



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Modulación de la inmunogenicidad de antígenos glicolipídicos y su papel en terapia oncológica

J. Oriol Massó Barnadas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



Universidad de Barcelona

Facultad de Biología

Departamento de Bioquímica y Fisiología

Unidad de Fisiología Animal

**MODULACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE ANTÍGENOS
GLICOLIPÍDICOS Y SU PAPEL EN TERAPIA ONCOLÓGICA.**

**Memoria presentada por J. Oriol Massó Barnadas para aspirar al grado de Doctor
en Biología.**

Barcelona Mayo 1993

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700184423

Jaime Piulats Xancó, Doctor en Farmacia y Director del Laboratorio de Bioinvestigación de MERCK - IGODA S.A. en Barcelona :

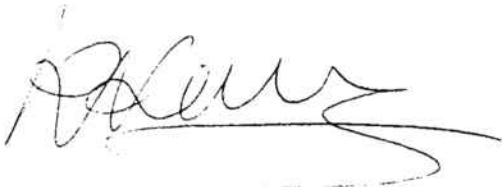
CERTIFICA que la tesis realizada por J. Oriol Massó Barnadas titulada **Modulación de la inmunogenicidad de antígenos glicolipídicos y su papel en la terapia oncológica**, reúne las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor en Biología.



Dr. J. Piulats

Barcelona, Mayo 1993

Visto bueno del ponente :



Dr. R. Rama, profesor titular
Departamento de Bioquímica y Fisiología
Universidad de Barcelona

A la Lina, en Sergi i la Mireia

Agraïments :

Són moltes les persones que han col.laborat perquè aquesta tesi arribi a bon fi, a totes els hi voldria fer palès el meu agraïment.

En primer lloc al Dr. Jaume Piulats, Director del Laboratori de Bioinvestigació de MERCK-IGODA S.A. que m'ha dirigit la tesi i m'ha permès compaginar la realització de la mateixa amb el desenvolupament paral.lel d'altres projectes.

Al Dr. Ramón Rama de l'Unitat de Fisiologia Animal del Departament de Fisiologia Animal i Bioquímica de l'Universitat de Barcelona que ha actuat de ponent de la mateixa.

A la Dra. Maria Kordovitz del Departament de Immunoquímica de E. Merck a Darmstad (Alemanya) i en Helmut Schröder del Departament de Immunologia del Institut Municipal d'Investigació Mèdica de Barcelona per el seu ajut en el desenvolupament de totes les tècniques d'extracció i anàlisi dels glicolípidis.

Al professor J. Montreuil del Departament de Química Biològica de l'Universitat de Lille (França) per facilitar-me la neoglicoproteïna sintètica disialil-lactosa-BSA.

Al Dr. S.F. Aliño del Departament de Farmacologia de la Facultat de Medicina de València per tots els seus ensenyaments de la teoria i pràctica dels liposomes i per el seu convenciment sobre les utilitats dels mateixos.

Al Dr. P. Livingston del Memorial Sloan Kettering Center de Nova York per iniciar-me en el camp de l'immunoteràpia com a eina vàlida en la terapia del cancer durant els breus dies que vaig passar al seu laboratori.

Al Dr. G. Tettamanti del Departament de Bioquímica Clínica de la Facultat de Medicina de Milà (Itàlia) per la seva interessant discussió sobre el paper de les ceramides dins l'immunogenicitat dels liposomes i la dinàmica de membranes.

Als Drs. R. Reuss del Departament d'Inmunofarmacologia de E.Merck a Darmstad (Alemanya) i X.F. Real de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica de Barcelona per la donació de diverses línies cel.lulars emprades a la present tesi.

Al Dr. S. Vilaró de la Unitat de Biologia Cel.lular del Departament de Bioquímica i Fisiologia de l'Universitat de Barcelona per facilitar-me l'ús del Servei de Microscopia Electrònica i per ensenyar-me les tècniques d' immunohistoquímica aplicades a la microscopia electrònica.

A tots el meus companys del Laboratori de Bioinvestigació de MERCK-IGODA S.A. per el seu constant recolzament i ajuda, en especial a en Manel Moyano per les seves anàlisis de citometria de fluxe i les llargues discussions sobre els resultats.

Finalment no voldria acabar sense esmentar i agrair molt especialment l'ajut prestat per els meus companys Francesc Blasco, Carmen Recacha i Jordi Grimaó amb qui he estat treballant durant els ultims tres anys i sense els que la present tesi no hauria estat possible.

Així mateix cal fer palès l'agraïment molt especial a la meva esposa, Lina, i als meus fills, Sergi i Mireia, per la seva paciència i ajut durant la realització de la tesi.

Barcelona 23 d'Abril de 1993

Diada de Sant Jordi.

ÍNDICE

<u>I.- Introducción</u>	13
1.- Antígenos tumorales	17
1.1.- Características bioquímicas de la glicosilación aberrante.	19
1.1.1.- Cambios a nivel de glicolípido.	19
1.1.2.- Cambios a nivel de glicoproteína.	19
1.1.3.- Bases enzimáticas de la glicosilación aberrante.	19
1.1.4.- Significado biológico de la glicosilación aberrante.	20
1.2.- T.A.A. Glicolipídicos.	21
1.2.1.- Antígenos glicolipídicos en tumores experimentales.	21
1.2.2.- Antígenos tumorales humanos	22
1.2.2.1.- Gangliósidos.	22
1.2.2.2.- Síntesis normal de gangliósidos	24
1.2.2.3.- Síntesis aberrante de gangliósidos.	24
1.2.2.4.- Globósidos.	26
1.2.2.5.- Síntesis normal de globósidos.	26
1.2.2.6.- Síntesis aberrante de globósidos.	26
1.2.2.7.- Series lacto y neolacto.	27
1.2.2.8.- Síntesis de cadenas de tipo I.	28
1.2.2.9.- Síntesis de cadenas de tipo II.	29
1.3.- T.A.A. Glicoproteícos.	31
1.3.1.- Antígenos de la serie lacto expresados en mucinas y glicoproteínas.	31
1.3.2.- Antígenos T, Tn y Sialil-Tn	32
1.3.3.- Otros T.A.A. glicoproteícos.	33
1.4.- Modificación de antígenos de grupo sanguíneo en tumores humanos.	34
1.4.1.- Delección de determinantes A y B y acumulación de precursores.	34
1.4.2.- Antígenos incompatibles.	34
1.4.3.- Antígenos P, P ₁ y P ^k .	35
2.- Respuesta inmunológica antitumoral.	36
2.1.- Inmunogenicidad tumoral.	36
2.1.1.- Moléculas relacionadas con el MHS.	36

2.1.2.-	Proteínas relacionadas con virus y oncogenes.	37
2.1.3.-	Antígenos de rechazo.	40
2.1.4.-	Antígenos únicos.	41
2.2.-	Factores que afectan a la inmunogenicidad de los T.A.A. glucídicos.	41
2.2.1.-	Densidad de las cadenas de carbohidrato.	43
2.2.2.-	Criticidad de los antígenos.	44
2.2.3.-	Composición de la ceramida.	44
2.2.4.-	Antígenos exclusivos.	45
2.3.-	Respuesta inmune anti-tumoral.	45
2.3.1.-	Presentación del antígeno.	47
2.3.2.-	Activación T-independiente.	47
2.4.-	Mecanismos efectores de la respuesta inmune.	48
3.-	Liposomas.	52
3.1.-	Estructura química y lípidos empleados.	54
3.1.1.-	Fosfolípidos.	54
3.1.2.-	Ácidos grasos.	54
3.1.3.-	Esfingolípidos.	56
3.1.4.-	Glicoesfingolípidos.	57
3.1.5.-	Esteroles.	57
3.1.6.-	Metabolización de los lípidos integrados en los liposomas.	58
3.1.6.1.-	Fosfolípidos.	58
3.1.6.2.-	Esteroles	59
3.1.7.-	Precauciones en el manejo de lípidos.	59
3.2.-	Tipos y composición de liposomas.	60
3.3.-	Propiedades de los liposomas.	61
3.3.1.-	Transición de fase.	61
3.3.2.-	Disposición espacial de la membrana.	62
3.3.3.-	Permeabilidad de la membrana.	65
3.3.4.-	Estructura física de los liposomas.	66
3.4.-	Interacción entre liposomas y células.	67
3.4.1.-	Interacción entre membranas.	68
3.4.1.1.-	Transferencia entre membranas.	68
3.4.1.2.-	Absorción.	68
3.4.1.3.-	Fusión de membranas.	69
3.4.1.4.-	Consideraciones anatómicas.	70
3.5.-	Dianización de liposomas.	73

3.5.1.- Liposomas temperatura sensibles.	73
3.5.2.- Liposomas diana sensibles.	74
3.5.3.- Liposomas pH sensibles.	74
3.6.- Liposomas y respuesta inmune.	75
3.6.1.- Presentación de antígenos.	75
3.6.1.1.- Estudios <i>in vitro</i> .	75
3.6.1.2.- Estudios <i>in vivo</i> .	76
3.6.2.- Influencia de la composición química.	78
3.6.3.- Los liposomas como transportadores de adyuvantes.	78
3.6.3.1.- Lípido A.	78
3.6.3.2.- Muramildipéptido.	79
4.- Melanoma	81
4.1.- Antígenos asociados a melanoma.	82
4.1.1.- Marcadores oncofetales.	82
4.1.1.1.- Condroitín sulfato proteoglicano.	82
4.1.1.2.- Moléculas de adhesión celular.	82
4.1.1.3.- Antígeno de membrana placentaria.	83
4.1.2.- Receptores de factores de crecimiento.	83
4.1.3.- Proteínas de transporte de cationes.	83
4.1.3.1.- Melanotransferrina.	84
4.1.3.2.- Proteína S-100.	84
4.1.4.- Antígenos de histocompatibilidad.	84
4.1.5.- Antígenos asociados a pigmentación.	85
4.1.6.- Proteínas de la matriz extracelular.	85
4.1.7.- Marcadores de diferenciación.	85
4.1.8.- Gangliósidos.	85
4.2.- Inmunoterapia pasiva con anticuerpos anti-melanoma.	86
4.3.- Inmunoterapia activa anti-melanoma.	88
<u>II.- Objetivos.</u>	90
<u>III.- Material y Métodos</u>	93
1.- Preparación de liposomas.	94
1.1.- Liposomas multilamelares.	94
1.2.- Liposomas unilamelares.	94

2.- Caracterización de los liposomas.	96
2.1.- Estabilidad	96
2.1.1.-Purificación de la carboxifluoresceína.	96
2.1.1.1.- Recristalización.	96
2.1.1.2.- Eliminación de contaminantes polares.	96
2.1.2.- Valoración de la estabilidad.	97
2.2.- Composición lipídica de los liposomas.	98
2.2.1.- Cromatografía en capa fina (TLC).	98
2.2.2.- Visualización.	99
2.2.3.- Cromatografía líquida (HPLC).	99
2.2.2.1.- Extracción de lípidos.	99
2.2.2.2.- Cuantificación de gangliósidos.	100
2.2.2.3.- Cuantificación de fosfolípidos.	100
2.2.2.4.- Cuantificación de colesterol.	101
2.3.- Caracterización inmunológica.	101
2.3.1.- Absorción de liposomas con anticuerpos anti- GD3.	101
2.3.2.- Microscopía electrónica.	101
2.3.2.1.- Marcaje de liposomas.	101
2.3.2.2.- Contrastado.	102
2.3.2.3.- Observación.	102
2.4.- Biodistribución de los liposomas.	102
3.- Obtención y purificación de los antígenos.	103
3.1.- Extracción y purificación del gangliósido GD3.	103
3.1.1.- Extracción de lípidos totales.	103
3.1.2.- Extracción de Folch y Pi.	104
3.1.3.- Separación de glicolípidos neutros y gangliósidos.	104
3.1.3.1.- Preparación de la columna.	105
3.1.3.2.- Preparación de la muestra.	105
3.1.3.3.- Desalting de la muestra.	105
3.1.4.- Purificación del GD3 mediante HPLC analítica.	105
3.1.5.- HPLC preparativa	106
3.1.6.- Identificación de los gangliósidos.	107
3.1.6.1.- HPLC analítica.	107
3.1.6.2.- TLC.	107
3.1.6.3.- Inmuno-TLC.	108
3.1.6.4.- Tratamiento alcalino.	109

3.1.7.- Cuantificación del GD3.	109
3.1.8.- Análisis de las ceramidas mediante TLC.	110
3.1.9.- Disialil-lactosa-BSA.	110
4.- Cultivo de líneas celulares.	110
4.1.- Líneas celulares empleadas.	111
4.2.- Expresión de GD3 en la membrana celular.	111
4.3.- Implantación del melanoma humano WM-164 en ratones nu/nu.	112
4.4.- Protocolo de congelación.	113
4.5.- Protocolo de descongelación.	113
5.- Pautas de inmunización.	114
5.1.- Animales.	114
5.2.- Conjugación <i>Salmonella minnesota</i> -GD3.	114
5.3.- Inmunización con GD3- <i>Bordetella pertusis</i> .	115
5.4.- Inmunización con adyuvante de Freund.	115
5.5.- Inmunización con células de melanoma.	115
5.6.- Inmunización con liposomas.	115
5.7.- Inmunización con disialil-lactosa-BSA.	115
5.8.- Pauta de inmunización y sangrado de animales.	116
5.9.- Inmunización para determinar la existencia de memoria inmunológica.	116
6.- Modelos de respuesta celular T.	116
6.1.- Hipersensibilidad retardada.	116
6.1.1.- Animales.	117
6.1.2.- Antígenos.	117
6.1.3.- Pauta de inmunización.	117
6.1.4.- Medida de la inflamación.	117
6.2.- Modelo con ratones atímicos.	118
7.- Respuesta serológica.	118
7.1.- Respuesta anti-gangliósido (ELISA).	119
7.2.- Reacciones cruzadas entre gangliósidos.	119
7.3.- Absorción con gangliósidos y análisis mediante HPLC.	119
7.4.- Caracterización de los isotipos.	119
8.- Respuesta antitumoral.	120
8.1.- Inmunofluorescencia.	120
8.2.- Citometría de flujo.	120
8.3.- Citotoxicidad mediada por complemento.	121
8.4.- Citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente.	121

9.- Antigenicidad del GD3 extraído de líneas tumorales.	124
9.1.- Antigenicidad del GD3 soluble.	124
9.2.- Antigenicidad del GD3 asociado a liposomas.	124
<u>IV.- Resultados</u>	126
1.- Caracterización y estabilidad de los liposomas.	127
1.1.- Composición lipídica	127
1.2.- Caracterización inmunológica.	127
1.3.- Estabilidad de los liposomas.	127
2.- Biodistribución de los liposomas.	135
3.- Caracterización de líneas celulares.	137
4.- Extracción del gangliósido GD3 de células WM-164.	137
4.1.- Extracciones analíticas.	137
4.2.- Extracciones preparativas.	143
4.2.1.- Purificación mediante columnas 250-5.	143
4.2.2.- Purificación mediante columnas 250-10.	143
4.3.- Análisis y cuantificación del GD3 obtenido.	144
4.4.- Estudio de las ceramidas.	148
5.- Antigenicidad del GD3 tumoral.	149
5.1.- Antigenicidad del GD3 soluble.	149
5.2.- Antigenicidad del GD3 asociado a liposomas.	149
6.- Respuesta serológica.	151
6. 1.- Inmunización con adyuvante de Freund.	151
6. 2.- Inmunización con <i>Bordetella pertusis</i> .	151
6. 3.- Inmunización con GD3- <i>Salmonella</i> .	151
6. 4.- Inmunización con disialil-lactosa-BSA.	152
6. 5.- Inmunización con células de melanoma.	153
6. 6.- Inmunización con liposomas unilamelares.	154
6. 7.- Inmunización con liposomas multilamelares.	154
6. 8.- Inmunización con liposomas control.	157
6. 9.- Muestras preinmunes.	157
6.10.- Toxicidad y morbilidad de las inmunizaciones.	159
7.- Respuesta antitumoral.	159
7.1.- Reconocimiento de líneas celulares humanas.	160
7.2.- Citotoxicidad mediada por complemento.	160

7.3.- Citotoxicidad celular anticuerpo dependiente.	164
7.4.- Efecto "cluster".	164
8.- Liposomas con GD3 tumoral vs. liposomas con GD3 no tumoral.	165
9.- Análisis del isotipo.	166
10.- Cinética de la respuesta y memoria inmunológica.	167
10.1.- Inmunización con células de melanoma.	168
10.2.- Inmunización con liposomas.	168
10.3.- Inmunización con disialil-lactosa-BSA.	168
10.4.- Inmunización a largo término.	168
11.- Modelos de respuesta celular T.	170
11.1.- Hipersensibilidad retardada.	170
11.2.- Respuesta en ratones atómicos.	170
<u>V.- Discusión</u>	172
<u>VI.- Resumen y Conclusiones.</u>	184
<u>VII.- Bibliografía.</u>	187

I.- Introducción

INTRODUCCIÓN

El seguimiento del curso clínico de los pacientes oncológicos o la evolución del crecimiento de tumores en animales experimentales permite observar que, aparentemente, los tumores crecen sin ningún tipo de control por parte del sistema inmune. Sin embargo un estudio más detallado nos aporta algunas evidencias de la existencia de mecanismos inmunológicos de defensa frente al tumor.

Determinar que antígeno o antígenos tumorales pueden ser reconocidos por el sistema inmune y cuales son los principales mecanismos efectores del mismo es, quizá, la principal cuestión planteada en el campo de la inmunología tumoral. La posible existencia de antígenos tumorales exclusivos ha sido durante décadas un tema muy atractivo para muchos grupos de trabajo. Desafortunadamente hoy podemos decir que hasta el momento no ha sido posible detectar ningún antígeno tumoral exclusivo, y los que se han descrito, muestran una expresión restringida a unos pocos pacientes y por lo tanto su utilidad como diana terapéutica es escasa.

Con la progresiva implantación de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales, ha sido posible disponer de un considerable panel de anticuerpos específicos de muy distintos tumores. En su mayor parte estos anticuerpos se han obtenido inmunizando ratones con células tumorales humanas o con extractos de las mismas. Al estudiar los epítomos reconocidos por estos anticuerpos no ha pasado desapercibido el hecho de que una gran mayoría de ellos reconocen estructuras de naturaleza glucídica. En general se trata de glicolípidos de membrana o bien de glicoproteínas o mucinas de elevado peso molecular.

Desde el punto de vista inmunológico los carbohidratos son moléculas poco o nada inmunogénicas y que en algunos casos incluso poseen actividad inmunosupresora. No deja de parecer un contrasentido este comportamiento inmunosupresor frente a la gran cantidad de anticuerpos monoclonales obtenidos.

Las terapias basadas en la inmunización activa de pacientes con antígenos tumorales purificados o bien con derivados sintéticos de los mismos ofrecen un atractivo campo de

trabajo. Seguramente este tipo de terapias precisa de su asociación con terapias complementarias, ya sean de tipo biológico con anticuerpos monoclonales, químico con citostáticos, quirúrgico o radioterapia, pero permiten asegurar determinados parámetros como la especificidad, vigilancia de metástasis y escasos efectos secundarios.

En nuestro laboratorio nos hemos planteado el desarrollo de diversas estrategias en la bioterapia del cáncer. Estas estrategias se basan en dos objetivos prioritarios. En primer lugar inhibir el crecimiento de la célula tumoral y en segundo lugar destruir aquellas células que ya han proliferado. El objetivo final es la eliminación de la célula tumoral y la prevención y vigilancia de la aparición de nuevos focos celulares.

A lo largo de la presente tesis queremos demostrar, tanto a nivel de respuesta sérica como a nivel de mecanismos efectores celulares, la capacidad de los antígenos de tipo glicolipídico para activar la respuesta inmunológica antitumoral cuando son presentados adecuadamente al sistema inmune. Así mismo queremos aportar un mayor conocimiento al campo de la inmunología de los antígenos asociados a tumores y desarrollar diversas aproximaciones que permitan aumentar su escasa inmunogenicidad.

El modelo de trabajo escogido es el melanoma. La principal razón de ello ha sido la facilidad de cultivo de diversas líneas celulares humanas de melanoma, la existencia de diversos anticuerpos monoclonales anti-melanoma que nos permitían caracterizar las diversas líneas celulares mantenidas en cultivo y el hecho de que el melanoma es uno de los tumores humanos del que se posee más información acerca de su biología y comportamiento. La incidencia del melanoma se ha incrementado fuertemente en los últimos años. Se trata de un tumor con una elevada capacidad de metástasis, muy refractario a los tratamientos convencionales con quimioterapia y radioterapia y de mal pronóstico, pues se suele diagnosticar en estadios muy avanzados. Todo ello lo sitúa como un buen candidato a la inmunoterapia.

En la presente memoria hemos desarrollado una introducción teórica en la que se revisan los conceptos de los antígenos tumorales, la respuesta inmune anti-tumoral, los liposomas como transportadores de antígenos y las principales características del melanoma. Esta revisión bibliográfica nos ha permitido escoger al gangliósido GD3 como el antígeno más característico de las células de melanoma y plantear como objetivo principal del desarrollo

experimental el diseño y evaluación de diversas metodologías de inmunización que, en un modelo experimental murino, nos permita evaluar la respuesta sérica anti-GD3 y su capacidad efectora frente a células de melanoma.

1.- ANTIGENOS TUMORALES

A lo largo de la década de los 80 se llevaron a cabo muchos estudios con anticuerpos monoclonales con el objetivo de encontrar e identificar antígenos de membrana específicos de células tumorales. Los resultados obtenidos fueron, hasta cierto punto, sorprendentes. Una inmensa mayoría de los anticuerpos obtenidos reconocían antígenos de tipo carbohidrato y especialmente glicolípidos. Los antígenos definidos por estos anticuerpos demostraban una reactividad específica o preferencial con las células tumorales y reconocían moléculas que eran expresadas tanto en la célula normal como en la cancerosa, pero en ésta última su densidad de expresión era mucho más elevada. Este tipo de antígenos han recibido el nombre de antígenos asociados a tumores o bien en inglés "Tumor associated antigen" o T.A.A..

Las células transformadas *in vitro* o bien tomadas de biopsias *in vivo* exhiben fenotipos de membrana diferentes de las mismas células normales, estos cambios afectan especialmente al patrón de glicosilación de la célula normal. Los cambios del patrón de glicosilación son, básicamente, cuantitativos más que cualitativos, así, es difícil observar estructuras sintetizadas *de novo* pero es fácil detectar importantes aumentos en la expresión de glicolípidos y glicoproteínas de membrana, un aumento en la cantidad total de ácido siálico y en el número de carbohidratos fucosilados. Sin embargo, los cambios son lo suficientemente importantes como para poder ser detectados mediante técnicas inmunológicas. El significado biológico de estos cambios en los patrones de glicosilación es desconocido.

Existen dos aproximaciones posibles para identificar los antígenos asociados a tumores (TAA) con patrón de glicosilación aberrante. El primero se basa en una caracterización bioquímica sistemática de la composición y cantidad de los glicoconjugados detectados, seguida de la obtención de anticuerpos monoclonales contra las estructuras aberrantes detectadas. Estos anticuerpos poseen capacidad citostática y citolítica. Actualmente esta metodología se considera clásica, y ha permitido identificar un gran cantidad de

estructuras con glicosilación aberrante tanto en tumores experimentales en animales, como en tumores humanos .

La segunda aproximación se ha desarrollado a partir de datos obtenidos del estudio de la reactividad de los anticuerpos específicos de las células tumorales. Estos anticuerpos son, mayoritariamente, específicos de estructuras glucídicas. Una gran cantidad de antígenos glicolipídicos o glicoproteicos han podido ser identificados mediante esta metodología, sin embargo, y hasta el momento actual, no ha sido posible identificar ninguna estructura aberrante no presente en menor concentración en la célula normal.

Desde el punto de vista químico, salvo rarísimas excepciones que serán descritas mas adelante, no podemos hablar de la existencia de antígenos específicos de tumores y más bien podemos hablar de antígenos asociados a tumores. Estos antígenos se clasifican en tres grupos según sus características de expresión :

1.- Estructuras relativamente nuevas, expresadas en muy altas concentraciones en la célula tumoral que si bien están ausentes en la célula normal si que están expresadas en otros tejidos normales. Constituyen la gran mayoría de los T.A.A. Por ejemplo el gangliósido GD3 en el melanoma o bien los antígenos de Lewis en los tumores gastrointestinales.

2.- Estructuras comunes en la célula normal y la célula tumoral, expresadas en muy altas concentraciones en la célula tumoral y prácticamente ausentes en otros tejidos normales. Como ejemplo podemos citar el GM3 en el melanoma.

3.- Estructuras completamente nuevas y solo detectables en la célula tumoral. Están moléculas nuevas pueden serlo por neosíntesis, caso de los antígenos sanguíneos incompatibles, o por descriptación como en el caso de los antígenos T y Tn.

En este capítulo se revisarán las características bioquímicas generales de los patrones de glicosilación aberrante, las bases bioquímicas y enzimáticas que hacen posible estos cambios y aquellos factores que afectan a esta expresión.

1. 1.- CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LA GLICOSILACION ABERRANTE

Se han detectado dos grandes grupos de carbohidratos aberrantes en la célula tumoral :

a) Carbohidratos unidos a ceramidas e insertados en la bicapa lipídica; y b) carbohidratos unidos a glicoproteínas de membrana, incluyendo mucinas excretadas por la célula y proteínas de membrana como la fibronectina.

1.1.1.- Cambios a nivel de glicolípido : Se han observado tres cambios en los glicolípidos de las células tumorales *in vivo*, a) bloqueo de vías metabólicas de síntesis, con o sin acumulación de precursores (1,2); b) neosíntesis debida a la activación de glicosiltransferasas inactivas en la célula normal (3-7), y c) cambios a nivel de la organización de los glicolípidos de membrana, como por ejemplo la pérdida de la cripticidad (4,8-10). Frecuentemente los glicolípidos detectados muestran, también, una ceramida aberrante que puede tener implicaciones tanto a nivel de la inmunogenicidad de la célula como en la disposición del glicolípido en la superficie celular (10). De este modo las células tumorales se caracterizan por la acumulación de precursores glicolipídicos o neoglicolípidos que al ser expuestos en su membrana pueden ser reconocidas por el sistema inmune como antígenos no propios (3,4,11).

1.1.2.- Cambios a nivel de glicoproteína : Los cambios a nivel de glicoproteínas se pueden agrupar en tres categorías, a) La presencia de glicopéptidos con oligosacáridos unidos a residuos de asparagina y que poseen un peso molecular superior al glicopéptido expresado por la célula normal (12,13); estos glicopéptidos han sido parcialmente identificados y se caracterizan por poseer un mayor grado de cadenas con bifurcaciones, sobretudo a nivel de los grupos manosa internos, por ejemplo grupos Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 4Man y grupos GlcNAc β 1 \rightarrow 4Man (14-16).; b) el incremento de mucinas O-glicosiladas en general, y en particular la aparición de mucinas con glicosilación muy densa y rica en grupos mono y disialo (17-19). Finalmente se ha detectado un incremento de glicoproteínas con enlaces N- u O-glicosídicos dando lugar a moléculas con glicosilación incompleta o aberrante de forma similar a la detectada en los glicolípidos (16,20).

1.1.3.- Bases enzimáticas de la glicosilación aberrante : En tumores experimentales inducidos por carcinogénesis vírica o química se ha detectado un bloqueo de la actividad de determinadas glicosiltransferasas (1,2). Por el contrario son muy reducidos los casos

en que aparecen moléculas de neosíntesis no presentes en la célula normal, y en ningún caso se ha detectado la aparición de mecanismos enzimáticos nuevos. Así, por ejemplo, en fibroblastos 3T3 murinos transformados mediante *Roux Sarcoma virus* se ha detectado la activación de las glicosiltransferasas responsables de la síntesis del globósido Gb3, síntesis silente en los fibroblastos normales (5), en hepatocitos de rata transformados se detecta la síntesis de fucosil-GM1, síntesis inactiva en el hepatocito normal (7). Por otra parte la presencia de mucinas con un elevado grado de ramificación puede ser debida a la activación de una GlcNAc transferasa que puede sintetizar la estructura GlcNAc β 1-4Man.

La regla general es que un enzima activo en la célula normal experimenta un desmesurado incremento de su actividad y provoca un exceso en la síntesis de producto; sin embargo en algunos casos se han detectado glicoconjugados aberrantes sin que se haya identificado el enzima responsable de su síntesis. Por ejemplo, no existe ninguna correlación entre la actividad de la ácido siálico-CMP sialiltransferasa y el acumulo de GM3 detectado en fibroblastos de pollo transfectados con *Roux Sarcoma virus* (21). Es muy posible que algunos cambios no estén provocados por la actividad de las glicosiltransferasas citoplasmáticas y si estén provocados por la existencia de complejos de glicosiltransferasas en la membrana .

1.1.4.- Significado biológico de la glicosilación aberrante : Se considera a los oncogenes como responsables del proceso de malignización celular y por lo tanto debe existir una correlación entre la activación de uno o mas oncogenes y la aparición de un fenotipo de membrana aberrante. Inicialmente los oncogenes fueron descritos a nivel de retrovirus, de forma silente en células normales y activados en la célula tumoral (22-24). Hakomori describió en 1977 un correlación positiva entre la activación del oncogen *src* y la síntesis aberrante de GM3, posteriormente se describió la correlación entre la activación de *ras* y la síntesis del globósido Gb3 en fibroblastos humanos (9).

Por regla general, se trata de datos fragmentarios y restringidos a unos pocos tipos de tumores, por lo que es difícil establecer una correlación precisa entre la activación de los oncogenes y la glicosilación aberrante. Si tenemos en cuenta que la transformación celular es consecuencia de la activación de mas de un oncogen, es muy posible que exista una correlación positiva entre la activación de varios oncogenes y la glicosilación aberrante.

Muchos de los cambios descritos reflejan alteraciones en el desarrollo y diferenciación celulares, así por ejemplo, muchos carbohidratos detectados en la célula cancerosa también se han detectado en diversas etapas de la diferenciación celular (10,25,26). La glicosilación aberrante puede, también, ser causa directa de los fallos en la comunicación y reconocimiento celular responsables de la capacidad invasiva y metastásica de la célula tumoral (27,28).

La glicosilación aberrante afecta especialmente a los glicolípidos, y estos alteran sustancialmente la fluidez y rigidez de la membrana celular (29-31) y pueden afectar a la función de muchos receptores de membrana (32-34). Sin embargo, no ha sido posible demostrar ninguna correlación positiva entre todos estos mecanismos. De la misma forma los cambios en el patrón de glicosilación afectan a la conformación de las proteínas de membrana, su *turnover* celular y su antigenicidad (35-37).

1.2.- T.A.A. GLICOLÍPIDICOS

1.2.1.- Antígenos glicolípidicos en tumores experimentales : La presencia de lactoneotetraosilceramida (nLc4) en fibroblastos de hámster transformados por el virus *polioma* y su ausencia total en la célula normal es un buen modelo para el estudio de la neosíntesis de TAA (4). Si se implantan estos fibroblastos transformados en hámsteres adultos, no tan solo se magnifica la expresión de nLc4 sino que es posible detectar anticuerpos anti-nLc4 en suero de los animales trasplantados (11), de forma parecida las células del linfoma murino L-5178 implantado en ratones DBA/2 muestran una acumulación del globósido Gb3, mientras que las células normales no lo expresan en cantidades detectables, así mismo se han descrito dos anticuerpos monoclonales anti-Gb3 obtenidos a partir de linfocitos de estos animales. La administración de uno de estos anticuerpos inhibe *in vivo* el crecimiento del tumor (38). Mas recientemente se han utilizado ratas WKA hiperinmunizadas con el fibrosarcoma singénico KMT-17 para producir anticuerpos monoclonales anti-Gb3 y anti- α -galactosil-nLc4 (39). Glicolípidos obtenidos de células infectadas con SV40 y encapsulados mediante liposomas han demostrado ser inmunogénicos en ratones e inhiben el crecimiento del tumor después de la inmunización con los mismos (40).

Estos datos indican que determinados glicolípidos, no tan solo se acumulan en la

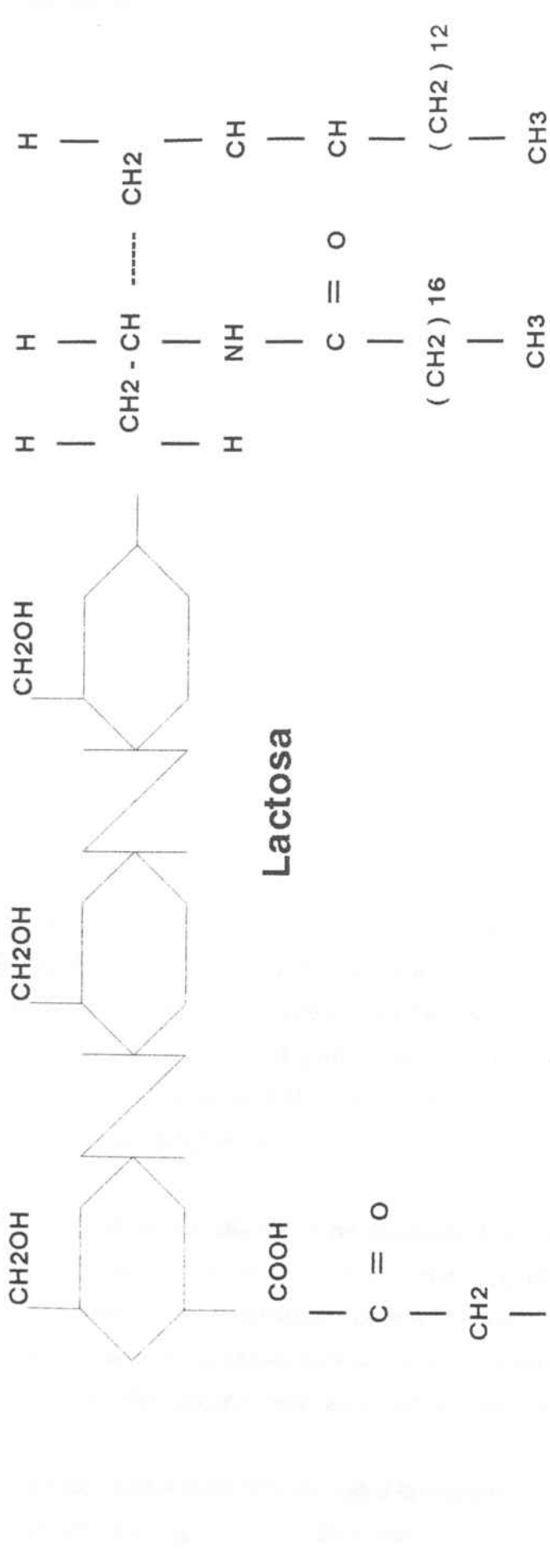
membrana de la célula transformada, sino que demuestran ser inmunogénicos, es decir que el sistema inmune del huésped reconoce como no propias este tipo de moléculas y que por lo tanto pueden ser utilizadas como moléculas diana para la inmunoterapia oncológica.

1.2.2.- Antígenos tumorales humanos : La irrupción de la metodología de obtención de los anticuerpos monoclonales ha permitido identificar una gran cantidad de antígenos de naturaleza glicolipídica asociados a tumores humanos de muy diverso origen. Las características químicas de estos T.A.A. glicolipídicos se describirán de acuerdo con las tres estructuras básicas : Gangliósidos, globósidos y la serie lacto y neo-lacto (Tabla 1).

Serie	Estructura básica	Localización preferente
Gangliósidos	Neu5Ac α (2→n)Gal β (1→4)Glc β (1→1)Cer	Sistema nervioso
Globósidos	Gal α (1→4)Gal β (1→4)Glc β (1→1)Cer	Eritrocitos
Lacto	Gal β (1→3)GlcNAc β (1→1)Cer	Diversa
Neo-lacto	Gal β (1→4)GlcNAc β (1→1)Cer	Desconocida

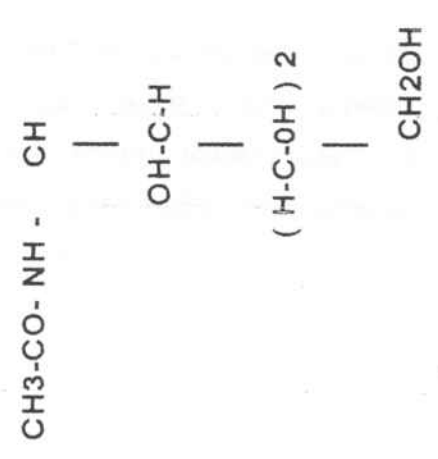
Tabla I : Características básicas de las series ganglio, globo, lacto y neo-lacto y localización preferente en la célula normal.

1.2.2.1.- Gangliósidos : Uno de los grupos de tumores mas estudiados hasta el momento es el melanoma y tumores de origen neuroectodérmico muy relacionados con él, como por ejemplo el neuroblastoma, glioma, astrocitoma, etc. Todos estos tumores poseen un patrón de glicosilación aberrante caracterizado por un importante incremento en la concentración de gangliósidos en la membrana celular (Fig 1). El antígeno definido por los monoclonales con actividad específica anti-melanoma R24 (41), 14F9 y 1362A10 (42) y 4.2 (43) es el gangliósido GD3 (44). El GD3 presente en la célula de melanoma es, junto con el GD2, los dos gangliósidos mayoritarios en este tipo de tumores y ambos se caracterizan por poseer ceramidas de mayor longitud que las que poseen los gangliósidos aislados a partir de cerebro (45). Si bien el gangliósido GD3 se presenta en bajas concentraciones en la materia gris, es relativamente abundante en la retina (46), y en el



Esfingosina A. Graso

Ceramida



A. Siálico

Fig. 1 : Esquema básico de un gangliósido.

riñón (47), sin embargo, ninguno de los cuatro monoclonales mencionados reacciona contra células de retina o renales (43,48).

Se han descrito dos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra antígenos oncofetales (OFA-I-1 y OFA-I-2), estos anticuerpos han sido obtenidos mediante transformación por el virus de Epstein-Barr de linfocitos de sangre periférica de enfermos de melanoma (49). El anticuerpo OFA-I-1 reacciona con una amplia serie de tumores humanos de muy diverso origen, incluyendo melanoma, tumores cerebrales, y tumores de mama pero no reconoce tejidos normales. La molécula diana es el gangliósido GM2 (50). El anticuerpo OFA-I-2 define un antígeno presente en tumores neuroectodérmicos y que ha sido identificado como el gangliósido GD2 (51,52). Tanto GM2 como GD2 se hallan presentes en las células nerviosas normales.

1.2.2.1.- Síntesis normal de Gangliósidos : La estructura química básica de un gangliósido se caracteriza por la presencia de, al menos, un residuo de ácido siálico unido a la lactosil-ceramida. La síntesis normal de los gangliósidos (Fig 2) se inicia con la adición de un ácido siálico a la lactosil-ceramida para producir GM3, en una reacción catalizada por la GM3 sintetasa, posteriormente el GM3 sirve de base para producir GM2, GM1, GD1_a y GT1_a (53,54). Por un proceso diferente el GM3 puede ser convertido en GD2, GD1_b, GT1_b y GQ1_b. A su vez el GD3 puede convertirse en GT2, GT1_c, GQ1_c y GP1_c (55-56). Existe una vía complementaria de síntesis que también se inicia a partir de lactosil-ceramida para producir Gg3 (asialo-GM2) y posteriormente GM2 ; el Gg3 puede dar origen a Gg4 (asialo-GM1) y GM1. Tanto el GM1 como el asialo-GM1 pueden dar origen al Fucosil-GM1 y al Asialo-fucosil-GM1 (57).

1.2.2.3.- Síntesis aberrante de Gangliósidos : Una gran cantidad de gangliósidos se hiperexpresan en muchos tumores humanos y ello ha permitido obtener un amplio panel de anticuerpos monoclonales. La gran mayoría de estos gangliósidos están presente a nivel de trazas en la célula normal o bien se trata de productos intermedios en la síntesis final de los gangliósidos mas expresados, como son GM3 y GM1.

En 1979 Pourtakalian (48) describió la síntesis aberrante de GD3 en células de melanoma. La acumulación de GD2 y GD3 en asociación con la ausencia de gangliósidos de mayor tamaño sugieren un bloqueo enzimático con acumulación de precursores, estos

precursores son eliminados del citoplasma celular y expresados en la membrana (58). Por otra parte se ha descrito que tanto GD3 como GD2 pueden sufrir una acetilación aberrante a nivel del carbono número 9 del ácido siálico dando lugar a 9-O-acetil GD3 (59,60) y 9-O-Acetil-GD2 (61).

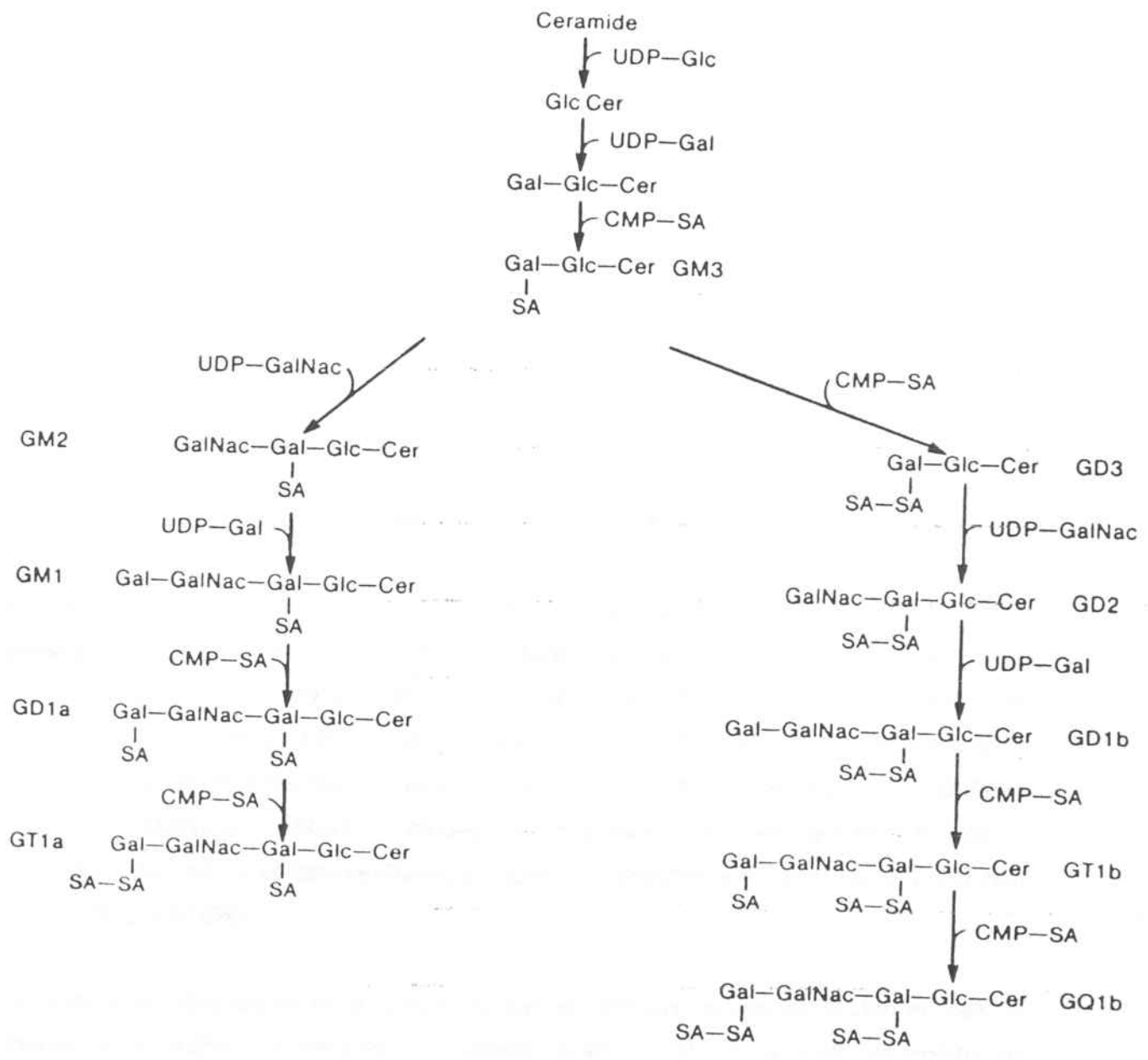


Fig. 2 : Principales vías de síntesis de los gangliósidos.

1.2.2.4.- Globósidos : El linfoma de Burkitt se caracteriza por expresar el antígeno del virus de Epstein-Barr y por expresar el globósido Gb3 (Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer) identificado por el anticuerpo 38-13 (62,63), el mismo antígeno también ha sido identificado como el responsable del grupo sanguíneo P^k. El análisis químico de las células del linfoma de Burkitt revela una importante acumulación de Gb3 en su membrana. Aunque los eritrocitos normales lo expresan en concentración moderada y los eritrocitos P^k positivos lo expresan en mayor cantidad, el anticuerpo 38-13 no reacciona con los eritrocitos normales, ni lo hace con eritrocitos del grupo P^k (64).

El antígeno Forssman (IV³ α -GalNAc-Gb4) se halla presente en los eritrocitos de muchos mamíferos, pero los eritrocitos humanos son Forssman negativos (65), sin embargo cerca de 30% de la población expresa el glicolípido de Forssman a nivel de trazas. Por otra parte cerca del 100% de los tumores gastrointestinales son Forssman positivos (66). Se han descrito varios casos de adenocarcinomas y carcinomas escamosos de pulmón que son Forssman positivos, mientras que el tejido pulmonar normal es Forssman negativo (67-70).

1.2.2.5.- Síntesis normal de Globósidos : A diferencia de los demás glicolípidos que poseen una lactosa interna, los globósidos son los únicos glicolípidos que poseen un enlace α 1 \rightarrow 4Gal en su estructura básica. La lactosil-ceramida se convierte en globotriosil-ceramida o Gb3 (Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer) por acción de la Gb3 sintetasa y posteriormente pasa a Gb4 por adición del un grupo α 1 \rightarrow 4GalNAc (71). Los globósidos constituyen el glicolípido neutro mas abundante en las células normales humanas, pero están prácticamente ausentes del tejido nervioso. La substitución del grupo α 1 \rightarrow 4GalNAc del Gb4 por el grupo α 1 \rightarrow 3GalNAc da origen al antígeno de Forssman, que es el globósido mas abundante en todos los mamíferos, excepto en los primates en donde se detecta solo a nivel de trazas (38).

Durante muchos años no se describieron mas estructuras de tipo globósido en células humanas. En 1984 fue descrito el globósido Globo-H extraído a partir de eritrocitos humanos, el enzima responsable de su síntesis es desconocido.

1.2.2.6.- Síntesis aberrante de Globósidos : Tal y como se ha descrito anteriormente el linfoma de Burkitt expresa un importante acumulo de Gb3 y se han obtenido diversos anticuerpos monoclonales inmunizando ratones con linfocitos de pacientes de linfoma de

Burkitt (62,63), esta acumulación es debida a la actividad del enzima α 1-4Gal transferasa y no a una inhibición de la degradación del Gb3 (72).

En teratocarcinomas se ha descrito la substitución del grupo GalNac terminal del Gb4 por grupos Gal β 1-3, Fuc α 1-2Gal β 1-3, y NeuAc α 2-3Gal β 1-3. Estos globósidos están definidos por los anticuerpos monoclonales SSEA-3, MBr1 y SSEA-4 respectivamente (73). La distribución de estas moléculas en la célula normal es desconocida y su vía de síntesis también.

1.2.2.7.- Series lacto y neolacto : Mas de la mitad de los glicolípidos de membrana carecen de ácido siálico y presentan el disacárido lactosa como base estructural de los mismos. Estos glicolípidos se clasifican en dos grupos : La serie lacto que posee cadenas de tipo 1 que se caracteriza por tener un grupo interno Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal, y la serie neo-lacto que posee cadena de tipo 2 con un grupo interno Gal β 1-4GlcNAc β 1-3. Ambos tipos de cadenas son los sillares estructurales de los grupos sanguíneos ABH y de los grupos de Lewis a,b,x e y.

Un elevado número de anticuerpos monoclonales específicos de adenocarcinomas de colon reconocen el glicolípidido Lewis^a (Le^a) o su derivado sializado Sialil-Le^a (74). Uno de estos anticuerpos, el N-19-9 es también específico de tumores gástricos y de páncreas. La unión del anticuerpo con su epítipo es inhibida por el suero de pacientes con adenocarcinoma de colon, pero no se inhibe con sueros de donantes sanos o con patologías gastrointestinales no oncológicas (75). El epítipo del N-19-9 fue identificado por Magnani como el glicolípidido Sialil-Le^a (76,77). El mismo antígeno puede encontrarse en el meconio de los neonatos. El suero de pacientes de adenocarcinoma de colon presenta el mismo epítipo, pero en forma de glicoproteína (78).

Los anticuerpos monoclonales específicos de tumores gástricos (WGHS 29-1), adenocarcinoma de colon (ZWG13,ZWG14 y ZWG111) (79) y los monoclonales específicos de carcinoma de pulmón de célula pequeña (55A5,534F8 y 535F12) (80,81), así como varios anticuerpos dirigidos contra leucemias promielocíticas (82-84) poseen como epítipo de reconocimiento común el glicolípidido Lewis x también conocido como hapteno-X (Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc). Anticuerpos dirigidos contra el antígeno embriogénico de ratón SSEA-1, también poseen al hapteno-X como epítipo (85,86).

Todos estos anticuerpos reconocen igualmente el hapteno-X presente en granulocitos (83), eritrocitos, mucosa de colon normal y hepatocitos normales (87). Sin embargo los adenocarcinomas de colon y muchos hepatomas se caracterizan por presentar una serie de derivados del hapteno-X como la lactofucopentaosil-III-ceramida (88,89), la difucosil-lacto-nor-hexaosil-ceramida y trifucosil-lacto-nor-octaosil-ceramida (90), derivados que están ausentes de la mucosa de colon y del hígado normales. Solo los monoclonales FH4 y ACFH12 reaccionan únicamente con los derivados di y trifucosil y no reaccionan con el hapteno-X presente en los tejidos normales (91).

1.2.2.8.- Síntesis de cadenas de tipo 1 : En el epitelio gastrointestinal y colorectal del adulto los glicolípidos con cadena de tipo 1 predominan sobre los que poseen cadenas de tipo 2, y la mayoría de estos glicolípidos se encuentran fucosilados con un enlace $\alpha 1 \rightarrow 4$ a nivel del penúltimo residuo GalNAc para formar Le^a, o con un enlace $\alpha 1 \rightarrow 2$ a nivel de la galactosa terminal para formar Le^b. Este perfil de fucosilación de las cadenas de tipo 1 se encuentra genéticamente y bioquímicamente bien definido dando lugar a los grupos sanguíneos de Lewis (92).

En muchos tumores, y especialmente en el adenocarcinoma de colon la glicosilación aberrante de las cadenas de tipo 1 se caracteriza por las siguientes reacciones :

1.- Aumento de la sialización a nivel de la galactosa terminal o bien del penúltimo grupo GlcNAc, formándose cadenas con grupos sialo $\alpha(2 \rightarrow 3)$ o grupos disialo $\alpha(2 \rightarrow 3)$ y $\alpha(2 \rightarrow 6)$. La primera estructura está reconocida por los anticuerpos K21 (93,94) y CA50 (95) preparados, respectivamente después de inmunizar ratones con células de teratocarcinoma y de adenocarcinoma de colon. La segunda estructura está definida por el anticuerpo FH9 (96), esta molécula también ha sido detectada en implantes en ratón atímico Balb/c nu/nu realizados con células del glioma humano A172 y en meconio (97).

2.- Fucosilación en posición $\alpha(1 \rightarrow 4)$ de cadenas de tipo 1 sializadas previamente en posición $\alpha(2 \rightarrow 3)$. El producto de estos dos procesos es el sialil-Le^a definido por el anticuerpo N-19-9 (74) o por el anticuerpo CSLEA-1 (98). El anticuerpo FH7 (99) reconoce el glicolípidido Disialil-Le^a (IV³NeuAcIII⁶-NeuAcIII4FucLc₄). La secuencia de reacciones enzimáticas que originan la molécula de sialil-Le^a se inicia con una sialización en posición $\alpha(2 \rightarrow 3)$ de la cadena básica de tipo 1, es decir Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 3$ Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ Glc $\beta 1 \rightarrow 1$ Cer,

seguida de una fucosilación en $\alpha(1\rightarrow4)$ por medio de la $\alpha(1\rightarrow4)$ -fucosil-transferasa, la reacción inversa nunca tiene lugar (100).

3.- Aumento de la fucosilación y coexpresión de los antígenos Le^a y Le^b . Aunque la base enzimática de este proceso es desconocida, en muchos adenocarcinomas de colon se ha detectado una fucosilación aberrante del penúltimo grupo GlcNAc y una coexpresión de los grupos A y B de Lewis (101,102).

1.2.2.9.- Síntesis de cadenas de tipo 2 : Las cadenas de tipo 2 ($Gal\beta 1\rightarrow 4GlcNAc\beta 1\rightarrow 3Gal$) son los carriers de los determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos ABH y Lewis, pero están prácticamente ausentes de los demás tejidos normales a excepción de determinados epitelios. En los eritrocitos humanos y en el epitelio del adulto las cadenas de tipo 2 presentan varias alteraciones :

1.- Elongación de la cadena por repetición del grupo $Gal\beta 1\rightarrow 4GlcNAc$ con una ramificación a nivel de la galactosa y una substitución por el grupo $Gal\beta 1\rightarrow 4GlcNAc\beta 1\rightarrow 6$ formando el antígeno I (103-106).

2.- La Galactosa terminal es fucosilada en posición $\alpha(1\rightarrow 2)$ dando lugar los determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos ABH (104,106).

3.- Sialización de la galactosa terminal en posición α y $\beta(2\rightarrow 3)$ y α y $\beta(2\rightarrow 6)$.

4.- Formación de cadenas con sialización terminal y fucosilación subterminal a nivel del grupo GlcNAc (107).

Las bases enzimáticas de estas reacciones son prácticamente desconocidas y solo se poseen algunos datos fragmentarios revisados recientemente (108).

La presencia de estructuras Le^x y Le^y en células del epitelio renal y en la mucosa gástrica fue descrita por LLoyd en 1966 (109). Mas recientemente, y mediante el uso de anticuerpos monoclonales, se ha podido estudiar la distribución de ambas moléculas en tejidos normales. Le^x se expresa en granulocitos, neutrófilos y el epitelio proximal del túbulo renal, mientras que Le^y se expresa a lo largo de toda la mucosa gástrica.

La glicosilación aberrante de las cadenas de tipo 2 constituye el cambio del patrón de glicosilación más importante en muchos tumores humanos. Se han descrito los siguientes cambios :

1.- Elongación de la cadena del antígeno I y acumulación de su forma sializada formando el antígeno sialil-I (110).

2.- Fucosilación a nivel del penúltimo grupo GlcNAc por medio de una $\alpha(2\rightarrow3)$ fucosiltransferasa, formando dimer y trimer Le^x (111). Los glicolípidos neutros más expresados por muchos adenocarcinomas humanos son lacto-fucopentaosil-III-ceramida ($III^3FucnLc_4$) o di y trimeric- Le^x , existiendo una gran cantidad de anticuerpos monoclonales contra estas estructuras. El primer monoclonal contra Le^x fue obtenido inmunizando ratones con células del teratocarcinoma murino F9 y define el hapteno-X muy expresado en el estadio de mórula de los embriones murinos, por lo que recibió el nombre de "stage-specific embryonic antigen-1" o SSEA-1 (112), posteriormente fueron descritos los anticuerpos SSEA-2, SSEA-3 y SSEA-4 que reconocen derivados del antígeno Le^x (113), más tarde Hakomori describió la existencia de este antígeno en adenocarcinomas de colon humanos (82). El anticuerpo FH4 reconoce dimer- Le^x , no presenta reacción cruzada con la forma monomérica y muestra un elevado grado de especificidad para adenocarcinomas de colon (107,114), mientras que anticuerpos específicos de la forma monomérica reaccionan fuertemente con granulocitos y neutrófilos.

Muchos tumores acumulan series de glicolípidos con la molécula de Le^y como sillar fundamental. Esta estructura es sintetizada por la acción conjunta de las $\alpha(1\rightarrow2)$ y $\alpha(1\rightarrow3)$ fucosiltransferasas sobre la cadena base de tipo 2. Varios anticuerpos específicos de Le^y reaccionan contra adenocarcinomas gástricos (115), de mama (116) y de colon (117). Uno de estos anticuerpos, el AH6, reconoce tumores de colon, pero también reconoce débilmente el epitelio del colon ascendente y transversal normales, siendo negativo con colon descendente y recto (118). Otros anticuerpos reconocen derivados de Le^y que se expresan en adenocarcinomas de colon. Algunos anticuerpos son específicos de moléculas con dimer y trimer (extended) Le^y , con o sin grupos fucosil $\alpha 2\rightarrow3$ internos, por ejemplo el anticuerpo KH1 reconoce trifucosil- Le^y (119) y los anticuerpos CC1 y CC2 son específicos de extended- Le^y ; los tres anticuerpos son específicos de adenocarcinoma de colon y no muestran reacción cruzada con células de colon normal (120).

En algunos tumores aparecen formas sializadas de Le^x, no habiéndose detectado la forma sializada de Le^y (121). Estas formas sializadas son reconocidas por los anticuerpos FH6 (91) y CSLEX-1 (122). El anticuerpo FH6 es específico de la forma extended del sialil-Le^x, con o sin fucosilación interna, mientras que el segundo anticuerpo reconoce cualquier derivado sializado de Le^x. La secuencia de la síntesis enzimática de sialil-Le^x es similar a la descrita para sialil-Le^a, es decir la $\alpha(2\rightarrow3)$ fucosil-transferasa actúa solo sobre cadenas de tipo 2 previamente sializadas y nunca lo hace directamente sobre la moléculas de Le^x (121).

1.3.- T.A.A. GLICOPROTEICOS

Las glicoproteínas presentes en la membrana de la célula tumoral presentan glicosilación aberrante en los residuos terminales de las cadenas glucídicas, unidas a residuos de asparagina por enlaces N-glicosídicos o a residuos de serina o treonina mediante enlaces O-glicosídicos (12-15).

Muchas de las estructuras son las mismas que las detectadas en glicolípidos, aunque existen antígenos que están expresados únicamente en glicoproteínas. Los T.A.A. presentes en glicoproteínas se han clasificado en 4 grupos. El primero consiste en antígenos de la serie lacto, cuyos epítomos están presentes tanto en glicoproteínas como en glicolípidos, aunque cuantitativamente su expresión es mas elevada en forma de glicoproteínas, especialmente en el caso de las mucinas. El segundo grupo de antígenos esta formado exclusivamente por glicoproteínas tipo mucina que expresan epítomos únicos y no compartidos con glicolípidos. Estos antígenos están presentes en tumores de pulmón, colon, ovario y mama y su epítomo es especialmente rico en ácido siálico, aunque muchos de ellos no han podido ser identificados ni aislados. El tercer grupo esta integrado por grupos mono y disacáridos unidos O-glicosidicamente a residuos de serina o treonina; este grupo está integrado exclusivamente por los antígenos T, Tn y sialil-Tn. El cuarto y último grupo de antígenos se encuentra asociado a fibronectinas, y su epítomo está formado por cadenas peptídicas cuya inmunogenicidad se mantiene por O-glicosilación de residuos de treonina de las cadenas peptídicas.

1.3.1.- Antígenos de la serie lacto expresados en mucinas y glicoproteínas : El antígeno Sialil-Le^a, definido por el anticuerpo N-19-9 y presente en el suero de pacientes con

tumores gastrointestinales, fue detectado inicialmente asociado a una glicoproteína de alto peso molecular, clasificada inicialmente como una mucina (78). El antígeno Sialil-difucosil-Le^x, definido por el anticuerpo FH6, también se presenta asociado a una glicoproteína de tipo mucina. Este antígeno es soluble en ácido perclórico y se eluye en el volumen vacío de una columna de Sepharosa 4B. En individuos sanos el mismo epítipo se encuentra en concentraciones muy bajas y no es soluble en ácido perclórico, es decir que en función de la existencia o ausencia de células transformadas, el mismo epítipo se presenta asociado a una u otra glicoproteína (72).

Los epítipos Le^x o Le^y se han detectado unidos al antígeno carcinoembrionario (CEA) en muchos caso de tumores de colon. En algunos casos el CEA lleva el epítipo Le^y definido por el anticuerpo AH6, y en otros casos lleva el epítipo dimer-Le^x definido por el anticuerpo FH4 (123).

En tumores escamosos de pulmón se presenta un antígeno glicoproteico asociado a una mucina de alto peso molecular definido por el anticuerpo 43-9F (124). El epítipo reconocido por este anticuerpo ha sido identificado como Le^a, aunque posiblemente sea una molécula híbrida Le^a/Le^x (125).

1.3.2.- Antígenos T, Tn y Sialil Tn : El antígeno T , o antígeno de Thomsen-Friedenreich, fue originalmente descrito como un receptor de eritrocitos panaglutinables, es decir aglutinados por cualquier suero de un donante normal, esta panaglutinación es debida a la presencia de anticuerpos anti-T en el suero de mas del 90% de la población adulta (126). Dado que el antígeno suele presentarse de forma críptica, el tratamiento de eritrocitos humanos con neuraminidasa pone de manifiesto la presencia de antígeno T (127). El antígeno es un disacárido unido a serina o treonina (Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr). La expresión del antígeno T esta desenscriptada y aumentada en mas del 90% de casos de tumores de páncreas, pulmón y mama (128,129).

El antígeno Tn se obtiene por perdida del grupo Gal terminal del antígeno T y se expresa preferentemente en tumores escamoso de pulmón y gástricos. En 1985 se obtuvieron dos anticuerpos monoclonales, NCC-Lu-35 y NCC-Lu-81, específicos de células de carcinoma escamoso de pulmón. Ambos anticuerpos reconocen el antígeno Tn y reconocen positivamente el 70% de los tumores de pulmón y mas del 90% de los tumores de

estómago (130).

La acción de una $\alpha(2\rightarrow6)$ sialiltransferasa sobre el antígeno Tn, provoca la síntesis del antígeno sialil-Tn. Se trata de un antígeno con una distribución muy heterogénea entre todos los adenocarcinomas humanos, aunque su expresión esta especialmente elevada en adenocarcinomas de páncreas y colon. La principal fuente de obtención de Sialil-Tn es la mucina de las glándulas submaxilares de cordero (OSM) y inmunizando con esta mucina se han obtenido una gran cantidad de anticuerpos monoclonales contra sialil-Tn, de entre los que destacan los anticuerpos TKH-1 y TKH-2 que muestra una elevada especificidad por tumores gástricos, de colon y páncreas y nula reactividad con tejidos normales (131).

1.3.3.- Otros T.A.A. glicoproteicos : Existe una gran cantidad de anticuerpos monoclonales obtenidos después de inmunizaciones con células tumorales o bien con membranas de las mismas que son específicos de tumores humanos y especialmente reactivos con tumores de colon, pulmón y mama. Los epítomos reconocidos por estos anticuerpos están asociados a glicoproteínas y mucinas y en muchos el epítomo definido no se conoce.

La serie de anticuerpos DUPAN, específicos de cancer de páncreas, reconocen glicoproteínas y mucinas con pesos moleculares superiores al millón. Su reactividad es sensible al tratamiento con sialidasas y proteasas y los epítomos reconocidos están unidos a la cadena peptídica por enlaces O-glicosídicos (132).

Una serie de anticuerpos específicos de cancer de mama han sido obtenidos mediante dos pautas de inmunización distintas, por una parte se ha inmunizado con células provenientes de biopsias, y por otra parte inmunizando con glicoproteínas obtenidas a partir de la leche materna. Se trata de anticuerpos que reconocen epítomos glucídicos expresados en mucinas de alto peso molecular, en muchos caso superior a los 2 millones, y algunos de ellos reconocen la cadena peptídica de la mucina.

Debida a la extrema heterogeneidad y complejidad de estos antígenos asociados a mucinas y glicoproteínas, ninguno de los epítomos ha sido identificado, con la excepción de los compartidos con glicolípidos y la serie del antígeno T. Recientemente se han identificado los genes que codifican la secuencia peptídica de estos antígenos y en algunos casos se

han clonado. Algunas de las proteínas codificadas por estos genes reaccionan con anticuerpos obtenidos por inmunización con células tumorales o con extractos de las mismas. Muchos de los anticuerpos que definen mucinas asociadas a tumores están dirigidos contra el núcleo peptídico de las mismas, sin duda debido a su mayor inmunogenicidad y a la facilidad de su procesamiento por el macrófago (133-136).

Todos los epítomos glucídicos asociados a mucinas y glicoproteínas muestran una tendencia a ser liberados al suero y a los espacios extracelulares, por lo que en muchos casos sus anticuerpos específicos poseen utilidad diagnóstica.

1.4.- MODIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE GRUPO SANGUÍNEO EN TUMORES HUMANOS.

Los antígenos de grupo sanguíneo constituyen el mayor grupo de aloantígenos en humanos y están expresados tanto en los eritrocitos como en las células epiteliales. Dado que la gran mayoría de tumores derivan de células epiteliales, los cambios y aberraciones producidos en este tipo de antígenos constituyen un importante capítulo en la biología tumoral.

1.4.1.- Delección de determinantes A y B y acumulación de precursores : La alteración más frecuente en la expresión de grupos sanguíneos en pacientes oncológicos es la delección de los antígenos A y B (137). Estos cambios también se presentan en las displasias premalignas con un elevado grado de desorganización celular (138,139).

La síntesis incompleta de las cadenas de tipo 2 de los antígenos A y B provoca una acumulación del antígeno I_i (140), sin embargo la inmunogenicidad del antígeno I_i es dependiente del carácter secretor o no secretor del tumor (139). La mucosa oral se caracteriza por una muy buena organización de la arquitectura de los carbohidratos presentes en el espacio extracelular, esta arquitectura se desorganiza como consecuencia de la pérdida de los epítomos terminales del antígeno A y por acumulación de cadenas H de tipo 2 (141). La síntesis incompleta de los antígenos de grupo sanguíneo ABH, también puede implicar la acumulación de cadenas de tipo 1 sin acumulación del antígeno I_i (142).

1.4.2.- Antígenos incompatibles : Hace más de 50 años se describió un caso de presencia de antígenos de grupo A en un paciente de adenocarcinoma de colon cuyo grupo

sanguíneo era O (137). Estudios mucho mas recientes (143-144) muestran que dicho antígeno no es exactamente igual al epítipo A normal, por lo que recibe el nombre de *A-like*. A partir de glicolípidos extraídos de hepatomas ha sido posible aislar un hexasacárido que reacciona con anticuerpos anti-A, no reacciona con anticuerpos anti-Frossman y migra con una banda única en cromatografía de capa fina (TLC). Este glicolípido es degradado por la α -N-acetilgalactosaminidasa y por espectrometría de masas se le asignado la secuencia GalNAc α -Hex-HexN-R, pero carece del residuo de fucosa que se encuentra en antígeno A normal . Así mismo en muchos casos de adenocarcinoma se ha descrito la existencia α -GalNAc transferasa anormal que podría transferir el grupo GalNAc terminal al esqueleto del antígeno A (144).

Un 15% de pacientes de adenocarcinomas expresan auténticos antígenos del grupo A cuando en realidad su sangre es de otro grupo. La presencia del antígeno A se ha demostrado por inmuno-TLC y también se ha demostrado la existencia del enzima α -GalNAc transferasa. Se da la coincidencia de que la incidencia de adenocarcinomas es mas elevada en la población del grupo A, que en la de los demás grupos sanguíneos. Sin embargo la base biológica de este desequilibrio es desconocida, aunque es posible que en individuos del grupo O y B cuando expresan antígenos del grupo A, estos antígenos son reconocidos por el sistema inmune y el tumor es eliminado.

1.4.3.- Antígenos P, P₁ y P^k : Otro caso interesante de la existencia de grupos sanguíneos incompatibles fue descrito por Levine y colaboradores en 1951 . Un paciente de 66 años con cancer gástrico con genotipo sanguíneo PP, sufrió una regresión completa del tumor después de recibir por error una transfusión de 25 ml. de eritrocitos P normales incompatibles con los suyos, el paciente sobrevivió 22 años sin ningún signo ni de recurrencia ni de metástasis, aunque el título de anticuerpos anti-PP₁P^k aumentó mas de 100 veces, sufrió una severa reacción hemolítica y su suero aglutinaba eritrocitos de cualquier grupo sanguíneo, excepto los del suyo propio. Muestras de tejido tumoral extraído por biopsia fue liofilizado y analizado descubriéndose la presencia de un glicolípido que presentaba reacción cruzada con anticuerpos anti-P (145).

2.- RESPUESTA INMUNOLÓGICA ANTITUMORAL

Tanto en pacientes oncológicos como en tumores experimentales inducidos en animales, los tumores parecen crecer sin ningún tipo de obstáculo ni control por parte del sistema inmune, sin embargo en ambos modelos es posible detectar reacciones inmunológicas y anticuerpos específicos frente a la célula tumoral. Además en modelos experimentales se han podido aislar linfocitos con capacidad de transferir resistencia al tumor en animales "naive" y de provocar reacciones de DTH mediante transferencia celular (146-153). A pesar de estas reacciones inmunológicas, en muchos casos el tumor sigue creciendo debido a la existencia de mecanismos de escape.

Es este capítulo describiremos los mecanismos de inicio de la respuesta antitumoral, las fases y mecanismos efectores de esta respuesta y el papel de la inmunidad humoral.

2.1.- INMUNOGENICIDAD TUMORAL

Para desencadenar una respuesta inmune, sea del tipo que sea, es preciso la existencia de un antígeno, y en nuestro caso es preciso que la célula tumoral sea antigénica. Tal y como se ha comentado en el capítulo anterior la búsqueda de antígenos específicos de tumores ha frustrado grandes esperanzas en la inmunología tumoral y hasta el momento no ha sido posible detectar ningún antígeno que se exprese exclusivamente en la célula tumoral, a excepción de los antígenos de rechazo. Los tumores experimentales inducidos por vía vírica o mediante carcinogénesis química poseen una inmunogenicidad elevada (154), sin embargo los tumores espontáneos poseen una escasa o nula inmunogenicidad.

Independientemente de los T.A.A. descritos en el capítulo anterior, existen cuatro tipos de antígenos que pueden estar relacionados con la inmunogenicidad tumoral : a) moléculas relacionadas con el MHS, b) proteínas relacionadas con virus y oncogenes c) los antígenos de rechazo y finalmente d) los antígenos únicos.

2.1.1.- Moléculas relacionadas con el MHS : Una gran cantidad de tumores, tanto a nivel experimental en ratones como a nivel humano, son deficientes en cuanto a su expresión

de antígenos asociados al MHS (155). A nivel experimental se ha demostrado que la reexpresión de antígenos de clase I implica un incremento en la inmunogenicidad del tumor y en la benignidad del pronóstico (156).

En ratones C57/BL6 trasplantados con el tumor singénico de pulmón 3LL, negativo para la expresión del antígeno K^b, se ha observado que la transfección del gen que codifica para dicho antígeno provoca la eliminación de las metástasis y una disminución en el tamaño del tumor primario (157,158). Estudios parecidos se han realizado con el mismo tumor pero transfectándole el gen del alelo HLA-Cw3 e implantando el tumor en ratones transgénicos C57/BL6-HLA-Cw3. Los resultados indican que solo el tumor que expresa el antígeno Cw3 es rechazado (155).

De este tipo de ensayos se deduce que algunos alelos de los antígenos de clase I pueden mediar la presentación de péptidos a las células T-citotóxicas y a las células NK, sin embargo, en ningún caso se ha logrado detectar respuesta humoral frente a estos péptidos.

En muchos casos la reexpresión de los antígenos de clase I puede inducirse mediante interferón gamma (157), ello hace pensar que la pérdida de expresión de los antígenos del MHS puede ser debida a la pérdida de factores activadores de su transcripción (159) o bien a un bloqueo de la síntesis de la β 2microglobulina (160). La transfección de genes del sistema murino H-2 provoca la reexpresión del alelo, pero es frecuente la existencia de incompatibilidades en la reasociación entre el péptido del H-2 y la molécula de β 2microglobulina, lo que provoca la expresión de un antígeno no funcional. Sería interesante conocer si esta expresión no funcional puede estar relacionada con la sensibilidad mostrada por estos tumores a las células T citotóxicas y NK (161).

Si la expresión de antígenos de clase I esta muy disminuida en la célula tumoral, la expresión de antígenos de clase II es prácticamente nula, tanto en tumores primarios como en metástasis. Solo el grupo de Koprowski describe un aumento de la expresión de HLA-DR en algunos melanomas (162).

2.1.1.- Proteínas relacionadas con virus y oncogenes : Una gran parte del conocimiento actual acerca de la biología celular y molecular de los mecanismos de transformación

neoplásica es el resultado del descubrimiento de los oncogenes a principios de la década de los 80. Sin embargo la función exacta de la activación del oncogen en el inicio y mantenimiento de las neoplasias todavía esta en discusión (163). Una gran mayoría de los oncogenes identificados hasta el momento, codifican para factores de crecimiento o para receptores de los mismos (164-168), cuya expresión está notablemente aumentada en la célula tumoral. Unos pocos oncogenes, como mutaciones puntuales de ras (164) o el oncogen abl (170), codifican para moléculas que son ligeramente distintas en la célula neoplásica.

A principios de la década de los 60, dos grupos independientes (171,172) describieron que ratones inmunizados con polioma virus o con células transformadas por este virus podían rechazar la implantación de tumores inducidos por polioma, pero no otros tipos de tumores. Así mismo esta rechazo podía ser transferido a animales "naive" mediante transferencia de células esplénicas o ganglionares. Trabajos sucesivos demostraron que otros tumores murinos causados por virus-DNA o RNA mostraban comportamientos semejantes (163). Así mismo se describió que los antígenos expresados por estas células transformadas eran diferentes a los antígenos capsulares de los virus responsables de su transformación (173). Estudios posteriores identificaron al antígeno causado por la transformación mediante SV40, como el antígeno T (174). Este antígeno había sido identificado previamente mediante técnicas serológicas y era necesario, aunque no suficiente, para mantener el fenotipo maligno de las células transformadas. El antígeno se localiza preferentemente a nivel de la membrana nuclear mientras que en la membrana citoplasmática se expresa a bajos niveles (175). En un principio resulta sorprendente que este antígeno se exprese a nivel de la membrana nuclear, sin embargo en trabajos mas recientes se ha visto que algunos antígenos nucleares y citoplasmáticos son procesados en la célula y transportados a la membrana plasmática para ser expresados asociados a péptidos codificados por el MHS de forma que pueden constituir dianas para los linfocitos T-citotóxicos (174).

A nivel de neoplasias humanas existen antígenos homólogos a los descritos en ratones. El virus de Epstein-Barr induce la expresión de un antígeno nuclear en el linfoma de Burkitt (176), así mismo algunas leucemias T expresan antígenos nucleares codificados por virus de la familia HTLV (177) . Virus del grupo de los papiloma-virus también codifican antígenos que se expresan en carcinomas cervicales (178). Así mismo bastantes

hepatomas expresan el antígeno de la hepatitis B . Desde el punto de vista terapéutico y profiláctico la escasa incidencia de los tumores víricos y la elevadas tasas de mutación de los virus hacen prácticamente inviable un uso terapéutico de la respuesta inmune frente a estos antígenos.

La activación de un oncogen puede inducir la aparición de antígenos tumorales de dos posibles formas. En primer lugar, proteínas codificadas por los oncogenes pueden actuar como antígenos tumorales. En segundo lugar las proteínas codificadas por oncogenes pueden inducir la expresión de una gran variedad de antígenos, como sucede en el caso de melanocitos humanos, en los que la transfección del oncogen ras provoca el incremento en la expresión de GD3 (179).

Muchos antígenos codificados por oncogenes están, directa o indirectamente, relacionados con los procesos de proliferación celular o con el mantenimiento del proceso de malignización. En algunos casos la proteína codificada por el oncogen es idéntica a su homóloga expresada por la célula normal, como por ejemplo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) codificado por el oncogen sis (168).

Frecuentemente las diferencias entre ambas proteínas son suficientes como para ser reconocidas por el sistema inmune. El oncogen neu codifica para una proteína semejante, pero no idéntica al "epidermal growth factor" (180), esta proteína codificada por neu esta presente en células embrionarias y en células del individuo adulto, aunque en una concentración mas baja que la del EGF normal (181). Dado que el oncogen neu se halla activado en gran cantidad de adenocarcinomas humanos, esta proteína codificada por él podría ser una buena diana para efectos inmunoterapéuticos (182). Se han descrito anticuerpos monoclonales contra el producto de neu con actividad anti-tumoral, tanto *in vivo* como *in vitro* (183). Esta actividad anti-tumoral es consecuencia del efecto citotóxico del anticuerpo sobre la célula tumoral y no por efecto de las células NK ni de macrófagos citotóxicos. La inmunización de ratones con el producto del oncogen neu de rata provoca inmunidad frente a tumores de ratón que presentan el oncogen neu activado, sin embargo no se ha logrado demostrar la inmunidad con el oncogen neu autólogo, desconociéndose la razón de esta tolerancia (184).

Existen datos parecidos a los descritos hasta aquí con los productos de los oncogenes myc (167), abl (170) y ras (185-186), sin embargo en ningún caso ha sido posible obtener una respuesta inmunológica intensa frente a estos antígenos y es difícil detectar anticuerpos séricos frente a los mismos.

2.1.3.- Antígenos de rechazo : Desde hace tiempo se ha descrito la existencia de antígenos expresados por tumores experimentales inducidos por carcinogénesis química o por radiación ultravioleta. Estos antígenos son los responsables del rechazo del tumor cuando se implanta en un huésped singénico y solo son reconocidos en el contexto de su asociación con el MHS. Estos antígenos han recibido el nombre de antígenos de rechazo (187).

El tratamiento mutagénico in vitro de células tumorales genera variantes celulares altamente inmunogénicas (188). Debido a la falta de capacidad tumorigénica de estas líneas celulares se las ha llamado tum⁻, en contrapartida a las células originales tumorigénicas o tum⁺. La existencia de estos antígenos tum⁻ fue demostrada in vivo mediante técnicas inmunológicas. La transfección de células tumorales con los genes que codifican los antígenos tum⁻ resulta en una reversión del fenotipo celular y una pérdida de la capacidad tumorigénica (189). Recientemente ha sido posible identificar dos genes que codifican para estos antígenos de rechazo (190).

La demostración de la existencia de antígenos de rechazo en tumores humanos es difícil por la imposibilidad ética de realizar experimentos de implantación tumoral. Existen algunos datos obtenidos por Anichini con melanoma y respuesta autóloga por medio de linfocitos T citotóxicos (191).

Diversos estudios con pacientes de melanoma han mostrado que co-cultivando linfocitos de sangre periférica con células autólogas de melanoma es posible obtener linfocitos T-citotóxicos capaces de lisar melanoma autólogo e incapaces de lisar células B autólogas transformadas por EBV, fibroblastos o células K562. Clones T con similares características se han aislado a partir de linfocitos infiltrados en tumores (192,193). Sin embargo es preciso demostrar que estos antígenos están presentes in vivo en el paciente y no son un artefacto del co-cultivo. Otro requerimiento para probar la existencia de antígenos de rechazo en tumores espontáneos humanos, es la demostración de que estos antígenos

están completamente ausentes de las células sanas del organismo y que no se corresponden con ningún proceso autoinmune. Esta incógnita puede ser resuelta con el análisis genético de los genes que codifican para estos antígenos en humanos.

2.1.4.- Antígenos únicos : El grupo de Old (194,195) en un estudio con 85 pacientes de melanoma describen la existencia de anticuerpos en el suero de seis pacientes que solo reconocen las células de melanoma autólogas y no reconocen otros melanomas ni cualquier otro tipo celular. Cinco de estos anticuerpos son IgG y el sexto es IgM. Estos anticuerpos reconocen antígenos proteicos con un peso molecular medio de 90.000 daltons. Estos antígenos también se han detectado en tumores experimentales de origen químico o bien mediante radiación ultravioleta y su expresión es debida a la síntesis errónea de proteínas de membrana cuyos genes han sido mutados como efecto secundario del proceso de carcinogénesis (196). Su bajo nivel de incidencia y su caracter autólogo les hace inviables como dianas adecuadas para inmunoterapia.

2.2.- FACTORES QUE AFECTAN A LA INMUNOGENICIDAD DE LOS T.A.A. GLUCÍDICOS

La inmunogenicidad de los antígenos de naturaleza glucídica esta definida por su propia estructura química, pero también es función de su organización y densidad en la superficie de la membrana de la célula tumoral. Dado que la composición química de este tipo de antígenos tumorales no es nueva, y solo en muy pocos casos se han detectado antígenos con estructuras no existentes en la célula normal, caso de los grupos sanguíneos incompatibles o de los antígenos Tn, el sistema inmune debería considerarlos como antígenos propios, y solo pueden ser reconocidos debido a una organización y disposición espacial distinta a la que adoptan en las células normales.

Los principales factores que afectan a la inmunogenicidad de estos antígenos son la densidad de expresión, la pérdida de cripticidad, el grado de sialización y fucosilación, la posible aparición de isómeros no presentes en la célula normal y en el caso de los glicolípidos la existencia de ceramidas aberrantes que puedan presentar al carbohidrato en una disposición espacial distinta. Por lo que respecta a los antígenos expresados en mucinas hay que tener en cuenta la expresión de mucinas con un grado de glicosilación incompleto, lo que origina neo-antígenos muy inmunogénicos.

Podemos agrupar todos estos antígenos en tres grandes grupos en función de sus características de expresión y sus posibilidades de reconocimiento por parte del sistema inmune.

1.- Algunos glicolípidos están presentes en la célula en cantidades considerables, pero es difícil detectarlos por métodos inmunológicos, o bien permanecen ocultos los mismos. Muchos glicolípidos son inmunológicamente conspicuos en los eritrocitos fetales y en células transformadas por oncogenes víricos, sin embargo la cantidad total del globósido Gb4 o del gangliósido GM3 en estas células es superior a la expresada por sus correspondientes células normales. Una situación parecida se detecta en el linfoma de Burkitt con el globósido Gb3 (197). Por el momento se desconocen las razones de esta cripticidad, pues este tipo de antígenos no logran ser reconocidos casi nunca por el sistema inmune.

2.- Algunos anticuerpos solo son capaces de reconocer a su antígeno, especialmente si este es un glicolípido, cuando se expresa en la superficie célula con una densidad determinada, o bien cuando está unido a una fase sólida. El anticuerpo SSEA-1 no reacciona con el glicolípido Le^x si este está en forma soluble; en un ensayo de lisis de liposomas, la lisis no se produce si la concentración de glicolípido es inferior a 10 μ molar o superior a 15 μ molar (198).

3.- Muchos antígenos glicolipídicos que están muy expresados en la célula tumoral, también están expresados a bajas concentraciones en la célula normal. La administración de anticuerpos del isotipo y afinidad adecuadas inhibe el crecimiento del tumor sin afectar la función de las células normales que expresan los mismos antígenos. El linfoma murino L5178, que expresa grandes cantidades del globósido Gb3, inhibe completamente su crecimiento cuando se administra al animal el anticuerpo anti-Gb3, IgG3, D10G11 y los animales sobreviven normalmente al tratamiento a pesar de que Gb3 se expresa en muchas células normales y en los eritrocitos (199). De forma parecida, el crecimiento del melanoma singénico B16 implantado en ratones C57BL6 se inhibe por la administración del anticuerpo anti-GM3, IgG3, DH2 y los animales no presentan ningún tipo de efecto secundario, todo y la elevada expresión de GM3 en el cerebro y diversos órganos (200).

La posible implicación del primer tipo de antígenos en cualquier respuesta inmunológica

anti-tumoral esta descartada debido a la incapacidad del sistema inmune para reconocerlos. La segunda clase de antígenos representa moléculas altamente expresadas en la célula tumoral y expresadas en bajísimas concentraciones en la célula normal. Estos antígenos parecen ser reactivos en función de su densidad celular. Entre estos antígenos cabe destacar dimer y trimer Le^x, trifucosil Le^y, sialil-difucosil-Le^y, monosialil y disialil-Le^a, GD3, GD2 y los antígenos T y Tn. Finalmente la tercera clase de antígenos se halla presente tanto en células normales como en células tumorales, y la diferencia radica en el distinto grado de expresión. Este grupo está integrado por los antígenos GM3, la serie de los globósidos y los monómeros de los antígenos de Lewis.

El distinta distribución de estos antígenos en la superficie de la célula tumoral no tan solo posee implicaciones a nivel de su reconocimiento por anticuerpos monoclonales, sino que también posee implicaciones a nivel de los mecanismos biológicos desencadenados por la reacción antígeno-anticuerpo. Las células efectoras, macrófagos y red anti-idiotípica son capaces de reconocer estos cambios en la organización de los glicolípidos y glicoproteínas de membrana. Este reconocimiento inmunológico es tanto mas importante si tenemos en cuenta que a excepción de los polisacáridos bacterianos, todos los carbohidratos poseen una baja inmunogenicidad y es difícil desencadenar una respuesta inmune efectiva contra ellos.

El estado actual de los conocimientos no permite dar una razón concreta que explique la razón de esta inmunogenicidad, aunque existen distintas aproximaciones posibles :

2.2.1.- Densidad de las cadenas de carbohidratos : La estructura espacial de las moléculas de carbohidrato puede variar si estos están expresados en la membrana con una elevada densidad formando clusters o placas, esta variación puede ser suficiente para que los antígenos sean reconocidos como moléculas no propias. El anticuerpo Ca-1 reconoce un cluster de sialosiloligosacárido presente en una determinada región del polipéptido Ca (201). Una estructura parecida se forma cuando los glicolípidos no se distribuyen de forma homogénea en la membrana celular y forman agrupaciones (202); la proximidad entre las moléculas crea interacciones estéricas lo que provoca cambios conformacionales, ello es especialmente manifiesto en el caso de los gangliósidos debido a las repulsiones existentes entre los distintos residuos de ácido siálico.

2.2.2.- Cripticidad de los antígenos : En la célula normal muchos glicolípidos que no están expresados en gran cantidad quedan enmascarados o por glicolípidos mas abundantes, o bien por glicolípidos que poseen la porción glucídica mas larga. Dado que los glicolípidos de cadena corta minimizan su expresión en la célula tumoral (203) y los de cadena larga maximalizan su expresión, su exposición al sistema inmune es mas evidente al perder su cripticidad. Las glicoproteínas que rodean al glicolípido también encriptan al mismo en la célula. El glicolípido al aumentar su densidad desplaza a las glicoproteínas y es accesible desde el exterior (204).

2.2.3.- Composición de la ceramida : La reactividad de los glicolípidos de membrana está en función de la longitud de las cadenas de ácido graso insertas en la bicapa lipídica de la membrana, así como de la presencia o ausencia de grupos α -hidroxilo en dichas cadenas. Las diferencias en la composición de la ceramida pueden provocar que la porción glucídica sobresalga mas de entre todas las moléculas de la membrana o bien que adopte una conformación diferente debido a la libertad de giro del enlace glicosídico $\beta(1-1)$ entre la glucosa terminal del carbohidrato y el grupo CH_2OH terminal de la ceramida.

En una ceramida normal las dos cadenas de ácido graso suelen tener la misma longitud cuando se trata de ácidos de cadena corta, entre 14 y 18 carbonos, mientras que estas cadenas son desiguales cuando el ácido graso posee mas de 22 carbonos, por regla general una cadena es entre 1,2 y 1,4 veces mas larga que la otra.

La existencia de ceramidas hidroxiladas es bastante frecuente en la célula tumoral, dando lugar a ácidos grasos α -hidroxilados o bien a 3-hidroxi esfingamina, ello provoca que la porción glucídica cambie su conformación de mínima energía y que el eje del carbohidrato deje de ser perpendicular al eje de la ceramida. Sin embargo, el mecanismo por el que la reactividad inmunológica de estos antígenos cambia al cambiar la ceramida es desconocido.

En la bibliografía se han encontrado varios datos que avalan esta teoría. La reactividad e inmunogenicidad de liposomas con fucosil-ceramida de cadenas largas o α -hidroxiladas es muy superior a la de liposomas con el mismo antígeno pero con cadenas de ácido graso mas cortas o no hidroxiladas (205). El GD3 aislado a partir de melanomas presenta ceramidas con cadenas mucho mas largas que su equivalente extraído de cerebro, aunque

no hay datos publicados acerca de modificaciones en su inmunogenicidad (45).

2.2.4.- Antígenos exclusivos : La posible existencia de antígenos exclusivos de la célula tumoral ha sido un campo de trabajo durante muchos años, sin embargo, la evidencia de que uno de estos antígenos presente una estructura única y no expresada en la célula normal es muy limitada. Algunos ejemplos vienen dados por la presencia de antígenos del grupo A en pacientes de los grupos O o B (102CA), la presencia del antígeno de Forssman en individuos Forssman negativos (59CA) y la existencia del antígeno P₁ en individuos p (206). Sialil-Le^a, los antígenos con cadenas polifucosiladas de tipo 2 y el sialil- α 2-2-fucogangliósido también podrían ser considerados como antígenos exclusivos debido a su bajísima concentración, incluso nula o indetectable, en los tejidos normales.

Lamentablemente la incidencia de estos antígenos citados es escasa y su distribución es muy heterogénea, por lo que difícilmente pueden tener un papel relevante en la respuesta inmunológica anti-tumoral.

2.3.- RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL

En 1985 el grupo de De Weger (153) estableció una hipótesis basada en inmunoterapia experimental en ratones, que divide la respuesta inmune en dos fases (Fig 3) : Una fase de iniciación, etapas 1 a 4, y una fase efectora ,etapas 5 a 11. Después de la inyección de un tumor singénico en ratones, las células tumorales estimulan a los linfocitos T, estos linfocitos T estimulados producen factores T específicos, como el "specific macrophage-arming factor" (SMAF), etapas 1 y 2. Este factor activa al macrófago (etapa 3) .El macrófago activado fagocita la célula tumoral (etapa 4) y los restos celulares son procesados por las células presentadoras de antígenos (etapa 5). Las células presentadoras de antígenos presentan los antígenos asociados a tumores (T.A.A.) a los linfocitos T en un sistema restringido por el sistema principal de histocompatibilidad y algunos antígenos son presentados de forma libre al linfocito B (etapa 6). Esta presentación de antígenos provoca la síntesis de factores T no específicos como el factor activador de macrófagos (MAF), factor inhibidor de macrófagos (MIF), factores quimiotácticos y interleukinas (etapa 7). Por su parte el linfocito B secreta anticuerpos específicos contra los T.A.A. (etapa 8). Los factores quimiotácticos atraen a las células mononucleadas al lugar del tumor (etapa 9) y se activa su citotoxicidad (etapa 10), por su parte las interleukinas activan a la célula

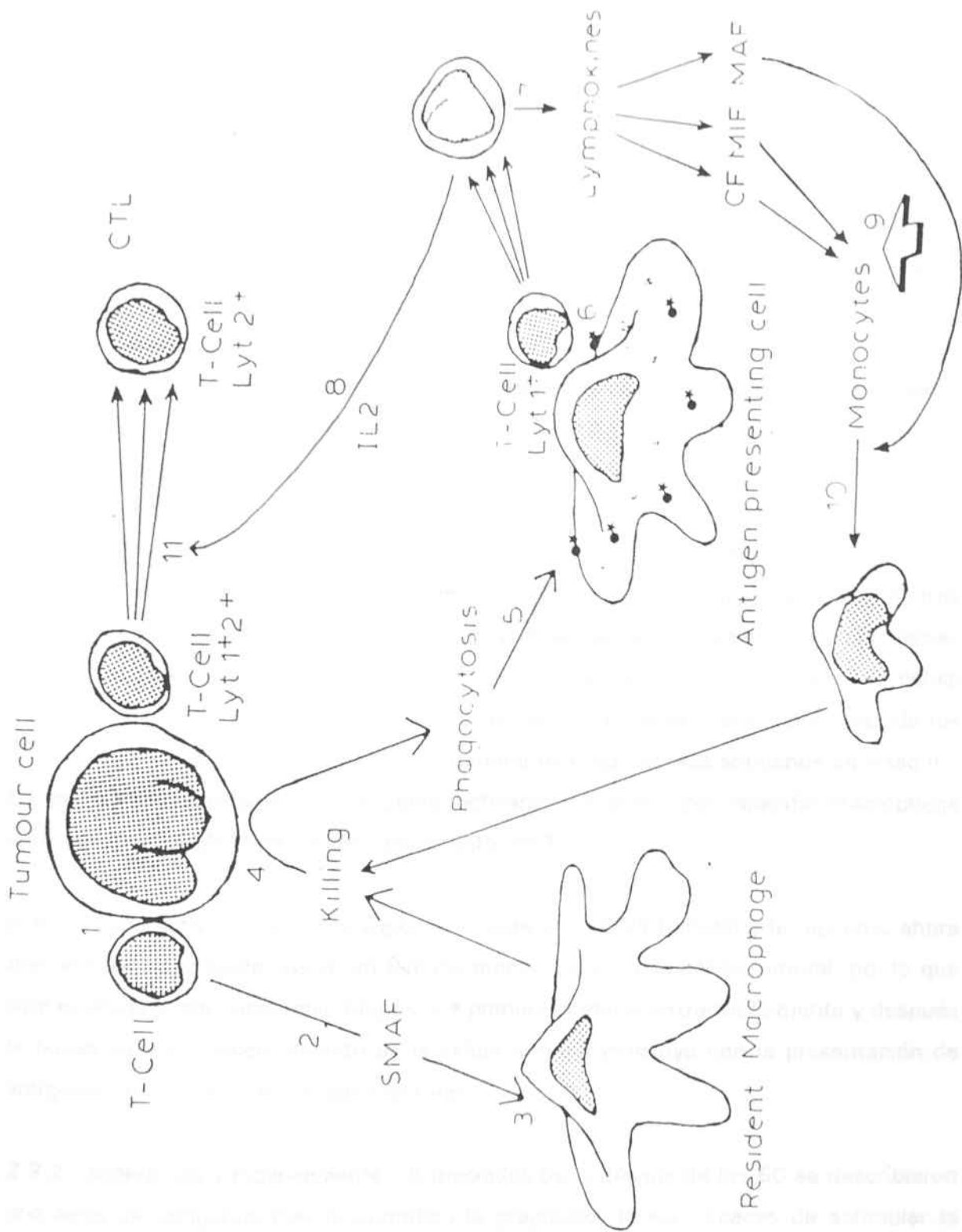


Fig. 3 : Esquema de la respuesta inmune anti-tumoral propuesta por De Weger. Ver texto para detalles.

T-citotóxica (etapa 11). Estas dos últimas etapas efectoras se ven potenciadas por la presencia de anticuerpos específicos de la célula tumoral que facilitan la activación de la citotoxicidad mediada por complemento y la citotoxicidad celular anticuerpo dependiente.

2.3.1.- Presentación del antígeno : Los antígenos tumorales descritos hasta el momento son antígenos de tipo particulado que requieren ser procesados previamente por las células presentadoras de antígeno (APC). Este procesamiento implica la fagocitosis de la célula tumoral, su degradación y la re-expresión de los antígenos en la membrana de las APC.

La célula tumoral no es fagocitada por el macrófago sin la opsonización previa de la misma por parte de anticuerpos específicos (207), este dato sugiere que previamente a la presentación del antígeno, el tumor debe hallarse opsonizado por anticuerpos y a su vez estos anticuerpos solo son producidos en una etapa posterior a la presentación del antígeno. Este círculo vicioso puede romperse en el caso de la existencia de antígenos T-independientes que puede activar directamente al linfocito B sin la presencia de linfocitos T-helper. La activación del linfocito B por parte de antígenos tumorales T-independientes será discutida mas adelante en esta memoria. El reconocimiento directo de la célula tumoral por el linfocito T-helper solo es posible dentro de la restricción por parte de los antígenos de clase II del MHS y la célula tumoral rara vez expresa antígenos de clase II. En ratones el macrófago también puede activarse por medio del "specific macrophage arming factor" (SMAF) sintetizado por el linfocito T (208).

El macrófago activado reconoce específicamente a la célula tumoral y la fagocita, ahora bien el macrófago suele poseer un tamaño menor que el de la célula tumoral, por lo que esta es atacada por varios macrófagos que primero la matan extracelularmente y después la fagocitan. Este procesamiento de la célula tumoral concluye con la presentación de antígenos tumorales a las células efectoras.

2.3.2.- Activación T-independiente : A mediados de la década de los 60 se describieron una serie de antígenos que presentaban la propiedad de ser capaces de estimular la síntesis de anticuerpos sin necesidad de la colaboración de los linfocitos T. Estos antígenos recibieron el nombre de antígenos T-independientes y la respuesta inmunológica frente a ellos se caracteriza por los bajos títulos obtenidos, la restricción casi exclusiva de la respuesta en forma de IgM, la escasa respuesta en IgG y si aparece IgG casi siempre

es del isotipo IgG3, y la incapacidad de desarrollar reacciones de hipersensibilidad retardada (209).

Los antígenos T-independientes son, en su gran mayoría, antígenos de tipo polimérico que presentan repeticiones de una misma estructura en forma de tandems como, por ejemplo los polisacáridos bacterianos. El mismo antígeno presentado en forma monomérica no es inmunogénico. En general se trata de antígenos débiles y escasamente inmunogénicos aunque debidamente presentados al sistema inmune pueden provocar una respuesta inmune intensa (210). Las copias repetitivas de un mismo epítipo en cada molécula de antígeno favorece la formación de enlaces cruzados multivalentes y estables con las inmunoglobulinas de membrana del linfocito B, estos enlaces provocan el "capping" de las inmunoglobulinas y la activación y diferenciación del linfocito B hacia célula plasmática.

Cheresh describe que en la superficie de la célula tumoral los glicolípidos no se distribuyen de manera homogénea sino que se distribuyen formando agrupaciones o clusters en determinadas zonas de la membrana celular, mientras que otras zonas no presentan clusters (202). Estos clusters podrían mimetizar una estructura polimérica y activar directamente al linfocito B.

2.4.-MECANISMOS EFECTORES DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL

En todas las teorías clásicas sobre la respuesta inmune anti-tumoral se ha asignado a la célula T y sobre todo a los linfocitos T-citotóxicos un papel central dentro los mecanismos efectores antitumorales (211). Sin embargo solo hay evidencias parciales de que estas teorías sean completamente ciertas y todas obtenidas a partir de un número limitado de modelos experimentales murinos (212). La extrapolación de estos datos a los tumores humanos se basa en el aislamiento de clones T-citotóxicos con actividad anti-tumoral (213).

En los tumores de origen vírico la función del linfocito T-citotóxico esta fuera de toda duda según los datos obtenidos mediante ensayos de transferencia celular (214). La situación es menos evidente en otros modelos. Ensayos realizados con el linfoma murino FBL3 demuestran que la transferencia celular requiere utilizar linfocitos T-helper además de los citotóxicos (215). Este dato no es exclusivo de este modelo y parece depender del tipo

de tumor de los antígenos expresados por el mismo. Un problema añadido y no solucionado es la existencia de células T-supresoras en el huesped y que en los modelos experimentales provocan el crecimiento incontrolado del tumor aunque exista una respuesta antitumoral (216,217).

Los resultados obtenidos mediante modelos experimentales han permitido arrojar una cierta luz sobre los posibles mecanismos de respuesta en pacientes. En un intento de aumentar la respuesta celular se han ensayado terapias basadas en el empleo de IL2 recombinante con el objetivo de estimular la actividad citotóxica. Los datos obtenidos con modelos murinos muestran que la mejor respuesta se obtiene después de incubar in vitro linfocitos T con IL2 y obtener células LAK que son transferidas al portador del tumor junto con IL2. Este tipo de inmunoterapia mediante transferencia celular se ha ensayado sobretodo en melanomas causado la regresión de algunos tumores. Existen varios ensayos clínicos en marcha dentro del campo del carcinoma de colon y el cancer renal, sin embargo los datos son muy dispersos y la terapia no es aplicable a todos los tipos de tumores. Al ser una terapia de tipo autólogo, es decir aplicable solo con los linfocitos de cada paciente tampoco es aplicable a gran escala (218).

Los modelos realizados mediante células LAK han permitido obtener algunos datos interesantes, pero los mecanismos efectores mas potentes deben de hallarse en la propia masa tumoral. Datos obtenidos a través del examen de biopsias muestran que en algunos tumores como el melanoma y los tumores de mama, es frecuente la existencia de células mononucleadas que infiltran la masa tumoral y que esta infiltración suele ser un dato de buen pronóstico (219). Los infiltrados son especialmente ricos en células T, macrófagos y una pequeña proporción de linfocitos B, por otra parte es escasa o nula la presencia de células NK. Estas observaciones permiten suponer la existencia de una respuesta inmune específica que implica tanto a linfocitos T y B como a macrófagos, siendo posible aislar y estudiar la función de estas células (220). El grupo de Rosenberg es el que ha trabajado mas con estos infiltrados tumorales mediante un modelo que se basa la extracción de los linfocitos, la activación in vitro mediante IL2 de forma similar a la empleada para las células LAK y la devolución de las células al paciente. Los resultados obtenidos in vitro muestran que estas células son citotóxicas frente a células tumorales autólogas, pero no lo son frente a células heterólogas ni frente a células autólogas normales y su fenotipo se corresponde con un linfocito T-citotóxico (220). Recientemente

se han combinado este tipo de estrategias con modelos de transferencia génica (221)

Durante mucho tiempo se ha considerado que la inmunidad humoral y el linfocito B no tenían una función relevante en la inmunidad tumoral. Sin embargo es difícil establecer un modelo de inmunidad que pase por alto la función de los anticuerpos. Los datos obtenidos mediante anticuerpos circulantes en paciente y mediante anticuerpos monoclonales, ya revisados en el capítulo anterior, muestran la existencia de inmunidad humoral frente al tumor.

En los linfomas murinos BCL1 y A31 los experimentos realizados mediante transferencia pasiva demuestran que la malla anti-idiotípica inhibe el crecimiento tumoral, mientras que la célula T parece no actuar (222). Se han obtenido datos parecidos con el linfoma 38C13 (223).

Los distintos mecanismos efectores dependen del tipo de antígeno que reconoce el sistema inmune. En los casos que el antígeno es vírico o bien es producto de un oncogén mutado, la presentación del antígeno requiere la existencia de moléculas asociadas al MHS y los mecanismos efectores se basan en el linfocito T-citotóxico, mientras que los anticuerpos frente a la proteína intacta no son eficaces. Para una buena respuesta humoral el antígeno debe presentarse en la superficie celular y no debe secretarse al espacio extracelular.

Se considera que los anticuerpos por si solos son incapaces de destruir a la célula tumoral, excepto en el caso de aquellos anticuerpos capaces de desencadenar procesos de muerte celular programada o apoptosis (224,225). La apoptosis es un proceso de muerte y lisis celular completamente independiente de cualquier mecanismo citotóxico celular o mediante complemento (226). La apoptosis se observa cuando la muerte celular es una parte de los procesos de embriogénesis, en los procesos de metamorfosis, en la atrofia celular endocrino-dependiente (227) y en la regresión tumoral (228).

Por otra parte, el anticuerpo puede mediar la destrucción del tumor por medio de la activación del complemento, la citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente y activando las células inflamatorias. Un dato importante obtenido a partir de algunos ensayos clínicos de inmunización pasiva, es el isotipo del anticuerpo efector. Solo los isotipos IgG3 e IgG2a

en el ratón y IgG1 en el hombre son capaces de activar todos los mecanismos efectores mencionados, especialmente la citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente, a la que se la considera el mecanismo efector mas importante (229). La principal implicación de esta restricción en la actividad citotóxica es la necesidad de provocar la aparición de estos isotipos en respuesta inmunológicas con actividad anti-tumoral.

3.- LIPOSOMAS :

Hace mas de 25 años Bangham y su grupo describieron que dispersiones acuosas de fosfolípidos y otros lípidos como el colesterol mezclados en condiciones adecuadas pueden formar bicapas concéntricas cerradas que encierran moléculas hidrosolubles en su interior y son relativamente impermeables al flujo de iones a través de sus membranas (230), estas bicapas concéntricas han venido recibiendo el nombre de liposomas. Por otra parte moléculas liposolubles o bien moléculas conjugadas a lípidos pueden incorporarse en las bicapas y exponer la parte no lipídica de la molécula en la superficie exterior del liposoma (Fig 4).

A lo largo de los últimos años se ha producido un gran incremento en el uso de los liposomas como modelos de dinámica de membranas, aplicaciones cosméticas, bioquímica clínica y mas recientemente como sistemas de liberación retardada de fármacos. Durante la última década su utilización ha llegado a las técnicas de transfección dando lugar a la llamada lipotransfección. Uno de los campos en que la aplicación de los liposomas ha implicado un mayor avance es su utilización como vacunas sintéticas, pues de una parte pueden mimetizar a las membranas celulares y estimular el sistema inmune, y por otra parte pueden encapsular adyuvantes o modificadores de la respuesta biológica como son las interleuquinas, interferones, etc.

Existe abundante bibliografía en forma de revisiones monográficas acerca de las propiedades de los liposomas como modelo de dinámica de biomembranas (231,232); anclaje de las proteínas de membrana en la célula (233); transportadores de moléculas hidrosolubles y su interacción "in vivo" con las distintas células y órganos (234-239) y su uso como adyuvantes inmunológicos (240,241). En este capítulo describiremos no tan solo los tipos de liposomas mas utilizados y su composición

química, sino que también se incidirá en su interacción con las células y la biodistribución *in vivo* de los mismos.

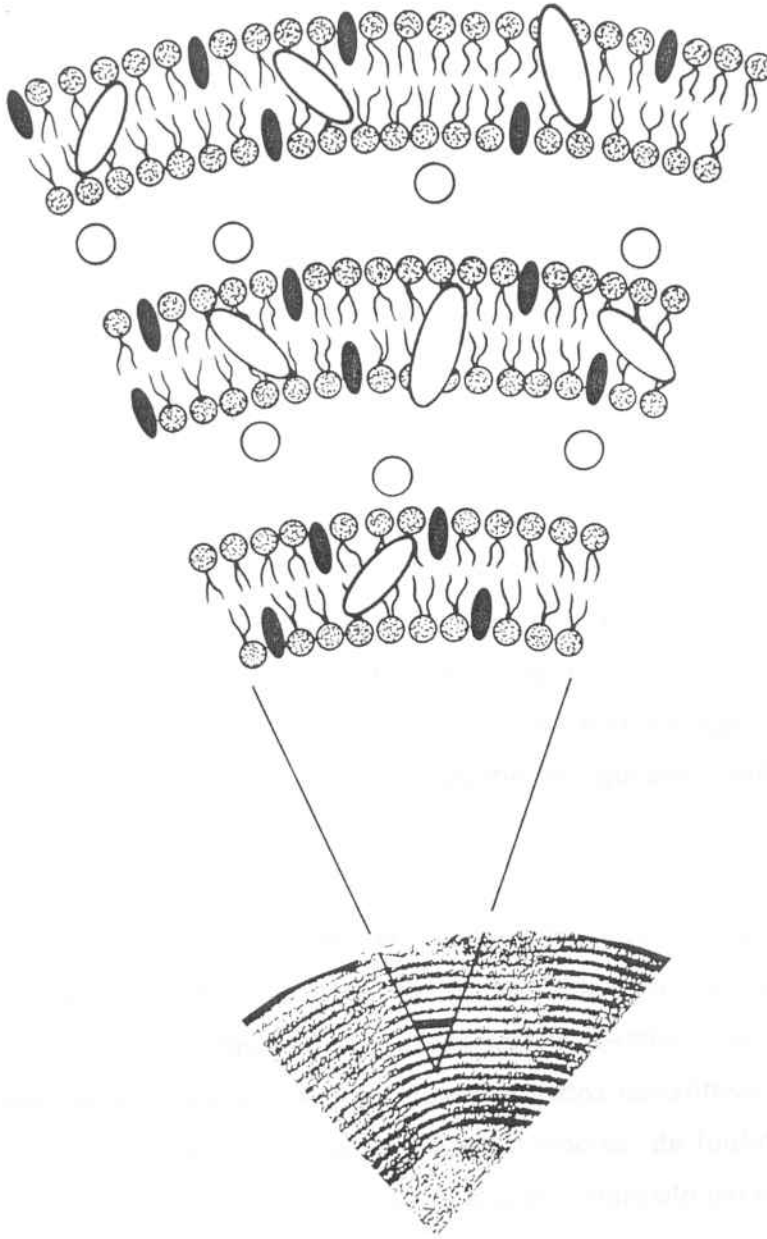


Fig 4 : Sección de una microfotografía electrónica de un liposoma cortado y teñido por contraste negativo. Representación esquemática del mismo mostrando la disposición de las bicapas lipídicas y del material hidrosoluble encapsulado.

3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA Y LÍPIDOS EMPLEADOS

En las formulaciones de los liposomas se combinan distintos tipos de lípidos. En todas las formulaciones cabe destacar fosfolípidos, esfingomielinas, ácidos grasos y esteroides.

3.1.1.- Fosfolípidos : Muchos fosfolípidos, solos o en combinación con otros lípidos pueden formar liposomas. Dependiendo de la temperatura de transición del lípido, los liposomas presentan una mayor o menor rigidez en su membrana y por lo tanto una mayor o menor fluidez de los mismos. Los fosfolípidos que contienen glicerol son los lípidos más empleados en la composición de los liposomas y pueden representar hasta el 50% de los lípidos presentes en los mismos.

La estructura general de este tipo de lípidos tiene como punto de partida el ácido fosfatídico. En la molécula de fosfolípido existe una cadena de glicerol no polar. En el carbono número 3 del glicerol, el grupo hidroxilo está esterificado con ácido fosfórico dando origen a un glicerofosfato. Los carbonos 1 y 2 están esterificados con cadenas más o menos largas de ácidos grasos. Uno de los oxígenos libres del grupo fosfato puede presentarse esterificado con alcoholes, glicerol, colina, etanolamina, serina o inositol.

Aunque el ácido fosfatídico libre se encuentra en muy pequeñas cantidades, constituye un intermediario importante en la biosíntesis de los fosfoglicéridos. Los fosfoglicéridos más abundantes son la fosfatidilcolina, también llamada lecitina y la fosfatidiletanolamina o cefalina. Ambos fosfoglicéridos constituyen los componentes mayoritarios de las membranas biológicas. En la molécula de fosfatidilserina el ácido fosfórico del ácido fosfatídico se esterifica con el grupo hidroxilo del aminoácido L-serina y en el caso del fosfatidilinositol se esterifica con un hidroxilo del azúcar cíclico del inositol. En el fosfatidilglicerol la esterificación se produce con un hidroxilo alcohólico del glicerol. Los grupos más característicos de los fosfoglicéridos se esquematizan en la tabla II.

3.1.1.- Ácidos grasos : Tal y como se ha dicho en el apartado anterior los ácidos grasos forman parte de los glicerofosfatos y son parte importante de otros lípidos, como los

Fosfolípido	Siglas	Carga	Temp. trans.
Fosfatidilcolina (huevo)	EPC	0	-7
Dilauroilfosfatidilcolina	DLPC	0	-1,8
Dimiristoilfosfatidilcolina	DMPC	0	23
Dipalmitoilfosfatidilcolina	DPPC	0	41
Diesteroilfosfatidilcolina	DSPC	0	55
1-Miristoil-2-fosfatidilcolina	MPPC	0	27
1-Palmitoil-2-esteroil-fosfatidilcolina	PSPC	0	44
1-Eesteroil-2-palmitoil-fosfatidilcolina	SPPC	0	47
Dimiristoilfosfatidilglicerol	DMPG	-1	23
Dipalmitoilfosfatidilglicerol	DPPG	-1	41
Diesteroilfosfatidilglicerol	DSPG	-1	55
Dioleoilfosfatidilglicerol	DOPG	-1	-18
Ácido dimiristoil-fosfatídico	DMPA	-1	51
Ácido dipalmitoil-fosfatídico	DPPA	-1	67
Dimiristoil-fosfatidiletanolamina	DMPE	n.d.	50
Dipalmitoil-fosfatidiletanolamina	DPPE	n.d.	60
Dimiristoil-fosfatidilserina	DMPS	n.d.	38
Dipalmitoil-fosfatidilserina	DPPS	n.d.	51
Fosfatidilserina (cerebro)	PS	n.d.	6-8
Esfingomielina (cerebro)	BSP	0	32
Dipalmitoil-esfingomielina	DPSP	0	41

Tabla II : Relación de los principales fosfolípidos empleados en los liposomas. Se indica carga a pH neutro y temperaturas de transición. (n.d. = varía en función del pH)

triglicéridos. Sin embargo, los ácidos grasos no esterificados solo se encuentran a nivel de trazas. Se han aislado varios ácidos grasos diferentes dependiendo del número de átomos de carbono en la cadena y del grado de insaturación de la misma. En la tabla III se muestran los ácidos grasos presentes en dos fosfatidilcolinas diferentes, una extraída de la clara de huevo y la otra extraída del aceite de soja. En general los ácidos grasos con un mayor grado de insaturación son más resistentes a la oxidación de los mismos.

Tipo de ácido graso	Cadena	Huevo	Soja
Ácido palmítico	16:0	32 %	12 %
Ácido palmitoleico	16:1	1,5 %	0,2 %
Ácido esteárico	18:0	16 %	2,3 %
Ácido oleico	18:1	26 %	10 %
Ácido linoleico	18:2	13 %	68 %
Ácido linolénico	18:3	0,3 %	5 %
Ácido arquidónico	20:4	4,8 %	0,1 %
Ácido dodecapentanoico	22:6	4 %	0,1 %

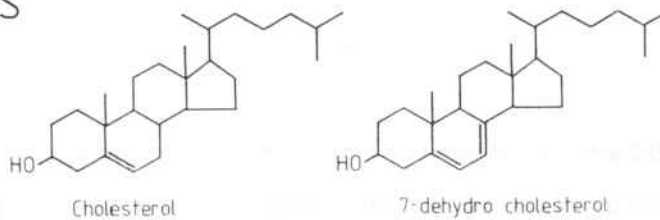
Tabla III Tipos de ácidos grasos presentes en fosfatidilcolinas según su origen, y proporciones existentes entre ellos.

3.1.3.- Esfingolípidos : A diferencia de los fosfolípidos, los esfingolípidos contienen una esfingosina. Estas moléculas son componentes importantes tanto de la célula animal, especialmente en el cerebro y en el tejido nervioso, como de la célula vegetal. Los esfingolípidos contienen una molécula de ácido graso, una esfingosina y un grupo que puede ser o bien un alcohol simple como la colina o incluso carbohidratos muy complejos. El esfingolípido más importante es la esfingomielina, que puede contener tanto fosforil-colina como fosforil-etanolamina esterificadas en el primer hidroxilo de la ceramida.

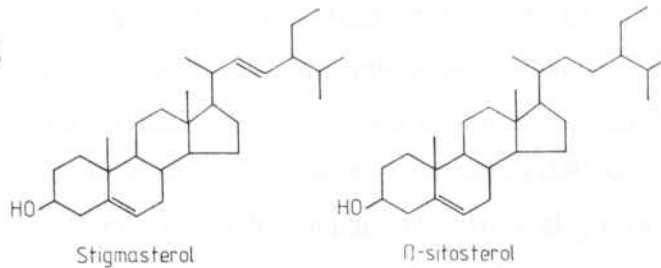
3.1.4.- Glicoesfingolípidos : El principal grupo de glicoesfingolípidos son los gangliósidos que se encuentran en la materia gris del cerebro de todos los animales superiores. Estas moléculas contienen oligosacáridos complejos con uno o mas ácidos siálicos, estos ácidos siálicos confieren carga negativa a la molécula a pH neutro.

3.1.5.- Esteroles : El esteroles mas común es el colesterol y se suele incluir en las formulaciones de todos los liposomas. Son derivados del hidrocarburo tetracíclico ciclo-pentano-perhidro-fenantreno. La inclusión del colesterol en la membrana de los liposomas logra tres importantes efectos : incrementar la fluidez de la bicapa lipídica, reducir la permeabilidad de la misma con lo que la estabilidad del compuesto encapsulado es mayor y aumentar la resistencia del liposoma frente a las lipasas séricas. Tanto el efecto de impermeabilización de la membrana como la resistencia a las lipasas son de capital importancia en todas aquellas aplicaciones de los liposomas que implican su administración por vía intravenosa.

ANIMALS



PLANTS



FUNGI

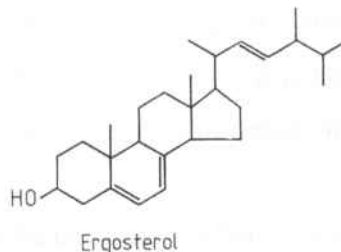


Fig 4 : Tipos de esteroides presentes en la membrana plasmática y origen de los mismos.

Los liposomas que carecen de colesterol interaccionan rápidamente con proteínas plasmáticas como la albúmina, transferrina y macroglobulinas. Estas proteínas secuestran los fosfolípidos de los liposomas provocando la degradación de los mismos. Los nombres y estructuras de los esteroídes más usados se pueden ver en la figura 4. El grupo hidroxilo en la posición 7 junto con el hidrocarburo en la posición 17 confieren polaridad a la molécula. En las bicapas lipídicas el colesterol se intercala entre los fosfolípidos con este grupo hidroxilo orientado hacia el compartimento acuoso, el anillo tetracíclico se encuentra entre los primeros carbonos de las cadenas de ácido graso intercalándose fuertemente entre ellas.

3.1.6.- Metabolización de los lípidos integrados en los liposomas : Después de la administración " *in vivo* " de los liposomas, estos son degradados de la misma forma que lo son los lípidos integrantes de la membranas biológicas. En el interior del organismo los liposomas son convertidos enzimáticamente en intermediarios metabólicos como el glicerofosfato, ácidos grasos, etanolamina, colina, acetil-CoA, etc, o bien son utilizados para mantener el "pool" de lípidos intracelulares y posteriormente reemplazar a los lípidos integrados en las membranas biológicas.

3.1.6.1.- Fosfolípidos : Los fosfolípidos son hidrolizados mediante fosfolipasas específicas. La fosfolipasa A1 degrada específicamente el ácido graso situado en la posición 1 del glicerol, la fosfolipasa A2 cataliza la adición de agua al carbono en posición 2 rompiendo la esterificación de los dos ácidos grasos con el glicerol. La fosfolipasa B es una mezcla de ambas enzimas y puede remover específicamente ambas cadenas de ácido graso. La fosfolipasa C cataliza la hidrólisis del enlace entre el ácido fosfórico con el glicerol, mientras que la fosfolipasa D rompe el grupo alcohólico de la cabeza polar del fosfolípido. Los ácidos grasos liberados por acción de las fosfolipasas entran en el "pool" celular y son utilizados como precursores para sintetizar nuevos fosfolípidos, triglicéridos, o bien son activados a acetil-CoA y ser posteriormente oxidados a CO₂, H₂O y energía por medio de la beta-oxidación.

El glicerofosfato no es degradado. Ello es debido a hecho de que es un buen aceptor de fosfatos. A nivel intracelular existe un equilibrio entre la forma de glicerofosfato y defosforilada. Estas moléculas son recicladas e incorporadas a la síntesis de nuevos fosfolípidos.

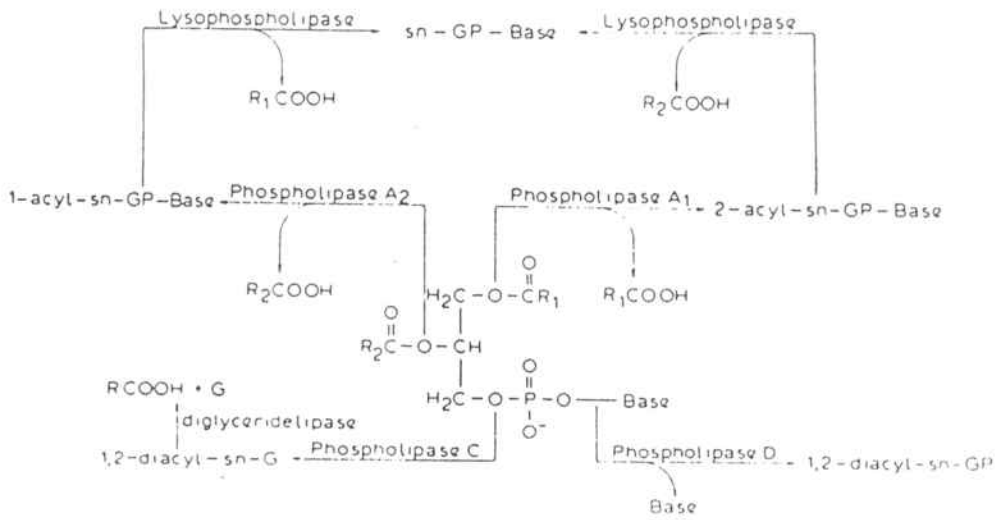


Fig 5 : Catabolismo de los fosfolípidos. RCOOG, ácido graso; P, fosfato; G, glicerol; Base = colina, etanolamina, inositol, serina o glicerol.

3.1.6.2.- Esteroles : El hígado es el principal órgano implicado en la síntesis y degradación de los esteroides en general y del colesterol en particular. Una gran proporción del colesterol hidrolizado por las lipoproteínas plasmáticas es excretada por el hígado a través de la bilis en forma de ácidos biliares y liberado al intestino como coadyuvante en la digestión de las grasas. Parte del colesterol es reabsorbido en el intestino grueso y solo una pequeña parte se excreta junto con las heces fecales. Aproximadamente un 20% del colesterol total es absorbido directamente por la mucosa intestinal.

En el lumen intestinal el colesterol es degradado por la flora bacteriana y convertido en coprostanol y eliminado junto con las heces. Finalmente menos del 1 % del colesterol se utiliza como precursor en la síntesis de las hormonas esteroideas.

3.1.7.- Precauciones en el manejo de lípidos : La característica más importante que deben reunir los lípidos empleados en la producción de liposomas es el grado de pureza de los mismos. Los lípidos de origen comercial presentan distintos grados de pureza y es imprescindible prestar atención a determinadas impurezas presentes en ellos. Pequeñas cantidades de ácidos grasos libres o de lisofosfátidos (240) pueden alterar la carga de los liposomas y la permeabilidad de sus membranas. El grado de

oxidación y la insaturación de las cadenas de ácido graso puede ser monitorizado mediante la relación entre la absorción a 232 nm y a 215 nm o bien mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico (241). Todos los fosfolípidos deben ser analizados mediante TLC o mediante HPLC . Los lípidos deben ser almacenados desecados o disueltos en cloroformo:metanol a -20°C y a ser posible en atmósfera inerte de nitrógeno o argón.

3.2.- TIPOS Y COMPOSICIÓN DE LOS LIPOSOMAS

Los liposomas pueden prepararse a partir de muy distintas composiciones de lípidos y con muy variadas proporciones entre ellos y en función de esta composición presentar unas determinadas propiedades.

Desde el punto de vista físico los liposomas se dividen en liposomas unilamelares si tienen una sola capa lipídica o bien multilamelares (MLV) si están formados por varias capas. Los liposomas unilamelares con un diámetro inferior a 100 nm reciben el nombre de "small unilamellar vesicles" (SUV), mientras que si su diámetro es superior reciben el nombre de "large unilamellar vesicles" (LUV).

El método de preparación de los liposomas influye, no solo en las características de los mismos, sino que permite clasificarlos según la tecnología empleada en su producción.

Tipo	Siglas	Tamaño
Pequeños unilamelares	SUV	0.025 - 0.10 μ
Multilamelares	MLV	0.05 - 10 μ
Fase reversa	REV	0.5 - 10 μ
Inyección en éter	EIV	0.02 - 1 μ
Congelación	FDV	> 0.5 μ

Tabla IV : Tipos de liposomas en función de la metodología empleada en su obtención y de su tamaño.

El índice de encapsulación de moléculas hidrosolubles puede variar desde algo menos del 2% para los SUV hasta cerca del 50% para los REV, solo en el caso de la encapsulación de DNA puede llegarse hasta el 70% para los REV.

3.3. PROPIEDADES DE LOS LIPOSOMAS

3.3.1.- Transición de fase : La estructura de la bicapa lipídica puede variar enormemente según la temperatura en función de la temperatura de transición de los lípidos. A diferentes temperaturas las bicapas lipídicas se presentan en diferentes fases, y la transición de una fase a otra es fácilmente detectable mediante técnicas de microcalorimetría. Los cambios mas fácilmente detectables ocurren a altas temperaturas, pues las membranas pasan de una estructura solida, mas o menos rígida a una fase mas cristalina y gelificada en donde es posible el libre movimiento de las moléculas.

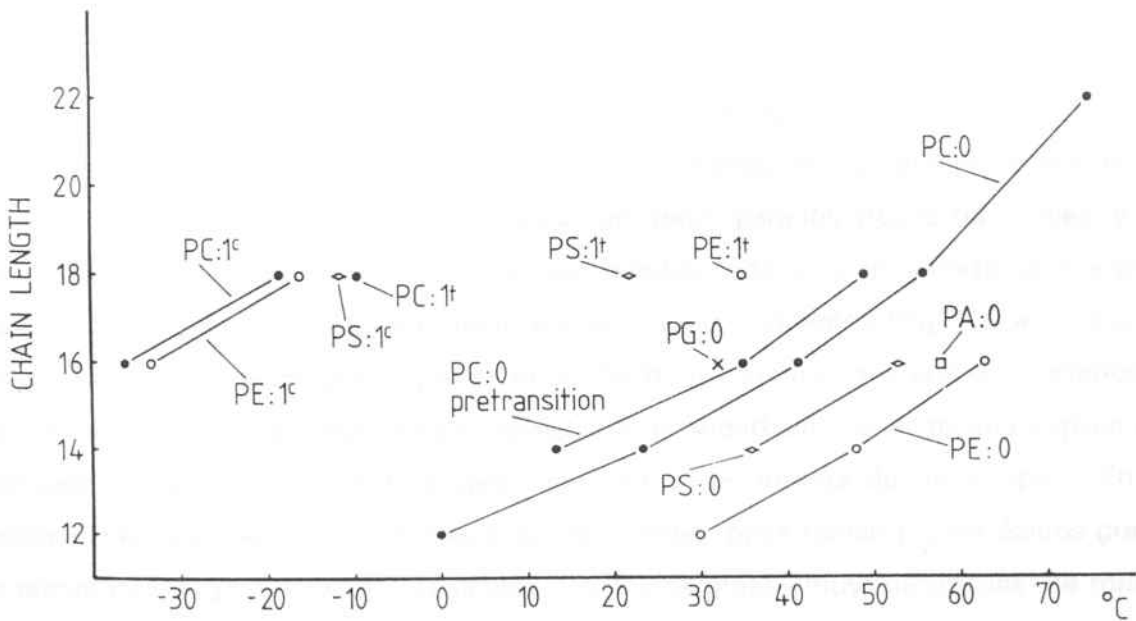


Fig 6 : Temperaturas de transición de fase de diversos fosfolípidos en función de sus distintos grupos y del tipo de ácido graso presente en su cadena.

La técnica mas ampliamente utilizada para medir los efectos de las transiciones de fase, es la microcalorimetría . La longitud de la cadena de ácido graso y su grado de insaturación, así como el tipo de grupo existente en la cabeza del lípido es de capital importancia para el valor de la temperatura de transición de la membranas lipídicas (Fig

6). Por regla general a medida que se incrementa la longitud de la cadena lipídica y su grado de insaturación se aumenta la temperatura de transición y la rigidez de la membrana.

El control de la temperatura de transición y por lo tanto de la rigidez de la membrana del liposoma es fundamental en el diseño de liposomas, pues tal y como se vera mas adelante, el tipo de membrana altera considerablemente la inmunogenicidad del liposoma, así como su interacción con distintas células y tumores.

3.3.2.- Disposición espacial de la membrana : En la bicapa lipídica las moléculas aparecen alineadas con el glicerol en posición perpendicular al plano de la membrana, y el grupo terminal en posición paralela a la misma. Esta conformación reduce al máximo la distancia entre las cargas positivas y negativas del fosfolípido. En el caso de fosfatidilcolina, la existencia de tres grupos metilo unidos a un nitrógeno cuaternario, obliga al grupo terminal de la colina a ocupar un area algo superior a la que ocuparía la unión de dos cadenas de ácidos grasos simples.

Para evitar problemas de tensiones en la superficie de la bicapa, una de las dos cadenas hidrocarbonadas del ácido graso adopta una posición ligeramente inclinada con respecto a la vertical, creando así un espacio adicional para los grupos terminales y así lograr un máximo acercamiento entre las distintas cadenas y maximizar el efecto de las fuerzas de Van der Wals y otras interacciones no covalentes (Fig 7). La inclinación de las cadenas de ácido graso, junto con el hecho de que los dos primeros átomos de carbono de la segunda cadena son paralelos a la superficie de la bicapa implica que con cadenas de igual longitud se creen agujeros en el interior de la bicapa. En las lecitinas naturales este problema se evita fácilmente, pues suelen poseer ácidos grasos de distinta longitud. Si utilizamos lípidos con ácidos grasos muy desiguales se forman bicapas con un elevado grado de interdigitación en las cadenas de ácido graso y ello hace aumentar la estabilidad e impermeabilidad del liposoma.

A medida que la temperatura aumenta las cadenas de ácido graso o tienden a adoptar conformaciones distintas a la conformación trans habitual, y el grado de separación de las dos cadenas de ácido graso se acentúa (Fig 8). Este fenómeno fuerza al ácido graso a aumentar su area, acortar su longitud relativa y por lo tanto el grosor de la bicapa decrece, esto es especialmente importante en la transición desde una fase rígida a una

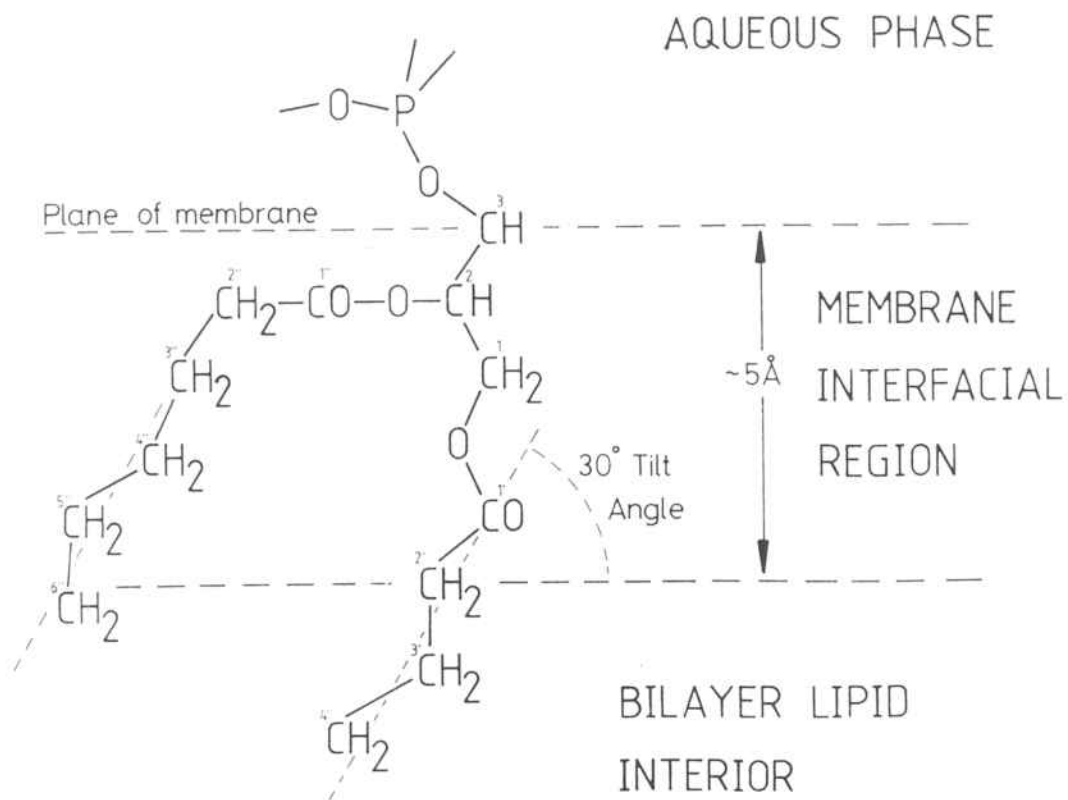


Fig 7: Esquema de la conformación espacial de la fosfatidilcolina : Este diagrama muestra la orientación del puente de glicerol perpendicular al plano de la membrana y las cadenas de ácido graso formando un ángulo de 30° con respecto a dicho plano.

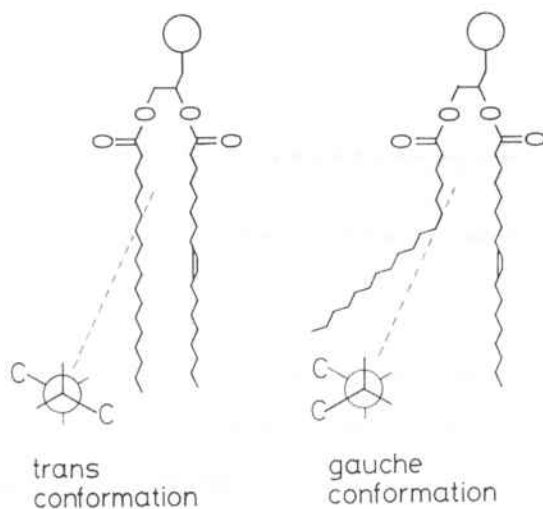


Fig 8 : Disposición de las cadenas de ácido graso según adopten una conformación trans o no.

fase quasi cristalina. En efecto la transición desde una fase rígida hasta una fase de cristal líquido no tiene lugar de forma inmediata, sino que se realiza por etapas, y en realidad implica la existencia de dos transiciones consecutivas. La primera transición y principal ocurre al llegar a la temperatura de transición del lípido e implica el abandono de la conformación trans, pero existe una pretransición, a una temperatura 5 grados inferior a la de transición, en que el grupo terminal suele adoptar conformaciones distintas a las habituales. En el intervalo de temperaturas entre ambas transiciones, la membrana adopta una apariencia ondulada que se pierde al llegar a la fase cristalina (Fig 9).

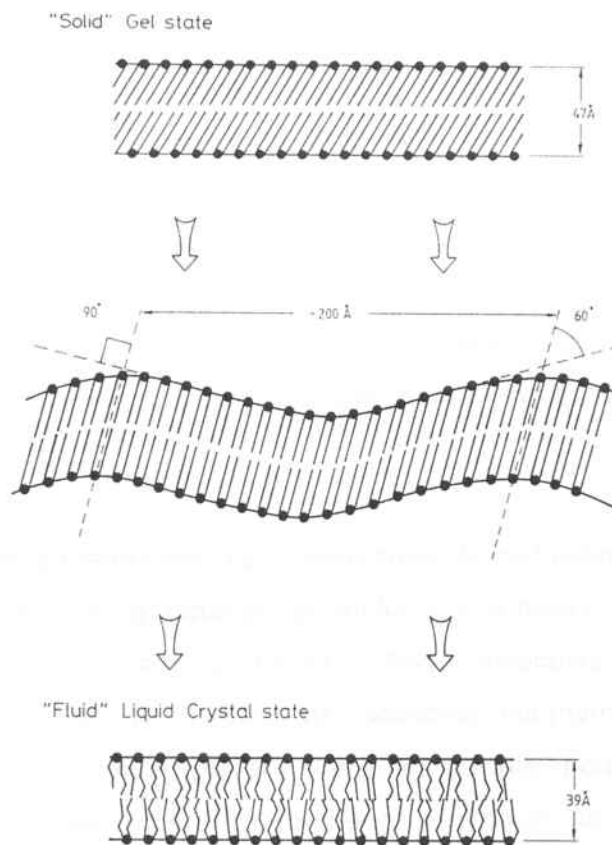


Fig 9 : Conformación espacial de una bicapa lipídica según se encuentre en una fase sólida o "fluida". En función de la temperatura de transición de los lípidos empleados en la misma, esta sera mas o menos rígida.

Incluso en temperaturas superiores a las de transición de fase, las cadenas de ácido graso adoptan una conformación muy distinta a la que poseen cuando se hallan

disueltas en solventes orgánicos o cuando forman mezclas parafínicas. El glicerol es la parte de la molécula con una libertad de movimientos mas limitada. Los grupos metilo cercanos al grupo carboxílico muestran una rigidez considerable, a partir del carbono número 9 y hacia el extremo de la molécula la rigidez decrece. Sin embargo en la interfase entre la bicapa lipídica y el medio acuoso los grupos terminales de los lípidos en general y de los fosfolípidos en particular tienden a adoptar una conformación cercana a la de una matriz bidimensional con distancias fijas entre moléculas. En realidad esta estructura matricial es una estructura cristalina tridimensional muy regular en donde la presencia de impurezas o bien defectos en el empaquetado del liposoma puede favorecer la aparición de puntos de fractura, con la consiguiente perdida del material disuelto en el compartimento acuoso interno. Estos defectos están asociados a cambios en la conformación e inclinación del ácido graso. El cambio desde una conformación trans a otra conformación mas abierta presenta una entalpía de 0,4 Kcal/mol y una energía de activación de 30 Kcal/mol. Esta pequeña variación energética significa que la rotación de los grupos metilo adyacentes dentro de una misma cadena con respecto a los grupos de las cadenas mas próximas no es completamente libre y que por lo tanto la conformación trans puede ser fácilmente recuperable. Ello hace que las transiciones de fase desde una estructura rígida hasta otra cristalina sean completamente reversibles.

3.3.3.- Permeabilidad de la membrana : Las membranas de los liposomas son membranas semipermeables en las que la difusión de moléculas a través de las mismas varia considerablemente en función su naturaleza. Para moléculas solubles tanto en disolventes orgánicos como en disolventes acuosos, las membranas de fosfolípido constituyen una barrera muy tenue; por otra parte, los solubles polares como la glucosa o de muy alto peso molecular como las proteínas atraviesan las bicapas con mucha dificultad. Moléculas pequeñas carentes de carga, como el agua o la urea pueden difundir bastante rápidamente, mientras que el paso de iones está en función del tipo de tampón en el que están disueltos los liposomas. Los protones y los grupos hidroxilo pueden atravesar la membrana con facilidad, probablemente como resultado de una transferencia de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua. Los iones con mas dificultad de paso a través de la membrana del liposoma son el sodio y el potasio, y en menor grado el cloro y los nitritos. Existen indicios de que el mecanismo de difusión los iones metálicos a través de las membranas lipídicas es ligeramente

diferente del utilizado por otros tipos de moléculas, ello es debido a que el flujo de iones metálicos es función indirecta del grado de insaturación de las cadenas de ácido graso, mientras que el flujo de glucosa aumenta ligeramente al aumentar la insaturación. Una posible explicación es el hecho de los iones metálicos fluyen a través de la membrana gracias pequeños túneles que se forman como resultado de la rotación de los enlaces entre átomos de carbono. Los dobles enlaces no pueden rotar libremente y ello podría dificultar considerablemente el paso de estos iones metálicos. La glucosa es demasiado grande para utilizar este mecanismo y requiere la existencia de fallos en la conformación de la bicapa y por lo tanto el acortamiento de la cadena de ácido graso implica una disminución en el grosor de la bicapa y facilita la existencia de puntos de fractura.

La discusión anterior es solo aplicable a liposomas en los que los compartimentos acuosos interno y externo se hallan en perfecto equilibrio. Debido a que los liposomas son membranas semipermeables, un desequilibrio entre ambos compartimentos puede generar una presión osmótica. En el caso de solutos encapsulados a altas concentraciones en el interior del liposoma disueltos en tampones de baja concentración salina, el liposoma se hincha y aumenta su volumen como consecuencia de un flujo de agua desde el exterior hacia el interior del mismo. En muchos casos la presión generada es suficiente para romper completamente la membrana con la consiguiente pérdida del material encapsulado.

3.3.4.- Estructura física de los liposomas : Independientemente de la composición química de los liposomas, que determina parámetros como la fluidez de la membrana, carga eléctrica, etc. los liposomas pueden obtenerse con diferentes tamaños y grosores de la bicapa. El tamaño puede variar ampliamente desde los 25 nm de diámetro hasta un micra o mas.

El tamaño mas reducido posible no es nunca inferior a 25 nm por ser este el mínimo tamaño posible en función del máximo grado posible de curvatura de una bicapa lipídica. Por otra parte el tamaño máximo posible esta en función de la máxima estabilidad posible para una bicapa lipídica, este tamaño está alrededor de 10 micras de diámetro, si bien es posible obtener liposomas de varias micras de diámetro mediante técnicas de fusión entre los mismos.

En función de su tamaño y del número de capas presentes en un liposoma, estos se pueden clasificar de la siguiente forma :

a) Liposomas multilamelares : Son liposomas constituidos por varias capas concéntricas con diversos espacios hidrófilos entre las mismas. Poseen un amplio abanico de tamaños que abarca desde los 100 nm de diámetro hasta una micra.

b) Liposomas unilamelares : Son liposomas constituidos por una sola bicapa y una gran espacio hidrófilo en su interior. Suelen clasificarse en tres grupos de acuerdo con su diámetro. Los mas pequeños poseen diámetros entre los 25 y los 75 nm. Los de mediano tamaño oscilan entre los 100 y 200 nm de diámetro, mientras que los de mayor tamaño poseen mas de 500 nm de diámetro.

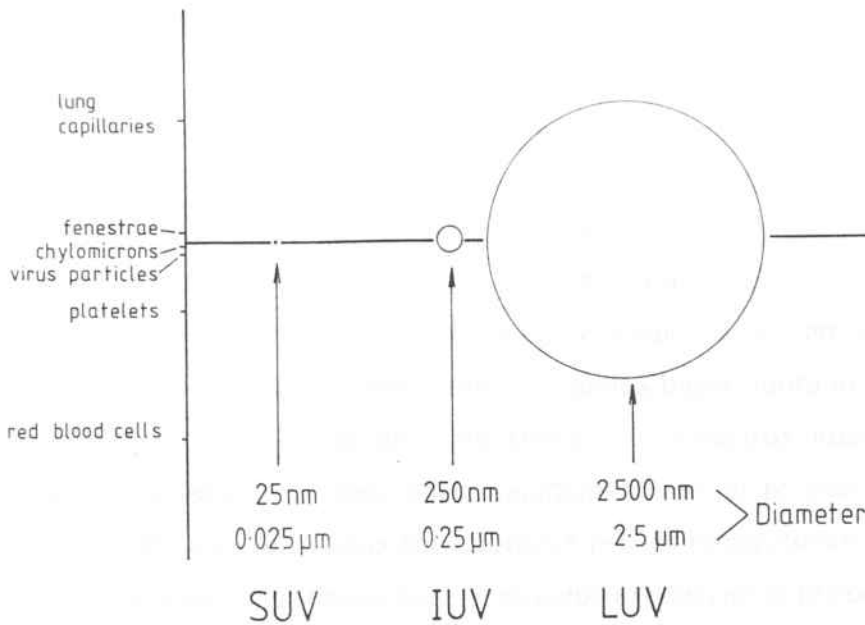


Fig 10 : Tamaño comparativo de diversos liposomas y de algunas estructuras biológicas.

En la práctica casi todos los métodos de obtención de liposomas permiten obtener una población muy heterogénea en cuanto a tamaños, especialmente dentro del rango de los liposomas de pequeño diámetro.

3.4.- INTERACCIÓN ENTRE LIPOSOMAS Y CÉLULAS :

Los liposomas pueden interactuar con células y tejidos de muy distintas formas. En

todos los casos la interacción entre liposomas y células implica, al menos, dos etapas, una primera etapa de interacción entre la membrana del liposoma y la de la célula, y una segunda etapa de fusión de membranas que implica la inserción del liposoma en la célula y liberación del material encapsulado en el citoplasma celular.

3.4.1.- Interacción entre membranas : La interacción entre la membrana del liposoma y la membrana celular puede tener lugar por transferencia entre membranas, interacción por contacto, absorción o fusión de membranas.

3.4.1.1.- Transferencia entre membranas : La transferencia de lípidos entre membranas puede tener lugar debido a un acercamiento entre la membrana celular y la del liposoma sin que exista contacto entre ambas y sin perjuicio de la integridad de la membrana del liposoma, debido a ello la transferencia de material entre el liposoma y la célula, no es tan solo reversible, sino que puede darse en ambas direcciones.

El intercambio de fosfolípidos con las células puede realizarse mediante la existencia de receptores de membrana de tipo proteico y sensibles al tratamiento con tripsina (242). Interacciones similares tiene lugar entre liposomas y lipoproteínas, en particular con lipoproteínas de alta densidad. A concentraciones de lípidos bajas, tanto in vivo como in vitro, los liposomas unilamelares de pequeño tamaño compuestos íntegramente de fosfatidilcolina y sin colesterol se desintegran rápidamente en el plasma, no llegan a interaccionar con las células y los lípidos son captados por las lipoproteínas plasmáticas. La incorporación de colesterol a los liposomas construidos exclusivamente con fosfolípidos inhibe la desintegración de los mismos y les da una mayor estabilidad (243).

La liberación de compuestos hidrosolubles simplemente por contacto y sin rotura de la membrana del liposoma tiene lugar por mecanismos que, hasta el momento presente, no son conocidos, pero que implican un incremento en la permeabilidad de la membrana y la posible existencia de receptores en la membrana celular (242). Este proceso de interacción permite dirigir los liposomas hacia células con escasa actividad fagocítica y que el material encapsulado sea liberado al citoplasma celular.

3.4.1.2.- Absorción : La absorción de liposomas por parte de la membrana celular puede ocurrir con liberación o no del material encapsulado al interior del citoplasma celular. Esta

absorción puede tener lugar como resultado de fuerzas de atracción de tipo físico y electroestático, o como resultado de la unión del liposoma a receptores de membrana. Sorprendentemente los mecanismos de absorción están potenciados por debajo de la temperatura de transición de los lípidos, posiblemente debido a que los puntos de unión son más estables por debajo de esta temperatura. La absorción es un proceso indispensable y previo para la ingestión del liposoma por parte de la célula (243).

3.4.1.3.- Fusión de membranas : El paso consecutivo lógico después de una absorción es la fusión de la membrana del liposoma con la membrana celular. En el caso de los liposomas unilamelares la fusión de membranas implica la introducción del material encapsulado directamente al citoplasma. En el caso de los liposomas multilamelares la fusión implica la introducción al citoplasma del material encapsulado junto con las membranas interiores del liposoma, ello puede facilitar la liberación del contenido del liposoma en los orgánulos subcelulares. En procesos "*in vitro*" la fusión de membranas puede facilitarse mediante la adición al medio de sustancias fusógenas, como son la lisolecitina, detergentes y surfactantes, sin embargo este tipo de materiales pueden ser tóxicos "*in vivo*" (244).

Sin embargo, "*in vivo*" el proceso de fusión implica la existencia de dos etapas diferenciadas, por una parte la absorción propiamente dicha y una segunda etapa de fagocitosis. Generalmente los liposomas son removidos rápidamente desde el torrente circulatorio por parte de las células fagocíticas, aunque ello puede retardarse mediante la adición de gangliósidos en la membrana del liposoma.

Las células con actividad fagocítica incorporan los liposomas en forma de endosomas, vacuolas subcelulares formadas por invaginación de la membrana plasmática. Estos endosomas se fusionan con lisosomas para formar lisosomas secundarios en donde tiene lugar la digestión de las membranas del liposoma. Los enzimas lisosomiales hidrolizan los fosfolípidos a ácidos grasos que pueden ser reciclados y asimilados por el metabolismo de los fosfolípidos. Algunos lípidos aniónicos y determinados fármacos pueden inhibir la rotura del liposoma y producir patologías por acumulo de fármacos .

Durante el proceso de rotura del liposoma en los lisosomas el contenido del compartimento acuoso se libera y permanece secuestrado en los lisosomas hasta su exocitosis,

especialmente si se trata de compuestos que se ionizan a por debajo de pH 6, o bien se va liberando lentamente desde el liposoma y llega a la matriz citoplasmática.

Los liposomas también pueden ser captados mediante endocitosis a partir de receptores específicos. Este tipo de proceso tiene lugar en el caso de que los liposomas presente lipoproteínas de baja densidad o bien transferrina, ambas proteínas pueden unirse a receptores específicos y provocar la endocitosis del liposoma, de esta forma el liposoma puede llegar a organulos subcelulares distintos al lisosoma (245).

3.4.1.4.- Consideraciones anatómicas : La administración de liposomas *"in vivo"* está sujeta a diversas variables especialmente el tamaño y la composición de la membrana, que pueden determinar la estabilidad del liposoma en el plasma, la captación por determinados órganos, y el aclaramiento metabólico.

En condiciones normales, cuando inyectamos por vía endovenosa liposomas de fosfatidilcolina:colesterol, los liposomas son captados mayoritariamente por el sistema retículo endotelial, especialmente por el macrófago, y se acumulan en el hígado. Debido a esta captación pasiva por parte del sistema retículo endotelial la terapia mediante fármacos encapsulados mediante liposomas es especialmente útil en todas aquellas enfermedades que afectan al sistema reticulo endotelial, sobre todo la leishmaniasis y las micosis (243). Los liposomas de pequeño diámetro son captados mas lentamente que los de mayor tamaño, y especialmente los unilamelares se acumulan preferentemente en los hepatocitos en lugar de las células de Kupffer, ello es debido a que su pequeño diámetro les permite atravesar las fenestraciones de los sinusoides hepáticos. La captación por parte del hígado es claramente dosis-dependiente y puede saturarse por un exceso de liposomas o bien por una competencia entre liposomas de pequeño y gran diametro. El colesterol captado por el hígado a partir de los liposomas es metabolizado de forma diferente segun se trate de liposomas de pequeño o gran tamaño . El colesterol de los liposomas de pequeño diametro se metaboliza a glicolato, mientras que el proveniente de los de gran diametro es metabolizado a taurocolato (246).

La incorporación de lactosilceramida a los SUV incrementa el ratio de captación por parte del hígado y especialmente por parte del hepatocito (247). El mecanismo responsable de esta captación es la interacción de los liposomas por parte de receptores para la galactosa

que poseen los hepatocitos, la captación es también función del método empleado para la incorporación del carbohidrato a la membrana del liposoma. El ratio de la captación por parte del hepatocitos también puede incrementarse con el uso de sales de gadolinio, que inhiben la captación por parte de las células fagocíticas, pero no por parte del hepatocito (248). Los liposomas de gran diámetro no pueden acceder fácilmente al hepatocito debido a la imposibilidad de difundir a través de las fenestraciones de los sinusoides hepáticos. Se ha descrito que los liposomas captados directamente por el hepatocito son dirigidos hacia la mitocondria (249). Ello tiene una especial relevancia en el targeting y expresión de material genético. Los liposomas de elevado diámetro, mayor de 5 micras, son captados mayoritariamente por el macrófago pulmonar, y esta captación puede aumentarse con el uso de lípidos cargados negativamente, especialmente fosfatidilserina (250).

La administración intramuscular de liposomas provoca su retención inicial en el sitio de administración y una liberación lenta, tipo depot, a través de los nódulos linfáticos regionales hacia el sistema linfático. En el sistema linfático los liposomas son captados por el macrófago y entran en contacto con los linfocitos.

Los liposomas que incorporan material antigénico, ya sea en la membrana o encapsulado en el compartimento hidrofílico, son capaces de generar una intensa respuesta inmune cuando se administran por vía subcutánea, intraperitoneal o parenteral. Esta respuesta puede ser debida a la interacción directa del liposoma con el linfocito o por presentación del antígeno captado por el macrófago. Los datos publicados hasta el momento indican que los liposomas que contienen esfingomielina o diesteroilfosfatidilcolina provocan una mejor respuesta inmune (251). La administración por vía intraperitoneal provoca la rápida captación del liposoma por parte del macrófago y al poco tiempo pueden ser detectados en la circulación, tanto sanguínea como linfática.

Los liposomas administrados por otras vías, tópica, intraocular, oral o mediante instilación nasal, suelen permanecer en el sitio de aplicación o bien son rápidamente destruidos y su contenido liberado, en general este tipo de administración de liposomas impide que estos lleguen al torrente sanguíneo.

No hay datos concretos acerca de que factores influyen en la captación del liposoma por parte del macrófago. Cuando el liposoma se administra por vía intraperitoneal los lípidos

de su membrana interaccionan rápidamente con gran cantidad de proteínas plasmáticas. Se han detectado gran cantidad de proteínas capaces de interactuar con los liposomas, entre las que destacaremos : α y β globulinas, IgG, fibronectina, factores de coagulación y albúmina, todas ellas pueden afectar el modo en el liposoma es captado por el macrófago y demás células fagocíticas y por lo tanto la forma en que el liposoma puede ser eliminado de la circulación sanguínea por parte del sistema reticuloendotelial (252).

Los liposomas que se han polimerizado con proteínas plasmáticas son eliminados de la circulación sanguínea con mayor rapidez que los liposomas normales (253). Su captación por parte del macrófago es más rápida. Este proceso es mas evidente si en su membrana contienen amino-azúcares (254), o glicolípidos (255). La incorporación de GM1 en el liposoma en concentraciones no superiores al 5% del total de lípidos retrasa el aclaramiento de los liposomas de la circulación sanguínea, similares resultados se consiguen con una proporción de esfingomielina : colesterol de 4:3 (256). Debido a que tanto esfingomielina como fosfatidilcolina poseen el mismo grupo polar estas diferencias tienen que ser debidas a distintas formas de empaquetamiento de la membrana lipídica. La combinación de GM1 con liposomas de fosfatidilcolina:colesterol provoca una mayor estabilidad del liposoma una permanencia mayor en el torrente circulatorio (255).

La conjugación de liposomas con anticuerpos incrementa su captación por parte del sistema reticuloendotelial, excepto que el fragmento Fc este enmascarado o sea eliminado. La utilización de liposomas de larga estabilidad plasmática conjugados con fragmentos $F_{(ab)}$, o con receptores moleculares permite dirigirlos hacia tejidos y células determinadas, o bien hacia células que presentes determinados antígenos en su membrana. Sin embargo esta metodología no permite dirigir los liposomas hacia territorios desprovistos de vascularización, pues el diametro de los mismos no les permite abandonar facilmente los capilares sanguíneos (257).

La administración de los liposomas por via intramuscular o subcutanea es muy eficaz para su liberación en los nódulos linfáticos y su acumulación en los mismos, esta acumulación secuestra los liposomas y no permite su destrucción por parte del sistema reticuloendotelial ni por el hígado (258).

La utilización de factores quimiotácticos permite la vehiculización del liposoma hacia zonas

muy concretas del organismo, así por ejemplo se han utilizado liposomas con factores quimiotácticos para movilizar monocitos y dirigirlos hacia tejidos inflamados o infectados. Tratamientos de este tipo han demostrado una gran eficacia en el tratamiento de infecciones parasitarias (259).

3.5.- DIANIZACION DE LIPOSOMAS

En el capítulo anterior se ha descrito que una gran parte de los liposomas administrados in vivo son captados por el hígado o bien son secuestrados y destruidos por el sistema reticulo-endotelial, sin embargo determinadas combinaciones de lípidos permiten dirigir o dianizar el liposoma hacia tejidos u órganos concretos en donde liberaran su contenido. En particular se pueden diseñar liposomas que se dirigan a un determinado órgano, o que se lisen en respuesta a determinadas condiciones de temperatura, pH, etc.

3.5.1.- Liposomas Temperatura sensibles : Este tipo de liposoma se diseña con el objetivo que el liposoma se rompa y libere su contenido cuando la temperatura ambiente sea la temperatura de transición de los lípidos integrantes de su membrana. Tanto in vivo como in vitro esta lisis está aumentada por la presencia de proteínas plasmáticas que se unen a su membrana y ayudan a desestabilizar el liposoma cuando se llega a la temperatura de transición (260).

Para estudios in vivo se pueden utilizar liposomas constituidos por diesteroil-fosfatidilcolina y dipalmitoil-fosfatidilcolina y sin colesterol que son estables a 37 grados, pero que al llegar a zonas del organismo con temperaturas cercanas a los 40 grados, como son tumores o zonas inflamadas, el liposoma se lise y libere sus contenidos.

Las lipoproteínas de elevada densidad (HDL) realizan una función adyuvante en lisis del liposoma a temperaturas superiores a la temperatura de transición, provocando un aumento de la permeabilidad de la membrana y por lo tanto una liberación del material encapsulado, especialmente si este es de bajo peso molecular.

Usando carboxifluoresceína como marcador (261) se ha demostrado que los liposomas unilamelares, con o sin la presencia del HDL, liberan en pocos segundos el 100% del

material encapsulado cuando se sobrepasa ligeramente la temperatura de transición, mientras que liposomas multilamelares precisan de la presencia de HDL para desestabilizarse, posiblemente debido a la dificultad en la rotura simultánea de varias membranas.

Todas las lipoproteínas plasmáticas pueden unirse a la membrana de liposoma y desestabilizarla, sin embargo determinadas proteínas como la tubulina y la actina pueden interactuar específicamente con bicapas de lecitinas neutras, en ambos casos la proteína no se une al liposoma sino se alcanza la temperatura de transición (262).

3.5.2.- Liposomas diana-sensibles : La idea de los liposomas diana-sensibles se basa en el diseño de liposomas intrínsecamente inestables, por ejemplo con fosfatidiletanolamina insaturada. Estos liposomas se estabilizan por la presencia de proteínas unidas covalentemente a los lípidos de la bicapa. Generalmente la proteína utilizada es un anticuerpo; este anticuerpo encuentra su diana específica y se une a ella provocando el capping de los anticuerpos y la desestabilización de la bicapa. Este método es particularmente eficaz para vehicular moléculas que deban unirse a receptores de membrana, por ejemplo antígenos, linfoquinas, factores de crecimiento, etc, o bien para diana liposomas hacia células con reducida capacidad fagocítica (263).

3.5.3.- Liposomas pH sensibles : Para construir liposomas sensibles al pH puede utilizarse una aproximación parecida a la descrita en el apartado anterior. Si empleamos fosfatidiletanolamina como componente mayoritario, la membrana puede estabilizarse con la presencia de moléculas cargadas a pH neutro, pero que pierdan su carga a pH bajo, y por lo tanto pierdan su capacidad de estabilizar la membrana. Liposomas compuestos de colesterol hemisuccinato, palmitoil-homocisteína o N-succinil-fosfatidiletanolamina junto con fosfatidiletanolamina neutra son estables a pH 7 pero se desestabilizan rápidamente a pH 5 o inferiores (264).

Este tipo de liposoma se emplea para vehicular materiales bioactivos hacia células en las que se desee evitar que el liposoma sea degradado en el lisosoma. Tal y como se ha descrito anteriormente, la primera etapa en la captación del liposoma por la célula es la formación de un endosoma posterior a la endocitosis del liposoma. El pH interno del endosoma suele estar alrededor de 5, lo que provoca la desestabilización de la bicapa y

la liberación del material encapsulado antes de que el endosoma se fusione con un lisosoma. Esta estrategia ha demostrado ser muy útil para transfectar plásmidos que deben ser vehiculizados hacia el núcleo y asimismo deben ser protegidos de la acción de las endo y exo-nucleosidasas (265).

3.6.- LIPOSOMAS Y RESPUESTA INMUNE

Desde la introducción de los liposomas hacia finales de la década de los 60, estos han sido utilizados frecuentemente como portadores de antígenos y han mostrado ser unas poderosas herramientas como modelos de presentación del antígeno y para el estudio de los mecanismos efectores de la respuesta inmune.

En 1974 Allison y Gregoriadis (266) describieron el uso de los liposomas como transportadores o carriers de antígenos *in vivo* y posteriormente se ha descrito su uso como presentadores del antígeno (267) y transportadores de antígenos y adyuvantes (268). Actualmente los liposomas se emplean como modelos de liberación lenta del antígeno, encapsulación de interleucinas y otros modificadores de la respuesta biológica, y para vehicular a territorios específicos o inmunodeprimidos antígenos y anticuerpos.

3.6.1.- Presentación de antígenos : Después de la inmunización intraperitoneal o parenteral con el antígeno encapsulado en liposomas, estos son rápidamente captados por el macrófago, especialmente en el bazo y el hígado, en donde son rápidamente degradados en el lisosoma (269). Estudios *in vitro* han demostrado que los liposomas pueden ser captados por el macrófago mediante un proceso de endocitosis, mediante los receptores Fc de la inmunoglobulina o por fagocitosis (270).

3.6.1.1.- Estudios *in vitro* : Diversos autores han demostrado que la incubación de liposomas con linfocitos y macrófagos provoca la presentación de antígenos proteicos, encapsulados o absorbidos al liposoma, al linfocito T colaborador (271,272). También se han empleado los liposomas como transportadores de antígenos del sistema principal de histocompatibilidad o para la generación *in vitro* de clones de linfocitos T citotóxicos (273,274).

En una interesante serie de ensayos se ha demostrado que antígenos de tipo proteico

encapsulados en liposomas pueden ser presentados a la célula T helper por el macrófago pero no directamente a la célula B en ausencia de macrófagos (275,276). Sin embargo se ha visto que el antígeno unido covalentemente a la superficie del liposoma puede ser presentado directamente por la célula B, aunque con una eficiencia menor. Estos trabajos sugieren que, aunque el macrófago juegue un papel destacado en estos mecanismos de presentación del antígeno, en el caso de los antígenos particulados puede ser substituido por el linfocito B.

En otra serie de experimentos *in vitro* se han utilizado liposomas que expresan el antígeno y moléculas del sistema principal de histocompatibilidad en su superficie. Estos liposomas se han presentado a la célula T-helper en ausencia total de células presentadoras de antígeno. Los antígenos proteicos se han unido covalentemente al liposoma por medio de un puente bifuncional (N-succinimidimyl 3(-2-piridylthio) propionato o SPDP), por su parte las moléculas del MHS han sido purificadas a partir de células normales por medio de extracciones con detergentes aniónicos. La presentación del antígeno a la célula T se ha demostrado por medio de clones T-antígeno específicos y por el aumento de la secreción de IL-2 (277). Debido a la inmovilización del antígeno y a la ausencia de células presentadoras de antígeno, los autores concluyen que la degradación del antígeno no es estrictamente necesaria para la activación de la célula T helper, si el antígeno se halla asociado a liposomas. Otro dato de gran interes es que si el antígeno se encuentra en concentraciones muy altas en la membrana del liposoma, la presentación del mismo al linfocito T se puede realizar en ausencia de moléculas del MHC (278).

La principal conclusión que podemos sacar de estos datos es el hecho de que la presentación del antígeno al linfocito T y B puede realizarse en ausencia de mediadores sintetizados por las células presentadores de antígeno. El análisis del papel de estos mediadores se realizó con liposomas de llevaban IL-1 unida mediante SPDP a la membrana de los mismos y junto con moléculas del MHS y el antígeno y se vió que estos liposomas poseían un elevado poder mitogénico y podían actuar a modo de "macrófagos sintéticos" (279), estos datos son de gran interes si pudiesen ser reproducidos con antígenos T-independientes.

3.6.1.2- Estudios *in vivo* : Los diversos estudios *in vitro* descritos establecen la base teórica de que los antígenos presentados por medio de liposomas son captados

mayoritariamente por el macrófago, aunque determinados tipos de liposomas pueden ser presentados directamente a los linfocitos T y B. Basandonos en el estado actual de los conocimientos es de suponer que *in vivo*, sea, también, el macrófago el responsable de la captación del liposoma y de la presentación a los linfocitos, sin embargo es preciso averiguar si esta presentación puede realizarse en ausencia de las células presentadoras de antígeno o bien en ausencia de restricción por parte del MHS.

Estudios *in vivo* han demostrado que el macrófago capta una gran cantidad de los liposomas en periodos de tiempo relativamente cortos, y lo hace por medio de fagocitosis, ello descarta al linfocito B y a las células dendríticas como células presentadoras de antígeno por su escasa o nula capacidad fagocítica (280). Por otra parte la deplección de macrófagos *in vivo* causa la supresión de la respuesta a antígenos proteicos encapsulados en liposomas (281,282), finalmente la inyección de macrófagos que han ingerido previamente liposomas que encapsulan albúmina en animales "naive" provoca una respuesta sérica anti-albúmina (293).

La principal ventaja del uso de liposomas es su capacidad de potenciar la inmunogenicidad de antígenos débiles o bien de convertir en inmunogénicos antígenos que en forma soluble no lo son. En el caso de antígenos proteicos los liposomas no aportan ventajas frente al uso de Adyuvante de Freund o del hidróxido de aluminio, excepto por su falta de toxicidad y la posibilidad de ser utilizados en ensayos clínicos con pacientes. En la bibliografía consultada existen pocos o nulos datos acerca de antígenos no proteicos o bien T-independientes encapsulados con liposomas para poder exponer alguna conclusión.

En algunos casos descritos en que el liposoma convierte en inmunogénico un antígeno que en su forma soluble no lo es, se ha visto que la conformación del antígeno en el liposoma es un factor a tener muy en cuenta, en este orden de cosas recientemente se han descrito liposomas que inducen anticuerpos específicos de una determinada conformación espacial (284). Liposomas que contenían un péptido de 25 aminoácidos y lípido A fueron utilizados para obtener anticuerpos monoclonales específicos del péptido, de todos los anticuerpos obtenidos se observó que no todos reconocían el péptido completo y que muchos solo reconocían un determinado fragmento del mismo, mientras que otros fragmentos no eran reconocidos por ningún anticuerpo.

3.6.2.- Influencia de la composición química : Hasta el momento se han evaluado una gran cantidad de variables para establecer una relación entre la composición química de los liposomas, sus propiedades físicas y la influencia de ambos parámetros en la respuesta inmune. Las principales variables estudiadas son : la carga eléctrica de los liposomas; la situación del antígeno, ya sea encapsulado en el interior de las lamelas o bien unido por la parte externa del liposoma; la rigidez o fluidez de las membranas en función de la composición química de las mismas; el tamaño de los liposomas y el número de lamelas, es decir los unilamelares con respecto a los multilamelares. Todos estos parámetros han sido estudiados con gran detalle y sus resultados son revisados frecuentemente (285-288).

Por lo que respecta a la carga neta de los liposomas hay un acuerdo general en que los liposomas con carga negativa producen una mejor respuesta inmune que los liposomas neutros o los que poseen carga positiva (285), aunque determinados antígenos, como la albúmina, presenten unos resultados contradictorios (289,290). Cabe destacar que la totalidad de las referencias bibliográficas consultadas reflejaban datos obtenidos con antígenos proteicos. En general los datos acerca de todas estas variables suelen mostrar datos bastante contradictorios y es difícil establecer reglas de aplicación comunes a todos los antígenos, ello es debido a las distintas y muy diferentes capacidades inmunogénicas de los distintos antígenos ensayados.

3.6.3.- Liposomas como transportadores de adyuvantes : Si bien muchos estudios demuestran los efectos adyuvantes de los liposomas por ellos mismos, la capacidad inmunopotenciadora de los liposomas puede ser magnificada mediante la inclusión de adyuvantes lipídicos, caso del lípido A y del diesteroil-muramil-dipéptido, o bien por encapsulación de adyuvantes hidrosolubles, interleuquinas y modificadores de la respuesta biológica (BRM).

3.6.3.1.- Lípido A : El lípido A es la porción lipídica del lipo-polisacárido bacteriano (LPS). posee una potente actividad endotóxica y mitogénica, así como de potenciadora de la respuesta inmune (291). La molécula de lípido A (Fig 11) contiene una región polar constituida por diglucosamina-1,4'-difosfato a la que se encuentran unidos numerosos ácidos grasos de entre 12 y 16 carbonos de longitud. Gran parte de la actividad biológica del lípido A es debida a esta región polar.

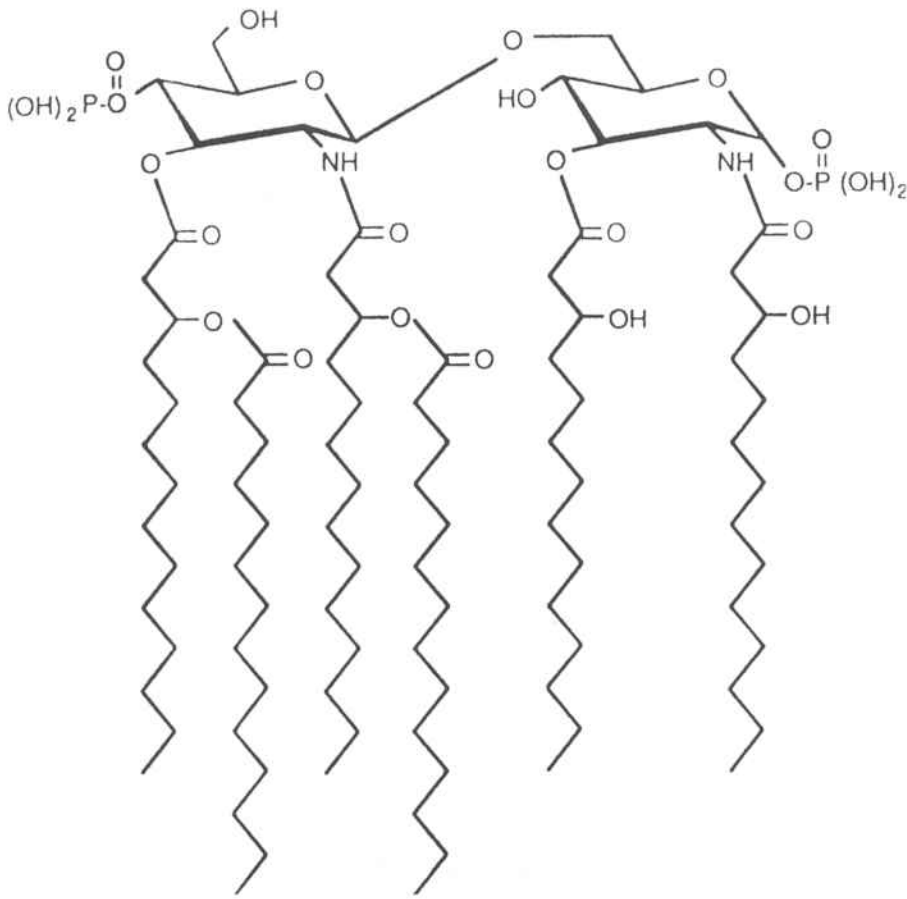


Fig 11 : Estructura de la molécula de lípido A.

Debido a su capacidad endotóxica, el lípido A por si solo posee escasas aplicaciones como adyuvante en vacunaciones humanas. Se puede conseguir una importante reducción en la toxicidad del lípido A eliminando el grupo fosfato unido al carbono número 1 y obteniendo el monofosforil-lípido A (MPL). La inclusión del MPL en la formulación de los liposomas reduce fuertemente su citotoxicidad sin disminuir su efecto inmunopotenciador (292,293).

Desde el punto de vista de su utilización en humanos, cabe destacar que la inclusión del lípido A en liposomas reduce la pirogenicidad del mismo sin alterar su capacidad adyuvante y por lo tanto aumentar la respuesta humoral y celular frente al antígeno (294,295).

3.6.3.2.- Muramildipéptido (MDP) : Muchos autores defienden que ningún adyuvante supera en efectividad al adyuvante completo de Freund (ACF), pero su elevada toxicidad

lo hacen poco menos que inutilizable en humanos y poco recomendable en inmunizaciones a largo termino en ratones y conejos. Debido a ello muchos investigadores han intentado identificar el componente responsable de la acción adyuvante del ACF. A mediados de la decada de los 70 dos grupos independientes identificaron al MDP extraido del *Mycobacterium tuberculossium* como la fracción con actividad imunopotenciadora (296).

En muchos aspectos la acción del MDP es parecida a la del lípido A. El MDP utiliza el macrófago como punto de partida para su acción imunoestimuladora, posee accion pirógena debido a su capacidad de inducir la síntesis de IL-1 por parte del macrófago, aunque, a diferencia del lípido A sus efectos secundarios y su pirogenicidad son menores (297).

La mayor diferencia entre el lípido A y el MDP, es que este último es hidrosoluble , y por lo tanto puede ser encapsulado, con lo que es posible reducir su toxicidad. Sin embargo existen derivados lipofílicos del MDP que si pueden ser atrapados en la bicapa lipídica y ser expuestos en el exterior del liposoma. Dos de los derivados lipofílicos han sido estudiados con mayor detalle por poseer una actividad adyuvante potenciada. El primero es el B30-MDP o $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13})_2\text{CHCO-MDP}$ y el segundo es el esteroil-MDP (L18-MDP) o $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO-MDP}$ (296). Cuando se presentan asociados con liposomas estos dos compuestos, el B30-MDP presenta una mayor actividad imunoestimuladora que el L18-MDP y ambos carecen de la pirogenicidad del MDP original. Basándonos en estos datos el B30-MDP es un firme candidato para ser usado usado en humanos (298). Otro derivado lipofílico del MDP, el fosfatidil-etanolamina-muramitripéptido (PE-MTP) posee la capacidad de activar las células *natural killer* y los macrófagos para destruir células tumorales (299). A diferencia de los derivados del MDP, el PE-MTP retiene la pirogenicidad y toxicidad, incluso si se administra unido a liposomas, lo que limita su uso en ensayos clínicos con pacientes (300).

La combinación de diversos adyuvantes junto con la encapsulación de interleucinas y otros modificadores de la respuesta puede tener importantes consecuencias, especialmente cuando se aplique esta metodologia al campo de los antígenos T-independientes y a los mecanismos de la memoria inmunológica.

4.- MELANOMA

El melanoma maligno es, quizá, uno de los tumores sólidos humanos mas estudiados, tanto a nivel experimental como clínico. A nivel clínico se han descrito hasta seis etapas en la progresión del tumor, y dada la facilidad en la extracción de biopsias son muy completas las series histológicas existentes (301).

El primer estadio del melanoma lo constituye el nevi melanocítico, en el que todavía ni existe una atípia histológica, ni existe, tampoco, una especial diferenciación. El nevi melanocítico pobremente diferenciado, pero todavía sin atípia histológica, constituye el segundo estadio. La tercera etapa es el nevi displásico. Sin embargo estas tres etapas no pueden ser consideradas, todavía, plenamente malignas, pues en bastantes casos regresionan de forma espontánea y desaparecen. La cuarta etapa está representada por el melanoma con crecimiento radial, que muestra una marcada tendencia a invadir tejidos vecinos al primitivo nevi pero no presenta crecimiento vertical ni se le considera capaz de inducir metástasis (302). La resección quirúrgica de la lesión suele ser suficiente para eliminar el tumor y los casos con recidivas son escasos. Sin embargo en muchos casos esta fase de crecimiento radial no es diagnosticada y el tumor entra en una fase de crecimiento vertical, estadio quinto, que penetra profundamente en la dermis y es plenamente competente para metastatizar. La incidencia de las metástasis está en correlación directa con la penetración del crecimiento vertical (303). La resección quirúrgica de estas lesiones implica una excisión completa de los tejidos afectados, que no siempre es posible, y un completo seguimiento del paciente para determinar la existencia de metástasis a distancia. La sexta y última etapa lo constituye el melanoma metastásico.

En Estados Unidos el melanoma maligno constituye solo el 1% del de tumores

diagnosticados, el 3% de todos los tumores dérmicos, pero es la causa del 65% de las muertes por cáncer de piel. Últimamente estas proporciones están aumentando considerablemente.

El mal pronóstico del melanoma es debido a factores como la dificultad en el diagnóstico de la enfermedad en estadios precoces, la casi total ausencia de síntomas clínicos, y, sobre todo, la escasa respuesta de los pacientes a las terapias de quimio y radioterapia.

Los recientes progresos en la caracterización de los antígenos expresados en la membrana del melanoma han permitido desarrollar nuevas estrategias en el diagnóstico y tratamiento del melanoma.

4.1.- ANTÍGENOS ASOCIADOS A MELANOMA (AAM)

El uso de anticuerpos monoclonales contra los AAM fue descrito por Koprowski (304) y ha permitido conocer y caracterizar diversos sistemas antigénicos con muy diversas propiedades biológicas e inmunológicas. A grandes rasgos estos sistemas antigénicos pueden clasificarse en ocho grandes grupos.

4.1.1.- Marcadores oncofetales : Los AAM expresados también por las células fetales forman un grupo de proteínas oncofetales solamente expresados por tumores embriológicamente derivados de la cresta neural, principalmente melanoma y glioma. Estos antígenos se encuentran asociados a proteínas de elevado peso molecular. La característica común a estos antígenos es su implicación en la adhesión celular y el reconocimiento célula-célula. Hasta el momento se han descrito cuatro antígenos.

4.1.1.1.- Condroitín-sulfato proteoglicano (CSP) : El CSP es una glicoproteína codificada por un gen localizado en el cromosoma 15 (305), habiéndose obtenido varios anticuerpos monoclonales (306,307). Estos anticuerpos fueron inducidos inmunizando ratones con células de melanoma (308-310), nevi displásico (311) o gliomas (312). Su expresión es detectable en más del 90% de los melanomas, y cerca del 100% de las células son positivas (313,314). El CSP se expresa en la superficie del melanocito formando microespinas de 1 o 2 μ m de longitud, existiendo entre 100.000 y 6.000.000 de moléculas por célula (315). Estas microespinas están implicadas en las primeras etapas de las

interacciones entre los melanocitos y los substratos adyacentes, estas microespinas son especialmente importantes en la formación de placas de adhesión sobre el epitelio. Los anticuerpos monoclonales contra el CSP no inhiben la adhesión celular pero si bloquean la quimiotaxis celular (316) y la formación de colonias (316).

4.1.1.2.- Moléculas de adhesión celular asociadas a melanoma (MECAM) : Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales que en condiciones no reductoras inmunoprecipitan de las células de melanoma unas proteínas con pesos moleculares entre 90 y 150 Kd. Los mismos anticuerpos en condiciones reductoras precipitan cuatro proteínas de 120, 95, 29 y 26 Kd respectivamente (318,319). Aunque se sabe que estos antígenos están relacionados con la adhesión celular no se conoce exactamente su función ni si están implicadas en los procesos de invasión y metástasis.

4.1.1.3.- Antígeno de la membrana placentaria : Se ha obtenido un anticuerpo monoclonal después de inmunizar ratones con membranas placentarias que precipita una molécula de 120 Kd. El anticuerpo muestra una elevada especificidad por las células de melanoma, bloquea la adhesión celular e induce apoptosis (320).

Proteínas de elevado peso molecular con una distribución "like-gangliósido" : La inmunización de ratones con células de melanoma seguida de dosis de recuerdo con gangliósidos absorbidos sobre eritrocitos ha permitido obtener varios anticuerpos monoclonales que precipitan varias proteínas con pesos moleculares medios de 260 Kd. Todos los anticuerpos son específicos de melanoma y no se ha descrito la función de este grupo de proteínas (320).

4.1.2.- Receptores para factores de crecimiento : En la célula de melanoma se han descrito hasta seis receptores para factores de crecimiento : Factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento "insulin-like" (ILGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento tumoral alfa y beta (TGF) y factor de crecimiento fibroblástico (FGF). Todos estos factores de crecimiento se expresan tanto en el melanoma primario como en el metastásico (307).

4.1.3.- Proteínas de transporte de cationes : Básicamente existen dos tipos.

4.1.3.1.- Melanotransferrina : Se trata de una glicoproteína de 97 Kd altamente expresada en muchos melanomas y algunos adenocarcinomas (321-323). La melanotransferrina posee, como mínimo, 5 determinantes antigénicos distintos (324). Es un sialoglicoproteína monomérica con puentes disulfuro intracatenario capaz de quelar hierro y posee una cierta homología con la secuencia de la lactotransferrina, especialmente en la zona del extremo amino terminal (325).

4.1.3.2.- Proteína S-100 : La proteína S-100 es una proteína citoplasmática de tipo ácido aislada inicialmente de cerebro bovino (326). Está compuesta por dos cadenas polipeptídicas (327) y se une fuertemente a calcio. Su expresión está alterada en muchos tumores, tanto de origen neuroectodérmico (328) como en otros tumores. Se ha ensayado con éxito su uso en el diagnóstico de melanomas no pigmentados (329).

4.1.4.- Antígenos de Histocompatibilidad (HLA) : Los antígenos HLA de clase II comprende marcadores codificados por los locus DR, DQ y DP situados en la región HLA-D del cromosoma 6. El antígeno HLA-DR está expresado en el 75% de las líneas cultivables de melanoma (330). La expresión de los antígenos de HLA-D no muestra ninguna correlación con a) localización anatómica de los tumores; b) expresión de los antígenos HLA de clase I; y c) expresión de otros AAM (331). Así mismo ni la pigmentación del melanocito ni la tumorigenicidad en ratones nu/nu muestra ninguna correlación con la expresión de HLA-D (332).

En el melanoma metastásico, aproximadamente el 50% de las células expresan HLA-D, pero existen grandes diferencias en la intensidad de la expresión incluso para muestras de un mismo paciente (333). En tumores primarios, el 39% de las biopsias muestran la presencia de los antígenos en, como mínimo, el 10% de las células (334).

La expresión de HLA-DR en los tumores primarios parece estar relacionada con la inducción de respuesta inmune celular. Líneas celulares derivadas de tumores poco diferenciados y positivas para HLA-DR estimulan clones T autólogos cuando son cocultivados *in vitro* (335,336). Sin embargo líneas celulares derivadas de tumores bien diferenciados son incapaces de activar células T con independencia de la expresión de HLA-DR (337).

4.1.5.- Antígenos asociados a pigmentación : Se han caracterizado tres antígenos relacionados con la pigmentación, tanto del melanocito normal como del neoplásico. Se trata de moléculas de 70-80 Kd. que en principio no están relacionados con la actividad tiroquinásica típica de la melanina (338) y que solo están expresados en las lesiones pigmentadas (339,340).

4.1.6.- Proteínas de la matriz extracelular : Las proteínas de la matriz extracelular son secretadas en grandes cantidades por las células de melanoma y poseen una importante función en la adhesión, motilidad y invasión del melanoma. A nivel diagnóstico se ha empleado la laminina y el colágeno de tipo IV como marcadores de malignidad (341). La fibronectina y la vitronectina, así como sus receptores, son también producidos en grandes cantidades por los melanocitos (306).

4.1.7.- Marcadores de diferenciación : Se han descrito varios marcadores de expresión transitoria asociados a diferentes estados de diferenciación de la célula tumoral (342). Dado que los melanocitos poseen un origen neuroectodérmico, los antígenos de diferenciación neuronal como el A2B5, galactocerebrósido o la glicoproteína asociada a mielina también se expresan en la célula tumoral (343).

Houghton (344) y Real (345) proponen un vía de diferenciación celular basándose en estudios morfológicos y antigénicos realizados con melanocitos y biopsias de metástasis. Estos autores distinguen tres estadíos de diferenciación : temprano, intermedio y tardío. El melanoma temprano o poco diferenciado expresa el receptor para el EGF, HLA-DR, CS. El melanoma intermedio presenta una mayor diferenciación histológica, mientras que el melanoma tardío muestra una marcada diferenciación y expresa los marcadores relacionadas con la pigmentación.

4.1.8.- Gangliósidos : Tal y como se ha descrito en otros capítulos de esta memoria los gangliósidos son uno de los antígenos asociados a melanoma mas estudiados y de los que se han obtenido un mayor número de anticuerpos monoclonales. Hasta el momento se han obtenido anticuerpos monoclonales contra GD2, GD3, 9-O-acetil-GD3, GM2 y GM3 (346). Muchos gangliósidos, especialmente GM1 y GM3, se encuentran expresados en el cerebro, riñón y retina, pero el incremento en su expresión parece circunscrito a tumores

de origen neuroectodérmico (347). La práctica totalidad de los anticuerpos anti-GD3 reconocen el 100% de los melanomas estudiados, por lo que su expresión parece universal en los mismos, así mismo esta expresión parece restringida a melanoma y tumores neurales. in embargo otros gangliósidos, como el GD2, parecen tener una expresión menos universal (348).

A nivel clínico se ha estudiado la evolución en la expresión de gangliósidos desde el melanocito normal hasta el melanoma maligno. El principal gangliósido en el melanocito no neoplásico es el GM3, mientras que GD2 y GD3 constituyen menos del 5% del total de los gangliósidos (349). En el melanocito maligno se mantiene la expresión de GM3, pero existe un incremento en la expresión de GD3 y GD2. La expresión de GD3 es debida a la activación de la $\alpha(2\rightarrow 8)$ sialiltransferasa (350). La expresión de GD3 puede llegar a representar el 75% del total de gangliósidos. La relación GM3:GD3 cambia desde una proporción 19:1 en el melanocito normal hasta 1:15 en el melanoma (351). Esta inversión se va acentuando con la evolución del tumor y llega al máximo con la diseminación de la metástasis (352).

Este incremento en la expresión del GD3 provoca que en pacientes de melanoma sea posible detectar la presencia de gangliósidos en sangre (353). Se ha descrito que en estadíos avanzados de melanoma la concentración plasmática de GD3 es hasta cuatro veces superior a la concentración en las primeras etapas de la enfermedad, por el contrario no se ha podido detectar la presencia plasmática GD2, GM3 ni de 9-O-acetil-GD3 (354,355).

La elevada expresión de GD3 en melanoma y de GD2 en neuroblastoma los ha echo candidatos a diversos ensayos de inmunoterapia específica activa y pasiva. Así mismo también se han ensayado otros gangliósidos como GM2 y derivados sintéticos de GD3.

4.2 INMUNOTERAPIA PASIVA CON ANTICUERPOS ANTI-MELANOMA

Se han obtenido gran cantidad de anticuerpos monoclonales específicos de melanoma que son capaces de inhibir, tanto *in vitro* como en ratones nu/nu, el crecimiento de tumores. La inhibición del crecimiento tumoral depende de la existencia de una buena diana en la célula tumoral y del isotipo del anticuerpo (130). A nivel murino los isotipos con capacidad

citotóxica son IgM, IgG2a e IgG3, si bien la IgM no es capaz de activar la citotoxicidad celular anticuerpo dependiente (356). A nivel humano el isotipo mas citotóxico es la IgG1 (357).

La supresión del crecimiento tumoral por parte de los anticuerpos está en función directa de la densidad de expresión del antígeno diana en la membrana celular. Tumores con menos de 300000 antígenos por célula difícilmente son atacados efectivamente por anticuerpos. Curiosamente la afinidad del anticuerpo parece jugar un papel menor en la inhibición del crecimiento (358).

Muchos anticuerpos anti-disialogangliósidos han mostrado una elevada citotoxicidad frente a células de melanoma y neuroblastoma (359,360), lo que ha permitido ensayar varios de estos anticuerpos a nivel clínico.

Inicialmente una estrategia bastante empleada fue la conjugación del anticuerpo monoclonal con radio-isótopos o con agentes citostáticos. Los resultados de los ensayos clínicos realizados no han demostrado un efecto citostático significativo. Los puntos mas críticos son la estabilidad de la unión entre el anticuerpo y el agente citotóxico, la accesibilidad del conjugado al tumor y la potencia del mismo conjugado (361).

Contrariamente a lo esperado los resultados de los ensayos clínicos con los anticuerpos solos han aportado datos muy interesantes. Cinco anticuerpos anti-gangliósido han conseguido inducir importantes regresiones del tumor después de ser administrados sistemicamente. Los anticuerpos son R24 (anti-GD3), 3F8 (anti-GD2), MG21 (anti-GD3), 14G2a (anti-GD2), y Me36.1 (anti GD2/GD3). Se han observado respuestas parciales y totales con intervalos libres de enfermedad de bastantes años y resultados significativamente mejores que los obtenidos mediante terapias clásicas (362-364).

Los efectos secundarios descritos son débiles o moderados, y generalmente se limitan a fiebre suave, eritema, inflamación moderada, pruritis, coriza. Dosis altas de anticuerpos inducen nauseas pasajeras y diarrea. Dosis de anticuerpo superiores a 1200 mg/m² provocan hipertensión. Todos los síntomas desaparecen entre las 24 y 36 horas posteriores a la administración del anticuerpo y en ningún caso se han descrito reacciones adversas graves (365).

Los resultados de estos ensayos clínicos indujeron a asociar el tratamiento mediante anticuerpos monoclonales con modificadores de la respuesta biológica con la intención de potenciar el efecto citotóxico de los anticuerpos. Hasta el momento se ha ensayado la asociación entre anticuerpos y interferón (366,367), anticuerpos y IL-2 y anticuerpos y el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Así mismo también se ha ensayado el empleo simultaneo de varios anticuerpos (368,369).

La combinación de GM-CSF con anticuerpos monoclonales ha demostrado ser la mas eficaz . Los monocitos poseen la capacidad de secretar una gran cantidad de factores que a su vez activan otras células del sistema inflamatorio y ello provoca un incremento general de la actividad citolítica (370). El GM-CSF recombinante humano es un factor de crecimiento hematopoyético que soporta la proliferación y crecimiento de las células fagocíticas mononucleares (371). La unión del GM-CSF con el anticuerpo posee un importante efecto sinérgico sobre la citotoxicidad celular. La citotoxicidad se hace efectiva mediante varios mecanismos como la liberación de óxidos, peróxidos y sustancias citotóxicas intracelulares (372-374). Un segundo mecanismo es la activación del factor de necrosis tumoral.

Se han iniciado algunos estudios clínicos mediante la combinación de anticuerpos monoclonales y GM-CSF pero, si bien los primeros resultados preclínicos son interesantes, es muy pronto para poder evaluar la bondad de la terapia (375-377).

Uno de los principales problemas en los ensayos de inmunoterapia pasiva es la respuesta inmune del paciente a los anticuerpos de ratón, la llamada "Human anti-mouse immunoglobulin (HAMA)". Para evitar esta respuesta se han modificado mediante ingeniería genética las moléculas de inmunoglobulina murina, substituyendo la parte constante de las mismas por su equivalente humano y dando lugar a la formación de anticuerpos quimera. El siguiente paso dado en este campo ha sido la conservación de las regiones hipervariables murinas y la substitución del resto de la molécula por una inmunoglobulina humana, formando los anticuerpos humanizados (357). Recientemente se ha iniciado un ensayo clínico con las versiones quiméricas de los anticuerpos R24 y 14G2 sin que se conozcan los resultados finales (378).

4.3 INMUNOTERAPIA ACTIVA ANTI-MELANOMA

A diferencia de la inmunoterapia pasiva, la inmunoterapia activa se basa en la inmunización del paciente y en la activación del sistema inmune del mismo para la posterior eliminación del tumor. En una inmunización activa los efectos biológicos deseables son la activación de la respuesta celular de tipo citotóxico, la especificidad de la misma, la aparición de memoria inmunológica y la ausencia de reacciones adversas.

En el campo del melanoma se han iniciado algunos ensayos clínicos de inmunización activa empleado gangliósidos como antígenos. Básicamente se han ensayado tres estrategias :

Inmunización con extractos celulares : La inmunización de pacientes con células inactivadas de melanoma ha provocado una respuesta sérica anti-GM2 y anti-GD2 pero no ha sido posible detectar una respuesta anti-GD3, por otra parte los resultados clínicos han sido pobres . De los 26 pacientes ensayados, 2 pacientes mostraron respuesta anti-GD2 y 10 anti-GM2 (379). Sin embargo si ha sido posible detectar respuesta específica anti-9-O-acetil-GD3 (380).

Inmunización con gangliósidos conjugados a *Salmonella minnesota* : Se ha venido ensayando repetidamente la inmunización con GM2 y GD3 conjugados a S.M. o a BCG consiguiéndose unos resultados parecidos a los descritos anteriormente, es decir intensa respuesta anti-GM2 pero ausencia de respuesta anti-GD3 (381).

Inmunización con derivados sintéticos de GD3 : La ausencia de respuesta anti-GD3 en pacientes ha inducido al grupo de P. Livingston (Memorial Sloan Kettering Center, Nueva York) a intentar la inmunización con derivados semisintéticos de GD3. La inmunización con lactonas de GD3, GD3-amida y GD3 en forma de gangliosidol ha inducido una respuesta mediante IgM e IgG contra la molécula semisintética, pero que no muestra una reacción cruzada con el GD3 nativo, ni con células de melanoma (382).

II.- Objetivos

OBJETIVOS

De la introducción teórica expuesta se desprenden las siguientes conclusiones :

- 1.- La célula tumoral presenta un importante incremento en la expresión de glicolípidos y glicoproteínas de membrana.
- 2.- La célula tumoral si bien no presenta ningún antígeno específico, si que presenta antígenos de tipo glucídico asociados a la misma. Estos antígenos se consideran antígenos asociados a tumores.
- 3.- En el melanoma maligno se produce un importante incremento de los gangliósidos expresados en su membrana. El gangliósido mas expresado es el GD3.
- 4.- Los primeros ensayos clínicos de inmunoterapia activa y pasiva muestran que la terapia anti-GD3 puede lograr la remisión del tumor.

Fue en este orden de cosas cuando a finales de la década los 80 nuestro laboratorio se planteó la necesidad de investigar en el campo de la inmunogenicidad de los antígenos glucídicos asociados a tumores con el objetivo de incrementar su inmunogenicidad y poderlos emplear en la inmunización activa de pacientes. Los antígenos escogidos fueron los gangliósidos, y en especial el GD3, y el tumor escogido el melanoma.

Desde un punto de vista estrictamente inmunológico, los antígenos de tipo glicolípídico son poco o nada inmunogénicos, y en determinados casos incluso poseen actividad inmunosupresora (383), aunque se ha descrito la obtención de una gran cantidad de anticuerpos monoclonales murinos específicos de epítomos glucídicos (384). Así mismo se han descrito algunos anticuerpos monoclonales de origen humano específicos de este mismo tipo de antígenos obtenidos partiendo de linfocitos de sangre periférica de enfermos oncológicos (385). Sin embargo existen muy pocos trabajos focalizados en la inmunogenicidad de este tipo de antígenos. Es de especial interés para nuestro grupo el desarrollo de una metodología que permita obtener una buena respuesta humoral y celular

frente a este tipo de antígenos tumorales.

El objetivo básico de la presente tesis es la obtención de protocolos de inmunización que provoquen una respuesta sérica intensa y específica con actividad anti-tumoral. Esta respuesta debe de activar los mecanismos de citotoxicidad mediada por complemento y de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Así mismo debe ser capaz de inducir memoria inmunológica. De conseguir este objetivo se podrían iniciar estudios clínicos con el objetivo de disponer de protocolos de inmunización activa de enfermos oncológicos.

Los objetivos concretos de la tesis son :

- 1.- Estandarización de la tecnología de obtención de liposomas.
- 2.- Estudio, caracterización y purificación de los gangliósidos expresados por la línea de melanoma maligno humano WM-164.
- 3.- Estudio de las posibles diferencias existentes entre el GD3 purificado partiendo de tejidos no tumorales y el extraído de células de melanoma.
- 4.- Estudio de la inmunogenicidad del gangliósido GD3.
- 5.- Establecer las diferencias existentes en los mecanismos efectores activados después de la inmunización de ratones con GD3 asociado a diferentes transportadores como son células tumorales, liposomas y neoglicoproteínas sintéticas.
- 6.- Estudio de actividad anti-tumoral *in vitro* de los sueros de animales inmunizados con GD3.

III.- Material y Métodos

1.- PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS :

Se han preparado 14 tipos diferentes de liposomas, todos ellos por el método de la dispersión mecánica por agitación (386).

1.1.- LIPOSOMAS MULTILAMELARES : Los lípidos se pesaron en seco y se mezclaron de acuerdo con las proporciones y cantidades especificadas en las tablas I y II. La mezcla de lípidos se resuspendió en una solución de cloroformo:metanol (2:1, v:v) y se depositó en matraces de 50 ml. La mezcla se evapora en el rotovapor en agitación a 60 r.p.m., 37°C y vacío mediante trompa de agua hasta su secado total. El secado final de los lípidos se realiza mediante liofilización durante un mínimo de dos horas. Una vez secados los lípidos, estos se rehidratan con PBS y el matraz se devuelve al rotovapor dejándolo en agitación a 60 r.p.m. durante un mínimo de 60 minutos a temperatura ambiente y presión atmosférica. La rehidratación de los lípidos puede facilitarse añadiendo 4 o 5 perlas de cristal al tampón de rehidratación. Los liposomas rehidratados se dejan en reposo a temperatura ambiente durante dos horas hasta finalizar su proceso de estabilización.

La separación de los materiales encapsulados de los que han quedado libres se realiza mediante el lavado de los liposomas por centrifugación. La suspensión de liposomas se disuelve en un volumen suficiente de PBS y se centrifuga durante 60 minutos a 100.000 xg en un rotor basculante (Sw60Ti, Beckman Instruments). Se retira el sobrenadante y el pellet de liposomas se redilsuelve con PBS y se centrifuga dos veces más durante 30 minutos a 10000 xg.

El pellet de liposomas obtenidos se resuspende en 1 ml de PBS y estos se conservan herméticamente cerrados a cuatro grados . Para prevenir la oxidación de los lípidos deben conservarse en atmósfera inerte de argón o nitrógeno.

1.2.- LIPOSOMAS UNILAMELARES : Los liposomas unilamelares se preparan según el mismo protocolo que los multilamelares, pero una vez rehidratados se filtran durante un mínimo de 7 ciclos repetidos a través de filtros de policarbonato de 200 nm de tamaño

Tipo	Formulación	Proporción molar
1	Fosfatidilcolina : Colesterol : GD3	47,5 : 47,5 : 5
2	Fosfatidilcolina : Colesterol : GD3	45 : 45 : 10
3	Fosfatidilcolina : Colesterol : GD3 + MDP	45 : 45 : 10
4	Fosfatidilcolina : Colesterol : Dicetilfosfato : GD3	40 :40 : 10 : 10
5	Esfingomielina : Colesterol : Dicetilfosfato : GD3	40 :40 : 10 : 10
6	Esfingomielina : Colesterol : GD3 + LipA	45:45: 10
7	Esfingomielina : Colesterol : Dicetilfosfato : GD3 + LipA	40 :40 : 10 : 10

Tabla V : Formulación y tipos de liposomas empleados en las diversas pautas de inmunización. En todos los casos también se obtuvieron lotes de liposomas con idéntica formulación pero sin GD3 y se emplearon como controles.

Tipo	Col.	EPC	BSP	DCP	% LipA	MDP mM	GD3
1	9.140	9.140	-	-	-	-	1.00
2	8.270	8.270	-	-	-	-	1.83
3	4.270	4.270	-	-	-	50	0.95
4	4.000	4.000	-	4.000	-	-	1.00
5	4.000	-	4.000	4.000	-	-	1.00
6	4.270	-	4.270	-	0.2	-	0.95
7	3.800	-	3.800	0.950	0.2	-	0.95

Tabla VI : Composición expresada en μ moles de cada uno de los componentes de los distintos tipos de liposomas. Col=Colesterol; EPC=Fosfatidilcolina de huevo; BSP=Esfingomielina de cerebro; DCP:Dicetilfosfato; %LipA : % en peso de lípido A; MDP = milimoles de muramildipéptido.

de poro a una temperatura constante de 37 grados mediante un proceso de extrusión bajo presión de nitrógeno seco (387). El proceso de separación de los materiales no encapsulados es idéntico al de los liposomas multilamelares.

2.- CARACTERIZACION DE LOS LIPOSOMAS

Los liposomas han sido caracterizados atendiendo a su estabilidad, composición lípida y disposición del glicolípido.

2.1.- ESTABILIDAD : Para llevar a cabo los estudios relativos a la estabilidad de los liposomas se prepararon liposomas de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente, encapsulando en todos los casos un solución de carboxi-fluoresceína 50 mM disuelta en tampón Hepes-NaCl (10 mM-150 nM, pH 7,4). Los liposomas se separan de la carboxi-fluoresceína libre mediante cromatografía en columna (1x4 cm) utilizando Sepharosa CL4B (Pharmacia-LKB, Upsala, Suecia).

2.1.1.- Purificación de la carboxifluoresceína : Previa a su utilización, la carboxifluoresceína debe purificarse y eliminar los contaminantes polares y los no hidrofóbicos (388).

2.1.1.1.- Recristalización : Se toman 35 gramos de carboxifluoresceína (Eastman Kodak Co., Rochester, USA) y se disuelven en 200 ml de etanol, se añaden 2 gramos de carbón activado y se calienta la mezcla durante una hora en un baño de agua. La mezcla se filtra y el filtrado se enfría añadiendo lentamente 400 ml de agua. La mezcla se deja recristalizar a -20°C durante toda una noche con el objetivo de provocar la precipitación de los contaminantes.

2.1.1.2.- Eliminación de contaminantes polares : Se toman 30 gramos de carboxifluoresceína prepurificada y se disuelven en 40 ml de NaOH 6M. La solución se neutraliza hasta pH 7,5 mediante HCl 6M. Finalmente la solución se calienta a 50°C hasta la total disolución de los precipitados que aparecen. Se aplican 10 ml de esta solución a una columna de cromatografía (K26/100, Pharmacia-LKB, Upsala, Suecia) rellena con Sephadex LH20 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suecia). La muestra se eluye con tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a una velocidad de 0,5 ml/minuto. Se recogen fracciones de 2 ml. La

pureza de cada fracción se monitoriza mediante cromatografía en capa fina sobre placas de silicagel 60 (E. Merck, Darmstad,RFA), usando una fase móvil compuesta de cloroformo, metanol y agua en unas proporciones de 65:25:4 en volumen. Las fracciones con la carboxifluoresceina pura se identifican mediante iluminación con una lámpara de luz ultravioleta que excite a 254 nm..

La muestra se eluye formando dos picos, un primer pico contiene contaminantes no fluorescentes seguido de un segundo pico fluorescente con la carboxifluoresceina pura. Los contaminantes hidrofóbicos son retenidos en la cabeza de la columna formando un precipitado no fluorescente. La concentración mas adecuada para encapsular en los liposomas es la que sea isoosmolar con los tampones fisiológicos (275 mOsm). Esta concentración esta alrededor de 100 mM si trabajamos con un tampón Tris-HCl 10 mM. La concentración total de carboxifluoresceina se determina por espectrofotometria a 492 nm.

2.1.2.- Valoración de la estabilidad : La estabilidad de los liposomas se entiende como la capacidad que presentan las membranas lipídicas para impedir o dificultar el paso a través de las mismas de materiales hidrosolubles encapsulados en su interior. En realidad se trata de una medida de la capacidad de retención de material encapsulado y no del grado de estabilidad de las membranas.

Físicamente se trata de un metodología basada en la capacidad de "quenching" de la carboxifluoresceina a elevadas concentraciones. Así, en nuestras condiciones de trabajo, una concentración de carboxifluoresceina de 50 mM en el interior de los liposomas presenta una menor fluorescencia que cuando la carboxifluoresceina se libera al exterior.

Los datos de estabilidad se expresan en términos de latencia, entendida como la proporción de carboxifluoresceina que permanece sin difundir en el interior del liposoma, de acuerdo con la siguiente fórmula :

$$\text{latencia} = \frac{(\text{Fluorescencia total} - \text{Fluorescencia remanente})}{\text{Fluorescencia total}}$$

La fluorescencia total es la fluorescencia producida por la lisis de una alícuota de liposomas lisados con una solución de Triton X-100 al 10% en tampón Hepes, mientras que la fluorescencia remanente es la fluorescencia que posee una alícuota igual de liposomas no lisados. Todas las mediciones se realizaron con un espectrofluorímetro Perkin Elmer con una excitación ajustada a 490 nm y una emisión a 520 nm.

La estabilidad fue determinada tomando una alícuota de 100 μ l de liposomas y resuspendiéndola en 1 ml de tampón Hepes, por otra parte se tomó la misma alícuota de liposomas y se resuspendió en plasma de ratón. La primera muestra se dejó 50 días a 4°C, mientras que la segunda se dejó 48 horas a 37°C. De ambas muestras se valoró la carboxifluoresceína latente a lo largo de todo el proceso.

2.2.- COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LOS LIPOSOMAS : La composición lipídica de los liposomas se determinó mediante cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

2.2.1.- Cromatografía en capa fina (TLC) : Se toman 200 μ l de la suspensión de liposomas y se centrifugan a 10000xg durante diez minutos a 4°C, el sobrenadante se descarta y los liposomas se disuelven con 200 μ l de una solución de cloroformo-metanol (2:1). La extracción de los lípidos se realiza mediante agitación con un vortex y posterior centrifugación a 10000xg durante 10 minutos a 4°C. La fase inferior orgánica se concentra en un rotovapor o bien mediante una corriente de nitrógeno hasta lograr un volumen de 20 μ l. Se aplican 10 alícuotas de 1 μ l cada una sobre una placa de Silicagel-60 de un tamaño de 10x10 cm (E.Merck, Darmstadt, RFA) dejándose secar las muestras. En la misma placa se aplican 5 μ gr. de colesterol, esfingomielina, fosfatidilcolina, dicetilfosfato y GD3 a modo de estándares. Todos los estándares se disuelven en cloroformo-metanol (2:1).

La placa se deposita verticalmente en un tanque de cromatografía (Desaga, Heidelberg, RFA) que contiene una fase móvil constituida por cloroformo, metanol y CaCl₂ al 0,02% en agua en unas proporciones volumen-volumen de 60:40:9. La placa se deja en el interior del tanque hasta que el frente de la fase móvil alcanza el borde superior de la misma, a continuación se retira y se deja secar 10 minutos al aire .

2.2.2.- Visualización : Los glicolípidos se pueden visualizar mediante la reacción del α -naftol. El reactivo de α -naftol se prepara disolviendo 2,5 gr. de α -naftol en 25 ml. de etanol absoluto. De esta solución madre se toman 10,5 ml. y se mezclan cuidadosamente con 6,5 ml. de ácido sulfúrico concentrado, 40,5 ml. de etanol absoluto y 4 ml. de agua. La reacción es muy calorífica, por lo que la mezcla debe realizarse en un baño de hielo y dejarla reposar no menos de tres horas antes de su empleo (389).

Los lípidos neutros se visualizan mediante la reacción del anisaldehído. Se prepara una mezcla con 50 ml. de ácido acético, 1 ml. de ácido sulfúrico y 0,3 gr. de anisaldehído. En ambos casos las placas de TLC deben pulverizarse mediante un spray en el interior de una cabina extractora de gases. La reacción se visualiza dejando las placas durante 10 o 15 minutos a 120°C en una estufa de secado.

2.2.3.- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) : Los lípidos fueron cuantificados mediante HPLC en un proceso que implica una primera etapa de extracción de los mismos y separación de fosfolípidos, esteroides y gangliósidos y una segunda etapa cromatográfica de cuantificación.

2.2.2.1.- Extracción de lípidos : Se toman 100 μ l de liposomas y los lípidos se extraen según el procedimiento descrito en el apartado III-3.1.1 con la única diferencia que la fase orgánica se seca totalmente y finalmente el residuo seco se disuelve con 20 μ l de tampón acetonitrilo-fosfato 5 mM pH=5.6 (87:13, v:v). La mezcla disuelta se aplica sobre una minicolumna de extracción Absorbex-NH₂ (E. Merck, Darmstad, RFA). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, la columna se ha acondicionado previamente con 20 ml de metanol, seguidos de 20 ml de acetonitrilo y 20 ml de tampón acetonitrilo-fosfato 5 mM pH=5,6 (87:13, v:v). A continuación se aplica la muestra y se lava la columna con 20 ml de tampón acetonitrilo-fosfato 5 mM, eluyéndose los lípidos neutros. Los gangliósidos se eluyen con 20 ml de tampón acetonitrilo-fosfato 20 mM pH=5,6 (1:1, v:v) . Las dos fracciones obtenidas se evaporan a sequedad por medio de un rotovapor o bien mediante liofilización. En el caso de utilizar un rotovapor debe añadirse a cada fracción entre un 20 y un 30% en volumen de isopropanol para facilitar la evaporación de la fase acuosa. La fracción que contiene los gangliósidos se redisuelve con 50 μ l de agua, mientras que la fracción que contiene los lípidos neutros se disuelve en 1 ml de cloroformo.

Los lípidos neutros deben fraccionarse para separar fosfolípidos de esteroides mediante una minicolumna de Absorbex-silica (E.Merck, Darmstad, RFA.) previamente equilibrada con 20 ml de metanol y 20 ml de cloroformo. Una vez aplicada la muestra la columna se lava con 20 ml de cloroformo, eluyéndose los esteroides, mientras que los fosfolípidos se eluyen con 20 ml de metanol. Las fracciones obtenidas se desecan mediante un rotovapor. La fracción que contiene los fosfolípidos se disuelve en 50 μ l de diclorometano-metanol (1:1, v:v). La fracción que contiene los esteroides se disuelve en 50 μ l de etanol-diclorometano-cloroformo (45:45:10, v:v) (390).

2.2.2.2.- Cuantificación de los gangliósidos : La fracción que contiene el gangliósido se cuantifica mediante HPLC de intercambio iónico sobre una columna Lichrospher-NH₂ (E. Merck, Darmstad, RFA) equilibrada con tampón acetonitrilo-fosfato 5 mM pH = 5,6 (87:13, v:v). Se inyectan 10 μ l de muestra y se eluye con el siguiente gradiente :

Tiempo	Gradiente
De 0 hasta 7 minutos	Tampón A 100%
De 7 hasta 60 minutos	Gradiente hasta A:64% y B:36%
De 60 hasta 80 minutos	Gradiente hasta A:36% y B:64%

Tabla VII : Gradiente empleado en la cuantificación de GD3 mediante HPLC

El tampón A está constituido por acetonitrilo-fosfato 5 mM pH = 5,6 en unas proporciones de 87 % de acetonitrilo y 13 % de fosfato, mientras que el tampón esta constituido a partes iguales por acetonitrilo y tampón fosfato 20 mM pH = 5,6. La columna se eluye con un flujo de 1 ml/minuto y la detección se realiza a 215 nm. El area del pico obtenido se integra y su area se compara con el area de concentraciones conocidas del mismo gangliósido (391).

2.2.2.3.- Cuantificación de los fosfolípidos : La determinación y cuantificación de los fosfolípidos se realiza mediante HPLC de fase reversa sobre una columna Lichrospher RP18 (E. Merck, Darmstad, RFA.) equilibrada con un tampón de hidróxido amónico 20 mM pH=10,7-acetonitrilo (22:78, v:v). Se inyectan 10 μ l de muestra y se eluyen con un gradiente de 10 minutos desde el tampón inicial hasta un 100% de acetonitrilo con un

flujo de 1 ml/minuto y realizándose la detección a 215 nm (392).

2.2.2.4.- Cuantificación de colesterol : El colesterol se cuantifica mediante HPLC de fase reversa sobre una columna Lichrospher-RP18 (E. Merck, Darmstad, RFA.) eluida en modo isocrático con metanol 100%, a un flujo de 1 ml/minuto y monitorizando la elución a 214 nm (393).

2.3.- CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA : La caracterización inmunológica de los liposomas se realizó con el objetivo de comprobar que las moléculas de GD3 quedaban atrapadas entre las bicapas lipídicas y con la parte glucídica dirigida hacia el exterior del liposoma. Esta caracterización se realizó mediante técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) y mediante técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la microscopia electrónica.

2.3.1.- Absorción de liposomas con anticuerpos anti-GD3 : Se toma una alícuota de 50 μ l de la suspensión de liposomas-GD3 y se incuba en frío durante 18 horas con 200 μ l de sobrenadante del anticuerpo monoclonal anti-GD3 14F9. El mismo proceso se repite con liposomas que no contienen GD3, así mismo y a modo de control negativo se realizan ambas absorciones con 200 μ l de sobrenadante del anticuerpo F111 anti-RNAasa. Después de la absorción las muestras se centrifuga diez minutos a 10000xG para precipitar los liposomas y el sobrenadante se analiza mediante ELISA para comprobar si los anticuerpos anti-GD3 han sido absorbidos por los liposomas, y si esta absorción es específica o no. El protocolo detallado para este tipo de ELISA se describe en el apartado III-7.1.

2.3.2. Microscopía electrónica : Para determinar si las moléculas de GD3 muestran el determinante glucídico en la parte externa de liposoma se combinaron técnicas de inmunocitoquímica con la microscopia electrónica.

2.3.2.1.- Marcaje de los liposomas : Se tomaron alícuotas de 10 μ l de liposomas que contenían GD3 y la misma alícuota de liposomas sin GD3 y se depositaron sobre sendas rejillas de microscopia electrónica previamente tratadas con Formvar y un film de carbono. La muestra se deja secar 15 minutos al aire y se bloquean mediante tres incubaciones de 5 minutos cada una en una solución ovoalbúmina al 1,5 % en PBS. Después del bloqueo las muestras se lavan con una solución de ovoalbúmina al 0,15% en PBS 3 veces y se

incubaban 30 minutos con el primer anticuerpo. Se lava tres veces la muestra y a continuación se incubaba con antisuero anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con oro coloidal diluido 1:500 durante otros 30 minutos. Después de la segunda incubación se seca la muestra con un papel de filtro se lava tres veces con PBS-OVA y posteriormente tres veces mas con agua destilada.

Durante las incubaciones con los anticuerpos las rejillas deben flotar sobre gotas de reactivos con la cara de la rejilla que contiene los liposomas en contacto con el anticuerpo, poniendo especial atención en evitar que la rejilla se hunda en la gota, estas gotas de reactivos se depositan sobre una hoja de parafilm dispuesta en una mesa nivelada. Así mismo después de cada incubación las rejillas deben secarse con un papel de filtro pero sin que lleguen a secarse totalmente (394).

2.3.2.2.- Contrastado : Una vez las muestras se han marcado con anticuerpo y oro coloidal deben contrastarse para permitir su observación. Se han utilizado indistintamente dos tipos de contraste, por una parte acetato de uranilo al 2% en agua y un pH de 4, o bien molibdato amónico al 1,5% en agua y pH = 7. El contrastado se realiza sujetando las rejillas con unas pinzas de microscopia electrónica y depositando 25 μ l de solución contrastadora sobre la rejilla durante 1 minuto. Con un papel de filtro se seca la rejilla y se pasa a la observación (395).

2.3.2.3.- Observación : La observación se realizó en el servicio de microscopia electrónica de la Universidad de Barcelona mediante un microscopio electrónico Hitachi modelo 600. Las preparaciones se observaron a varios aumentos según se describe en el apartado de resultados.

2.4.- BIODISTRIBUCION DE LOS LIPOSOMAS : Con el objetivo de conocer la farmacocinética de los liposomas se realizaron estudios de seguimiento de los mismos por el interior del organismo y así conocer los principales órganos implicados en su procesamiento.

Se prepararon liposomas que encapsulaban yoduro de propidio a modo de marcador. El yoduro de propidio es un fluorocromo no vital que solo emite fluorescencia si se encuentra unido al ADN. Los liposomas con GD3 y yoduro de propidio se prepararon siguiendo el

método general descrito en el apartado III-1.1 y la solución encapsulada tenía una concentración de 10 mM yoduro de propidio en NaHCO₃ 100 mM.

Por vía endovenosa se administró a un lote de ratones 10 µg de Lp-IP y una hora después los animales fueron sacrificados y el bazo, hígado y pulmones se congelaron en nitrógeno líquido. La fluorescencia se observó sobre criocortes montados con una solución de glicerol en agua al 45% utilizando un microscopio de fluorescencia.

3.- OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS

La gran mayoría de los ensayos se realizaron utilizando GD3 adquirido comercialmente (Genzyme Corporation, Boston, USA) y cuyo origen es de cerebro de vaca. Se realizaron diversos ensayos con GD3 extraído y purificado en nuestro laboratorio a partir de células de la línea de melanoma humano WM-164 cultivado in vitro o bien implantado en ratones atímicos nu/nu Balb/c. El resto de los gangliósidos empleados se adquirieron comercialmente (Biocarb, Lund, Suecia).

3.1.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL GANGLIÓSIDO GD3 : La obtención del GD3 se desarrolla en cuatro etapas. En primer lugar se realiza una extracción de los lípidos totales presentes en las células seguida de una extracción de Folch y Pi para separar fosfolípidos y esteroides de glicolípidos. A continuación se separan los glicolípidos neutros de los gangliósidos mediante cromatografía de intercambio iónico y finalmente el GD3 se purifica mediante HPLC semipreparativa.

3.1.1.- Extracción de lípidos totales : Se partió de lotes de células, congeladas o frescas, que oscilaban entre los 2 y los 5 gramos. Las células se lavaron un mínimo de tres veces con PBS sin Calcio ni Magnesio por medio de centrifugaciones de diez minutos a 400xG. El pellet celular se disolvió en 45 ml de cloroformo-metanol (2:1, v:v) agitando continuamente. Las células se homogenizaron mediante sonicación durante 5 minutos introduciendo la punta de titanio del sonicador (Labsonic U, Braun Biotec, RFA) en el interior del tubo que contenía las células, para evitar el calentamiento de la muestra se trabajó en el interior de una bañera de hielo. La extracción se continuó incubando la muestra durante 15 minutos a 50°C. Se centrifugó durante 15 minutos a 1000xG y el sobrenadante se decanta y deposita en un matraz con cuello esmerilado, el pellet se re-

extrae dos veces siguiendo el mismo protocolo pero utilizando una mezcla de cloroformo-metanol- CaCl_2 al 0,02% en agua (31:63:6, v:v). Finalmente los restos celulares insolubles se descartan y los tres sobrenadantes se combinan y mezclan bien por agitación. En los casos en que se observaron precipitados en los sobrenadantes, estos se filtraron a través de un papel de filtro (Whatman.Madistone, Inglaterra). La fase orgánica conteniendo los lípidos totales se evapora en un rotovapor y el residuo se seca completamente mediante liofilización durante toda una noche. El residuo seco se disuelve en 50 ml de cloroformo : metanol (2:1, v:v) para proceder a la extracción de Folch y Pi.

3.1.2.- Extracción de Folch y Pi : Se toma la disolución con los lípidos totales y se combina con un 20%, en volumen, de KCl 0.1M agitando enérgicamente para mezclar las fases orgánica e inorgánica. Ambas fases se separan centrifugando 15 minutos a 1000xG. La fase superior, que contiene los glicolípidos, se decanta poniendo especial cuidado en no arrastrar la fase orgánica y se deposita en una matraz con cuello esmerilado, mientras que la fase inferior se re-extrae dos veces mas llevándola al volumen inicial con metanol:KCl 0,1 M:Cloroformo (47:48:3). Finalmente las tres fases superiores se combinan y se evaporan en el rotovapor añadiendo isopropanol varias veces para facilitar la evaporación de la porción acuosa. El secado final se realiza mediante liofilización (396).

El residuo seco se disuelve en 10 ml de cloroformo:metanol:KCl 0,1 M en agua (3:48:47, v:v) y se desala mediante una minicolumna de Absorbex-RP18 (E. Merck, Darmstad, RFA). Las columnas de Absorbex-RP18 se acondicionan mediante lavados sucesivos con 20 ml de metanol, seguidos de tres ciclos con 10 ml de metanol y 20 ml de cloroformo:metanol 2:1, finalmente la columna se lava con 20 ml de cloroformo:metanol:KCl 0,1M en agua (3:48:47, v:v). La muestra se aplica con una jeringa de 20 ml y se reaplica dos veces. Las sales se eliminan lavando la columna con 30 ml de agua, mientras que los glicolípidos se recuperan con 30 ml de metanol. Finalmente la muestra se concentra hasta sequedad mediante rotovapor y liofilización (397).

3.1.3.- Separación de glicolípidos neutros y gangliósidos : Los glicolípidos totales extraídos mediante partición de Folch y Pi y posterior "desalting" pueden separarse en glicoesfingolípidos neutros y ácidos mediante cromatografía de intercambio iónico a baja presión. Asimismo los glicoesfingolípidos ácidos (gangliósidos) pueden separarse en mono-, di- y tri- gangliósidos según el número de residuos de ácido siálico que contengan (398).

3.1.3.1.- Preparación de la columna : Podemos utilizar DEAE-Sephadex A-25 (Farmacia-LKB, Upsala, Suecia) o bien DEAE-Celulosa (E. Merck, Darmstad, Alemania). Pesamos entre diez y 35 gramos de resina y se activa con 100 ml de tampón B (metanol:cloroformo:Acetato sódico 0,8M , 60:30:8) mediante agitación suave durante 15 minutos y se deja sedimentar el gel descartándose el sobrenadante. Este proceso se repite tres veces con tampón B nuevo y el último ciclo se deja a 4 grados un mínimo de 18 horas. Después de descartar el último sobrenadante el gel se lava cuatro veces con 30 ml de tampón A (metanol:cloroformo:agua, 60:30:8), a continuación el gel se carga en una columna SR 25/45 (Farmacia-LKB, Upsala, Suecia) poniendo mucha atención para evitar la formación de burbujas. El gel se compacta con el tampón A a un flujo máximo de 2,5 ml/minuto durante un mínimo de 4 o 5 horas, finalmente la columna se lava con metanol durante toda la noche a razón de 1 ml/minuto.

3.1.3.2.- Preparación de la muestra : Los glicolípidos extraídos mediante la partición de Folch y Pi y libres de sales deben desecarse mediante liofilización y resuspenderlos con unos 10 o 15 ml de metanol. Los glicolípidos neutros se eluyen con 400 ml de metanol, mientras que los gangliosidos monosializados se eluyen con acetato amónico 0,03M en metanol, los disialos se eluyen con acetato amónico 0,13M, mientras que los tri y tetrasializados se eluyen con acetato amónico 0,45M. Sino se desea la separación según el número de residuos de ácido siálico, los gangliósidos pueden eluirse completamente con acetato amónico 0,8M. La velocidad de flujo se mantiene constante a 1 ml/minuto. Las fracciones se recogen en matraces del rotovapor, añadiéndose isopropanol hasta llegar a una proporción 50:50 con el eluido y se evaporan, el secado final debe hacerse mediante liofilización.

Las columna no pueden regenerarse y una vez utilizadas se descarta el gel y se lava bien la columna con agua y metanol.

3.1.3.3.- Desalting de los glicolípidos eluidos : Los glicolípidos salen de la columna mezclados con sales (acetato amónico) y deben desalarse antes de seguir trabajando con ellos. Los glicolípidos se resuspenden y se tratan tal y como se detalla en el apartado III-3.1.2. . El residuo seco se resuspende en un volumen máximo de 250 μ l de agua.

3.1.4.- Purificación del GD3 mediante HPLC analítica : La fracción con los gangliósidos

contiene GM3, GM2, GD3, GD2 y en menor grado GM1 y trazas de GD1a, por lo que se debe separarse el GD3 del resto de gangliósidos. Esta purificación final se realiza mediante HPLC de intercambio iónico sobre una columna de sílica funcionalizada con radicales NH₂ (Lichrospher-NH₂ 4x250, E. Merck, Darmstad, RFA) (391). La columna se equilibra con un tampón acetonitrilo-fosfato 5 mM pH=5,6 (87:13, v:v) durante un mínimo de dos horas a una velocidad de flujo de 1 ml/minuto y una presión que oscila entre 35 y 37 atmósferas. Se inyectan 100 µl de muestra mediante el inyector automático y el cromatograma se desarrolla con el siguiente gradiente :

Tiempo	% A	% B	Flujo
0- 7 min.	100	0	1 ml / min.
7-60 min.	64	36	1 ml / min.
60-80 min.	36	64	1 ml / min.
80-90 min.	0	100	1 ml / min.

Tabla VIII : Gradiente de elución empleado en la determinación analítica de GD3 mediante HPLC.

La elución se monitoriza con un detector de fotodiodos con un rango de barrido entre 200 y 330 nm y ajuste automático de escala. Las fracciones se recogen con un colector de fracciones conectado al detector de forma que conserve aquellas fracciones que contienen glicolípidos y descarte el resto (Frac-100, Pharmacia-LKB, Uppsala, Suecia).

3.1.5.- HPLC preparativa : La escasa capacidad preparativa de las columnas analíticas obligó a utilizar columnas preparativas con el objetivo de aumentar el rendimiento de cada purificación. Se utilizó el mismo protocolo y el mismo tipo de columna variando solo el tamaño de la misma (Lichrospher-NH₂ 10x250, E.Merck, Darmstad, RFA). La elución se realizó con los mismos tampones y el gradiente expresado en la tabla IX. El resto del protocolo era idéntico al empleado con la columna analítica.

Tiempo	% A	% B	Flujo
0- 15 min.	100	0	5 ml / min.
15- 68 min.	64	36	5 ml / min.
68- 87 min.	36	64	5 ml / min.
87- 100 min.	0	100	5 ml / min.

Tabla IX : Gradiente de elución empleado en la purificación del GD3 mediante HPLC preparativa.

En ambos casos las fracciones obtenidas se desecan por medio de un rotovapor y las sales se eliminan por medio de cromatografía en fase reversa según el protocolo descrito en el apartado III-3.1.2. . El residuo seco de cada fracción obtenida se disuelve con metanol.

3.1.6.- Identificación de los gangliósidos : Los distintos gangliósidos obtenidos se identifican por medio de HPLC analítica, cromatografía en capa fina e inmuno-TLC.

3.1.6.1.- HPLC analítica : Para identificar los distintos gangliósidos obtenidos se realizaron una serie de cromatografías analíticas con distintos standares obtenidos comercialmente (Biocarb, Lund, Suecia) siguiendo el mismo protocolo que el descrito en el apartado de purificación del GD3 mediante HPLC semipreparativa. Los tiempos de retención de cada gangliósido se compararon con los tiempos de retención obtenidos en la cromatografía semipreparativa, aceptándose una desviación de \pm un 2,5% del total del tiempo de retención.

3.1.6.2.- TLC : En aquellos casos en que había solapamiento de varios picos, o que los tiempos de retención variaban por encima del margen aceptado, los gangliósidos obtenidos se identificaron por medio de TLC sobre placas de silicagel (E. Merck, Darmstad, RFA) siguiendo el mismo protocolo que el descrito en el apartado III-2.2.1. pero utilizando placas de 10x20 cm y tiñendo las mismas con α -naftol. Los coeficientes Rf obtenidos de las bandas problema fueron comparados con los Rf de los standares.

3.1.6.4.- Inmuno-TLC : La identificación final del pico que contenía el GD3 se realizó por medio de inmuno-TLC con anticuerpos monoclonales anti-GD3 obtenidos en nuestro laboratorio.

Se utilizan tantas placas de TLC del tipo Silicagel-60 sobre folio de aluminio de 5x7,5 cm. (E. Merck, Darmstad, RFA) como anticuerpos se quieran testar mas una. Se marca una linea de puntos de aplicación a 1 cm de un extremo de la placa depositándose un mínimo de 5 μ gr de cada gangliósido y una vez secada la placa se deja correr durante 15 minutos siguiendo el protocolo habitual. Se retiran las placas del tanque de cromatografía y una placa se tiñe con α -naftol para poder visualizar las bandas de todos los gangliósidos, mientras que las otras placas se tiñen con el anticuerpo monoclonal (399).

Las placas que serán incubadas con el anticuerpo se fijan con Plexigum P-28 (Rhom Chemicals, Darmstad, RFA) al 0,1 % en hexano sumergiendo la placa tres veces durante 5 minutos cada vez en la solución y dejándola secar. Después del último secado se bloquea la placa con una solución de BSA al 3% en PBS durante 30 minutos, luego las placas se lavan varias veces con PBS que contiene un 0,3% de BSA para eliminar los restos de bloqueo no absorbidos. La incubación con el primer anticuerpo se realiza empapando una hoja de papel de filtro (Munktell, Pharmacia-LKB, Uppsala, Suecia) con 3 ml de anticuerpo y depositándola sobre la placa de TLC poniendo especial atención a que no queden burbujas de aire entre la placa y el papel de filtro. Las placas se dejan en una cámara húmeda durante 18 horas a temperatura ambiente . Como primer anticuerpo se utilizaron indistintamente los anticuerpos 136-2A10, 14F9 o 14G4 todos específicos de GD3 y obtenidos en nuestro laboratorio. La existencia de posibles contaminantes se comprobó utilizando anticuerpos específicos de otros gangliósidos. Todos los anticuerpos deben tener una concentración mínima de 15 μ g de anticuerpo por mililitro.

Al finalizar la primera incubación se retira el papel de filtro y se decanta el exceso de anticuerpo sin que se seque la placa. Las placas se lavan tres veces por inmersión en una solución de PBS-BSA durante 5 minutos. El segundo anticuerpo se deposita directamente sobre las placa y se dejan incubar durante 4 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Como segundo anticuerpo se utilizo antisuero anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con peroxidasa diluido 1:500 con la solución de lavado (Dako, Copenhague, Dinamarca), incubando en agitación durante dos horas en la oscuridad. Finalmente se

decanta el exceso de anticuerpo y se lavan las placas con tres ciclos de PBS-BSA y tres ciclos de tampón tris-salino (TBS). Como sustrato de la peroxidasa se utilizó diamino bencidina (Merck, Darmstad, RFA) disuelta en TBS a la que se añadía en el momento de su utilización 50 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%. Las placas se dejan en esta solución cromogénica hasta que las bandas coloreadas son bien visibles, momento en que la reacción se detiene con agua. Las placas deben fotografiarse dado que las bandas pierden el color a las pocas horas.

La movilidad de las bandas coloreadas por los anticuerpos se comparó con las bandas de la placa teñida con α -naftol.

3.1.6.4.- Tratamiento alcalino : Frecuentemente se observó que el GD3 copurificaba con una banda que migraba en TLC mas rápida que el standard, esta banda puede corresponder a la lactonización de la molécula de GD3 o a la existencia de un derivado acetilado del mismo, el 9-O-Acetil-GD3. El tratamiento alcalino suave convierte ambas moléculas en GD3.

El gangliósido purificado y liofilizado se disuelve en hidróxido sódico o potásico 0,1 N en metanol y se incuba durante 2 horas a 37 grados, o toda la noche a temperatura ambiente. La recuperación del gangliósido se realiza mediante evaporación y desalado sobre RP-18. El análisis de los resultados se realiza mediante TLC e inmuno-TLC con el anticuerpo ME-311 específico de 9-O-Acetil-GD3 (400).

3.1.7.- Cuantificación del GD3 : La cantidad de GD3 purificado se determinó mediante coloración específica del ácido siálico según el método espectrofotométrico de la difenilamina. El reactivo de difenilamina se prepara disolviendo 5 gramos de difenilamina en 450 ml. de ácido acético y 50 ml. de ácido sulfúrico. Se toman 200 μ l de la muestra de GD3 y se mezclan con 100 μ l de ácido tricloroacético al 15% en agua y 600 μ l del reactivo de difenilamina. La mezcla se agita enérgicamente y se hidroliza al baño maría durante 30 minutos. El color desarrollado se lee mediante un espectrofotómetro a 530 nm. La densidad óptica leída es directamente proporcional a la cantidad de gangliósido en solución. Como curva patrón se emplea un standard de ácido siálico entre 10 y 200 μ g. La cantidad de GD3 se interpola en la curva standard teniendo en cuenta que cada molécula de GD3 posee dos moléculas de ácido siálico, por lo que el número total de

moles de GD3 será la mitad que los moles de ácido siálico detectados (401).

3.1.8.- Análisis de las ceramidas mediante TLC : La existencia de ceramidas aberrantes se monitorizó mediante TLC de fase reversa sobre placas de silicagel-RP18 (E. Merck, Darmstad, RFA) utilizando una fase móvil de metanol:acetonitrilo:agua (19:5:1, v:v:v). En esta fase móvil el GD3 purificado se separa según el tipo de ceramida que posee, siendo posible determinar la longitud y el grado de insaturación de las mismas (402). Las ceramidas con un menor número de carbonos migran más rápidamente que las ceramidas de cadena larga, y de dos cadenas de igual longitud, migrará más rápidamente la que no posea dobles enlaces entre carbonos. Con la excepción de la fase móvil el resto de la TLC se desarrolla de forma idéntica a la descrita en el apartado III-3.1.2..

3.1.9.- Disialil-lactosa-BSA : La disialil-lactosa-BSA es un antígeno sintético obtenido del "Laboratoire de Chemie Biologique" de la "Universite des Sciences et Techniques de Lille, Flandes et Artois" en Lille (Francia) dirigido por el Profesor J. Montreuil y con el que tenemos suscrito un convenio de colaboración. El protocolo de obtención se basa en la degradación enzimática del GD3 con el enzima endoglico-ceramidasa que hidroliza el enlace glicosídico entre la glucosa terminal de la parte glucídica del glicolípido y la ceramida (403). El carbohidrato liberado se separa de la ceramida por cromatografía en fase reversa y se conjuga por medio de aminación reductiva con la seroalbúmina bovina (404). El producto fue recibido en forma liofilizada y con un grado de conjugación de 8 moléculas de disialil-lactosa por molécula de BSA.

4.- CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Todas las líneas celulares utilizadas fueron cultivadas en frascos de cultivo de 175 cm² de superficie (Nunc, Dinamarca) mediante RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, N.Jersey, USA) suplementado con Glutamina 20 mM y un 10% de suero fetal de ternera (Biological Industries, Israel). Salvo indicación expresa no se utilizaron ni antibióticos ni otros suplementos. Las células utilizadas para la extracción y purificación del GD3 se cultivaron en grandes dispositivos de cultivo celular con una superficie de 6000 cm² de superficie (Cell factories CF10, Nunc, Dinamarca). Los frascos de cultivo se llenaron con 75 ml de medio de cultivo, mientras que las "cell factories" utilizaban 2 litros de medio. En todos los casos el inóculo inicial era de 50000 células por mililitro de medio. Las células se

cultivaron en ambiente estéril a 37°C en atmósfera con un 7% de CO₂ y un 100% de humedad hasta llegar un estado de confluencia.

Para prevenir cualquier degradación enzimática de los antígenos de membrana nunca se utilizaron tratamientos enzimáticos para despegar las células de los frascos de cultivo. En su lugar se utilizó PBS o solución salina según Hanks sin Calcio ni Magnesio (Whitaker) y agitación suave. Una vez despegadas las células se recogían mediante un pipeta o por decantación y se lavaban con Hanks por centrifugación a 400xg durante 7 minutos.

4.1.- LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS : Las líneas celulares empleadas se detallan en la tabla X. La línea WM-164 fue cedida por el Dr. Reuss del banco de células del departamento de Inmunofarmacología de E. Merck (Darmstad, RFA). Las líneas SKMel 28 y SKMel 23 fueron cedidas por el Dr. F.X. Real del departamento de Inmunología del Instituto Municipal de Investigación Médica de Barcelona. La línea de melanoma murino B16 fue cedida por el Dr. S.F. Aliño del departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Los hibridomas 136-2A10, 14G4 y 14F9 fueron obtenidos en nuestro laboratorio dentro de nuestro programa de inmunogenicidad de antígenos tumorales, mientras que el híbrido F111 fue obtenido por mi compañero J. Adán del departamento de Inmunobiología mediante inmunización "in vitro". Los anticuerpos monoclonales ME-361, anti-GD2 (405) y ME-311, anti-9-O-acetil-GD3 (45) fueron cedidos por el departamento de Inmunofarmacología de E. Merck (Darmstad, RFA) y de los mismos solo disponemos de sobrenadante y no disponemos del hibridoma. El resto de líneas celulares fueron adquiridas a la American Type Culture Collection (Rockville, Mariland, USA). Todas las líneas celulares utilizadas fueron analizadas para detectar la existencia de contaminación con micoplasmas por medio del método Gene-Probe (Gene Probe Incorporated, San Diego, California, USA)). En ningún caso se detectó contaminación por micoplasmas.

4.2.- EXPRESIÓN DE GD3 EN LA MEMBRANA CELULAR : Todas las líneas utilizadas fueron analizadas para comprobar si expresaban GD3 en su membrana, o si por el contrario eran negativas para este gangliósido. El análisis se realizó mediante citometría de flujo y utilizando los anticuerpos monoclonales 14F9 (IgG3) o 136-2A10 (IgM) ambos específicos de GD3.

Línea	Tipo	Donante	GD3
WM - 164	Melanoma humano	Dr. Reuss	Positiva
SK-Mel 28	Melanoma humano	Dr. Real	Positiva
SK-Mel 23	Melanoma humano	Dr. Real	Positiva
B-16	Melanoma murino	Dr. Aliño	Negativa
Colo 205	Adenocarcinoma	ATCC	Negativa
PA-1	Teratocarcinoma	ATCC	Negativa
F111	Hibridoma	Propia	anti-RNAsa (IgG1)
136-2A10	Hibridoma	Propia	anti-GD3 (IgM)
14F9	Hibridoma	Propia	anti-GD3 (IgG3)
14G4	Hibridoma	Propia	anti-GD3 (IgM)

Tabla X : Relación de líneas empleadas, citandose el tipo de línea, el donante de la misma y la expresión de GD3 en su membrana. Todos los hibridomas han sido obtenidos en nuestro laboratorio y de los mismos se cita su especificidad e isotipo.

Se tomaron un millón de células de cada línea y se lavaron con PBS dos veces mediante centrifugación a 400xg durante 7 minutos. Se ajusto la concentración del primer anticuerpo a 10 μ gr/ml y se incubaron las células con 100 μ l de anticuerpo durante 30 minutos a 4°C. A continuación las células se lavan dos veces con 1 ml de una solución de BSA al 0,15% en PBS y se incuban durante 15 minutos en frío con antisuero anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína a razón de 4 μ g de anticuerpo por millón de células (Becton Dickinson, Mountain View, California, USA). Las células se lavan dos veces y el pellet resultante se resuspende en 1 ml yoduro de propidio (5 μ g/ml) para poder discriminar entre células vivas y muertas. EL análisis se realizó con un citómetro de flujo EPICS Profile II (Coulter, Orlando, Florida, USA) contabilizandose un mínimo de 10000 eventos.

4.3.- IMPLANTACIÓN DEL MELANOMA HUMANO WM-164 EN RATONES nu/nu : Con el objetivo de disponer de xenoinjertos del melanoma humano WM-164 se implanto dicho

tumor en ratones atímicos machos nu/nu (IFA-Credo, Lyon, Francia). Esta cepa de ratones deriva del ratón Balb/c y posee una mutación homocigótica recesiva y ligada al sexo que provoca una atrofia de la glándula tímica. Estos ratones carecen de linfocitos T y no pueden rechazar xenoinjertos. Como característica secundaria estos ratones carecen de pelo, lo que les ha dado el nombre de ratones nude o desnudos. Al ser una mutación ligada al sexo, solo se pueden utilizar ratones machos. Debido a la inmunodeficiencia que presentan este tipo de ratones, deben mantenerse en ambiente estéril para prevenir infecciones.

Se tomaron lotes de 5 ratones nu/nu, machos de 7 semanas, y se les administró a cada uno 5 o 10 millones de células WM-164 por vía subcutánea en la espalda (406). Cuando el tumor era macroscópicamente visible y con un diámetro medio de 1 cm, el animal era sacrificado por desnucamiento y el tumor resecado y disgregado mecánicamente con ayuda de unas pinzas. La disgregación final se realizaba incubando las células con una solución de que contenía 2 mgr/ml colagenasa (Sigma Co., St. Louis, USA) y 5 mgr/ml de DNAasa (Sigma Co., St. Louis, USA) durante una hora a 37°C en agitación suave. Finalmente las células se lavaban varias veces con solución de Hanks y se utilizaban frescas o bien se congelaban (407).

4.4.- PROTOCOLO DE CONGELACIÓN : En aquellos casos en que las células debían conservarse largo tiempo antes de su utilización era preciso congelarlas. La congelación se realizaba resuspendiendo el pellet celular en una solución de suero fetal de ternera, medio RPMI-1640 y dimetilsulfóxido (45:45:10, v:v) a razón de una parte de células y nueve partes de medio de congelación. La suspensión celular se depositaba en un contenedor de porexpan durante 24 horas a -40°C, 24 horas más a -80°C y finalmente eran transferidas y almacenadas en un depósito con nitrógeno líquido. Los viales con las líneas celulares originales eran congelados y mantenidos en idénticas condiciones, pero utilizando una solución de suero fetal de ternera y dimetilsulfóxido (90:10, v:v) como medio de congelación.

4.5.- PROTOCOLO DE DESCONGELACIÓN : Las células eran descongeladas sumergiendo el vial de congelación en una bañera a 37°C hasta que el bloque congelado empieza a licuarse, a continuación el pellet celular se terminaba de descongelar añadiendo 10 volúmenes de solución de Hanks a 37°C y lavando rápidamente las células para eliminar

el dimetilsulfóxido. Después de dos lavados las células se resuspenden en un volumen suficiente de medio de cultivo y se dejan un mínimo de 24 horas en la estufa de cultivo. Las células que se utilizaron para extraer glicolípidos fueron utilizadas inmediatamente después de la descongelación.

5.- PAUTAS DE INMUNIZACIÓN

5.1 ANIMALES : En los protocolos de inmunización se utilizaron ratones hembras de la primera generación de la cepa híbrida Balb/c x C57BL/6, de ocho semanas de edad criados y mantenidos en nuestra propia colonia. Los ratones parentales fueron hembras de la cepa C57BL/6 y machos Balb/c (IFA-Credo, Lyon, Francia). En los ensayos de hipersensibilidad retardada (DTH) se usaron ratones Balb/c machos de ocho semanas de edad (IFA-Credo, Lyon, Francia). Para los xenoinjertos de líneas tumorales y en los modelos de T-independencia e inmunoterapia se utilizaron ratones atímicos nu/nu Balb/c machos de ocho semanas de edad (IFA-Credo, Lyon, Francia).

5.2.- CONJUGACIÓN *Salmonella minnesota*-GD3 : La cepa mutante R595 de la bacteria *Salmonella minnesota* (S.M.) fue adquirida a la American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) y fue cultivada en suspensión y expandida en el laboratorio de microbiología del Dr. Duran Bellido (Barcelona) . Las células se recogen por centrifugación del medio y son liofilizadas. El residuo seco se inactivó por ebullición con ácido acético al 1% y posterior lavado. La bacteria inactivada se guardó liofilizada a -40°C hasta su utilización (408).

El mismo día de la inmunización las bacterias se resuspendían en PBS mediante sonicación en un baño de hielo y se añadían a viales que contenían GD3 liofilizado. La conjugación se realiza de forma espontánea por agitación a temperatura ambiente.

Se utilizaron tres pautas de inmunización distintas. En primer lugar se utilizó un protocolo en que el grado de conjugación entre GD3 y S.M. era de 4 partes de GD3 por 1 parte de S.M., en segundo lugar se utilizó la proporción de 20 partes de GD3 por una parte de S.M. y finalmente se utilizó un protocolo con S.M. sola a modo de control negativo. En todos los casos la dosis de GD3 empleada era de 50 μ gr. de GD3 por dosis y animal administrados quincenalmente por vía intraperitoneal .

5.3.- INMUNIZACIÓN CON GD3 Y *Bordetella pertusis* : Se utilizó un protocolo descrito inicialmente para conejos y adaptado posteriormente a ratones (409). Se toman 200 μ l de una solución de 1 mg/ml de GD3 y se mezclan con 200 μ l de adyuvante completo de Freund (FCA) (Difco, Grand Island, USA) y 1000 millones de células de *Bordetella pertusis* (Difco, Grand Island, USA). La mezcla se emulsiona mediante sonicación y se administra subcutáneamente en diversos lugares de la espalda del animal. La misma inmunización pero sin *Bordetella* se repite dos veces más a intervalos de una semana. Pasadas 3 semanas de reposo y durante un período de tres meses, se repiten inmunizaciones quincenales de GD3 con Adyuvante incompleto de Freund (FIA) (Difco, Grand Island, USA).

5.4.- INMUNIZACIÓN CON ADYUVANTE DE FREUND : Se mezclan a partes iguales GD3, a una concentración de 1 mg/ml en PBS, y FCA mediante sonicación durante 5 minutos. La inmunización es por vía subcutánea en la espalda.

5.5.- INMUNIZACIÓN CON CÉLULAS DE MELANOMA : Se utilizaron las líneas de melanoma humano SKMel-28 y WM-164 que se mantenían en cultivo continuo con medio RPMI-1640, glutamina y un 10% de suero fetal. El día de la inmunización las células eran despegadas de los frascos de cultivo y lavadas abundantemente según el protocolo descrito en el apartado III-4.1. Las inmunizaciones se realizaban por vía subcutánea y con 5 millones de células por dosis.

5.6.- INMUNIZACIÓN CON LIPOSOMAS : El mismo día de la inmunización los liposomas eran lavados centrifugándolos 10 minutos a 10000xG, del pellet se tomaba la cantidad de liposomas equivalente a 50 μ gr. de GD3 y se resuspendía con PBS hasta un volumen de 200 μ l por animal a inmunizar. Las inmunizaciones se llevaron a cabo por vía intraperitoneal.

5.7.- INMUNIZACIÓN CON DISIALIL-LACTOSA-BSA : De la solución stock del antígeno, resuspendida previamente a 1 mg/ml, se tomaba el equivalente a 50 μ gr de disialil-lactosa y se diluía con 100 μ l de PBS por animal a inmunizar. La disolución se mezclaba a partes iguales con adyuvante de Freund y se homogenizaba mediante sonicación durante 5 minutos en baño de hielo. Para la primera dosis se utilizó adyuvante completo de Freund, mientras que para las dosis restantes se empleó adyuvante incompleto.

5.8.- PAUTA DE INMUNIZACIÓN Y SANGRADO DE LOS ANIMALES : En todos los protocolos de inmunización se formaron lotes de 6 animales híbridos Balb/c x C57BL/6, hembras de 8 semanas de edad. Las dosis, salvo indicación expresa en los apartados precedentes, eran de 50 μ gr. de GD3 por animal, a intervalos quincenales durante un mínimo de tres meses.

El mismo día de la primera inmunización, y ocho días después la primera, tercera y última inmunizaciones, los animales eran sangrados por punción retro-orbital. Las sangres se dejaban 2 horas a 37°C para permitir la retracción del coágulo y se centrifugaban 5 minutos a 5000xG. Los sueros se numeraban y se guardaban congelados a -40°C. En ningún caso los sueros fueron congelados y descongelados mas de dos veces y nunca se utilizaron preservativos químicos.

5.9.- INMUNIZACIÓN PARA DETERMINAR LA EXISTENCIA DE MEMORIA INMUNOLÓGICA : Para determinar la existencia de memoria inmunológica frente al GD3 se empleó un lote de ratones que había sido inmunizado con liposomas-GD3, tanto de origen tumoral como de origen bovino, siguiendo la pauta de inmunización con tres dosis quincenales de 50 μ gr de GD3, al finalizar esta inmunización se dejó un período de reposo de 10 semanas y se volvió a inmunizar a los animales con idéntica dosis de GD3. Estos animales fueron sangrados el mismo día de la administración de la dosis de recuerdo, y a los 8 días de dicha inmunización.

6.- MODELOS DE RESPUESTA CELULAR T

Se emplearon dos tipos de modelos de T-independencia, en primer lugar un modelo clásico de hipersensibilidad retardada, y en segundo lugar un modelo con ratones atímicos nu/nu que carecen de linfocitos T.

6.1.- HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA : El termino hipersensibilidad retardada (DTH), se aplica a la reacción inflamatoria "in situ" que se produce a las 24-36 horas de la administración del antígeno. Esta reacción inflamatoria está mediada por el linfocito T y se manifiesta por la infiltración de células , empezando por una acumulación perivascular de linfocitos y monocitos en el lugar de administración del antígeno. La respuesta inflamatoria es inducida y mantenida por linfoquinas liberadas por el linfocito T y el

macrófago. Estos factores facilitan la infiltración de células inflamatorias, eosinófilos y basófilos, y fibroblastos, así como la destrucción de componentes tisulares. El término retardado se aplica debido a que estos mecanismos no se inician hasta pasadas 24 o 36 horas del estímulo antigénico, a diferencia de las reacciones anafilácticas que ocurren a los pocos minutos (410).

Tradicionalmente la reacción de DTH se ha empleado como medida de la implicación de la célula T en la respuesta inmunológica, ya que los antígenos T-independientes son incapaces de provocar reacciones de este tipo. A nivel experimental el modelo se basa en la administración intraperitoneal o subcutánea de una dosis primaria de antígeno. A los 12 días se reinmunizan los animales por vía subcutánea o intradérmica en las patas, midiéndose la inflamación de las mismas a las 24, 36 y 48 horas.

6.1.1.- Animales : Se trabajó con lotes de 10 ratones Balb/c machos de ocho semanas de edad tal y como se describe en el apartado III-5.1..

6.1.2.- Antígenos : Se emplearon liposomas-GD3 contruidos con fosfatidilcolina-colesterol-dicetilfosfato-GD3 (40:40:10:10, v:v)(liposomas tipo 1) y esfingomielina-colesterol-dicetilfosfato-GD3 (40:40:10:10, v:v)(liposomas tipo 2) obtenidos según el protocolo descrito en el apartado III-1.1. La diasialilactosa-BSA se administró con adyuvante completo de Freund. Se emplearon controles negativos con liposomas sin GD3 y BSA sola.

6.1.3.- Pauta de inmunización : Se emplearon 6 lotes de ratones. de acuerdo con la tabla XI. En la dosis primaria se administró 50 μ gr. de GD3 por vía subcutánea cerca de los ganglios inguinales. Las dosis de recuerdo se administraron por vía intradérmica en las patas derechas del animal, mientras que en las patas contralaterales se administraron liposomas vacíos sin GD3 como controles negativos (411).

6.1.4.- Medida de la inflamación : La inflamación se midió por medio de un pie de rey digital (Mitutoyo Corporation, Tokio, Japón) con una sensibilidad de 0,01 mm. De cada pata se realizaron tres medidas y se obtuvo la media de cada medida. La inflamación relativa se obtuvo restando del diámetro de la pata problema el diámetro de la pata control.

Dosis primaria	Dosis secundaria
Disialil-lactosa-BSA	Liposomas tipo 1
Liposomas tipo 1	Liposomas tipo 1
Liposomas tipo 2	Liposomas tipo 1
Disialil-lactosa-bsa	Liposomas tipo 2
Liposomas tipo 1	Liposomas tipo 2
Liposomas tipo 2	Liposomas tipo 2

Tabla XI : Protocolo de inmunización empleado en el protocolo de inducción de DTH.

6.2.- MODELO CON RATONES ATÍMICOS nu/nu : La cepa de ratones Balb/c nu/nu posee una mutación recesiva y ligada al sexo que origina que los machos carezcan de la glándula tímica y de pelo. Esta última característica da nombre a la cepa. La ausencia de timo origina una ausencia prácticamente total de linfocitos T, ello hace que esta cepa sea especialmente interesante en los modelos de T-independencia.

Se inmunizaron de forma paralela dos lotes de seis ratones, el primer lote estaba integrado por ratones nu/nu y el segundo lote por ratones Balb/cxC57BL/6 F1 idénticos a los empleados en todos los otros ensayos. Ambos lotes fueron inmunizados con 50 μ gr. de GD3 incorporado a liposomas de Esfingomielina : Colesterol : Dicetilfosfato : GD3 en proporciones 40:40:10:10. Como control negativo se emplearon dos lotes de ratones inmunizados con liposomas sin GD3.

7.- RESPUESTA SEROLÓGICA

En la determinación de la respuesta serológica se determinó mediante ELISA la respuesta general anti-gangliósido y la especificidad de la misma, por otra parte también se determinaron los isotipos específicos que se expresaban durante la respuesta. En algunos casos en que las cantidades de suero eran muy reducidas la especificidad de la respuesta se determinó mediante HPLC.

7.1.- RESPUESTA ANTI-GANGLIÓSIDO (ELISA) : Se utilizaron placas Immunolon II (Dynatech, New Jersey, USA) absorbidas con GD3. En cada pocillo de la placa de GD3 se depositaron 50 μ l de una solución de 2 μ g/ml de GD3 en etanol. El etanol se deja evaporar a sequedad a 37 grados. Las placas se bloquearon con una solución de gelatina (E.Merck, Darmstad, RFA) al 1,5% en PBS durante 60 minutos a 37°C. Las placas se lavan con gelatina al 0,15% y Tween 20 al 0,1% en PBS. Se realizan diluciones seriadas de las muestras con solución de bloqueo empezando con una dilución 1:20 y se depositan 50 μ l de cada dilución en los pocillos y se incuban 2 horas a 37°C. Se lavan las placas 5 veces y se incuban con 50 μ l/pocillo de antisuero anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:1000 con solución de bloqueo dejando incubar las placas 1 hora a 37°C. Finalmente se lavan las placas 5 veces y se dejan incubar con el substrato del enzima un mínimo de 30 minutos a 37°C. Como substrato se empleó paranitrofenilfosfato (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) con una concentración de 1 mg/ml en tampón dietanolamina. La lectura de las densidades ópticas se realizó con un espectrofotómetro para ELISA Multiskan MKII (ICN Flow Biomedicals, High Wycombe, Inglaterra) a una longitud de onda de 405 nm.

Para descartar el efecto de inespecificidad que poseen todas las respuestas policlonales junto con las placas que poseían GD3 se llevaron de forma paralela placas que contenían solo solución de bloqueo y que se realizaron siguiendo exactamente el mismo protocolo pero sin la etapa de conjugación de GD3 a la placa de ELISA. La absorbancia leída en estas placas fue restada de la absorbancia de las placas que contenían GD3.

7.2.- REACCIONES CRUZADAS ENTRE GANGLIÓSIDOS : El análisis de las reacciones cruzadas entre los distintos gangliósidos se realizó mediante ELISA según el protocolo descrito en el apartado anterior pero conjugando en distintos pocillos de la placa de ELISA los siguientes gangliósidos : GD3, GD1a, GD1b, GM1, GM2, GM3 y lactosilceramida (Biocarb, Lund, Suecia)..

7.3.- ABSORCIÓN CON GANGLIÓSIDOS Y ANÁLISIS MEDIANTE HPLC : Se tomaron 100 μ l de algunos sueros con título anti-GD3 superior a 1:40 y se diluyeron a 1:20 con PBS, estas muestras se conjugaron a una placa de ELISA 18 horas a 4°C. Las placas se lavaron con PBS y se incubaron durante 4 horas a 37°C con 100 μ l de una mezcla que contenía GM1, GM2, GM3, GD1a, GD2 y GD3 a razón de 1 mg/ml de cada gangliósido. El

sobrenadante se recogió cuidadosamente y el contenido de gangliósidos se analizó mediante HPLC según el protocolo descrito en el apartado III-3.1.5.1. La especificidad de la respuesta fue determinada comparando el perfil cromatográfico de los gangliósidos antes y después de la absorción.

7.4.- CARACTERIZACIÓN DE LOS ISOTIPOS : Los isotipos presentes en la respuesta anti-GD3 se determinaron mediante ELISA siguiendo el protocolo descrito anteriormente, pero determinando cada isotipo con antisueros anti-isotipo (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Zymed Corporation, Massachusetts, USA).

8.- RESPUESTA ANTITUMORAL

Se determinó la capacidad de reconocimiento de células tumorales y de destruirlas mediante citotoxicidad. En todos los ensayos de reconocimiento celular se utilizaron las líneas de melanoma humano WM-164 y SKMel 28 como líneas que expresan GD3 y las líneas Colo-205, adenocarcinoma de colon, y PA-1, teratocarcinoma, como líneas que no expresan GD3.

8.1.- INMUNOFLOURESCENCIA : 24 horas antes de cada ensayo se preparan placas de Terasaki (Nunc Laboratories, Dinamarca) con 2000 células de la línea a ensayar resuspendidas en 20 μ l de medio de cultivo, dejándolas toda la noche a 37°C y atmósfera de CO₂. A la mañana siguiente las placas se lavan con PBS y las células se incuban con 10 μ l de suero diluido 1:40 con PBS-BSA al 1,5% durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan con cuidado de no despegar las células adheridas a los pocillos y se secan ligeramente con un papel de filtro. La incubación con el segundo anticuerpo, anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína diluido 1:50 (DAKO, Dinamarca), se realiza durante 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, finalmente las placas se lavan con PBS y se observan en un microscopio de fluorescencia.

8.2.- CITOMETRÍA DE FLUJO : Para comprobar la homogeneidad de la población reconocida por los antisueros anti-GD3 se utilizó la citometría de flujo, usándose un

protocolo de trabajo idéntico al empleado en el apartado III-4.2, pero substituyendo el anticuerpo monoclonal anti-GD3 por los antisueros obtenidos en la inmunizaciones diluidos 1:50 con un tampón fosfato que contenía un 1% de BSA y ázida sódica.

8.3.- CITOTOXICIDAD MEDIADA POR COMPLEMENTO : El ensayo se realizo incubando en placas de cultivo 10000 células diana suspendidas en 50 μ l de medio de cultivo, 20 μ l de antisuero problema diluido 1:50 en medio de cultivo y 50 μ l de suero de cobayo como fuente de complemento diluido 1:5 (Behring Inst. Marburg, RFA). La incubación se realiza a 37 °C en atmósfera de CO₂ durante 60 minutos (412).

La cuantificación de la lisis celular se realizó mediante la tinción de las células vivas con sales de metiltetrazolio, MTT (Merck, Darmstad, RFA). Cada pocillo se incubó con 10 μ l de una solución que contenía 10 mg de MTT por ml de PBS durante 4 horas a 37°C y atmósfera de CO₂, durante este tiempo las cadenas respiratorias mitocondriales reducen el MTT produciendo un pigmento azulado insoluble. La extracción del pigmento producido se realiza con 100 μ l de una solución de dimetilformamida y dodecilsulfato sódico durante 18 horas a 37°C. La cantidad de pigmento liberada se mide por espectrofotometría en un lector de placas de ELISA a 570 nm. El ruido de fondo producido por el MTT no reducido puede minimizarse realizando una segunda lectura a 630 nm y restando las absorbancias ópticas obtenidas de las obtenidas en la primera lectura (413).

El tanto por ciento de células lisadas se obtiene aplicando la siguiente formula, en donde el 100% de lisis es la absorbancia óptica producida por células lisadas mediante 20 μ l de Tween-20 al 1% en PBS y el 0% de lisis o lisis espontanea es la absorbancia óptica producida una muestra de células en las que no se ha puesto antisuero anti-GD3.

$$\text{Lisis} = \frac{\text{Citotoxicidad observada} - \text{citotoxicidad espontanea}}{\text{Citotoxicidad total} - \text{citotoxicidad espontanea}}$$

8.4.- CITOTOXICIDAD CELULAR ANTICUERPO DEPENDIENTE (ADCC) : Los ensayos para determinar la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos fueron realizados utilizando la

línea de melanoma humano WM-164 como células diana y linfocitos de sangre periférica humana como células efectoras.

Las células efectoras se obtenían de sangre periférica humana en forma de "buffy coats" (Banco de sangre del Hospital de la Cruz Roja, Barcelona) mediante centrifugación en un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suecia). El volumen total de sangre, aproximadamente 150 ml, se diluía con solución de Hanks en una proporción 1:5 y se lavaba por centrifugación a 400xG dos veces durante 10 minutos. El pellet celular obtenido se resuspendía en 150 ml de solución de Hanks y se deposita repartido en cuatro tubos de centrifuga, estériles de 50 ml cada uno. A cada tubo se le añaden 20 ml de Ficoll, densidad 1,077 gr/ml, introduciéndolos lentamente mediante una pipeta por debajo de la suspensión celular. Es muy importante trabajar cuidadosamente para no distorsionar la interfase entre la solución de Ficoll y la suspensión celular. La separación se realiza centrifugando 30 minutos a 400xG a una temperatura de 4°C. Al acabar la centrifugación y con la ayuda de una pipeta Pasteur se recupera el anillo de células que se ha formado en la interfase entre ambas soluciones y que contiene las células mononucleadas, por su parte los eritrocitos y células polimorfonucleadas, neutrófilos y plaquetas se encuentran formando un pellet en el fondo de los tubos. La presencia de plaquetas contaminantes se reduce mediante una centrifugación a 100xG durante 15 minutos. Las células mononucleadas se lavan dos veces con solución de Hanks mediante centrifugación. La concentración de células mononucleadas se ajusta a 2×10^6 cels/ml .

Las células diana se recuperan de los frascos de cultivo tal y como se describe en el apartado de cultivo celular, se lavan y su concentración se ajusta a 5×10^6 cels/ml. Previamente al ensayo las células diana se incuban con el colorante Bis-carboxi-ethyl-carboxifluorescein-AM (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA) a razón de 0,69 mg/ml por millón de células durante 30 minutos a 37°C. Finalizada la incubación las células se lavan un mínimo de tres veces mediante centrifugación. Dado que estas células se utilizaran en ensayos de citotoxicidad es importante prestar mucha atención a la viabilidad de las mismas y solo se pueden utilizar preparaciones celulares con viabilidades iguales o superiores al 95% (414).

Este colorante es de tipo supravital y en su forma natural no es fluorescente y atraviesa

libremente la membrana celular, una vez en el interior del citoplasma es degradado por las esterasas citoplasmáticas produciendo un derivado de la carboxifluoresceína, la bis-carboxi-ethyl-carboxifluoresceína, que es fluorescente y atraviesa la membrana celular con dificultad, por lo que su liberación al medio solo es posible mediante la lisis celular (414).

La determinación de la actividad ADCC de los antisueros obtenidos se realiza en placas de cultivo celular de 96 pocillos con fondo en U (Nunc, Dinamarca) utilizando una proporción de 50 células efectoras por cada célula diana. En cada pocillo se depositan 10000 células diana marcadas con el colorante fluorescente en un volumen de 50 μ l de medio de cultivo completo, 500000 células efectoras en 100 μ l de medio y 50 μ l de antisuero anti-GD3 diluido a 1:50. Todas las muestras se preparan por triplicado. Las placas se centrifugan durante 10 minutos a 100xG y se incuban en la oscuridad durante 2 horas a 37°C y atmósfera con un 5% de CO₂. Al finalizar la incubación las placas se centrifugan 10 minutos a 2500xG y se traspasa 100 μ l de cada pocillo a otra placa de microtitulación (Nunc, Dinamarca). Las placas con los sobrenadantes se leen con un espectrofluorímetro (Cytofluor 2350, Millipore, Massachusetts, USA) con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una de emisión de 530 nm. Dado que el colorante fluorescente es liberado al medio cuando la célula es lisada, la cantidad de fluorescencia presente en el medio es proporcional a la cantidad de células lisada por efecto de las células efectoras (415).

El cálculo de del tanto por ciento de citotoxicidad se realiza de forma idéntica al realizado en el caso de la citotoxicidad mediada por complemento.

En todas las determinaciones de citotoxicidad mediada por complemento los controles deben incluir células diana con 50 μ l de medio de cultivo en lugar del antisuero para determinar la citotoxicidad espontanea provocada por el complemento. Un control de lisis total obtenido lisando las células con Nonidet P-40 al 5% en solución de Hanks. Un control positivo de citotoxicidad realizado con el anticuerpo monoclonal 14F9 específico de GD3 y un control negativo con un antisuero no relacionado a la misma dilución que los antisueros testados.

En las determinaciones de ADCC la citotoxicidad espontanea se determina mediante células diana y células efectoras pero substituyendo el antisuero por 50 μ l de medio de cultivo, y la citotoxicidad total se determina con Nonidet P-40. Los controles positivo y

negativo son los mismos que en el caso del complemento.

9.- ANTIGENICIDAD DEL GD3 EXTRAÍDO DE LÍNEAS TUMORALES

Como un ensayo mas para poder caracterizar el GD3 purificado partiendo de células de melanoma se estudió la antigenicidad del mismo, entendiendo como antigenicidad la capacidad de este antígeno para interferir la reacción antígeno-anticuerpo.

9.1.- ANTIGENICIDAD DEL GD3 SOLUBLE : La antigenicidad del GD3 tumoral fue analizada estudiando las curvas de afinidad de dos anticuerpos monoclonales, 14G4 y 14F9, por el GD3 bovino y el tumoral. Estas curvas se realizaron añadiendo cantidades crecientes de anticuerpo a una cantidad fija de antígeno y midiendo la intensidad de la reacción mediante ELISA de fluorescencia.

Se prepararon dos placas de ELISA según el protocolo descrito en el apartado III-7.1 de este mismo capítulo. La concentración de GD3 empleada fue de 250 ng/pocillo. Se emplearon los dos anticuerpos monoclonales anti-GD3 a concentraciones crecientes de inmunoglobulina específica desde 7 ng/ml hasta 10000 ng/ml. Las concentraciones de inmunoglobulina fueron previamente determinada mediante ELISA cuantitativo y ajustadas diluyendo las muestras con PBS-BSA al 1,5%. El ensayo se realizo por triplicado, dejando las muestras dos horas a 37°C. La reacción se reveló mediante un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con fosfatasa alcalina (Dako, Dinamarca) y se cuantificó con 100 μ l/pocillo de metil-umbeliferona-fosfato (Sigma Chemicals Co, St. Louis USA) a una concentración de 1 mg/ml en tampón trietanolamina 1M, pH 9. La lectura se realizó con citofluorímetro excitando a 360 nm y detectando a 460 nm (Cytofluor 2350, Millipore, USA) (416).

9.2.- ANTIGENICIDAD DEL GD3 ASOCIADO A LIPOSOMAS : Se incubaron 10 μ g de GD3 asociado a liposomas (Esfingomielina : colesterol : Dicitilfosfato : GD3, 40:40:10:10) con 100 μ l de anticuerpo monoclonal 14F9 (10 μ g/ml) durante varios intervalos de tiempo, que iban desde 15 minutos hasta 5 horas. Finalizada cada incubación la muestra se centrifugó 15 minutos a 15000xG conservado el sobrenadante. La actividad anti-GD3 del sobrenadante se analizó mediante ELISA. Los ensayos se realizaron por triplicado enfrentando la cinética de absorción de los liposomas que contenían GD3 bovino con los

liposomas de GD3 tumoral.

IV.- Resultados

1.- CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS LIPOSOMAS

1.1.- COMPOSICIÓN LIPÍDICA : La composición lipídica de los liposomas fue determinada mediante TLC y HPLC. Mediante TLC fue posible comprobar que los tres lípidos mayoritarios se incorporaban conjuntamente en el liposoma en proporciones constantes. Se observaron tres bandas que se correspondían, respectivamente, con el colesterol, el fosfolípido correspondiente y el GD3.

Mediante HPLC se pudo cuantificar la cantidad de lípido incorporada en cada caso (Fig. 12), pudiéndose identificar cada uno de los picos obtenidos. Las cantidades incorporadas en cada lote variaban ligeramente entre ellos. El colesterol se incorporaba al 100%, mientras que los fosfolípidos se incorporaban en un $97,2\% \pm 0,8$ y el GD3 se incorporó en un $94,8\% \pm 2,6$.

1.2.- CARACTERIZACION INMUNOLÓGICA : La absorción de sobrenadantes del híbrido anti-GD3 136-2A10 con liposomas que contenían GD3 inhibía al 100% los anticuerpos anti-GD3, mientras que los liposomas que no contenían GD3 o bien los anticuerpos monoclonales no relacionados no mostraban una absorción significativa (Figs.13 y 14).

La visualización de los liposomas al microscopio electrónico permitió comprobar que la parte glucídica del GD3 era accesible desde el exterior de los mismos (Fig.15), mientras que los liposomas que carecían de GD3 no mostraban tinción alguna (Fig16). El GD3 siempre se detectó en la parte exterior del liposoma y no se distribuye de forma homogénea por la membrana, sino que es posible observar zonas con un marcaje muy intenso, mientras que otras zonas carecen totalmente del mismo (Fig 17).

1.3.-ESTABILIDAD DE LOS LIPOSOMAS : En el plasma la estabilidad de los liposomas que contenían un 5% de GD3 en proporción molar era muy parecida tanto para los liposomas que estaban formados por fosfatidilcolina como los que estaban constituidos por esfingomielina. Esta semejanza era patente para períodos de incubación de hasta ocho horas. En períodos de incubación mas largos los liposomas de esfingomielina, algo

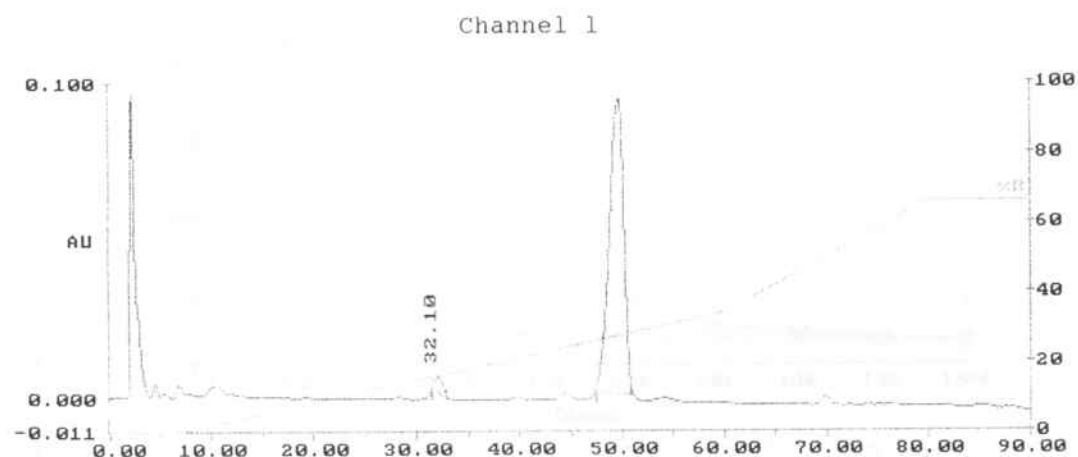
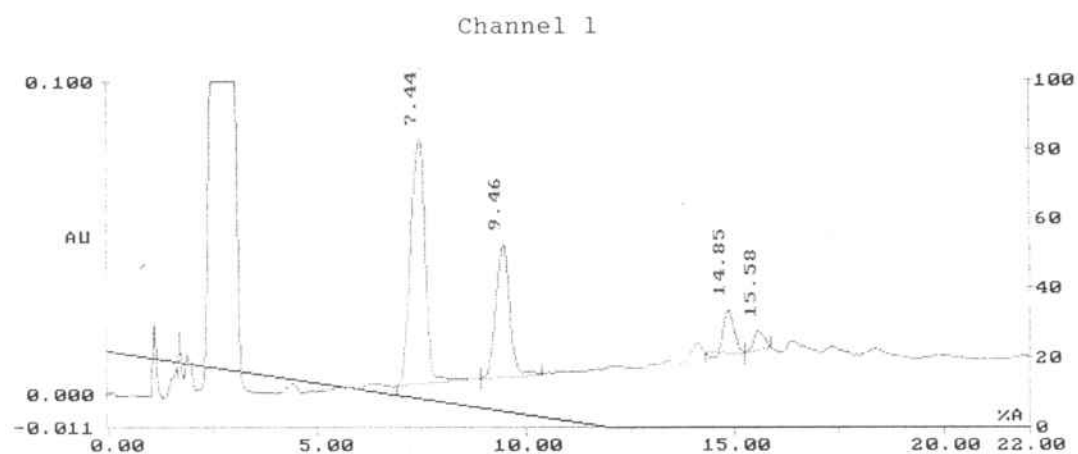
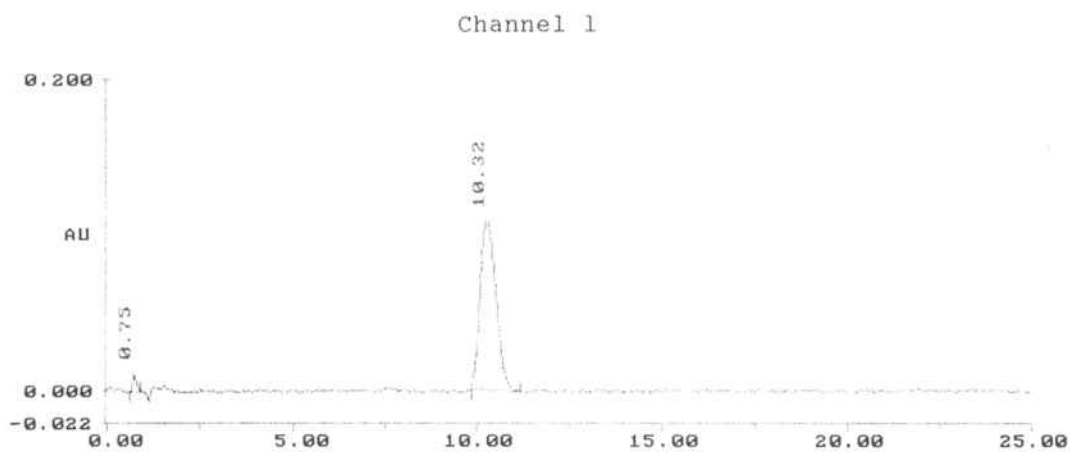


Fig. 12 : Caracterización mediante HPLC de diversos lípidos empleados en la obtención de liposomas. Colesterol (a), Esfingomiolina (b) y GD3 (c). El colesterol y el GD3 eluyen en un solo pico, mientras que la esfingomiolina eluye formando dos picos con unos tiempos de retención de 7.44 y 9.46 minutos respectivamente, así mismo se observa un pico que se corresponde al volumen vacío de la columna y es debido al tampón en que se disuelve la muestra.

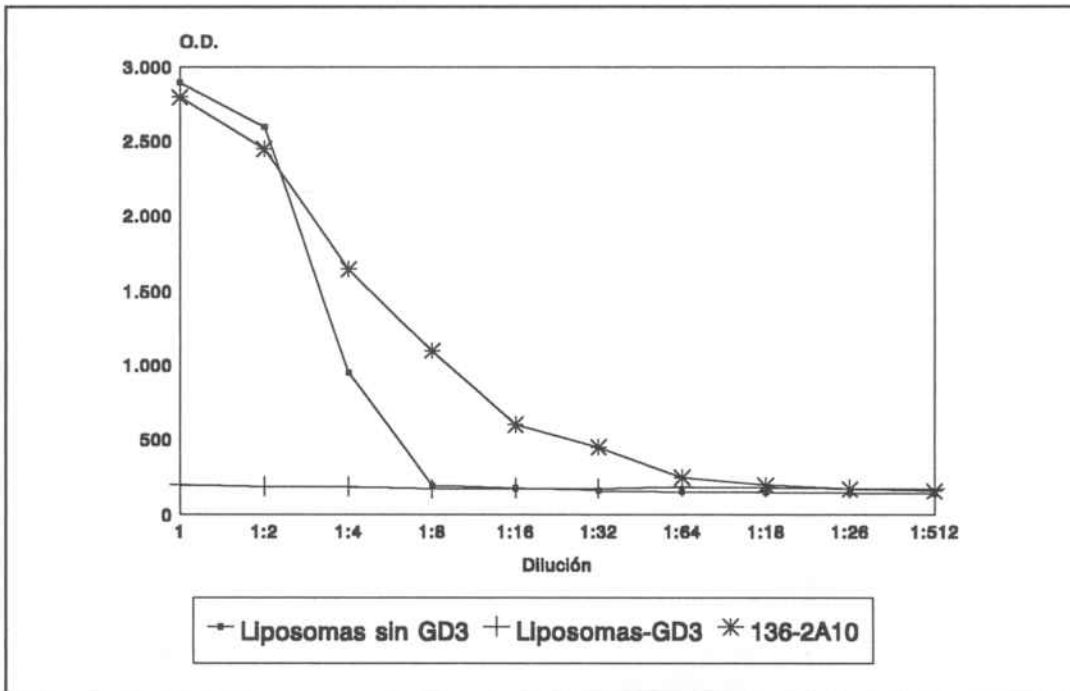


Fig 13 : Absorción de liposomas con y sin GD3 por el anticuerpo anti-GD3 136-2A10. Solo los liposomas que contienen GD3 absorben significativamente el anticuerpo anti-GD3.

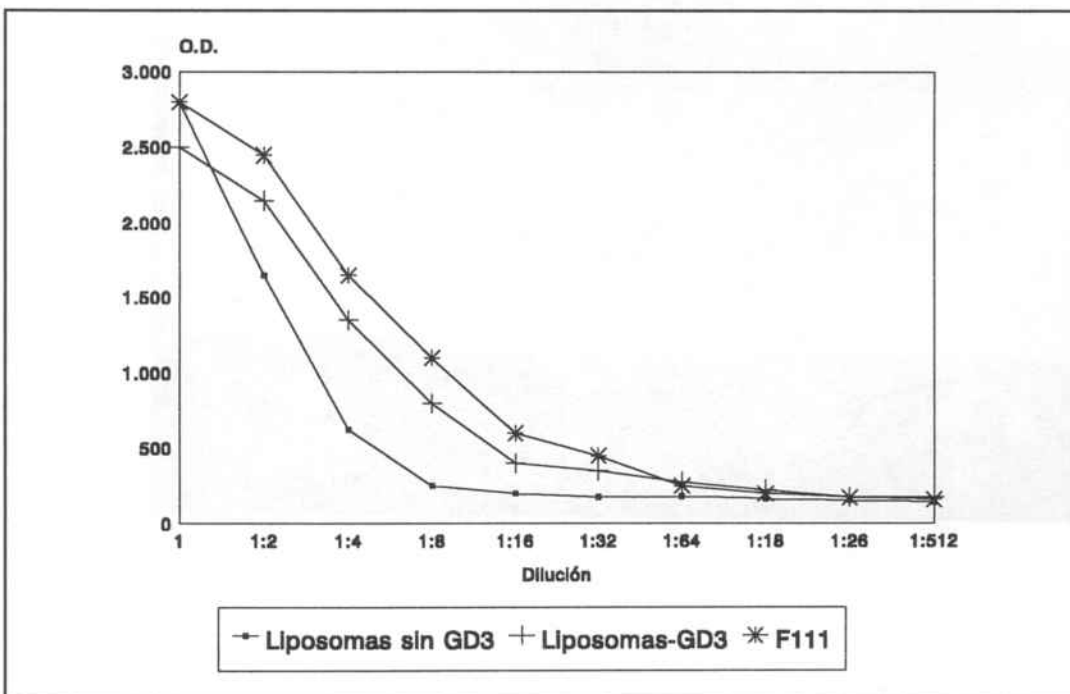


Fig 14 : Absorción de liposomas con y sin GD3 con el anticuerpo anti-RNAsa F111. No se observa ninguna reacción significativa.

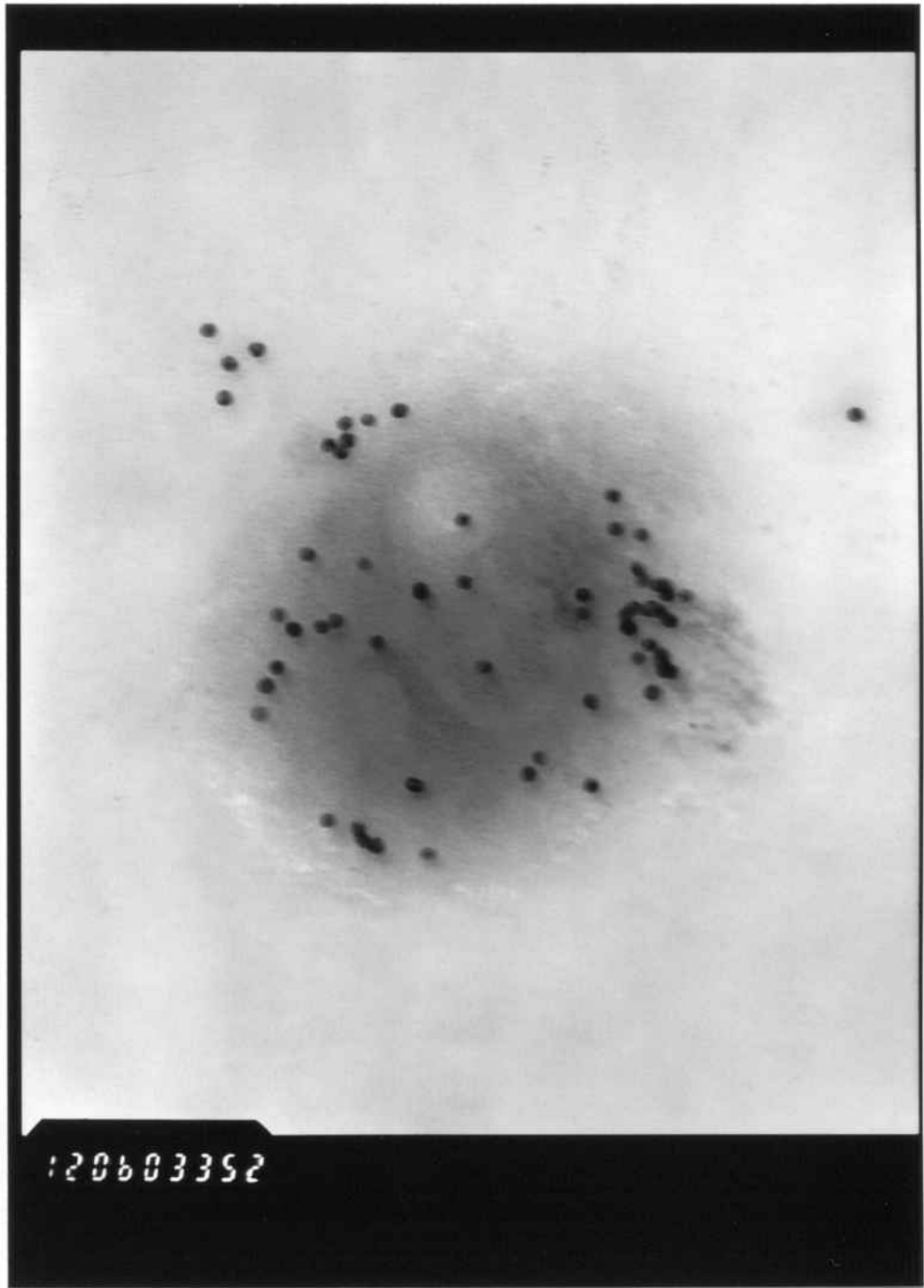


Fig. 15 : Liposoma-GD3 marcado con el anticuerpo anti-GD3 136-2A10 y oro coloidal.
Microscopio electrónico (120.000 X).



Fig. 16 : Liposoma sin GD3 marcado con el anticuerpo anti-GD3 136-2A10 y oro coloidal. No se observa marcaje. Microscopio electrónico (170.000 X).

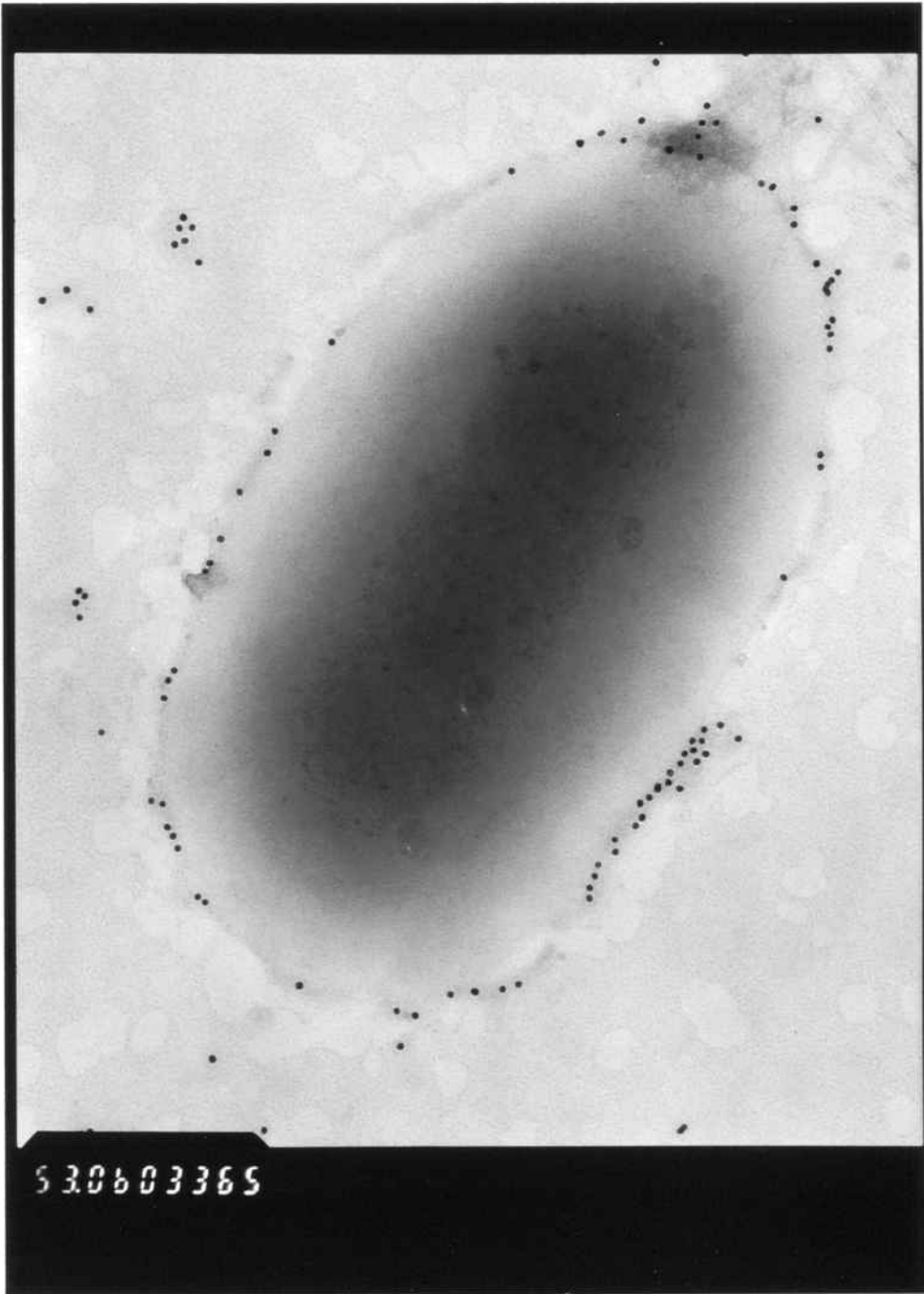


Fig 17 : Liposoma-GD3 marcado con el anticuerpo anti-GD3 136-2A10 y oro coloidal. Obsérvese la distribución heterogénea del marcaje con zonas en el que es muy denso y otras zonas sin marcar. (53.000 X).

mas rígidos, presentaban una estabilidad superior a los fosfatidilcolina (Fig 18)

Si el estudio se realizaba a 4 grados, los resultados eran similares, aunque, los liposomas de fosfatidilcolina conservaban una latencia superior al 60% después de 45 días de incubación en tampón Hepes. (Fig 19)

Con el fin de aumentar la cantidad de gangliósido asociado a los liposomas, se evaluó la estabilidad de los mismos cuando estaban constituidos por porciones equimolares de fosfatidilcolina o esfingomielina y colesterol, a los que se incorporó un 10% de GD3.

Los resultados muestran que la estabilidad en plasma (Fig 20) de los liposomas de fosfatidilcolina fue menor que la de los liposomas de esfingomielina, apoyando la idea que la rigidez del liposoma contribuye a su estabilidad. No obstante, en ambos casos, el incremento en la concentración de GD3, reduce, en cierto grado, la estabilidad de los mismos. Así comparando las figuras 18 y 20 es posible comprobar que, para una misma composición de fosfolípido, los liposomas reducen su estabilidad al incrementar la proporción de GD3 incorporado.

Así mismo, la estabilidad en el tiempo de los liposomas conservados en tampón Hepes a 4 grados (Fig 21), confirma que la incorporación de GD3 reduce notablemente la estabilidad de los mismos y que la difusión de la carboxifluoresceína es mucho mayor en los liposomas de fosfatidilcolina, los cuales, a los 35 días de su preparación, han alcanzado un equilibrio de concentración entre los compartimientos interno y externo del liposoma.

Con el fin de verificar si la pérdida de estabilidad estaba relacionada con la difusión del fluorocromo y con una pérdida de la estructura vesicular de los liposomas, se llevo a cabo una experiencia adicional utilizando la fracción de liposomas de fosfatidilcolina:colesterol:GD3 (10%) que a los 27 días de incubación llego al 0% de latencia. Esta fracción fue sometida a purificación mediante una columna de cromatografía de Sepharosa 4B (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suecia). Mediante este ensayo fue posible identificar una fracción enriquecida de liposomas, sugiriendo que la integridad de los mismos permanecía intacta y que su inestabilidad era expresión de la permeabilidad de las vesículas lipídicas. Ensayos inmunológicos demostraron que esta permeabilidad de la

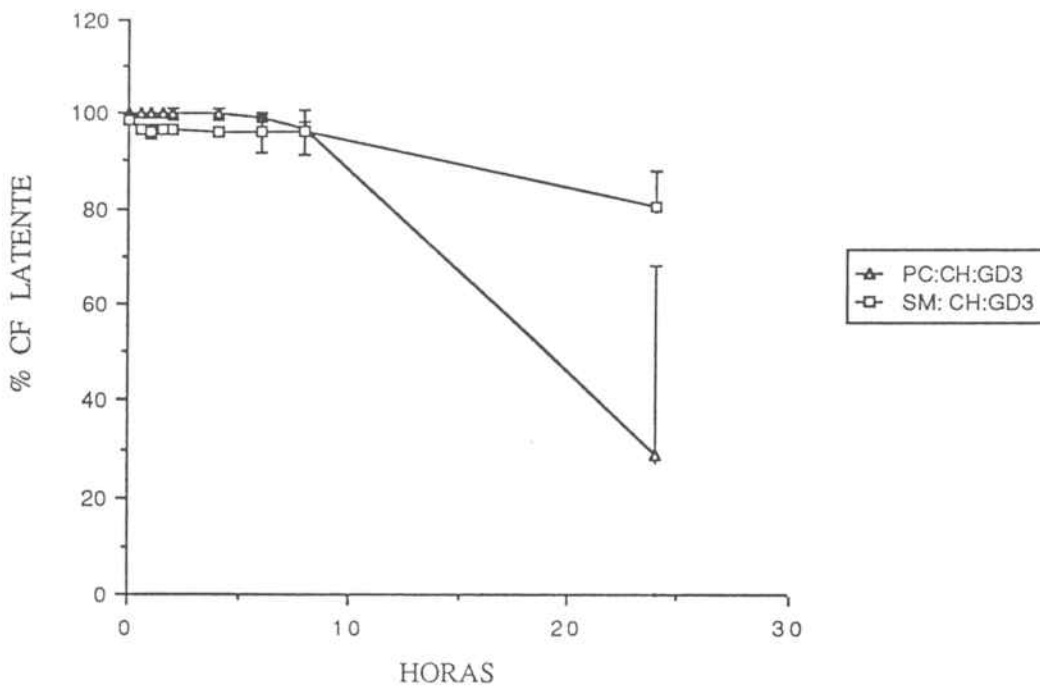


Fig. 18 : Estabilidad de los liposomas-GD3 (5%) en plasma. Los liposomas menos rígidos son mas estables en plasma.

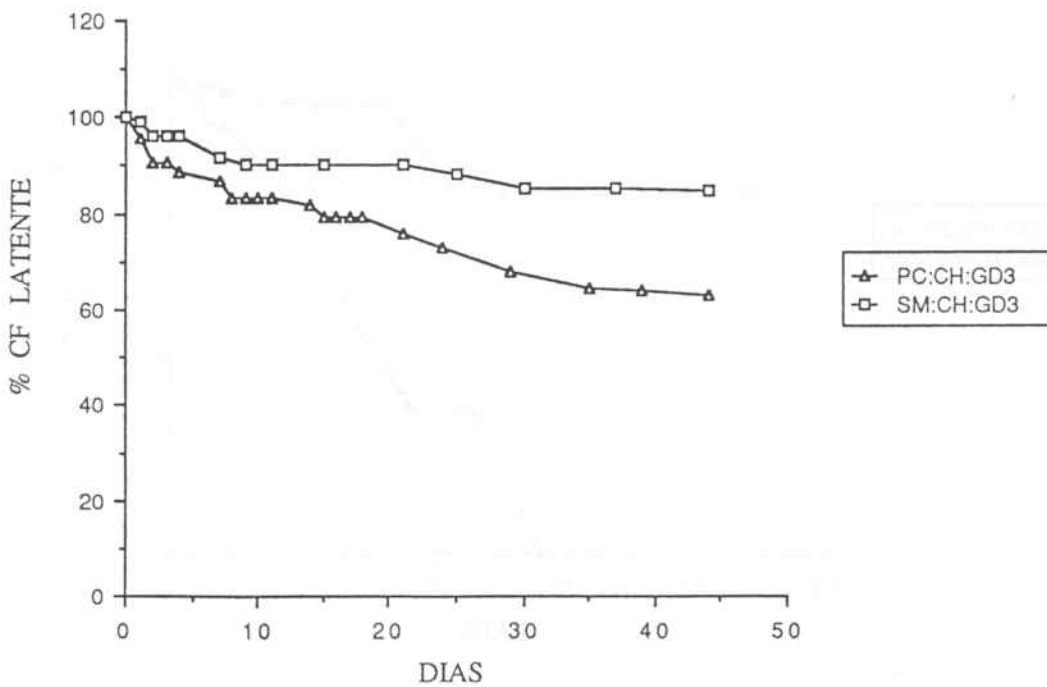


Fig. 19 : Estabilidad de los liposomas-GD3 (5%) en tampón Hepes. Al igual que en plasma los liposomas menos rígidos son algo mas estables.

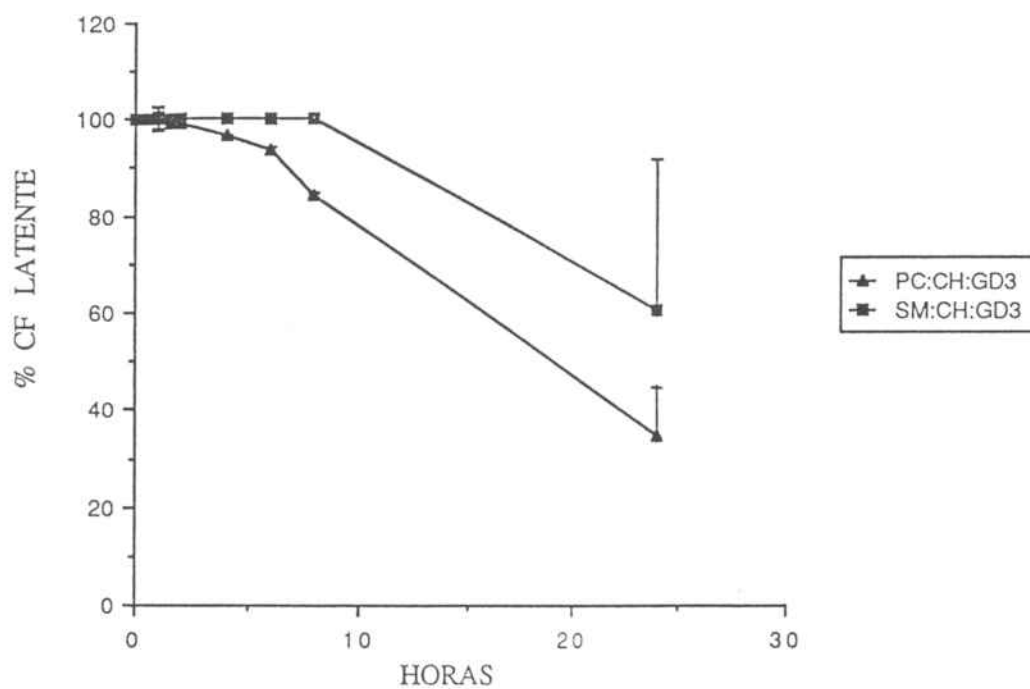


Fig. 20 : Estabilidad de los liposomas-GD3 (10%) en plasma.

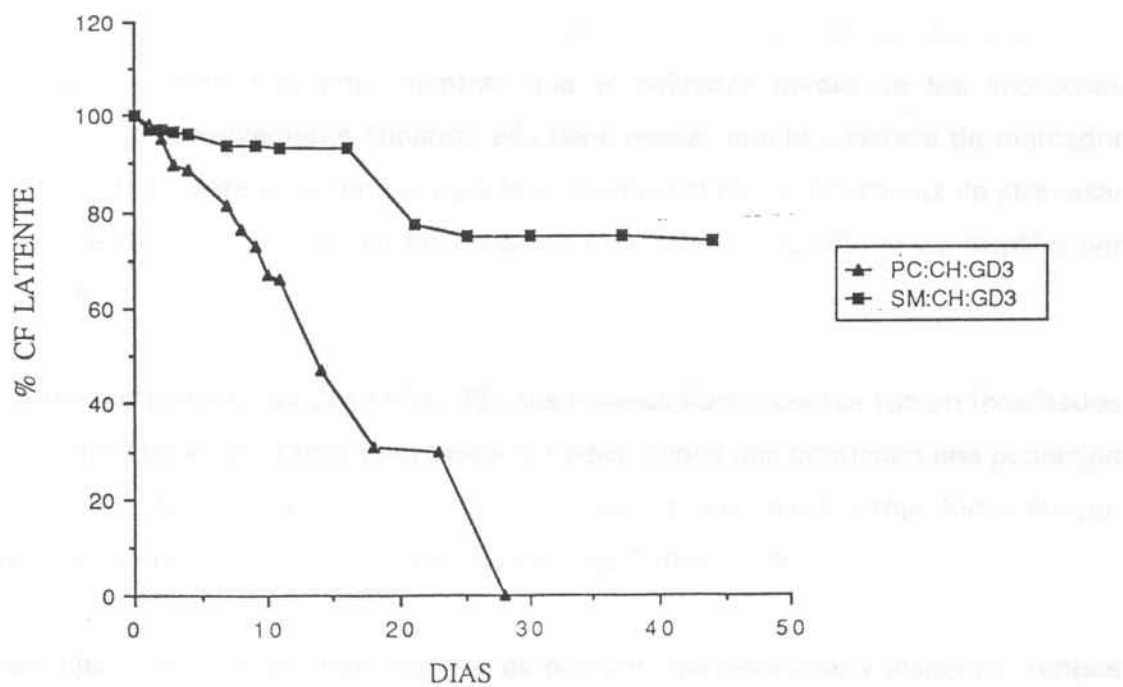


Fig. 21 : Estabilidad de los liposomas-GD3 (10%) en tampón Hepes.

membrana no iba acompañada de una pérdida de GD3 de la misma.

2.- BIODISTRIBUCION DE LOS LIPOSOMAS

La observación mediante microscopia de fluorescencia de cortes finos de pulmón, hígado y bazo obtenidos de ratones tratados con liposomas que contenían GD3 y yoduro de propidio, puso de manifiesto la existencia de poblaciones captadoras de liposomas con una distribución heterogénea, cuyos núcleos podían ser identificados por su fluorescencia.

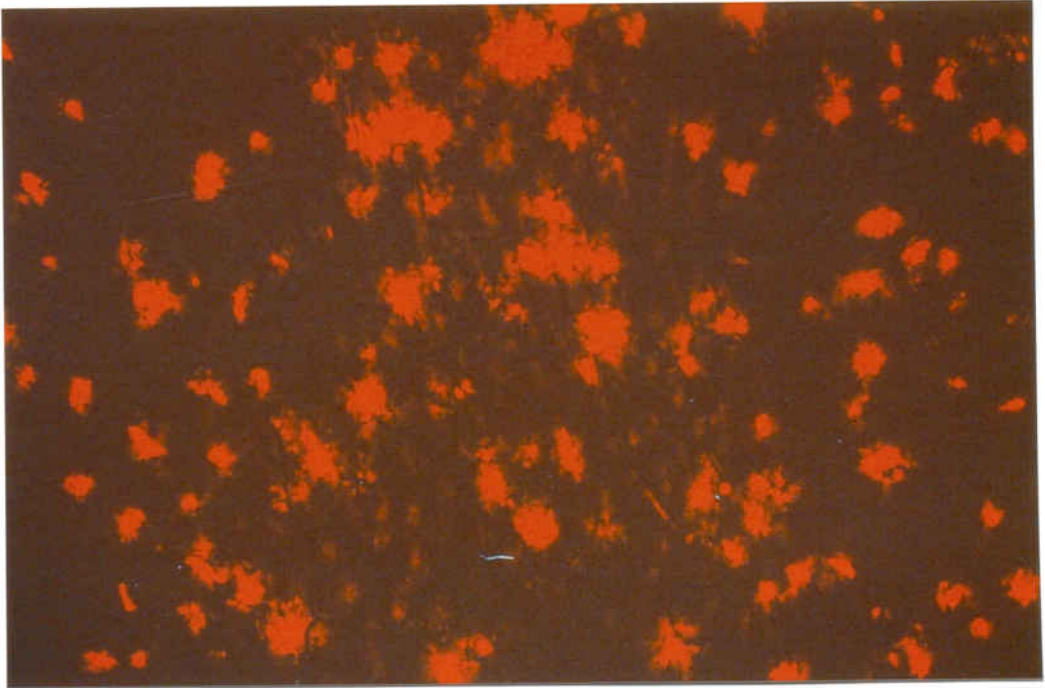
El yoduro de propidio es un colorante no vital, y por lo tanto atraviesa con dificultad la membrana plasmática de las células vivas, por ello sólo las células con capacidad para captar los liposomas, es decir las células fagocíticas, serán las que presenten una fluorescencia nuclear.

En el hígado (Fig 22), la morfología y distribución de los núcleos marcados es compatible con la población macrofágica del mismo ubicada en el interior de los sinusoides hepáticos, mientras que, las células propias del parénquima hepático, los hepatocitos, no mostraban fluorescencia significativa. El diámetro medio de las fenestraciones de los sinusoides hepáticos es de unos 100 nm, mientras que el diámetro medio de los liposomas multilamelares es sensiblemente superior, ello hace pensar que la ausencia de marcador en los hepatocitos puede estar limitada por la imposibilidad de los liposomas de atravesar estas fenestraciones, mientras que los liposomas entrarían en la células de Kupffer por fagocitosis de los mismos.

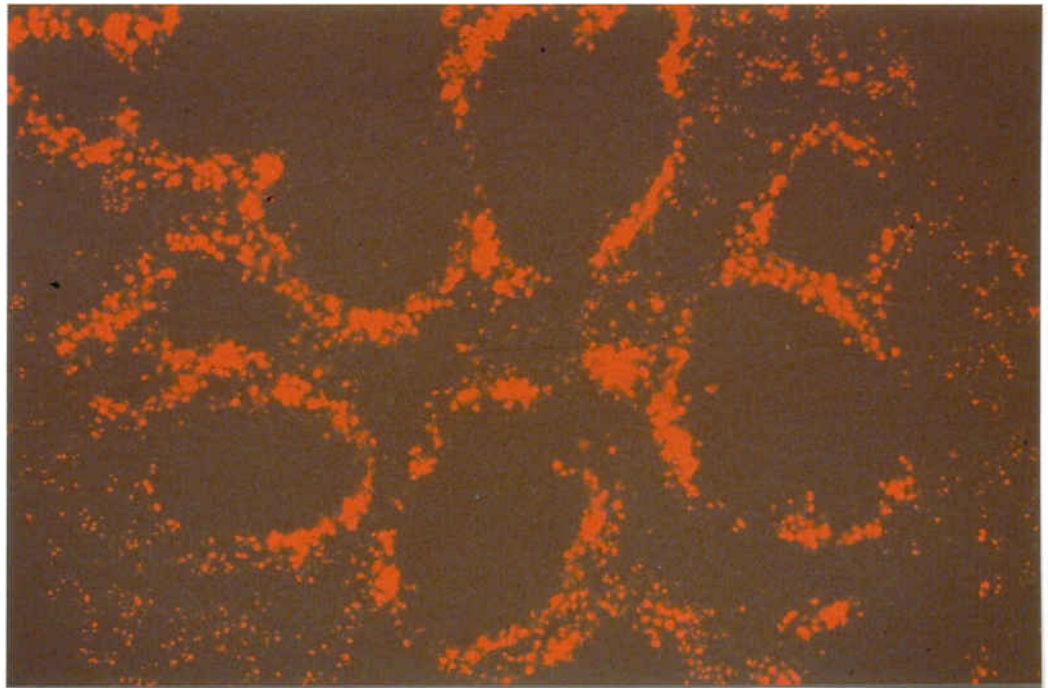
En los cortes histológicos de bazo (Fig. 23), los núcleos fluorescentes fueron localizados de forma preferente en los senos marginales linfoides, senos que contienen una población fagocítica en su interior, y también se observó fluorescencia en la pulpa roja. Sin embargo, el interior del folículo linfoide quedó libre de marcaje fluorescente.

El marcaje observado en las preparaciones de pulmón fue ocasional y disperso, aunque en algunos casos se observaron pequeñas agrupaciones

22



23



Figs. 22 y 23 : Cortes histológicos de hígado (22) y de bazo (23). En el hígado los liposomas, fluorescencia roja, se detectan en los sinusoides hepáticos, mientras que en el bazo el interior del folículo linfoide permanece sin marcar.

3.- CARACTERIZACION DE LÍNEAS CELULARES

La línea celular mas empleada a lo largo de la presente tesis ha sido el melanoma humano WM-164, mientras que los melanomas SKMel 23 y SKMel 28 solo se han utilizado ocasionalmente como auxiliares en algunas técnicas de screening.

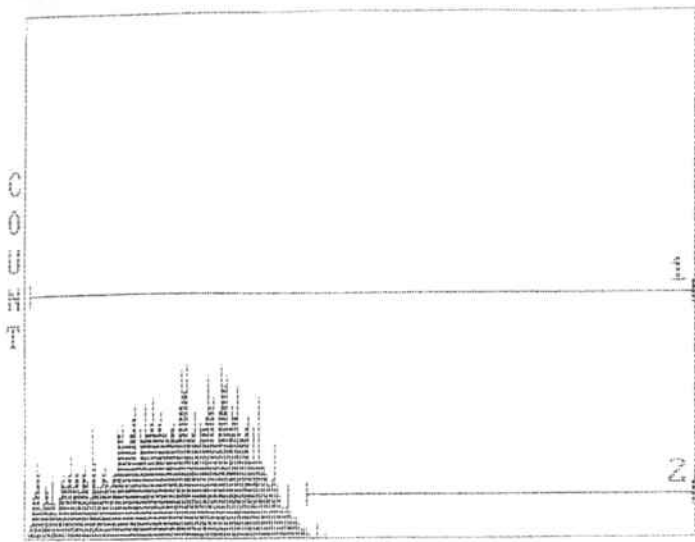
El análisis mediante citometría de flujo revelo que la línea de melanoma murino B16 no era reconocida por ninguno de los anticuerpos monoclonales anti-GD3 empleados, por lo que su uso fue como control negativo. Las líneas celulares humanas PA-1 y Colo 205 también son negativas por lo que respecta a la expresión de GD3 (Fig 25).

4.- EXTRACCION DEL GANGLIOSIDO GD3 A PARTIR DE CÉLULAS WM-164

Las células del melanoma humano WM-164 se cultivaron o bien en frascos de cultivo y en factorías celulares, según se describe en el capítulo correspondiente . Cuando las células forman un cultivo confluyente, se recuperan mediante Hank's o PBS sin calcio ni magnesio y se lavan mediante centrifugación un mínimo de tres veces.

Se realizaron 2 extracciones analíticas con un gramo de células cada una y 5 extracciones preparativas con 6.8, 7.2, 8.4, 9.3 y 10.5 gramos de células cada una. En las tres primeras extracciones preparativas los glicolípidos totales obtenidos después de la extracción de Folch y Pi, se desalaron y el GD3 se purifico mediante HPLC semipreparativo con una columna Lichrospher-NH2 250-4 sin realizar un fraccionamiento previo mediante DEAE. Dada la limitada capacidad de absorción de estas columnas analíticas los glicolípidos totales se alicuotaron en 4 lotes distintos para cada extracción. En las dos últimas extracciones se empleó una columna preparativa Lichrospher-NH2 250-10.

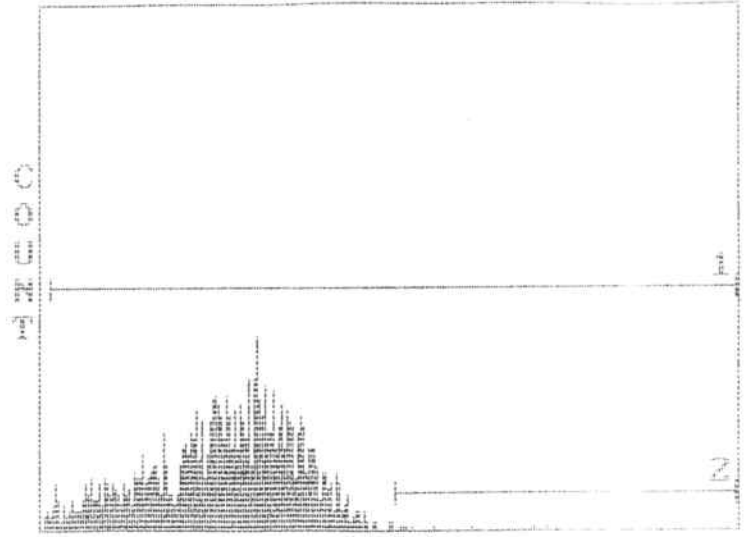
4.1.- EXTRACCIONES ANALÍTICAS : Se inyectaron 5 μ l de glicolípidos totales, eluyendo según el gradiente descrito en el apartado correspondiente del capítulo material y métodos. Se detectó la existencia de 4 picos mayoritarios que representaban mas del 91% del total de los gangliosidos y que se identificaron según el tiempo de retención de



FL1

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1	0.112	1023.	7205	80.0	0.831	0.258	1.46
2	5.656	1023.	14	0.2	7.783	0.190	0.12

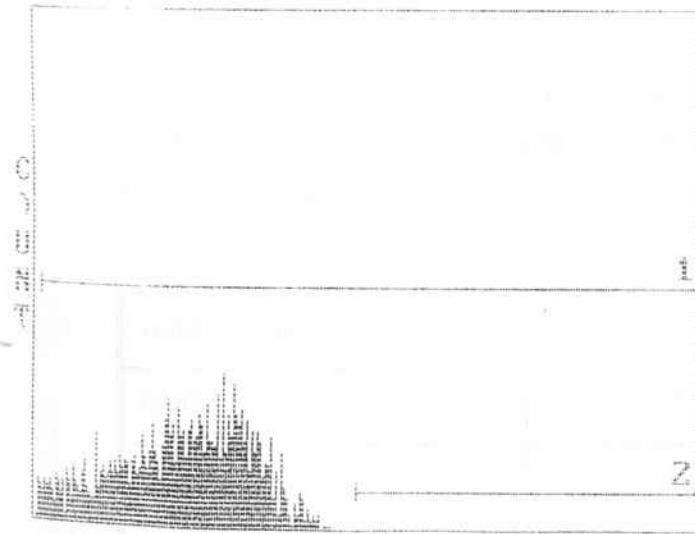
a) Células PA-1 marcadas con el anticuerpo anti-GD3 14F9. Todas las células son negativas.



FL1

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1	0.114	1023.	6198	79.4	1.128	0.272	3.86
2	10.62	1023.	31	0.4	18.64	0.18	0.16

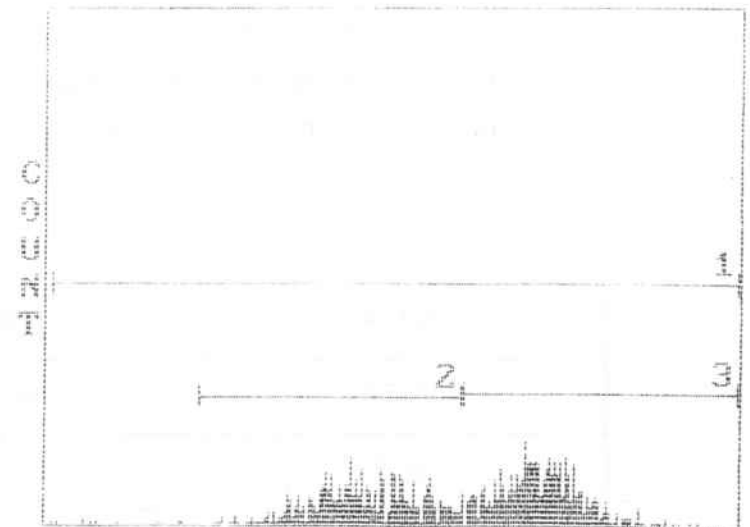
b) Células WM-164 (melanoma) marcadas con el anticuerpo anti-RNAasa F111 (control negativo). No se observa marcaje.



FL1

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1	0.114	1023.	5787	72.2	0.922	0.259	0.96
2	10.62	1023.	1	0.0			

c) Células Colo 205 marcadas con el anticuerpo anti-GD3 14F9. Todas las células son negativas.



FL1

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1	0.112	1023.	3586	99.6	21.27	0.43	0.10
2	0.810	26.07	1756	48.8	6.813	0.215	0.16
3	26.09	1023.	1782	49.5	72.92	0.18	0.10

d) Células WM-164 (melanoma) marcadas con el anticuerpo anti-GD3 14F9. Observese el desplazamiento a la derecha del canal medio de fluorescencia indicando la expresión de GD3.

Fig. 25: Análisis mediante citometría de flujo de las líneas celulares WM-164 (melanoma), PA-1 (teratocarcinoma) y Colo-205 (adenocarcinoma de colon). Solo las células de melanoma muestran positividad frente a GD3.

acuerdo con la tabla XII

Pico	Tiempo de retención	Gangliósido
1	6.82 min.	GM3
2	12.72-13.64 min.	GM2
3	41.21-41.93 min.	N.I.
4	44.81-45.49 min.	GD3

Tabla XII : Tiempos de retención de cada uno de los gangliósidos detectados en los gangliósidos extraídos de células WM-164. (N.I. Pico no identificado)

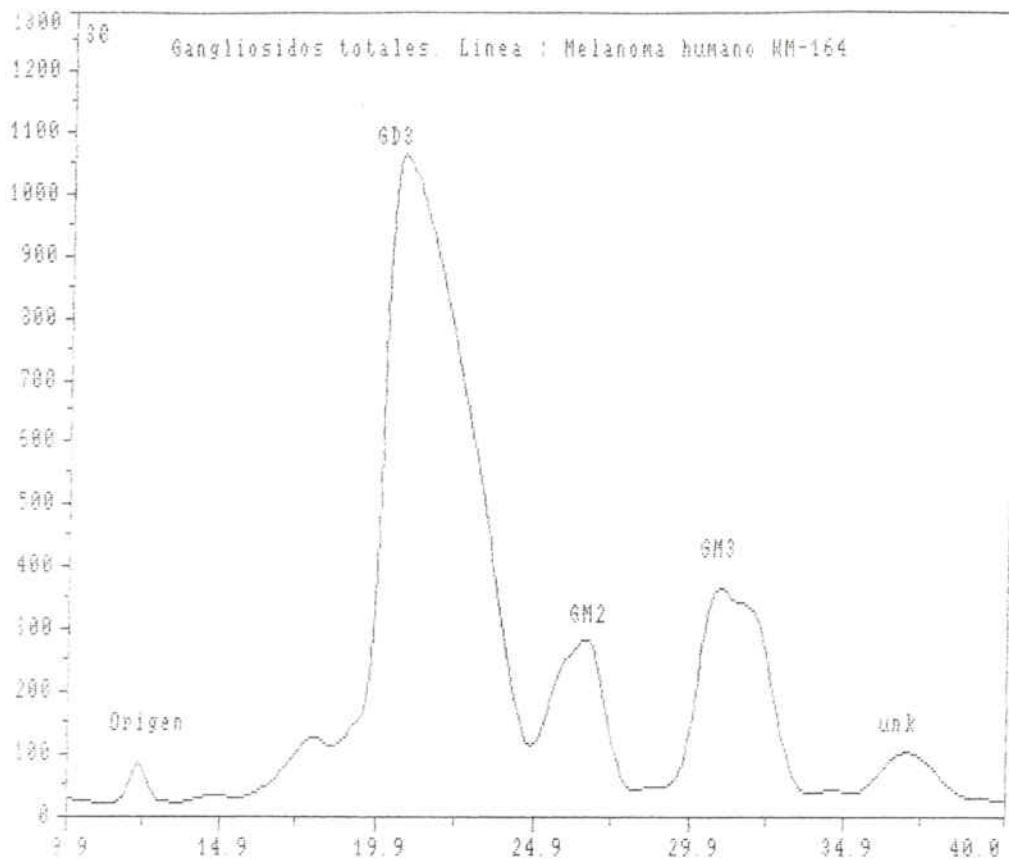
Así mismo se detectaron dos picos minoritarios que no pudieron ser identificados con exactitud pero que por sus tiempos de retención pueden corresponder al GD1b y al GD2.

La cromatografía en capa fina confirmó los resultados obtenidos mediante HPLC, aunque la menor sensibilidad de esta técnica no permitió observar la presencia ni de GD1b ni de GD2. La cantidad de cada gangliósido pudo ser determinada mediante densitometría. La banda correspondiente al GD3 se pudo identificar mediante inmuno-TLC con el anticuerpo monoclonal 14G4 (Figs 26 , 27 y 28. Tabla XIII).

Gangliósido	% HPLC	% TLC
GM3	12 %	15 %
GM2	7,2 %	8 %
GD3	68,6 %	70 %
N.I.	3,3 %	2 %

Tabla XIII : Comparación entre los resultados cuantitativos de las proporciones de los distintos gangliósidos extraídos de las células WM-164 detectados mediante HPLC o TLC.

Es importante observar el hecho de que todos los gangliósidos extraídos de la línea celular



	Name	Y-Pos. [mm]	Area	Area [%]	Height	PM	Std. Conc. ug
Lane Number : 30							X-Coordinate : 35.2 [mm]
1	(?)	17.9	159.6	3.3	98.82	f	
2	GD3	20.6	3245.3	67.4	1037.37	f	
3	GM2	26.5	473.1	9.8	245.01	f	
4	GM3	30.8	809.1	16.8	326.93	f	
5	unk.	36.9	129.8	2.7	69.46	b	



Fig. 27 : TLC y análisis densitométrico de los gangliosidos totales extraídos de la línea WM-164.

Analyzed: Nov 26, 1992 10:43

Reported: May 26, 1993 12:54

Method Title : Method File

Method : GD3

Data File : GD3001.RW

Channel : 1

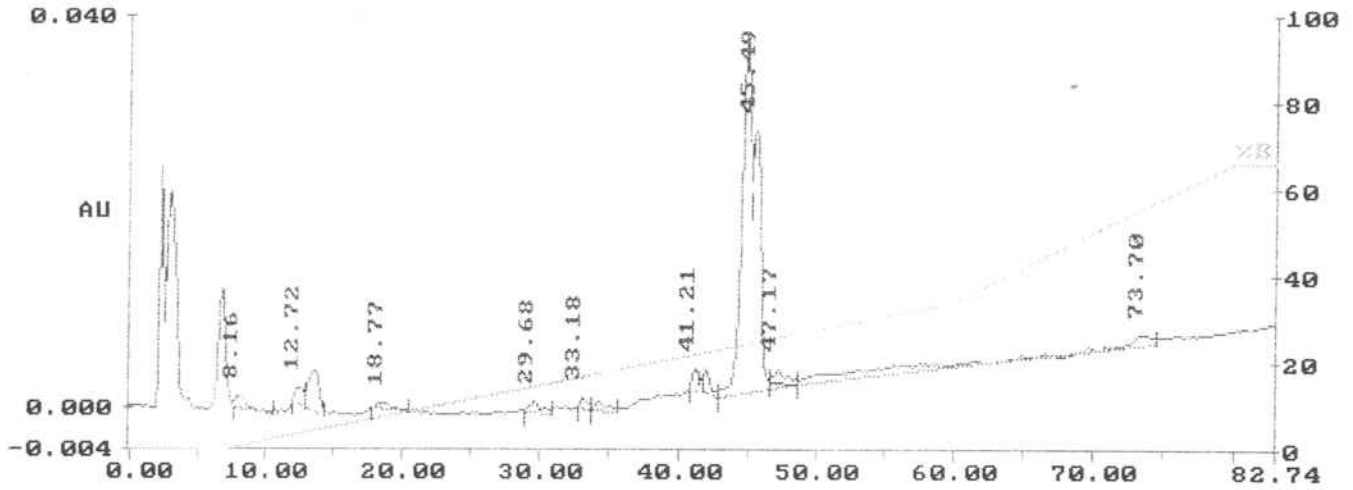
Sample : GD3042.215

UNK - Inj 1

Vial No. = 1

Vol = 10 ul

Channel 1



Channel 1

Peak Quantitation : AREA
Calculation Method : AREA%

NO	RT	AREA		BC
1	8.16	11457	0.662	BB
2	12.72	29715	1.718	BV
3	13.64	101263	5.855	VB
4	18.77	13319	0.770	BB
5	29.68	27779	1.606	BB
6	33.18	14392	0.832	BB
7	34.49	26085	1.508	BB
8	41.21	28376	1.641	BV
9	41.93	31294	1.809	VB
10	44.81	693087	40.073	BV
11	45.49	552490	31.944	VB
12	47.17	34221	1.979	TBB
13	73.70	166072	9.602	BB
TOTAL		1729550	100.000	

Fig. 28 : Cromatografía analítica del extracto de gangliósidos totales de células WM-164. Los picos 10 y 11 (tiempos de retención de 44,81 y 45,49 minutos) corresponden al GD3.

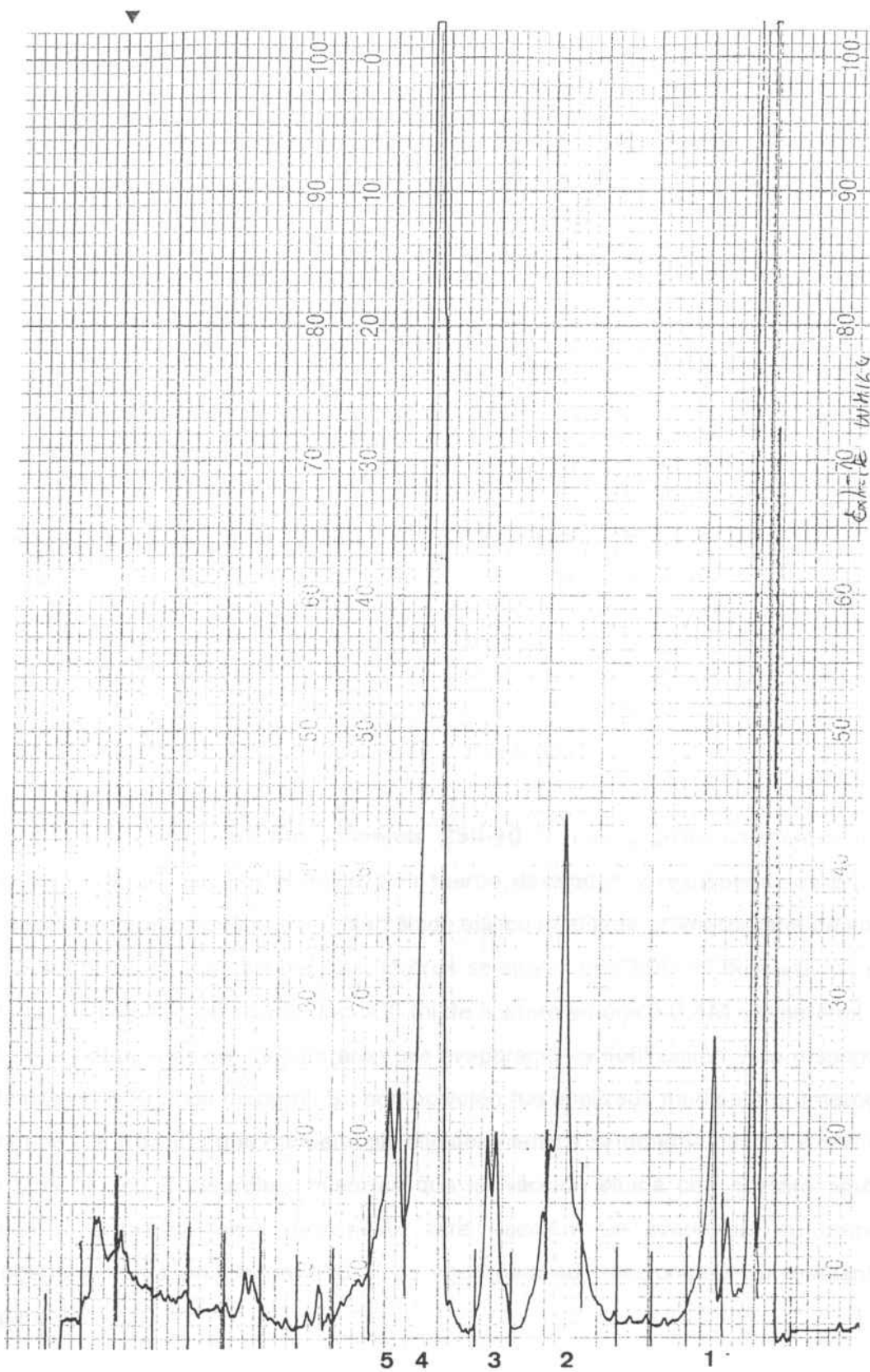


Fig. 29 : HPLC semipreparativa. Gangliósidos totales extraídos de la línea WM-164. La identificación de cada pico se realizó mediante TLC de acuerdo con la figura 32.

WM-164 migran en capa fina formando una doble banda. Esta característica puede ser debida a una diferente composición en las ceramidas y será analizada con mas detalle en otro apartado.

4.2.- EXTRACCIONES PREPARATIVAS : Debido a la mayor resolución que proporcionan las columnas preparativas los resultados de la purificación del GD3 son bastante diferentes según el tamaño de la columna utilizada, por lo que los resultados se describen en dos apartados diferentes.

4.2.1.- Purificación mediante columnas 250-5 : El total de glicolípidos obtenidos en la extracción se resuspendía en 425 μl de agua y se inyectaba al cromatógrafo fraccionado en lotes de 100 μl cada uno. El cromatograma se solucionaba en fracciones de acuerdo con los picos obtenidos. El pico de GD3 presentaba una cierta asimetría y en algunas ocasiones aparecía un subpico minoritario, ni la asimetría ni el subpico minoritario pudieron ser solucionados (Fig. 29). Los distintos lotes de GD3 obtenidos eran mezclados, concentrados por evaporación, desalados y analizados.

4.2.2.- Purificación mediante columnas 250-10 : Los glicolípidos totales obtenidos después de la extracción de Folch y Pi fueron desalados y resuspendidos en 2 ml de metanol y separados según contenían ácido siálico mediante cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE. Los glicolípidos neutros se eluyen con 500 ml de metanol, mientras que los gangliósidos se eluyen con 500 ml de acetato amónico 0,4M en metanol. Las dos fracciones obtenidas se concentraron por evaporación y liofilización y se resuspendieron cada una en 500 μl de metanol. Su composición fue analizada mediante cromatografía en capa fina. La fracción que contiene glicolípidos neutros se obtenía bastante contaminada con fosfolípidos y esteroides, mientras que la fracción eluida con acetato amónico no presentó contaminaciones detectables, esta fracción fue evaporada en corriente de nitrógeno y resuspendida en 110 μl de agua para su fraccionamiento mediante HPLC preparativa.

Los gangliósidos totales obtenidos mediante intercambio iónico se inyectaron al cromatógrafo en un solo lote. El escalado desde las columnas analíticas hasta la preparativa se realizó alargando hasta 15 minutos el lavado inicial de la columna para eluir los glicolípidos no absorbidos a la misma e incrementado el flujo hasta 5 ml/minuto. Estas

condiciones permitieron obtener resultados idénticos a los obtenidos mediante las columnas analíticas. El pico de GD3 se resolvió en dos picos contiguos que pudieron ser parcialmente separados y analizados (Fig 30). El GD3 obtenido fue concentrado, desalado y analizado en idénticas condiciones a las ya descritas.

4.3.- ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DEL GD3 OBTENIDO : El GD3 purificado se analizó mediante cromatografía en capa fina e inmuno-TLC. En todos los casos el GD3 obtenido migraba mediante TLC en una doble banda con un Rf compatible con los estándares comerciales ensayados. Esta doble banda no se observa en GD3 de origen bovino. La tinción de las placas de TLC mediante los anticuerpos monoclonales 14G4, 14F9 y 136-2A10 permitió observar la presencia de una tercera banda de migración mas rápida. Esta tercera banda desaparecía tras un tratamiento de la muestra con NaOH 1M. En ningún caso la metodología empleada permitió detectar contaminación con otros gangliósidos.

La cantidad de GD3 obtenido fue diferente en función de la cantidad inicial de células empleada, aunque se mantenía alrededor de 400 μ g por gramo de células empleado.

El empleo de una columna preparativa permitió resolver la asimetría del pico de GD3 en dos picos que se pudieron fraccionar parcialmente. El análisis mediante TLC mostró la existencia de dos bandas simples en el primer pico. La primera banda migra 35 mm y es sensible al tratamiento alcalino, mientras que la segunda banda migra hasta 29 mm y es resistente al tratamiento alcalino. Por las condiciones de migración y la sensibilidad al tratamiento alcalino la banda mas rápida puede identificarse como 9-O-Acetil-GD3 o bien como resultado de un proceso de lactonización del GD3. El segundo pico aislado mostró la existencia de dos bandas resistentes al tratamiento alcalino que migran conjuntamente hasta 26,3 y 29,2 mm respectivamente, estas dos bandas son compatibles con la movilidad del GD3 que migra hasta 28,9 mm. La diferencia de movilidad puede ser debida a la existencia de ceramidas distintas. Todas las bandas purificadas en estos dos picos se tiñen con anticuerpos específicos anti-GD3, pero no se tiñen ni con el anticuerpo ME-311 (anti-acetil-GD3) ni con el anticuerpo ME-361 (anti-GD2), por lo que queda descartada la presencia de cualquier contaminación con otros gangliósidos. La banda sensible al tratamiento alcalino puede ser resultado de un proceso de lactonización del GD3, siendo imposible llegar a una conclusión exacta sin la ayuda de espectrofotometría de masas (Figs. 30, 31 y 32)

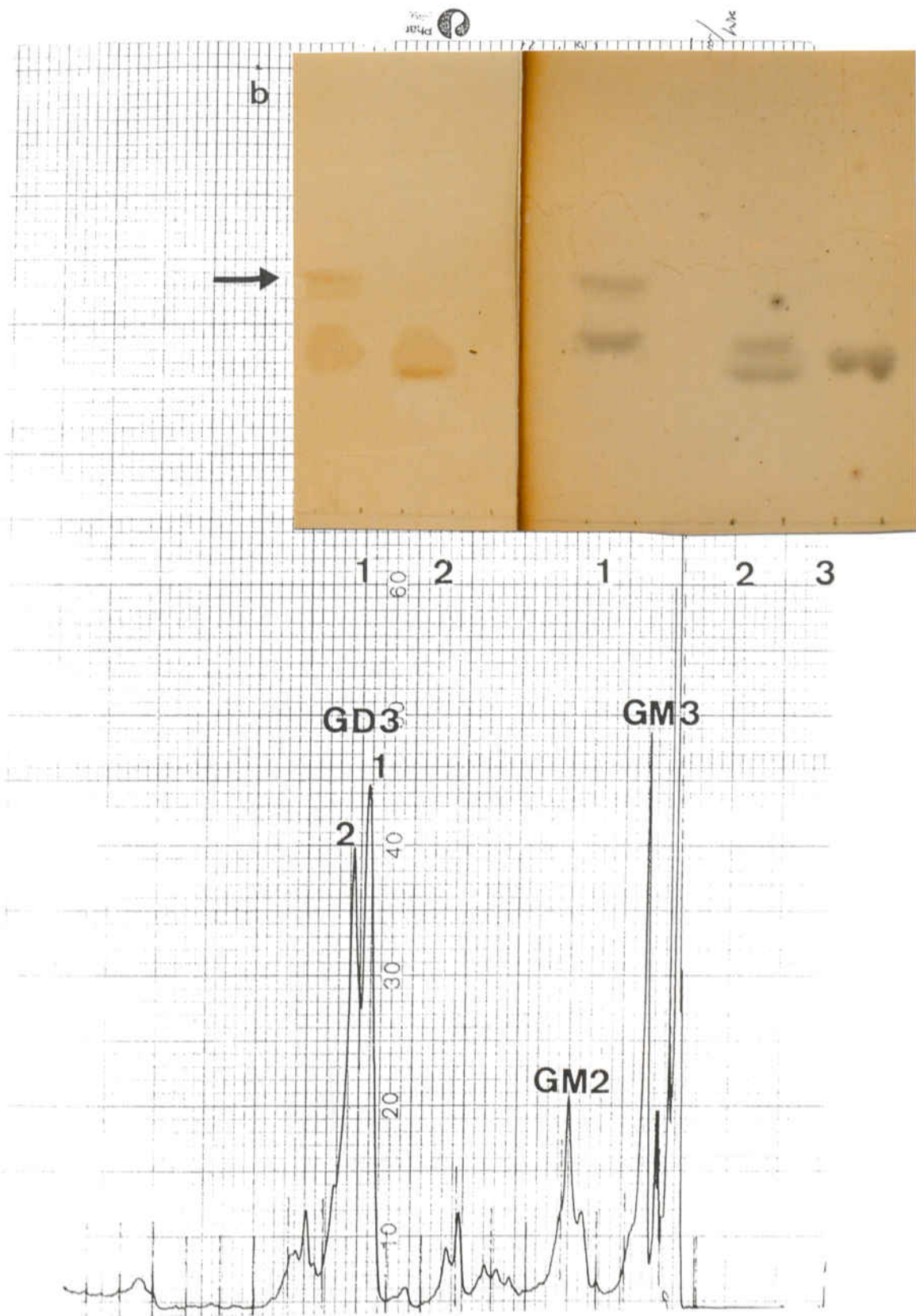
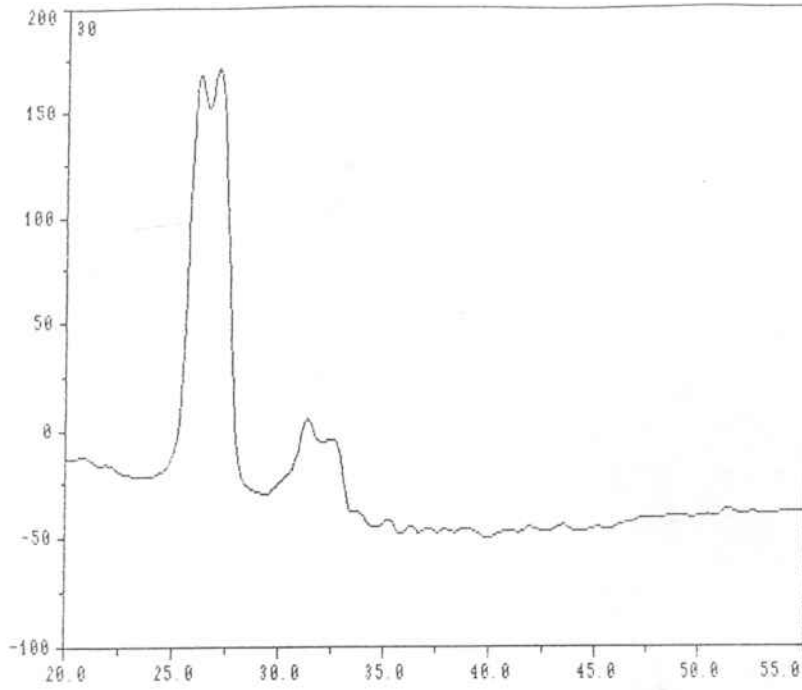
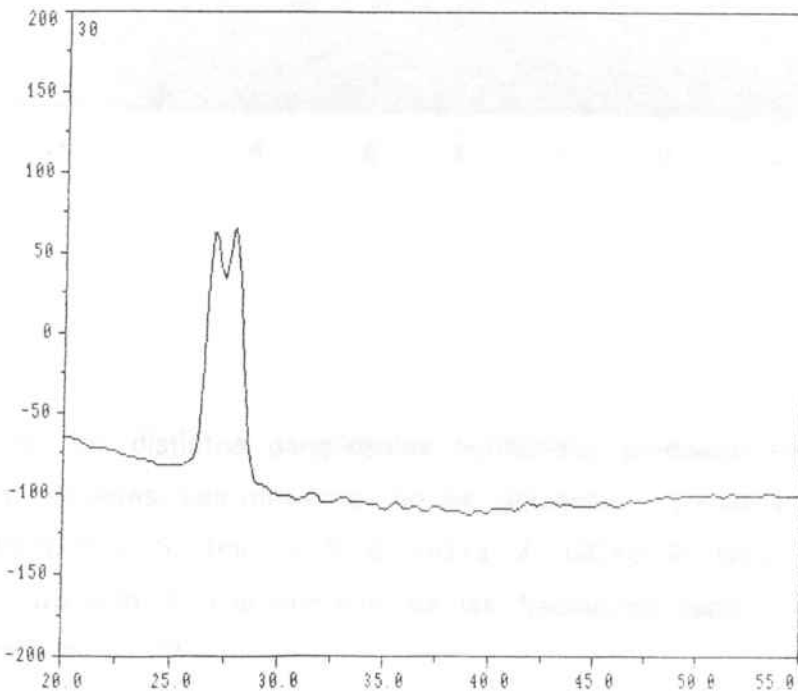


Fig. 30 : HPLC preparativa . Gangliósidos totales de la línea WM-164. El pico correspondiente al GD3 se desdobló en dos picos (1 y 2) que migraban formando una doble banda mediante TLC (panel a). Todas las bandas mostraron reacción positiva con el anticuerpo anti-GD3 136-2A10 (panel b). La banda más rápida del pico 1 (→) es sensible al tratamiento alcalino (ver fig. 32).



GD3 from WM-164 cell line before NaOH treatment



GD3 from WM-164 cell line after NaOH treatment

Fig. 31 : TLC (densitometría) del pico de GD3 antes (panel superior) y después (panel inferior) del tratamiento alcalino con NaOH. La banda que migró mas rapidamente mostró sensibilidad a dicho tratamiento.

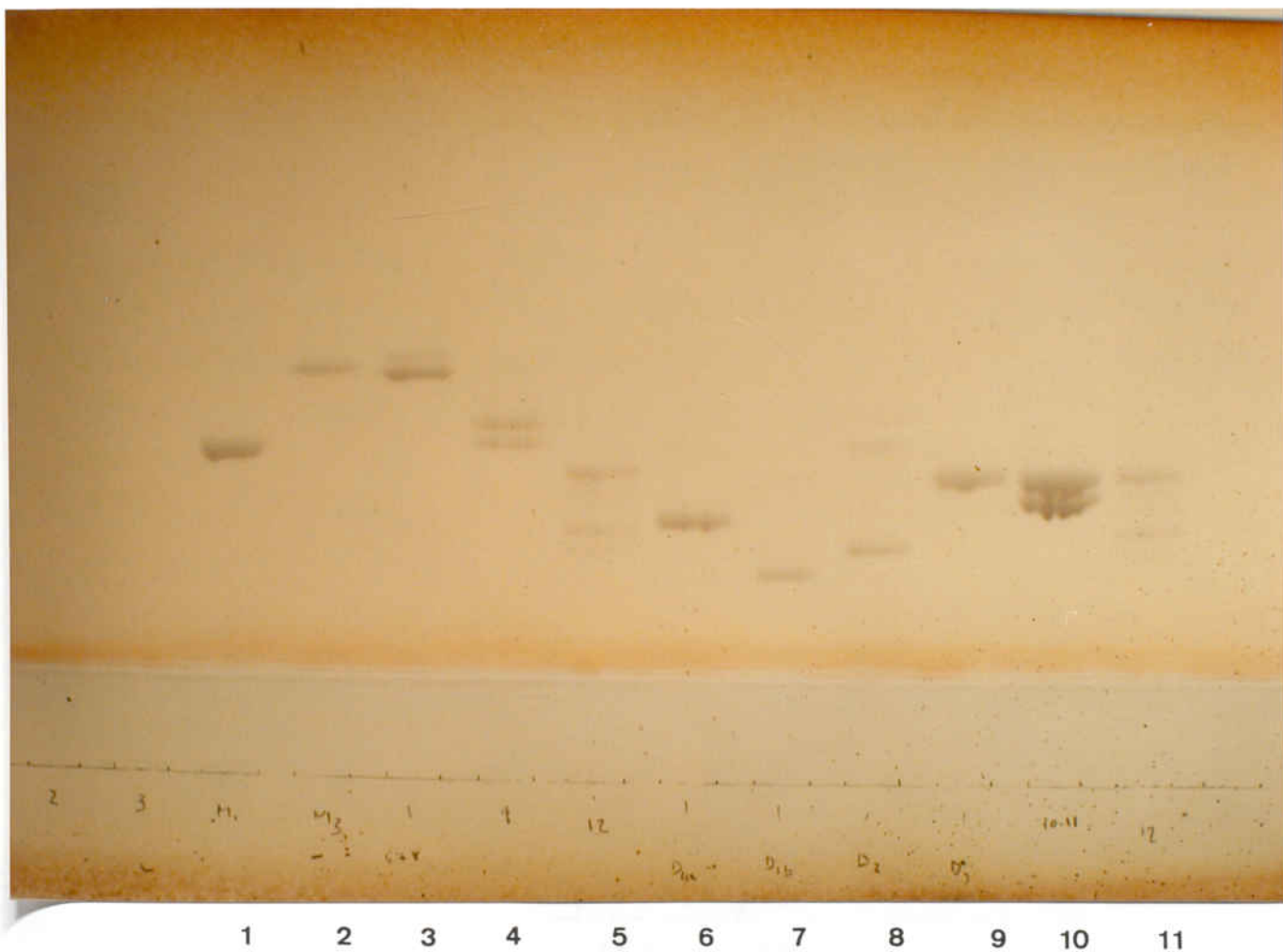


Fig. 32 : TLC de los distintos gangliósidos purificados mediante HPLC y de los correspondientes estándares. Las muestras son las siguientes : 1.- GM1; 2.- GM3; 3.- fracción 1; 4.- fracción 2; 5.- fracción 5; 6.- GD1a; 7.- GD1b; 8.- GD2; 9.- GD3; 10.- fracción 4; 11.- fracción 5. Los números de las fracciones están indicados en el cromatograma de la figura 29.

De acuerdo con los estándares utilizados la fracción número 1 corresponde al GM3, la número 2 corresponde al GM2 y la número 4 corresponde al GD3. Las fracciones 3 y 5 no se corresponden con ninguno de los gangliósidos empleados por lo que no han podido ser identificadas.

4.4.- ESTUDIO DE LAS CERAMIDAS : En el apartado anterior se ha descrito que el GD3 de origen no tumoral migra formando una sola banda homogénea, mientras que el GD3 extraído de células tumorales migra formando un doblete. estas diferencias son debidas a la existencia de ceramidas de diferente composición y diferente grado de insaturación.

El GD3 bovino migró formando una serie de bandas bastante difusas que se extendían desde los 21,7 hasta los 33,4 mm, existiendo una banda mayoritaria, 52,2 %, que migra entre los 28,5 y 29,8 mm. La primera fracción obtenida de células de melanoma migró formando tres bandas dobles, la primera entre los 16,7 y 18,2 mm, la segunda entre los 20 y 21,7 mm y finalmente la tercera, mas ancha, entre los 25,9 y 28,5mm. La segunda fracción de GD3 tumoral presenta un patrón distinto con cuatro grupos de bandas situados entre los 20,2 y 21,9, 24,8 y 26,1, 29,4 y finalmente entre 35,7 y 37,2 mm.

Ceramida	Bovino		Tumor (1)		Tumor(2)	
	mm	%	mm	%	mm	%
			16.7	7.3		
			18.2	15		
C 16:1			20	7.1	20.2	12.6
C 16:0	21.7	6.3	21.7	13.7	21.9	9
C 18:1	24.8	15.7			24.8	12.6
C 18:0	26	12.2	25.9	36.9	26.1	9
C 20:1	28.5	21.3	28.5	12		
C 20:0	29.8	30.9			29.4	18.6
C 22	33.4	6.3				
C 24:1					35.7	26
C 24 : 0					37.2	9

Tabla XIV : Análisis de la composición de las ceramidas mediante TLC de fase reversa.

El GD3 de origen bovino migra formando bandas mayoritarias para ceramidas con 18 y 20 átomos de carbono, mientras que las dos muestras de GD3 tumoral (Tumor(1) y Tumor (2)) presentan una mayor heterogeneidad. Las muestras de GD3 tumoral 1 y 2 corresponden a los picos 1 y 2 purificados mediante HPLC preparativa (Ver figura 30).

Lamentablemente carecemos de estándares adecuados para reconocer con exactitud el tipo de ceramida presente en cada muestra, pero de acuerdo con la bibliografía consultada las bandas que migran entre los 24,8 y 29,8 mm corresponden a las ceramidas normales, 80,1% en el GD3 bovino, formadas por cadenas saturadas e insaturadas de 18 y 20 átomos de carbono. Las ceramidas con una movilidad menor poseen cadenas más largas, C:22 y c:24, mientras que las ceramidas con una migración más rápida poseen cadenas de 16 carbonos o incluso más cortas.

5.- ANTIGENICIDAD DEL GD3 TUMORAL

Como un ensayo más en la caracterización del GD3 purificado partiendo de células de melanoma se estudió la antigenicidad del mismo, entendiendo como antigenicidad la capacidad de un antígeno para interferir la reacción entre un antígeno y su anticuerpo específico.

5.1.- ANTIGENICIDAD DEL GD3 SOLUBLE : La antigenicidad del GD3 tumoral fue analizada estudiando las curvas de afinidad de dos anticuerpos monoclonales, 14G4 y 14F9, por el GD3 bovino y el GD3 tumoral. Estas curvas se realizaron añadiendo cantidades crecientes de anticuerpo monoclonal a una cantidad fija de antígeno y midiendo la intensidad de la reacción mediante ELISA de fluorescencia. Los resultados demostraron que no existían diferencias en la reactividad de ambos tipos de GD3, siendo las curvas obtenidas para cada anticuerpo perfectamente superponibles (Fig. 34).

5.2.- ANTIGENICIDAD DEL GD3 ASOCIADO A LIPOSOMAS : Los resultados de este ensayo muestran que el anticuerpo es absorbido más rápidamente por los liposomas que contienen GD3 tumoral que por los liposomas realizados con GD3 bovino. Las diferencias en la actividad residual anti-GD3 de los sobrenadantes son significativas ($p < 0,001$) desde los 5 minutos de incubación hasta los 60 minutos, desde este punto hasta la finalización de los tiempos ensayados las diferencias no son significativas (Fig 35).

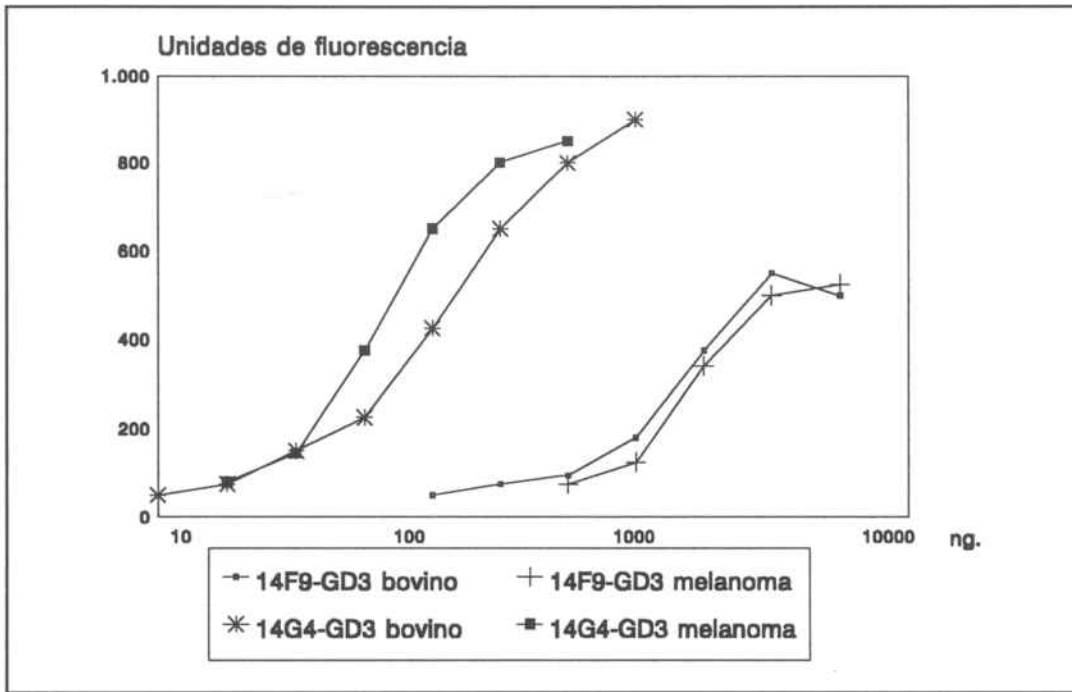


Fig 34 : Afinidad de los anticuerpos 14F9 y 14G4 por el GD3 bovino y tumoral. No se observan diferencias significativas entre las afinidades por ambos tipos de gangliósidos.

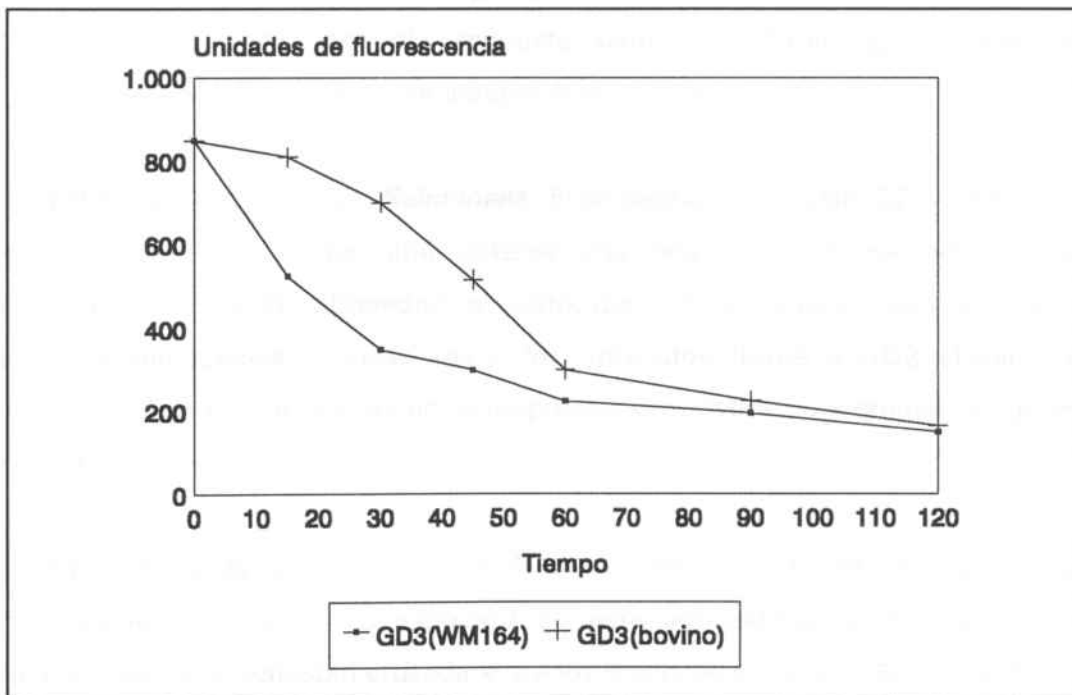


Fig 35 : Absorción de liposomas-GD3 con el anticuerpo 14F9. Se observa una afinidad significativamente superior ($p < 0,001$) por los liposomas que contienen GD3 tumoral.

6. - RESPUESTA SEROLÓGICA

Los resultados de la respuesta inmunológica se expresaran de forma separada para cada una de las pautas de inmunización ensayadas. En los resultados se expresarán los títulos obtenidos, reacciones cruzadas e isotipos. Tal y como se especifica en el apartado correspondiente del capítulo de Material y métodos el título obtenido se obtiene restando la absorbancia leída en las placas que contenían GD3 de las placas que contenían solo solución de bloqueo.

6.1.- INMUNIZACIÓN CON ADYUVANTE DE FREUND : Ninguna de las pautas ensayadas utilizando Adyuvante completo, incompleto o una combinación de ambos dio ningún tipo de respuesta detectable mediante ELISA (Tabla XV).

6.2.- INMUNIZACIÓN CON *Bordetella pertusis* : La combinación de B.P. con adyuvante de Freund y GD3 dio una moderada respuesta, siempre con títulos iguales o inferiores a 1:40. Esta respuesta fue totalmente inespecífica (Tabla XV).

6.3.- INMUNIZACIÓN CON GD3-*Salmonella* : El empleo del conjugado GD3-Salmonella con una proporción de 1:20, permitió obtener una respuesta intensa pero totalmente inespecífica. Los títulos obtenidos al enfrentar los antisueros con antígenos no relacionados son iguales o superiores a los obtenidos frente a GD3 (Tabla XV). Al determinar los isotipos presentes en la respuesta se detectó un incremento general de todos ellos.

La inmunización con el conjugado GD3-SM 1:4 dio una respuesta específica anti-GD3 en todos los animales con un título medio de 1:20, esta respuesta fue en forma de IgM y con un elevado nivel de reactividad cruzada entre los distintos gangliósidos empleados (Tabla XV).

Inmunógeno	Adyuvante	% Resp.	Título
GD3	-	0	0
GD3	Freund	0	0
GD3	B. Pertusis	0	0
GD3-SM 1:20	-	0	0
GD3-SM 1:4	-	50	1:20(4),1:40(1)
SKMel 28	-	50	1:20(2),1:40(1)

Tabla XV : Resultados a diversas pautas de inmunización. Todas las respuestas son mediante IgM.

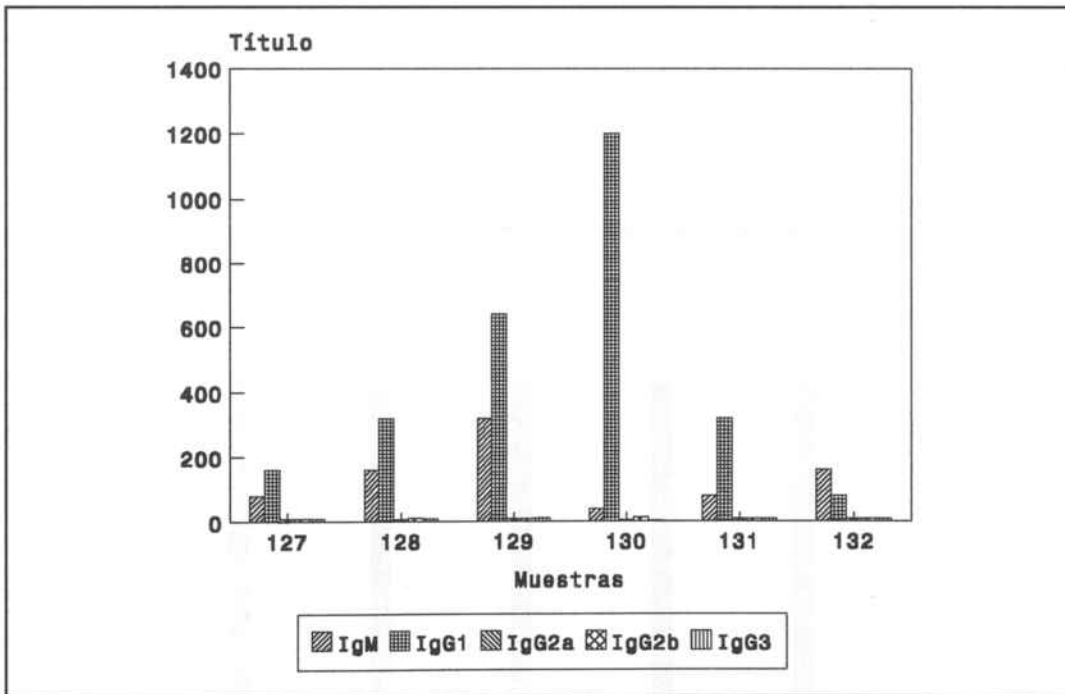


Fig 36 : Isotipos presentes en la respuesta a la inmunización con la neoglicoproteína sintética Disialil-lactosa-BSA.

6.4.-INMUNIZACIÓN CON DISIALIL-LACTOSA-BSA : Se obtuvo un título medio de 1:160 para la IgM y de 1:640 para la IgG, la respuesta fue sumamente específica y sin apenas reacciones cruzadas con los otros gangliósidos. El máximo título obtenido fue de 1:1200 (Figs 36 y 37).

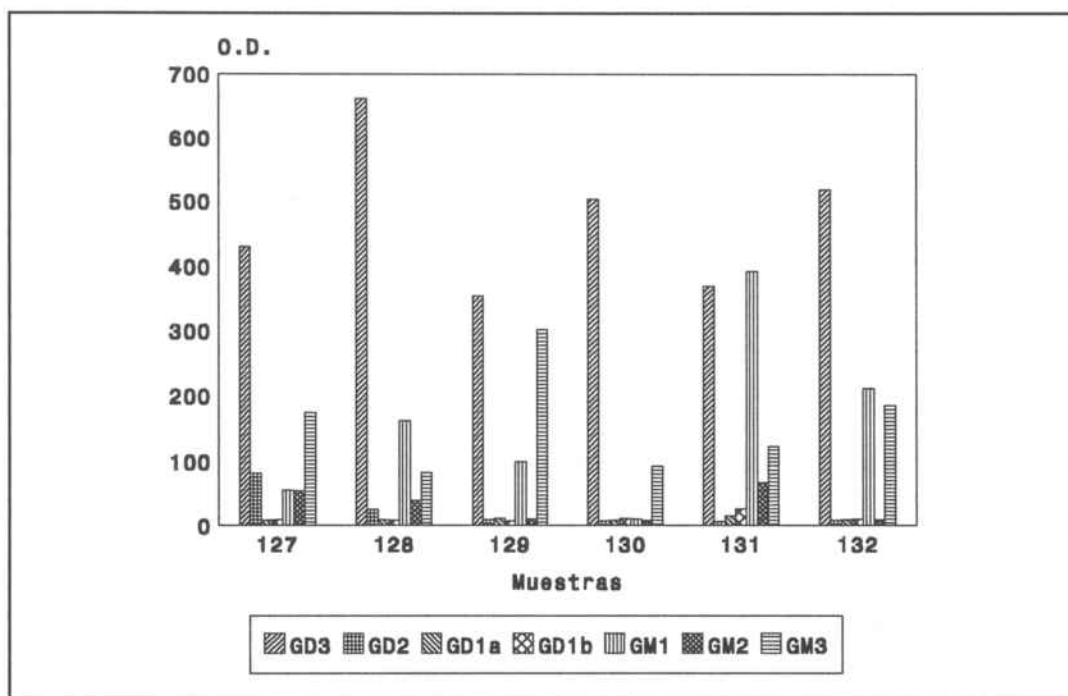


Fig. 37 : Reactividad cruzada entre gangliósidos de los antisueros obtenidos mediante inmunización con disialil-lactosa-BSA.

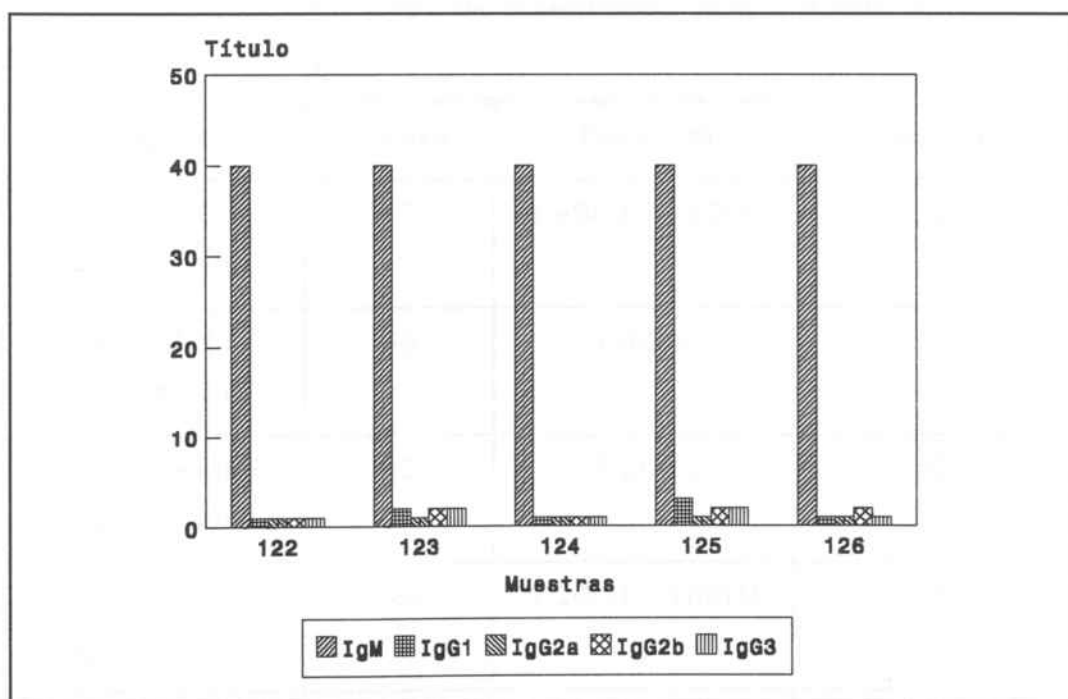


Fig 38 : Isotipos presentes en la respuesta anti-GD3 inducida mediante células de melanoma

6.5.- INMUNIZACIÓN CON CÉLULAS DE MELANOMA : Respondieron un 50% de los

animales con unos títulos que oscilaban entre el 1:20 y un máximo de 1:40. La respuesta fue mayoritariamente mediante IgM, aunque dos animales dieron una débil respuesta con IgG (Fig. 38). La especificidad obtenida fue buena, teniendo en cuenta que las células de melanoma expresan GM3, GM2, GD3, y GD2 mayoritariamente y GD1a en menor grado.

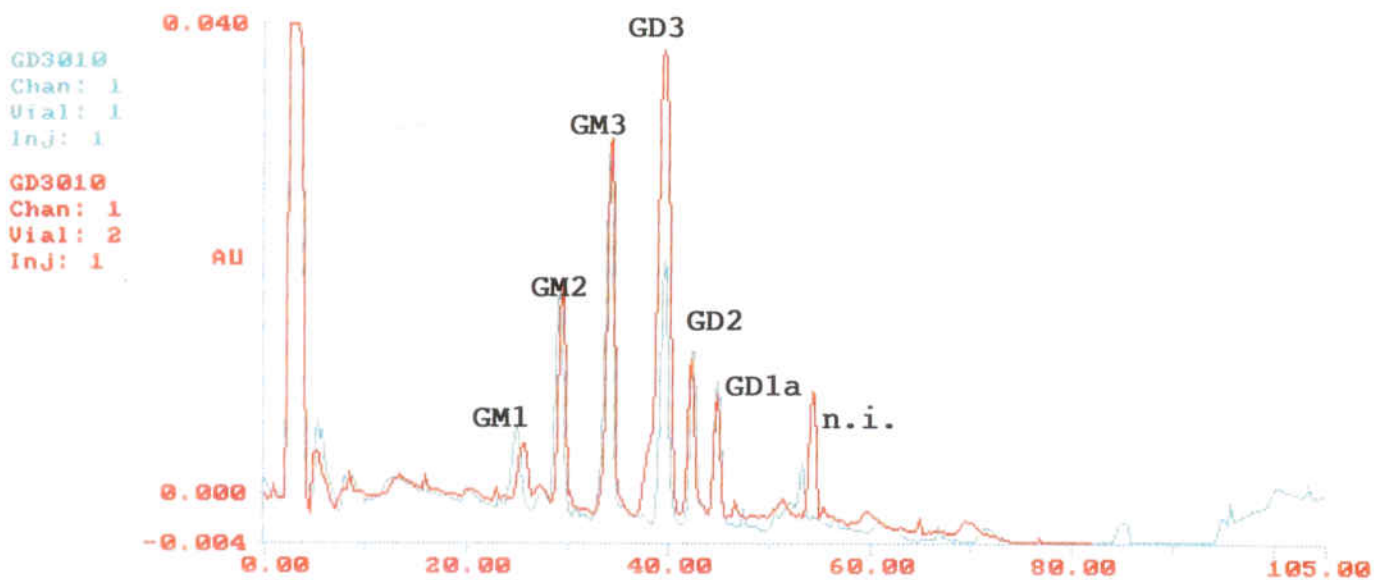
6.6.- INMUNIZACIÓN CON LIPOSOMAS UNILAMELARES : Mediante liposomas unilamelares no fue posible inducir ningún tipo de respuesta sérica.

6.7.- INMUNIZACIÓN CON LIPOSOMAS MULTILAMELARES : Dado que se ensayaron diversos tipos de liposomas y que los resultados fueron muy distintos según el tipo de liposoma empleado, los resultados se especifican separadamente de acuerdo con los distintos tipos de liposomas.

Liposomas de Fosfatidilcolina-Colesterol-GD3 (47,5:47,5:5) Se obtuvo respuesta en el 50% de los animales (3/6) con un título mínimo de 1:80 y un máximo de 1:160. La respuesta siempre fue mediante IgM (Tabla XVI). La respuesta se determinó por oabsorción con un panel de gangliósidos y posterior análisis de los mismos mediante HPLC, mostrando un elevado grado de especificidad dado que solo disminuía el área correspondiente al GD3 (Fig 39).

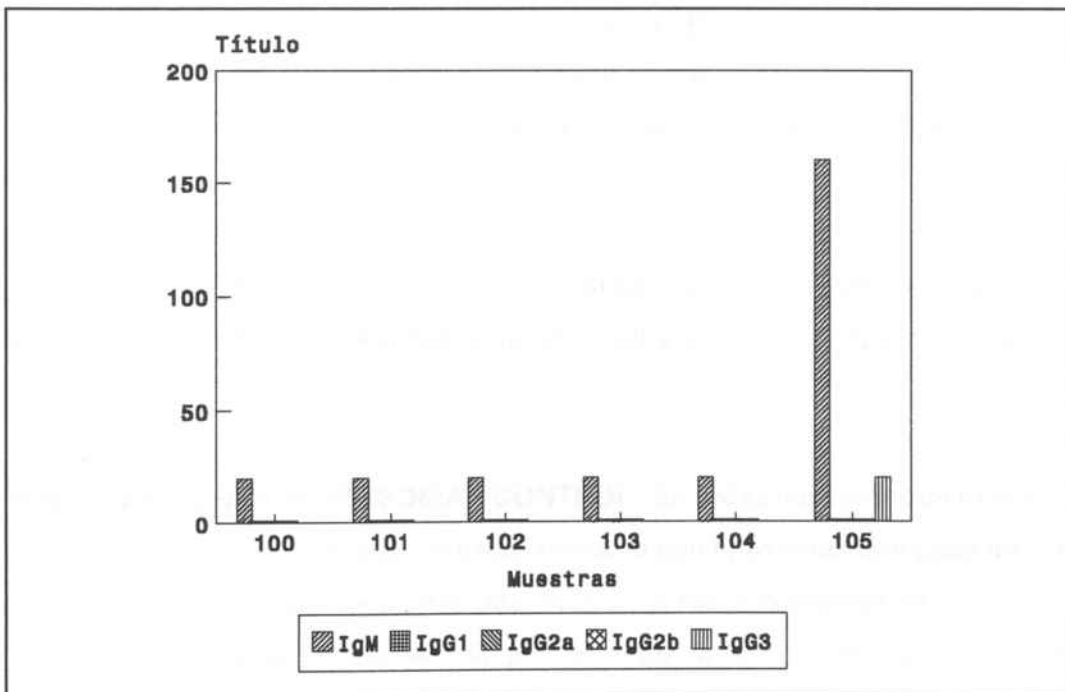
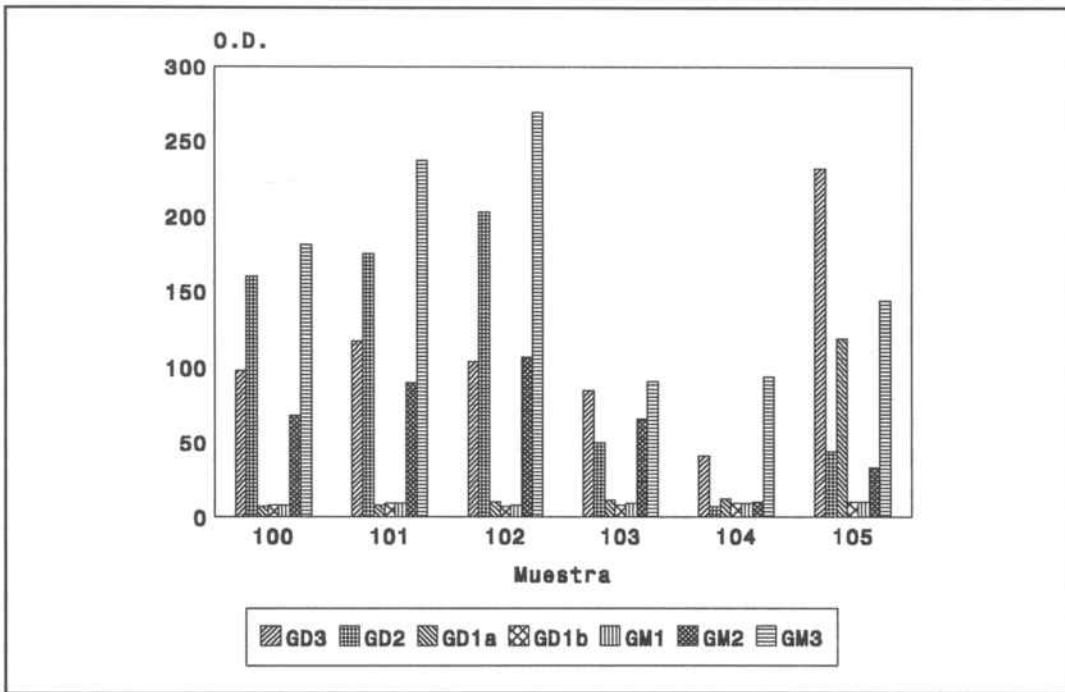
Tipo liposoma	% Resp.	Título IgM	Título IgG
C:F:GD3 (47,5:47,5:5)	40	1:80(1),1:160(1)	0
C:F:GD3 (45:45:10)	60	1:40(4)	0
C:F:GD3 + MDP (45:45:10)	30	1:20(2)	0
C:F:DP:GD3 (40:40:10:10)	100	1:20(5),1:160(1)	1:20(1)
C:E:DP:GD3 (40:40:10:10)	100	1:80(1),1:160(1),1: :360(2), > 1:640(2)	1:20(2),1:100(1)

Tabla XV : Respuesta anti-GD3 inducida mediante liposomas multilamelares.



Gangliósido	t. retención	Area pre-absorción	Area postabsorción	%
GM1	17.25	108903	112745	96.6
GM2	29.53	348215	352267	98.8
GM3	34.36	734879	756785	97.1
GD3	39.54	1638011	519286	31.7
GD2	42.33	298692	291011	97.5
GD1a	44.84	204624	213678	95.8

Figura39 : Determinación de la especificidad de la respuesta mediante absorción de un panel de gangliósidos con antisuero anti-GD3 y posterior análisis de los mismos mediante HPLC. El único gangliósido que reduce significativamente su concentración es el GD3.



Figs 40 y 41 : Respuesta específica anti-GD3. Inmunización con liposomas de fosfatidilcolina : colesterol:dicetilfosfato:GD3 (40:40:10:10). Solo el suero 105 muestra una especificidad aceptable. La respuesta es mayoritariamente en forma de IgM. Solo un animal presentó una debil respuesta mediante IgG3.

Liposomas de Fosfatidilcolina-Colesterol-GD3 (45:45:5) y MDP : Solo respondió un 33% de los animales (2/6) con un título de 1:20 y una especificidad muy baja (Tabla XVI).

Liposomas de Fosfatidilcolina-Colesterol-Dicetilfosfato-GD3 (40:40:10:10): Respondieron el 100 % de los animales. 5 animales lo hicieron con un título de 1:20 y un animal lo hizo con un título de 1:160, este mismo animal respondió con un título de 1:20 de IgG. El nivel de especificidad de la respuesta fue bajo, existiendo una fuerte reacción cruzada GD3, GD2 y GM3 y solo un suero muestra un mejor nivel de especificidad (Figs 40 y 41).

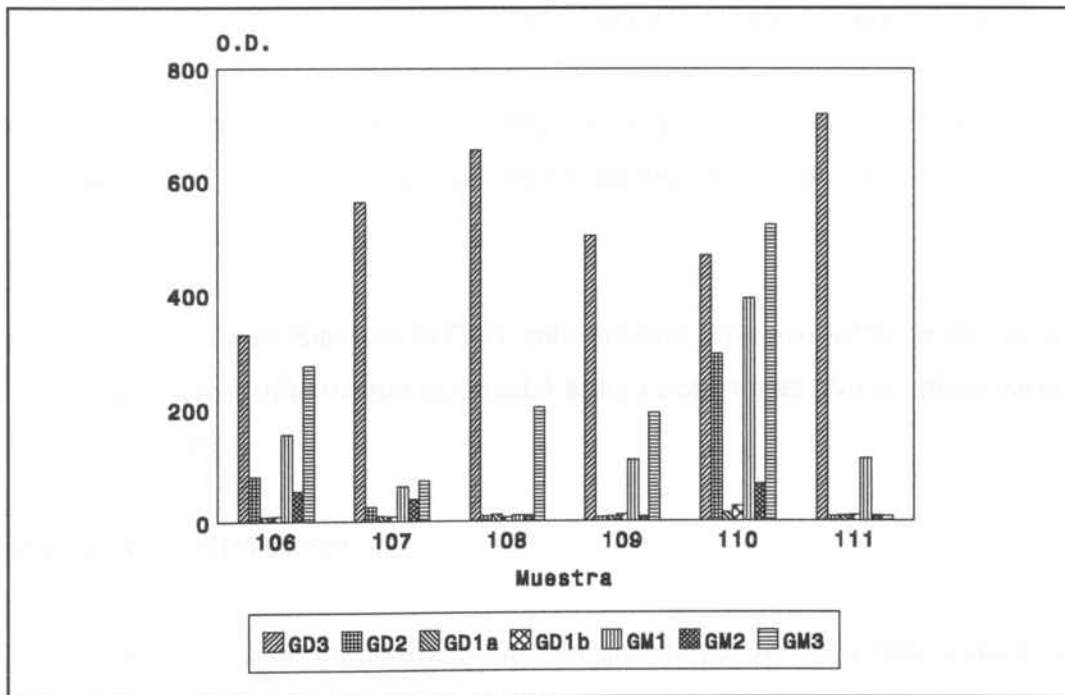
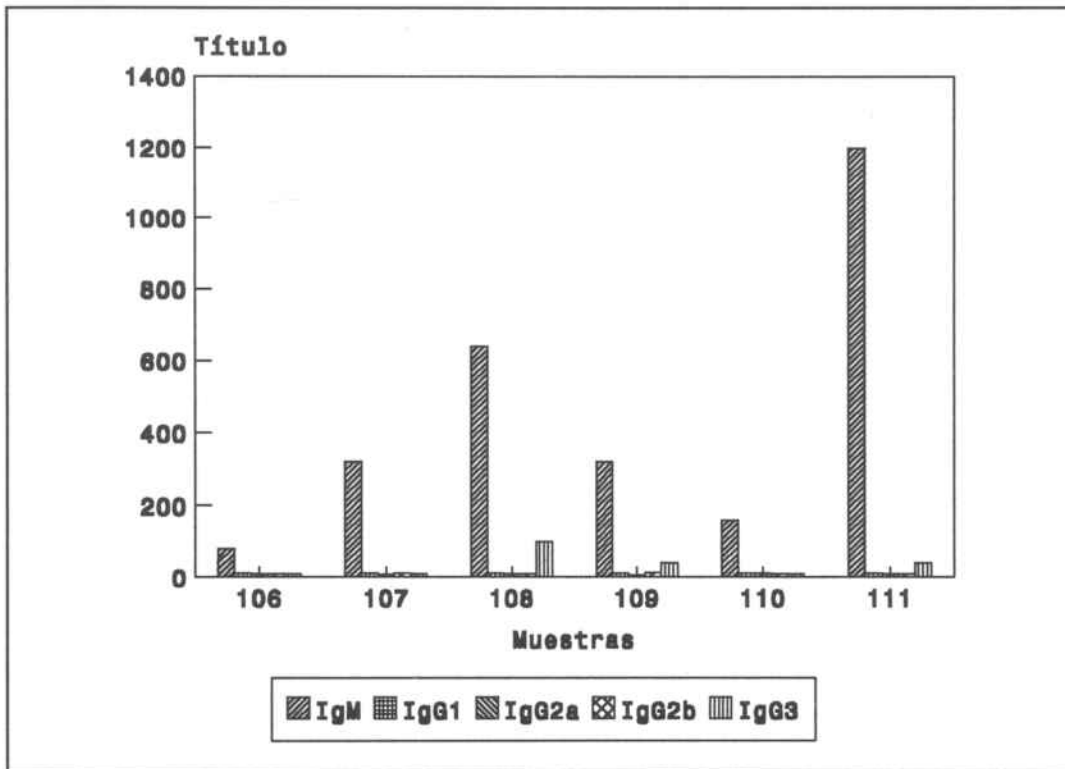
Liposomas de Esfingomielina-Colesterol-Dicetilfosfato-GD3 (40:40:10:10) Todos los animales respondieron mediante IgM y la mitad de ellos también lo hizo mediante IgG. Los títulos oscilaron entre 1:80 y 1:1600 para la IgM y entre 1:40 y 1:100 para la IgG . Solo el suero de un animal mostró una reacción cruzada intensa, mientras que la respuesta anti-GD3 de los otros sueros fue muy específica (Figs. 42 y 43).

Liposomas de Esfingomielina-Colesterol-GD3-Lípido A (45:45:10:0,2) Todos los animales respondieron con títulos superiores a 1:250, pero se trata de una respuesta sumamente inespecífica con reacciones cruzadas tanto entre diversos gangliósidos como con antígenos no relacionados.

Liposomas de Esfingomielina-Colesterol-Dicetilfosfato-GD3-Lípido A (40:40:10:10:0,2) Los resultados obtenidos fueron idénticos a los obtenidos con el otro tipo de liposomas que contenían lípido A.

6.8.- INMUNIZACIÓN CON LIPOSOMAS CONTROL : En todas las pautas de inmunización, y de forma paralela, se inmunizaron lotes de animales con liposomas que poseían la misma composición lipídica que los liposomas descritos pero sin la presencia de GD3. Salvo los liposomas que contenían lípido A, ningún tipo de liposoma indujo respuesta anti-gangliósido. Los liposomas que contenían lípido A indujeron una respuesta intensa y totalmente inespecífica.

6.9.- MUESTRAS PREINMUNES : Todos los animales utilizados en las distintas pautas de inmunización fueron sangrados previamente a la primera inmunización y su suero analizado mediante ELISA para analizar la presencia previa de anticuerpos anti-GD3. En ningún caso



Figs. 42 y 43 : Isotipos y especificidad de la respuesta anti-GD3. Inmunización con liposomas de colesterol:esfingomiolina:dicetilfosfato:GD3 (40:40:10:10). Con la excepción de la muestra 110, todas las demas muestran un elevado grado de especificidad.

se detectó la presencia de estos anticuerpos en los sueros preinmunes.

6.10.- TOXICIDAD Y MORBILIDAD DE LAS INMUNIZACIONES : La toxicidad detectada en las pautas de inmunización fue nula, en ningún caso se detectaron ni granulomas ni inflamaciones debidas a la propia inmunización. El examen peritoneal de algunos animales sacrificados a las 24 horas de su inmunización con liposomas mostró una buena absorción de los liposomas en la cavidad peritoneal y la ausencia de restos lipídicos en la misma. Solo un animal murió durante la pauta de inmunización, menos del 1% de la población, la necropsia de dicho animal no mostró ninguna afectación en bazo, hígado ni órganos relacionados.

Los animales inmunizados con adyuvante completo de Freund mostraron una inflamación intensa en el lugar de la inmunización, inflamación que cedió a las 48 de su inicio. En algunos animales el granuloma se cronificó después de la cuarta o quinta inmunización.

El grupo de animales tratados con Bordetella mostró una reacción intensa a las 12 horas de su administración, esta reacción produjo pirosis intensa, inapetencia y un estado de atonía general de los animales, esta reacción se mantuvo durante mas de una semana. A nivel local se observó

un intenso granuloma en el lugar de la inyección, el granuloma se mantuvo durante mas de diez días. El 20% de los animales murió dentro de las primeras 48 horas post-inmunización.

El empleo del conjugado Salmonella-GD3 solo produjo una leve inflamación local en un 25% de los animales, inflamación que cedió a las pocas horas. No se observaron otras reacciones adversas.

7.- RESPUESTA ANTITUMORAL

En aquellos protocolos de inmunización en los que se obtuvo una respuesta específica anti-gangliósido se estudió el reconocimiento de líneas de melanoma por parte de los sueros con actividad anti-GD3 y su actividad citotóxica contra las mismas células. El reconocimiento de las líneas celulares se realizó mediante inmunofluorescencia, bien sea mediante microscopia o mediante citometria de flujo, por otra parte la actividad citotóxica

se estudió utilizando las técnicas de citotoxicidad por complemento (CDC) y la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC).

7.1.- RECONOCIMIENTO DE LÍNEAS TUMORALES HUMANAS : Las líneas de melanoma humano SKMel 28 y WM-164 se utilizaron como líneas que expresan GD3 en su membrana, mientras que las líneas de adenocarcinoma de colon Colo 205 y el teratocarcinoma PA-1 se utilizaron como líneas negativas en cuanto a su expresión de GD3 (Ver apartado IV-3).

Los resultados indican que los sueros obtenidos mediante inmunización con liposomas multilamelares reconocen ambas líneas de melanoma y no reconocen las dos líneas celulares empleadas como controles negativos, existiendo una correlación entre la intensidad de la fluorescencia observada y el título sérico obtenido. Estos resultados fueron confirmados mediante análisis por citometría de flujo (Fig. 44)

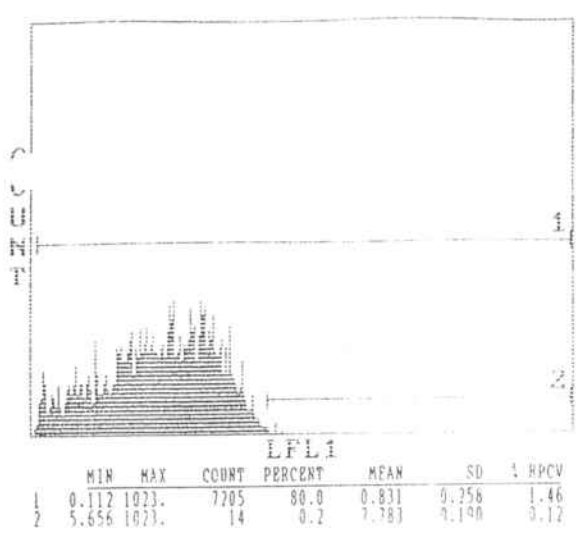
Ninguno de los sueros obtenidos mediante inmunización con GD3-Salmonella, GD3-Bordetella-FCA o bien con liposomas que contenían Lípido A fue capaz de reconocer células de melanoma de forma específica. Los sueros de animales inmunizados con Disialil-lactosa-BSA no reconocieron ninguna de las líneas celulares ensayadas (Fig 44).

7.2.- CITOTOXICIDAD MEDIADA POR COMPLEMENTO : La citotoxicidad mediada por complemento se estudió utilizando células del melanoma humano WM-164 como células diana y del adenocarcinoma de colon Colo-205 como control negativo. Todos los sueros fueron testados a una dilución 1:20.

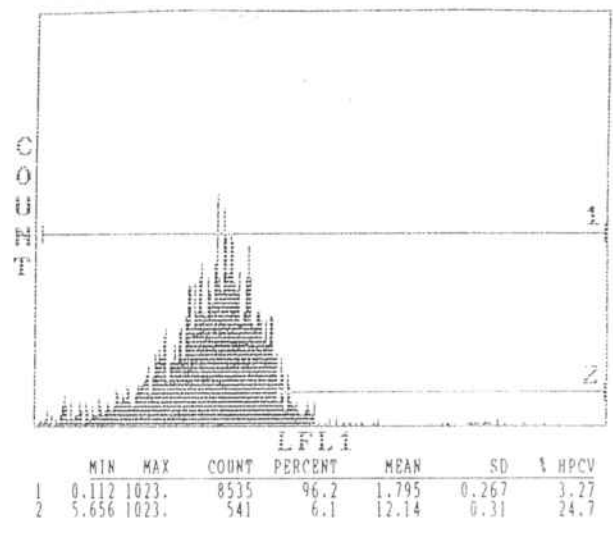
Liposomas unilamelares : Ninguno de los sueros obtenidos mostró actividad citotóxica alguna.

Liposomas de Fosfatidilcolina-Colesterol-GD3 (47,5:47,5:5) : Los tres sueros que mostraron actividad anti-GD3 mostraron actividad citotóxica anti-melanoma, si bien en uno de los tres sueros estudiados esta actividad era muy baja (Fig 45)

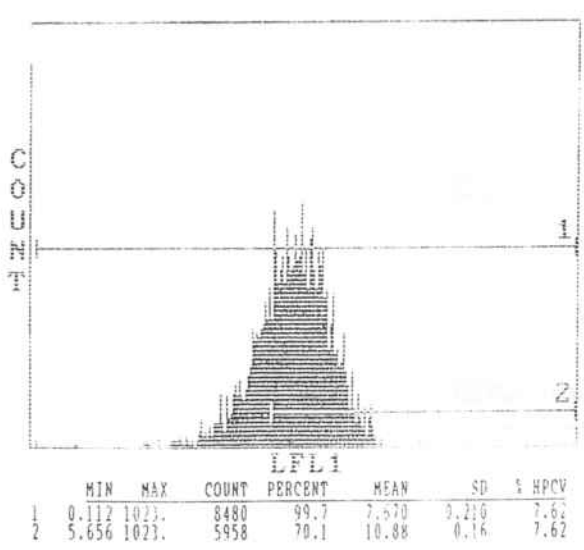
Liposomas de Fosfatidilcolina-Colesterol-GD3 (47,5:47,5:5) y MDP : Ninguno de los sueros ensayados mostró actividad citotóxica alguna.



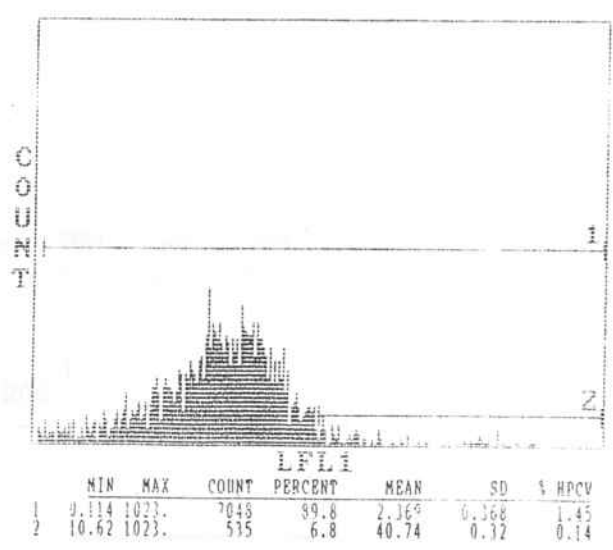
a) Células WM-164. Control negativo



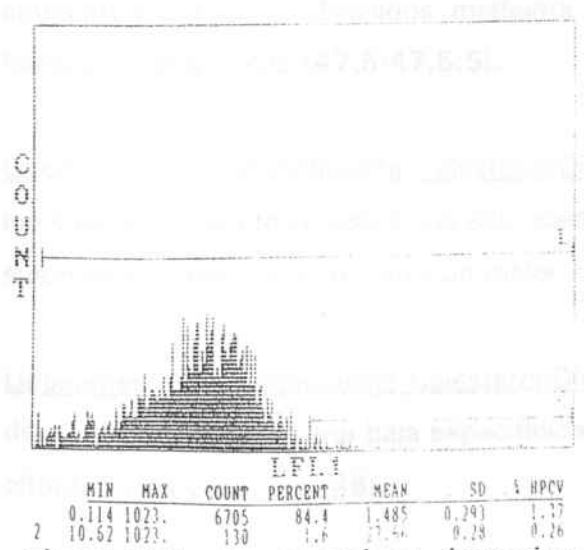
b) Células PA-1. Control negativo



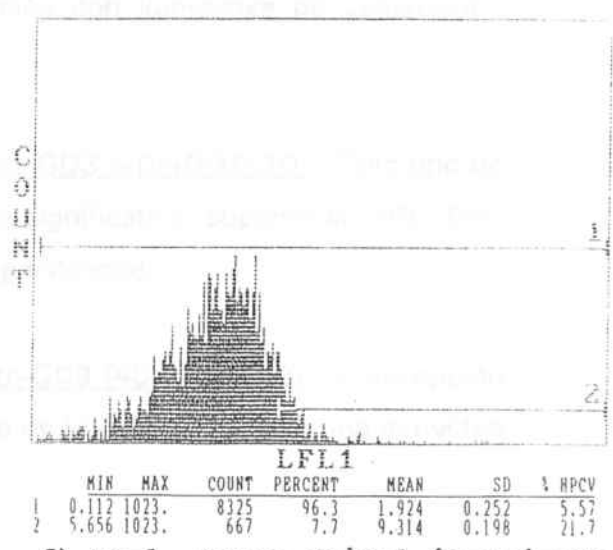
c) WM-164. Suero animal inmunizado con liposomas-GD3



d) PA-1. Suero animal inmunizado con liposomas-GD3



e) WM-164. Suero animal inmunizado con Disialil-lactosa-BSA



f) PA-1. Suero animal inmunizado con Disialil-lactosa-BSA

Figura 44: Análisis por citometría de flujo del reconocimiento de líneas celulares por antisueros anti-GD3. Paneles a y b : WM-164 y PA-1 marcados con un antisuero no relacionado. c y d : Suero de ratón inmunizado con liposomas GD3. e y f : suero de ratón inmunizado con antígeno sintético.

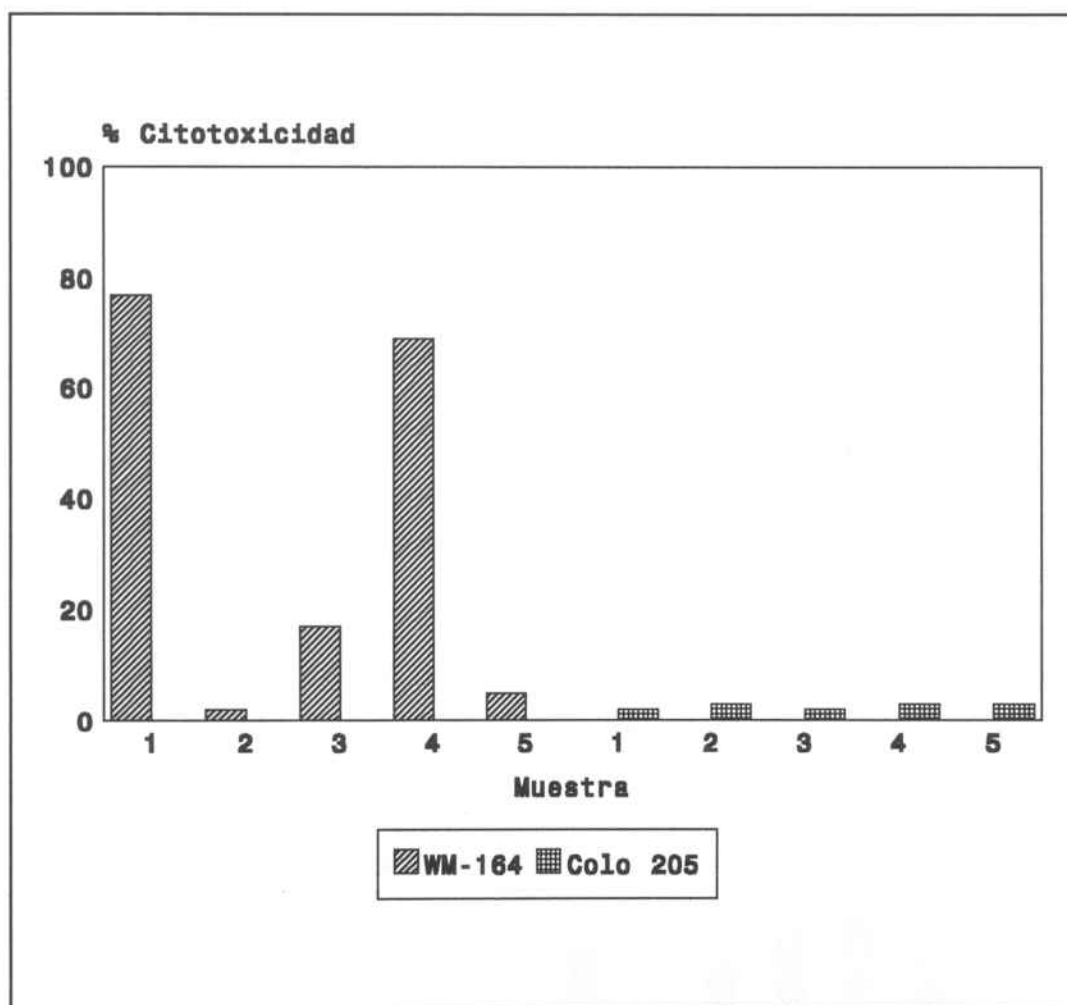
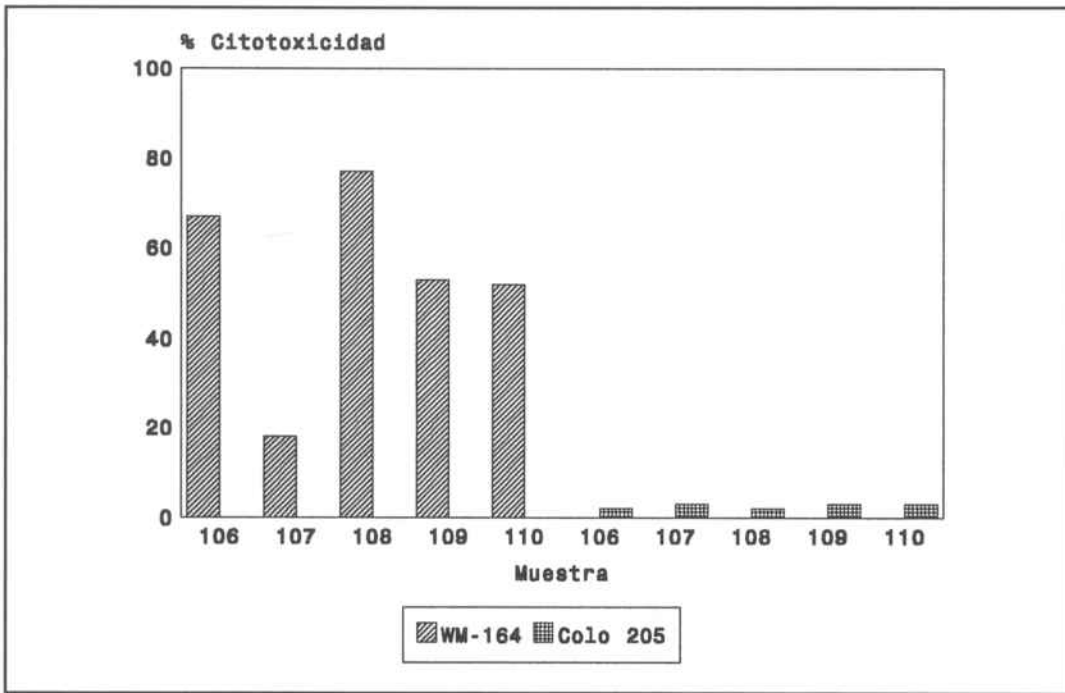


Fig 45 : Respuesta citotóxica mediada por complemento *in vitro* anti-WM-164 de los antisueros anti-GD3 obtenidos mediante inmunización con liposomas de colesterol : fosfatidilcolina : GD3 (47,5:47,5:5).

Liposomas de Fosfatidilcolina-Colesterol-Dicetilfosfato-GD3 (40:40:10:10) : Solo uno de los sueros ensayados mostró una actividad citotóxica significativa, superior al 10%. Este suero es el mismo que muestra un mejor nivel de especificidad.

Liposomas de Esfingomiolina-Colesterol-Dicetilfosfato-GD3 (40:40:10:10) : A excepción del suero que mostró una baja especificidad, el resto de los sueros mostró una actividad citotóxica elevada (Fig. 46).

Ninguno de los sueros de animales inmunizados con GD3-Salmonella, GD3-Bordetella,



Figs 46 : Citoxocidad mediada por complemento tras la inmunización con liposomas de colesterol: esfingomielina : dicetilfosfato : GD3 (40:40:10:10).

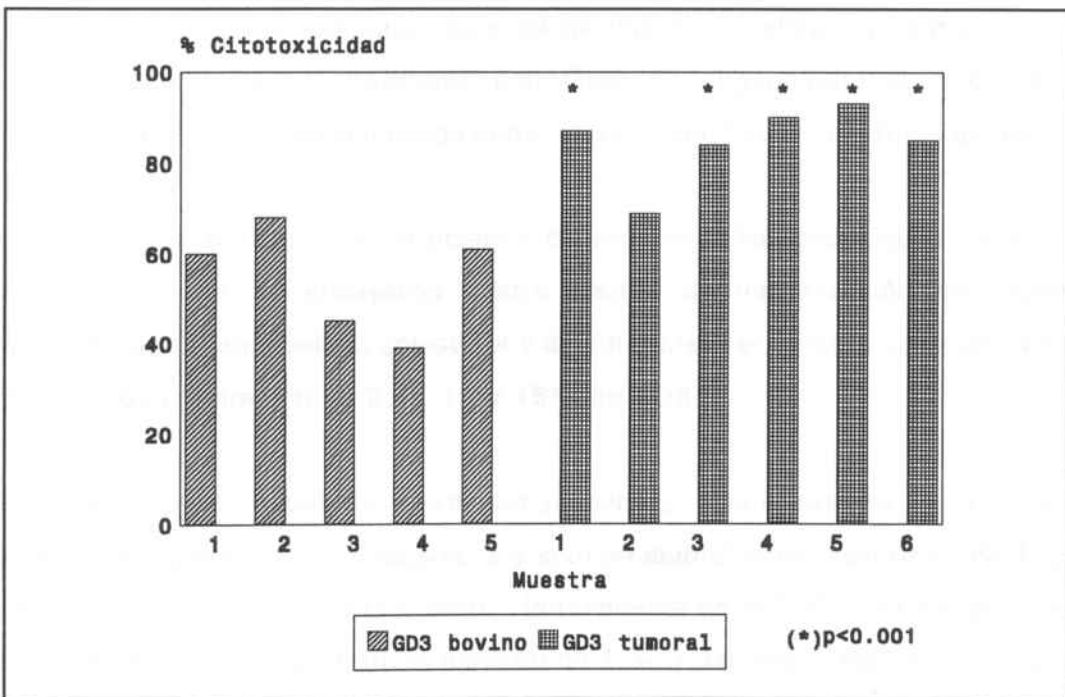


Fig 47 : Citotoxicidad celular anticuerpo dependiente. Los liposomas con GD3 tumoral provocan una citotoxicidad significativamente superior ($p < 0.001$) que los liposomas con GD3 bovino.

GD3-FCA, Disialil-lactosa-BSA o con liposomas que contenían lípido A mostró actividad citotóxica alguna. Así mismo ninguno de los liposomas control que no contenían GD3 provocó respuesta citotóxica.

En todos los casos en que se detectó actividad citotóxica mediada por complemento esta fue específica anti-melanoma y la citotoxicidad residual dirigida contra otras células fue siempre inferior al 3% .

7.3.- CITOTOXICIDAD CELULAR MEDIADA POR ANTICUERPO (ADCC) : Los sueros de animales inmunizados con liposomas de esfingomielina : colesterol : dicetilfosfato : GD3, con independencia del origen del GD3, fueron analizados en cuanto a su capacidad de activar una respuesta celular de tipo citotóxico. No se analizaron los sueros de las otras pautas de inmunización dada la escasa presencia de respuesta mediante IgG.

En todos los casos los sueros se ensayaron por triplicado a una dilución de 1:100 frente a células de melanoma, línea WM-164, y células del teratocarcinoma PA-1, control negativo. Los resultados muestran que todos los sueros que muestran una respuesta mediante IgG poseen actividad citotóxica celular (Fig 47 siendo muchos mas citotóxicos los sueros de animales inmunizados con GD3 de origen tumoral ($p < 0.001$). La citotoxicidad frente a la línea empleada como control negativo nunca fue superior al 2%.

7.4.- EFECTO "CLUSTER" : Con el objetivo de analizar el llamado efecto "cluster" (Ver introducción teórica) se ensayaron cuatro pautas de inmunización con liposomas constituidos por esfingomielina, colesterol y dicetil-fosfato en unas proporciones molares de 1:1:0,1 y que contenían un 2, 5, 10 y 15% de GD3.

Los resultados séricos obtenidos fueron los siguientes : Los liposomas que contenían un 2,5% de GD3 apenas son inmunogénicos y solo un animal mostró un título de 1:20. Los liposomas con un 5% de GD3 provocaron la respuesta en el 100% de los animales con un título mínimo de 1:50 y un título máximo de 1:320. La mejor respuesta fue obtenida por los liposomas que contenían un 10 y un 15% de GD3 con un título mínimo de 1:50 y un título máximo de 1:640 (Tabla XVII).

La respuesta citotóxica *in vitro* es siempre específica contra células de melanoma, pero

existe una correlación directa entre la concentración de GD3 en la membrana del liposoma y la capacidad citotóxica de los antisueros obtenidos. Así los liposomas que contenían un 2,5% de GD3 no provocan una respuesta sérica con actividad citotóxica, mientras que esta respuesta es débil para los liposomas con un 5% de GD3 y muy intensa si está provocada inmunizando con liposomas contienen un 10 y un 15% de GD3. Las diferencias entre estos dos últimos grupos no son significativas, mientras que las diferencias entre ambos grupos y los liposomas con un 5% de GD3 si son significativas ($p < 0,001$).

% GD3	Título sérico	% Citotoxicidad
2,5	1:20 (1)	0
5	1:50(2),1:150(2),1:320(1)	17
10	1:80(1),1:160(3),1:640(1)	67(*)
15	1:160(4),1:640(1)	68(*)

Tabla XVII : Resultados de la inmunización con liposomas-GD3. Efecto de la concentración de GD3 en el liposoma. (*) Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

8.- LIPOSOMAS CON GD3 TUMORAL VS. LIPOSOMAS CON GD3 NO TUMORAL

Una vez pudimos obtener una formulación lipídica que incrementaba fuertemente la inmunogenicidad del GD3 se procedió a determinar si las diferencias detectadas en las composiciones de las ceramidas del GD3 podían tener efecto sobre la inmunogenicidad del mismo, para ello se construyeron liposomas que tenían la misma composición lipídica pero contenían bien sea GD3 tumoral o bien GD3 de cerebro de vaca. La composición de estos liposomas era esfingomielina : colesterol : dicetil-fosfato : GD3 en las proporciones 40:40:10:10. La pauta de inmunización fue la descrita en material y métodos.

Los liposomas con GD3 bovino provocaron una respuesta sérica en el 100% de los animales con los siguientes títulos : 1:40 (1), 1:320 (2), y superior a 1:640 (2), por su parte los liposomas con GD3 de origen tumoral también provocaron una respuesta sérica en el 100% de los animales con unos títulos de 1:40 (1), 1:80 (1), 1:160 (1), 1:320 (1)

y superior a 1:640 (2). En ningún caso las diferencias entre ambos grupos son significativas. La respuesta fue, en ambos casos, muy específica detestándose algunas reacciones cruzadas con GD1a y GM3 (Fig. 48).

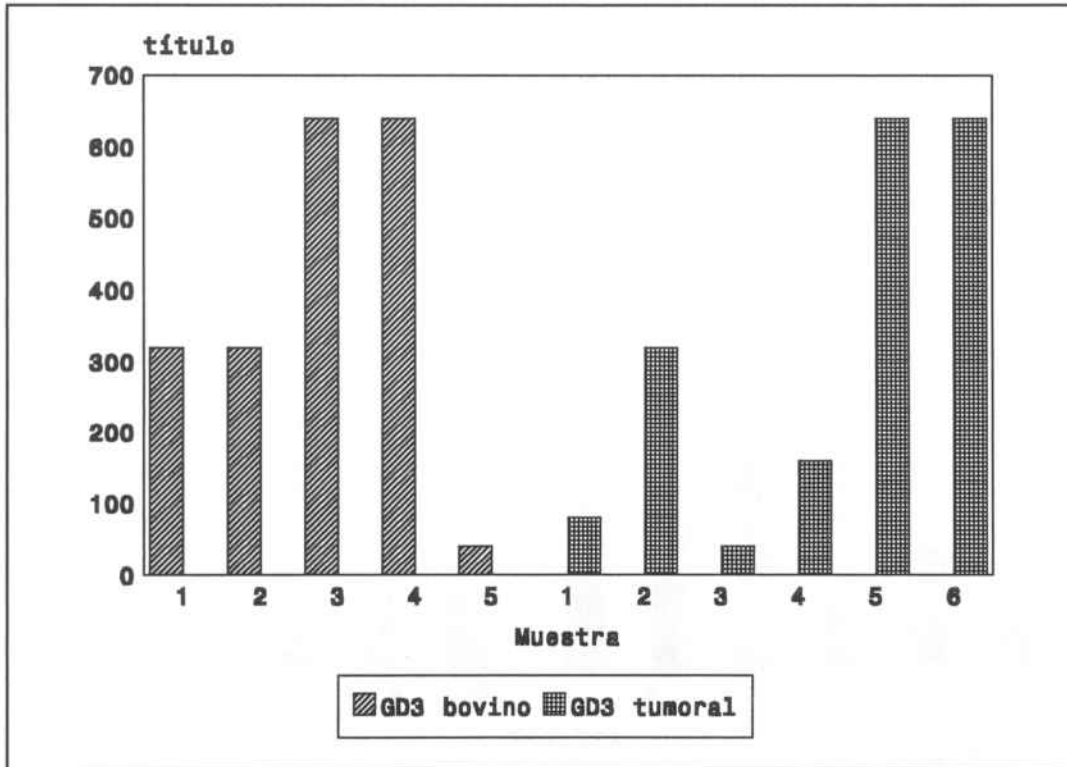


Fig 48 : Respuesta sérica determinada mediante ELISA. Inmunización con liposomas-GD3 de origen tumoral o bovino. No se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos.

El análisis de la respuesta citotóxica mediada por complemento se realizó con los sueros diluidos a 1:50 y mostró una citotoxicidad media del $54,3\% \pm 6,62$ para los liposomas con GD3 bovino, mientras que los liposomas con GD3 tumoral provocaban una lisis del $86,5\% \pm 4,63$. Las diferencias entre ambos grupos son altamente significativas ($p < 0,0005$) (Fig. 49).

9.-ANÁLISIS DEL ISOTIPO

En aquellos animales en los que se detectó una respuesta mediante IgG se analizó la subclase de IgG que aparecía. Los resultados indican que si la respuesta es inespecífica

se observa un incremento general en todos los isotipos de la IgG, mientras que si la respuesta es específica la respuesta inducida por liposomas es mediante IgG3, mientras que si la respuesta es inducida por una glicoproteína sintética el isotipo presente es IgG1 con una ligera presencia de IgG2a .

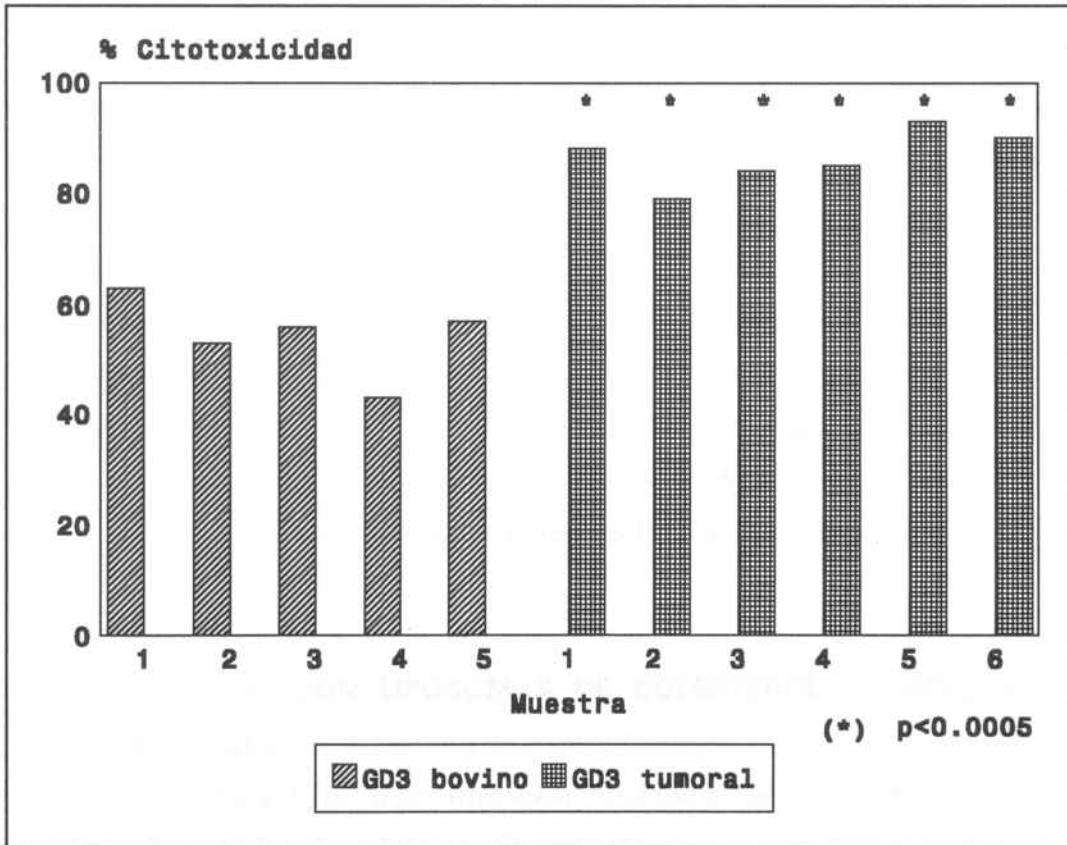


Fig 49 : Citotoxicidad *in vitro* anti-WM-164 inducida por los antisueros anti-GD3 obtenidos mediante inmunización con liposomas-GD3 de origen bovino o tumoral. El GD3 de origen tumoral provoca una citotoxicidad significativamente superior ($p < 0.0005$).

10.- CINÉTICA DE LA RESPUESTA Y APARICIÓN DE MEMORIA INMUNOLÓGICA

En todos los protocolos de inmunización se extrajo sangre 8 días después de las inmunizaciones primera, tercera y sexta con el objetivo de analizar la cinética de la respuesta. Así mismo se diseñó expresamente un protocolo a largo término con el objetivo de determinar la existencia de memoria inmunológica. Sin embargo los protocolos mejor analizados, en cuanto a la cinética de la respuesta, fueron los protocolos en que se inmunizó con células de melanoma, liposomas con esfingomielinina : colesterol : dicetil-

fosfato : GD3, fosfatidilcolina:colesterol:dicetilfosfato:GD3 y disialil-lactosa, así como el protocolo a largo término.

10.1.- INMUNIZACIÓN CON CÉLULAS DE MELANOMA : Después de la primera dosis solo se detectó respuesta en un animal y con un título de 1:40 de IgM. Después de la tercera dosis se detectó respuesta en el 66% de los animales con títulos que oscilaban entre 1:40 y 1:160 de IgM, siendo imposible detectar respuesta mediante IgG. Al finalizar el protocolo de seis dosis el 33% de los animales seguían sin dar ningún tipo de respuesta, mientras que los animales que respondieron lo hicieron con títulos que oscilaban entre 1:80 y 1:320 de IgM, solo dos animales dieron respuesta con un título de 1:20 de IgG.

10.2.- INMUNIZACIÓN CON LIPOSOMAS DE COLESTEROL : FOSFATIDILCOLINA : DICETILFOSFATO : GD3 : Después de la primera inmunización respondieron 4 animales con un título en IgM de 1:20. A la tercera dosis se detectó respuesta en el 100% de los animales con títulos entre 1:20 y 1:80, un animal mostró un título de 1:20 en IgG. Finalmente después de las seis inmunizaciones los títulos se situaron entre 1:20 y 1:160 de IgM y un animal poseía 1:20 de IgG.

10.3.- INMUNIZACIÓN CON LIPOSOMAS DE COLESTEROL : ESFINGOMIELINA : DICETILFOSFATO : GD3 : A la primera dosis respondieron 4 animales de un total de seis con títulos entre 1:20 y 1:80, a las tres dosis respondían el 100% de los animales con títulos entre 1:80 1:640 para la IgM y el 50% de los animales mostró títulos de 1:40 para la IgG. Después de seis inmunizaciones los títulos se situaron entre 1:80 y 1:1280 para la IgM y entre 1:40 y 1:100 para la IgG.

10.3.- INMUNIZACIÓN CON DISIALIL-LACTOSA-BSA : Las inmunizaciones con glicoproteína sintética mostraron un incremento mas rápido de los títulos séricos, estos llegaron a 1:160 en IgM después de la primera dosis y se mantuvieron siempre a este nivel, por lo que respecta a la IgG fueron de 1:80 después de la primera dosis, entre 1:80 y 1:1280 después de tres dosis y entre 1:320 y 1:1280 después de seis dosis.

10.4.- INMUNIZACIÓN A LARGO TÉRMINO : Los resultados descritos anteriormente permitían suponer la existencia de una memoria inmunológica, aunque no era descartable que los títulos de 1:640 y superiores que se detectaron al finalizar las pautas de

inmunización pudiesen ser debidos a una simple acumulación de anticuerpos circulantes, para ello se inmunizó un lote de cinco animales con tres dosis quincenales de liposomas-GD3 y se les administró una cuarta dosis después de 90 días de descanso. Estos animales fueron sangrados 8 días después de las inmunizaciones primera, tercera y cuarta y el mismo día de la inmunizaciones primera y cuarta.

Los resultados de esta pauta de inmunización se sumarizan en la figura 50, siendo importante destacar que después de tres dosis los títulos oscilaban entre 1:40 y 1:1280 de IgM y 1:40 y 1:160 de IgG, el título bajaba a cero antes de la cuarta dosis y volvía a ascender a niveles entre 1:40 y 1:1280 a los ocho días de la cuarta inmunización.

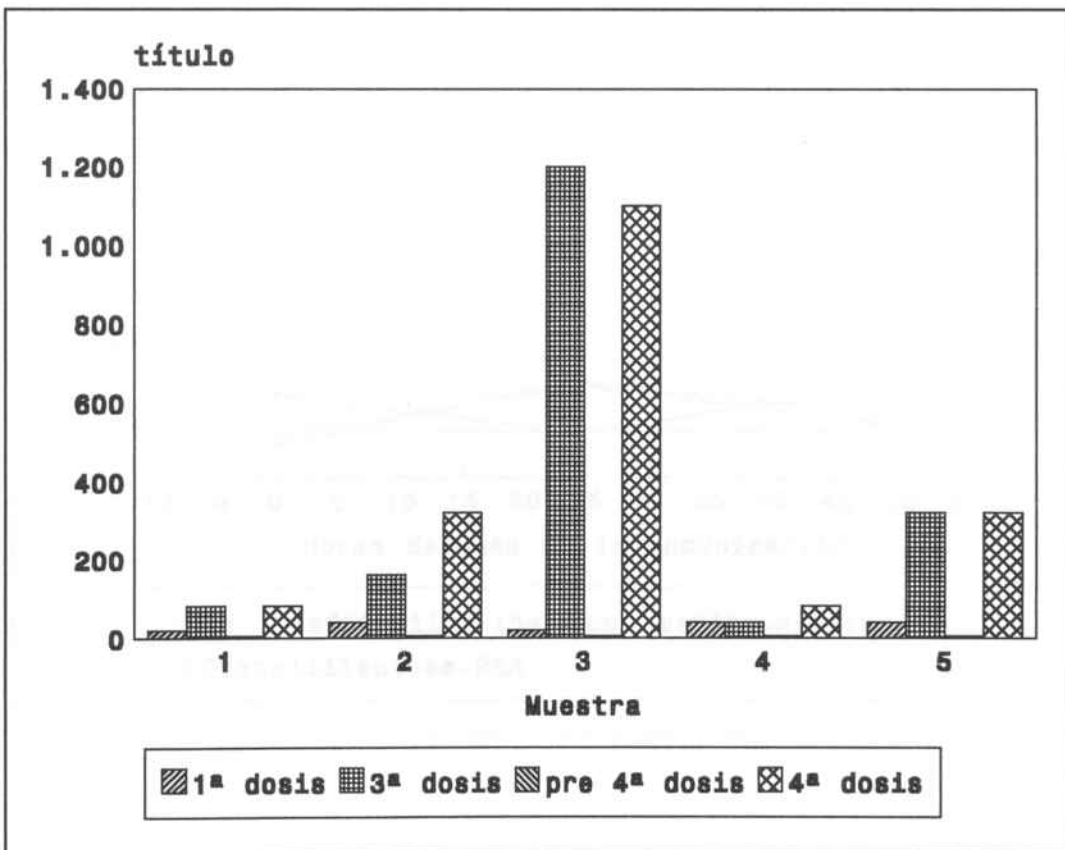


Fig 50 : Inmunización a largo término. El título sérico es nulo con anterioridad a la última dosis y asciende hasta valores equivalentes a los títulos posteriores a la tercera dosis ocho días después de la dosis de recuerdo.

11.- MODELOS DE RESPUESTA CELULAR T

11.- HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA : En ninguna de las distintas pautas de inmunización ensayadas fue posible detectar inflamación debida a mecanismos de hipersensibilidad retardada. Es de destacar que en los animales primados con la glicoproteína sintética disialil-lactosa-BSA y reinmunizados con liposomas, con ambos tipos, se produjo una ligera inflamación a las 24 horas de la reinmunización, pero en ningún caso esta inflamación fue estadísticamente significativa (fig 51).

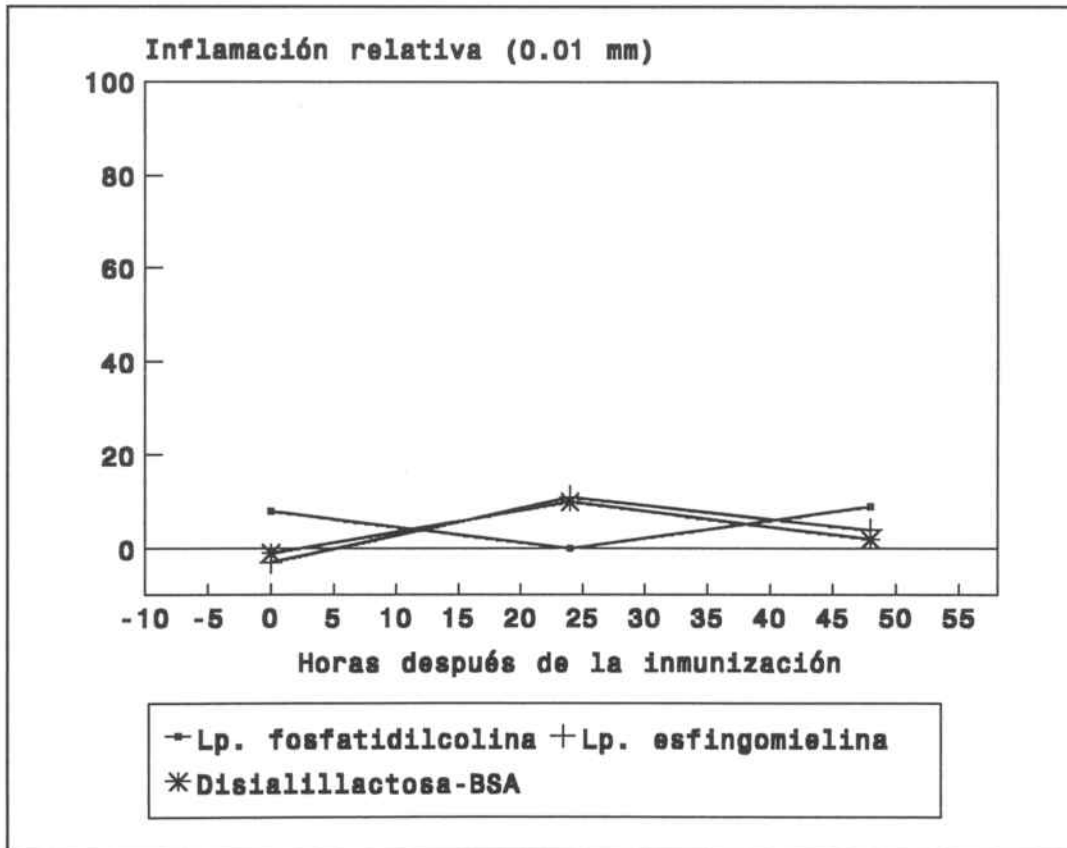


Fig 51 : Reacción de hipersensibilidad retardada . Los animales se primaron con liposomas-GD3 y se reinmunizaron a los 11 días tal como se indica en la figura. En ningún caso se detectó una reacción positiva.

11.2.- RESPUESTA EN RATONES ATÍMICOS : La inmunización con liposomas de colesterol : esfingomielina : dicetilfosfato : GD3 produjo una respuesta en el 100 % de los

animales ensayados, con títulos que oscilaban entre 1:80 y 1:620 en IgM, dos animales produjeron respuesta mediante IgG3 con un título de 1:50.

El grupo control con animales normales mostró respuesta en el 100 % de los animales con títulos en IgM que iban desde 1:80 hasta 1:1240, mientras que tres animales dieron respuesta con IgG3 con un título de 1:100. En ningún caso las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas ($p > 0,001$).

V.- Discusión

DISCUSIÓN

En la introducción teórica de la presente memoria se ha puesto de manifiesto la existencia de una respuesta inmunológica específica frente a la célula tumoral y se han revisado los distintos tipos de antígenos que pueden vehicular dicha respuesta. De estos datos se desprende una conclusión : Ciertamente existe una respuesta inmunológica frente a la célula tumoral, pero, con la excepción de los antígenos de rechazo, no se ha descrito la existencia de antígenos tumorales específicos capaces de dirigir esta respuesta. Sin embargo, si existen antígenos que se presentan asociados a la célula tumoral, siendo posible inducir una respuesta inmunológica contra estos antígenos.

Los resultados obtenidos de la aproximación experimental propuesta muestran que el empleo de liposomas de esfingomiolina : colesterol : dicetilfosfato : GD3 provoca una intensa respuesta humoral capaz de activar, *in vitro*, tanto la respuesta citotóxica dependiente de complemento, como la respuesta citotóxica celular frente a células tumorales que expresan GD3. Esta respuesta es sumamente específica y es mucho mas efectiva si empleamos GD3 de origen tumoral en la manufactura de los liposomas que si empleamos GD3 de origen no tumoral. Se trata de una respuesta T-independiente capaz de activar la aparición de memoria inmunológica. Por otra parte el empleo de antígenos sintéticos, si bien provoca una respuesta humoral intensa, los antisueros obtenidos ni reconocen células de melanoma ni activan los mecanismos efectores citotóxicos que destruyen la célula tumoral.

La inmunoterapia con antígenos de tipo polisacárido se inició en los años treinta (417) con inmunizaciones con pneumococos con el objetivo de inducir resistencia a la neumonía. Los resultados obtenidos provocaron la aparición de gran cantidad de trabajos entre los años 30 y 50, todos estos estudios culminaron en 1945 con un estudio de inmunización con polisacáridos de la cápsula de pneumococos. Los pacientes inmunizados eran resistentes a la infección, mientras que los pacientes del grupo control no lo eran. Es en estos trabajos en donde nace la idea de una inmunización preventiva y protectora con antígenos no proteicos.

En general los antígenos de tipo carbohidrato son antígenos de tipo T-independiente que provocan una respuesta inmunológica débil, generalmente mediante IgM y que muchas veces no son capaces de activar la aparición de memoria inmunológica (418).

El concepto de antígeno T-independiente nace de la observación que ratones timectomizados neonatalmente retienen la capacidad de desarrollar una respuesta sérica frente a moléculas poliméricas de gran tamaño (419,420). Este tipo de respuesta se ha reproducido en ratones atímicos nu/nu. Los antígenos de este tipo resultan ser cadenas polimerizadas formadas por repeticiones mas o menos largas de unidades monoméricas. Los dos antígenos T-independientes típicos son los polisacáridos bacterianos y los polímeros de D-aminoácidos, así como polímeros sintéticos como la poliacrilamida, el polivinilo o la pirrolidona, por otra parte la unidades monoméricas de estos polímeros no son inmunogénicas.

Se han descrito dos tipos de antígenos T-independientes. Los antígenos T-independientes de tipo 1 que poseen una elevada capacidad mitogénica *in vitro* y que provocan una intensa respuesta tanto en IgM como en IgG, pero de una baja especificidad, y los antígenos T-independientes de tipo 2, con una baja capacidad mitogénica y que provocan una respuesta intensa mediante IgM y una débil respuesta con IgG, especialmente IgG3 en ratones (421) e IgG2 en el hombre (422) ambas respuesta pueden ser altamente específicas (423,424). La estructura general de los antígenos de tipo 2 se corresponde con los polímeros descritos anteriormente.

En general la respuesta a estos antígenos es débil con un pico inicial después de la primera inmunización y una disminución en la intensidad de la respuesta a lo largo de semanas o incluso meses. La respuesta de los ratones nu/nu a los antígenos T-independientes de tipo 2 es igual, o incluso superior, a la respuesta obtenida en los animales tímicos. Esta diferencia es debida a la ausencia de una respuesta reguladora auto-anti-idiotípica T-dependiente (425). Así mismo en estas respuestas no se observa una maduración en la afinidad y avidéz de los anticuerpos (426).

Los antígenos T-independientes no inducen competencia antigénica (427) y su respuesta es difícilmente potenciada mediante el uso de los adyuvantes convencionales existiendo una gran cantidad de resultados negativos que permanecen sin publicar. Una excepción

lo constituye el efecto de la cápsula de *Corynebacterium parvum* que amplifica considerablemente la respuesta a DNP-levano (428,429), mientras que el adyuvante completo e incompleto de Freund o el de *Bordetella pertussis* son absolutamente ineficaces.

Por lo que respecta a la interacción entre antígenos T-independientes y los linfocitos T existe gran controversia en si estos antígenos son capaces de interactuar con la célula T, aunque en general se acepta que si existe interacción, esta no se produce en asociación con moléculas de clase II del sistema principal de histocompatibilidad (430). Por otra parte no se ha descrito la inducción de células T de memoria, por el contrario si se ha descrito la inducción de células B de memoria (431), aunque en algunos casos se precisa de la existencia de un carrier T-dependiente. En ningún caso se ha descrito la presencia de reacciones de hipersensibilidad retardada .

Recientemente se ha publicado un trabajo (430) en que se estudia, entre otros antígenos, la posible unión de GM1 a marcadores de clase I de sistema H2 del ratón presentando resultados negativos. Se han publicado algunos trabajos en donde se describe la obtención de clones T-citotóxicos frente a gangliósidos (432), la obtención de reacciones de DTH frente a antígenos sintéticos de naturaleza glucídica (433) o frente a polisacáridos y peptidoglicanos bacterianos (434). Sin embargo hay que tener en cuenta que en todos estos casos el antígeno ha sido presentado a la célula T mediante un transportador proteico. No se ha encontrado ningún trabajo que describa la interacción de gangliósidos con la célula T bajo la restricción del sistema principal de histocompatibilidad.

Es evidente que los gangliósidos en forma soluble no poseen la estructura polímera necesaria para poder ser asimilados a la estructura típica de los antígenos T-independientes de clase 2, ahora bien esta estructura si que podría presentarse cuando los gangliósidos están anclados en la membrana plasmática formando clusters.

Diversos autores han descrito que los gangliósidos no se distribuyen de forma homogénea en la superficie de la célula.

Tettamanti ha descrito la existencia de una distribución heterogénea de los gangliósidos en la superficie de liposomas en función de dos variables. En primer lugar la rigidez del

liposoma y en segundo lugar la longitud de la ceramida del gangliósido (435). Se ha descrito que los gangliósidos con ceramidas más largas y fosfolípidos con una mayor temperatura de transición dan lugar a membranas más rígidas en donde los gangliósidos no se distribuyen al azar y tampoco pueden desplazarse libremente por las mismas, así mismo la presencia de iones calcio maximaliza este efecto (436). El grupo de Cheresh y Reisfeld describen que en células de melanoma humano tanto el GD2 como el GD3 no se distribuyen homogéneamente en la superficie celular sino que forman agrupaciones o clusters (202). Hakomori postula que las diferencias entre las ceramidas pueden afectar tanto a la inmunogenicidad como a la cripticidad de los glicolípidos de membrana (437).

En nuestro caso las fotografías realizadas mediante microscopía electrónica muestran que los gangliósidos no se distribuyen de forma homogénea por la superficie del liposoma, sino que se agrupan en determinadas zonas de la misma, mientras que otras partes del liposomas están exentas de marcaje.

El análisis de las ceramidas muestra que existen diferencias importantes en la composición de las mismas. Mientras que el GD3 extraído del cerebro posee cerca del 80% del total de sus ceramidas con cadenas de 18 y 20 átomos de carbono, el GD3 extraído de células tumorales muestra una mayor heterogeneidad con ceramidas considerablemente más largas y otras más cortas. Estos datos están en consonancia con otros publicados en la bibliografía. Tettamanti describe que hasta un 65% de las ceramidas cerebrales poseen cadenas insaturadas con 18 y 20 átomos de carbono, si bien esta proporción varía algo con la edad (438). El análisis de las ceramidas presentes en los gangliósidos de melanoma muestra importantes alteraciones, entre las que destacaremos una mayor longitud, grado de insaturación y la presencia de α -hidroxi-ácidos. Estos datos también se han descrito en otros tumores como linfoma y adenocarcinoma de colon (439).

En 1983 el grupo de Kannagi y cols. (440) publicaron que el globósido Gg₃Cer presente en linfoma murino L5178Y poseía diferentes capacidades inmunogénicas en función de la longitud de sus ceramidas. Ceramidas con cadenas cortas provocan una mayor cripticidad del antígeno expuesto en la membrana plasmática, mientras que ceramidas más largas incrementan la inmunogenicidad del gangliósido. Este efecto se incrementa si coexisten en una misma superficie glicolípidos con ceramidas cortas y largas juntamente con glicoproteínas de elevado peso molecular. Así mismo la presencia de alfa-hidroxi-

ácidos en las ceramidas crea interacciones entre ellas facilitando la formación de clusters.

Las proporciones entre los distintos lípidos empleados en los liposomas también pueden alterar la rigidez de su membrana y la facilitar o dificultar el libre movimiento de los gangliósidos a través de la misma. Los liposomas de esfingomielina han mostrado una inmunogenicidad muy superior a los liposomas de fosfatidilcolina, así mismo la conjunción entre la esfingomielina y el GD3 de origen tumoral ha incrementado significativamente este efecto. Este hecho puede explicarse por la mayor temperatura de transición de la esfingomielina, 32 grados centígrados, con respecto a la fosfatidilcolina, -7 grados (252). En la introducción teórica se ha descrito que los fosfolípidos con temperaturas de transición mas altas confieren mas rigidez al liposoma. Por otra parte la asociación de gangliósidos con fosfolípidos confiere una mayor resistencia al liposoma y evita su captación por el sistema retículo endotelial (441), ello provoca que los liposomas sean mas estables y con un aclaramiento mas lento, este efecto podría potenciarse inmunizando por vía subcutanea o intramuscular (442). Por otra parte la existencia de ceramidas de una mayor longitud provoca una mayor interacción con los fosfolípidos, creando dificultades para el libre desplazamiento de los gangliósidos a través de la bicapa lipídica y facilitando la formación de *clusters* de gangliósidos.

La respuesta inmunológica detectada en nuestro modelo se ajusta perfectamente a la respuesta típica de un antígeno T-independiente de clase 2, con una respuesta mediante IgM e IgG3, existencia de memoria inmunológica, falta de potenciación mediante adyuvantes y sin diferencias significativas entre ratones atímicos y ratones normales.

El hecho de que la respuesta sea T-independiente puede despejar una incógnita existente en el planteamiento de la respuesta inmunológica anti-tumoral. En la introducción teórica se ha descrito que la célula tumoral precisa del reconocimiento por parte del macrófago para ser eliminada, ahora bien este reconocimiento solo puede tener lugar en el caso de la existencia de anticuerpos que se unan a la célula tumoral, o bien dentro de la restricción por parte del sistema principal de histocompatibilidad, pero la célula tumoral pierde rápidamente los marcadores del MHS y no se ha descrito inmunidad natural frente a la célula tumoral. Este circulo vicioso puede romperse con la activación T-independiente del sistema inmune, esta activación puede proporcionar los anticuerpos necesarios para facilitar el reconocimiento del tumor por parte del macrófago. Por otra parte este

reconocimiento mediante anticuerpos se realizaría de forma específica.

De las dos aproximaciones que han proporcionado una respuesta sérica mas intensa, es decir los liposomas y las neoglicoproteínas sintéticas, solo los liposomas han sido capaces de provocar una respuesta efectiva que reconozca a la célula tumoral, mientras que las neoglicoproteínas sintéticas, si bien provocan títulos séricos elevados, la respuesta no muestra ninguna actividad anti-tumoral. Dos razones pueden explicar este fenómeno, en primer lugar las neoglicoproteínas sintéticas se han obtenido conjugando la parte glucídica del gangliósido con un carrier proteico por el método de la aminación reductiva. Esta conjugación provoca que la glucosa del extremo reductor se rompa y el anillo se abra formándose un neoantígeno muy reactivo (404), este neoantígeno puede alterar la especificidad de los anticuerpos. Existe una segunda razón para explicar esta falta de reconocimiento celular. En esta misma discusión se ha descrito que los gangliósidos de la célula tumoral forman clusters o agrupaciones en la membrana celular, estos clusters obligan a que los glicolípidos estén muy próximos entre si creándose repulsiones entre ellos, esto es especialmente importante si tenemos en cuenta que el ácido siálico es una molécula cargada negativamente a pH neutro y muy reactiva que puede crear una excesiva rigidez en la parte mas externa del gangliósido, así mismo esta rigidez anula completamente la libertad de giro que posee el enlace glicosídico $\alpha(1 \rightarrow 1)$ entre el extremo reductor del polisacárido y la ceramida. Ello provocaría que la parte glucídica del gangliósido puede poseer una conformación espacial distinta en la neoglicoproteína a la que se encuentra en la superficie de la célula tumoral, mientras que el liposoma mimetiza completamente la disposición de los gangliósidos en la célula.

Dos datos desprendidos de nuestros resultados avalan la segunda razón propuesta. En primer lugar el resultado de las inmunizaciones realizadas con liposomas que poseen distintas concentraciones de GD3. En estos protocolos de inmunización se ha visto que los liposomas con bajas concentraciones de GD3 si bien inducen respuesta sérica, esta respuesta es incapaz de reconocer a la célula tumoral, por el contrario los liposomas que poseen un mínimo de un 10% de GD3 provocan una respuesta altamente citotóxica frente a las células de melanoma. En segundo lugar la mayor citotoxicidad mostrada por los liposomas que contienen GD3 de origen tumoral y las ceramidas aberrantes detectadas en este gangliósido también nos hacen pensar que la ceramida juega un importante papel en la inmunogenicidad del gangliósido y, además, facilita la formación de *clusters* que

provocan alteraciones estéricas en la molécula de gangliósido.

Existe otro resultado que puede abonar más la teoría de las modificaciones estéricas. Los resultados del ensayo de antigenicidad de los liposomas con GD3 cerebral y tumoral, muestran que cuando el GD3 se ensaya inmovilizado a bajas concentraciones sobre placas de ELISA no existen diferencias entre la reactividad de ambas moléculas, ahora bien cuando el ensayo se repite con el GD3 inmovilizado en la superficie de liposomas las diferencias entre ambas reactividades son altamente significativas en favor de una mayor antigenicidad del GD3 de origen tumoral. No hay que olvidar que los anticuerpos monoclonales empleados en estos ensayos se obtuvieron partiendo de inmunizaciones con células de melanoma.

En la bibliografía se ha encontrado un trabajo en donde se describe una correlación entre la densidad de GM3 en liposomas y su antigenicidad de forma que los liposomas con una mayor antigenicidad son los que contienen un 9% de GM3 en su composición (443).

Todos los datos discutidos hasta el momento parecen indicar que los gangliósidos se expresan en la membrana de la célula tumoral formando agrupaciones o *clusters* que alteran su configuración espacial, esta alteración provoca una mayor antigenicidad del gangliósido y su comportamiento con activador del linfocito B sin la necesaria colaboración de los linfocitos T.

En la bibliografía se han descrito diversas aproximaciones del problema de la inmunización con gangliósidos. Las distintas aproximaciones empleadas se centran en la conjugación del gangliósido a *Salmonella minesotta*. En general esta estrategia logra una respuesta débil con títulos máximos de 1:320 en IgM y 1:80 en IgG, en ningún caso se describe una respuesta en el 100% de los animales (444-446). En uno de estos trabajos se emplean liposomas de fosfatidilcolina:colesterol:dicetil-fosfato:GM2 con y sin monofosforil-lípido A logrando unos títulos séricos máximos de 1:40 (446). En todos los estudios se coincide en la ausencia de respuesta a la inmunización con gangliósidos en forma soluble, con y sin adyuvantes. A diferencia de estos resultados nuestra estrategia incrementa los títulos séricos hasta 1:1200 en IgM y 1:100 en IgG, así mismo se incrementa considerablemente el efecto citotóxico con el empleo de GD3 de origen tumoral y se logra inducir respuesta en el 100% de los animales. En ningún caso se ha encontrado descrita la activación de

la citotoxicidad celular anticuerpo dependiente.

No se han encontrado trabajos en los que se utilice la conjugación de gangliósidos a proteínas, pero si se han encontrado resultados en los que se describe la obtención de anticuerpos monoclonales contra otros tipos de glicolípidos conjugados a proteínas. En el año 1980 se describió el uso de diversos glicolípidos sintéticos conjugados a transportadores proteícos para la obtención de anticuerpos monoclonales. Los conjugados son altamente inmunogénicos pero los anticuerpos obtenidos no reconocen ninguna línea celular (447). Posteriormente se ha descrito la obtención de anticuerpos monoclonales contra los antígenos P y P_k, antígenos asociados a tumores linfoides, mediante neoglicoproteínas sintéticas (448,449). La afinidad de los anticuerpos obtenidos es muy alta en comparación con las afinidades obtenidas mediante la inmunización con glicolípidos naturales, pero el reconocimiento de líneas celulares que expresan los antígenos P y P_k es confuso y no se describe la capacidad citotóxica de estos anticuerpos (450). Estos datos concuerdan con la imposibilidad mostrada por los antiseros inducidos mediante disialil-lactosa-BSA en reconocer células de melanoma.

Diversos trabajos indican que la modificación química de los gangliósidos incrementa considerablemente su inmunogenicidad. Estas modificaciones incluyen la utilización de lactonas de GM3 (451), lactonas de GD3, GD3 amida y Acetil-GD3 sintético (452). La inmunización de ratones con lactonas de GM3 provoca una intensa respuesta sérica contra el antígeno inmunizante y también contra el GM3 nativo. Resultados idénticos se han obtenido inmunizando con lactonas de GD3. En este último caso se describe el reconocimiento de células de melanoma por parte de los antiseros obtenidos, aunque no se aportan datos acerca de su citotoxicidad (452).

Lamentablemente, tal y como se describe en la introducción teórica, ninguna de las aproximaciones ensayadas en ratones ha conseguido inducir respuesta anti-GD3 en pacientes de melanoma. En el hombre el GM1 es inmunogénico, el GD2 es débilmente inmunogénico y el GM3 no parece ser inmunogénico en absoluto. Se han publicado varios trabajos con los resultados de inmunizaciones con GM2 (381) por lo que su inmunogenicidad en el hombre está fuera de duda.

Contrastando con estos resultados se han publicado algunos trabajos en los que se afirma

la inmunogenicidad del GD3 en el hombre. El grupo de Yamaguchi describió en 1987 la existencia de anticuerpos anti-GD3 en el suero de pacientes de melanoma y obtuvieron un anticuerpo humano anti-GD3 mediante transformación de linfocitos B de sangre periférica con virus de Epstein-Barr (453). Con anterioridad a este trabajo se publicaron los resultados de un ensayo clínico de inmunización activa con extractos orgánicos de células de melanoma (379). En este trabajo se inmunizaron 26 pacientes de melanoma avanzado con extractos de tres líneas celulares de melanoma. La inmunización se realizó por vía intralinfática o intradérmica. Los pacientes recibieron 4 dosis durante 4 semanas seguidas de 4 dosis durante 2 meses y una inmunización final después de cuatro meses de la primera. En ningún caso fue posible detectar anticuerpos anti-GD3, pero sí que fue posible detectar anticuerpos anti-acetil-GD3. Las respuestas obtenidas mostraron un elevado poder citotóxico. Posteriormente se han publicado dos trabajos más reportando la respuesta anti-GD3 en pacientes de melanoma inmunizados con células inactivadas de melanoma (454).

Recientemente se han publicado los resultados de un estudio clínico multicéntrico de inmunización activa con GD3 en pacientes de melanoma en estadio libre de enfermedad (455). En este estudio se inmunizaron 32 pacientes con gangliósidos extraídos de células de melanoma, de los 32 pacientes inmunizados 12 lo fueron con liposomas de esfingomielina: colesterol:gangliósido en proporciones de 45:45:10. El protocolo de inmunización fue de tres dosis por semana durante tres semanas, un segundo ciclo idéntico después de tres semanas de descanso y una inmunización mensual hasta llegar a un año. Los resultados muestran que de los 32 pacientes inmunizados 17 mostraron respuesta específica anti-gangliósido, de estas 17 respuesta positivas, 7 fueron inducidas mediante liposomas. El 40% de las inmunizaciones con liposomas fracasaron. El análisis de la especificidad de la respuesta muestran que existe una respuesta muy intensa contra los gangliósidos mas minoritarios, GM2, GD2 y Acetil-GD3, pero también existe una respuesta específica anti-GM3 y anti-GD3. De estos resultados cabe destacar que la inmunogenicidad del Acetil-GD3 es extraordinariamente alta en comparación con su nivel de expresión y que ha sido posible detectar de forma clara la inmunogenicidad del GD3 en el hombre. Si bien no se aportan datos sobre la citotoxicidad de la respuesta si que se demuestra el reconocimiento específico de células de melanoma por parte de los antisueros obtenidos.

Existen diversas razones para explicar la aparente falta de inmunogenicidad del GD3 en el hombre, en primer lugar una gran mayoría de los estudios se han realizado inmunizando con el conjugado GD3-*Salmonella*, ello hace que la respuesta obtenida difícilmente reconozca células de melanoma y los anticuerpos pueden haber sido neutralizados por el GD3 sérico presente en los pacientes de melanoma (456), por otra parte este tipo de inmunización provoca una respuesta bastante inespecífica. Las dosis empleadas en muchas inmunizaciones son superiores a 100 μg /dosis, dosis que al tratarse de un antígeno T-independiente puede inducir tolerancia. Este dato puede ser de especial importancia en las inmunizaciones realizadas con lisados y extractos celulares totales, en donde la presencia mayoritaria del GD3 puede inducir tolerancia. En general hay que tener en cuenta que los antígenos T-independientes son mas inmunogénicos con dosis bajas que con dosis elevadas .

Dado el escaso número de resultados publicados y las diferentes aproximaciones empleadas es difícil obtener una conclusión general acerca de la inmunogenicidad del GD3 en el hombre, pero nos parece evidente que empleando una pauta de inmunización adecuada y una correcta presentación del antígeno es posible provocar una respuesta específica anti-GD3 en el hombre. Esta dispersión de datos es frecuente en los antígenos T-independientes, en donde son parámetros críticos la dosis del antígeno, la frecuencia en las inmunizaciones y la vía de inmunización empleada (457).

Un dato a tener en cuenta es la aparente falta de toxicidad neurológica de la respuesta anti-GD3 en ratones, todo y la elevada expresión de GD3 en la materia gris cerebral (458,459). Esta falta de toxicidad puede ser debida a dos factores. En primer lugar la existencia de la barrera hematoencefálica puede dificultar el acceso de los anticuerpos anti-GD3 al encéfalo (460), en segundo lugar puede ser una dato más acerca de las diferencias existentes entre la antigenicidad de los gangliósidos agrupados en clusters o sin agrupar. Es importante considerar que en ninguno de los estudios publicados, tanto en ratones como en el hombre, se reportan casos de toxicidad neurológica. Lo mismo sucede en los estudios de inmunización pasiva con anticuerpos anti-GD3.

VI.- Resumen y Conclusiones

RESUMEN Y CONCLUSIONES

A lo largo de los tres últimos años hemos llevado adelante una serie de ensayos para, por una parte adquirir la metodología necesaria para extraer, purificar e identificar antígenos de naturaleza glicolípídica que se presentan asociados a tumores, y por otra parte, desarrollar vehículos capaces de incrementar la escasa o nula inmunogenicidad de este tipo de antígenos.

Los distintos ensayos desarrollados a lo largo de este proyecto han demostrado que el GD3 incorporado en la membrana del liposoma incrementa su inmunogenicidad y su capacidad para inducir una respuesta inmunológica anti-tumoral. En efecto el GD3 presentado al sistema inmunológico insolubilizado en la superficie de los liposomas es significativamente más inmunogénico que cantidades iguales presentadas en forma de células o conjugadas con otros transportadores. Existen diferencias significativas en la inmunogenicidad de las distintas formulaciones de liposomas, existiendo una correlación positiva entre rigidez de la membrana del liposoma e inmunogenicidad del mismo.

Se ha demostrado la existencia de ceramidas aberrantes en los glicolípidos extraídos de las células tumorales. Estas ceramidas confieren un mejor anclaje del glicolípido en la superficie del liposoma y le confieren una mayor rigidez, provocando una mimetización de la célula tumoral, considerablemente más rígida que la normal, y una respuesta con una mayor capacidad citotóxica.

El empleo de neoglicoproteínas sintéticas formadas por un transportador proteico al que se ha unido la porción glucídica del antígeno, si bien ha provocado respuestas

inmunológicas intensas y específicas, los anticuerpos obtenidos son incapaces de reconocer células tumorales que expresan el antígeno en estudio. Este fenómeno podría ser explicado por el hecho que los glicolípidos se encuentran en la superficie de la célula tumoral agrupados en forma de "clusters" en zonas de muy alta expresión antigénica. Sin duda la formación de estos "clusters" provoca cambios conformacionales en los glicolípidos, cambios que se reproducen perfectamente en la superficie del liposoma, pero que no son reproducidos por las neoglicoproteínas sintéticas. Ello explica el hecho que los liposomas que contienen un 2,5% o un 5% de GD3 si bien provocan respuesta medible mediante ELISA, su capacidad citotóxica es escasa. La misma explicación es válida para el caso de las neoglicoproteínas sintéticas.

De los distintos protocolos ensayados durante este proyecto extraemos las siguientes conclusiones :

1.- Los antígenos de tipo carbohidrato asociados a tumores son inmunogénicos si se presentan adecuadamente al sistema inmunitario.

2.- La mejor respuesta anti-carbohidrato se ha obtenido presentando los antígenos bien en forma de neoglicoproteínas sintéticas, bien en forma de glicolípidos asociados a liposomas.

3.- La respuesta inmune obtenida después de la inmunización con neoglicoproteínas sintéticas, si bien es altamente específica no reconoce células tumorales que expresan el antígeno en estudio.

4.- La respuesta inmune obtenida en el caso de la inmunización con liposomas presenta una elevada especificidad y reconoce, in vitro, células tumorales que expresan el antígeno en estudio.

5.- La composición lipídica de los liposomas condiciona fuertemente la inmunogenicidad de los mismos, existiendo una correlación positiva entre la rigidez de su membrana y su inmunogenicidad.

6.- La inmunización con liposomas provoca la aparición sérica de anticuerpos capaces de activar in vitro respuesta citotóxica mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

7.- La actividad citotóxica de la respuesta esta en función de la concentración de glicolípidos en la membrana del liposoma.

8.- La respuesta inmunológica obtenida después de la inmunización con liposomas es de tipo T-independiente.

9.- La respuesta inmunológica obtenida después de la inmunización con liposomas es capaz de inducir memoria inmunológica.

10.- Los glicolípidos extraídos y purificados a partir líneas tumorales cultivadas in vitro muestran una mayor antigenicidad que los glicolípidos obtenidos a partir fuentes no patológicas.

11.- Los glicolípidos obtenidos a partir de células tumorales son mas inmunogénicos que los obtenidos de materiales no patológicos .

12.- Ambos tipos de glicolípidos se comportan de forma idéntica si están en solución pero su antigenicidad es distinta si están insolubilizados mediante liposomas.

13.- La existencia de ceramidas de mayor longitud y mayor grado de insaturación en los glicolípidos tumorales podría ser la responsable de su mayor inmunogenicidad y antigenicidad.

De todas estas conclusiones extraemos una conclusión general : La inmunización con liposomas puede representar una importante herramienta terapéutica para la inmunoterapia oncológica, aunque su empleo debe ser demostrado, primero en modelos in vivo y posteriormente mediante estudios clínicos.

VII.- Bibliografía

BIBLIOGRAFIA :

- 1.- RADY R.O.,FISHMAN P. BIOSYNTHESIS OF GLYCOLIPIDS IN VIRUS TRANSFORMED CELLS. BIOCHEM.BIOPHYS.ACTA (1974); 335 : 121- 148.
- 2.- RICHARDSON C.L.,BAKER S.R.,MORRE D.J.,KEENAN T.W. GLYCO - SPHINGOLIPID SYNTHESIS AND TUMORIGENESIS. A ROLE FOR THE GOLGI APPARATUS IN THE ORIGIN OF SPECIFIC RECEPTOR MOLECULES OF THE MAMMALIAN CELL SU BIOCHEM.BIOPHYS.ACTA (1975); 417 : 175- 186.
- 3.- OSENFELDER G.,YOUNG W.W.,HAKOMORI S.I ASSOCIATION OF THE GLYCOLIPID PATTERN WITH ANTIGENIC ALTERATION IN MOUSE FIBROBLASTS TRANSFORMED BY MURINE SARCOMA VIRUS. CANCER RESEARCH (1977); 37 : 1333- 1339.
- 4.- GAHMBERG C.G.,HAKOMORI S.I. SURFACE CARBOHYDRATES OF HAMSTER FIBROBLASTS. I.- CHEMICAL CHARACTERIZATION OF SURFACE LABELLED GLYCOSPHINGOLIPIDS AND A SPECIFIC CERAMIDE TETRASAC J.BIOL.CHEMISTRY (1975); 250 : 2438- 2446.
- 5.- LOKNEY M.W.,SOLTYSIAK R.M.,SWEeley C.C. GLYCOLIPID N-ACETYL GALACTOSAMINYLTRANSFERASE ACTIVITY IN NORMAL AND KIRSTEIN MURINE SARCOMA VIRUS TRANSFORMED BALB/C 3T3 CELLS. NEW VISTAS IN GLYCO ADV.EXP.MED.BIOL.MONOG. (1982); 152 : 139- 147.
- 6.- HOLMES E.H.,HAKOMORI S.I. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NEW FUCO-GANGLIOSIDE ACCUMULATED IN PRECANCEROUS RAT LIVER AND IN RAT HEPATOMA INDUCED BY N-ACETYLAMINOFLUORENE J.BIOL.CHEMISTRY (1983); 257 : 7698- 7703.
- 7.- HOLMES E.H.,HAKOMORI S.I. ENZYMATIC BASIS FOR CHANGES IN FUCOGANGLIOSIDE DURING CHEMICAL CARCINOGENESIS : INDUCTION OF A SPECIFIC ALFA-FUCOSILTRANSFERASE. J.BIOL.CHEMISTRY (1983); 258 : 3706- 3713.
- 8.- HAKOMORI S.,TEATHER C.,ANDREWS H.D. ORGANIZATIONAL DIFFERENCE OF CELL

SURFACE OF HEMATOSIDE IN NORMAL AND VIRALLY TRANSFORMED CELLS. BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1968); 33 : 563- 568.

9.- TSUCHIYA S.,HAKOMORI S. CELL SURFACE GLYCOLIPIDS OF TRANSFORMED NIH 3T3 CELLS TRANSFECTED WITH DNAS OF HUMAN BLADDER AND LUNG CARCINOMAS. EMBO J. (1983); 2 : 2323- 2326.

10.- HAKOMORI S.,KANNAGI R. GLYCOSPHINGOLIPIDS AS TUMOR ASSOCIATED AND DIFFERENTIATION MARKERS. J.NATL.CANCER INST. (1983); 71 : 231- 251.

11.- SUNDSMO J.,HAKOMORI S. LACTO-N-TETRAOSYLCERAMIDE (PARAGLOBOSIDE) AS A POSSIBLE TUMOR ASSOCIATED SURFACE ANTIGEN OF HAMSTER NIL_{py} TUMOR. BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1976); 68 : 799- 806

12.- BUCK C.A.,GLICK M.C.,WARREN L. A COMPARATIVE STUDY OF GLYCOPROTEIN FROM THE SURFACE OF CONTROL AND ROUS SARCOMA VIRUS TRANSFORMED HAMSTER CELLS. BIOCHEMISTRY (1970); 9 : 4567- 4576.

13.- WARREN L.,BUCK C.A.,TUSZYNDKI G.P. GLYCOPEPTIDE CHANGES AND MALIGNANT TRANSFORMATION. A POSSIBLE ROLE FOR CARBOHYDRATE IN MALIGNANT BEHAVIOR. BIOCHEM.BIOPHYS.ACTA (1978); 516 : 97- 123.

14.- OGATA S.,MURAMATSU T.,KOBATA A. NEW STRUCTURAL CHARACTERISTIC OF THE GLYCOPEPTIDES FROM TRANSFORMED CELLS. NATURE (1976); 259 : 580- 582.

15.- TAKASAKI S.,IKEHIRA H.,KOBATA A. INCREASES OF ASPARAGINE LINKED OLIGOSACHARIDES WITH BRANCHED OUTER CHAINS CAUSED BY CELL TRANSFORMATION. BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1980); 92 : 735- 742.

16.- YAMASHITA K.,HITOI A.,TANIGUCHI N.,YOKOSAWA N.,TSUKADA Y.,KOBATA A. COMPARATIVE STUDY OF THE SUGAR CHAINS OF GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASES PURIFIED FROM RAT LIVER AND RAT AH-66 HEPATOMA. CANCER RESEARCH (1983); 43 : 5059- 5063.

17.- BHAVANANDAN V.P.,KEMPER J.G.,BYSTYN J.C. PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A MURINE MELANOMA ASSOCIATED ANTIGEN. J.BIOL.CHEMISTRY (1980); 255 : 5145- 5153.

- 18.- CHANDRASEKARAN E.V.,DAVIDSON E.A. SIALOGLYCOPROTEINS OF HUMAN MAMMARY CELLS : PARTIAL CHARACTERIZATION OF SIALOGLYCOPEPTIDES. BIOCHEMISTRY (1979); 18 : 5615- 5620.
- 19.- FUNAKOSHI I.,YAMASHINA I. STRUCTURE OF O-GLYCOSIDICALLY LINKED SUGAR UNITS FROM PLASMA MEMBRANES OF AN ASCITES HEPATOMA. J.BIOL.CHEMISTRY (1981); 90 : 1281- 1289.
- 20.- YAMASHITA K.,TACHIBANA Y.,TAKENCHI T.,KOBATA A. STRUCTURAL STUDY OF THE SUGAR CHAINS Ó-AMYLASES PRODUCED ECTOPICALLY IN TUMORS. J.BIOCHEMISTRY (1981); 90 : 1281- 1289.
- 21.- HAKOMORI S.,WYKE J.A.,VOGT P.K. GLYCOLIPIDS OF CHICK EMBRYO FIBROBLASTS INFECTED WITH TEMPEATURE SENSITIVE MUTANTS OF AVIAN SARCOMA VIRUSES. VIROLOGY (1977); 76 : 485- 493.
- 22.- LAND H.,PARADA L.F.,WEINBERG R.A. CELLULAR ONCOGENE AND MULTISTEP CARCINOGENESIS. SCIENCE (1983); 222 : 771- 773.
- 23.- BISHOP J.M. CELLULAR ONCOGENES AND RETROVIRUS. ANNU.REV.BIOCHEMISTRY (1983); 52 : 301- 354.
- 24.- VARMUS H.E. THE MOLLECULAR GENETICS OF CELLULAR ONCOGENES. ANNU.REV.GENETICS (1984); 18 : 553- 612.
- 25.- HAKOMORI S.,FUKUDA M.,NUDELMAN E. ROLE OF CELL SURFACE CARBOHYDRATES IN DIFFERENTIATION : BEHAVIOR OF LACTOSAMINOGLYCANS IN GLYCOLIPIDS AND GLYCOPROTEINS. EN TERATOCARCINOMA AND EMB SPRIGER VERLAG (HEILDERBERG) (1982); 179- 200.
- 26.- FEIZI T. CARBOHYDRATE DIFFERENTIATION ANTIGENS. BIOCHEM. SOC.TRANSACTIONS (1983); 2 : 263- 266.
- 27.- EMMELLOT P. BIOCHEMICAL PROPERTIES OF NORMAL AND NEOPLASTIC CELL SURFACES, A REVIEW. EUROPEAN J.CANCER (1973); 9 : 319- 333.
- 28.- LOEWENSTEIN W.R. JUNCTIONAL INTERCELLULAR COMMUNICATION AND GROTWH

CONTROL. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA (1979); 560 : 1- 65.

29.- SHAROM F.J.,GRANT C.W.M. A MODEL FOR GANGLIOSIDE BEHAVIOR IN CELL MEMBRANES. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA (1978); 507 : 280- 293.

30.- LEE P.M.,KETIS N.V.,BARBER K.R.,GRANT C.W.M. GANGLIOSIDE HEADGROUP DYNAMICS. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA (1980); 601 : 68- 87.

31.- MAGGIO B.,CUMAR F.A.,CAPPUTO R. MOLECULAR BEHAVIORS OF GLYCOSPHINGOLIPIDS IN INTERFACES. POSSIBLE PARTICIPATION IN SOME PROPERTIES OF NERVE MEMBRANES. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA (1981); 650 : 68- 87.

32.- BREMER E.G.,HAKOMORI S.I. GM3 GANGLIOSIDE INDUCES HAMSTER FIBROBLASTS GROWTH INHIBITION IN CHEMICALLY DEFINED MEDIUM : GANGLIOSIDE MAY REGULATE GROWTH RECEPTOR FUNCTION. BIOCHIM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1982); 106 : 711- 718.

33.- CAPPUTO R.,MACCIONI A.H.R.,CAPPUTO H.L. ACTIVATION OF DEOXYCHOLATE SOLUBILIZED ADENOSINE TRIPHOSPHATASE BY GANGLIOSIDE AND ASIALOGANGLIOSIDE PREPARATIONS. BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1977); 74 : 1046- 1052.

34.- PARTINGTON C.R.,DALY J.W. EFFECT OF GANGLIOSIDES ON ADENYL-CYCLASE ACTIVITY IN RAT CEREBRAL CORTICAL MEMBRANES. MOLECULAR PHARMACOLOGY (1979); 15 : 484- 491.

35.- OLDEN K.,PARENT J.B.,WHITE S.L. CARBOHYDRATE MOITIES OF GLYCOPROTEINS, A RE-EVALUATION OF THEIR FUNCTION. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA (1982); 650 : 209- 232.

36.- SADLER J.E.,PAULSSON J.C.,HILL R.L. THE ROLE OF SIALIC ACID IN THE EXPRESSION OF HUMAN MN BLOOD GROUP ANTIGENS. J.BIOL.CHEMISTRY (1979); 254 : 2112- 2119.

37.- WATANABE K.,HAKOMORI S.,POWELL M.E.,YOKOTA M. THE AMPHIPHATIC MEMBRANE PROTEINS ASSOCIATED WITH GANGLIOSIDES : THE PAUL-BUNNELL ANTIGEN IS ONE OF THE GANGLIOPHILIC PROTEINS. BIOCHIM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1980); 92 : 638- 648.

38.- YOUNG W.W.,McDONALD E.M.S.,NOVINSKY R.C.,HAKOMORI S. PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR DISTINCT PROPORTIONS OF THE GLYCOLIPID ASIALO-GM2. J.EXP.MEDICINE (1979); 150 : 1008- 1019.

- 39.- ITO M.,SUZUKI E.,NAIKI M.,SENDO F.,ARAI S. CARBOHYDRATES AS TUMOR ASSOCIATED TUMOR ANTIGENS. J.NATL.CANCER INST. (1983); SUPLT 1.
- 40.- ANSEL S.,HUET C. SPECIFIC GLYCOLIPID ANTIGEN IN SV-40 TRANSFORMED CELL MEMBRANES. INT.J.CANCER (1980); 25 : 797- 803.
- 41.- DIPPOLD W.G.,LLOYD K.O.,LI L.T.,IKEDA H.,OETTGEN H.F.,OLD L.J. CELL SURFACE ANTIGENS OF HUMAN MALIGNANT MELANOMA: DEFINITION OF SIX ANTIGENIC SYSTEMS WITH MOUSE MONOCLONAL ANTIBODIES. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1980); 77 : 6114- 6118.
- 42.- MASSO O.,CARCELLER A.,GOMEZ A.,BLASCO F.,KORDOWICZ M.,PIULATS J. OBTENTION AND CHARACTERIZATION OF MURINE MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST GANGLIOSIDES. IV JORNADA DE ACTUALIZACIONES EN INMUNOLOGIA. LIBRO DE ABSTRACTS (1990); 1.
- 43.- YEH M.Y.,HELLSTROM I.,ABE K.,HAKOMIR S.,HELLSTROM K.E. A CELL SURFACE ANTIGEN WHICH IS PRESENT IN THE GANGLIOSIDE FRACTION AND SHARED BY HUMAN MELANOMAS. INT.J.CANCER (1982); 29 : 269- 275.
- 44.- PUKEL C.S.,LLOYD K.O.,TRABASSOS L.R.,DIPPOLD W.G.,OETTGEN H.F.,OLD L.J. GD3 A PROMINENT GANGLIOSIDE OF HUMAN MELANOMA : DETECTION AND CHARACTERIZATION BY MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY. J.EXPERIMENTAL MEDICINE (1982); 155 : 1133- 1147.
- 46.- HOLM M.,MANSSON J.E.,VANIER M.T.,SVENNERHOLM L. GANGLIOSIDES OF HUMAN, BOVINE AND RABBIT RETINA. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA (1972); 280 : 356- 364.
- 47.- PURO K. CARBOHYDRATE COMPONENTS OF BOVINE KIDNEY GANGLIOSIDES. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA (1969); 189 : 401- 413.
- 48.- POURTAKALIAN J.,ZWINGELSTEIN G.,DORE J.F. LIPID COMPOSITION OF HUMAN MALIGNANT MELANOMA TUMORS AT VARIOUS LEVELS OF MALIGNANT GROWTH. EUR.J.BIOCHEMISTRY (1979); 94 : 19- 23.
- 49.- IRIE R.T.,SZE L.L.,SAXTON R.E. HUMAN ANTIBODY TO OFA-I A TUMOR ANTIGEN PRODUCED IN VITRO BY EPSTEIN BARR VIRUS TRANSFORMED HUMAN B-LYMPHOID CELL LINES. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1982); 79 : 5666- 5670.

- 50.- TAI T.,PAULSSON J.C.,CAHAN L.D.,IRIE R.F. GANGLIOSIDE GM2 AS A HUMAN TUMOR ANTIGEN (OFA-I-1). PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1983); 80 : 5392- 5396.
- 51.- CAHAN L.D.,IRIE R.I.,SINGH R.,CASIDENTI A.,PAULSSEN J.C. IDENTIFICATION OF HUMAN NEUROECTODERMAL TUMOR ANTIGEN (1A-1-2) AS GANGLIOSIDE GD2. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1982); 79 : 7629- 7633.
- 52.- WATANABE T.,PUKEL C.S.,TAKEYAMA H.,LLOYD K.O.,SHIKU H.,LI L.T.C.,TRABASSOS L.R.,OETTGEN H.F.,OLD L. HUMAN MELANOMA AH ANTIGEN IS AN AUTOANTIGEN GANGLIOSIDE RELATED TO GD2. J.EXPERIMENTAL MEDECINE (1982); 156 : 1884- 1889.
- 53.- BASU S.,BASU M.,CHIEN J.L.,PRESPER K.A. STRUCTURE AND FUNCTION OF GANGLIOSIDES. L.SVENNERHOLM, H.DREYFUS, P.F. URBAN EDITORES PLENUM PRESS (NEW YORK) (1980); 0 : 213- 226.
- 54.- BASO S.,BASU M. BIOSYNTHESIS IN VITRO OF li CORE GLYCOSPHINGOLIPIDS FROM NEO-LACTOTETRAOSYLCERAMIDE BY $\beta(1 \rightarrow 3)$ AND $\beta(1 \rightarrow 6)$ n-ACETYLGLUCOSAMINILTRANSFERASE FROM MO J.BIOL.CHEMISTRY (1984); 259 : 12557-12562.
- 55.- SVENNHERHOLM L.,P.FREDMAN. A PROCEDURE FOR THE QUANTITATIVE ISOLATION OF BRAIN GANGLIOSIDES. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA (1980); 617 : 97- 109.
- 56.- HOLMGREN J.,LINDHOML L.,ELWING H.,FREDMAN P.,STRANNEGARD O. SENDAI VIRUS RECEPTOR : PROPOSED RECOGNITION STRUCTURE BASED ON BINDING TO PLASTIC ABSORBED GANGLIOSIDES. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1980); 77 : 1947- 1950.
- 57.- KANFER J.N. SPHINGOLIPID BIOCHEMISTRY. J.N. KA FER Y S. HAKOMORI EDS. PLUNEN PRESS (NEW YORK) (1983); 167- 312.
- 58.- CHERESH D.A.,ROSENBERG J.M.,MUJOO K.,HIRSCHOWITZ L.,REISFELD R.A. BIOSYNTHESIS AND EXPRESSION OF THE DISIALOGANGLIOSIDE GD2, A RELEVANT TARGET ANTIGEN ON SMALL CEL LUNG CARCINOMA FOR MONOCLONAL ANTIBODY MEDIATED C CANCER RESEARCH (1986); 46 : 5112- 5118.
- 59.- CHERESH D.A.,VARKI A.P.,STALLCUP W.P.,LEVINE J.M.,REISLFELD R.A. A MONOCLONAL ANTIBODY RECOGNIZES AN O-ACYLATED SIALIC ACID IN HUMAN MELANOMA-ASSOCIATED

GANGLIOSIDE. J.BIOL.CHEMISTRY (1984); 259 : 7453- 7459.

60.- THURIN J.,HERLYN M.,HINDSGAUL O.,STROMBERG N.,KARLSSON K.,ELDER D.,STEPLEWSKI Z.,KOPROWSKI H. PROTON NMR AND FAST ATOM BOMBARDMENT MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF THE MELANOMA ASSOCIATED GANGLIOSIDE 9-O-ACETYL-GD3. J.BIOL.CHEMISTRY (1985); 260 : 14556-14563.

61.- SJOBERG E.R., MANZI A.E.,KHOO K.H.,DELL A.,VARKI A. STRUCTURAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF O-ACETYLATED GD2. EVIDENCE THAT GD2 IS AN ACCEPTOR FOR GANGLIOSIDE O-ACETYLTRANSFERASE IN HUMAN MELANOMA CELLS. J. BIOLOGICAL CHEMISTRY (1992); 267: 16200-16211.

62.- WIELS J.,FELLOUS M.,TURSZ T. MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST A BURKKIT LYMPHOMA ASSOCIATED ANTIGEN. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1981); 78 : 6485- 6488.

63.- NUDELMAN E.,KANNAGI R.,HAKOMORI S.,PARSONS M.,LIPINSKI M.,WIELS J.,FELLOUS M.,TURSZ T. A GLYCOLIPID ANTIGEN ASSOCIATED WITH BURKKIT LYMPHOMA DEFINED BY A MONOCLONAL ANTIBODY. SCIENCE (1983); 220 : 509- 511.

64.- MARCUS D.M.,KUNDU S.K.,SUZUKI A. THE P BLOOD SYSTEM: RECENT PROGRESS IN IMMUNOCHEMISTRY AND GENETICS. SEMIN.HEMATOLOGY (1981); 18 : 63- 71.

65.- BUCHBINDER L. HETEROFILE PHENOMENA IN IMMUNOLOGY. ARCH.PATHOLOGY (1935); 19 : 841- 880.

66.- HAKOMORI S.,WANG S.H.,YOUNG W.W. ISOANTIGENIC EXPRESSION OF FORSSMOANGLYCOLIPID IN HUMAN GASTRIC AND COLONIC MUCOSA: IT'S POSSIBLE IDENTITY WITH "a-LIKE" ANTIGEN IN HUMAN CANCER. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1977); 74 : 3023- 3027.

67.- YODA H.,ISHIBASHI T.,MAKITA A. ISOLATION,CHARACTERIZATION AND BIOSYNTHESIS OF FORSSMAN ANTIGEN IN HUMAN LUNG AND LUNG CARCINOMA. J.BIOCHEMISTRY (1980); 88 : 1887- 1890.

68.- TANIGUCHI N.,YOKOSAWA N.,NARITA M.,MITSUYAMA T.,MAKITA A. EXPRESSION OF FORSSMAN ANTIGEN SYNTHESIS AND DEGRADATION IN HUMAN LUNG CANCER. J.NATL.CANCER INST. (1981); 67 : 577- 583.

- 69.- MORI T.,SUDO T.,KANO K. EXPRESSION OF HETHEROPHILE FORSSMAN ANTIGENS IN CULTURED MALIGNANT CELL LINES. J.NATL.CANCER INST. (1983); 70 : 811- 814.
- 70.- MORI E.,MORI T.,SANAI Y.,NAGAI Y. RADIO-IMMUNO-THIN-LAYER CHROMATOGRAPHIC DETECTION OF FORSSMAN ANTIGEN IN HUMAN CARCINOMA CELL LINES. BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1982); 108 : 926- 932.
- 71.- BEYER T.A.,SADLER J.E.,REARICK J.I.,PAULSON J.C.,HILL R.L. GLYCOSYLTRANSFERASES AND THIER USE IN ASSESING OLIGOSACHARIDE STRUCTURE AND STRUCTURE FUNCTION RELATIONSHIPS. ADVANCES ENZYMOLOGY (1981); 52 : 23- 175.
- 72.- KANNAGI R.,LEVERY S.B.,HAKOMORI S. HYBRID TYPE GLICOLIPIDS (LACTO-GANGLIO SERIES) WITH A NOVELL BRANCHED STRUCTURE. J.BIOL.CHEMISTRY (1984); 259 : 8444- 8451.
- 73.- KANNAGI R.,LEVERY S.B.,HAKOMORI S. BLOOD GROUP H ANTIGEN WITH GLOBOSERIES STRUCTURE. FEBS LETTERS (1984); 175 : 397- 401.
- 74.- KOPROWSKI H.,STEPLEWSKY Z.,MITCHELL K.,HERLYN M.,HERLYN D.,FUHRER P. COLORECTAL CARCINOMA ANTIGENS DETECTED BY HIBRIDOMA ANTIBODIES SOMA.CELL GENETICS (1979); 5 : 957- 972.
- 75.- KOPROWSKI H.,HERLYN M.,STEPLEWSKI Z.,SEARS H.F. SPECIFIC ANTIGEN IN SERUM OF PATIENTS WITH COLON CARCINOMA. SCIENCE (1981); 212 : 53- 55.
- 76.- MAGNANI J.L.,NILSSON B.,BROCKHAUS M.,ZOPF D.,STEPLEWSKI Z.,KOPROWSKI H.,GINDSBURG V. A MONOCLONAL ANTIBODY DEFINED ANTIGEN ASSOCIATED WITH GASTROINTESTINAL CANCER IS A GANGLIOSIDE CONTAINING LACTO-N-FUCOPENTAOSE II. J.BIOL.CHEMISTRY (1982); 257 : 14365-14369.
- 77.- FALK K.E.,KARLSSON K.A.,LARSON G.,THURIN J.,BLASZCZYK M.,STEPLEWSKI Z.,KOPROWSKI H. MASS SPECTROMETRY OF A HUMAN TUMOR GLYCOLIPID ANTIGEN BEING DEFINED BY MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY NS-19-9. BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1983); 100 : 383- 391.
- 78.- MAGNANI J.,STEPLEWSKI Z.,KOPROWSKI H.,GINDSBURG V. IDENTIFCATION OF THE GASTROINTESTINAL AND PANCREATIC CANCER-ASSOCIATED ANTIGEN DETECTED BY

MONOCLONAL ANTIBODY 19-9 IN THE SERA OF PATIENTS AS A MUC CANCER RESEARCH (1983); 43 : 5489- 5492.

79.- BROCKHAUS M.,MAGNANI J.,HERLYN M.,BLASZCZYK M.,STEPLEWSKI Z.,KOPROWSKI H.,GINDSBURG V. MONOCLONAL ANTIBODIES DIRECTED AGAINST THE SUGAR SEQUENCE OF LACTO-N-FUCOPENTAOSE III ARE OBTAINED FROM MICE IMMUNIZED WITH HUMAN TUMORS. ARCH.BIOCHEM.BIOPHYS. (1982); 217 : 647- 651.

80.- CUTTITTA F.,ROSEN S.,GAZDAR A.F.,MINNA J.D. MONOCLONAL ANTIBODIES THAT DEMONSTRATE SPECIFICITY FOR SEVERAL TYPES OF HUMAN LUNG CANCER. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1981); 78 : 4591- 4595.

81.- HUANG L.C.,BROCKHAUS M.,MAGNANI J.,CUTTITA S.R.,ROSEN S.,MINNA J.D.GINDSBURG V. MANY MONOCLONAL ANTIBODIES WITH AN APPARENT SPECIFICITY FOR CERTAIN LUNG CANCERS ARE DIRECTED AGAINST A SUGAR SEQUENCE FOUND IN LACTO-N-FUCOPENTAOS ARCH.BIOCHEM.BIOPHYS. (1983); 220 : 318- 320.

82.- HUANG L.C.,CIVIN C.I.,MAGNANI J.L.,SHAPER J.H.,GINDSBURG. My-1, THE HUMAN MYELOID-SPECIFIC ANTIGEN DETECTED BY MOUSE MONOCLONAL ANTIBODIES, IS A SUGAR SEQUENCE FOUND IN LACTO-N-FUCOPENTAOSE III. BLOOD (1983); 61 : 1020- 1023.

83.- GOOI H.,THORPE S.J.,HOUNSELL E.F.,RUMPOLD H.,KRAFT D.,FORSTER O.,FEIZI T. MARKER OF PERIPHERAL BLOOD GRANULOCYTES AND MONOCYTES OF MAN RECOGNIZED BY TWO MONOCLONAL ANTIBODIES VEP8 AND VEP9 INVOLVES THE TRISACHARIDE 3-FUCO EUR.J.IMMUNOLOGY (1983); 13 : 306- 312.

84.- URDAL D.L.,BRETNALL T.A.,BERSTEIN I.D.,HAKOMORI S. THE GRANULOCYTE REACTIVE MONOCLONAL ANTIBODY,IG10, IDENTIFIES THE LeX CARBOHYDRATE DETERMINANT EXPRESSED IN HL-60 CELLS IN BOTH GLYCOLIPID AND GLYC BLOOD (1983); 62 : 1022- 1026.

85.- HAKOMORI S.,NUDELMAN E.,LEVERY S.,SOLTER D.,KNOWLES B. THE HAPTEN STRUCTURE OF A DEVELOPMENTALLY REGULATED GLYCOLIPID ANTIGEN (SSEA-1) ISOLATED FROM HUMAN ERYTHROCYTES AND ADENOCARCINOMA : A PRELIMINARY BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1981); 100 : 1578- 1586.

86.- GOOI H.C.,FEIZI T.,KAPADIA A.,KNOWLES B.B.,SOLTER D.,EVANS J.M. STAGE-SPECIFIC EMBRYONIC ANTIGENS INVOLVES $\alpha 1 \rightarrow 3$ FUCOSYLATED TYPE 2 BLOOD GROUP CHAINS.

NATURE (1981); 292 : 156- 158.

87.- KANNAGI R.,NUDELMAN E.,LEVERY S.B.,HAKOMORI S. A SERIES OF HUMAN ERYTHROCYTE GLYCOSPHINGOLIPIDS REACTING TO THE MONOCLONAL ANTIBODY DIRECTED TO A DEVELOPMENTALLY REGULATED ANTIGEN, SSEA-1. J.BIOL.CHEM. (1982); 257 : 14865-14874.

88.- HAKOMORI S.,NUDELMAN E.,KANNAGI R.,LEVERY S.B. THE COMMON STRUCTURE IN FUCOSYLLACTOSAMINOLIPIDS ACCUMULATING IN HUMAN ADENOCARCINOMAS, AND ITS ABSENCE IN NORMAL TISSUE. BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1982); 109 : 36- 44.

89.- YANG H.J.,HAKOMORI S. A SPHINGOLIPID HAVING A NOVEL TYPE OF CERAMIDE AND LACTO-N-PENTAOSE III. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1971); 246 : 1192- 1200.

90.- HAKOMORI S.,NUDELMAN E.,LEVERY S.B.,KANNAGI R. NOVEL FUCOLIPIDS ACCUMULATION IN HUMAN ADENOCARCINOMA. I GLYCOLIPIDS WITH DI- OR TRIFUCUSYLATED TYPE 2 CHAIN. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1984); 259 : 4672- 4680.

91.- FUKUSHI Y.,HAKOMORI S.,NUDELMAN E.,COCHRAN N. NOVEL FUCOLIPIDS ACCUMULATING IN THE HUMAN ADENOCARCINOMA II. J.BIOL.CHEMISTRY (1984); 259 : 4648- 4685.

92.- LEPENDU J.,LAMBERT F.,GERARD G., VITRAC D., MOLLICONE R., ORIOL R. ON THE SPECIFICITY OF HUMAN ANTI-H ANTIBODIES. VOX SANG. (1986); 50 : 223- 226.

93.- RETTING W.J.,CORDON-CARDO C.,NG J.S.C.,OETTGEN H.F.,OLD L.J.,LLOYD K.O. HIGH MOLECULAR WEIGHT GLYCOPROTEIN OF HUMAN TERATOCARCINOMA DEFINED BY MONOCLONAL ANTIBODIES TO CARBOHYDRATE DETERMINANTS. CANCER RESEARCH (1985); 45 : 815- 821.

94.- FUKUDA M.N.,BOTHNER B.,LLOYD K.O.,RETTING W.J.,TILLER P.R.,DELL A. STRUCTURES OF GLYCOSPHINGOLIPIDS ISOLATED FROM HUMAN EMBRYONAL CARCINOMA CELLS: THE PRESENCE OF MONO- AND DISIALOSYL GLYCOLIPIDS WITH BLOOD GROUP T J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1986); 261 : 5145- 5153.

95.- NILSSON O.,MANSSON J.E.,LINDHOLM L.,HOLMGREN J.,SVENNERHOLM L. SIALOSYLLACTOTETRAOSYLCERAMIDE, A NOVEL GANGLIOSIDE ANTIGEN DETECTED IN HUMAN

CARCINOMAS BY MONOCLONAL ANTIBODIES. FEBS LETTERS (1985); 182 : 398- 402.

96.- FUKUSHI Y.,NUDELMAN E.,LEVERY S.B.,HIGUCHI T.,HAKOMORI S.I. A NOVEL DISIALOGANGLIOSIDE (IV3NeuAcII6NeuAcLc4) OF HUMAN ADENOCARCINOMA AND THE MONOCLONAL ANTIBODY (FH9) DEFINING THIS DISIALOSYL STRUCTURE. BIOCHEMISTRY (1986); 25 : 2859- 2866.

97.- MANSSON J.E.,FREDMAN P.,BIGNER D.D.,MOLIN K.,ROSEGREN B.,FRIEDMAN H.S.,SVENNERHOLM L. CHARACTERIZATION OF NEW GANGLIOSIDES OF THE LACTOTETRAOSE SERIES IN MURINE XENOGRAPTS OF A HUMAN GLIOMA CELL LINE. FEBS LETTERS (1986); 201 : 109- 113.

98.- CHIA D.,TERASAKI P.I.,SUYAMA N.,GALTON J.,HIROTA M.,KATZ D. USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO SIALYLATED LeX AND SIALYLATED LeA FOR SEROLOGICAL TEST OF CANCER. CANCER RESEARCH (1985); 45 : 435- 437.

99.- NUDELMAN E.,FUKUSHI Y.,LEVERY S.B.,HIGUCHI T.,HAKOMORI S. NOVEL FUCOLIPIDS OF HUMAN ADENOCARCINOMA : CHARACTERIZATION OF THE MAJOR LEWIS Y ANTIGEN OF HUMAN ADENOCARCINOMA AS TRIFUCOSYLNONAOSYL LEWIS Y GLYC J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1986); 261 : 5487- 5495.

100.- HANSSON G.C.,ZOPF D. BIOSYNTHESIS OF THE CANCER ASSOCIATED SIALYL-LeA ANTIGEN. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1985); 260 : 9388- 9392.

101.- BLASZCZYK M.,PAK K.Y.,HERLYN M.,SEARS H.F.,STEPLEWSKI Z. CHARACTERIZATION OF LEWIS A ANTIGEN IN NORMAL COLON AND GASTROINTESTINAL ADENOCARCINOMA. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1985); 82 : 3552- 3556.

102.- TEMPERO M.A.,UCHIDA E.,TAKASAKI H.,BURNETT D.A.,STEPLEWSKI Z.,POUR P.M. RELATIONSHIP OF CARBOHYDRATE ANTIGEN 19-9 AND LEWIS ANTIGENS IN PANCREATIC CANCER. CANCER RESEARCH (1987); 47 : 5501- 5503.

103.- WATANABE K.,HAKOMORI S. STATUS OF BLOOD GROUP CARBOHYDRATE CHAINS IN OTOGENESIS AND IN ONCOGENESIS. J.EXPERIMENTAL MEDECINE (1976); 144 : 644- 653.

104.- HAKOMORI S. SEMIN.HAEMATHOLOGY (1981); 18 : 39- 62.

105.- FUKUDA M.,FUKUDA M.N.,HAKOMORI S. DEVELOPMENTAL CHANGE AND GENETIC DEFECT IN THE CARBOHYDRATE STRUCTURE OF BAND 3 GLYCOPROTEIN OF HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANE. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1979); 254 : 3700- 3703.

106.- FUKUDA M.,FUKUDA M.N.,PAPAYANNOPOLOU T.,HAKOMORI S. MEMBRANE DIFFERENTIATION IN HUMAN ERYTHROCYTE CELLS. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1980); 77 : 3474- 3478.

107.- FUKUSHI.,NUDELMAN E.,LEVERY S.B.,RAUVALA H.,HAKOMORI S. NOVEL FUCOLIPIDS ACCUMULATING IN HUMAN ADENOCARCINOMA. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1984); 259 : 10511-10517.

108.- HOLMES E.H.,OSTRANDER G.O.,CLAUSSEN H.,GRAEM N. ONCOFETAL EXPRESSION OF LeX CARBOHYDRATE ANTIGEN IN HUMAN COLONIC ADENOCARCINOMA. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1987); 262 : 11331-11338.

109.- LLOYD K.O.,KABAT E.A.,LAYUG E.J.,GRUEZO F. IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON BLOOD GROUPS BIOCHEMISTRY (1966); 5 : 1489- 1501.

110.- HIROHASHI S.,CLAUSEN H.,NUDELMAN E.,INOUE H.,SHIMOSATO Y.,HAKOMORI S. A HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY DIRECTED TO BLOOD GROUP i ANTIGEN : HETEROHIBRIDOMA BETWEEN HUMAN LYMPHOCYTES FROM REGIONAL LYMPH NODES OF A LUNG CANCER J.IMMUNOLOGY (1986); 136 : 4163- 4168.

111.- HOLMES E.H.,OSTRANDER G.K.,HAKOMORI S. ENZYMOLOGICAL BASIS FOR THE ACCUMULATION OF GLYCOLIPIDS WITH X AND DIMERIC LeX DETERMINANTS IN HUMAN LUNG CANCER CELLS NCI-H69. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1985); 260 : 7619- 7627.

112.- SOLTER D.,KNOWLES B.B. MONOCLONAL ANTIBODY DEFINING A STAGE SPECIFIC MOUSE EMBRYONIC ANTIGEN (SSEA-1). PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1978); 75 : 5565- 5569.

113.- FUKUSHI Y.,HAKOMORI S.,SHEPARD T. LOCALIZATION AND ALTERATION OF MONO- DI AND TRIFUCOSYL $\alpha(1 \rightarrow 3)$ TYPE 2 CHAIN STRUCTURES DURING HUMAN EMBRYOGENESIS AND IN HUMAN CANCER. J.EXPERIMENTAL MEDICINE (1984); 159 : 506- 520.

114.- ITZKOWITZ S.H.,YUAN M.,FUKUSHI Y.,PALEKAR A.,PHELPS P.C.,SHAMSUDDIN A.M.,TRUMP B.S.,HAKOMORI S.,KIM J. LEWIS X AND SIALYLATED LEWIS X RELATED ANTIGEN

EXPRESSION IN HUMAN MALIGNANT AND NON MALIGNANT COLONIC TISSUES. CANCER RESEARCH (1986); 46 : 2627- 2632.

115.- ABE K.,McKIBBIN J.M.,HAKOMORI S. THE MONOCLONAL ANTIBODY DIRECTED TO DIFUCOSYLATED TYPE 2 CHAIN (Y DETERMINANT). J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1983); 258 : 11793-11797.

116.- BROWN A.,FEIZI T.,GOOI H.C.,EMBLETON M.J.,PICKARD J.K.,BALDWIN R.W. A MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HUMAN COLONIC ADENOCARCINOMA RECOGNIZES DIFUCOSYLATED TYPE 2 BLOOD GROUP CHAINS. BIOSCIENCE REP. (1983); 3 : 163- 170.

117.- LLOYD K.O.,LARSON G.,STROMBERG N.,THURIN J.,KARLSSON K.A. IMMUNOGENETICS (1983); 17 : 537- 541.

118.- ABE K.,HAKOMORI S.,OSHIBA S. DIFFERENTIAL EXPRESSION OF DIFUCOSYL TYPE 2 CHAIN (LeY) DEFINED BY MONOCLONAL ANTIBODY AH6 IN DIFFERENT LOCATIONS OF COLONIC EPITHELIA, VARIOUS HIS CANCER RESEARCH (1986); 46 : 2639- 2644.

119.- KAIZU T.,LEVERY S.B.,NUDELMAN E.,STENKAMP R.E.,HAKOMORI S. NOVEL FUCOLIPIDS OF HUMAN ADENOCARCINOMAS : MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR TRIFUCOSYLATED LeY AND A POSSIBLE THREE DIMENSIONAL EPI TOPE STRUCTURE. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1986); 261 : 11254-11258.

120.- KIM Y.S.,YUAN M.,ITZKOVITZ S.H.,SUN Q.,KAIZU T.,PALEKARA.,TRUMP B.F.,HAKOMORI S. EXPRESSION OF LeY AND EXTENDED LeY BLOOD GROUP RELATED ANTIGEN IN HUMAN MALIGNANT, PREMALIGNANT AND NON-MALIGNANT COLONIC TISSUES. CANCER RESEARCH. (1986); 46 : 5985- 5992.

121.- HOLMES E.H.,OSTRANDER G.K.,HAKOMORI S. BIOSYNTHESIS OF THE SIALYL-LeX DETERMINANT CARRIED BY THE TYPE 2 CHAIN GLYCOSPHINGOLIPIDS IN HUMAN LUNG CARCINOMA PC9 CELLS. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1986); 261 : 3737- 3743.

122.- FUKUSHIMA K.,HIROTA M.,TERASAKI P.I.,WAKISAKA A.,TOGASHI H.,CHIA D.,SUYANA N. ET ALS. CHARACTERIZATION OF SIALOSYLATED LEWIS X AS A NEW TUMOR ASSOCIATED ANTIGEN. CANCER RESEARCH (1984); 44 : 5279- 5285.

123.- YAMASHITA K.,TOTANI K.,KUROKI M.,MATSUOKA Y.,UEDA I.,KOBATA A. STRUCTURAL

STUDIES OF THE CARBOHYDRATE MOIETIES OF CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN. CANCER RESEARCH (1987); 47 : 3451- 3459.

124.- PETI-JOHN D.E.,STRANAHAN P.L.,DUE C.,RONNE E.,RAHBEK SORENSSEN H.,OLSSON L. GLYCOPROTEINS DISTINGUISHING NON SMALL CELL LUNG FROM SMALL CELL LUNG CARCINOMA RECOGNIZED BY MONOCLONAL ANTIBODY 43-9F. CANCER RESEARCH (1987); 47 : 1161- 1169.

125.- MARTENSSON S.,DUE C.,PHALSSON P.,NILSSON B.,ERICKSSON H.,ZOPF D.,OLSSON L.,LUNDBLAD A. A CARBOHYDRATE EPI TOPE ASSOCIATED WITH HUMAN SQUAMOUS LUNG CANCER. CANCER RESEARCH (1988); 48 : 2125- 2131.

126.- PROKOP O.,UHLENBRUCK G. THE THOMSEN PHENOMENON IN HUMAN BLOOD AND SERUM GROUPS McLAREN AND SOONS (LONDRES) (1969); 0 : 102- 110.

127.- UHLENBRUCK G.,PARDOE G.I.,BIRD G.W.G. ON THE SPECIFICITY OF LECTINS WITH A BROAD AGGLUTINATION SPECTRUM. II STUDIES ON THE NATURE OF T-ANTIGEN AND THE SPECIFIC RECEPTORS FOR THE LECTIN OF IMMUNITATFORSCH.ALL.KLIN.IMMUNOL. (1969); 38 : 423- 433.

128.- SPRINGER G.F.,DESAI P.R.,BANATWALA I. BLOOD GROUP MN ANTIGEN AS PRECURSOR IN NORMAL AND MALIGNANT HUMAN BREAST GLANDULAR TISSUE. J.NATL.CANCER.INST. (1975); 54 : 335- 336.

129.- SPRINGER G.F.,DESAI P.R.,FRY W.A.,GOODALE R.L.,SHEAREN J.G.,SCANLONE.F. T ANTIGEN : A TUMOR MARKER AGAINST WHICH BREAST,LUNG AND PANCREAS CARCINOMA PATIENTS MOUNT IMMUNE RESPONSES. CANCER DETECT.PREVEN. (1983); 6 : 111- 118.

130.- HIROHASHI S.,CLAUSSEN H.,YAMADA T.,SHIMOSATA Y.,HAKOMORI S. BLOOD GROUP A CROSS REACTING EPI TOPE DEFINED BY MONOCLONAL ANTIBODIES NCC-LU-35 AND -81 EXPRESSED IN CANCER OF BLOOD GROUP O OR B INDIVIDUALS ITS I PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1985); 82 : 7039- 7043.

131.- KUROSAKA A.,KITAGAWA H.,FUKUI S.,NUMATA Y.,NAKADA H.,FUNAKOSHI I.,KAWASAKI T.,OGAWA T ET ALS. A MONOCLONAL ANTIBODY THAT RECOGNIZES A CLUSTER OF A DISSACHARIDE, NeuAc $\hat{O}(2\rightarrow 6)GalNAc$, IN MUCIN TYPE GLYCOPROTEIN. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1988); 263 : 8724- 8726.

- 132.- LAN M.S.,KHORRAMI A.,KAUFMAN B.,METZGAR R.S. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A MUCIN-TYPE ANTIGEN ASSOCIATED WITH HUMAN PANCREATIC CANCER. THE DUPAN-2 ANTIGEN. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1987); 262 : 12863-12870.
- 133.- ABE M.,SIDDIQUI J.,HAYES D.,KUFÉ D. ISOLATION AND SEQUENCING OF A DNA CODING FOR THE HUMAN DF3 BREAST CARCINOMA ASSOCIATED ANTIGEN. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1988); 85 : 2320- 2323.
- 134.- HAYES D.F.,SEKINE H.,OHNO T.,ABE M.,KEEFE K.,KUFÉ D.W. USE OF MURINE MONOCLONAL ANTIBODY FOR DETECTION OF CIRCULATING PLASMA DF3 ANTIGEN LEVELS IN BREAST CANCER PATIENTS. J.CLINICAL INVESTIGATION (1985); 75 : 1671- 1678.
- 135.- GENDLER S.,TAYLOR-PAPADIMITRIOU J.,DUHING T.,ROTHBARD J.,BURCHELL J. A HIGHLY IMMUNOGENIC REGION OF A HUMAN POLYMORPHIC EPITHELIAL MUCIN EXPRESSED BY CARCINOMAS IS MADE UP OF TANDEM REPEAT. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1988); 263 : 12820-12823.
- 136.- HILKENS J.,BUIJS F. BIOSYNTHESIS OF MAM-6, AN EPITHELIAL SIALOMUCIN.EVIDENCE FOR INVOLVEMENT OF A RARE PROTEOLYTIC CLEAVAGE STEP IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1988); 263 : 4215- 4222.
- 137.- HAKOMORI S.,YOUNG W.W. TUMOR ASSOCIATED GLYCOLIPID ANTIGENS AND MODIFIED BLOOD GROUP ANTIGENS SCANDINAVIAN J.IMMUNOLOGY (1978); 7 : 97- 117.
- 138.- DABELSTEEN E.,FEJERSKOV O. DISTRIBUTION OF BLOOD GROUP ANTIGEN A IN HUMAN ORAL EPITHELIUM. SCAND.J.DENT.RES. (1974); 82 : 206- 211.
- 139.- KAPADIA A.,FEIZI T.,JEWELL D.,KEELING J.,SLAVIN G. IMMUNO-CYTOCHEMICAL STUDIES OF BLOOD GROUP A,H,I, AND i ANTIGENS IN GASTRIC MUCOSAE OF INFANTS WITH NORMAL GASTRIC HISTOLOGY AND OF PATIENTS WITH GA J.CLINICAL PATHOLOGY (1981); 34 : 320- 337.
- 140.- FEIZI T.,TURDERWILLE C.,WESTWOOD J.H. BLOOD GROUP PRECURSORS AND CANCER RELATED ANTIGENS. LANCET (1975); 2 : 391- 393.
- 141.- DABELSTEEN E.,VEDTOFTE P.,HAKOMORI S.,YOUNG W.W. ACCUMULATION OF BLOOD GROUP ANTIGEN PRECURSORS IN ORAL PREMALIGNANT LESIONS. CANCER RESEARCH

(1983); 43 : 1451- 1454.

142.- GOOI H.C.,WILLIAMS L.K.,UEMURA K.,HOUNSELL E.F.,McILHINNEY R.A.J.,FEIZI T. A MARKER OF HUMAN FOETAL ENDODERM DEFINED BY A MONOCLONAL ANTIBODY INVOLVES TYPE 1 BLOOD GROUP CHAINS. MOL.IMMUNOLOGY (1983); 20 : 607- 613.

143.- HATTORI H.,UEMURA K.,TAKETOMI T. GLYCOLIPIDS OF GASTRIC CANCER.THE PRESENCE OF BLOOD GROUP A-ACTIVE GLYCOLIPIDS IN CANCER TISSUES FROM BLOOD GROUP O PATIENTS. BIOCHEM.BIOPHYS.ACTA (1981); 666 : 361- 369.

144.- YOKOTA M.,WARNER G.,HAKOMORI S. BLOOD GROUP A-LIKE GLYCOLIPID AND A NOVEL FORSSMAN ANTIGEN IN THE HEPATOCARCINOMA OF A BLOOD GROUP O INDIVIDUAL. CANCER RESEARCH (1981); 41 : 4185- 4190.

145.- LEVINE P. BLOOD GROUP AND TISSUE GENETIC MARKERS IN FAMILIAL ADNOCARCINOMA : POTENTIAL SPECIFIC IMMUNOTHERAPY. SEMINARS ONCOLOGY (1978); 5 : 28- 34.

146.- DORVAL G.,WITZ I.P.,KLEIN E.,WIGZELL H TUMOR BOUND IMMUNOGLOBULIN. i FURTHER ANALYSIS OF THE CHARACTERS OF BINDING OF IMMUNOGLOBULIN TO IN VIVO GROWTH OF TUMOR CELLS. INT.J.CANCER (1976); 17 : 109- 117.

147.- MOAV N.,HOCHBERG Y.,COHEN G.,WHITE I.P. BINDING PATERS OF IMMUNOGLOBULINS FROM TUMOR BEARING MICE TO CORRESPONDING TUMOR CELLS. J.IMMUNOL.METHODS (1977); 22 : 37- 45.

148.- HERBERMAN R.B. EXISTENCE OF TUMOR IMMUNITY IN MAN. EN MECHANISMS OF TUMOR IMMUNITY.I. GREEN,S. COHEN Y R.T. MCCLUSKEY EDITORES WILEY AND SOONS.(NEW YORK) (1977).

149.- MILLER F.R.,HEPPNER G.H. ASSESMENT OF SINGENIC CELL MEDIATED IMMUNITY TO MOUSE MAMMARY TUMOR BY THREE DIFFERENT ASSAYS. CANCER IMMUNOL.IMMUNOTHER. (1979); 7 : 77- 84.

150.- VAN LOVEREN H.,SNOEK N.,DEN OTTER W. HOST MACROPHAGE INVOLVED IN SYSTEMIC ADOPTIVE IMMUNITY AGAINST TUMORS. EXPERIENTIA (1982); 38 : 488- 494.

- 151.- ROMANI L.,NARDELLI B.,BIANCHI R.,PUCETTI P.,MAGE M.,FIORETTI M.C. ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY OF INTRACEREBRAL IMMUNE LYMPHOMAS. ROLE OF DIFFERENT LYMPHOID POPULATIONS. INT.J.CANCER (1985); 35 : 659- 663.
- 152.- LLOYD K.O.,OLD LL J. HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES TO GLYCOLIPIDS AND OTHER CANCER ANTIGENS:DISECTION OF THE HUMORAL IMMUNE RESPONSES IN CANCER PATIENTS. CANCER RESEARCH (1989); 49 : 3445- 3451.
- 153.- DE WEGER R.A.,DULLENS H.F.J.,DE BOER R.J.,DEN OTTER W. ANALYSIS OF THE CELLULAR IMMUNE REACTIONS AGAINST TUMOR CELLS BY MEANS OF A MATHEMATICAL MODEL. IMMUNOLOGY TODAY (1986); 6 : 316- 317.
- 154.- ROGERS M.J. TUMOR ASSOCIATED TRANSPLANTATION ANTIGENS OF CHEMICALLY INDUCED TUMORS: NEW COMPLEXITIES. IMMUNOLOGY TODAY (1984); 5 : 167- 168.
- 155.- HAMMERLING G.J.,MASCHEK.,STURMHOFEL K.,MONBURG F. REGULATION AND FUNCTIONAL ROLE OF MHC EXPRESSION ON TUMORS. EN PROGRESS IN IMMUNOLOGY VIII. F. MELCHERS Y COLS. EDITORES SPRINGER VERLAG (BERLIN) (1990); 0 : 1071- 1078.
- 156.- WALLICH R. ,BALBUC N.,HAMMERLING G.J.,KATZAV S.,SEGAL S.,FELDMAN M. ABROGATION OF METASTASIC PROPERTIES OF TUMOR CELLS BY DE NOVO EXPRESSION OF H-2K ANTIGENS FOLLOWING H-2 TRANSFECTION. NATURE (1985); 315 : 301- 305.
- 157.- HAMMERLING G.J.,KLAR D.,MASCHEK U.,PILM W.,STURMHOFFEL K., H-2 ANTIGENS. DAVID S.C. EDITOR PLENUM PRESS (NEW YORK) (1987); 0 : 705- 716.
- 158.- PLASKIN D.,GELBER C.,FELDMAN M.,EISSEMBACK L. REVERSAL OF THE METASTASIC PHENOTYPE IN LEWISLUNG CARCINOMA CELLS AFTER TRANSFECTION WITH SYNGENIC H-2-Kb GENE. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1988); 85 : 4463- 4467.
- 159.- MASCHEK U.,PULM W.,SEGAL S.,HAMMERLING G.J. MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CALSS I GENES IN MURINE FIBROSARCOMA IC9 ARE DOWN REGULATED AT THE LEVEL OF THE CHROMATIN STRUCTURE. J.MOLLECULAR CELL BIOLOGY (1989); 9 : 3136- 3142.
- 160.- MOMBURG F.,KOCH S. SELECTIVE LOSS OF $\beta 2$ MICROGLOBULIN mRNA IN HUMAN COLON ADENOCARCINOMA. J.EXPERIMENTAL MEDECINE (1984); 169 : 309- 314.

- 161.- KLARK D., HAMMERLING G.J. STRUCTURE OF ASSEMBLY OF MHC CLASS I HEAVY CHAINS WITH β 2MICROGLOBULIN BY INTERFERON GAMMA. EMBO J. (1989); 8 : 475- 481.
- 162.- HERLYN M.,KOPROWSKI H. MELANOMA ANTIGENS : IMMUNOLOGICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND CLINICAL SIGNIFICANCE. ANNUAL REV.IMMUNOLOGY (1988); 6 : 283- 308.
- 163.- HELLSTROM K.E.,HELLSTROM I. ONCOGENE-ASSOCIATED TUMOR ANTIGENS AS TARGETS FOR IMMUNOTHERAPY FASEB J. (1989); 3 : 1715- 1722.
- 164.- WEINBERG R.A. ONCOGENES AND THE MOLECULAR BASIS OF CANCER. HARVEY LECT. (1985); 80 : 129- 136.
- 165.- BARBACID M. HUMAN ONCOGENES. REV.CLIN.ESPAÑOLA (1986); 179 : 412- 427.
- 166.- CHAN V.,McGHEE J.O. CELLULAR ONCOGENES IN NEOPLASIA. J.CLINICAL PATHOLOGY (1987); 40 : 1055- 1063.
- 167.- CHAN S.,SIKORA K. THE POTENTIAL OF ONCOGENE PRODUCTS AS TUMOR MARKERS. CANCER SURV. (1987); 6 : 185- 207.
- 168.- HELDIN C.H.,JONHSSON A.,WENNERGREN S.,WERNSTEDT C.,BETSHOLTZ C.,WESTERMARK B. A HUMAN OSTEOSARCOMA CELL LINE SECRETES A GROWTH FACTOR STRUCTURALLY RELATED TO A HOMODIMER OF PDGF A-CHAINS. NATURE (1986); 319 : 511- 514.
- 169.- BOS J.L. THE RAS GENE FAMILY AND HUMAN CARCINOGENESIS. MUTATION RESS. (1988); 195 : 255- 271.
- 170.- MES-MASSON A.M.,McLAUGHLIN J.,WITTE O. MOLECULAR CLONING AND SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF AN ALTERED C-ABL GENE PRODUCT IN Ph1 CML PATIENTS. HAEMATOL.BLUTTRANSFUS. (1987); 31 : 163- 166.
- 171.- SJODREN H.O.,HELLSTROM I.,KLEIN G. TRANSPLANTATION OF POLIOMA VIRUS INDUCED TUMORS IN MICE. CANCER RESEARCH (1961); 21 : 329- 337.
- 172.- HABEL K. IMMUNOLOGICAL DETERMINANTS OF POLYOMA VIRUS ONCOGENESIS.

J.EXPERIMENTAL MEDECINE (1962); 115 : 181- 193.

173.- HELLSTROM I. DISTINCTION BETWEEN THE EFFECTS OF ANTIVIRAL AND ANTICELLULAR POLYOMA ANTIBODIES ON POLYOMA TUMOR CELLS. NATURE (1965); 208 : 652- 653.

174.- BRACIALE T.,MORRISON L.A.,SWEETSER M.T.,SAMBROCK J.,GETHING M.J.,BRACIALE V.L. ANTIGEN PRESENTATION PATHWAYS TO CLASS I AND CLASS II MHC RESTRICTED T LYMPHOCYTES. IMMULOGICAL REV. (1987); 98 : 95- 114.

175.- LIVIGNSTON D.M.,BRADLEY M.K. THE SIMIAN VIRUS 40 LARGE T ANTIGEN. A LOT PACKED INTO A LITTLE. MOL.BIOL.MEDECINE (1987); 4 : 63- 80.

176.- REEDMAN B.M.,KLEIN G. CELLULAR LOCALIZATION OF AN EPSTEIN-BARR VIRUS ASSOCIATED COMPLEMENT FIXING ANTIGEN IN PRODUCER AND NON PRODUCER LYMPHOBLASTOID CELL LINES. INT.J.CANCER (1973); 11 : 499- 520.

177.- GALLO R.C. HUMAN T-CELL LEUKEMIA (LYMPHOTROPIC) RETROVIRUS AND THEIR CAUSATIVE ROLE IN T-CELL MALIGNANCES AND ADQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SINDROME. EN ACCOMPLI J.P. LIPPINCOTT EDS. FILADELFIA (1985); 76- 87.

178.- ZUR HAUSSEN H. PAPILOMAVIRUS IN HUMAN CANCER. CANCER (1987); 59 : 1691- 1696.

179.- ALBINO A.P. PARADOX OF RAS ONCOGENES IN MALIGNANT MELANOMA. PIGMENT CELL RESS. SUPL. (1988); 1 : 169- 179.

181.- BARGMANN C.I.,HUNG M.C.,WIENBERG R.A. THE NEU ONCOGENE ENCODES AN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR RELATED PROTEIN. NATURE (1986); 319 : 226- 230.

182.- VAN DE VIJVER M.J.,MOOI W.J.,WISMAN P.,PETERSE J.L.,NUSSE R. IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF THE NEU PROTEIN IN TISSUE SECTIONS OF HUMAN BREAST TUMORS WITH AMPLIFIED NEU DNA. ONCOGENE (1988); 2 : 175- 178.

183.- DREBIN J.A.,LINK V.C.,GREENE M.I. MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR THE NEU ONCOGENE DIRECTLY MEDIATE ANTI-TUMOR CITOTOXICITY. ONCOGENE (1988); 2 : 387- 394.

- 184.- BERNARDS R.,DESTREE A.,MCKENZIE S. EFFECTIVE TUMOR IMMUNOTHERAPY. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1987); 84 : 6854- 6858.
- 185.- NONOMURA A.,OHTA G.,HAYASHI M.,IZUMI R.,WATANABE K., TAKAYANAGI N.,MIZUKAMI Y.,MATSUBARA F. IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF RAS ONCOGENE P21 PRODUCT IN LIVER CIRRHOSIS AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA. AM.J.GASTROENTEROLOGY (1987); 82 : 512- 518.
- 186.- VIOLA M.V.,FROMOWITZ F.,ORAVEZ S.,DEB S.,FINKEL G.,LUNDY J.,HAND P.,THOR A.,SCHLOM J. EXPRESSION OF RAS ONCOGENE P21 IN PROSTATE CANCER. N.ENGLAND J.MEDICINE (1986); 314 : 133- 137.
- 187.- VAN EPL A.,VESSIERE F.,BOON T. PROTECTION AGAINST TWO SPONTANEOUS MOUSE LEUKEMIAS CONFERRED BY IMMUNOGENIC VARIANTS OBTAINED BY MUTAGENESIS. J.EXPERIMENTAL MEDECINE (1983); 157 : 1992- 2001.
- 188.- BOON T.,KELLERMAN O. REJECTION BY SINGENIC MICE OF CELL VARIANTS OBTAINED BY MUTAGENESIS OF A MALIGNANT TERATOCARCINOMA CELL LINE. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1977); 74 : 272- 275.
- 189.- KOHAI H.,COHEN J.A.,DREBIN J.A.,GREENE M.I. STAGE AND TISSUE SPECIFIC EXPRESSION OF THE NEU ONCOGENE IN RAT DEVELOPMENT. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1987); 84 : 8498- 8501.
- 189.- KAVATHAS P.,HERZEMBERG L.A. STABLE TRANSFORMATION OF MOUSE L-CELLS FOR HUMAN MEMBRANE T-CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, HLA AND β 2 MICROGLOBULIN : SELECTION BY FLUORESCENCE PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1983); 80 : 524- 528.
- 190.- LURQUIN C.,VAN PEL A.,MARIANNE B.,DE PLAEN E.,SCIKORA J.P.,JANSSENS C.,LEJEUNE J.,BOON T. STRUCTURE OF THE GENE OF TUM- TRANSPLANTATION ANTIGEN P91A: THE MUTATED EXON ENCODES A PEPTIDES RECOGNIZED WITH LD BY CYTOLYTIC T CELLS. CELL (1989); 58 : 293- 303.
- 191.- ANICHINI A.,FOSSATI G.,PARMIANI G. CLONAL ANALYSIS OF THE CYTOLYTIC T-CELL RESPONSE TO HUMAN TUMORS. IMMUNOLOGY TODAY (1987); 8 : 385- 389.
- 192.- MUUL C.M.,SPIESS P.J.,DIRECTOR E.P.,ROSEMBERG S.A. IDENTIFICATION OF SPECIFIC

CYTOLITIC IMMUNE RESPONSES AGAINST AUTOLOGOUS TUMORS IN HUMANS BEARING MALIGNANT MELANOMA. J. IMMUNOLOGY (1987); 138 : 989- 995.

193.- KNUTH A., WOFEL T., KLEHMANN., BOON T., MEYER K.Z. CYTOLYTIC T-CELL CLONES AGAINST AN AUTOLOGOUS HUMAN MELANOMA: SPECIFICITY STUDY AND DEFINITION OF THREE ANTIGENS BY IMMUNOSELECTION. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1989); 86 : 2804-2808.

194.- OLD L.J. CANCER IMMUNOLOGY. THE SEARCH FOR SPECIFICITY. CANCER RESEARCH (1981); 41 : 361- 375.

195.- REAL F.X., MATTES M.J., HOUGHTON A.A., OETTGEN H.F., LLOYD K.O., OLD L.J. CLASS I (UNIQUE) TUMOR ANTIGENS ON HUMAN MELANOMA. IDENTIFICATION OF A 90.000 DALTON CELL SURFACE GLYCOPROTEIN BY AUTOLOGOUS TYPING. J. EXPERIMENTAL MEDICINE (1984); 160 : 1219- 1223.

196.- SCHREIBER H., WARD P.L., ROWLEY D.A., STRAUSS H.J. UNIQUE TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS. ANNUAL REV. IMMUNOL. (1988); 6 : 465- 483.

197.- WIELS J., HOLMES E.H., COCHRAN N., TURSZ T., HAKOMORI S.I. ENZYMATIC AND ORGANIZATIONAL DIFFERENCE IN EXPRESSION OF A BURKITT LYMPHOMA ASSOCIATED ANTIGEN IN BURKITT LYMPHOMA AND LYMPHOBLASTOID CELL LINES. J. BIOLOGICAL CHEMISTRY (1984); 259 : 14783-14787.

198.- HAKOMORI S.I., NUDELMAN E., LEVERY S.B., SOLTER D., KNOWLES B. THE HAPTEN STRUCTURE OF A DEVELOPMENTALLY REGULATED GLYCOLIPID. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM. (1981); 100 : 1578- 1586.

199.- YOUNG W.W., HAKOMORI S.I. THERAPY OF MOUSE LYMPHOMA WITH MONOCLONAL ANTIBODIES TO GLYCOLIPID: SELECTION OF LOW ANTIGENIC VARIANTS IN VIVO. SCIENCE (1981); 211 : 487- 489.

200.- DOHI T., NOVES G.A., HAKOMORI S.I. AN IgG3 MONOCLONAL ANTIBODY ESTABLISHED AFTER IMMUNIZATION WITH GM3 LACTONE: IMMUNOCHEMICAL SPECIFICITY AND INHIBITION OF MELANOMA CELL GROWTH IN VIVO. CANCER RESEARCH (1988); 48 : 5680- 5685.

201.- ASHALL F., BRANWELL M.E., HARRIS H. A NEW MARKER FOR HUMAN CANCER CELLS.

THE CA ANTIGEN AND THE CA-1 ANTIBODY THE LANCET (1982); 2 : 1- 6.

202.- CHERESH D.A.,HARPER J.R,SCHULZ G.,REISFELD R.A. LOCALIZATION OF THE
GANGLIOSIDE GD2 AND GD3 IN ADHESION PLAQUES AND ON THE SURFACE OF MELANOMA
CELLS. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1984); 81 : 5767- 5771.

203.- HAKOMORI S.I. GLYCOLIPIDS OF TUMOR CELL MEMBRANE ADVANCES CANCER RES.
(1973); 18 : 265- 315.

204.- STEIN K.N.,SCHWARTING G.A.,MARCUS D.M. GLYCOLIPID MARKERS OF MURINE
LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS. J.IMMUNOLOGY (1978); 120 : 676- 679.

205.- YOSHINO T.,WATANABE K.,HAKOMORI S.I. CHEMICAL SYNTHESIS OF
O-L-FUCOSYLCERAMIDE AND ITS ANALOGES AND PREPARATION OF ANTIBODIES DIRECTED TO
THIS GLYCPLIPID. BIOCHEMISTRY (1982); 21 : 928- 934.

206.- KANNAGIR.,LEVINE P.,WATANABE K.,HAKOMORI S.I. GLYCOLIPID AND GLYCOPROTEIN
PROFILES AND CHARACTERIZATION OF THE MAJOR GLYCOLIPID ANTIGEN IN GASTRIC CANCER
OF THE 1951 PATIENT OF BLOOD GROUP GENO CANCER RESEARCH (1982); 42 : 5249- 5254.

207.- DINGEMANS K.P.,PELS E.,VAN DONGEN G.,DEN OTTER W. DESTRUCTION OF MURINE
LYMPHOMA CELLS BY ALLOGENIC PERITONEAL MACROPHAGES IN VITRO : INFLUENCE OF
ANTISERUM. J.NATL.CANCER INST. (1983); 70 : 181.

208.- PELS E.,DE WEGER R.A.,DEN OTTER W. LYMPHOCYTE-INDUCED MACROPHAGE
CYTOTOXICITY.PRODUCTION OF SPECIFIC MACROPHAGE ARMING FACTOR BY SENSITIZED LYT
1 + 2 + T-LYMPHOCYTES. INT.ARCH.ALLERGY APPL.IMMUNOLOGY (1984); 74 : 140.

209.- MONGINI P.K.A.,STEIN K.E.,PAUL W.E. T-CELL REGULATION OF IGG SUBCLASS
ANTIBODY PRODUCTION IN RESPONSE TO T-INDEPENDENT ANTIGENS. J.EXPERIMENTAL
MEDECINE (1981); 153 : 1- 26.

210.- CONNELL I.,MUNRO A.,WALDMANN H. THE IMMUNE SYSTEM. A COURSE ON THE
MOLECULAR AND CELLULAR BASIS OF IMMUNITY. BLACKWELL SCI. PUBLISHERS (OXFORD)
(1981); 8 : 131- 132.

211.- HIMMELWEIT B. THE COLLECTED PAPERS OF PAUL ERLICH PERGAMON PRESS (OXFORD)

(1957).

212.- TROWBRIDGE I.S.,DOMINGO D.L. ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR MONOCLONAL ANTIBODY AND TOXIN.ANTIBODY CONJUGATES AFFECT GROWTH OF HUMAN TUMOR CELLS. NATURE (1981); 294 : 171- 173.

213.- LOTZE M.T.,FINN O. RECENT ADVANCES IN CELLULAR IMMUNOLOGY:IMPLICATIONS FOR IMMUNITY TO CANCER. IMMUNOLOGY TODAY (1990); 11 : 190- 193.

214.- BOLHUIS R.L.H.,DE GRIEND R.J.V.,STOTER G.,MUKHERJI B. LYMPHOID EFFECTOR CELLS AGAINST TUMOR CELLS. EN TUMOR IMMUNOLOGY-MECHANISMS, DIAGNOSIS AND THERAPY. W. DEN OTTER Y E.J. RUIEMBERG EDITORES. ELSEVIER SCIENTIFIC PUB. (OXFORD) (1987); 5 : 61- 88.

215.- RAMQUIST T.,PALLOS D.O. ,DEANDA J., AHRLUND-RICHTER L., REINHOLDSSON G.,ROBERTS T.M.,ET ALS. IMMUNIZATION AGAINST THE POLYOMA TUMOR-SPECIFIC TRANSPLANTATION ANTIGEN (TSTA) WITH POLYOMA T-ANTIGENS. INT.J.CANCER (1988); 42 : 123- 128.

216.- LATHE R.,KIENY M.P.,GERLINGER P.,CLERTANT P.,GUIZANI I.,CUZIN F.,CHAMBON P. TUMOR PREVENTION AND REJECTION WITH RECOMBINANT VACCINIA. NATURE (1987); 326 : 878- 880.

217.- NORTH R.J.,AWWAD M.,DUNN P.L. T CELL MEDIATED TUMOR REGRESSION IN EXPERIMENTAL SYSTEMS. EN PROGRESS IN IMMUNOLOGY VII. F MELCHERS Y COLS. EDITORES SPRINGER VERLAG (BERLIN) (1990); 4 : 1097- 1103.

218.- HELLSTROM K.E.,HELLTROM I. CELLULAR IMMUNITY AGAINST TUMOR SPECIFIC ANTIGENS. ADV.CANCER RES. (1969); 12 : 167- 223.

219.- EARL P.L.,MOSS B.,MORRISON R.P.,WEHRLY K.,NISHIO J.,CHESEBRO B. T-LYMPHOCYTE PRIMING AND PROTECTION AGAINST FRIEND LEUKEMIA BY VACCINIA RETROVIRUS ENV GENE RECOMBINATION. SCIENCE (1986); 234 : 728- 731.

220.- KLEIN G. TUMOR ANTIGENS. ANNU.REV.MICROBIOLOGY (1966); 20 : 223- 252.

221.- RUSELL S.J. LYMPHOKINE GENE THERAPY FOR CANCER. IMMUNOLOGY TODAY (1990);

11 : 196- 200.

222.- BALDWIN R.W.,BYERS V.S. MONOCLONAL ANTIBODIES FOR TUMOR DETECTION AND DRUG TARGETING. ACADEMIC PRESS (NEW YORK) (1985)

223.- KLARNET J.P.,KERN D.E.,UKUNO K.,HOLT C.,LILLY F.,GREENBERG P.D. FBL-REACTIVE CD8 POSITIVE CYTOTOXIC AND CD4 POSITIVE HELPER T LYMPHOCYTES RECOGNIZE DISTINCT F-MULV ENCODED ANTIGENS. J.EXPERIMENTAL MEDECINE (1989); 169 : 457- 467.

224.- GREENBERG P.D.,KERN D.E.,CHEEVER M.A. THERAPY OF DISSEMINATED MURINE LEUKEMIA WITH CYCLOFOSAFAMIDE AND IMMUNE LYT 1 + 2- T CELLS.TUMOR ERADICATION DOES NOT REQUIRE PARTICIPATION OF CYTOLY J.EXPERIMENTAL MEDECINE (1985); 161 : 1122- 1134.

225.- KRAMMER P.H.,TRAUTH B.C.,BIER V.,DHEIN J.,FALK W.,GARCIN G.,KLAS C.,MULLER W.,OEHM A., ET ALS. APOPTOSIS IN MONOCLONAL ANTIBODY-INDUCED TUMOR REGRESSION. EN PROGRESS IN IMMUNOLOGY VII F. MELCHERS Y COLS. EDITORES SPRINGER VERLAG (BERLIN) (1990); 4 : 1104- 1105.

226.- WYLLIE A.H.,KERR J.F.R.,CURRIE A.R. CELL DEATH: THE SIGNIFICANCE OF APOPTOSIS. INT.REV.CYTOLOGY (1980); 68 : 251- 306.

227.- ANDERSSON T.G.,FERGUSON D.J.P.,RAAB G.M. CELL TURN OVER IN THE RESTING HUMAN BREAST : INFLUENCE OF PARITY, CONTRACEPTIVE PILL, AGE AND LATERALITY. BRITISH J. CANCER (1981); 46 : 376- 382.

228.- DUVALL E.,WYLLIE A.H. DEATH AND THE CELL IMMUNOLOGY TODAY (1986); 7 : 115- 119.

229.- HELLSTROM I.,HELLSTROM K.E. CELL MEDIATED REACTIVITY TO HUMAN TUMOR TYPE ASSOCIATED ANTIGENS: DOES IT EXIST ? J.BIOL.RESPONSE MODIFIERS (1983); 2 : 310- 320.

230.- BANGHAM A.D. MEMBRANE MODELS WITH PHOSPHOLIPIDS. PROG.BIOPHYS.MOL.BIOLOGY (1968); 18 : 29.

231.- LIPOWSKY R. THE CONFORMATION OF MEMBRANES NATURE (1991); 349 : 475- 481.

232.- CHAPMAN D. BIOMEMBRANES : STRUCTURE OF BIOMEMBRANES AND THEIR MODELS.

ADV.EXP.MED.BIOLOGY (1988); 238 : 13- 20.

233.- ETEMADI A.H. FUNCTIONAL AND ORIENTATIONAL FEATURES OF PROTEIN MOLECULES IN RECONSTITUTED LIPID MEMBRANES. ADV.LIPID RES. (1985); 21 : 281- 428.

234.- HUG P.,SLEIGHT R.G. LIPOSOMES FOR THE TRANSFORMATION OF EUKARIOTIC CELLS. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA VOL 1097 (1991); 1 : 1- 17.

235.- STORM G.,WILMS H.P.,CROMMELIN D.J. LIPOSOMES AND BIOTHERAPEUTICS. BIOTHERAPY (1991); 3 : 25- 42.

236.- LANGER R. NEW METHODS OF DRUG DELIVERY. SCIENCE (1990); 249 : 1527- 1533.

237.- PAPAHA DJOPOULOS D.,GABIZON A. LIPOSOMES DESIGNED TO AVOID THE RETICULOENDOTHELIAL SYSTEM. PROG.CLIN.BIOL.RES. (1990); 343 : 85- 93.

238.- RANADE V.V. DRUG DELIVERY SYSTEMS: SITE SPECIFIC DRUG DELIVERY USING LIPOSOMES AS CARRIERS. J.CLIN.PHARMACOLOGY (1989); 29 : 685- 694.

239.- SCHERPHOF G.L.,SPANJER H.H.,DERKSEN J.T.,LAZAR G.,ROERDINK F.H. TRAGETING OF LIPOSOMES TO LIVER CELLS. HORIZ.BIOCHEM.BIOPHYS. (1989); 9 : 281- 291.

240.- SZOKA F.,PAPAHA DJOPOULOS D. COMPARATIVE PROPERTIES AND METHODS OF PREPARATION OF LIPID VESICLES (LIPOSOMES). ANN.REV.BIOPHYS.BIOENG. (1980); 9 : 467- 508.

241.- CHAPMAN D.,URBINA J.,KEOUGH K. BIOMEMBRANE PHASE TRANSITIONS. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1974); 249 : 2512- 2521.

242.- SENDRA A.,PAGANO R.E. LIPOSOME-CELL INTERACTIONS. J. BIOLOGICAL CHEMISTRY (1979); 254 : 2244- 2249.

243.- VAN RENSWOUDE A.J.,HOEKSTRA D. CELL INDUCED LEAKAGE OF LIPOSOME CONTENTS. BIOCHEMISTRY (1981); 20 : 540- 546.

243.- GRAYBILL J.R.,CRAVEN P.C.,TAYLOR R.L.,WILLIAMS D.M.,MAGEE W.E. TREATMENT OF MURINE CRYPTOCOCCOSIS WITH LIPOSOME ASSOCIATED AMPHOTERICIN B J.INF.DIS. (1982);

145 : 748- 752.

244.- LASERMAN L.D.,BARBET J.,KOURILSKY F.,WEINSTEIN J.N. TARGETING TO CELLS OF FLUORESCENT LIPOSOMES COVALENTLY COUPLED WITH MONOCLONAL ANTIBODY OR PROTEIN A. NATURE (1981); 288 : 602- 604.

245.- NEW R.R.C.,BLACK C.D.V.,PARKER R.J.,PURI A.,SCHERPHOF G.L. LIPOSOMES IN BIOLOGICAL SYSTEMS EN LIPOSOMES A PRACTICAL APPROACH DE R.R.C. NEW EDITOR IRL PRESS (OXFORD) (1990); 6 : 221- 252.

246.- LULLMANN-RAUCH R. LYSOSOMES IN APPLIED BIOLOGY AND THERAPEUTICS EDITADO POR J.T. DINGLE,P.J. JACQUES Y I.H. SHAW NORTH HOLLAND PUBLS.(AMSTERDAM) (1979); 6 : 49.

247.- SPANJER H.,SCHERPHOF G. TARGETING OF LACTOSYLCERAMIDE CONTAINING LIPOSOMES TO HEPATOCYTES IN VIVO. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA (1983); 734 : 40- 47.

248.- LAZAR G.,VAN GALEN M.,SCHERPHOF G.L. GADOLINIUM CHLORIDE INDUCED SHIFTS IN INTRAHEPATIC DISTRIBUTION OF LIPOSOMES. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA (1989);1011 : 97- 101.

249.- CUDD A.,NICOLAU C. INTRACELLULAR FATE OF LIPOSOME ENCAPSULATED DNA IN MOUSE LIVER. ANALISYS USING ELECTRON MICROSCOPE AUTORADIOGRAPHY AND SUBCELLULAR FRACTIONATION. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA (1985); 845 : 477

250.- FIDLER I.J.,RAZ A.,FOGLER W.E.,KIRSH R.,BUGELSKI P.,POSTE G. DESING OF LIPOSOMES TO IMPROVE DELIVERY OF MACROPHAGE AUGMENTING AGENTS TO ALVEOLAR MACROPHAGES. CANCER RESEARCH (1980); 40 : 4460- 4466.

251.- DANCEY G.F.,YASUDA T.,KINSKY S.C. EFECT OF LIPOSOMAL MODEL MEMBRANE COMPOSITION ON IMMUNIGENICITY. J.IMMUNOLOGY (1978); 120 : 1109- 1113.

252.- JULIANO R.L.,LIN G. LIPOSOMES IN IMMUNOBIOLOGY EDITADO POR B.TOM Y H.SIX ELSEVIER NORTH HOLLAND (NEW YORK) (1980); 49.

253.- BONTE F.,HSU M.J.,PAPP A.,WU K.,REGAN S.L.,JULIANO R.L. INTERACTION OF POLYMERIZABLE PHOPHATIDYLCHOLINE VESICLES WITH BLOOD COMPONENTS : RELEVANCE

TO BIOCOMPATIBILITY. BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA (1987); 900 : 1- 9.

254.- STIRK A.H.,BALDESHWIELER J.D. MEDICAL APLICATIONS OF LIPOSOMES EDITADO POR K.YAGI KARGER EDITORS (BASSEL) (1986);31.

255.- ALLEN T.M.,CHONN A. LARGE UNILAMELLAR LIPOSOMES WITH LOW UPTAKE INTO RETICULO-ENDOTHELIAL SYSTEM. FEBS LETTERS (1987); 223 : 42- 46.

256.- GREGORIADIS G.,SENIOR J. THE PHOSPHOLIPID COMPONENT OF SMALL UNILAMELLAR LIPOSOMES CONTROL THE RATE OF CLEARANCE OF ENTRAPPED SOLUTES FROM THE CIRCULATION. FEBS LETTERS (1980); 119 : 43- 46.

257.- YAGI K.,NAOI M. MEDICAL APLICATIONS OF LIPOSOMES EDITADO POR K. YAGI KARGER PRESS (BASSEL) (1986); 91.

258.- HIRNLE P. DRUG DEPPOTS IN LYMPH NODES: WHICH CARRIER IS MOST APPROPRIATE ? J.MICROENCAPSULATION (1991); 8 : 103- 119.

259.- KREUTER J. LIPOSOMES AND NANOPARTICLES AS VEHICLES FOR ANTIBIOTICS. INFECTION (SUPL 4) (1991); 19 : 224- 228.

260.- WEINSTEIN J.N.,MAGIN R.L.,CYSYK R.L.,ZAHARKO D.S. TREATMENT OF SOLID L1210 MURINE TUMORS WITH LOCAL HYPERTHERMIC AND TEMPERATURE SENSITIVE LIPOSOMES CONTAINING METHOTREXATE. CANCER RESEARCH (1980); 40 : 1388- 1395.

261.- WEINSTEIN J.N.,KLAUSNER R.D.,INNERARITY T.,RALSTON E. , BLUMENTHAL R. PHASE TRANSITION RELEASE, A NEW APPROACH TO THE INTERACTION OF PROTEINS WITH LIPID VESICLES. BIOCHEM.BIOPHYS.ACTA (1981); 647 : 270- 284.

262.- KLAUSNER R.D.,KUMAR N.,WIENSTEIN J.N.,BLUMENTHAL R.,FLAVIN M. INTERACTION OF TUBULIN WITH PHOSPHOLIPID VESICLES. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1981); 256 : 5879- 5885.

263.- HO R.J.,ROUSE B.Y.,HUANG L. TARGET SENSITIVE IMMUNOLIPOSOMES : PREPARATION AND CHARACTERIZATION. BIOCHEMISTRY (1986); 25 : 5500.

264.- BENTZ J.,ELLENS H.,SZOKA F.C. DEESTABILIZATION OF PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE

CONTAINING LIPOSOMES, HEXAGONAL PHASE AND SYMETRIC MEMBRANES. BIOCHEMISTRY (1987); 25 : 2105- 2116.

265.- WANG C.Y.,HUANG L. pH-SENSITIVE IMMUNOLIPOSOMES MEDIATED TARGET-CELL-SPECIFIC DELIVER AND CONTROLLED EXPRESSION OF A FOREING GENE IN MOUSE. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1987); 84 : 7851.

266.- ALLISON A.C.,GREGORIADIS G. LIPOSOMES AS IMMUNOLOGICAL ADYUVANTS. NATURE (1974); 252 : 252.

267.- VAN ROOIJEN N.,SU S. IMMUNOADJUVANT ACTION OF LIPOSOMES: MECHANISMS. EN IMMUNOLOGICAL ADYUVANTS AND VACCINES. EDITADO POR G.GREGORIADIS, A.C.,ALLISON Y G.POSTE. PLENUM PRESS (NEW YORK) (1989);95.

268.- ALVING C.R. LIPOSOMES AS CARRIERS FOR VACCINES. EN LIPOSOMES FROM BIOPHYSICS TO THERAPEUTICS EDITADO POR M.J. OSTRO. MARCEL DECKER PUB.(NEW YORK) (1987);195.

269.- SEGAL A.W.,WILLIS E.J.,RICHMOND J.E.,SLAVIN G.,BLACK C.D.V.,GREGORIADIS G. MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS ON THE CELLULAR AND SUBCELLULAR DESTINATION OF INTRAVENOUSLY ADMINISTERED LIPOSOMES. BRITISH J.EXP.PATHOLOGY (1974); 55 : 320.

270.- WASEEF N.M.,ALVING C.R. COMPLEMENT DEPENDENT PHAGOCYTOSIS OF LIPOSOMES BY MACROPHAGES. METHODS ENZYMOLOGY (1987); 149 : 124.

271.- ALVING C.R.,RICHARDS R.L. IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF LIPOSOMES EN LIPOSOMES EDITADO POR M.J. OSTRO MARCEL DECKER PUB.(NEW YORK) (1983);209.

272.- BURAKOFF S.J.,WIENBERGER O.,KRENSKY A.M.,REISS C.S. A MOLECULAR ANALYSIS OF THE CYTOLITIC T LYMPHOCYTE RESPONSE. ADVANCES IMMUNOLOGY (1984); 36 : 45.

273.- RAPHAEL L.,TOM B.H. IN VITRO INDUCTION OF PRIMARY AND SECONDARY XENOIMMUNE RESPONSES BY LIPOSOMES CONTAINING HUMAN COLON TUMOR CELL ANTIGENS. CELLULAR IMMUNOLOGY (1982); 71 : 224.

274.- RAPHAEL L.,TOM B.H. LIPOSOME FACILITATED XENOGENIC APPROACH FOR STUDYING HUMAN COLON CANCER IMMUNITY: CARRIER AND ADJUVANT AFFECT OF LIPOSOMES.

CLIN.EXP.IMMUNOLOGY (1984); 55 : 1.

275.- DAL MONTE P.,SZOKA F.C. EFFECT OF LIPOSOME ENCAPSULATION ON ANTIGEN PRESENTATION IN VITRO. COMPARISON OF PRESENTATION OF PERITONEAL MACROPHAGES AND B CELL TUMORS. J.IMMUNOLOGY (1989); 142 : 1437.

276.- DAL MONTE P.R.,SZOKA F.C. ANTIGEN PRESENTATION BY B CELLS AND MACROPHAGES OF CYTOCHROME C AND ITS ANTIGEN FRAGMENTS WHEN CONJUGATED TO THE SURFACE OF LIPOSOMES. VACCINE (1989); 7 : 401.

277.- WALDEN P. ANTIGEN PRESENTATION BY LIPOSOMES AS MODEL SYSTEM FOR T-B CELL INTERACTION. EUR.J.IMMUNOLOGY (1988); 18 : 1851.

278.- WALDEN P.,NAGY Z.A.,KLEIN J. ANTIGEN PRESENTATION BY LIPOSOMES : INHIBITION WITH ANTIBODIES. EUR.J.IMMUNOLOGY (1986); 16 : 717.

279.- BAKOUCHE O.,KOFF W.C.,BROWN D.C.,LACHMAN L.B. INTERLEUKIN 1 RELEASE BY HUMAN MONOCYTES TREATED WITH LIPOSOME-ENCAPSULATED LIPOPOLYSACCHARIDE. J.IMMUNOLOGY (1987); 139 : 1120.

280.- STEINMAN R.M.,NUSSENZWEIG M.C. DENDRITIC CELLS: FEATURES AND FUNCTIONS. IMMUNOLOGICAL REVIEW (1980); 53 :10.

281.- SHEK P.N.,LUKOVICH S. THE ROLE OF MACROPHAGES IN PROMOTING THE ANTIBODY RESPONSE MEDIATED BY LIPOSOME ASSOCIATED PROTEIN ANTIGENS. IMMUNOLOGICAL LETTERS (1982); 5 : 305.

282.- SU D.,VAN ROOIJEN N. THE ROLE OF MACROPHAGES IN THE IMMUNOADYUVANT ACTION OF LIPOSOMES : EFFECTS OF ELIMINATION OF SPLENIC MACROPHAGES ON TH IMMUNE RESPONSE AGAINST INT IMMUNOLOGY (1989); 66 : 466.

283.- BEATTY J.D.,BEATTY B.G.,PARASKEVAS F.,FROESE E. LIPOSOMES AS IMMUNE ADJUVANTS: T CELL DEPENDENCE. SURGERY (1984); 96 : 345.

284.- OGERT R.A.,GENTRY M.K.,RICHARDSON E.C.,DEAL C.D.,ABRAMSON S.N.,ALVING C.R.,TAYLOR P.,DOCTOR B.P. STUDIES ON THE TOPOGRAPHY OF THE CATALYTIC SITE OF ACETYLCHOLINESTERASE USING POLYCLONAL AND MONOCLONAL ANTIBODIES. J.NEUROCHEMISTRY (1990); 55 : 756.

- 285.- LATIF N.,BACHHAWAT B.K. LIPOSOMES IN IMMUNOLOGY J.BIOSCIENCE (1984); 6 : 491
- 286.- ALVING C.R.,RICHARDS R.L.,MOSS J.,ALVING L.I.,CLEMETS J.D.,SHIBA T.,KOTANI S.,WITZR.A. ET ALS. EFFECTIVENESS OF LIPOSOMES AS POTENTIAL CARRIERS OF VACCINES. VACCINE (1986); 4 : 166.
- 287.- GREGORIADIS G.,PANAGIOTIDI C. IMMUNOADJUVANT ACTION OF LIPOSOMES : COMPARISON WITH OTHERS ADJUVANTS. IMMUNOLOGICAL LETTERS (1989); 20 : 237.
- 288.- ALVING C.R. LIPOSOMES AS CARRIERS OF ANTIGENS AND ADJUVANTS. J.IMMUNOLOGICAL METHODS (1991); 140 : 1- 13.
- 289.- HEATH T.D.,EDWARDS D.C.,RYMAN B.E. THE ADJUVANT PROPERTIES OF LIPOSOMES. BIOCHEM.SOC.TRANS. (1976); 4 : 129.
- 290.- VAN ROOIJEN N.,NIEUWMEGEN R. LIPOSOMES IN IMMUNOLOGY: MULTILAMELLAR PHOSPHATIDYLCHOLINE LIPOSOMES AS A SIMPLE, BIODEGRADABLE AND HARMLESS ADJUVANT WITHOUT ANY IMMUNOGENIC ACTIV IMMUNOLOGICAL COMMUNICATIONS (1980); 9 : 243.
- 291.- TAKADA H.,KOTANI S. STRUCTURAL REQUERIMENTS OF LIPID A FOR ENDOTOXICITY AND OTHER BIOLOGICAL ACTIVITIES. CRC CRIT.REV.IMMUNOLOGY (1989); 16 : 477.
- 292.- VOSIKA G.J.,BARR C.,GILBERTSON D. PHASE I STUDY OF INTRAVENOUS MODIFIED LIPID A. CANCER IMMUNOL.IMMUNOTHERAPY (1984); 18 : 107.
- 293.- DIJKSTRA J.,MELLORS J.W.,RYAN J.L. ALTERED IN VIVO ACTIVITY OF LIPOSOME INCORPORATED LIPOPOLYSACHARIDE AND LIPID A. INFECTION IMMUNITY (1989); 57 : 3357.
- 294.- RICHARDS R.L.,SWARTZ G.M.,SCHULTZ C.,HAYRE M.D.,WARD G.S.,BALLOU W.R.,CHULAY J.D., ET ALS. IMMUNOGENICITY OF LIPOSOMAL MALARIA SPOROZOITE ANTIGEN IN MONKEYS:ADJUVANT EFFECTS OF ALUMINIUM HYDROXIDE ANF NON PYROGENIC LIPOSOMAL LIPID A. VACCINE (1989); 7 : 506.
- 295.- ALVING C.R.,RICHARDS R.L. LIPOSOMES CONTAINING LIPID A: A POTENT NONTOXIC ADJUVANT FOR A HUMAN MALARIA SPOROZOITE VACCINE. IMMUNOLOGICAL LETTERS (1990); 25 : 275.

- 296.- KOTANI S.,TSUJIMOTO M.,KOGA T.,NAGAO S.,TANAKA A.,KAWATA S. CHEMICAL STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITY RELATIONSHIP OF BACTERIAL CELL WALLS AND MURAMYL PEPTIDES. FEDERATION PROCEEDINGS (1986); 45 : 2534.
- 297.- DINARELLO C.A.,KRUEGER J.M. INDUCTION OF INTERLEUKIN 1 BY SYNTHETIC AND NATURALLY OCCURRING MURAMYL DIPEPTIDES. FEDERATION PROCEEDINGS (1986); 45 : 2545.
- 298.- TSUJIMOTO M.,KOTANI S.,SHIBA T.,KUSUMOTO S. ADJUVANT ACTIVITY OF 6-O-ACYLMURAMYLDIPEPTIDES TO ENHANCE PRIMARY CELLULAR AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN GUINEA PIGS: DOSE RESPONSE AND LOCAL REAC INFECTION IMMUNITY (1989); 53 : 517.
- 299.- FIDLER I.J. MACROPHAGES AND METASTASIS : A BIOLOGICAL APPROACH TO CANCER THERAPY. CANCER RESEARCH (1985); 45 : 47140
- 300.- CREAVEN P.J.,COWENS J.W.,BRENNER D.E.,DADEY B.M.,HANT.,HUBEN R.,KARAKOUSIS C.,FROST H., ET ALS. INITIAL CLINICAL TRIAL OF THE MACROPHAGE ACTIVATOR MURAMYL TRIPEPTIDE PHOSPHATIDYLETANOLAMINE ENCAPSULATED IN LIPOSOMES IN PATIENTS WITH ADVANCED C J.BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS. (1990); 9 : 492.
- 301.- CLARCK W.H.,ELDER D.E.,GUERRY D.,EPSTEIN M.,GREENE M.,VANHORN M. A STUDY OF TUMOR PREGRESSION : THE PRESURSOR LESIONS OF SUPERFICIA SPREADING AND NODULAR MELANOMA. HUMAN PATHOLOGY (1984); 15 : 1147- 1165.
- 302.- ELDER D.E.,GUERRY D.,EPSTEIN M.,ZENHGEBOT C.,LUSKY E.,VANHORN M.,CLARCK W. INVASIVE MALIGNANT MELANOMAS LACKING COMPTENCE FOR METASTASIS. AMM.J.DERMATOPHATOLOGY (1984); 6 : 55- 62.
- 303.- CLARK W.H.,ELDER D.E.,VANHORN M. THE BIOLOGIC FORMS OF MALIGNANT MELANOMA. HUMAN PATHOLOGY (1986); 17 : 443- 452.
- 304.- KOPROWSKI H.,STEPLEWSKI Z.,HERLYN D.,HERLYN M. STUDY OF ANTIBODIES AGAINST HUMAN MELANOMA PRODUCED BY SOMATIC CELL HYBRIDS. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1978); 75 : 3405- 3409.
- 305.- RETTING W.,REAL F.X.,SPENGLER B.A.,BIEBLER J.L.,OLD L. HUMAN MELANOMA PROTEOGLYCAN : EXPRESSION IN HYBRIDS CONTROLLED BY INTRINSIC AND EXTRINSIC

SIGNALS. SCIENCE (1986); 231 : 1281- 1284.

306.- HERLYN M.,CLARK W.,RODECK U.,MANCIANTI M.,JAMBROSIC J.,KOPROWSKI H. BIOLOGY OF TUMOR PROGRESSION IN HUMAN MELANOCYTES. LABORATORY INVESTIGATION (1987); 56 : 461- 474.

307.- REISFELD R.,CHERESH D. HUMAN TUMOR ANTIGENS. ADV.IMMUNOLOGY (1987); 40 : 323- 378.

308.- NATALI P.G.,CAVALIERE A.,BIGOTTI M.R.,NICOTRA C.,RUSSO A.,NG K.,GIACOMINI P.,FERRONE S. ANTIGENIC HETEROGENICITY OF SURGICALLY REMOVED PRIMARY AND AUTOLOGOUS METASTASIC HUMAN MELANOMA LESIONS. J.IMMUNOLOGY (1983); 130 : 1462- 1466.

309.- BUMOL T.F.,RESIFELD R.A. UNIQUE GLYCOPROTEIN-PROTEOGLYCAN COMPLEX DEFINED BY MONOCLONAL ANTIBODY ON HUMAN MELANOMA CELLS. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1982); 79 : 1245- 1249.

310.- HOUGHTON A.,EISINGER M.,ALBINO A.,CAIRNCROSS J.,OLD L.J. SURFACE ANTIGENS OF MELANOCYTES AND MELANOMAS MARKERS OF MELANOCYTE DIFFERENTIATION AND MELANOMA SUBSETS. J.EXP.MEDECINE (1982); 156 : 1755- 1766.

311.- HELLSTROM I.,GARRIGUES J.,CABASCO L.,MOSELY G.,BROWN J.,HELSTROM K. STUDIES OF HIGH MOLECULAR WEIGHT HUMAN MELANOMA ASSOCIATED ANTIGEN. J.IMMUNOLOGY (1983); 130 : 1467- 1472.

312.- CAIRNCROSS J.,MATTES M.,BERESFORD H.,ALBINO A.,HOUGHTON A.,LLOYD K.,OLD L.J. CELL SURFACE ANTIGENS OF HUMAN ASTROCYTOMAS DEFINED BY MOUSE MONOCLONAL ANTIBODIES: IDENTIFICATION OF ASTROCYTOMA SUBSETS. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1982); 79 : 5641- 5645.

313.- HERLYN M.,CLARK W.,MASTRANGELO M.,GUERRY D.,ELDER D.,LAROSSA D.,HAMILTON R.,BONDI E.,ET ALS. SPECIFIC IMMUNOREACTIVITY OF MONOCLONAL ANTI-MELANOMA ANTIBODIES TO CULTURED CELLS AND FREHSLY DERIVED HUMAN CELLS. CANCER RESEARCH (1980); 40 : 3602- 3609.

314.- HERLYN M.,STEPLEWSKI Z.,HERLYN D.,CLARK W.,ROSS A.,BLASZCZYK M.,PAK

K.,KOPROWSKI H. PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN MALIGNANT MELANOMA CANCER INVESTIGATION (1983); 1 : 215- 224.

315.- ZIAI M.,IMBERTI L.,NICOTRA M.,BADARACCO G.,SEGATTO O.,NATALI P.FERRONE S. ANALYSIS WITH MONOCLONAL ANTIBODIES OF THE MOLECULAR AND CELLULAR HETEROGENICITY OF HUMAN HIGH MOLECULAR WEIGHT MELANOMA ASSOCIATED ANTIGENS. CANCER RESEARCH (1987); 47 : 2474- 2480.

316.- DE VRIES J.,KEIZER G.D.,VELDE A.,VOORDOUW A,M.,RUITER D.,RUMKE P.,SPITS H.,FIGDOR C.G. CHARACTERIZATION OF MELANOMA ASSOCIATED SURFACE ANTIGENS INVOLVED IN THE ADHESION AND MOTILITY OF HUMAN MELANOMA CELLS. INT.J.CANCER (1986); 38 : 465- 473.

317.- HARPER J.R.,REISFELD R.A. INHIBITION OF ANCHORAGE INDEPENDENT GROWTH OF HUMAN MELANOMA CELLS BY A MONOCLONAL ANTIBODY TO A CHONDROITIN SURFACE PROTEOGLYCAN. J.NATL.CANCER INST. (1983); 71 : 259- 264.

318.- MITCHELL K.,FUHRER J.,STEPLEWSKI Z.,KOPROWSKI H. STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THE MELANOMA SPECIFIC ANTIGEN DETECTED BY MONOCLONAL ANTIBODY. MOLECULAR IMMUNOLOGY (1981); 18 : 207- 218.

319.- THOMPSON J.,HERLYN M.,ELDER D.,CLARK W.,STEPLEWIKI Z.,KOPROWSKI H. USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN DETECTION OF MELANOMA ASSOCIATED ANTIGENS IN INTACT HUMAN TUMORS. AMM.J.PATHOLOGY (1982); 107 : 357- 361.

320.- HERLYN M.,RODECK U.,MANCIANTI M.,CARDILLO F.,LANG A.,ROSS A.,JAMBROSIC J.,KOPROWSKI H. EXPRESSION OF MELANOMA ASSOCIATED ANTIGENS IN CULTURED RAPIDLY DIVIDING HUMAN MELANOCYTES. CANCER RESEARCH (1987); 47 : 3057- 3061.

321.- WOODBURRY R.G.,BROWN J.P.,LOOP S.M.,HELLSTRÖM K.,HELLSTRÖM I. ANALYSIS OF NORMAL NEOPLASTIC HUMAN TISSUES FOR THE TUMOR ASSOCIATED PROTEIN p97. INT.J.CANCER (1981); 27 : 145- 149.

322.- WOODBURRY R.G.,BROWN J.P.,YEH M.Y.,HELLSTRÖM K.E. IDENTIFICATION OF A CELL SURFACE PROTEIN p97 IN HUMAN MELANOMAS AND CERTAIN OTHER NEOPLASMS. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1981); 77 : 2183- 2187.

- 323.- BROWN J.P., WOODBURY R.R., HART C.E., HELLSTRÖM I., HELLSTRÖM K. QUANTITATIVE ANALYSIS OF MELANOMA ASSOCIATED ANTIGEN p97 IN NORMAL AND NEOPLASIC TISSUE. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA. (1981); 78 : 539- 543.
- 324.- BROWN J.P., NISHIYAMA K., HELLSTRÖM I., HELLSTRÖM K. STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF HUMAN MELANOMA ASSOCIATED ANTIGEN p97 WITH MONOCLONAL ANTIBODIES. J.IMMUNOLOGY (1981); 127 : 539- 546.
- 325.- BROWN J.P., HEWICK R.M., HELLSTRÖM I., HELLSTRÖM K., DOOLITTLE R., DREYER W.J., HUMAN MELANOMA ASSOCIATED ANTIGEN p97 IS STRUCTURALLY AND FUNCTIONALLY RELATED TO TRANSFERRIN. NATURE (1982); 296 : 171- 173.
- 326.- MOORE B.W. A SOLUBLE PROTEIN CHARACTERISTIC OF THE NERVOUS SYSTEM. BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1965); 19 : 739- 744.
- 327.- ISOBE T., TSUGITA A., OKUYAMA T. THE AMINO ACID SEQUENCE AND THE SUBUNIT STRUCTURE OF BOVINE BRAIN S100 PROTEIN J.NEUROCHEMISTRY (1978); 30 : 921- 923.
- 328.- GAYBOR R., IRIE R., MORTON D., HERSCHMANN H.R. S-100 PROTEIN IS PRESENT IN CULTURED HUMAN MALIGNANT MELANOMAS. NATURE (1980); 286 : 400- 401.
- 329.- WEISS S.W., LANGLOSS J.M., ENZINGER F.M. VALUE OF S-100 PROTEIN OF SOFT TISSUE TUMORS WITH PARTICULAR REFERENCE TO BENIGN AND MALIGNANT SCHWANN CELL TUMORS. LABORATORY INVESTIGATION (1983); 49 : 299- 308.
- 330.- TARAMELLI D., BALSARI A., FOSSATO G., AUICHINI A., GAMBACCORTI-PESSERINI C., KIRKWOOD J., PARMIANI G. IMMUNE RESPONSE TO AUTOLOGOUS HUMAN MELANOMA : IMPLICATION OF CLASS I AND II MHC PRODUCTS. BIOCHEM.BIOPHYS.ACTA (1986); 865 : 235- 251.
- 331.- NATALI P., BIGOTTI A., CAVALIERI R., NICOTRA M.R., TRECCE R., MANFREDI D., CHEN Y., NADLER L.M., ET ALS. GENE PRODUCTS OF THE HLA-D REGION IN NORMAL AND MALIGNANT TISSUES OF NONLYMPHOID ORIGIN. HUMAN IMMUNOLOGY (1986); 15 : 220- 233.
- 332.- REYNIER M., LEBEC S., ROHNER C., KALIL J., AUBERT C. Ia LIKE ANTIGEN EXPRESSION ON BIOLOGICALLY DIFFERENT HUMAN MELANOMA CELL LINES. EUR.J.CANCER CLIN.ONCOL.

(1984); 20 : 659- 665.

333.- RUITER D.J.,BERGMAN W.,WELVAART K.,SCHEFFER E.,VAN VLOTEN W.,RUSSO C.,FERRONE S. IMMUNO-HISTOLOGICAL ANALYSIS OF MALIGNANT MELANOMAS AND NEVOCELLULAR NEVI WITH MONOCLONAL ANTIBODIES TO DISTINCT MONOMORPHIC DETERMINANTS OF HLA ANT CANCER RESEARCH (1984); 44 : 3930- 3935.

334.- BROECKER E.B.,SUTER L.,SORG C. HLA-DR ANTIGEN EXPRESSION IN PRIMARY MELANOMAS OF THE SKIN. J.INVESTIGATION DERMATOLOGY (1984); 82 : 244- 247.

335.- GUERRY D.,ALEXANDER M.A.,HERLYN M.,ZEHNGEBOT L.M.,MITCHELL K.F.,ZMIJEWKI C.M.,LUSK E.J. HLA-DR HISTOCOMPATIBILITY LEUKOCYTE ANTIGENS PERMIT CULTURED HUMAN MELANOMA CELLS FROM EARLY BUT NOT AVANCED DISEASE TO STIMULATE AUTOLOGOUS LYMPHO J.CLINICAL INVESTIGATION (1984); 73 : 267- 271

336.- FOSSATI G.,TARAMELLI D.,DALSARI A.,BOGDANOVICH G.,ANDREOLA S.,PARMIANI G. PRIMARY BUT NOT STATIC HUMAN MELANOMA EXPRESSING DR ANTIGENS STIMULATE AUTOLOGOUS LYMPHOCYTES. INT.J.CANCER (1984); 33 : 591- 597.

337.- GUERRY D.,ALEXANDER M.A.,ELDER D.R.,HERLYN M. INTERFERON GAMMA REGULATED THE T-CELL RESPONSE TO PRECURSOR NEVI AND BIOLOGICALLY EARLY MELANOMA. J.IMMUNOLOGY (1987); 139 : 305- 312.

338.- THOMSON T.M.,MATTES M.,RANX L.,OLD L.J.,LLOYD K.O. PIGMENTATION ASSOCIATED GLYCOPROTEIN OF HUMAN MELANOMAS AND MELANOCYTES : DEFINITION WITH A MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY. J.INVESTIGATION DERMATOLOGY (1985); 85 : 169- 174.

339.- HAYASHIBE K.,MISHIMA Y.,ICHIHASHI M.,KAWAI M. MELANOSOMAL ANTIGENIC EXPRESSION ON THE CELL SURFACE AND INTRACELLULAR SUBUNITS WITHIN MELANOGENIC COMPARTMENTS OF PIGMENT CELLS : ANALYSIS BY ANTI J.INVESTIGATION DERMATOLOGY (1986); 87 : 89- 94.

340.- MAEDA K.,JIMBOW K. DEVELOPMENT OF MOAB HMSA-2 FOR MELANOSOMES OF HUMAN MELANOMA AND ITS APPLICATION TO IMMUNOHISTOPATHOLOGIC DIAGNOSIS OF NEOPLASTIC MELANOCYTES. CANCER (1987); 59 : 415- 423.

341.- NATALI P.G.,NICOTRA M.R.,BELLOCCI M.,CAVALIERE R.,BIGOTTI A. DISTRIBUTION OF

LAMININ AND COLLAGEN TYPE IV IN BENIGN AND MALIGNANT LESIONS OF MELANOCYTE ORIGIN. INT.J.CANCER (1985); 35 : 461- 467.

342.- NAKANISHI T.,HASHIMOTO K. THE DIFFERENTIAL REACTIVITY OF BENIGN AND MALIGNANT NEVO MELANOCYTIC LESIONS WITH MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY. CANCER (1987); 59 : 1340- 1344.

343.- NORONHA A.B.,HARPER J.,ILYAS A.,REISFELD R.,QUARLES R. MYELIN ASSOCIATED GLYCOPROTEIN SHARES AN ANTIGENIC DETERMINANT WITH A GLYCOPROTEIN OF HUMAN MELANOMA CELLS. J.NEUROCHEMISTRY (1986); 47 : 1558- 1565.

344.- HOUGHTON A.N.,CORDON CARDO C.,EISINGER M. DIFFERENTIATION ANTIGENS OF MELANOMA AND MELANOCYTES. INT.REV.EXP.PATHOLOGY (1986); 28 : 317- 329.

345.- REAL F.X.,HOUGHTON A.N.,ALBINO A.,CORDON CARDO C.,MELAMED M.,OETTGEN H.,OLD L. SURFACE ANTIGENS OF MELANOMA AND MELANOCYTES DEFINED BY MOUSE MONOCLONAL ANTIBODIES : SPECIFICITY ANALYSIS AND COMPARISON OF ANTIGENIC EXPRESSION I CANCER RESEARCH (1985); 45 : 4401- 4411.

346.- TSUCHIDA T.,SAXTON R.E.,MORTON D.L.,IRIE F. GANGLIOSIDES OF HUMAN MELANOMA. CANCER (1989); 63 : 1166- 1174.

347.- DIPPOLD W.,DIENNER H.,KNUTH A.,MEYER K. IMMUNOHISTOLOGICAL LOCALIZATION OF GANGLIOSIDE GD3 IN HUMAN MALIGNANT MELANOMA, EPITHELIAL TUMORS AND NORMAL TISSUES. CANCER RESEARCH (1985); 45 : 3699- 3705.

348.- CHERESH D.,HONSIK L.K.,STAFIILENO G.,REISFELD R. DISIALOGANGLIOSIDE GD3 ON HUMAN MELANOMA SERVES AS A RELEVANT TARGET ANTIGEN FOR MONOCLONAL ANTIBODY-MEDIATED TUMOR CYTOLYSIS. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1985); 82 : 5155- 5161.

349.- CARUBIA J.M.,YU R.K.,MACALLA L.J.,KIRKWOOD J.M.,VARGA J.M. GANGLIOSIDES OF NORMAL AND NEOPLASTIC MELANOCYTES. BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1984); 120 : 500- 504.

350.- THAMPOE I.J.,FURUKAWA K.,VELLVE E.,LLOYD K.O. SIALYL-TRANSFERASE LEVELS AND GANGLIOSIDE EXPRESSION IN MELANOMA AND OTHER CULTURED HUMAN CANCER CELLS.

CANCER RESEARCH (1989); 49 : 6258- 6264.

351.- RAVINDRANATH M.H., TSUCHIDA T., IRIE R.F. DIVERSITY OF GANGLIOSIDE EXPRESSION IN HUMAN MELANOMA. EN GANGLIOSIDES AND CANCER. VCH PUBLISHERS.(NEW YORK) (1989); 0 : 81- 91.

352.- RAVINDRANATH M.H., IRIE R.F. GANGLIOSIDES AS ANTIGENS OF HUMAN MELANOMA. EN MALIGNANT MELANOMA : BIOLOGY, DIAGNOSIS AND THERAPY. KLUWER ACADEMIC PLUB. (BOSTON) (1988); 0 : 17- 43.

353.- POURTAKALIAN J., ZWINGELSTEIN G., ABDULMALAK N. ALTERATION OF GANGLIOSIDES IN PLASMA AND RED CELLS OF HUMANS BEARING MELANOMA TUMORS. BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. (1978); 85 : 916- 920.

354.- TAI T., CAHAN L.D., PAULSON J.C. HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST GANGLIOSIDE GD2 : USE IN DEVELOPMENT OF ENZYME LINKED IMMUNOABSORBENT ASSAY FOR THE MONITORING OF ANTI-GD2 IN CAN J.NAT.CANCER INST. (1984); 73 : 627- 633.

355.- RAVINDRANATH M.H., PAULSON J.C., IRIE R.F. HUMAM MELANOMA ANTIGEN O-ACETYLATED GANGLIOSIDE GD3 IS RECOGNIZED BY CANCER ANTENNARIUS LECTIN. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1988); 263 : 2079- 2086.

356.- HERLYN D., KOPROWSKI H. IgG2a MONOCLONAL ANTIBODIES INHIBIT HUMAN TUMOR GROWTH THROUGH INTERACTIONS WITH EFFECTOR CELLS. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1982); 79 : 4762- 4765.

357.- ORLANDI R., GÜSSOW D., JONES P., WINTER G. CLONNING IMMUNOGLOBULINS VARIABLE DOMAINS FOR EXPRESSION BY THE PCR METHOD. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1989); 86 : 3833- 3837.

358.- HERLYN D., POWE J., GUERRY D., HERLYN M., KOPROWSKI H. INHIBITION OF HUMAN TUMOR GROWTH BY IgG2a MONOCLONAL ANTIBODIES CORRELATES WITH ANTIBODY DENSITY ON TUMOR CELLS. J.IMMUNOLOGY (1985); 134 : 1300- 1304.

359.- ILIOPOULOS D., ERNST C., STEPLEWSKI Z., JAMBORSIC J., RODECK U., HERLYN M., CLARK W., KOPROWSKI H. INHIBITION OF METASTASES OF A HUMAN MELANOMA XENOGRFT BY MONOCLONAL ANTIBODY TO THE GD2/GD3 GANGLIOSIDES. CANCER RESEARCH (1987) SUPL

1.

360.- MATZKU S., BROECKER E.B., BRUEGGEN J., DIPPOLD W., TILGEN W. MODES OF BINDING AND INTERNALIZATION OF MONOCLONAL ANTIMELANOMA ANTIBODIES. *CANCER RESEARCH* (1986); 46 : 384- 385.

361.- STEFFENS T.A., BAJORIN D.F., HOUGHTON A. IMMUNOTHERAPY WITH MONOCLONAL ANTIBODIES IN METASTATIC MELANOMA. *WORLD J. SURGERY* (1992); 16 : 261- 269.

362.- VANHAN R., CORDON-CARDO C., CARSWELL E., MINTZER D., DANTIS L., DUTEAU C., TEMPLETON M.A., ET ALS. PHASE I TRIAL OF A MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST GD3 GANGLIOSIDE IN PATIENTS WITH MELANOMA : INDUCTION OF INFLAMMATORY RESPONSES AT TUMOR SITES *J.CLIN.ONCOLOGY* (1988); 6 : 1636- 1644.

363.- DIPPOLD W.G., BERNHARD H., DIENES H.P., MEYER ZUM BÜSCHENFELDE K. TREATMENT OF PATIENTS WITH MALIGNANT MELANOMA BY MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST GANGLIOSIDES. *EUR.J.CANCER CLIN.ONCOL.* (1988); 24 : 65- 77.

364.- CHEUNG H.K.V., LAZARUS H., MIRALDI F.D., ABRAMOWSKI C.R., KALLICK S., SAARINEN U.M., ET ALS. GANGLIOSIDE GD2 SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY 3F8: A PHASE I STUDY IN PATIENTS WITH NEUROBLASTOMA AND MALIGNANT MELANOMA. *J.CLINICAL ONCOLOGY* (1987); 5 : 1430- 1441.

365.- BAJORIN D.F., CHAPMAN P.B., WONG G., DUTEAU C., CODY B., DANTIS L., TEMPLETON M.A., ET ALS. A PHASE I TRIAL OF HIGH-DOSE R24 MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY IN PATIENTS WITH METASTASIC MELANOMA. *PROS.AMM.ASSOC.CANCER RES.* (1991); 32 : 1577- 1579.

366.- SCROFF R.W., ANTON C.M., WOODHOUSE C.S., ABRAHMANS P.G., FARREL M.M., CARPENTER B.E. ET ALS. MONOCLONAL ANTIBODY THERAPY IN MALIGNANT MELANOMA : FACTORS EFFECTING IN VIVO LOCALIZATION. *J.BIOLOGICAL RESPONSE MOD.* (1987); 6 : 457- 463.

367.- GOODMAN G.E., BEAUMIER P.L., HELLSTRÖM I., FERNYHOUGH B., HELLSTRÖM K.E. PILOT TRIAL OF MURINE MONOCLONAL ANTIBODIES IN PATIENTS WITH ADVANCED MELANOMA. *J.CLINICAL ONCOLOGY* (1985); 3 : 340- 352.

- 368.- HELLSTRÖM I.,BROWN J.P.,HELLSTRÖM K.E. MONOCLONAL ANTIBODIES TO TWO DETERMINANTS OF MELANOMA ANTIGEN p97 ACT SYNERGISTICALLY IN COMPLEMENT DEPENDENT CYTOTOXICITY. J.IMMUNOLOGY (1981); 127 : 157- 162.
- 369.- LOMBERG M.,BAJORIN D.,CHEUNG N.R.,CORDON CARDO C.,DANTIS L.,TEMPLETON M.A.,ET ALS. PHASE I TRIAL OF A COMBINATION OF TWO MOUSE MONOCLONAL ANTIBODIES, ANTI-GD3 (R24) AND ANTI-GD2 (3F8) IN PATIENTS WITH MELANOMA AND SOFT TISSUE SARC. PROC.AMM.SOC.CLIN.ONCOLOGY (1988); 7 : 668- 672.
- 370.- NATHAN C.F. SECRETORY PRODUCTS OF MACROPHAGES. J.CLINICAL INVESTIGATION (1987); 79 : 319- 325.
- 371.- TUSHINSKI R.J.,OLIVER I.T.,GUILBERT L.J.,TYNAN P.W.,WARNER J.R.,STANLEY E.T. SURVIVAL OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES DEPENDS ON A LINEAGE SPECIFIC GROWTH FACTOR THAT THE DIFFERENTIATED CELLS SELECTIVELY DESTROY. CELL (1982); 28 : 71- 79.
- 372.- MUNN D.H.,CHEUBG N. PHAGOCYTOSIS OF TUMOR CELLS BY HUMAN MONOCYTES CULTURED IN RECOMBINANT MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR. J.EXPERIMENTAL MEDECINE (1990); 172 : 231- 245.
- 373.- SAMPSON-JOHANES A.,CARLINO J.A. ENHANCEMENT OF HUMAN MONOCYTES TUMORICIDAL ACTIVITY BY RECOMBINANT M-CSF. J.IMMUNOLOGY (1988); 141 : 3680- 3692.
- 374.- NATHAN C.,BRUCKER L.,KAPLAN G. ROLE OF ACTIVATED MACROPHAGES IN ANTIBODY DEPENDENT LYSIS OF TUMOR CELLS. J.EXPERIMENTAL MEDECINE (1980); 152 : 183- 194.
- 375.- MUNN D.H.,CHEUNG N. ANTIBODY DEPENDENT ANTITUMOR CYTOTOXICITY BY HUMAN MONOCYTES CULTURED WITH RECOMBINANT MACROPHAGE-COLONY STIMULATING FACTOR : INDUCTION OF EFFICIEN J.EXPERIMENTAL MEDECINE (1989); 170 : 511- 523.
- 376.- THOMASSON M.J.,BARNA B.P.,WERDERMANN H.P.,AHMADM. MODULATION OF HUMAN ALVEOLAR MACROPAHGE TUMORICIDAL ACTIVITY BY RECOMBINANT MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR. J.BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS (1990); 9 : 87- 103.
- 377.- BAJORIN D.J.,JAKUBOWSKI A.,CODY B.,MUNN D.,CHEUNG N.,URMACHER C.,DANTIS L. ET ALS. RECOMBINANT MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR : A PHASE I TRIAL

IN PATIENTS WITH METASTASIC MELANOMA. PROC.AMM.SOC.CLIN.ONCOLOGY (1990); 9 : 707- 712.

378.- SALEH M.N.,KHAZAEI M.B.,WHEELER R.H.,LIU T.,ALLEN L.,GRIZZLE W.,TILDEN A.B., ET ALS. A PHASE I TRIAL OF ANTI-GD2 CHIMERIC MONOCLONAL ANTIBODY C14.18 IN PATIENTS WITH METASTASIC MELANOMA : PHARMACO-KINETICS AND HUMAN IMMUNE RESPONSE. PROC.AMM.SOC.CLIN.ONCOLOGY (1991); 10 : 715- 727.

379.- TAI T.,CAHAN L.D.,TSUCHIDA T.,SAXTON R.,IRIE R.,MORTON D. IMMUNOGENICITY OF MELANOMA ASSOCIATED GANGLIOSIDES IN CANCER PATIENTS. INT.J.CANCER (1985); 35 : 607- 612.

380.- RAVINDRANATH M.H.,MORTON D.,IRIE R. AN EPITOPE COMMON TO GANGLIOSIDES O-ACETYL-GD3 AND GD3 RECOGNIZED BY ANTIBODIES IN MELANOMA PATIENTS AFTER ACTIVE SPECIFIC IMMUNOTHERAPY. CANCER RESEARCH (1989); 49 : 3891- 3897.

381.- LIVINGSTON P.,NATOLI E.,JONES CALVES M.,STOCKERT E.,OETTGEN H.,OLD LL. VACCINES COPNTAINING PURIFIED GM2 GANGLIOSIDE ELICIT GM2 ANTIBODIES IN MELANOMA PATIENTS. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1987); 84 : 2911- 2915.

382.- RITTER G.,BOOSFELD E.,ADLURI R.,CALVE M.,OETTGEN H.,OLD LL.,LIVIGSTON P. ANTIBODY RESPONSE TO IMMUNIZATION WITH GANGLIOSIDE GD3 AND GD3 CONGENERES (LACTONES, AMIDE AND GANGLIOSIDOL) IN PATIENTS WITH MALIGNANT MELANOMA. INT.J.CANCER (1991); 48 : 379- 385.

383.- FLOUTSIS G.,ULSH L.,LADISH S. IMMUNOSUPRESIVE ACTIVITY OF HUMAN NEUROBLASTOMA TUMOR GANGLIOSIDES. INT.J. CANCER (1989); 43 : 6- 9.

384.- MAGNANI J.L. MOUSE AND RAT MONOCLONAL ANTIBODIES DIRECTED AGAINST CARBOHYDRATES. METHODS ENZYMOLOGY (1987); 138 : 484- 491.

385.- OLD L.J. STRUCTURAL BASIS FOR TUMOR CELL RECOGNITION BY THE IMMUNE SYSTEM. EN PROGRESS IN IMMUNOLOGY VII. F.MELCHERS EDITOR. SPRINGER VERLAG (BERLIN) (1989); 4 : 1053- 1062.

386.- WATARAI S.,HANDA S.,TADAKAMA T.,YASUDA T. APPLICATION OF LIPOSOMES TO GENERATION OF MONOCLONAL ANTIBODY TO GLYCOSPHINGOLIPID. J.BIOCHEMISTRY (1987);

102 : 59- 67.

387.- ALIÑO S.F.,GARCIA SANZ M.,IRRUARRIZAGA A.,ALFARO J.,HERNANDEZ J. HIGH ENCAPSULATION EFFICIENCIES IN SIZED LIPOSOMES PRODUCED BY EXTRUSION OF DEHYDRATION - REHIDRATON VESICLES. J. MICRO-ENCAPSULATION (1990); 7 : 497- 503.

388.- NEW R.R.C. CHARACTERIZATION OF LIPOSOMES. EN LIPOSOMES A PRACTICAL APPROACH. IRL PRESS (OXFORD) (1916); 90 : 3- 105.

389.- MORRISON I.M. GLYCOLIPIDS EN CARBOHYDRATE ANALYSIS, A PRACTICAL APPROACH. IRL PRESS (OXFORD) (1986); 6 : 205- 222.

390.- NEW R.R.C. LIPOSOME EXTRACTION METHODS EN LIPOSOMES A PRACTICAL APPROACH. IRL PRESS (OXFORD) (1990); 5 : 256- 258.

391.- SONNINO S.,GHIDONI R.,GAZZOTTI G.,ACQUOTTI D.,TETTAMANTI G. NEW TRENDS IN GANGLIOSIDE CHEMISTRY EN THE MOLECULAR IMMUNOLOGY OF COMPLEX CARBOHYDRATES. PLENUM PRESS (NEW YORK) (1988); 7 : 437- 464.

392.- GEURST VAN KESSEL W.,HAX W.,DEMEL R.,GIER J. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHICSEPARATIONANDDIRECTULTRAVIOLETDETECTIONOFPHOSPHOLIPIDS. BIOCHEM.BIOPHYS.ACTA (1977); 486 : 524- 530.

393.- NEW R.R.C. CHEMICAL ANALYSIS OF LIPOSOMES EN LIPOSOMES A PRACTICAL APPROACH. IRL PRESS (OXFORD) (1990); 3 : 105- 124.

394.- HSU H.M.,RAINE L. PROTEIN A.,AVIDINE AND BIOTIN IN IMMUNOHISTOCHEMISTRY. J.HISTOCHEM.CYTOCHEMISTRY (1981); 29 : 1349- 1352.

395.- BUGELSKI P.J.,SOWINSKI J.M.,KIRSH R.L. NEGATIVE STAIN ELECTRON MICROSCOPY. EN LIPOSOMES A PRACTICAL APPROACH IRL PRESS (OXFORD) (1990); 4 : 140- 148.

396.- LEDEEN R.W.,YU R.K. GANGLIOSIDES . STRUCTURE ISOLATION AND ANALYSIS. METHODS ENZYMOLOGY (1982); 83 : 139- 191.

397.- WILLIAMS M.A.,McCLUER R.H. THE USE OF SEP-PAK C18 CARTRIDGES DURING ISOLATION OF GANGLIOSIDES. J.NEUROCHEMISTRY (1980); 35 : 266- 269.

398.- HAKOMORI S.I.,KANNAGI R. CARBOHYDRATE ANTIGENS IN HIGHER ANIMALS. EN IMMUNOCHEMISTRY BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS. (1986); 9 : 1- 39.

399.- MAGNANI J. IMMUNOSTAINING OF FREE OLIGOSACHARIDES DIRECTLY ON THIN LAYER CHROMATOGRAMS. METHODS ENZYMOLOGY (1987); 138 : 208- 212.

400.- RITTER G.,BOOSFELD E.,MARKSTEIN E.,YU R.,REN S.,STALLCUP W.,OETTGEN H.,OLD LL.,LIVINGSNTON P. BIOCHEMICAL AND SEROLOGICAL CHARACTERISTICS OF NATURAL 9-O-ACETYL-GD3 FROM HUMAN MELANOMA AND BOVINE BUTTERMILK AND CHEMICALLY O-ACETYLATED GD3. CANCER RESEARCH (1990); 50 : 1403- 1410.

401.- SPIK G. DETERMINATION OF THE CENTESIMAL COMPOSITION OF SUGARS. EUROPEAN C. OF GLYCOCONJUGATES (1992); 2 : 1- 6.

402.- GAZZOTTI G.,SONNINO S.,GHIDONI R. ISOLATION OF INDIVIDUAL GANGLIOSIDES HOMOGENEOUS LONG CHAIN BASE COMPOSITION. J.CHROMATOGRAPHY (1984); 315 : 395- 400.

403.- ITO M.,YAMAGATA T. A NOVEL GLYCOSPHINGOLIPID DEGRADING ENZYME CLEAVES THE LINKAGE BETWEEN THE OLIGOSACHARIDE AND CERAMIDE OF NEUTRAL AND ACIDIC GLYCOSPHINGOLIPIDS. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1986); 261 : 14278-14282.

404.- GRAY G.R. ANTIBODIES TO CARBOHYDRATES : PREPARATION OF ANTIGENS BY COUPLING CARBOHYDRATES TO PROTEINS BY REDUCTIVE AMINATION WITH CYANOBOROHYDRE. ARCH.BIOCHEM.BIOPHYS. (1974); 163 : 426- 434.

405.- THURIN J.,THURIN M.,KIMOTO Y.,HERLYN M.,LUDECK M.,ELDER D.,SMERRECYNSKA M.,KARLSSON A., ET ALS. MONOCLONAL ANTIBODY DEFIEND CORRELATIONS IN MELANOMA BETWEEN LEVELS OF GD2 AND GD3 ANTIGENS AND ANTIBODY MEDIATED CYTOTOXICITY. CANCER RESEARCH (1987); 47 : 1229- 1233.

406.- LEIBOVITZ A. DEVELOPMENT OF TUMOR CELL LINES. CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS (1986); 19 : 11- 19.

407.- ENGELHOML S.A.,SPANG-THOMSEN M.,BRÜNER N.,VINDELOV L.L. DISAGGREGATION OF HUMAN SOLID TUMORS BY COMBINED MECHANICAL AND ENZYMATIC METHODS. BR.CANCER (1985); 51 : 93- 98.

- 408.- GALANOS C.O.,LUDERITZ O.,WESTPHAL O. PREPARATION AND PROPERTIES OF ANTISERA AGAINST THE LIPID-A COMPONENT OF BACTERIAL LIPOPOLISACCHARIDES. EUROPEAN J. BIOCHEMISTRY (1971); 24 : 116- 125.
- 409.- MAHADIK S.P.,LAEV H.,RAPPORT M. PREPARATION AND SPECIFICITY OF 11 MONOCLONAL ANTIBODIES TO GM1 GANGLIOSIDE. J.NEUROCHEMISTRY (1986); 47 : 1172- 1175.
- 410.- MELTZER M.,NACY C. DELAYED TYPE HIPERSENSITIVITY AND INDUCTION OF ACTIVATED, CYTOTOXIC MACROPHAGES. EN FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY RAVEN PRESS LMTD. (NEW YORK) (1989); 28 : 765- 777.
- 411.- PTAK W.,HERZOG W.,ASKENASE P. DELAYED TYPE HIPERSENSITIVITY INITIATION BY ERALY ACTING CELLS THAT ARE ANTIGEN MISMATCHED OR MHC INCOMPATIBLE WITH LATE ACTING DELAYED TYPE HIPERS J.IMMUNOLOGY (1991); 146 : 469- 475.
- 412.- HELLSTRÖM I.,BRANKOVAN V.,HELLSTRÖM K.E. STRONG ANTITUMOR ACTIVITIES OF IgG3 ANTIBODIES TO A HUMAN MELANOMA ASSOCIATED GANGLIOSIDE. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA. (1985); 82 : 1499- 1502.
- 413.- MOSMANN T. RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELLULAR GROWTH AND SURVIVAL:APLICATION TO PROLIFERATION AND CYTOTOXICITY ASSAYS. J.IMMUNOLOGICAL METHODS (1983); 65 : 55- 62.
- 414.- ESSIG-MARCELLO J.S.,VAN BUSKIRK G. A DOUBLE LABEL IN IN SITU CYTOTOXICITY ASSAY USING THE FLUORESCENT PROBES NEUTRAL RED AND BCECF-AM. IN VITRO TOXICOLOGY (1990); 3 : 219- 227.
- 415.- WELT S.,CARSWELL E.A.,VOGEL C.W.,OETTGEN H.,OLD LL. IMMUNE AND NON-IMMUNE EFFECTOR FUNCTIONS OF IgG3 MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY R24 DETECTING THE DISIALOGANGLIOSIDE GD3 ON THE SURFACE OF MELANOMA CELL CLINICAL IMMUNOL.IMMUNOPATHOLOGY (1987); 45 : 214- 229.
- 416.- DIPPOLD W.,BERNHARD H. IMMUNORECOGNITION OF GANGLIOSIDE EPITOPES: CORRELATION BETWEEN AFFINITY AND CYTOTOXICITY OF GANGLIOSIDE ANTIBODIES. EUROPEAN J.CANCER (1992); 28 : 1605- 1610.

- 417.- KABAT E. CARBOHYDRATES AS ANTIGENS AND IMMUNOGENS : SIZE, SHAPE AND NATURE OF CARBOHYDRATE EPITOPES AND IDIOTOPES POLYSACCHARIDE VACCINES. EN TOWARDS BETTER JOHN WILEY AND SONS. (LONDRES) (1987); 7 : 75- 97.
- 418.- MACLEOD C.M., HODGES R.G., HEIDELBERGER M., BERNHARD W.G. PREVENTION OF PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA BY IMMUNIZATION WITH SPECIFIC CAPSULAR POLYSACCHARIDES. J. EXPERIMENTAL MEDICINE (1945); 82 : 445- 465.
- 419.- PIKE B.L., ALDERSON M.R., NOSSAL G. T-INDEPENDENT ACTIVATION OF SINGLE B CELLS. IMMUNOLOGICAL REVIEWS (1987); 99 : 119- 152.
- 420.- HOWARD J.G. T CELL INDEPENDENT RESPONSES TO POLYSACCHARIDES : THEIR NATURE AND DELAYED ONTOGENY. EN TOWARDS BETTER CARBOHYDRATE VACCINES. JOHN WILEY AND SOONS. (LONDRES) (1987); 16 : 221- 231.
- 421.- PERLMUTTER R.M., HAMBURG D., BRILES D.E., NICOLOTTI R.A., DAVIE J.M. SUBCLASS RESTRICTION OF MURINE ANTI-CARBOHYDRATE ANTIBODIES. J. IMMUNOLOGY (1978); 121 : 566- 572.
- 422.- SCHACKELFORD P.G., NELSON S., PALMA A., NAHM M. HUMAN ANTIBODIES TO GROUP A STREPTOCOCCAL CARBOHYDRATE. ONTOGENY, SUBCLASS RESTRICTION AND CLONAL DIVERSITY. J. IMMUNOLOGY (1988); 140 : 3200- 3205.
- 423.- BRILES D., DAVIE J.M. CLONAL DOMINANCE I RESTRICTED NATURE OF THE IgM ANTIBODY RESPONSE TO GROUP A STREPTOCOCCAL CARBOHYDRATE IN MICE. J. EXPERIMENTAL MEDICINE (1975); 141 : 1291- 1304.
- 424.- KLAUSS G.G.B., HUMPHREY J.H. THE IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF HAPTENS COUPLED TO THYMUS INDEPENDENT CARRIER MOLECULES. EUROPEAN J. IMMUNOLOGY (1974); 4 : 370- 376.
- 425.- SCHRATER A., GOIDL E., THORBECKE J., SISKIND G. PRODUCTION OF AUTO-ANTI-IDIOTYPIC DURING THE NORMAL IMMUNE RESPONSE TO TNP-FICOLL. J. EXPERIMENTAL MEDICINE (1979); 150 : 808- 812
- 426.- VICARI G., COURTENAY B.M. RESTRICTED AVIDITY OF THE IgM ANTIBODY RESPONSE TO DEXTRAN B512 IN MICE. IMMUNOCHEMISTRY (1977); 14 : 253- 261.

427.- WOOD C.,FERNANDEZ C.,MOLLER G. POTENTIATION OF THE PFC RESPONSE TO THYMUS INDEPENDENT ANTIGENS BY HETEROLOGOUS ERYTHROCYTES. SCANDINAVIAN J. IMMUNOLOGY (1982); 16 : 293- 304.

428.- DEL GUERCIO P. EFFECTS OF ADJUVANTS ON THE ANTIBODY RESPONSE TO A HAPTEN ON A THYMUS INDEPENDENT CARRIER. NATURE NEW BIOLOGY (1972); 238 : 213- 219.

429.- HOWARD J.G.,CHRISTIE G.H.,SCOTT M.T. BIOLOGICAL EFFECTS OF CORYNEBACTERIUM PARVUM. IV.- ADJUVANT AND INHIBITORY EFFECTS ON B LYMPHOCYTES. CELLULAR IMMUNOLOGY (1973); 7 : 290- 302.

430.- ISHIOKA G.,LAMONT A.,THOMSON D.,BULBOW N.,GAETA F.,SETTE A.,GREY H.M. MHC INTERACTION AND T CELL RECOGNITION OF CARBOHYDRATES AND GLYCOLIPIDS. J.IMMUNOLOGY (1992); 148 : 2446- 2451.

431.- MORENO C.,LIFELY M.R.,ESDAILE J. IMMUNITY AND PROTECTION OF MICE AGAINST NEISSERIA MENINGITIDIS GROUP B BY VACCINATION, USING POLYSACCHARIDE COMPLEXED WITH OUTER MEMBRANE PROTEINS: INFECTION IMMUNITY (1985); 47 : 527- 532.

432.- BELLAMY A.,DAVISON A.,FELDMAN M. DERIVATION OF GANGLIOSIDE SPECIFIC T CELL LINES OF SUPPRESSOR OR HELPER PHENOTYPE FROM CEREBROSPINAL FLUID OF MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS. J.NEUROIMMUNOLOGY (1986); 12 : 107- 118.

433.- HENNINGSSON C.M.,SELVARAJ G.D.,MACLEAN M.R.,SURESH A.,NOUJAIM A.,LONGENECKER B. T CELL RECOGNITION OF A TUMOR ASSOCIATED GLYCOPROTEIN AND ITS SYNTHETIC CARBOHYDRATE EPITOPES : STIMULATION OF ANTICANCER T CELL IMMUNITY IN VIVO. CANCER IMMUNOL.IMMUNOTHERAPY (1987); 25 : 231- 244.

434.- JACKSON S.,FOLKS T.M.,WETTERSKOG D.L.,KINDT T.J. A RABBIT HELPER T CELL CLONE REACTIVE AGAINST GROUP SPECIFIC STREPTOCOCCAL CARBOHYDRATE. J.IMMUNOLOGY (1984); 133 : 1553- 1661.

435.- PALESTINI P.,MASSERINI M.,FIORILLI A.,CALAPPI E.,TETTAMANTI G. EVIDENCE FOR NONRANDOM DISTRIBUTION OF GD1a GANGLIOSIDE IN RABBIT BRAIN MICROSOMAL MEMBRANES. J.NEUROCHEMISTRY (1991); 57 : 748- 753.

436.- MASSERINI M.,GIULIANI A.,PELAESTINI P.,ACQUOTTI D.,PITTO M.,CHIGORNO

V.,TETTAMANTI G. ASSOCIATION TO HELA CELLS AND SURFACE BEHAVIOR OF EXOGENOUS GANGLIOSIDES STUDIED WITH A FLUORESCENT DERIVATIVE OF GM1. *BIOCHEMISTRY* (1990); 29 : 697- 701.

437.- SINGHAL A.,HAKOMORI S.I. MOLECULAR CHANGES IN CARBOHYDRATE ANTIGENS ASSOCIATE WITH CANCER. *BIOESSAYS* (1990); 12 : 223- 230.

438.- PALESTINI P.,MASSERINI M.,SONNINO S.,GIULIANI A.,TETTAMANTI G. CHANGES IN THE CERAMIDE COMPOSITION OF RAT FOREBRAIN GANGLIOSIDES WITH AGE. *J.NEUROCHEMISTRY* (1990); 54 : 230- 235.

439.- SYMINGTON F.W.,BERNSTEIN I.D.,HAKOMORI S.I. MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR LACTOSYLCERAMIDE. *J.BIOLOGICAL CHEMISTRY* (1984); 259 : 6008- 6012.

440.- KANNAGIR.,STROUP R.,COCHRAN N.A,URDAL D.L.,YOUNG W.,HAKOMORI S.I. FACTORS AFFECTING EXPRESSION OF GLYCOLIPID TUMOR ANTIGENS: INFLUENCE OF CERAMIDE COMPOSITION AND COEXISTING GLYCOLIPID ON THE ANTIGENICITY OF GANGL. *CANCER RESEARCH* (1983); 43 : 4997- 5005.

441.- GREGORIADIS G. IMMUNOLOGICAL ADJUVANTS: A ROLE FOR LIPOSOMES *IMMUNOLOGY TODAY* (1990); 11 : 89- 97.

442.- GREGORIADIS G.,DAVIS D.,DAVIES A. LIPOSOMES AS IMMUNOLOGICAL ADJUVANTS: ANTIGEN INCORPORATION STUDIES. *VACCINE* (1987); 5 : 145.

443.- HARADA Y.,SAKATSUME M.,NOES G.A.,HAKOMORI S.I.,TANIGUCHI S.I. DENSITY OF GM3 WITH NORMAL PRIMARY STRUCTURE DETERMINES MOUSE MELANOMA ANTIGENICITY : A NEW CONCEPT OF TUMOR ANTIGEN. *JAPAN J.CANCER RESEARCH* (1989); 80 : 988- 992.

444.- LIVINGSTON P.,DELEO A.B.,JONES M.,OETTGEN H.F.,OLD L.J. COMPARISON OF APPROACHES FOR AUGMENTING THE SEROLOGICAL RESPONSE TO THE METH-A ANTIGEN. *J.IMMUNOLOGY* (1983); 131 : 2601- 2612.

445.- LIVINGSTON P.,JONES M.,DELEO A.B.,OETTGEN H.F.,OLD L.J. THE SEROLOGICAL RESPONSE TO METH A SARCOMA VACCINES AFTER CYCLOPHOSPHAMIDE TREATMENT IS FURTHER INCREASED BY VARIOUS ADJUVANTS. *J.IMMUNOLOGY* (1985); 135 : 1505- 1509.

446.- LIVINGSTON P.,JONES CALVES M.,NATOLI E.J. APPROACHES TO AUGMENTING THE IMMUNOGENICITY OF THE GANGLIOSIDE GM2 IN MICE : PURIFIED GM2 IS SUPERIOR TO WHOLE CELLS. J.IMMUNOLOGY (1987); 138 : 1524- 1529.

447.- SMITH D.F.,GINDSBURG V. ANTIBODIES AGAINST SIALYL-OLIGOSACCHARIDES COUPLED TO PROTEIN. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1980); 255 : 55- 59.

448.- SHIGETA K.,ITO Y.,OGAWA T.,KIRIHATA Y.,HAKOMORI S.I.,KANNAGI R. MONOCLONAL ANTIBODIES DIRECTED TO CHEMICALLY SYNTHESIZED LACTOGANGLIOTETRAOSYL CERAMIDE, A LEUKEMIA-ASSOCIATED ANTIGEN HAVING A NOVEL BRANCHING STRU J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1987); 262 : 1358- 1362.

449.- BRODIN T.,DAHMEN J.,NILSSON B.,MESSTER L.,MARTENSSON S.,HELDRUP J.,SJODREN H.,LUNDBLAD A. MONOCLONAL ANTIBODIES PRODUCED BY IMMUNIZATION WITH NEOGLYCOPROTEINS CONTAINING GAL α 1-->4GAL β 1-->4GLC β -->0 AND GAL α 1-->4GAL β 1-->4GLCNAC β -0 RESIDUE INTERNATIONAL J.CANCER (1988); 42 : 185- 194.

450.- NUDELMAN E.,HAKOMORI S.I.,KANNAGI R.,LEVERY S.B.,YEH M.Y.,HELLSTROM K.E.,HELLSTROM I. CHARACTERIZATION OF HUMAN MELANOMA ASSOCIATED GANGLIOSIDE ANTIGEN DEFINED BY A MONOCLONAL ANTIBODY. J.BIOLOGICAL CHEMISTRY (1982); 257 : 12752-12756.

450.- OOSTERWIJK E.,KALISIAK A.,WAKKA C.,SCHEINBERG D.A.,OLD LL. MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST PK (CD77) PRODUCED WITH A SYNTHETIC GLYCOCONJUGATE AS IMMUNOGEN: REACTIVITY WITH CARBOHYDRATES, WITH FRESH HUMAN TISS INTERNATIONAL J.CANCER (1991); 48 : 848- 854.

451.- NORES G.A.,DOHIT.,TANIGUCHI M.,HAKOMORI S.I. DENSITY DEPENDENT RECOGNITION OF CELL SURFACE GM3 BY A CERTAIN ANTI-MELANOMA ANTIBODY, AND GM3 LACTONE AS A POSSIBLE IMMUNOGEN. J.IMMUNOLOGY (1987); 139 : 3171- 3176.

452.- RITTER G.,BOOSFELDE.,CALVES M.J.,OETTGEN H.F.,OLD L.J.,LIVINGSTON P. ANTIBODY RESPONSE TO IMMUNIZATION WITH PURIFIED GD3 GANGLIOSIDE AND GD3 DERIVATIVES (LACTONES,AMIDE,AND GANGLIOSIDOL) IN THE MOUSE. IMMUNOBIOLOGY (1990); 182 : 32- 43.

453.- YAMAGUCHI H.,FURUKAWA F.,FORTUNATO S.R.,LIVIGNSTON P.,LLOYD K.O.,OETTGEN H.F.,OLD L.J. CELL SURFACE ANTIGENS OF MELANOMA RECOGNIZED BY HUMAN

MONOCLONAL ANTIBODIES. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1987); 84 : 2416- 2420.

454.- SEIGLER H.F.,WALLACK M.K.,VERVAERT C.E.,BASH J.A.,ROBERSON M.K.,STUHMILLER G.M. MELANOMA PATIENT'S ANTIBODY RESPONSE TO MELANOMA TUMOR ASSOCIATED ANTIGENS DEFINED BY MURINE MONOCLONAL ANTIBODIES. J.BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS (1989); 8 : 37- 52.

455.- PORTOUKALIAN J.,CARREL S.,DORE J.F.,RÜMKE P. AND EORTC COOPERATIVE MELANOMA GROUP. HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN DISEASE-FREE ADVANCED MELANOMA PATIENTS AFTER VACCINATION WITH MELANOMA ASSOCIATED GANGLIOSIDES. INT.J.CANCER (1991); 49 : 893- 899.

456.- SELA B.A.,ILIOPOULUS D.,GUERRY D.,HERLYN D.,KOPROWSKI H. LEVELS OF DISIALOGANGLIOSIDES IN SERA OF MELANOMA PATIENTS MONITORED BY SENSITIVE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND IMMUNOSTAINING. J.NATIONAL CANCER INSTITUTE (1989); 81 : 1489- 1492.

457.- MORENO C. CARBOHYDRATES AS IMMUNOGENS AND TOLEROGENS. ANTIBODY VERSUS CELL MEDIATED IMMUNE RESPONSES. EN TOWARDS BETTER CARBOHYDRATE VACCINES. JOHN WILEY AND SONS (NEW YORK) (1987); 19 : 263- 277.

458.- IWAMORI M.,HARPIN M.L.,LACHAPPELLE F.,BAUMANN N. BRAIN GANGLIOSIDES OF QUAKING AND SHIVEVER MUTANTS. J.NEUROCHEMISTRY (1985); 45 : 73- 78.

459.- SEYFRIED T.N.,GLASER G.H.,YU R.K. GENETIC VARIABILITY FOR REGIONAL BRAIN GANGLIOSIDES IN FIVE STRAINS OF YOUNG MICE. BIOCHEM.GENET. (1979); 17 : 43- 49.

460.- LIVINGSTON P. EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDIES WITH ACTIVE SPECIFIC IMMUNOTHERAPY. EN IMMUNITY TO CANCER II J.LISS (NEW YORK) (1989); 309- 322.

- 161.- KLARK D., HAMMERLING G.J. STRUCTURE OF ASSEMBLY OF MHC CLASS I HEAVY CHAINS WITH β 2MICROGLOBULIN BY INTERFERON GAMMA. EMBO J. (1989); 8 : 475- 481.
- 162.- HERLYN M.,KOPROWSKI H. MELANOMA ANTIGENS : IMMUNOLOGICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND CLINICAL SIGNIFICANCE. ANNUAL REV.IMMUNOLOGY (1988); 6 : 283- 308.
- 163.- HELLSTROM K.E.,HELLSTROM I. ONCOGENE-ASSOCIATED TUMOR ANTIGENS AS TARGETS FOR IMMUNOTHERAPY FASEB J. (1989); 3 : 1715- 1722.
- 164.- WEINBERG R.A. ONCOGENES AND THE MOLECULAR BASIS OF CANCER. HARVEY LECT. (1985); 80 : 129- 136.
- 165.- BARBACID M. HUMAN ONCOGENES. REV.CLIN.ESPAÑOLA (1986); 179 : 412- 427.
- 166.- CHAN V.,McGHEE J.O. CELLULAR ONCOGENES IN NEOPLASIA. J.CLINICAL PATHOLOGY (1987); 40 : 1055- 1063.
- 167.- CHAN S.,SIKORA K. THE POTENTIAL OF ONCOGENE PRODUCTS AS TUMOR MARKERS. CANCER SURV. (1987); 6 : 185- 207.
- 168.- HELDIN C.H.,JONHSSON A.,WENNERGREN S.,WERNSTEDT C.,BETSHOLTZ C.,WESTERMARK B. A HUMAN OSTEOSARCOMA CELL LINE SECRETES A GROWTH FACTOR STRUCTURALLY RELATED TO A HOMODIMER OF PDGF A-CHAINS. NATURE (1986); 319 : 511- 514.
- 169.- BOS J.L. THE RAS GENE FAMILY AND HUMAN CARCINOGENESIS. MUTATION RESS. (1988); 195 : 255- 271.
- 170.- MES-MASSON A.M.,McLAUGHLIN J.,WITTE O. MOLECULAR CLONING AND SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF AN ALTERED C-ABL GENE PRODUCT IN Ph1 CML PATIENTS. HAEMATOL.BLUTTRANSFUS. (1987); 31 : 163- 166.
- 171.- SJODREN H.O.,HELLSTROM I.,KLEIN G. TRANSPLANTATION OF POLIOMA VIRUS INDUCED TUMORS IN MICE. CANCER RESEARCH (1961); 21 : 329- 337.
- 172.- HABEL K. IMMUNOLOGICAL DETERMINANTS OF POLYOMA VIRUS ONCOGENESIS.

J.EXPERIMENTAL MEDECINE (1962); 115 : 181- 193.

173.- HELLSTROM I. DISTINCTION BETWEEN THE EFFECTS OF ANTIVIRAL AND ANTICELLULAR POLYOMA ANTIBODIES ON POLYOMA TUMOR CELLS. NATURE (1965); 208 : 652- 653.

174.- BRACIALE T.,MORRISON L.A.,SWEETSER M.T.,SAMBROCK J.,GETHING M.J.,BRACIALE V.L. ANTIGEN PRESENTATION PATHWAYS TO CLASS I AND CLASS II MHC RESTRICTED T LYMPHOCYTES. IMMULOGICAL REV. (1987); 98 : 95- 114.

175.- LIVIGNSTON D.M.,BRADLEY M.K. THE SIMIAN VIRUS 40 LARGE T ANTIGEN. A LOT PACKED INTO A LITTLE. MOL.BIOL.MEDECINE (1987); 4 : 63- 80.

176.- REEDMAN B.M.,KLEIN G. CELLULAR LOCALIZATION OF AN EPSTEIN-BARR VIRUS ASSOCIATED COMPLEMENT FIXING ANTIGEN IN PRODUCER AND NON PRODUCER LYMPHOBLASTOID CELL LINES. INT.J.CANCER (1973); 11 : 499- 520.

177.- GALLO R.C. HUMAN T-CELL LEUKEMIA (LYMPHOTROPIC) RETROVIRUS AND THEIR CAUSATIVE ROLE IN T-CELL MALIGNANCES AND ADQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SINDROME. EN ACCOMPLI J.P. LIPPINCOTT EDS. FILADELFIA (1985); 76- 87.

178.- ZUR HAUSSEN H. PAPILOMAVIRUS IN HUMAN CANCER. CANCER (1987); 59 : 1691- 1696.

179.- ALBINO A.P. PARADOX OF RAS ONCOGENES IN MALIGNANT MELANOMA. PIGMENT CELL RESS. SUPL. (1988); 1 : 169- 179.

181.- BARGMANN C.I.,HUNG M.C.,WIENBERG R.A. THE NEU ONCOGENE ENCODES AN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR RELATED PROTEIN. NATURE (1986); 319 : 226- 230.

182.- VAN DE VIJVER M.J.,MOOI W.J.,WISMAN P.,PETERSE J.L.,NUSSE R. IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF THE NEU PROTEIN IN TISSUE SECTIONS OF HUMAN BREAST TUMORS WITH AMPLIFIED NEU DNA. ONCOGENE (1988); 2 : 175- 178.

183.- DREBIN J.A.,LINK V.C.,GREENE M.I. MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR THE NEU ONCOGENE DIRECTLY MEDIATE ANTI-TUMOR CITOTOXICITY. ONCOGENE (1988); 2 : 387- 394.