($p=0,004$). A mayor grado de expresión del epitopo reconocido por el anticuerpo monoclonal A10, menor score de la escala de Gleason y menores niveles de PSA sérica (datos no publicados).

Es posible que este mejor pronóstico pueda asociarse a la presencia de NAb frente a los tumores A10 reactivos, como en el caso del modelo experimental murino (272). De hecho, analizando una serie de 195 sueros de pacientes con adenocarcinomas colorrectales, 258 sueros de pacientes con adenocarcinomas de próstata y 115 sueros de donantes sanos, se evidencia una reducción significativa de los niveles de NAb reactivos frente a los HC-ET, en los individuos con cáncer respecto los controles sanos (datos no mostrados).

Ello puede obedecer a la presencia de carbohidratos tumorales circulantes con capacidad para adsorber los anticuerpos IgM séricos, como nuestro grupo demostró en ratones portadores del tumor subcutáneo ET (150). En este sentido, hemos comprobado que es posible medir la molécula diana del AcMo A10 en el suero humano que denominamos Ca10. Los primeros datos que tenemos parecen indicar que sus niveles séricos son significativamente mayores en pacientes con cáncer y que estos niveles parecen estar relacionados con la evolución de la enfermedad, encontrándose más elevados en patología más avanzadas. Éste mismo resultado ya se había descrito en el caso de pacientes con mielomas o con tumores ginecológicos (endometrio y ovario). En el caso de los mielomas, observaron que en el suero de estos pacientes se producía un aumento de la molécula MUC-1 soluble y una disminución de los anticuerpos específicos frente a ella (389). En el estudio con pacientes con neoplasias de endometrio y ovario, vieron una disminución de los NAb reactivos frente al antígeno T y un aumento de su expresión, respecto los individuos sanos (373). De todas formas, necesitamos profundizar más en el significado de esta disminución aparente de los NAb reactivos en el suero de los pacientes, respecto los controles sanos, para confirmar este supuesto.

Tras demostrar la presencia de NAb humanos reactivos frente a tumores A10+, y viendo la posible importancia que estos pueden tener respecto a la evolución de los tumores humanos de colon y próstata, quisimos valorar su función efectora, desde el

Discusión

punto de vista de la inhibición del crecimiento tumoral. Diferentes estudios han descrito la capacidad de los NAb para eliminar células tumorales (390-393). En neuroblastoma, varios trabajos demostraron que los NAb IgM eran capaces de eliminar las células tumorales a través de un mecanismo en el que el sistema del complemento estaba implicado (394, 395). Por otro lado, Vollmers y colaboradores encontraron NAb que eran capaces de eliminar células tumorales mediante un mecanismo directo de apoptosis (258, 260, 396). Dado que la IgM tiene una gran capacidad para fijar la molécula del complemento C1q y promover la activación de este sistema y la posterior lisis de la célula tumoral, valoramos si los NAb encontrados en los sueros humanos era capaces de lisar las células ET a través de esta vía. Los resultados obtenidos demostraron que los sueros humanos procedentes de individuos sanos tenían capacidad para lisar las células ET, por un mecanismo dependiente de complemento (Figura 29), confirmando datos previos (394, 395). Como cabía esperar, a mayor título de NAb reactivos frente a los HC-ET, mayor porcentaje de lisis de las células tumorales. Los sueros con un título de NAb alto/medio frente los HC-ET tuvieron una capacidad para lisar las células ET significativamente mayor que los sueros que presentaron unos niveles bajos de IgM reactiva (33,4% vs. 16,5% de lisis).

Aunque estos resultados corroboran el potencial de los NAb que reaccionan frente a carbohidratos asociados a tumores en los mecanismos de resistencia antitumoral, más estudios son necesarios para evaluar su verdadero papel en los mecanismos de inmunovigilancia del cáncer (227, 228, 348). Además de su función efectora directa a través de la lisis por complemento o inducción de apoptosis (257, 258, 260, 396), podrían estar implicados en modificar el comportamiento biológico de las células tumorales circulantes por su interacción con moléculas de naturaleza carbohidrato implicadas en fenómenos de adhesión vascular (397). La lisis mediada por complemento es compatible con otros mecanismos de forma no excluyente, dado que aunque la IgM es un isotipo fundamentalmente intravascular y posee la mayor capacidad para la fijación del complemento (107), existen trabajos donde no está claro el papel de este sistema, y si a la presencia de NAb específicos frente las células tumorales (398-400). Por ejemplo los NAb podrían desempeñar una función, promoviendo un efecto citostático por medio de los macrófagos, mediante un

mecanismo tipo lectina en el que los NAb actúen de puente entre ambos tipos de células (256). También podrían desempeñar alguna función interfiriendo con los mecanismos de adhesión de la célula tumoral, inhibiendo o dificultando el anclaje de las células tumorales circulante al endotelio vascular, y por tanto, frenando o inhibiendo la posible migración de células tumorales con capacidad para generar metástasis, a posibles nichos donde anidaran y crecieran formando nuevos tumores sólidos (388, 397).

En todo caso, la gran capacidad lítica del complemento a través de su fijación a la IgM podría ser un mecanismo para la eliminación de células metastásicas circulantes (107).

Teniendo en cuenta la reactividad compartida entre tumores murinos y humanos a través del AcMo A10 y la estrecha correlación encontrada entre la reactividad de los NAb humanos con estos tumores en función de la expresión del epitopo A10, se hicieron experimentos de inmunización para valorar si esta reactividad se mantenía con los anticuerpos específicos inducidos. De esta forma, podríamos saber si un inmunógeno de origen murino con expresión de CA10, p.ej., células ET, podría ser capaz de generar una respuesta específica de anticuerpos frente a tumores humanos A10+.

Este hecho no solo confirmaría la presencia de epitopos comunes en ambos tipos de tumores, sino que abriría la posibilidad de utilizar una fuente xenogénica para una posible vacuna antitumoral. Como se presentó en la sección de Resultados, la inmunización produjo un incremento significativo de la IgM específica frente a los HC-ET en los animales inmunizados con las células ET, respecto los controles.

Al analizar la IgM específica presente en los animales inmunizados con las células ET con más detalle, observamos que también se había incrementado significativamente frente aquellas líneas celulares murinas y humanas que eran positivas para el AcMo A10.

Esta inmunización también produjo un aumento de la IgM específica en los animales tratados con el ET, frente a los tumores de colon humano A10+ (HT-29 y

Discusión

biopsias/piezas quirúrgicas) y no frente a los tejidos control de colon sano. En el caso de dos tejidos control, encontramos algún suero positivo en los animales inmunizados con las células ET (con un título bajo). Estos dos tejidos sanos eran también positivos frente al AcMo A10, por lo que no es de extrañar esta positividad con algún suero. Hay que recordar que el A10 marca la zona de transición temprana entre tejido benigno y maligno en cáncer de colon (340).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos con los sueros humanos y nos indican que la IgM inducida en los animales, tras la inmunización con la línea ET, debe estar reconociendo, en gran medida, la misma estructura que reconoce el AcMo A10 o algo asociado, tanto en células humanas como murinas.

Los resultados obtenidos confirmaron que los sueros de los animales inmunizados con las células ET son capaces de reconocer a los adenocarcinomas de colon humano A10+ y que la intensidad de la señal obtenida correlacionaba con el grado de positividad para el AcMo A10, siendo mayoritariamente negativos para los tejidos sanos de colon A10-. Además, en el tejido HT-29 y en las piezas o biopsias de colon, el patrón de reconocimiento fue similar al del AcMo A10, detectando fundamentalmente la zona glandular del tejido.

Los experimentos de inhibición con los sueros positivos frente a los tumores humanos A10+ y las células ET (como fuente de HC-ET) confirmaron la existencia de estructuras relacionadas presentes en ambos tipos de tumores. Esta estructura común, probablemente de tipo carbohidrato, está definida por el AcMo A10. La existencia de estructuras presentes en muestras de distinto origen tisular, e incluso de distintas especies, ya fue descrita para epitopos diana de NAb (366-368).

Varios estudios realizados con vacunas que utilizan carbohidratos tumorales han visto la implicación de procesos de CDC, como mecanismo efector antitumoral (331, 401, 402). Con objeto de saber si los anticuerpos inducidos que habíamos obtenido, tenían capacidad para lisar células tumorales A10+, desarrollamos el mismo experimento que hicimos con los NAb humanos. Los resultados del experimento de CDC nos indicaron que estos anticuerpos inducidos, como era de esperar, tenían la

capacidad de lisar las células ET cuando se añadía al cultivo complemento de conejo (Figura 30). El grupo de sueros procedentes de los ratones inmunizados con las células ET producían una lisis significativamente mayor que el grupo de sueros procedentes de ratones control no inmunizados (67,5% vs. 15,7%). Cuando se comparó con los sueros de los animales inmunizados con las células B16 se obtuvo también una diferencia significativa (67,5% vs. 15,5%), lo que descartó un posible efecto citotóxico inespecífico. Los mismos mecanismos de acción anti-tumorales mencionados anteriormente con los NAb, además de la CDC, podrían intervenir en el caso de los anticuerpos de clase IgM inducidos mediante inmunización (257, 258, 260, 396).

Por último, y como prueba de concepto, quisimos estudiar si la inmunización con una línea tumoral humana A10+ inducía una respuesta de anticuerpos de clase IgM específicos frente al Ehrlich. Una vez terminados los protocolos de inmunización, observamos que los niveles de IgM específica se habían incrementado de forma notable frente las líneas tumorales A10+, al igual que sucede cuando se inmuniza con la célula ET desvitalizadas (272).

Dada la importancia que parece tener la estructura reconocida por el AcMo A10, quisimos realizar una caracterización preliminar de la misma y de la molécula murina que la contiene (Ca10). Para ello, diseñamos un nuevo método que nos permitiera obtener una cantidad de Ca10 mayor que la obtenida con el anterior método empleado (fenol-cloroformo). Los datos previos que conocíamos de la molécula diana del AcMo A10, nos indicaban que es un polianión con un peso molecular aparente elevado (335). Además, sabemos que el epitopo reconocido por este anticuerpo es de naturaleza carbohidrato al ser sensible al tratamiento con periodato sódico (335). En el caso de los tumores humanos, y de forma más concreta en los adenocarcinomas de colon, sabemos que el A10 reconoce el core-6 glicano (GlcNAc β (1-6)GalNAc) presente en la molécula MUC-1 tumoral (340). Dicha molécula es una glicoproteína transmembrana de tipo I de alto peso molecular (más de 400 kDa) (403).

Aprovechando el conocimiento adquirido sobre las características de esta molécula y dado que presenta un alto peso molecular, empleamos una estrategia de

Discusión

separación por tamaño de exclusión. Para ello usamos un método de ultrafiltración tangencial con un tamaño de punto de corte de 300 KDa. El método planificado nos permitió la purificación del Ca10 de manera satisfactoria. La cantidad de proteínas irrelevantes que conseguimos eliminar se acercó al 99% respecto la cantidad inicial, mientras que conservamos la mayoría del Ca10 de la muestra de partida. Estos datos nos indicaron que el tamaño del Ca10 era, en gran medida, superior a 300 KDa. Hay que tener en cuenta que dentro de la fracción de carbohidratos purificados, se encuentra el Ca10, pero desconocemos su porcentaje en el conjunto de ellos.

La caracterización inicial de la muestra, realizada mediante cromatografía de gases y resonancia magnética nuclear, nos indicó una alta proporción de carbohidratos, donde los residuos de galactosa, glucosa, glucosamina y manosa eran el componente mayoritario. Además, el material de naturaleza proteico era bajo, con una mayor proporción de los aminoácidos glutamina, asparagina y leucina. No se encontraron niveles significativos de ácidos grasos. De forma resumida, se pudo concluir que la fracción HC-ET presentaban una alta proporción de componentes de naturaleza sacárida, con bajo contenido en proteínas y nula presencia de ácidos grasos.

Con la técnica de microarrays de lectinas vimos que el componente GlcNAc era muy importante, ya que sólo las lectinas LEA (*Lycopersicon esculentum agglutinin*) y DSL (*Datura stramonium lectin*), específicas de GlcNAc, mostraron una reactividad alta frente a los HC-ET. Además, el AcMo A10 parece tener una alta especificidad frente las siguientes estructuras: quitotriosa ([GlcNAc- β (1-4)]), lacto-N-triaosa (GlcNAc- β (1-3)-Gal- β (1-4)-Glc) y el core-3 de mucinas (GlcNAc- β (1-3)-GalNAc). Cuando estudiamos la molécula humana diana del AcMo A10 en tumores humanos vimos la implicación de un core glicano de mucinas. Los estudios de inhibición con los cores de mucinas 1, 2, 3 y 6 nos indicaron que este último (GlcNAc β (1-6)GalNAc) está implicado, en gran medida, en el reconocimiento del AcMo A10 en tejido de colon (340). Los resultados obtenidos con la molécula humana y murina, indican la importancia de la estructura sacárida (GlcNAc β (1-x)GalNAc).

Con respecto a la lacto-N-tetraosa ($\text{GlcNAc-}\beta(1-3)\text{-Gal-}\beta(1-4)\text{-Glc}$) hay que recordar un caso clínico descrito por Kabat en 1982 (404), de un paciente que presentaba un adenocarcinoma de pulmón al que además se le diagnosticó una gammopatía monoclonal IgM, con remisión de su adenocarcinoma. La remisión se asoció a la presencia de este monoclonal específico frente a la molécula lacto-N-tetraosa, que estaba presente en la superficie de las células del cáncer de pulmón.

Por último, quisimos saber qué tipo de glicosilación presentaba el Ca10. La mayoría de los azúcares presentes en proteínas de membrana, o secretadas se pueden clasificar en dos grandes grupos, en función de su unión a la fracción polipeptídica: N- y O-glicosilación. Varios trabajos publicados describen la presencia de azúcares unidos a través de tanto O- como N-glicosilaciones en moléculas presentes en las células ET (286, 405-407). Por otro lado, las glicosilaciones que se encuentran con mayor frecuencia en cánceres ginecológicos, mama y ovario, son N-glicosilaciones (408).

Los resultados obtenidos tras los tratamientos con las N- y O-glicosidasas y con los inhibidores metabólicos de la glicosilación nos indicaron una fuerte presencia de N-glicosilación en la muestra de HC-ET. Por tanto, parece que el epitopo reconocido por el A10 presente en el HC-ET depende de este tipo de enlace glicosídico. En el caso de la molécula humana presente en adenocarcinomas de colon, vimos que este epitopo es resistente a la acción de exoglicosidasas y a la oxidación por periodato, pero es sensible a la degradación de Smith y a la eliminación-beta, lo que sugería la implicación de carbohidratos unidos mediante O-glicosilación en posiciones reductoras no terminales (340).

A raíz de los resultados obtenidos con la molécula humana reconocida por el AcMo A10 (MUC-1), era fácil presuponer que en el caso de la molécula murina, iba a ser también un O-glicoconjugado. Sin embargo, los datos obtenidos en el tumor murino indicaron que la molécula diana del A10 se modifica mediante N-glicosilación. No es de extrañar este resultado ya que en cáncer de mama y ovario, esta unión es más importante que la O-glicosilación (408).

Discusión

Los datos obtenidos en estos experimentos son consecuentes con la bibliografía existente. El tumor de Ehrlich, no hay que olvidar que es un tumor mamario de origen espontáneo. En tumores ginecológicos (mama y ovario), las modificaciones o cambios en la glicosilación más importante se hallan en los azúcares unidos a través de N-glicosilación, presentes en sus glicoproteínas (408). Además, está descrito que a los residuos GlcNAc terminales no reductores que forman parte de N-, O-glicanos o glicolípidos se pueden añadir otros azúcares, formando repeticiones de poly-LacNAc, mediante la acción de las enzimas de las familias β 1,3GnT y β 1,4GalT (409). Las estructuras poly-LacNAc frecuentemente se modifican, dando lugar a antígenos asociados a tumores de naturaleza carbohidrato, como por ejemplo el antígeno SLew^X (410). Por otro lado, a las repeticiones lineales de poly-LacNAc se les pueden unir residuos β 1,6GlcNAc, fenómeno catalizado por las enzimas de la familia IGnT (411), seguido de la acción de β 1,3GnT y β 1,4GalT, creando estructuras ramificadas. Como hecho curioso, se ha descrito que las enzimas β 1,3GnT y β 1,4GalT e IGnT están implicadas en la regulación del crecimiento de varios tumores. Por ejemplo, se ha visto que la expresión génica de alguno de los miembros de la familia β 1,4GalT, como la enzima y β 1,4GalT1-3, aumenta de forma significativa en el tejido tumoral mamario, comparado con el tejido de mama sano (412).

Por tanto, y en resumen, los resultados nos confirman una importante presencia en los HC-ET de residuos de GlcNAc y galactosa. Además, el epitopo reconocido por el AcMoA10 está formado por los azúcares GlcNAc, GalNAc, Glc y Gal; mediante uniones β 1,3 y β 1,4, a través de N-glicoconjugados. Todas estas características son típicas de las estructuras sacáridas presentes en los tejidos tumorales mamaros (408). Con los datos que tenemos, podemos afirmar que aunque la estructura reconocida por el AcMo A10 no parece ser la misma en el tejido murino y en el tejido humano, sí parece que tienen características comunes. En ambos casos, los residuos de GlcNAc y GalNAc parecen jugar un papel fundamental. Estos carbohidratos se unen entre sí mediante enlaces β (1-3) y β (1-4) en ratones; y β (1-6) en tumores humanos.

En el caso de los adenocarcinomas de colon humanos, los resultados que teníamos nos indicaban que el epitopo reconocido por el AcMo A10 se encontraba en la molécula MUC-1 tumoral y probablemente también en otras mucinas, a excepción de MUC-2 (340). En el caso murino todavía tenemos que determinar de qué molécula se trata, ya que es algo que no podemos conocer con los experimentos que hemos realizado hasta el momento. Sabemos que este epitopo se encuentra localizado en la parte sacárida de una glicoproteína de alto peso molecular (como en el caso humano), que podría ser incluso una mucina, ya que estas glicoproteínas además de presentar una enorme fracción sacárida unida mediante O-glicosilación, también presentan azúcares unidos por medio de N-glicoconjugados (413). De todas formas, no sería extraño que las moléculas humana y murina reconocidas por el AcMo A10 fueran diferentes, si consideramos que probablemente se trate de una diana de NAb, como sabemos por los experimentos realizados en esta misma tesis; y que el A10 probablemente derive de un LB productor de este tipo de anticuerpos. Los NAb de clase IgM presentan reactividad frente estructuras o patrones que pueden estar presentes en distintas moléculas de incluso distintas especies (366-368), como podría ser el caso.

En el futuro, con el conocimiento adquirido y cuando hayamos caracterizado de forma más detallada el epitopo carbohidrato A10 murino, podríamos intentar utilizarlo como fuente de carbohidratos para construir una vacuna antitumoral, como se está haciendo con otras estructuras tumorales de tipo sacárido (331-334). Dicha vacuna estaría indicada para el tratamiento de neoplasias humanas positivas para el AcMo A10. Pero esta respuesta sólo se genera de forma eficaz en animales que posean, de forma previa a la inmunización, unos niveles mínimos de NAb reactivos (7). De esta forma, posiblemente la vacuna estaría sólo indicada en individuos que presentaran unos ciertos niveles de NAb reactivos frente al Ca10. Además, la presencia de estos anticuerpos naturales posiblemente refleje una falta de tolerancia frente a este antígeno tumoral. Este hecho es un fenómeno beneficioso desde el punto de vista de una respuesta inmunológica, ya que uno de los grandes problemas de la inmunoterapia contra el cáncer es el encontrar antígenos que sean lo suficientemente inmunogénicos como para poder inducir una respuesta inmunitaria

Discusión

eficaz. En nuestro caso, parece que la falta de tolerancia frente al Ca10 es una ventaja frente a otras aproximaciones o vacunas antitumorales. Por otro lado, sería indispensable que el tumor del paciente fuera A10+. Estas dos premisas harían de esta vacunación un tratamiento individualizado, en el que se tendría que cumplir tanto que el tumor fuera A10+, como que el paciente presentara unos niveles mínimos de NAb reactivos, para que la vacunación fuera capaz de generar una respuesta inmunitaria con la generación de anticuerpos específicos. Dado que el AcMo A10 es capaz de reconocer adenocarcinomas humanos de distinto origen (colon, próstata, pulmón, estómago) una vacuna basada en el Ca10 podría estar dirigida frente a un número amplio de tumores.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1- La mayoría de los sueros humanos (80%) contienen anticuerpos naturales (NAb) de clase IgM reactivos frente a los HC-ET. Los niveles de estos anticuerpos dependen de cada individuo y son variables, no existiendo ninguna relación con los antígenos de grupo sanguíneo.
- 2- Existe una correlación directa entre la reactividad de los NAb humanos y el AcMo A10 frente a los HC-ET, líneas tumorales murinas, así como frente a tumores humanos, lo que sugiere que las estructuras carbohidrato reconocidas por los NAb humanos y el AcMo A10 están relacionadas.
- 3- Los sueros de los animales inmunizados con las células ET desvitalizadas contienen un título alto de IgM específica frente a los HC-ET y son capaces de reconocer células y tumores A10+, tanto murinos como humanos, pero no aquellos tejidos que son negativos para este anticuerpo. Además, la reactividad IgM frente los tumores humanos A10+ desaparece si los sueros son pre-incubados con las células ET. Estos resultados apoyan la relación estructural entre los HC-ET A10+ y los presentes en las células tumorales humanas.
- 4- Los NAb humanos e inducidos murinos, de clase IgM, son capaces de lisar las células tumorales ET (*in vitro*) mediante un mecanismo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).
- 5- Los animales inmunizados con líneas tumorales humanas A10+ pero no A10-, generan una respuesta IgM frente a las células ET.
- 6- Se ha optimizado un proceso de purificación de los carbohidratos de la superficie celular de las células de Ehrlich (HC-ET) reactivos con el AcMo A10 a partir de sobrenadantes de cultivo de las células ET.
- 7- Los HC-ET purificados mediante ultrafiltración tangencial presentan una composición mayoritaria de material glucídico (88,2%) con un alto contenido en galactosa, glucosa, glucosamina y manosa, frente una minoría proteica (11,7%). El porcentaje de lípidos presente en la muestra es irrelevante (<0,1%).

Conclusiones

- 8- Experimentos de inhibición con azúcares sugieren la implicación de estructuras con GlcNAc- β (1-3) y GlcNAc- β (1-4) en el epitopo carbohidrato reconocido por el AcMo A10.
- 9- Dicho epitopo carbohidrato en el HC-ET está ligado a una estructura N-glicosilada.
- 10- Estos resultados nos permiten proponer a los HC-ET y más particularmente al carbohidrato definido por el AcMo A10 (Ca10) para el diseño de nuevas vacunas antineoplásicas para tumores humanos A10+.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Informe mundial sobre el cáncer 2014, IARC.
- 2- de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, Plummer M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012; 13: 607-615.
- 3- Sagar J, Chaib B, Sales K, Seifalian A. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell International.* 2009; 7:9.
- 4- Bixby S, Kruger G, Mosher J. Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron.* 2002; 35:643-656.
- 5- Reya T, Tannishtha R: Classic pathways, new views on cancer. Interview by Caitlin Sedwick. *J Cell Biol.* 2012; 198:766-767.
- 6- Bosch-Barrera J, Lopez-Picazo Gonzalez JM, Garcia-Foncillas, Lopez J, Prosper Cardoso F. Células madre y cáncer: dilucidando el origen de la célula madre tumoral. *Rev Med Univ Navarra.* 2007; 51:14-17.
- 7- Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges *Pathobiology.* 2008; 75:75-84.
- 8- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001; 414:105-111.
- 9- Bonnet D. Cancer stem cells: lessons from leukaemia. *Cell proliferation.* 2005; 38:357-361.
- 10- Daley GQ. Chronic myeloid leukemia: proving ground for cancer stem cells. *Cell.* 2004; 119:314-316.
- 11- Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5:311-321.
- 12- Cariati M, Purushotham AD. Stem cells and breast cancer. *Histopathol.* 2008; 52:99-107.
- 13- Farnie G, Clarke RB. Breast stem cells and cancer. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2006; 141-153.

Bibliografía

- 14- Vonderhaar BK, Smith GH. Stem cells and breast cancer. Introduction. *Breast Dis.* 2008; 29:1.
- 15- Wicha MS. Breast cancer stem cells: the other side of the story. *Stem Cell Rev.* 2007; 3:110-112.
- 16- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* 2007; 11:69-82.
- 17- Galderisi U, Cipollaro M, Giordano A. Stem cells and brain cancer. *Cell Death Differ.* 2006; 13:5-11.
- 18- Yu SC, Ping YF, Yi L, Zhou ZH, Chen JH, Yao XH, Gao L, Wang JM, Bian XW. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Lett.* 2008; 265:124-134.
- 19- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschsmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2004; 23:9392-9400.
- 20- Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol.* 2008; 26:2828-2838.
- 21- Cammareri P, Lombardo Y, Francipane MG, Bonventre S, Todaro M, Stassi G. Isolation and culture of colon cancer stem cells. *Methods Cell Biol.* 2008; 86:311-324.
- 22- Takaishi S, Okumura T, Wang TC. Gastric cancer stem cells. *J Clin Oncol.* 2008; 26:2876-2882.
- 23- Hombach-Klonisch S, Paranjothy T, Wiechec E, Pocar P, Mustafa T, Seifert A, Zahl C, Gerlach KL, Biermann K, Steger K, Hoang-Vu C, Schulze-Osthoff K, Los M. Cancer stem cells as targets for cancer therapy: selected cancers as examples. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2008; 56:165-180.
- 24- Nitsch SM, Pries R, Wollenberg B. Head and neck cancer triggers increased IL-6 production of CD34+ stem cells from human cord blood. *In vivo.* 2007; 21:493-498.

- 25- Gou S, Liu T, Wang C, Yin T, Li K, Yang M, Zhou J. Establishment of clonal colony-forming assay for propagation of pancreatic cancer cells with stem cell properties. *Pancreas*. 2007; 34:429-435.
- 26- Kasper S. Stem cells: The root of prostate cancer? *J Cell Phys*. 2008; 216:332-336.
- 27- Lawson DA, Witte ON. Stem cells in prostate cancer initiation and progression. *J Clin Invest*. 2007; 117:2044-2050.
- 28- Lawson DA, Xin L, Lukacs R, Xu Q, Cheng D, Witte ON. Prostate stem cells and prostate cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005; 70:187-196.
- 29- Sartor O, Koochekpour S. Stem cells and prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 2004; 3:11-12.
- 30- Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissmann I, Clark M. Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2004; 14:43-47.
- 31- Costello RT, Mallet F, Gaugler B, Sainty D, Arnoulet C, Gastaut JA, Olive D. Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res*. 2000; 60:4403-4411.
- 32- Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, Grimes BA, Rossi RM, Szilvassy SJ, Jordan CT. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:16220-16225.
- 33- Coley WB. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Ann Surg*. 1891; 14(S): 199-220.
- 34- Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci*. 1893; 10:487-511.
- 35- Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 1994; 64:529-564.
- 36- Foley EJ. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res*. 1953; 13:835-837.
- 37- Prehn RT, Main JM. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Nat Cancer Inst*. 1957; 18:769-778.

Bibliografía

- 38- Ehrlich P. Über den jetzigen stand der karzinomforschung. En: Hirnrelweit F, Editor. The collected papers of Paul Ehrlich (vol 2). Pergamon Press. Oxford, Reino Unido. 1967; 550-562.
- 39- Burnet FM. Immunological surveillance. Pergamon Press. Oxford, Reino Unido. 1970.
- 40- Old LJ. Structural basis for tumor cell recognition by the immune system. En: Melcher F et al (Ed). Progress in Immunology VII. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Alemania. 1989; 1053-1062.
- 41- Osband ME, Ross S. Problems in the investigational study and clinical use of cancer immunotherapy. Immunol Today. 1990; 11:193-195.
- 42- Madorsky Rowdo FP, Baron A, Urrutia M, Mordoh J. Immunotherapy in cancer: A combat between tumors and the Immune System; you win some, you lose some. Front Immunol. 2015; 6:127.
- 43- Abreu Velez AM, Howard MS. Tumor-suppressor genes, cell cycle regulatory checkpoints, and the skin. N Am J Med Sci. 2015; 7:176-188.
- 44- Vaughan C, Pearsall I, Yeudall A, Deb SP, Deb S. p53: its mutations and their impact on transcription. Subcell Biochem. 2014; 85:71-90.
- 45- Pasche B. Role of transforming growth factor beta in cancer. J Cell Physiol. 2001; 186:153-168.
- 46- Lind MH, Rozell B, Wallin RP, van Hogerlinden M, Ljunggren HG, Toftgård R, Sur I. Tumor necrosis factor receptor 1-mediated signaling is required for skin cancer development induced by NF-kappaB inhibition. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101:4972-4977.
- 47- Lin EY, Gouon-Evans V, Nguyen AV, Pollard JW. The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2002; 7:147-162.
- 48- Klein SC, Jücker M, Abts H, Tesch H. IL6 and IL6 receptor expression in Burkitt's lymphoma and lymphoblastoid cell lines: promotion of IL6 receptor expression by EBV. Hematol Oncol. 1995; 13:121-130.
- 49- Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P, Zhang QJ, Masucci MG, Kiessling R. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from

- tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med.* 1994; 180:2371-2376.
- 50- McKallip R, Li R, Ladisch S. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J Immunol.* 1999; 163:3718-3726.
- 51- Silverstein AM. *A History of Immunology.* San Diego, CA, USA. Academic Press. 2009.
- 52- Old LJ, Boyse EA. Immunology of experimental tumors. *Annu Rev Med.* 1964; 15:167-186.
- 53- Klein G. Tumor antigens. *Annu Rev Microbiol.* 1966; 20:223-253.
- 54- Burnet FM. Cancer - a biological approach. *Brit Med J.* 1957; 1:841-847.
- 55- Thomas L. *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive State.* Lawrence HS (Ed). Hoeber-Harper. Nueva York, NY, USA. 1959; 529-532.
- 56- Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970; 13:1-27.
- 57- Burnet FM. Immunological factors in the process of carcinogenesis. *Br Med Bull.* 1964; 20:154-158.
- 58- Kaplan HS. Role of immunologic disturbance in human oncogenesis: same facts and fancies. *Br J Cancer.* 1971; 25, 620-634.
- 59- Stutman O. Immunodepression and malignancy. *Adv Cancer Res.* 1975; 22:261-422.
- 60- Grant GA, Miller JF. Effect of neonatal thymectomy on the induction of sarcoma in C57BL mice. *Nature.* 1965; 205:1124-1125.
- 61- Burstein NA, Law LW. Neonatal thymectomy and non-viral mammary tumours in mice. *Nature.* 1971; 231:450-452.
- 62- Sanford BH, Kohn HI, Daly JJ, Soo SF. Long-term spontaneous tumor incidence in neonatally thymectomized mice. *J Immunol.* 1973; 110:1437-1439.
- 63- Flanagan SP. "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res.* 1966; 8:295-309.
- 64- Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature.* 1968; 217:370-371.

Bibliografía

- 65- Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*. 1974; 183:534-536.
- 66- Stutman O. En: Rygaard J & Poulsen C (Ed). *Proceedings of the International Workshop on Nude Mice Vol I*. Gustav Fischer. Stuttgart, Alemania. 1973; 257-264.
- 67- Stutman O. Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst*. 1979; 2:353-358.
- 68- Stutman O. En: Fogh J & Giovanella BC (Ed). *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research*. Academic Press. Nueva York, NY, USA. 1978; 411-435.
- 69- Rygaard J, Povlsen CO. Is immunological surveillance not a cell-mediated immune function? *Transplantation*. 1974; 17:135-136.
- 70- Rygaard J, Povlsen CO. The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand (B) Microbiol Immunol*. 1974; 82:99-106.
- 71- Maleckar JR, Sherman LA. The composition of T cell receptor repertoire in nude mice. *J Immunol*. 1987; 138:3873-3876.
- 72- Ikehara S, Pahwa RN, Fernandes G, Hansen CT, Good RA. Functional T cells in athymic nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81:886-888.
- 73- Huning T. T-cell function and specificity in athymic mice. *Immunol Today*. 1983; 4:84-87.
- 74- Engel AM, Svane IM, Mouritsen S, Rygaard J, Clausen J, Werdelin O. Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *APMIS*. 1996; 104:629-639.
- 75- Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1994; 1:447-456.
- 76- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:7556-7561.

- 77-Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*. 2001; 97:192-197.
- 78-van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med*. 1996; 184:1781-1790.
- 79-Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med*. 2000; 192:755-760.
- 80-Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*. 1992; 68:855-867.
- 81-Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001; 410:1107-1111.
- 82-Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med*. 2000; 191:661-668.
- 83-Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science*. 2001; 294:605-609.
- 84-Noguchi Y, Jungbluth A, Richards EC, Old LJ. Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 11798-11801.
- 85-Penn I. *Malignant Tumors in Organ Transplant Recipients*. Springer-Verlag, Nueva York, NY, USA. 1970.
- 86-Gatti RA, Good RA. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer*. 1971; 28:89-98.
- 87-Penn I. Posttransplant malignancies. *Transplant Proc*. 1999; 31:1260-1262.

Bibliografía

- 88-Uyttenhove C, Van Snick J, Boon T. Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. I. Rejection by syngeneic mice. *J Exp Med.* 1980; 152:1175-1183.
- 89-Urban JL, Holland JM, Kripke ML, Schreiber H. Immunoselection of tumor cell variants by mice suppressed with ultraviolet radiation. *J Exp Med.* 1982; 156:1025-1041.
- 90-Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86:353-364.
- 91-Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol.* 2001; 2:293-299.
- 92-Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:991-1045.
- 93-Pardoll DM. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2:227-238.
- 94-Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med.* 2002; 195:327-333.
- 95-Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Münz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med.* 2002; 195:343-351.
- 96-Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med.* 2002; 195:335-341.
- 97-Yokoyama WM. Now you see it, now you don't! *Nat Immunol.* 2000; 1:95-97.
- 98-Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, Lanier LL. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity.* 2000; 12:721-727.
- 99-Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature.* 2001; 413:165-171.

- 100- Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the SCID mouse. *Immunol Rev.* 1991; 124:5-24.
- 101- Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995; 13:251-276.
- 102- Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002; 13:95-109.
- 103- Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med.* 2002; 195:161-169.
- 104- May KF, Jinushi M, Dranoff G. Immunosurveillance: Innate and Adaptive Antitumor Immunity. En: Prendergast GC (Ed). *Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth.* Elsevier, California, USA. 2013; 101-113.
- 105- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Properties and Overview of Immune Responses. En: *Cellular and molecular immunology.* Elsevier-Saunders. Philadelphia, USA. 2014; 1-12.
- 106- Rajewski K. Evolutionary and somatic immunological memory. En: Metchers et al (Ed). *Progress in Immunology VII.* Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Alemania. 1989; 397-403.
- 107- Potter M, Smith-Gill SJ. Physiology of immunoglobulins. En: Oppenheim J et al, (Ed). *Immunophysiology.* Oxford University Press. Nueva York, NY, USA. 1990; 129-151.
- 108- Riethmüller G, Schlimok G, Lehmann JM, Funke I, Bock B, Schweiberer B, Johnson JP. Immunological analysis of micrometastases and the metastatic phenotype of human tumors. En: Melchers et al (Ed). *Progress in Immunology VII.* Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Alemania. 1989; 1079-1083.
- 109- Colten HR, Ravetch JV. Innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1992; 4:1-2.

Bibliografía

- 110- Herberman RB. Tumor immunology. *JAMA*. 1992; 268:2935-2939.
- 111- Ioannides CG, Whiteside T. T cell recognition of human tumors: implications for molecular immunotherapy of cancer. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993; 66:91-106.
- 112- Bykowsky MJ, Stutman O. The cells responsible for murine natural cytotoxic (NC) activity: a multi-lineage system. *J Immunol*. 1986; 137:1120-1126.
- 113- Woodruff MFA. Immunosurveillance. *Curr Opin Immunol*. 1989; 1:910-912.
- 114- Lichtenstein A. Granulocytes as possible effectors of tumor immunity. *Immunol Allergy Clin N Amer*. 1990; 10:731-745.
- 115- Klein J. Defence against tumours. En: *Immunology*. Blackwell Scientific Publications. Boston, USA. 1990; 419-428.
- 116- Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrot RH, Sedger LM, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med*. 2001; 193:661-670.
- 117- Smyth MJ, Swann J, Cretney E, Zerafa N, Yokoyama WM, Hayakawa Y. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med*. 2005; 202:583-588.
- 118- Taniguchi M, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Wakao H. The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:483-513.
- 119- Hayday AC. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:975-1026.
- 120- Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science*. 2005; 309:264-268.
- 121- Mc Bride WH. Phenotype and functions of intratumoral macrophages. *Biochem Biophys Acta*. 1986; 865:27-41.
- 122- Mantovani A, Botazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*. 1992; 265:265-270.
- 123- Adams DO, Nathan CF. Molecular mechanisms in tumor-cell killing by activated macrophages. *Immunol Today*. 1983; 4:166-170.

- 124- Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Ann Rev Immunol.* 1984; 2:283-318.
- 125- Ralph P, Williams N, Nakoinz I, Jackson H, Watson JD. Distinct signals for antibody -dependent and nonspecific killing of tumor targets mediated by macrophages. *J Immunol.* 1982; 129:427-432.
- 126- Hamilton TA, Adams DO. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol Today.* 1987; 8:151-158.
- 127- Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell.* 2006; 124:263-266.
- 128- Colombo MP, Ferrari G, Stoppacciaro A, Parenza M, Rodolfo M, Mavilio F, Parmiani G. Granulocyte colony-stimulating factor gene transfer suppresses tumorigenicity of a murine adenocarcinoma in vivo. *J Exp Med.* 1991; 173:889-897.
- 129- Bekes EM, Schweighofer B, Kupriyanova TA, Zajac E, Ardi VC, Quigley JP, Deryugina EI. Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation. *Am J Pathol.* 2011; 179:1455-1470.
- 130- Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, Stolz DB, Land SR, Marconcini LA, Kliment CR, Jenkins KM, Beaulieu KA, Mouded M, Frank SJ, Wong KK, Shapiro SD. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med.* 2010; 16:219-223.
- 131- Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med.* 1998; 188:2357-2368.
- 132- Dhodapkar KM, Krasovsky J, Williamson B, Dhodapkar MV. Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J Exp Med.* 2002; 195:125-133.
- 133- Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 2008; 26:57-79.

Bibliografía

- 134- Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med.* 2009; 206:1457-1464.
- 135- Wakita D, Sumida K, Iwakura Y, Nishikawa H, Ohkuri T, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *Eur J Immunol.* 2010; 40:1927-1937.
- 136- Gershon RK, Lance EM, Kondo K. Immunoregulatory role of spleen-localizing thymocytes. *J Immunol.* 1974. 112:546-554.
- 137- Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2000; 192:295-302.
- 138- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 2002; 16:311-323.
- 139- Dietl J, Engel JB, Wischhusen J. The role of regulatory T-cells in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2007; 17:764-770.
- 140- Linehan DC, Goedegebuure PS. CD25+CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Immunol Res.* 2005; 32:155-168.
- 141- Oleinika K, Nibbs RJ, Graham GJ, Fraser AR. Suppression, subversion, and escape: The role of regulatory T-cells in cancer progression. *Clin Exp Immunol.* 2013; 171:36-45.
- 142- Watanabe MA, Oda JM, Amarante MK, Cesar Voltarelli J. Regulatory T-cells and breast cancer: Implications for immunopathogenesis. *Cancer Metast Rev.* 2010; 29:569-579.
- 143- Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:4404-4408.

- 144- Javia LR, Rosenberg SA. CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother.* 2003; 26:85-93.
- 145- Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2005; 65:2457-2464.
- 146- Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer.* 2005; 92:913-920.
- 147- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001; 61:4766-4772.
- 148- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004; 10:942-949.
- 149- Subiza JL, Viñuela JE, Rodríguez R, Gil J, Figueredo MA, De La Concha EG. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. *Int J Cancer.* 1989; 44:307-314.
- 150- Viñuela JE, Rodríguez R, Gil J, Coll J, De la Concha EG, Subiza JL. Antigen shedding vs. development of natural suppressor cells as mechanism of tumor escape in mice bearing Ehrlich tumor. *Int J Cancer.* 1991; 47:86-91.
- 151- Angulo I, Rodríguez R, García B, Medina M, Navarro J, Subiza JL. Involvement of nitric oxide in bone marrow-derived natural suppressor activity. Its dependence on IFN-gamma. *J Immunol.* 1995; 155:15-26.
- 152- Angulo I, Rullas J, Campillo JA, Obregón E, Heath A, Howard M, Muñoz-Fernández MA, Subiza JL. Early myeloid cells are high producers of nitric oxide upon CD40 plus IFN-gamma stimulation through a mechanism dependent on endogenous TNF-alpha and IL-1alpha. *Eur J Immunol.* 2000; 30:1263-1271.

Bibliografía

- 153- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol.* 2009; 182:4499-4506.
- 154- Waldron TJ, Quatromoni JG, Karakasheva TA, Singhal S, Rustgi AK. Myeloid derived suppressor cells: Targets for therapy. *Oncoimmunology.* 2013; 2:e24117.
- 155- Youn JI, Gabrilovich DI. The biology of myeloid derived suppressor cells: The blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol.* 2010; 40:2969-2975.
- 156- Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2009; 58:49-59.
- 157- Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA, Middleton GW. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60:1419-1430.
- 158- Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:721s-726s.
- 159- Zhang B, Wang Z, Wu L, Zhang M, Li W, Ding J, Zhu J, Wei H, Zhao K. Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patient with colorectal carcinoma. *PLoS One.* 2013; 8:e57114.
- 160- Landsteiner K. The nature and specificity of anti-bodies. En: *The specificity of serological reactions.* Harvard University Press. Cambridge, MA, USA. 1945; 127-155.
- 161- Wilson GS, Miles AA. The natural antibodies: their nature, origin and behavior. En: *Principles of bacteriology and immunity.* Edward Arnold. Londres, Reino Unido. 1964; 1315-1344.

- 162- Boyden SV. Natural antibodies and the immune response. *Adv. Immunol.* 1965; 5:1-28.
- 163- Michael JG. Natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1969; 48: 43-62.
- 164- Witz IP, Aqassy-Cahalon L. Do naturally occurring antibodies play a role in the progression and proliferation of tumor cells? *Int Rev Immunol.* 1988; 3:133-145.
- 165- Avrameas S. Natural autoantibodies: from "horror autotoxicus" to "gnostic seauton". *Immunol Today.* 1991; 154:154-158.
- 166- Burnet FM. The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press. Londres, Reino Unido. 1959.
- 167- Bandeira A, Coutinho A, Martinez C, Pereira P. The origin of "natural antibodies" and the internal activity in the immune system. *Int Rev Immunol.* 1988; 3:47-58.
- 168- Bohn J, Josimovic-Alasevic O, Settmacher U, Kiessig ST, Lukowsky A, Volk HD, Diamantstein T, Von Baehr R, Jahn S. Human monoclonal IgM antibodies from foetal B-cell hybridomas directed against a surface antigen on human tumour cells. *Res Immunol.* 1992; 143:879-891.
- 169- Adib M, Ragimbeau J, Avrameas S, Ternynck T. IgG autoantibody activity in normal mouse serum is controlled by IgM. *J Immunol.* 1990; 145:3807-3813.
- 170- van Rooijen N. Are bacterial endotoxins involved in autoimmunity by CD5+(Ly-1+) B cells? *Immunol Today.* 1989; 10:334-336.
- 171- Aksentijevich I, Sachs DH, Sykes M. Natural antibodies against bone marrow cells of a concordant xenogenic species. *J Immunol.* 1991; 147:79-85.
- 172- Chen ZJ, Wheeler J, Notkins AL. Antigen-binding B cells and polyreactive antibodies. *Eur J Immunol.* 1995; 25:579-586.
- 173- Girard D, Senécal JL. Anti-microfilament IgG antibodies in normal adults and in patients with autoimmune diseases: immunofluorescence and immunoblotting analysis of 201 subjects reveals polyreactivity with microfilament-associated proteins. *Clin Immunol Immunopath.* 1995; 74:193-201.

Bibliografía

- 174- Klinman DM, Shirai A, Conover J, Steinberg AD. Cross reactivity of IgG anti-DNA-secreting B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol.* 1994; 24:53-58.
- 175- Klinman DM. Cross-reactivity of IgG and IgM secreting B cells in normal and autoimmune mice. *J Autoimmun.* 1994; 7:1-11.
- 176- Ternynck T, Avrameas S. Murine natural monoclonal autoantibodies: a study of their polyspecificities and their affinities. *Immunol Rev.* 1986; 94: 99-112.
- 177- Baccala R, Vo Quang T, Gilbert M, Ternynck T, Avrameas S. Two murine natural polyreactive autoantibodies are encoded by nonmutated germline genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 4624- 4628.
- 178- Ichiyoshi Y, Zhou M, Casali P. A human anti-insulin IgG autoantibody apparently arises through clonal selection from an insulin-specific “germ-line” natural antibody template. *J Immunol.* 1995; 154: 226-238.
- 179- Umeda M, Diego I, Marcus DM. The occurrence of anti-3-fucosyllactosamine antibodies and their cross-reactive idiotopes in preimmune and immune mouse sera. *J Immunol.* 1986; 137:3264-3269.
- 180- Casali P, Notkins AL. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today.* 1985; 10: 363-368.
- 181- McKenzie LE, Youinou PY, Hicks R, Yuksel B, Mageed RA, Lydyard PM. Auto- and polyreactivity of IgM from CD5+ and CD5- cord blood B cells. *Scand J Immunol.* 1991; 33: 329-335.
- 182- Kasaian MT, Ikematsu H, Casali P. Identification and analysis of a novel human surface CD5-B lymphocyte subset producing natural antibodies. *J Immunol.* 1992; 148: 2690-2702.
- 183- Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13:118-132.
- 184- Dighiero G, Lymberi P, Mazie J-C, Rouyre S, Butler-Browne GS, Whalen RG, Avrameas S. Murine hybridoma secreting natural monoclonal antibodies reacting with self-antigens. *J Immunol.* 1993; 131: 2267-2272.
- 185- Guilbert B, Mahana W, Gilbert M, Mazié J-C, Avrameas S. Presence of natural autoantibodies in hyperimmunized mice. *Immunology.* 1995; 56:401-408.

- 186- Naparstek Y, Schwartz JA Manser T, Wysocki LJ, Breitman L, Stollar B, Gefter M, Schwartz RS. A single germ line VH gene segment of normal A/J mice encodes autoantibodies characteristic of systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 1986; 164: 614-626.
- 187- Vakil M, Sauter H, Paige C, Kearney JF. In vivo suppression of perinatal multispecific B cells results in a distortion of the adult B cell-repertoire. *Eur J Immunol.* 1986; 16:1159-1165.
- 188- Mahana W, Guilbert B, Avrameas S. Suppression of anti-DNA antibody production in MRL mice treatment with anti-idiotypic antibodies. *Clin Exp Immunol.* 1987; 70:538-545.
- 189- Sundblad A, Hauser S, Holmberg D, Cazenave P-A, Coutinho A. Suppression of antibody responses to the acetylcholine receptor by natural antibodies. *Eur J Immunol.* 1989; 19:1425-1430.
- 190- De Maeyer-Guignard J, De Maeyer E. Natural antibodies to interferon-alpha and interferon-beta are a common feature of inbred mouse strains. *J Immunol.* 1986; 136:1708-1711.
- 191- Bendtzen K, Svenson M, Jonsson V. Autoantibodies to cytokines friends or foes? *Immunol Today.* 1990; 11:167-169.
- 192- Turano A, Balsari A, Viani E, Landolfo S, Zanoni L, Gargiulo F, Caruso A. Natural human antibodies to γ interferon interfere with the immuno-modulating activity of the lymphokine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:4447-4451.
- 193- Tiberio L, Caruso A, Pozzi A, Rivoltini L, Morelli D, Monti E, Balsari A. The detection and biological activity of human antibodies to IL-2 in normal donors. *Scand J Immunol.* 1993; 38:472-476.
- 194- Matsiota P, Saron MF, Guillon JC, Avrameas S. Mouse natural autoantibodies can interfere with murine alpha and beta interferons. *J Virol.* 1989; 63:955-956.
- 195- Hansen MB, Svenson M, Abell K, Yasukawa K, Diamant M, Bendtzen K. Influence of interleukin-6 (IL-6) autoantibodies on IL-6 binding to cellular receptors. *Eur J Immunol.* 1995; 25:348-354.
- 196- Glotz D, Zanetti M. A natural neonatal hybridoma autoantibody to the T200 antigen. *J Immunol.* 1989; 142:439-443.

Bibliografía

- 197- Wolf-Levin R, Azuma T, Aoki K, Yagami Y, Okada. Specific IgG autoantibodies are potent inhibitors of autoreactive T-cell response to phytohemagglutinin-activated T cells. *J. Immunol.* 1993; 151: 5864-5877.
- 198- Kiss K, Uher F, Gergely J. A natural IgM antibody does inhibit polyclonal and antigen-specific IgM but not IgG B-cell responses. *Immunol Lett.* 1994; 39:235-241.
- 199- Andersson A, Forsgren S, Söderström A, Holmberg D. Monoclonal, natural antibodies prevent development of diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *J Autoimmun.* 1991; 4:733-742.
- 200- Dietrich G, Kaveri SV, Kazatchkine MD. Modulation of autoimmunity by intravenous immunoglobulin through interactions with the function of the immune/idiotypic network. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992; 62:S73-S81.
- 201- Hentati B, Sato MN, Payelle-Brogard B, Avrameas S, Ternynck T. Beneficial effect of polyclonal immunoglobulins from Malaria-infected BALB/c mice on the lupus-like syndrome of (NZBxNZW)F1 mice. *Eur J Immunol.* 1994; 24:8-15.
- 202- Miller DJ, Rodríguez M. A monoclonal autoantibody that promotes central nervous system remyelination in a model of multiple sclerosis is a natural autoantibody encoded by germline immunoglobulin genes. *J Immunol.* 1995; 154:2460-2469.
- 203- Foster MH, Cizman B, Madaio MP. Nephritogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus: immunochemical properties, mechanisms of immune deposition, and genetic origins. *Lab Invest.* 1993; 69:494-507.
- 204- Ono M, Yamamoto T, Kyogoku M, Nose M. Sequence analysis of the germ-line VH gene corresponding to a nephritogenic antibody in MRL/1pr lupus mice. *Clin Exp Immunol.* 1995; 100:284-290.
- 205- Saadi S, Platt JL. Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement. *J Exp Med.* 1995; 181:21-31.
- 206- Koren E, Koscec M, Wolfson-Reichlin M, Ebling FM, Tsao B, Hahn BV, Reichlin M. Murine and human antibodies to native DNA that cross-react with the A and D SnRNP polypeptides cause direct injury of cultured kidney cells. *J Immunol.* 1995; 154:4857-4864.

- 207- Platt JL, Vercellotti GM, Dalmaso AP, Matas AJ, Bolman RM, Najarian JS, Bach FH. Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. *Immunol Today*. 1990; 11:450-456.
- 208- Süsal C, Guo Z, Terness P, Opelz G. Role of anti-IgG autoantibodies in kidney transplantation. *Immunol Lett*. 1990; 26:121-126.
- 209- Galili U, Clark MR, Shohet SB. Excessive binding of natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G to sickle erythrocytes may contribute to extravascular cell destruction. *J Clin Invest*. 1986; 77:27-33.
- 210- Hintner H, Romalii N, Stanzl U, Grubauer G, Fritsch P, Lawley TJ. Phagocytosis of keratin filament aggregates following opsonization with IgG-anti-keratin filament autoantibodies. *J Invest Dermatol*. 1987; 88:176-182.
- 211- Lutz HU, Nater M, Stammler P. Naturally occurring anti-band 3 antibodies have a unique affinity for C3. *Immunology*. 1993; 80:191-196.
- 212- Witz IP, Yaakubowicz M, Gelemter I, Hochberg Y, Anavi R, Ran M. Studies on the level of natural antibodies reactive with various tumor cells during urethane carcinogenesis in BALB/c mice. *Immunobiology*. 1984; 166:131-145.
- 213- Cahalon L, Korem S, Gonen B, Puri J, Smorodinsky NI, Witz IP. Autoantibody-mediated regulation of tumor growth. *Ann NY Acad Sci*. 1992; 651:393-408.
- 214- Tighe H, Chen PP, Tucker R, Kipps TJ, Roudier J, Jirik FR, Carson DA. Function of B cells expressing a human immunoglobulin M rheumatoid factor autoantibody in transgenic mice. *J Exp Med*. 1993; 177:109-118.
- 215- Kanost D, McCluskey J. Anergic B cells constitutively present self-antigen: enhanced immunoglobulin receptor-mediated presentation of antigenic determinants by B cells is hierarchical. *Eur J Immunol*. 1994; 24:1186-1193.
- 216- Thornton BP, Vetvicka V, Ross GD. Natural antibody and complement-mediated antigen processing and presentation by B lymphocytes. *J Immunol*. 1994; 152:1727-1737.
- 217- Navin TR, Krug EC, Pearson RD. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infect Immun*. 1989; 57:1343-1346.

Bibliografía

- 218- Michel C, Gonzalez R, Avrameas S. Opsonizing properties of natural antibodies of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Biol. 1990; 37:617-622.
- 219- Baughn RE, Wicher V, Wicher K. Production of rheumatoid factor in adoptively immune guinea-pigs after challenge with *Treponema pallidum*. Immunology. 1992; 76:548-552.
- 220- Gonzalez R, Matsiota P, Torchy C, de Kinkelin P, Avrameas S. Natural anti-TNP antibodies from rainbow trout interfere with viral infection in vitro. Res Immunol. 1989; 140:675-684.
- 221- Udeze FA, Kadis S. Inhibition of bactericidal activity of anticapsular antibody by nonspecific antibodies reactive with surface-exposed antigenic determinants on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect Immun. 1992; 60:3852-3860.
- 222- Schlesinger JS, Horwitz MA. A role for natural antibody in the pathogenesis of leprosy: antibody in nonimmune serum mediates C3 fixation to the *Mycobacterium leprae* surface and hence phagocytosis by human mononuclear phagocytes. Infect Immun. 1994; 62:280-289.
- 223- Paul S, Volle DJ, Mei S. Affinity chromatography of catalytic autoantibody to vasoactive intestinal peptide. J Immunol. 1990; 145:1196-1199.
- 224- Gololobov GV, Chernova EA, Schourov DV, Smironov IV, Kudelina IA, Gabibov AG. Cleavage of supercoiled plasmid DNA by autoantibody Fab fragment: application of the flow linear dichroism technique. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92:254-257.
- 225- Li L, Paul S, Tyutyulkova S, Kazatchkine MD, Kaveri S. Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies. J Immunol. 1995; 154:3328-3332.
- 226- Aoki T, Boyse EA, Old LJ. Occurrence of natural antibody to the G (gross) leukemia antigen in mice. Cancer Res. 1966; 26:1416-1419.
- 227- Vollmers HP, Brändlein S. The "early birds": natural IgM antibodies and immune surveillance. Histol Histopathol. 2005; 20:927-937.
- 228- Vollmers HP, Brändlein S. Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. Adv Drug Deliv Rev. 2006; 58:755-765.

- 229- von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten AA, Kenemans P, Snijdwint FG, Kok A, Van Kamp GJ, Paul MA, Van Diest PJ, Meijer S, Hilgers J. Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J Clin Oncol.* 2000; 18:574-583.
- 230- Greenberg AH, Chow DA, Wolosin LB. Natural antibodies: Origin, genetics, specificity and role in host resistance to tumours. *Immunol Allergy Clin N Amer.* 1983; 3:389-420.
- 231- Brown GW, Lesiuk TP, Chow DA. Phenotypic alterations in tumors that developed from threshold subcutaneous inocula. *J Immunol.* 1986; 136:3116-3123.
- 232- Tough DF, Chow DA. Tumorigenicity of murine lymphomas selected through fluorescence-detected natural antibody binding. *Cancer Res.* 1988; 48:270-275.
- 233- Chow DA, Bennet RD. Low natural antibody and low in vivo tumor resistance, in Xid-bearing B-cell deficient mice. *J Immunol.* 1989; 142:3702-3706.
- 234- Martin SE, Martin WS. X-chromosome-linked defect of CBA/HN mice in production of tumor reactive naturally occurring IgM antibodies. *J Immunol.* 1975; 115:502-507.
- 235- Kinlen LJ, Webster ADB, Bird AG, Haile R, Peto J, Soothill JF, Thomson RA. Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinemia. *Lancet.* 1985; 1:263-267.
- 236- Chow DA, Green MI, Greenberg AH. Macrophage-dependent NK-independent "natural" surveillance of tumors in syngenic mice. *Int J Cancer.* 1979; 23:788-797.
- 237- Shin HS. Antibody-mediated tumor suppression: some recent developments and possible role in natural resistance to tumours. *Immunol Allergy Clin N Amer.* 1983; 3:457-464.
- 238- Johnson RJ, Kaizer H, Massey AG, Shin HS. Role of endogenous complement in monoclonal IgM antibody-dependent leukemia suppression in vivo: participation of C3b. *J Immunol.* 1985; 134:3497-3503.

Bibliografía

- 239- Manson LA. Does antibody-dependent epitope masking permit progressive tumour growth in the face of cell-mediated cytotoxicity? *Immunol Today*. 1991; 12:352-355.
- 240- George AJT, Stevenson FK. Humoral effector mechanisms in the immunity to cancer. *Immunol Today*. 1990; 11:348-349.
- 241- Stevenson F, Gordon J. Immunization with idiotypic immunoglobulin protects against the development of B lymphocytic leukemia, but emerging tumor cells can evade antibody attack by modulation. *J Immunol*. 1983; 130:970-973.
- 242- Drebin JA, Link VC, Greene MI. Monoclonal antibodies specific for the neu oncogene product directly mediates anti-tumor effects in vivo. *Oncogene*. 1988; 2:387-394.
- 243- Krammer PH, Trauth BC, Vier V, Dhein J, Falk W, Garcin G, Klas C, Müller W, Oehm A, Peters A, Matzku S, Möller P, Debatin KM. Apoptosis in monoclonal antibody-induced tumor regression. En: Melchers F et al (Ed). *Progress in Immunology VII*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Alemania. 1989; 1104-1109.
- 244- Sell S. Cancer-associated carbohydrates identified by monoclonal antibodies. *Hum Pathol*. 1990; 21:1003-1019.
- 245- Lloyd KO. Molecular characteristics of tumor antigens. *Immunol Allergy Clin N Amer*. 1990; 10:765-779.
- 246- Sugiyama K, Kawai T, Nagata N, Suzuki M. Tumor-associated carbohydrate antigens in primary pulmonary adenocarcinomas and their metastasis. *Hum Pathol*. 1992; 23:900-904.
- 247- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. B-cell activation and antibody production. En: *Cellular and molecular immunology*. Elsevier-Saunders. Philadelphia, USA. 2014; 239-264.
- 248- Kantor AB. The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells). *Immunol Today*. 1991; 12:389-391.
- 249- Harada R, Ohmori K, Hirohashi S, Kyoizumi S, Akiyama M, Kannagi R. High idiotypic connectivity of the VH7183-encoded antibodies directed to a murine

- embryonic carbohydrate antigen, Lewis Y, as ascertained by syngenic anti-idiotypic monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1990; 145:224-232.
- 250- Chen Y, Park YB, Patel E, Silverman GJ. IgM antibodies to apoptosis-associated determinants recruit C1q and enhance dendritic cell phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol.* 2009; 182:6031-6043.
- 251- Ogden CA, Kowalewski R, Peng Y, Montenegro V, Elkon KB. IgM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity.* 2005; 38:259-264.
- 252- Quartier P, Potter PK, Ehrenstein MR, Walport MJ, Botto M. Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *Eur J Immunol.* 2005; 35:252-260.
- 253- Klimovich VB. IgM and its receptors: structural and functional aspects. *Biochemistry (Mosc).* 2011; 76:534-549.
- 254- Kurisu M, Yamakazi M, Mizuno D. Induction of macrophage-mediated tumor lysis by the lectin Wheat Germ Agglutinin. *Cancer Res.* 1980; 40:3798-3803.
- 255- Okhuma Y, Komano H, Natori S. Comparison of binding proteins on the surface of murine tumor cells for two lectins active in the lectin-dependent macrophage-mediated cytotoxic reaction. *Cancer Res.* 1985; 45:4397-4400.
- 256- Subiza JL, Gil J, Rodríguez R, Ruiz de Morales JG, Viñuela JE, de la Concha EG. Tumor cytostasis mediated by a monoclonal IgM antibody promoting adhesion between macrophages and tumor cells. Evidence for a lectin-like behavior. *J Immunol.* 1992; 148:2636-2642.
- 257- David K, Ollert MW, Vollmert C, Heiligtag S, Eickhoff B, Erttmann R, Bredehorst R, Vogel CW. Human natural immunoglobulin M antibodies induce apoptosis of human neuroblastoma cells by binding to a Mr 260.000 antigen. *Cancer Res.* 1999; 59:3768-3775.
- 258- Vollmers HP, Brändlein S. Death by stress: natural IgM-induced apoptosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2005; 27:185-191.
- 259- Vollmers HP, Brändlein S. Natural antibodies and cancer. *N Biotechnol.* 2009; 25:294-298.

Bibliografía

- 260- Vollmers HP, Brändlein S. Natural human immunoglobulins in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 2009; 1:241-248.
- 261- Pohle T, Brändlein S, Ruoff N, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP. Lipoptosis: tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation. *Cancer Res*. 2004; 64:3900-3906.
- 262- Brändlein S, Rauschert N, Rasche L, Dreykluft A, Hensel F, Conzelmann E, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP. The human IgM antibody SAM-6 induces tumor-specific apoptosis with oxidized low-density lipoprotein. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6:326-333.
- 263- Ehrlich P. Experimentelle karzinom studium am maüsen. *Arb Inst Exp Ther*. 1906; 1:77-92.
- 264- Lala PK, Santer V. Spontaneous fusion between Ehrlich ascites tumor cells and host cells in vivo: kinetics of hybridization, and concurrent changes in the histocompatibility profile of the tumor after propagation in different host strains. *Eur J Cancer*. 1980; 16:487-510.
- 265- Lindemann J, Klein PK. Immunological aspects of viral oncolysis. *Cancer Res*. 1967; 9:1-84.
- 266- Chen L, Watkins JF. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells. *Nature*. 1970; 225:734-735.
- 267- Carry PJ, Prescott DM, Ogilvie GK. Resistance to Ehrlich ascites tumor in a strain of dystrophic mice. *Cancer Res*. 1979; 39:2139-2140.
- 268- Thunold S. Globulin coating in vivo of Ehrlich ascites carcinoma cells. *Transplantation*. 1968; 6:716-727.
- 269- Sethi KK, Brandis H. Protection of mice from malignant tumor implants by enucleated tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 1974; 53:1175-1176.
- 270- Marusic M, Perkins EH. Genetic constraints in the induction of the immune response to Ehrlich ascites tumor in mice. *Cell Immunol*. 1981; 62:93-100.
- 271- Lindemann J. Immunity to transplantable tumors following viral oncolysis. *J Immunol*. 1963; 92:912-919.

- 272- Subiza JL, Coll J, Alvarez R, Valdivieso M, De la Concha EG. IgM response and resistance to ascites tumor growth. *Cancer Immunol Immunother.* 1987; 25:87-92.
- 273- Lala PK, Santer V, Libenson H, Parhar RS. Changes in the host natural killer-cell population in mice during tumor development. Kinetics and in vivo significance. *Cell Immunol.* 1985; 93:250-264.
- 274- Matsubara S, Suzuki M, Nakamura M, Edo K, Ishida N. Isolation of an inhibitor of type II interferon induction from tumor ascitic fluids. *Cancer Res.* 1980; 40:2534-2538.
- 275- Hrsak I, Marotti T. Mechanism of the immunosuppressive effect of Ehrlich ascitic tumor. *Eur J Cancer.* 1975; 11:181-185.
- 276- Motori H, Kamo I, Kikuchi M, Ono Y, Ishida N. Purification of an immunosuppressive principle derived from Ehrlich carcinoma cells. *Gan.* 1974; 65:269-271.
- 277- McCarthy RE. Modification of the immune response of mice to skin homografts and heterografts by Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res.* 1964; 24:915-919.
- 278- Rittenhouse HG, Rittenhouse JW, Takemoto L. Characterization of the cell coat of Ehrlich ascites tumor cells. *Biochemistry.* 1978; 17:829-837.
- 279- Qiujie X, Yan B. Experimental research on the surface antigen of Ehrlich ascites tumour cells. *Acta Zoologica Sinica.* 1979; 25:220-225.
- 280- Saha S, Ghosh A. Effect of plasma gangliosides on the growth of Ehrlich ascites tumor. *Int J Cancer.* 1990; 46:691-694.
- 281- Kishida E, Goldstein IJ. Characterization of gangliosides from Ehrlich ascites tumour cells and their variants. *Glycoconj J.* 1996; 13:127-134.
- 282- Saha S, Chattopadhyay U. Changes in plasma gangliosides in relation to tumor growth and their tumor-enhancing effect. *Int J Cancer.* 1988; 41:432-435.
- 283- Nachbar MS, Oppenheim JD, Aull F. Interactions of lectins with plasma membrane glycoproteins of the Ehrlich ascites carcinoma cell. *Biochem Biophys Acta.* 1976; 419:512-529.

Bibliografía

- 284- Sakakibara F, Kawauchi H, Takayanagi G. Blood group B-specific lectin of *Plecoglossus altivelis* (Ayu fish) eggs. *Biochem Biophys Acta*. 1985; 841:103-111.
- 285- Eckhardt AE, Goldstein IJ. Occurrence of alpha-D-galactosyl-containing glycoproteins on Ehrlich tumor cell membranes. *Biochemistry*. 1983; 22:5280-5289.
- 286- Eckhardt AE, Goldstein IJ. Isolation and characterization of a family of alpha-D-galactosyl-containing glycopeptides from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochemistry*. 1983; 22:5290-5297.
- 287- Alvarez Doforno R. Supresión del crecimiento del tumor de Ehrlich mediada por un anticuerpo monoclonal IgM con participación del macrófago como célula efectora. Tesis, Universidad Complutense de Madrid, 1989.
- 288- Gross DJ, Simon E, Szwarc-Bilotynski L, Marggalieth E, Gross J. An immunochemical assay for natural IgM antibodies with affinity to galactose and whose titers are reduced in the sera of cancer patients. *Eur J Clin Oncol*. 1988; 24:363-367.
- 289- Crocker PR, Feizi T. Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions. *Curr Opin Struct Biol*. 1996; 6:679-691.
- 290- Feizi T. Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity. *Immunol Rev*. 2000; 173:79-88.
- 291- Gabius HJ, Siebert HC, André S, Jiménez-Barbero J, Rüdiger H. Chemical biology of the sugar code. *ChemBiochem*. 2004; 5:740-764.
- 292- Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*. 2001; 291:2364-2369.
- 293- Karlsson KA. Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Mol Microbiol*. 1998; 29:1-11.
- 294- Taniguchi N, Kizuka Y. Glycans and cancer: Role of N-Glycans in Cancer Biomarkers, Progression and Metastasis, and Therapeutics. En: Drake RR, Ball LE (Ed.). *Glycosilation and cancer. Advances in cancer research* (vol 126). Elsevier. San Diego, CA, USA. 2015; 12-39.
- 295- Varki A, Freeze HH, Vacquier VD. Glycans in Development and Systemic Physiology. En: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi

- CR, Hart GW, Etzler ME (Ed). Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA. 2009; Capítulo 38.
- 296- Varki A, Kannagi R, Toole BP. Glycosylation Changes in Cancer. En: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME (Ed). Essentials of Glycobiology. 2nd edition. . Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA. 2009; Capítulo 44.
- 297- Hakomori S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res.* 1989; 52:257-331.
- 298- Hakomori SI, Cummings RD. Glycosylation effects on cancer development. *Glycoconj J.* 2012; 29:565-566.
- 299- Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell.* 2006; 126:855-867.
- 300- Brockhausen I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep.* 2006; 7:599-604.
- 301- Do SI, Kim K, Kim DH, Chae SW, Park YL, Park CH, Sohn JH. Associations between the Expression of Mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) and Clinicopathologic Parameters of Human Breast Ductal Carcinomas. *J Breast Cancer.* 2013; 16:152-158.
- 302- Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9:874-885.
- 303- Cao Y, Stosiek P, Springer GF, Karsten U. Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochem Cell Biol.* 1996; 106:197-207.
- 304- Springer GF. Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J Mol Med (Berl).* 1997; 75:594-602.
- 305- Ju T, Wang Y, Aryal RP, Lehoux SD, Ding X, Kudelka MR, Cutler C, Zeng J, Wang J, Sun X, Heimbürg-Molinaro J, Smith DF, Cummings RD. Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers. *Proteomics Clin Appl.* 2013; 7:618-631.

Bibliografía

- 306- Terasawa K, Furumoto H, Kamada M, Aono T. Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in the neoplastic transformation of uterine cervical epithelial cells. *Cancer Res.* 1996; 56:2229-2232.
- 307- Kjeldsen T, Clausen H, Hirohashi S, Ogawa T, Iijima H, Hakomori S. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl-2----6 alpha-N-acetylgalactosaminyl (sialosyl-Tn) epitope. *Cancer Res.* 1988; 48:2214-2220.
- 308- Tian Y, Zhang H. Characterization of disease-associated N-linked glycoproteins. *Proteomics.* 2013; 13:504-511.
- 309- Drake RR, Schwegler EE, Malik G, Diaz J, Block T, Mehta A, Semmes OJ. Lectin capture strategies combined with mass spectrometry for the discovery of serum glycoprotein biomarkers. *Mol Cell Proteomics.* 2006; 5:1957-1967.
- 310- Ishihara T, Fukuda I, Morita A, Takinami Y, Okamoto H, Nishimura S, Numata Y. Development of quantitative plasma N-glycoproteomics using label-free 2-DLC-MALDI MS and its applicability for biomarker discovery in hepatocellular carcinoma. *J Proteomics.* 2011; 74:2159-2168.
- 311- Zeng X, Hood BL, Sun M, Conrads TP, Day RS, Weissfeld JL, Siegfried JM, Bigbee WL. Lung cancer serum biomarker discovery using glycoprotein capture and liquid chromatography mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2010; 9:6440-6449.
- 312- Tian Y, Yao Z, Roden RB, Zhang H. Identification of glycoproteins associated with different histological subtypes of ovarian tumors using quantitative glycoproteomics. *Proteomics.* 2011; 11:4677-4687.
- 313- Chen R, Tan Y, Wang M, Wang F, Yao Z, Dong L, Ye M, Wang H, Zou H. Development of glycoprotein capture-based label-free method for the high-throughput screening of differential glycoproteins in hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Proteomics.* 2011; 10:M110.006445.
- 314- Zhao Y, Sato Y, Isaji T, Fukuda T, Matsumoto A, Miyoshi E, Gu J, Taniguchi N. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *FEBS J.* 2008; 275:1939-1948.

- 315- Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem.* 2001; 276:27371-27375.
- 316- Ebeling FG, Stieber P, Untch M, Nagel D, Konecny GE, Schmitt UM, Fateh-Moghadam A, Seidel D. Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer. *Br J Cancer.* 2002; 86:1217-1222.
- 317- Safi F, Schlosser W, Kolb G, Beger HG. Diagnostic value of CA 19-9 in patients with pancreatic cancer and nonspecific gastrointestinal symptoms. *J Gastrointest Surg.* 1997; 1:106-112.
- 318- Nustad K, Bast RC Jr, Brien TJ, Nilsson O, Seguin P, Suresh MR, Saga T, Nozawa S, Børmer OP, de Bruijn HW, Nap M, Vitali A, Gadnell M, Clark J, Shigemasa K, Karlsson B, Kreutz FT, Jette D, Sakahara H, Endo K, Paus E, Warren D, Hammarström S, Kenemans P, Hilgers J. Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen: first report from the ISOBM TD-1 workshop. *International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. Tumour Biol.* 1996; 17:196-219.
- 319- Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR Jr, Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 1983; 309:883-887.
- 320- Kumpulainen EJ, Keskikuru RJ, Johansson RT. Serum tumor marker CA 15.3 and stage are the two most powerful predictors of survival in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2002; 76:95-102.
- 321- Uehara M, Kinoshita T, Hojo T, Akashi-Tanaka S, Iwamoto E, Fukutomi T. Long-term prognostic study of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15-3 (CA 15-3) in breast cancer. *Int J Clin Oncol.* 2008; 13:447-451.
- 322- Lauro S, Trasatti L, Bordin F, Lanzetta G, Bria E, Gelibter A, Reale MG, Vecchione A. Comparison of CEA, MCA, CA 15-3 and CA 27-29 in follow-up and monitoring therapeutic response in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 1999; 19:3511-3515.
- 323- Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; ASCO. ASCO 2006 update of

- recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24:5313-5327.
- 324- Reiter W, Stieber P, Reuter C, Nagel D, Cramer C, Pahl H, Fateh-Moghadam A. Prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA 19-9 and CA 72-4 in gastric carcinoma. *Anticancer Res.* 1997; 17:2903-2906.
- 325- Pinho S, Marcos NT, Ferreira B, Carvalho AS, Oliveira MJ, Santos-Silva F, Harduin-Lepers A, Reis CA. Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2007; 249:157-170.
- 326- Brockhausen I, Yang J, Dickinson N, Ogata S, Itzkowitz SH. Enzymatic basis for sialyl-Tn expression in human colon cancer cells. *Glycoconj J.* 1998; 15:595-603.
- 327- Ychou M, Duffour J, Kramar A, Gourgou S, Grenier J. Clinical significance and prognostic value of CA72-4 compared with CEA and CA 19-9 in patients with gastric cancer. *Dis Markers.* 2000; 16:105-110.
- 328- Duraker N, Celik AN. The prognostic significance of preoperative serum CA 19-9 in patients with resectable gastric carcinoma: comparison with CEA. *J Surg Oncol.* 2001; 76:266-271.
- 329- Lee KJ, Yi SW, Chung MJ, Park SW, Song SY, Chung JB, Park JY. Serum CA 19-9 and CEA levels as a prognostic factor in pancreatic adenocarcinoma. *Yonsei Med J.* 2013; 54:643-649.
- 330- Grunnet M, Sorensen JB. Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer.* 2012; 76:138-143.
- 331- Heimbürg-Molinari J, Lum M, Vijay G, Jain M, Almogren A, Rittenhouse-Olson K. Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. *Vaccine.* 2011; 29:8802-8826.
- 332- Lo-Man R, Vichier-Guerre S, Perraut R, Dériaud E, Huteau V, BenMohamed L, Diop OM, Livingston PO, Bay S, Leclerc C. A fully synthetic therapeutic vaccine candidate targeting carcinoma-associated Tn carbohydrate antigen induces tumor-specific antibodies in nonhuman primates. *Cancer Res.* 2004; 64:4987-4994.

- 333- Keding SJ, Danishefsky SJ. Prospects for total synthesis: a vision for a totally synthetic vaccine targeting epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:11937-11942.
- 334- Sabbatini PJ, Kudryashov V, Ragupathi G, Danishefsky SJ, Livingston PO, Bornmann W, Spassova M, Zatorski A, Spriggs D, Aghajanian C, Soignet S, Peyton M, O'Flaherty C, Curtin J, Lloyd KO. Immunization of ovarian cancer patients with a synthetic Lewis(y)-protein conjugate vaccine: a phase 1 trial. *Int J Cancer.* 2000; 87:79-85.
- 335- Gil J, Alvarez R, Viñuelas JE, Ruiz de Morales JG, Bustos A, De la Concha EG, Subiza JL. Inhibition of in vivo tumor growth by a monoclonal IgM antibody recognizing tumor cell surface carbohydrates. *Cancer Res.* 1990; 40:7301-7306.
- 336- Subiza JL. Respuesta inmune y control del crecimiento del tumor de Ehrlich. Tesis, Universidad Autónoma de Madrid, 1985.
- 337- Lesuffleur T, Zweibaum A, Real FX. Mucins in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues. *CRC Crit Rev Oncol.* 1994; 17:153-180.
- 338- Itzkowitz SH, Dahiya R, Byrd JC, Kim YS. Blood group antigen synthesis and degradation in normal and cancerous colonic tissues. *Gastroenterology.* 1990; 99:431-442.
- 339- Feizi T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature (Lond).* 1985; 314:53-57.
- 340- Medina M, Vélez D, Asenjo JA, Egea G, Real FX, Gil J, Subiza JL. Human colon adenocarcinomas express a MUC1-associated novel carbohydrate epitope on core mucin glycans defined by a monoclonal antibody (A10) raised against murine Ehrlich tumor cells. *Cancer Res.* 1999; 59:1061-1070.
- 341- Itzkowitz S. Carbohydrate changes in colon carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 1992; 100 (Suppl 27):173-180.
- 342- Hanski C, Drechsler K, Hanisch FG, Sheehan J, Manske M, Ogorek D, Klusmann E, Hanski ML, Blank M, Xing PX, McKenzie IFC, Devine PL, Riecken EO. Altered glycosilation of the MUC-1 protein core contributes to the colon

Bibliografía

- carcinoma-associated increase of mucin-bound sialyl-Lewisx expression. *Cancer Res.* 1993; 53:4082-4088.
- 343- Strous GJ, Dekker J. Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1992; 27: 57-92.
- 344- Forstner JF, Neutra MR. Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion, and function. En: L Johnson (Ed). *Physiology of the Intestinal Tract*, Ed 2. Raven Press. Nueva York, NY, USA. 1987; 975-1009.
- 345- Codington JF, Haavik S. Epiglycanin: a carcinoma-specific mucin-type glycoprotein of the mouse TA3 tumour. *Glycobiology.* 1992; 2:173-180.
- 346- Hounsell EF, Lawson AM, Feeney J, Gool HC, Pickering NJ, Stoll MS; Lui SC, Feizi T. Structural analysis of the O-glycosidically linked core region oligosacchrides of human meconium glycoproteins which express oncofoetal antigens. *Eur J Biochem.* 1985; 148:361-377.
- 347- Tough DF, Feng X, Chow DA. p21-ras independent down regulation of ras induced increase in natural antibody binding during tumor progression. *Nat Immun.* 1995; 14:20-34.
- 348- Brändlein S, Pohle T, Ruoff N, Wozniak E, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP. Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res.* 2003; 63:7995-8005.
- 349- Bovin NV. Natural antibodies to glycans. *Biochemistry (Mosc).* 2013; 78:786-797.
- 350- Foley GE, Drolet BP. Sustained propagation of sarcoma of 180 in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956; 92:347-352.
- 351- Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* 1975; 35:218-224.
- 352- Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG. K562: a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer.* 1979; 23:143-147.
- 353- Epstein MA, Achong BG, Barr YM, Zajac B, Henle G, Henle W. Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Raji). *J Natl Cancer Inst.* 1966; 37:547-559.

- 354- Semple TU, Quinn LA, Woods LK, Moore GE. Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model. *Cancer Res.* 1978; 38:1345-1355.
- 355- AF Gazdar, JD Minna. NCI-Navy Medical Oncology Branch Cell Line Supplement. *J Cell Biochem.* 1996; Suppl 24.
- 356- Quinn LA, Moore GE, Morgan RT, Woods LK. Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions. *Cancer Res.* 1979; 39:4914-4924.
- 357- von Kleist S, Chany E, Burtin P, King M, Fogh J. Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst.* 1975; 55:555-560.
- 358- Laine RA, Esselman WJ, Sweeley CC. Gas-liquid chromatography of carbohydrates. *Methods in Enzymology.* 1972; 28: 159-167.
- 359- Rojas-Escudero E, Alarcón-Jiménez AL, Elizalde-Galván P, Rojo-Callejas F. Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. *J Chromatogr A.* 2004; 1027:117-120.
- 360- Gross J, Simon E, Szwarc-Bilotynski L, Durst A, Pfefferman R, Polishuk Z. Complement-dependent lysis of Ehrlich ascites tumor cells by human serum (ascitolysin) is lowered in cancer patients and raised in pregnant women. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1986; 22:13-19.
- 361- Kurtenkov O, Miljukhina L, Smorodin J, Klaamas K, Bovin N, Ellamaa M, Chuzmarov V. Natural IgM and IgG antibodies to Thomsen-Friedenreich (T) antigen in serum of patients with gastric cancer and blood donors--relation to Lewis (a,b) histo-blood group phenotype. *Acta Oncol.* 1999; 38:939-943.
- 362- Lee AK, DeLellis RA, Rosen PP, Saigo PE, Gangi MD, Bagin R, Groshen S, Wolfe HJ. ABH blood group isoantigen expression in breast carcinomas - an immunohistochemical evaluation using monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol.* 1985; 83:308-319.
- 363- Avrameas S, Ternynck T. Natural autoantibodies: the other side of the immune system. *Res Immunol.* 1995; 146:235-248.

Bibliografía

- 364- Avrameas S, Selmi C. Natural autoantibodies in the physiology and pathophysiology of the immune system. *J Autoimmun.* 2013; 41:46-49.
- 365- Chow DA, Yuan XY, Tough DF. Polyclonal natural antitumor antibody binding dynamics: preferential release of surface membrane molecules and increased metastasis. *Invasion Metastasis.* 1992; 12:218-232.
- 366- Hanisch FG, Baldus SE. The Thomsen-Friedenreich (TF) antigen: a critical review on the structural, biosynthetic and histochemical aspects of a pancarcinoma-associated antigen. *Histol Histopathol.* 1997; 12:263-281.
- 367- Springer GF. T and Tn pancarcinoma markers: autoantigenic adhesion molecules in pathogenesis, prebiopsy carcinoma-detection, and long-term breast carcinoma immunotherapy. *Crit Rev Oncog.* 1995; 6:57-85.
- 368- Osinaga E. Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. *IUBMB Life.* 2007; 59:269-273.
- 369- Guilbert B, Dighiero G, Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. *J Immunol.* 1982; 128:2779-2787.
- 370- Dighiero G, Guilbert B, Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. II. High incidence of monoclonal Ig exhibiting antibody activity against actin and tubulin and sharing antibody specificities with natural antibodies. *J Immunol.* 1982; 128:2788-2792.
- 371- Freitas AA, Guilbert B, Holmberg D, Wennerström G, Coutinho A, Avrameas S. Analysis of autoantibody reactivities in hybridoma collections derived from normal adult BALB/c mice. *Ann Inst Pasteur Immunol.* 1986; 137D:33-45.
- 372- Glycosilation and cancer. En: Drake RR, Ball LE (Ed.). *Advances in cancer research* (vol 126). Elsevier. San Diego, USA. 2015.
- 373- Bohn J. Are natural antibodies involved in tumour defence? *Immunol Lett.* 1999; 69:317-20.
- 374- Schwartz-Albiez R, Laban S, Eichmüller S, Kirschfink M. Cytotoxic natural antibodies against human tumours: an option for anti-cancer immunotherapy? *Autoimmun Rev.* 2008; 7:491-5.

- 375- Feizi T. Carbohydrate recognition in the immune system: contributions of neoglycolipid-based microarrays to carbohydrate ligand discovery. *Ann N Y Acad Sci.* 2013; 1292:33-44.
- 376- Loveless W, Feizi T, Valeri M, Day R, Bay S. A monoclonal antibody, MIN/3/60, that recognizes the sulpho-Lewis(x) and sulpho-Lewis(a) sequences detects a sub-population of epithelial glycans in the crypts of human colonic epithelium. *Hybridoma.* 2001; 20:223-229.
- 377- Hakomori S. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 491:369-402.
- 378- Kannagi R, Hakomori S. A guide to monoclonal antibodies directed to glycotopes. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 491:587-630.
- 379- Reis CA, David L, Seixas M, Burchell J, Sobrinho-Simões M. Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC1 mucin in gastric carcinoma. *Int J Cancer.* 1998; 79:402-410.
- 380- Werther JL, Tatematsu M, Klein R, Kurihara M, Kumagai K, Llorens P, Guidugli Neto J, Bodian C, Pertsemlidis D, Yamachika T, Kitou T, Itzkowitz S. Sialosyl-Tn antigen as a marker of gastric cancer progression: an international study. *Int J Cancer.* 1996; 69:193-199.
- 381- Dabelsteen E. Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. *J Pathol.* 1996; 179:358-369.
- 382- Baldus SE, Zirbes TK, Hanisch FG, Kunze D, Shafizadeh ST, Nolden S, Mönig SP, Schneider PM, Karsten U, Thiele J, Hölscher AH, Dienes HP. Thomsen-Friedenreich antigen presents as a prognostic factor in colorectal carcinoma: A clinicopathologic study of 264 patients. *Cancer.* 2000; 88:1536-1543.
- 383- Schumacher U, Adam E. Lectin histochemical HPA-binding pattern of human breast and colon cancers is associated with metastases formation in severe combined immunodeficient mice. *Histochem J.* 1997; 29:677-684.
- 384- Werther JL, Rivera-MacMurray S, Bruckner H, Tatematsu M, Itzkowitz SH. Mucin-associated sialosyl-Tn antigen expression in gastric cancer correlates with an adverse outcome. *Br J Cancer.* 1994; 69:613-616.

Bibliografía

- 385- Ghazizadeh M, Ogawa H, Sasaki Y, Araki T, Aihara K. Mucin carbohydrate antigens (T, Tn, and sialyl-Tn) in human ovarian carcinomas: relationship with histopathology and prognosis. *Hum Pathol.* 1997; 28:960-966.
- 386- Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, Sasaki Y, Kabuto T, Iwanaga T, Matsushita Y, Irimura T. Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res.* 1993; 53:3632-3637.
- 387- Takanami I. Expression of Thomsen-Friedenreich antigen as a marker of poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Oncol Rep.* 1999; 6:341-344.
- 388- Koda K, Nakajima N, Saito N, Yasutomi J, McKnight ME, Glassy MC. A human natural antibody to adenocarcinoma that inhibits tumour cell migration. *Br J Cancer.* 1998; 78:1313-1322.
- 389- Treon SP, Maimonis P, Bua D, Young G, Raje N, Mollick J, Chauhan D, Tai YT, Hideshima T, Shima Y, Hilgers J, von Mensdorff-Pouilly S, Belch AR, Pilarski LM, Anderson KC. Elevated soluble MUC1 levels and decreased anti-MUC1 antibody levels in patients with multiple myeloma. *Blood.* 2000; 96:3147-3153.
- 390- Ollert MW, David K, Vollmert C, Juhl H, Erttmann R, Bredehorst R, Vogel CW. Mechanisms of in vivo anti-neuroblastoma activity of human natural IgM. *Eur J Cancer.* 1997; 33:1942-1948.
- 391- David K, Ollert MW, Juhl H, Vollmert C, Erttmann R, Vogel CW, Bredehorst R. Growth arrest of solid human neuroblastoma xenografts in nude rats by natural IgM from healthy humans. *Nat Med.* 1996; 2:686-689.
- 392- Ollert MW, David K, Schmitt C, Hauenschild A, Bredehorst R, Erttmann R, Vogel CW. Normal human serum contains a natural IgM antibody cytotoxic for human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:4498-4503.
- 393- Brändlein S, Vollmers HP. Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity. *Histol Histopathol.* 2004; 19:897-905.
- 394- Bolande RP. Spontaneous regression of neuroblastoma: an experimental approach. *Pediatr Pathol.* 1990; 10:195-206.

- 395- Bolande RP, Mayer DC. The cytolysis of human neuroblastoma cells by a natural IgM 'antibody'-complement system in pregnancy serum. *Cancer Invest.* 1990; 8:603-611.
- 396- Brändlein S, Pohle T, Vollmers C, Wozniak E, Ruoff N, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP. CFR-1 receptor as target for tumor-specific apoptosis induced by the natural human monoclonal antibody PAM-1. *Oncol Rep.* 2004; 11:777-784.
- 397- von Mensdorff-Pouilly S, Snijdewint FG, Verstraeten AA, Verheijen RH, Kenemans P. Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. *Int J Biol Markers.* 2000; 15:343-356.
- 398- Chow DA, Chan J. Tumor progression in vitro: the paradoxical natural antibody and complement-selected phenotype. *Nat Immun Cell Growth Regul.* 1987; 6:189-204.
- 399- Law SKA, Reid KBM. Role of complement in health and disease. En: Male D (Ed). *Complement.* IRL Press. Oxford, Reino Unido. 1988; 47-64.
- 400- Rother K. Complement-deficient animals. En: Rother K, Till GO (Ed). *The complement system.* Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Alemania. 1988; 444-450.
- 401- Slovin SF, Keding SJ, Ragupathi G. Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. *Immunol Cell Biol.* 2005; 83:418-428.
- 402- Ragupathi G, Liu NX, Musselli C, Powell S, Lloyd K, Livingston PO. Antibodies against tumor cell glycolipids and proteins, but not mucins, mediate complement-dependent cytotoxicity. *J Immunol.* 2005; 174:5706-5712.
- 403- Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani EN, Wilson D. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem.* 1990; 265:15286-15293.
- 404- Kabat EA, Liao J, Shyong J, Osserman EF. A monoclonal IgM lambda macroglobulin with specificity for lacto-N-tetraose in a patient with bronchogenic carcinoma. *J Immunol.* 1982; 128:540-544.

- 405- Mostafapour MK, Goldstein IJ. Cultured Ehrlich ascites tumor cells show increased N-linked alpha 2,6-sialyltransferase activity. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 303:255-259.
- 406- Shigeta S, Winter HC, Goldstein IJ. Alpha-(2-->3)- and alpha-(2-->6)-sialyltransferase activities present in three variants of Ehrlich tumor cells: identification of the products derived from N-acetyllactosamine and beta-D-Gal-(1-->3)-alpha-D-GalNAc-(1-->O)-Bn. *Carbohydr Res.* 1994; 264:111-121.
- 407- Takagaki M, Knibbs RN, Roth J, Goldstein IJ. Monoclonal antibodies that recognize the trisaccharide epitope Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc present on Ehrlich tumor cell membrane glycoproteins. *Histochemistry.* 1993; 100:139-147.
- 408- Guo H, Abbott KL Functional Impact of Tumor-Specific N-Linked Glycan Changes in Breast and Ovarian Cancers. En: Drake RR, Ball LE (Ed.). *Glycosilation and cancer. Advances in cancer research (vol 126).* Elsevier. San Diego, CA, USA. 2015; 282-296.
- 409- Nairn AV, Aoki K, dela Rosa M, Porterfield M, Lim JM, Kulik M, Pierce JM, Wells L, Dalton S, Tiemeyer M, Moremen KW. Regulation of glycan structures in murine embryonic stem cells: combined transcript profiling of glycan-related genes and glycan structural analysis. *J Biol Chem.* 2012; 287:37835-37856.
- 410- Fukuda M, Hiraoka N, Yeh JC. C-type lectins and sialyl Lewis X oligosaccharides. Versatile roles in cell-cell interaction. *J Cell Biol.* 1999; 147:467-470.
- 411- Schwientek T, Nomoto M, Lavery SB, Merkx G, van Kessel AG, Bennett EP, Hollingsworth MA, Clausen H. Control of O-glycan branch formation. Molecular cloning of human cDNA encoding a novel beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase forming core 2 and core 4. *J Biol Chem.* 1999; 274:4504-4512.
- 412- Potapenko IO, Haakensen VD, Lüders T, Helland A, Bukholm I, Sorlie T, Kristensen VN, Lingjaerde OC, Borresen-Dale AL. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol Oncol.* 2010; 4:98-118.

- 413- Parry S, Hanisch FG, Leir SH, Sutton-Smith M, Morris HR, Dell A, Harris A. N-Glycosylation of the MUC1 mucin in epithelial cells and secretions. *Glycobiology*. 2006; 16:623-634.

IX. SUMMARY

SUMMARY

STUDY OF NATURAL AND INDUCED IgM ANTIBODY REACTIVITY AGAINST THE TUMOUR-ASSOCIATED CARBOHYDRATE DEFINED BY mAb A10

INTRODUCTION

Cancer is a generic term for a large group of diseases that can affect any part of the body. It also includes malignant tumours, or malignancies. A principal feature of the cancer process is the rapid growth of abnormal cells, extending beyond its usual limits and invading adjoining parts of the body or spreading to other organs.

The malignant transformation of epithelial cells leads to changes in the glycosylation pattern of membrane glycolipids and glycoproteins with the appearance of new epitopes, which can be recognized by monoclonal antibodies (mAb).

The mAb A10 (IgMk) was generated against cell surface carbohydrates of the murine Ehrlich tumour (HC-ET) and selected for its ability to inhibit *in vivo* tumour growth. This antibody defines a carbohydrate epitope associated with a glycoprotein expressed on the membrane of Ehrlich tumour cells (Ca10).

In human tissues, A10 recognizes a carbohydrate epitope associated with glandular epithelial tumours (adenocarcinomas), showing a very low reactivity against normal cells. The A10 human epitope is associated with GlcNAc carbohydrate structures contained in mucin cores, especially the MUC-1 core-6 glycan (GlcNAc β (1-6)GalNAc).

Mice immunized with irradiated Ehrlich tumour cells generate an IgM antibody response against their cell surface carbohydrates (HC-ET) that protects them against the growth of this tumour. Furthermore, natural resistance to this tumour correlates with the levels of natural antibodies (NAb) against the HC-ET. In humans, NAb reactive against mucin core glycans and Ehrlich tumour cells have also been described.

OBJETIVES

- To evaluate the human natural IgM reactivity against the HC-ET cancer cell lines and A10+ human tumour tissues.
- To evaluate the presence of induced murine IgM antibodies obtained by immunization with ET cells and reactive against the HC-ET cancer cell lines and A10+ human tumour tissues.
- To evaluate a possible cytotoxic function of these IgM class antibodies.
- To study the capacity of A10+ human tumour cell lines to induce IgM antibodies reactive against A10+ mouse tumour cells (ET).
- To optimize the HC-ET purification process from ET cells.
- To describe the structure and composition of the Ca10 obtained from ET cells.

RESULTS AND DISCUSSION

1- Natural antibodies (NAb) reactive against A10+ molecules

Total IgM and NAb levels against the HC-ET, tumour cell lines and human colon cancer tissues were analysed in 82 human sera. IgM and Nab levels against HC-ET were 112 ± 54 mg/dL and 309 ± 462 AU/mL, respectively. A positive correlation between both antibody levels was found ($r=0.582$; $p<0.001$). According to the Nab reactivity, 4 groups of sera were established: a) negative sera: <42 AU/mL; b) low reactivity: 42-200 AU/mL; c) medium reactivity: 200-500 AU/mL d) and high reactivity >500 AU/mL. No significant correlation between NAb reactivity against the HC-ET and the serum ABO blood group was observed.

Medium and high reactivity groups showed NAb only against A10+ cell lines (25.2 ± 14.3 and 45.4 ± 25.6 for ET; 33.1 ± 7.8 and 48.1 ± 27.9 for S180). NAb levels of the high reactivity group were statistically significant greater compared with the low group ($p<0.001$; in ET and S180). There was a moderate correlation between the NAb against the HC-ET and the ET and S180 cell lines ($r=0.451$; $r=0.532$; $p<0.001$ in both cases).

Testing the 82 human sera and HT-29 human colon tissue, the percentage of positive samples were 18%, 62 and 92% considering the low, medium and high reactivity groups, respectively. A significant correlation between the frequency of positivities in each group and the signal intensity obtained was found ($p<0.01$). All the

sera were negative with the control tissue (liver). Four sera, with different levels of Nab against the HC-ET were tested with the human colon cancer biopsies. The 2 sera that showed high levels detected 100% of A10+ tumours. The intermediate serum 27% and the low reactivity one was only able to recognize 7% of A10+ tumours. However, the sera were mostly negative when incubated with A10- tumours and healthy tissues.

2- Specific IgM antibodies against A10+ molecules in mice immunized with ET

Mice were immunized with ET cells in order to induce a specific IgM response against the HC-ET. Afterwards, specific IgM against the HC-ET tumour cell lines and human colorectal cancer tissues were evaluated. Mice immunized with the A10- B16 murine melanoma, as well as, PBS treated and non-immunized mice were used as controls.

Specific IgM levels against HC-ET were significantly increased only in the animals immunized with ET devitalized cells, compared with the non-immunized animals (22.3 ± 8.2 vs. 3.8 ± 3.2 $\mu\text{g/mL}$; $p=0.003$).

Mice immunized with ET cells showed a statistically significant increase in specific IgM against murine and human A10+ cell lines, compared to non-immunized control. The values obtained were 657 ± 243 vs. 2 ± 0.4 ($p < 0.001$) and 28.7 ± 16.2 vs. 3.4 ± 0.4 ($p=0.002$) for ET and S180, respectively. In addition, specific IgM levels were 13.2 ± 1.9 vs. 2.1 ± 0.4 ($p < 0.001$) and 15.9 ± 7.1 vs. 4 ± 0.5 ($p < 0.001$) for the SNU-C1 (mAb A10=22.4) and Colo-320 (mAb A10=34.8) human colon cell lines, respectively.

Regarding the HT-29 human colon cancer tissue, the sera from the mice immunized with ET cells were positive to a large extent (94.44%). In addition, control sera showed no specific IgM. In human colorectal biopsies, 78% of samples analysed were positive using the sera of ET cells immunized mice. Some of the samples (23.33%) also showed IgM reactivity in mice treated with PBS, although with low intensity. All the sera of non-immunized animals were negative. No specific IgM against A10- adjacent healthy tissues was found.

Summary

Furthermore, IgM reactivity against the HT-29 tumour contained in the sera of mice immunized with ET cells could be adsorbed when they were pre-incubated with ET cells. However, the B16 melanoma cell line did not inhibit this IgM reactivity.

3- Biological effect of the IgM class antibodies

Human sera of the medium and high reactivity groups (Nab) showed a significantly higher complement-mediated lysis activity compared with the sera of the low reactivity group (33.4 ± 8.9 vs. 16.5 ± 13.5 , respectively; $p < 0.001$). Furthermore, sera from mice immunized with ET cells had a significantly greater complement-mediated lysis activity than the sera of non-immunized, or B16 immunized controls (67.5 ± 18 vs. 15.7 ± 4.7 vs. 15.5 ± 6.4 ; $p < 0.01$).

4- Specific IgM antibodies against ET in mice immunized with A10+ human cells

Animals immunized with the human lung tumour cell line H-1355 showed a statistically significant increase in specific IgM against ET cells than non-immunized or B16 immunized controls (235.2 ± 105.4 vs. 4.3 ± 2.2 vs. 7 ± 2.6).

5- ET membrane carbohydrates purification (HC-ET)

A tangential flow ultrafiltration process allowed us to increase 86 times the specific activity of the Ca10 molecule, increasing from $5.9 \text{ AU}/\mu\text{g}$ to $508.9 \text{ AU}/\mu\text{g}$ of lyophilized sample. Using as a reference criteria the UA per unit of protein weight (measured by the Bradford method), this activity was increased 173 times, going from $25.5 \text{ AU}/\mu\text{g}$ to 4403.8 initial $\text{UA}/\mu\text{g}$. Moreover, 99% of the irrelevant proteins contained in the sample were removed.

6- Molecular characterization of the HC-ET

The main monosaccharides contained in the HC-ET were galactose, glucose, glucosamine and mannose. Monosaccharides unions comprising the oligosaccharide part of the sample at the non-reducing ends were basically [-3)-Galp-(1-], [-4)-GlcNH₂-(1-] and [-4)-GlcP-(1-]. The protein component contained in the sample was low, with a higher proportion of the amino acids glutamine, asparagine and leucine. No significant levels of fatty acids were found in the samples.

The lectins specific for GlcNAc (DSL and LEA) interacted with the HC-ET, both, the no fractioned sample as well as the >300 kDa fraction. Furthermore, this interaction was strong, since in the presence of GlcNAc as an inhibitor, the binding was retained.

The mAb A10 binding was inhibited using sugars with different molecular weight sizes and degrees of complexity. We found that chitotriose, lacto-N-triaose and the mucin core-3 glycan inhibited the binding of mAb A10 to purified Ca10.

The studies of N-, O-glycosidases and metabolic inhibitors of glycosylation indicate that the epitope recognized by mAb A10 depends on N-glycosylation.

CONCLUSIONS

- Most of the human sera (80%) contain natural antibodies (NAb) reactive against HC-ET. No relationship with blood group antigens was found.
- There is a direct correlation between the human NAb levels and the mAb A10 reactivity against HC-ET, murine tumour cell lines and human tumours, suggesting that the carbohydrate structures recognized by NAb and mAb A10 are closely related.
- The sera of mice immunized with ET devitalized cells contained high titers of specific IgM antibodies against the HC-ET murine and human A10+ tumour cells, and A10+ human cancer tissues but not against A10- samples. In addition, the IgM reactivity against A10+ human tumours disappeared if the sera were pre-incubated with ET cells. These results support the structural relationship between the murine Ca10 and the epitope present in A10+ human tumour cells.
- Human NAb and murine induced IgM antibodies are able to kill ET cells (*in vitro*) through a complement dependent cytotoxicity (CDC).
- Animals immunized with an A10+ human tumour cell line induce an IgM response to the murine ET cells.
- An optimal HC-ET purification process has been optimized.

Summary

- The HC-ET purified sample mainly contains carbohydrate molecules (88.2%) with high levels of galactose, glucose, glucosamine and mannose and low percentages of proteins (11.7%). The lipid content was irrelevant (<0.1%).
- mAb A10 sugar inhibition studies suggest the involvement of GlcNAc- β (1-3) and GlcNAc- β (1-4) carbohydrate structures in the epitope recognized by mAb A10.
- The A10 carbohydrate epitope is related with a N-glycosylated structure.
- These results allow us to propose the HC-ET and particularly the Ca10 for the design of an anticancer vaccine for A10+ human tumours.