

EXPRESIÓN DEL GANGLIÓSIDO N-GLICOLIL GM3 EN TUMORES MALIGNOS DE PACIENTES CUBANOS: UN APORTE IMPRESCINDIBLE PARA LA EXTENSIÓN DE LA INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER DIRIGIDA CONTRA ESTE BLANCO.

Autoría principal: Rancés Blanco Santana¹

Otros autores: Enrique Rengifo Calzado, Adriana Carr Pérez, Mercedes Cedeño Arias, Charles E. Rengifo González y Milagros Frómeta Campanón

Colaboradores: Damián Blanco Santana, Xiomara Escobar Pérez, Rosa Irene Álvarez Goyanes, Yisel Quintana Tamayo, Marta Osorio Rodríguez, Zailí Gutiérrez Aleaga, Janet Lamadrid García, Martha C. Ríos Castillo y Carmen Viada González

Centro de Inmunología Molecular (CIM). Calle 216, esq. 15, Atabey, Playa. AP 16040. Habana 11600, Cuba. Fax: (537) 2720644. Teléfono: (537) 2143133.

¹Autor de correspondencia. Correo electrónico rances@cim.sld.cu

Otra entidad participante: Hospital Clínico-Quirúrgico “Manuel Fajardo”

Lic. Rancés Blanco Santana (25%). Licenciado en Tecnología de la Salud perfil Citohistopatología y Diplomado en Histología. Evaluación histológica de las muestras de tejido adulto normal. Diseño, ejecución y análisis microscópico de los ensayos de inmunohistoquímica en muestras de tejido adulto normal y tumoral. Evaluación de los resultados y toma de microfotografías representativas. Redacción de los manuscritos. Autor principal de las 6 publicaciones y presentación de los resultados en la mayoría de los eventos científicos.

Dr.C. Enrique Rengifo Calzado (20%). Investigador Titular y Profesor Titular de Histología. Toma de las muestras de tejido adulto normal y evaluación histológica de las mismas. Diseño y análisis microscópico de los ensayos de inmunohistoquímica en muestras de tejido adulto normal y tumoral. Evaluación de los resultados. Asesoría científica y revisión final de los manuscritos. Co-autor de las 6 publicaciones y presentación de los resultados en varios eventos científicos.

Dra.C. Adriana Carr Pérez (20%). Investigadora Titular. Investigadora de proyectos relacionados con los gangliósidos como blancos para la inmunoterapia. Concibió la hipótesis de trabajo y el diseño general de la investigación. Además, participó en la evaluación y discusión de los resultados. Asesoría científica y revisión final de los manuscritos. Co-autora de las 6 publicaciones.

Ms.C. Mercedes Cedeño Arias (15%). Investigadora Agregada y Profesora Auxiliar de Histología. Toma de las muestras de tejido adulto normal y evaluación

histológica de las mismas. Consulta de casos. Asesoría científica y revisión final de los manuscritos. Co-autora de las 6 publicaciones.

Dr. Charles E. Rengifo González (15%). Especialista de 1er Grado en Anatomía Patológica, Profesor Auxiliar de Anatomía Patológica, Profesor Asistente de Histología y Profesor Principal de la asignatura Anatomía Patológica. Diagnóstico anatomo-patológico y selección de todas las muestras de tejido tumoral empleadas en este trabajo. Consulta de casos. Co-autor de las 6 publicaciones.

Téc. Milagros Frómata Campanón (5%). Técnica en Anatomía Patológica. Corte y coloración con hematoxilina y eosina (H/E) de todas las muestras de tejidos tumorales. Procesamiento, inclusión, corte y coloración con H/E de las muestras de tejido adulto normal. Co-autora de 5 publicaciones.

RESUMEN

En estudios previos, se demostró la expresión aberrante del gangliósido N-glicolil GM3 (NeuGcGM3) en carcinomas de mama, melanoma cutáneo y carcinomas de células no pequeñas de pulmón (CCNPP). Los resultados de la expresión de NeuGcGM3 en cáncer de mama por métodos bioquímicos, así como su detección inmunohistoquímica con el empleo del anticuerpo monoclonal (AcM) 14F7 (IgG1 murina que reconoce con elevada especificidad a este gangliósido) recibieron premios de la Academia de Ciencias en los años 1997 y 2003, respectivamente. Sin embargo, en la actualidad la expresión de este antígeno tumor-asociado no ha sido evaluada en otras neoplasias malignas. En este trabajo se evalúa por primera vez la expresión de NeuGcGM3 en un gran número de tumores malignos (423) con la utilización del AcM 14F7. Particularmente, se incluyeron en este estudio neoplasias malignas con una pobre supervivencia, alta incidencia, baja respuesta a las terapias estándares y/o de difícil acceso a las mismas por nuestro país (Ej. adenocarcinomas de estómago, páncreas, colon, ovario y próstata, tumores cerebrales de alto grado, sarcomas y metástasis ganglionares y a distancia de diferentes tumores). Adicionalmente, se confirmó la expresión de NeuGcGM3 en los tumores previamente reportados (101), así como su presencia limitada en las muestras de tejido adulto normal (79). De estos resultados se derivaron 6 publicaciones internacionales en revistas biomédicas y condujeron al inicio de ensayos clínicos con las vacunas: Vaxira® (Racotumomab) en tumores de colon y NGcGM3/VSSP en tumores de estómago, ovario y sarcoma de partes blandas. Además, permitieron sustentar la continuación de las terapias anti-NeuGcGM3 en pacientes con cáncer de mama, melanoma y CCNPP, así como el empleo del AcM 14F7 murino como una herramienta útil para la selección de los pacientes candidatos a estas terapias específicas. En la actualidad, cerca de 1692 pacientes se encuentran en ensayos clínicos o reciben alguna de estas terapias anti-NeuGcGM3 de forma compasional.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

Las alteraciones en la expresión y/o composición gangliosídica de las células tumorales han convertido a estas moléculas en blancos atractivos para la inmunoterapia del cáncer (1). Los gangliósidos portadores de la variante N-glicolilada del ácido neuramínico, aunque se encuentran ampliamente distribuidos entre las diferentes especies de mamíferos, tienen una presencia muy limitada en tejidos normales humanos, por lo que constituyen antígenos tumor-asociados (2).

En estudios previos, se reportó la expresión aberrante del gangliósido N-glicolil GM3 (NeuGcGM3) en tumores de mama empleando cromatografía de capa fina y espectrometría de masa (3). Posteriormente, se generó en nuestro centro el anticuerpo monoclonal (AcM) 14F7, una IgG1 murina que reconoce con elevada especificidad al gangliósido NeuGcGM3. Adicionalmente, se publicó el reconocimiento del AcM 14F7 en tumores de mama y melanoma, así como su reacción limitada en el tejido normal, empleando métodos inmunohistoquímicos (4). Estos resultados se confirmaron en un ensayo clínico de inmunolocalización *in vivo* en tumores de la mama con el empleo del AcM 14F7 marcado con ^{99m}Tc (5). Más recientemente, se reportó la expresión de NeuGcGM3 en el carcinoma de células no pequeñas de pulmón (CCNPP) (6), con la utilización del AcM 14F7. Estos atributos convirtieron al AcM 14F7 y al gangliósido NeuGcGM3 en un sistema atractivo en el diseño de las nuevas terapias antitumorales. Sin embargo, hasta el presente la expresión de NeuGcGM3 no ha sido evaluado en otras neoplasias malignas.

En la actualidad, el centro cuenta con diferentes modalidades terapéuticas dirigidas contra este antígeno tisular, entre las que se encuentran las vacunas NGcGM3/VSSP (7) y Vaxira® (Racotumomab, 1E10) (8). Estas vacunas terapéuticas se encuentran en ensayos clínicos o registrados para el tratamiento de los tumores malignos mencionados anteriormente.

Adicionalmente, las versiones terapéuticas en potencia (quimérica y humanizada) del AcM 14F7 se encuentran en fase de desarrollo (9,10). Por estos motivos, la evaluación de la expresión de NeuGcGM3 en otras localizaciones tumorales y subtipos histológicos, permitiría el diseño y aplicación de tratamientos específicos y personalizados dirigidos contra esta molécula diana.

Resultados

La expresión de NeuGcGM3 se evaluó en 524 muestras de tumores malignos a través de métodos inmunohistoquímicos con el empleo del AcM 14F7. Del total de muestras, 423 corresponden a nuevas localizaciones y subtipos histológicos, mientras que 101 pertenecen a la re-evaluación de la expresión de NeuGcGM3 en cáncer de mama, melanoma cutáneo y CCNPP. Adicionalmente, se incluyeron en

este estudio 79 muestras procedentes de tejidos humanos normales. Los resultados que se describen a continuación llevaron un examen riguroso por microscopía óptica para la selección de las muestras de tejido adulto normal y tumoral basado en las características morfológicas de cada tejido y de los cambios distintivos que ocurren durante la transformación maligna de las células. La evaluación microscópica de los ensayos de inmunohistoquímica fueron analizados por al menos dos observadores expertos.

La expresión del gangliósido N-Glicolil GM3 en muestras de tejido adulto normal fue limitada

La representatividad y el grado de preservación morfológica de las muestras de tejido normal se evaluaron por microscopía óptica empleando la coloración con hematoxilina y eosina. Para los estudios de inmunohistoquímica, solamente se emplearon las muestras de tejido que mostraron la arquitectura habitual. No se detectó expresión de NeuGcGM3 en 71/79 (89,9%) de estas muestras de tejido, excepto por una expresión restringida a las células glandulares del estómago y sus secreciones (3/8), al estroma y los vasos sanguíneos del ovario (3/5) y a los túbulos contorneados del riñón (2/6). La especificidad de esta reacción se confirmó a través de la ausencia de inmunotinción en los cortes de tejidos incubados con la solución de lavado (TBS), empleado como control negativo.

La expresión del gangliósido N-glicolil GM3 es abundante en muestras de tumores malignos de diferentes orígenes

La evaluación de la expresión de NeuGcGM3 en tumores malignos se dirigió fundamentalmente a la búsqueda de subtipos histológicos con pobre supervivencia, alta incidencia, baja respuesta a las terapias estándares y/o de difícil acceso por nuestro país, con la finalidad de explorar el uso potencial de terapias específicas anti-NeuGcGM3 en estas neoplasias malignas.

La expresión de NeuGcGM3 se observó como un reconocimiento homogéneo y finamente granular del AcM 14F7 y se localizó fundamentalmente en la membrana plasmática de las células tumorales, aunque también se evidenció una reactividad adicional en el citoplasma de las mismas. En general, la expresión de NeuGcGM3 se detectó en 392/524 (74,8%) de las muestras, independientemente del tipo histológico y de la localización. En cuanto a los nuevos tipos tumorales evaluados, la expresión de este gangliósido se evidenció en 294/423 (69,5%). Los resultados detallados de la expresión de NeuGcGM3 en las muestras de tejido tumoral se muestran en la Tabla 1.

Una elevada expresión de NeuGcGM3 en más del 50% de las células tumorales se evidenció en los adenocarcinomas de: unión gastroesofágica (2/2), estómago (12/12), páncreas (8/8) (Figura 1A y B), colon (12/12), así como hepatocarcinoma (13/14). Resultados similares se obtuvieron en el carcinoma de células transicionales de vejiga (8/9), adenocarcinomas de endometrio (4/7) y próstata (17/20), así como en la mayoría de los adenocarcinomas de ovario (22/35). La expresión aberrante de NeuGcGM3 también se evidenció en los astrocitomas de

alto grado (9/13) (Figura 1C y D), en los sarcomas (25/30) (Figura 1E y F) y linfomas (33/37). Adicionalmente, se evidenció una expresión elevada de NeuGcGM3 en las metástasis ganglionares (42/47), así como en las metástasis a distancia evaluada (6/9).

Impacto científico

En este trabajo se reporta por primera vez la expresión del gangliósido Nglicolil GM3 en 423 nuevas muestras de tumores malignos, correspondientes a 68 entidades procedentes de más de 18 órganos distintos, así como su presencia limitada en las muestras de tejido adulto normal (79) de 17 órganos distintos. Particularmente, se reporta la expresión de este gangliósido en un grupo de tumores malignos con una pobre supervivencia, alta incidencia, baja respuesta a las terapias estándares y/o de difícil acceso a las mismas en nuestro país (Ej. adenocarcinomas de estómago, páncreas, colon, ovario y próstata, tumores cerebrales de alto grado, sarcomas y metástasis). Adicionalmente, se confirma la elevada expresión de este gangliósido en el melanoma cutáneo, en el carcinoma de la mama y en carcinoma de células no pequeñas de pulmón (122).

Impacto social

Para el tratamiento del cáncer, las estrategias terapéuticas actuales son cada día más personalizadas y están basadas en la expresión tisular de antígenos tumor-asociados. Los resultados de este trabajo conducen a la potencial aplicación de una terapia personalizada en estos tumores malignos, a través de vacunas terapéuticas y/o anticuerpos monoclonales humanizados producidos en el Centro de Inmunología Molecular dirigidos contra esta molécula diana. Los datos obtenidos en este trabajo permiten considerar el uso del AcM murino 14F7 a través de métodos inmunohistoquímicos para la selección de los pacientes candidatos a estas terapias específicas dirigidas contra NeuGcGM3, lo que conlleva a un manejo clínico más adecuado de los mismos. El conocimiento de la expresión de las moléculas blanco es un indicador para la evaluación de la eficacia de las vacunas terapéuticas según lo establecido recientemente en la guía sobre consideraciones clínicas de las vacunas terapéuticas emitida por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA, del inglés Food and Drug Administration) (11).

Grado de introducción en la práctica

Los resultados obtenidos en este trabajo condujeron al inicio de ensayos clínicos con las vacunas terapéuticas: Vaxira® (Racotumomab) en tumores de colon (Fase III) y NGcGM3/VSSP en tumores de estómago (Fase I), colon (Fase II), ovario (Fase I) y sarcoma de partes blandas (Fase I). Adicionalmente, permitieron sustentar la continuación de las terapias anti-NeuGcGM3 en pacientes con cáncer de mama (Fase IIb-III), melanoma (Fase I-II), así como la continuidad del tratamiento con Vaxira® en el carcinoma de células no pequeñas de pulmón. Actualmente, cerca de 1692 pacientes se encuentran en estos ensayos clínicos o reciben alguna de estas terapias anti-NeuGcGM3 de forma compasional.

Referencias bibliográficas

- (1) Zhang S, Cordon Cardo C, Zhang HS, Reuter VE, Adluri S, Hamilton WB y cols. Selection of carbohydrate tumour antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry. I. Focus on gangliosides. *Int J Cancer* 1997; 73:42-49.
- (2) Watarai S, Kushi Y, Shigeto R. Production of monoclonal antibodies directed to hanganutziu deicher active gangliosides, nglycolylneuraminic acidcontaining gangliosides. *J. Biochem.* 1995; 117: 1062-9.
- (3) Marquina G, Waki H, Fernández LE, Kon K, Carr A, Valiente O y cols. Gangliosides Expressed in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 1996; 56:5165-5171.
- (4) Carr A, Mullet A, Mazorra Z, Vázquez AM, Alfonso M, Mesa C y cols. A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* 2000; 19:241-247.
- (5) Oliva JP, Valdés Z, Casacó A, Pimentel G, González J, Álvarez I y cols. Clinical evidences of GM3 (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14f7 monoclonal antibody labelled with (99m) tc. *Breast. Cancer Res. Treat.* 2006; 96: 115-21.
- (6) Van Cruijssen H, Gallegos Ruiz M, Van der Valk P, D de Gruijl T, Giaccone G. Tissue micro array analysis of ganglioside N-glycolyl GM3 expression and signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 activation in relation to dendritic cell infiltration and microvessel density in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2009; 9:180.
- (7) de la Torre A, Hernandez J, Ortiz R, Cepeda M, Perez K, Car A y cols. NGlycolylGM3/VSSP Vaccine in Metastatic Breast Cancer Patients: Results of Phase I/IIa Clinical Trial. *Breast Cancer (Auckl)*. 2012; 6:151-7.
- (8) Alfonso S, Diaz RM, de la Torre A, Santiesteban E, Aguirre F, Pérez K y cols. 1E10 antiidiotype vaccine in non-small cell lung cancer: experience in stage IIIb/IV patients. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6(12):1847-52.
- (9) Roque-Navarro L, Chakrabandhu K, de León J, Rodríguez S, Toledo C, Carr A y cols. Antiganglioside antibody-induced tumor cell death by loss of membrane integrity. *Mol. Cancer Ther.* 2008; 7:2033-2041.
- (10) Fernández-Marrero Y, Roque-Navarro L, Hernández T, Dorvignit D, Molina-Pérez M, González A y cols. A cytotoxic humanized anti-ganglioside antibody

produced in a murine cell line defective of N-glycosylated-glycoconjugates. Immunobiology 2011; 16(12): 1239-47.

(11) FDA. Guidance for Industry: Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines. 2011. Disponible en:

<http://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/vaccines/ucm278673.pdf>

Tabla 1. Expresión tisular del gangliósido N-glicolil GM3 en tumores malignos.

Clasificación histopatológica	No. casos (%)
Piel	
Melanoma*	28/28 (100)
Carcinoma (epidermoide y basal)	6/21 (28,6)
Sistema digestivo	
Carcinoma epidermoide de esófago	3/13 (23,1)
Adenocarcinoma de la unión gastroesofágica	2/2 (100)
Adenocarcinoma de estómago	12/12 (100)
Adenocarcinoma de páncreas	8/8 (100)
Hepatocarcinoma	13/14 (92,8)
Adenocarcinoma de colon	12/12 (100)
Carcinoma del canal anal (epidermoide y basaloide)	9/12 (75,0)
Sistema genito-urinario	
Carcinoma de células renales	12/38 (31,6)
Carcinoma de células transicionales de vejiga	8/9 (88,8)
Adenocarcinoma de mama*	41/42 (97,6)
Adenocarcinoma de ovario	22/35 (62,8)
Adenocarcinoma de endometrio	4/7 (57,1)
Carcinoma epidermoide del cervix	1/7 (14,3)
Adenocarcinoma de próstata	17/20 (75,0)
Seminoma clásico	4/5 (80,0)
Sistema respiratorio	
Carcinoma epidermoide de nasofaringe	13/14 (92,8)
Carcinoma de pulmón*	29/31 (93,5)
Sistema nervioso	
Astrocitomas de bajo grado (I-II)	3/9 (33,3)
Astrocitomas de alto grado (III-IV)	9/13 (69,2)
Neuroblastoma	4/5 (80,0)
Otros tumores	3/19 (15,8)
Sistema endocrino	
Carcinoma de tiroides	23/25 (92,0)
Sarcomas	25/30 (83,3)
Linfomas	33/37 (89,2)
Metástasis	
Ganglios linfáticos	42/47 (89,4)
Distancia	6/9 (66,7)

Leyenda: No: número; %: por ciento; * tumores malignos evaluados previamente por otros autores.

En este trabajo estas neoplasias malignas fueron re-evaluados en nuevos casos.

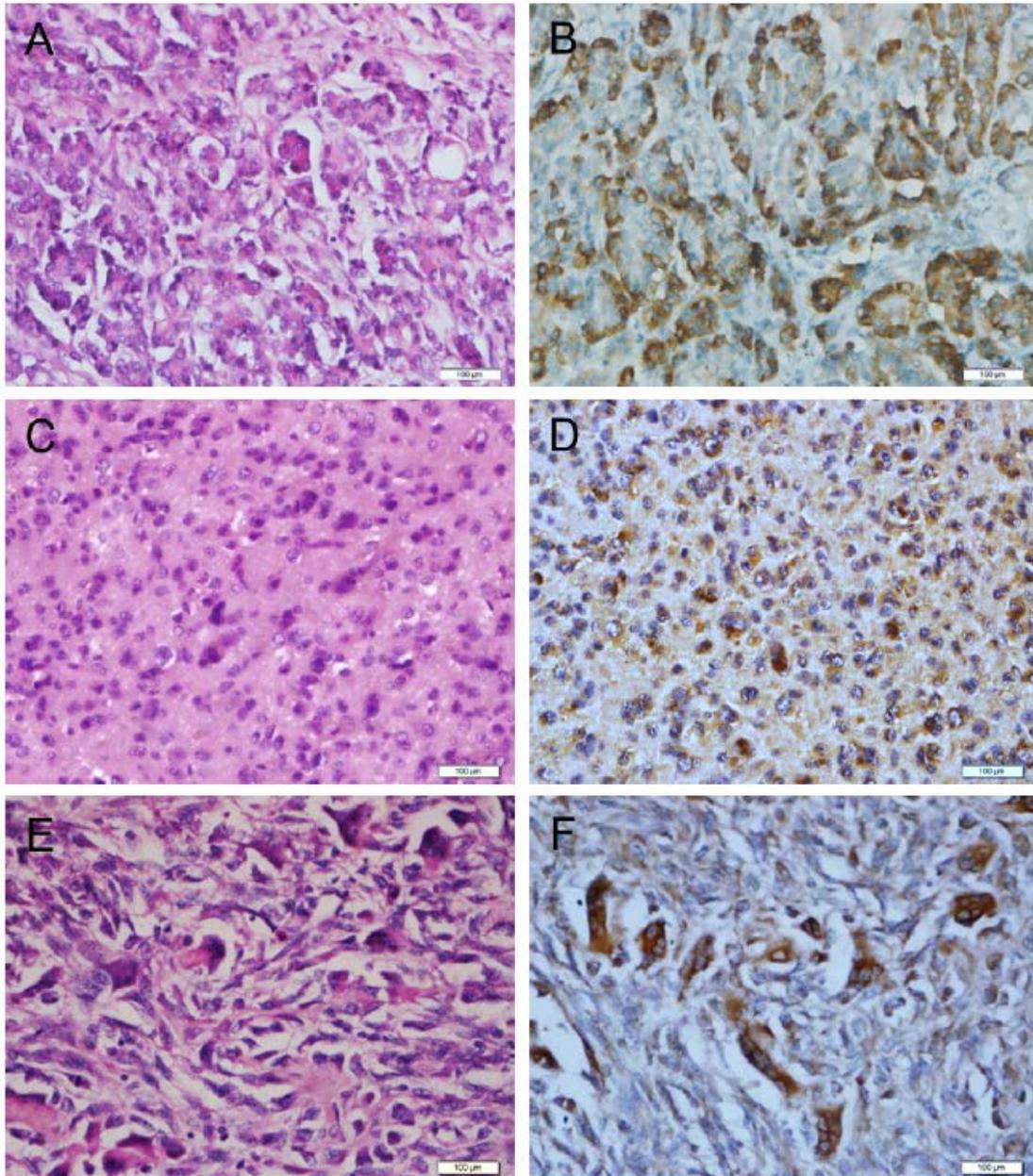


Figura 1. Expresión del gangliósido N-glicolil GM3 en muestras de tumores malignos. A, C y E: Coloración con hematoxilina y eosina de adenocarcinoma de páncreas, astrocitoma anaplásico y osteosarcoma, respectivamente. B, D y F: Reactividad tisular del AcM 14F7 específico por el gangliósido N-glicolil GM3. Observe: expresión elevada de NeuGcGM3 en las células malignas (color carmelita). Contratinción con Hematoxilina de Mayer (color azul). Barra blanca = 100 µm.