Interferón y Biotecnología, Vol. 3, No. 2, 125-138 (1986)

Utilización de líneas celulares de cáncer mamario humano en la obtención de anticuerpos monoclonales que reconocen tejido tumoral

ALICIA FERNÁNDEZ[1]; CARMEN HERMIDA[2]; JORGE GAVILONDO[1]; CARLOS GARCÍA[1] e IRENE ALVAREZ[1]

1) **Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR), Ministerio de Salud Pública (MINSAP), 29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba.**

2) **Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", MINSAP, 200 y 17, Siboney, La Habana, Cuba.**

Recibido el 3 de enero de 1986

RESUMEN

Trabajos recientes dirigidos a la obtención de anticuerpos monoclonales contra células de cáncer mamario humano, reportan la generación de reactivos potencialmente útiles en la definición del linaje de tumores de origen dudoso, la detección de metástasis ganglionares, la radiolocalización de lesiones, la formación de subgrupos de pacientes con tumores de probable comportamiento biológico diferente y el tratamiento inmunológico del cáncer mamario.

En este artículo se describe la obtención de cultivos de hibridomas secretores de anticuerpos que reconocen líneas de cultivo de cáncer mamario humano y tejido tumoral. Estos se generaron mediante la hibridización de células P3/x63-Ag8-653, con células esplénicas de ratones Balb/cHab inmunizados con tres líneas de cáncer mamario humano. En el tamizaje de los anticuerpos y la definición de su reconocimiento tisular se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Se discute el valor de las líneas celulares como inmunógeno, el sistema empleado para el tamizaje de anticuerpos y la caracterización de su reconocimiento, así como la posible relevancia de los patrones de identificación obtenidos en los cortes histológicos de tumores mamarios benignos, malignos y en lesiones metastásicas ganglionares.

SUMMARY

Recent work devoted to the obtention of monoclonal antibodies against human breast cancer cells, has originated reagents potentially useful in the definition of the tissue lineage of tumors with unknown origin, the detection of lymphnode metastases, the radiolocalization of lesions, the formation of subsets of patients with tumors of probable different biological behaviour, and the immunological treatment of breast cancer.

Copyright © 1986, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón
Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba

The present article describes the obtention of hybridoma cultures that secrete antibodies that recognize human breast cancer cell lines and tumor tissue. These were generated through the hybridization of P3/x63-Ag8-653 cells and splenic cells of mice immunized with three human breast cancer cell lines. In the screening of antibodies and the definition of their tissue recognition characteristics we employed the technique of indirect immunofluorescence.

The article discusses the value of culture cell lines as immunogens, the screening system employed for the detection of antibodies and the characterization of their recognition, and the possible relevance of the patterns of identification obtained in histological sections of benign and malignant mammary tumors, as well as in the metastatic lymphnode lesions.

INTRODUCCION

La tecnología de generación de hibridomas B secretores de anticuerpos monoclonales (AcM) de especificidad predeterminada (Köhler y Milstein, 1975; Köhler, 1981; Waldman y Milstein, 1982) ha aumentado extraordinariamente las posibilidades de definición inmunológica de nuevos marcadores tumorales, celulares o circulantes, de aplicación en el mejoramiento de los métodos de clasificación y diagnóstico del cáncer y en el diseño de esquemas de inmunoterapia antitumoral específica (Damjanov y Knowles, 1983).

La especial importancia del cáncer mamario por su incidencia mundial, así como el impacto positivo que en el manejo de esta enfermedad han tenido ya algunos marcadores tumorales de tipo bioquímico (Schottenfeld, 1981; Pascual *et al.*, 1984) han hecho que un conjunto de trabajos recientes se hayan dirigido a la obtención de AcM contra células de cáncer mamario humano; varios autores han reportado la obtención de AcM potencialmente útiles en la definición del linaje de tumores de origen dudoso y la detección de lesiones metastásicas ganglionares (Colcher *et al.*, 1981; Menard *et al.*, 1983; Canevari *et al.*, 1983; Papsidero *et al.*, 1983; Karsten *et al.*, 1983). Otros resultados apuntan hacia el posible empleo de AcM en la radiolocalización de lesiones (Colcher *et al.*, 1983) y el tratamiento inmunológico del cáncer mamario (Capone *et al.*, 1983).

Por último, la formación de "paneles" de AcM que reconocen antígenos tumor-asociados más o menos restringidos, comienza a esbozarse en esta y en otras entidades como una forma práctica de aplicación de estos reactivos en la formación de subconjuntos de pacientes con lesiones indistinguibles histológicamente, pero de distinto perfil antigénico, y por tanto, con diferente pronóstico (Horan Hand *et al.*, 1983; Fradet *et al.*, 1984).

En el presente trabajo reportamos la obtención de cultivos de hibridomas secretores de anticuerpos que reconocen líneas celulares de cáncer mamario humano y tejido tumoral mamario maligno, benigno y/o metastásico. Estos cultivos se generaron mediante la hibridización de células de mieloma murino con células esplénicas de ratones inmunizados con líneas celulares de cáncer mamario humano.

MATERIALES Y METODOS

Líneas celulares

En la tabla 1 se muestra una relación de las líneas celulares utilizadas en este trabajo para el proceso de inmunización *in vivo*, la hibridización celular y el tamizaje de los anticuerpos. La tabla incluye datos sobre su origen, condiciones de cultivo y procedencia.

Tabla 1

LINEAS CELULARES UTILIZADAS EN LOS EXPERIMENTOS

Denominación	*Tejido de origen*	*Medio de cultivo*	*Referencia*
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamario humano	SRPMI+I+15% SFBi	Cailleau *et al.*, 1978
MDA-MB-157	Carcinoma medular mamario humano	SRPMI+I+15% SFBi	Cailleau *et al.*, 1978
MDA-MB-468	Tumor mamario humano	SRPMI+I+15% SFBi	Cailleau *et al.*, 1978
MDA-MB-435-S	Tumor mamario humano	SRPMI+I+15% SFBi	Cailleau *et al.*, 1978
MCF-7	Carcinoma ductal infiltrante (tipo escirro) humano	SRPMI+I+15% SFBi	Soule *et al.*, 1973
KB	Carcinoma epidermoide oral humano	Mc Coy 5A +10% SB+P-E	Eagle, 1955
NEURO-F	Neuroblastoma humano	Mc Coy 5A +10% SB+P-E	Lombardero *et al.*, 1984
P3/X63. Ag8.6.5.3.	Mieloma de ratón Bal b/c, HAT-sensible	SRPMI+2-ME+10% SFBi	Kearney *et al.*, 1979

Nota: *SRPMI*= Medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 26 mM de CO_3HNa, 18 mM de HEPES, 2 mM de L-Glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 100 U-100 ug/ml de penicilina-estreptomicina (P-E, Difco); *I*= 10 ug/ml de insulina; *SB*= suero bovino; *SFBi*= suero fetal bovino (Difco) inactivado; *2-ME*= 2 mercaptoetanol.

Inmunización

Para la inmunización específica se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-157 y MCF-7. Las suspensiones de células libres con más de 90% de viabilidad (azul tripan) se prepararon mediante el tratamiento de los cultivos subconfluentes con solución de tripsina 0,25%-EDTA 0,02% en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF), pH 7,2, la remoción de las células y dos lavados por centrifugación a baja velocidad y resuspensión en SRPMI. Las concentraciones deseadas se ajustaron finalmente en 1 ml de SSTF y se inocularon por vía intraperitoneal a tres grupos de ratones Balb/cHab, siguiendo el esquema: 5×10^6 células/animal en los días 0, 7 y 14, y 2×10^6 células/animal en el día 60.

Obtención de hibridomas

Para la generación de hibridomas por fusión se empleó la metodología reportada en otros trabajos (Köhler, 1981; García *et al.*, 1984), con algunas modificaciones. Tres días después de la última inmunización se sacrificó un animal de cada grupo y se obtuvieron las células esplénicas mediante la perfusión del bazo con SRPMI. Estas y las células del mieloma P3/653, provenientes de cultivos en crecimiento exponencial, se lavaron separadamente en tres ocasiones por centrifugación a baja velocidad y resuspensión en SRPMI, se ajustaron a las concentraciones deseadas y se mezclaron en proporción 10:1.

Luego de una nueva centrifugación y la decantación total de sobrenadante, el botón celular desagregado se resuspendió en 60 segundos con 0.5 ml de una solución al 50% de polietilenglicol 1500. Después de una breve incubación a 37°C durante tres minutos y con agitación, la suspensión celular se diluyó gota a gota con SRPMI precalentado, se dejó reposar diez minutos y se suplementó con 2-ME y SFBi hasta 5×10^{-5} M y 15%, respectivamente, distribuyéndose a razón de 150 μl por pozo de placas Costar 3596 (densidad final de 10^5 células por pozo). A cada pozo se le añadió además 10^4 células de exudado peritoneal de ratón Balb/cHab. Los cultivos se incubaron a 37°C y en atmósfera de 5% CO_2-95% aire durante la noche y al siguiente día se les adicionó una mezcla de hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) hasta concentraciones finales de 10^{-4}, 4×10^{-7} y $1{,}6 \times 10^{-5}$ M por pozo, respectivamente.

A partir de ese momento, los cultivos fueron alimentados en días alternos con medio fresco SRPMI-HAT, conteniendo 15% de SBi, restringiéndose luego los cambios a aquellos pozos que en los primeros 15 días manifestaron un adecuado crecimiento de hibridomas.

Ensayo de anticuerpos (Ac) en los sobrenadantes de cultivo

Se realizó primeramente un tamizaje en líneas celulares con muestras del medio de cultivo metabolizado por los hibridomas que crecieron en los pozos, seguido de un estudio en cortes de tejido con los sobrenadantes provenientes de la expansión de los cultivos antes seleccionados por su reconocimiento. En ambos casos, el método empleado fue la inmunofluorescencia indirecta (IFI).

a) **IFI en líneas celulares**

Esta se realizó esencialmente como descrito por Lane y Lane (1981), en cultivos confluentes de líneas celulares humanas creciendo en placas Petri Costar de 60 x 15 mm. Las células fueron fijadas en acetona-metanol (1:1) durante diez minutos y luego del secado al aire, 5 μl de cada sobrenadante de cultivos de hibridomas se depositaron separadamente sobre el tapiz celular con ayuda de una cuadrícula dibujada en el fondo de la placa. Después de una incubación de 30 minutos en cámara húmeda y a temperatura ambiente, las placas se lavaron con SSTF y se realizó una segunda incubación con suero de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Meloy), en las mismas condiciones de temperatura y tiempo.

Después de varios lavados con SSTF y agua destilada, se recortaron las áreas a examinar, se fijaron a portaobjetos y, se montaron con cubreobjetos para su estudio en un microscopio de fluorescencia Ortholux-II (Leitz). Los resultados se expresaron de forma semicuantitativa sobre la base de la intensidad de la reacción, teniendo como controles el suero de los animales inmunizados específicamente, muestras de medio de cultivo no metabolizado y sobrenadante de un clon de hibridomas no relacionado (IOR-T1, García *et al.*, 1984).

b) **IFI en cortes de tejidos**

Los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas seleccionados en el tamizaje en líneas celulares se ensayaron para su reconocimiento de tejidos mamarios tumorales malignos y benignos, así como de lesiones metastásicas ganglionares de primarios de mama, todos obtenidos y diagnosticados en el Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. Se prepararon de 25 a 35 cortes por criostato de cada muestra y en caso de no procederse a la IFI inmediatamente, estos se almacenaron a -70°C. Para la IFI, el tejido sin fijación fue incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente con SRPMI suplementado con 15% de SBi, seguido por la reacción con el sobrenadante en condiciones similares a las descritas en *a)*. Luego de varios lavados con SSTF, se procedió a un segundo bloqueo con suero de conejo y a partir de éste, los pasos de la técnica coinciden con aquellos descritos para la IFI en líneas celulares. Los resultados del análisis de la fluorescencia se expresaron de forma cualitativa, utilizando los mismos controles descritos anteriormente, excepto el IOR-T1.

RESULTADOS

A partir de las tres fusiones de las células de mieloma P3/653 con las células esplénicas de los ratones inmunizados con las líneas de cáncer mamario humano, se originaron cultivos primarios de hibridomas, de los cuales 112 fueron sometidos a un tamizaje primario por el método de IFI sobre un panel de siete líneas de cultivo humanos que incluían cinco derivadas de cáncer mamario, una de carcinoma oral y una proveniente del cultivo de un neuroblastoma. Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 2; los hibridomas se agruparon de acuerdo con tres formas de comportamiento de sus sobrenadantes: (I) los 22 cultivos cuyos anticuerpos reconocieron fuertemente al menos una de las líneas de cáncer mamario, junto a dos que, además, presentaron reacción cruzada con las células KB (uno de estos reconoció moderadamente a las células Neuro-F); (II) aquellos 79 cuyos sobrenadantes reconocían débilmente las líneas de cáncer mamario y/o reaccionaban fuertemente con células Neuro-F, y (III) un último grupo de 9 hibridomas que no reconocían ninguna línea celular.

Tabla 2

CLASIFICACION DE LOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE HIBRIDOMAS A PARTIR DEL TAMIZAJE PRIMARIO EN LINEAS CELULARES POR IFI

	Sobrenadantes que reconocen fuertemente las líneas de cáncer mamario	22/112 (19,6%)
(I)	Sobrenadantes que reconocen fuertemente las líneas de cáncer mamario, la línea KB y algún reconocimiento en células Neuro-F	2/112 (1,8%)
(II)	Sobrenadantes con débil reconocimiento frente a las líneas de cáncer mamario y/o con fuerte reacción cruzada frente a la línea Neuro-F	79/112 (70,5%)
(III)	Sobrenadantes que no mostraron ningún reconocimiento	9/112 (8,0%)

En la tabla 3 se presenta de manera detallada el patrón semicuantitativo de fluorescencia de los anticuerpos secretados por los 24 hibridomas correspondientes al grupo (I), clasificado según la línea de cáncer mamario humano que fue utilizada en la inmunización, y por tanto, provenientes

de fusiones independientes. Se observó que predominaron los anticuerpos que reconocen a la línea MDA-MB-468, aunque las reacciones más intensas se detectaron sobre la superficie de la línea MCF-7. La localización de la fluorescencia fue en todos los casos sobre estructuras superficiales de las células blanco reconocidas. Existió una alta reactividad cruzada para las líneas de cáncer mamario; todos los sobrenadantes reconocieron al menos dos de ellas y el 83,3% reconocían tres o más líneas. Los cultivos de hibridomas denominados CaMa 7, CaMa 9, CaMa 12 y CaMa 16 identificaron antígenos presentes en todas las líneas de cáncer mamario; el CaMa 16 además reaccionó con células KB y Neuro-F.

Se observa que la cantidad de cultivos de hibridomas provenientes de cada fusión independiente incluidos en el grupo (I) por sus características de reconocimiento, fue muy semejante, aunque los derivados de la fusión con células esplénicas de ratones inmunizados con MCF-7 manifestaron las reacciones cruzadas más intensas entre las líneas mamarias. Por último, en cuatro casos (señalados por un asterisco en la tabla) se obtuvieron cultivos de hibridomas secretores de anticuerpos que no reconocieron la línea utilizada como inmunógeno, pero sí otras líneas de cáncer mamario.

En la tabla 4 se presentan los resultados del estudio de reconocimiento de los sobrenadantes de los 24 cultivos de hibridomas del grupo (I) sobre cortes de tejido de lesiones tumorales malignas y benignas de la mama humana, así como de metástasis ganglionares de esta patología. Cinco hibridomas secretan anticuerpos que no reconocieron ninguna de las muestras de tejido tumoral con las que se enfrentaron; de estos, tres provienen de la fusión conducida con células esplénicas del ratón inmunizado con la MDA-MB-231. Los CaMa 16 y CaMa 23 reaccionaron fuertemente con todas las muestras, ofreciendo un patrón de fluorescencia que mostraba una cierta selectividad por las células epiteliales ductales, normales y tumorales (figura 1).

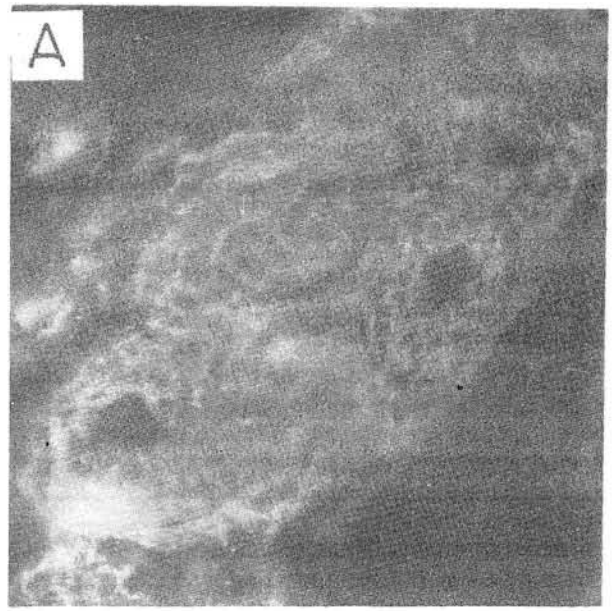

FIG. 1a

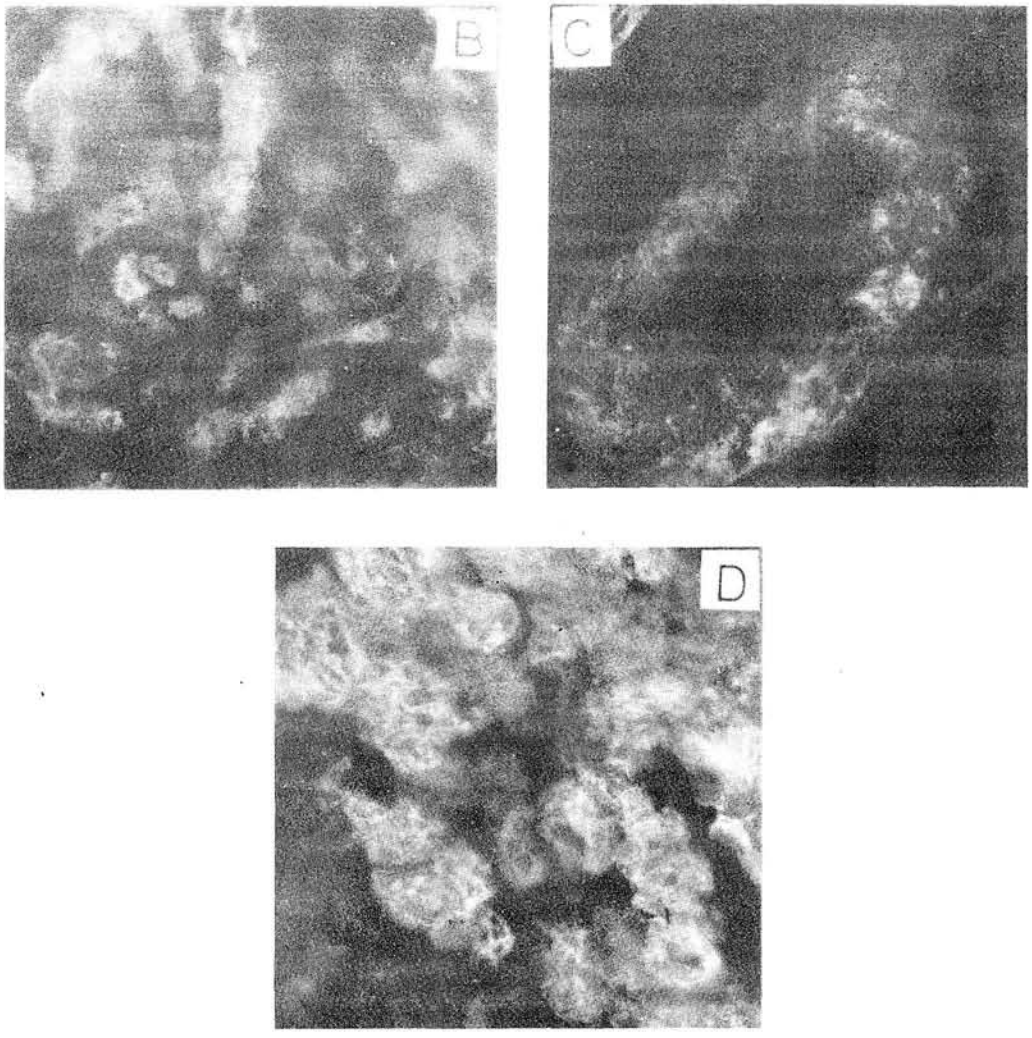

FIG. 1. Patrón de reconocimiento por IFI del sobrenadante del cultivo de hibridomas CaMa 16, en cortes por criostato sin fijación, en dos fibroadenomas benignos de la mama (A-B) y dos carcinomas ductales infiltrantes (C-D). Se observa el marcaje limitado a las células relacionadas a estructuras de tipo glandular, con escaso reconocimiento del estroma.

Entre los sobrenadantes se identificaron algunos que parecen reconocer mayormente tejido tumoral benigno del tipo fibroquístico (CaMa 8, CaMa 9 y CaMa 13), tumor maligno primario del tipo carcinoma ductal infiltrante (CaMa 2, CaMa 6 y CaMa 24) o metástasis ganglionares (CaMa 1, CaMa 12, CaMa 18 y CaMa 25); el resto manifestó diferentes combinaciones de reactividad cruzada para los diferentes tipos de tejido blanco. Excepto para los CaMa 16 y CaMa 23, se observó en el resto una reactividad diferencial para un mismo tipo histológico utilizado como blanco, que se manifestaba en la identificación de solo una fracción de las muestras (pacientes) con que se enfrentaron.

Tabla 3

PATRONES DE RECONOCIMIENTO CELULAR DE LOS ANTICUERPOS SECRETADOS POR LOS 24 CULTIVOS DE HIBRIDOMAS CORRESPONDIENTES AL BLOQUE I

Línea utilizada para la inmunización	*MDA-MB-231*									*MDA-MB-157*							*MCF-7*							
CaMa[(a)]	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6**	*17*	*18*	*19*	*15**	*16*	*21**	*22*	*23*	*24*	*25*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*	*13**	*20*
Líneas celulares usadas como blanco:																								
MDA-MB-231	2+	2+	3+	2+	2+	-	3+	2+	+	3+	4+	3+	2+	-	-	-	2+	4+	2+	2+	2+	2+	2+	-
MDA-MB-157	2+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	4+	-	-	+	-	4+	2+	4+	+	-	-	2+	-	-
MCF-7	-	-	+	2+	-	3+	4+	4+	4+	4+	4+	-	-	+	-	4+	2+	2+	2+	2+	2+	4+	-	4+
MDA-MB-468	2+	+	-	-	2+	2+	+	+	2+	3+	4+	+	-	-	+	+	2+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	+
MDA-MB-435S	-	4+	-	2+	-	-	+	2+	+	-	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	-	+	-	3+	2+	-	2+
KB	-	-	-	-	-	-	2+	-	-	-	4+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neuro-F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota *(a)*: denominación del cultivo de hibridomas; la tabla incluye los valores semi-cuantitativos de la fluorescencia observada, atendiendo a la intensidad de la reacción sobre la superficie de las células (4+–3+ intensa; 2+moderada; + débil; – ausente). En el experimento se utilizaron como controles: antisuero policlonal anticélulas MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-157 y MCF-7 (fluorescencia positiva) y medio de cultivo no metabolizado (fondo). * Ver texto para detalle al respecto.

Tabla 4

TAMIZAJE DE LOS 24 SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE HIBRIDOMAS CORRESPONDIENTES AL BLOQUE I SOBRE CORTES DE TEJIDO

Línea utilizada para la inmunización	*MDA-MB-231*									*MDA-MB-157*							*MCF-7*							
CaMa[a]	*1*	*2*	*3*[b]	*4*	*5*[b]	*6*	*17*[b]	*18*	*19*	*15*[b]	*16*	*21*	*22*	*23*	*24*	*25*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*[b]	*12*	*13*	*20*
Tejido utilizado como blanco																								
Carcinoma mamario*	0/7	1/7	0/6	2/7	0/7	1/6	0/6	0/7	6/7	0/7	7/7	4/7	1/7	7/7	1/7	0/7	5/7	0/6	0/7	2/7	0/7	0/7	0/7	2/7
Tumor benigno																								
a) fibroadenoma	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/2	0/3	3/3	2/3	1/3	3/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/2	0/3	0/3	0/3	0/3
b) displasia fibroquística	0/3	0/3	0/3	0/4	0/4	0/3	0/3	0/3	0/4	0/3	4/4	2/4	0/4	4/4	0/3	0/3	1/4	1/4	2/4	1/3	0/3	0/3	2/3	0/4
Metástasis ganglionar	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3	0/3	3/3	1/3	0/3	3/3	0/3	1/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3	1/3

Nota *(a):* denominación del cultivo de hibridomas; *(*):* carcinomas ductales infiltrantes en todos los casos; la tabla refleja el número de muestras que evidencian fluorescencia positiva, con respecto al total de muestras (pacientes) estudiados; se utilizaron como controles los mismos mencionados en la tabla 3; *(b):* CaMa que no mostraron reconocimiento tisular.

DISCUSION

En trabajos recientes dirigidos a la obtención de AcM contra células de cáncer mamario humano, se han empleado como inmunógeno fracciones de membrana con diferente grado de enriquecimiento y provenientes de metástasis hepáticas de cáncer mamario (Colcher *et al.*, 1981) y de células de cultivo (Menard *et al.*, 1983), líneas celulares intactas de cáncer mamario (Karsten *et al.*, 1983; Papsidero *et al.*, 1983) e inmunocomplejos purificados a partir de pacientes portadores de esta entidad (Papsidero *et al.*, 1982).

En sentido general, el uso de líneas celulares en la inmunización ofrece la posibilidad de un amplio rango de linajes de diferenciación, la expresión de antígenos tumor-asociados con distinto grado de restricción y provee poblaciones de relativa homogeneidad. En nuestro trabajo optamos por utilizar células intactas provenientes de tres líneas de cáncer mamario humano establecidas en dos laboratorios diferentes, y que como se mostró en la tabla 1, se originaron de tumores mamarios con distinta histología. De estas, la MCF-7 ha sido empleada ya en la obtención de AcM (Karsten *et al.*, 1983; Papsidero *et al.*, 1983; Menard *et al.*, 1983) contra cáncer mamario. Las tres líneas fueron también seleccionadas teniendo en cuenta que han sido reportadas como tumorigénicas en ratones inmunodeprimidos congénitos (Engel y Young, 1978; Davis *et al.*, 1981) lo que, a pesar de las limitaciones de interpretación que estos experimentos imponen, es indicativo de su malignidad potencial *in vivo*. Por otra parte permitía abordar estudios *in vivo* de radiolocalización con AcM marcados y del efecto terapéutico de estos, investigaciones que han sido ya reportadas en la literatura con resultados promisorios (Capone *et al.*, 1983; Colcher *et al.*, 1983).

El sistema de tamizaje escogido para el ensayo de los anticuerpos de los cultivos de hibridomas con crecimiento más estable comprendió dos etapas fundamentales: *a)* un tamizaje primario sobre un panel de líneas celulares humanas, y *b)* la validación del reconocimiento encontrado, sobre tejidos tumorales malignos y benignos.

Teniendo en consideración que algunos antígenos tumor-asociados pueden estar pobremente expresados en las células *in vitro* y que no existe una completa correlación entre el patrón de reconocimiento de los AcM *in vitro* y en tejidos (Fradet *et al.*, 1984), concedimos una importancia especial a la validación inmediata de los resultados del tamizaje primario en las muestras de tumor. Se obvió, por tanto, el clonaje, considerando además que el sistema de plaqueo de las células recién fundidas (10^4 mielomas por pozo) daba lugar a una alta probabilidad de que cada cultivo fuera de hecho originado por un solo clon de hibridomas (Reading, 1982), de esta forma, reduciéndose la posibilidad de existencia de varias especificidades de Ac por sobrenadante.

El panel de líneas celulares empleado en el tamizaje primario incluyó cinco líneas de cáncer mamario humano y células KB; estas se tomaron como indicativas de Ac capaces de identificar antígenos tumor-asociados con diferente grado de restricción. Por otra parte, las células Neuro-F, obtenidas y caracterizadas en este Instituto (Lombardero *et al.*, 1984), presentan cariotipo, morfología y patrón de crecimiento compatibles con los de fibroblastos humanos diploides y se derivaron probablemente de la infiltración conectiva de un neuroblastoma infantil. Ellas se emplearon en el panel como indicadoras del reconocimiento de células humanas con características diploides *in vitro* y con posibles marcadores de tejido conectivo.

La decisión de realizar el tamizaje primario sobre un panel amplio de líneas celulares, unido al hecho de que se realizaron las tres fusiones paralelamente, nos llevó a escoger una prueba de identificación del reconocimiento que conjugara la multiplicidad de muestras, rapidez y nivel aceptable de detección, con la conservación adecuada de las estructuras antigénicas

potencialmente blanco de los Ac. En otros trabajos se han empleado indistintamente diferentes variantes del radioinmunoensayo, utilizando como sustrato proteínas purificadas, membranas celulares, células fijadas e incluso células vivas (Menard *et al.*, 1983; Papsidero *et al.*, 1983; Colcher *et al.*, 1981). La IFI ha sido también usada por otros autores (Karsten *et al.*, 1983) en el tamizaje de AcM contra cáncer mamario y presenta la ventaja de poder distinguir si el reconocimiento es superficial o intracelular; en nuestro caso escogimos el método de Lane y Lane (1981), basado en la IFI sobre células creciendo en placas de cultivo, que además de cubrir los requerimientos mencionados para el tamizaje, se justificaba por el propio hecho de haber empleado células de cultivo como inmunógeno.

Mediante el sistema de tamizaje primario referido, se seleccionaron para el ensayo en cortes de tejido los 24 cultivos que mostraron un fuerte reconocimiento de al menos una línea de cáncer mamario, sin reactividad cruzada importante con las células Neuro-F. Es interesante que todos los hibridomas cuyos sobrenadantes cumplieron con estos requisitos, manifestaron en algún grado una reactividad cruzada para las líneas mamarias; incluso esta fue para tres o más líneas en más del 80 por ciento de los casos. Al margen del hecho de que los cultivos no han sido clonados, ello pudiera ser sugestivo de la presencia de antígenos tumor-asociados compartidos entre las diferentes líneas; aun así, la discusión de la probable naturaleza de tales antígenos no forma parte de este trabajo por razones obvias, y será tema de futuros artículos.

Resultó igualmente interesante el hecho de que la línea celular MDA-MB-468, sin haber sido utilizada como inmunógeno, hubiera sido sin embargo, la más reconocida. Esta línea tiene algunas características particulares que la hacen blanco de nuestra atención para otros experimentos. Ella fue derivada de una efusión pleural de una paciente portadora de un tumor mamario avanzado (Cailleau *et al.*, 1978), es tumorigénica en ratones inmunodeprimidos congénitos (Engel y Young, 1978), ha sido reportada como un buen blanco para la absorción significativa de proteínas circulantes en pacientes con cáncer mamario humano (Davis *et al.*, 1981) y posee un alto número de sitios receptores para el factor de crecimiento epidérmico (r-FCE)*. Sobre la base de estos elementos y de trabajos recientes conducidos en este Instituto sobre el valor pronóstico potencial de la presencia de r-FCE en tumores mamarios humanos (Pérez *et al.*, 1984), la línea MDA-MB-468 presenta características de interés para su uso como inmunógeno en la generación de AcM contra el cáncer mamario.

Un último aspecto derivado de los resultados del tamizaje en líneas celulares fue la presencia de cultivos de hibridomas cuyos Ac no reconocieron la línea empleada como inmunógeno, pero sí otras. Ello puede explicarse sobre la base de que estas líneas comparten algunos antígenos de expresión cuantitativamente diferente o de distinta conservación luego del proceso de fijación a que fueron sometidas. Claramente, estos antígenos, por pequeña que fuera su expresión en las células empleadas como inmunógeno, fueron reconocidos por el animal y se expandieron clones de células B contra ellos.

El análisis que presentamos de los resultados obtenidos en secciones histológicas es necesariamente limitado, teniendo en cuenta el hecho de que los hibridomas no fueron clonados previamente, así como los inconvenientes que para el reconocimiento celular en tejido presenta la técnica de IFI y la necesidad de ampliar el número de muestras a analizar. Recientemente Fradet *et al.* (1984), estudiaron el reconocimiento de una serie de AcM obtenidos a partir de inmunizaciones con líneas celulares de cáncer de vejiga humano y suspensiones celulares de

* Pérez *et al.*, resultados no publicados.

tejido tumoral, frente a un panel de 75 líneas celulares derivadas de tumores malignos epiteliales y tejidos normales humanos, así como frente a cortes de tejido fetal y tumoral. Los resultados del tamizaje en las líneas permitieron a los autores la definición de antígenos de distribución amplia, intermedia o restringida entre los diferentes cultivos; algunos de estos antígenos mostraron una relativa correlación directa entre su expresión *in vitro* e *in vivo*, mientras que en otros casos existieron discrepancias entre la expresión antigénica de las células de cultivo y los cortes de tejido.

Por todo ello, la validación rápida de los resultados del tamizaje primario en muestras de tejido, relevantes a la aplicación potencial de los Ac obtenidos, constituyó en nuestro trabajo uno de los aspectos más importantes de esta primera fase de generación de AcM anti-cáncer mamario. En seis casos encontramos una relativa correlación directa entre los resultados *in vitro* e *in vivo;* cuatro cultivos (CaMa 3, CaMa 13, CaMa 22 y CaMa 24) cuyos anticuerpos habían manifestado el menor espectro de reactividad cruzada e intensidades de reacción frente a las líneas mamarias, dieron también un pobre reconocimiento en tejido (uno de ellos fue negativo). Por otra parte, los CaMa 7 y CaMa 16 tuvieron un alto reconocimiento en las líneas de cultivo y en las muestras de tejido con que se enfrentaron.

En cambio, en otros 13 casos existieron algunas discrepancias entre la amplitud de la reactividad manifestada en líneas celulares y en las secciones histológicas; 8 hibridomas (CaMa 1, CaMa 2, CaMa 6, CaMa 8, CaMa 9, CaMa 12, CaMa 18 y CaMa 25) cuyo reconocimiento *in vitro* fue relativamente amplio, identificaron un número limitado de muestras de tejido. Los CaMa 5, CaMa 11, CaMa 15 y CaMa 17, con fuerte reacción frente a líneas celulares, resultaron totalmente negativos en los cortes histológicos; estos pudieran estar reconociendo marcadores de proliferación ampliamente difundidos en las condiciones de cultivo, pero relativamente escasos en los tumores *in vivo* (Fradet *et al.*, 1984). Por último, el CaMa 23 reconoció todas las muestras de tejido, si bien su identificación *in vitro* se había limitado a tres líneas mamarias.

En el marco de los patrones de reconocimiento encontrados, uno de los hechos más frecuentes fue que la mayoría de los anticuerpos manifestaron una heterogeneidad de comportamiento al enfrentarse con muestras de diferentes pacientes, pero de un mismo tipo histológico. Resultados similares han sido encontrados con AcM anti-cáncer de vejiga (Fradet *et al.*, 1984) y contra cáncer mamario (Colcher *et al.*, 1981; Horan Hand *et al.*, 1983); en estos últimos casos incluso, la heterogeneidad de reconocimiento se manifestó en diferentes zonas de un mismo tumor. Todo ello indica que los antígenos presentes en las células de los carcinomas manifiestan una amplia gama de restricciones, y que si bien aquellos antígenos de diferenciación y tejido muy difundidos podrán ser definidos por un AcM, es muy probable que en un futuro se deba recurrir a paneles de estos para una clasificación de los tumores que permita predicciones sobre el pronóstico.

Este tipo de acercamiento ha dado ya sus frutos en el caso de los linfomas y las leucemias, donde los AcM han permitido trazar la ontogenia de estas entidades y generado una clasificación inmunológica de relevancia para el manejo del paciente (Nadler *et al.*, 1982; Parkinson *et al.*, 1983).

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean manifestar su agradecimiento a R. Cailleau y M. Olivé (M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston) por las líneas celulares de cáncer mamario humano,

así como a L. Moreno, I. Pérez, O. Más, M. Amigó y R. Guarnaluse (INOR) por su cooperación decisiva en la obtención y diagnóstico de las muestras de tejido tumoral.

El apoyo técnico de I. Beausoleil, I. Alvarez y M. Merino fue esencial para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

CAILLEAU, R.; M. OLIVE y Q. V. J. CRUCIGER (1978). *Long-term human breast carcinoma cell lines metastatic origin: preliminary characterization.* In vitro, **14**: 911-915.

CANEVARI, S.; G. FOSSATI; A. BALSARI; S. SONNINO y M. I. COLNAGHI (1983). *Immunochemical analysis of the determinant recognized by a monoclonal antibody (MBrl) which specifically binds to human mammary epithelial cells.* Cancer Res. **43**: 1301-1305.

CAPONE, P. M.; L. D. PAPSIDERO; G. A. GROGHAN y T. MING CHU (1983). *Experimental tumoricidal effects of monoclonal antibody against solid breast tumors.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**: 7328-7332.

COLCHER, D.; P. HORAN HAND; M. NUTI y J. SCHLOM (1981). *A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 3199-3203.

COLCHER, D.; M. ZALUTSKY; W. KAPLAN; D. KUFE; F. AUSTIN y J. SCHLOM (1983). *Radiolocalization of human mammary tumors in athymic mice by a monoclonal antibody.* Cancer Res. **43**: 736-742.

DAMJANOV, I. y B. B. KNOWLES (1983). *Biology of Disease. Monoclonal antibodies and tumor associated antigens.* Lab. Invest. **48**: 510-542.

DAVIS, J. W.; M. OLIVE; R. CAILLEAU y J. M. BOWEN (1981). *Analysis of sera from breast cancer patients by radioimmunoassays.* Cancer Immunol. Immunother. **11**: 225-231.

EAGLE, H. (1955). *Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, Strain KB.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **89**: 362-364.

ENGEL, L. W. y N. A. YOUNG (1978). *Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review.* Cancer Res. **38**: 4327-4339.

FRADET, Y.; C. CORDON-CARDO; T. THOMSON; M. E. DALY; W. F. WHITMORE; K. O. LLOYD; M. R. MELAMED y L. J. OLD (1984). *Cell surface antigens of human bladder cancer defined by mouse monoclonal antibodies.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 224-228.

GARCIA C. A.; J. V. GAVILONDO; J. F. AMADOR; A. M. VAZQUEZ y A. FERNANDEZ (1984). *Obtención de hibridomas de ratón productores de anticuerpos monoclonales que reconocen células humanas de origen T. II. Caracterización de los anticuerpos monoclonales IOR-T1 e IOR-T2.* Interferón y Biotecnología, 1: 29-38.

HORAN HAND, P.; M. NUTI; D. COLCHER y J. SCHLOM (1983). *Definition of antigenic heterogeneity and modulation among human mammary carcinoma cell populations using monoclonal antibodies to tumor-associated antigens.* Cancer Res. **43**: 728-735.

KARSTEN, U.; R. WIDMAIER y D. KUNDE (1983). *Monoclonal antibodies against antigens of the human mammary carcinoma cell line MCF-7.* Arch. Geschwulstforch, **53**: 529-536.

KEARNEY, J. F.; A. RADBRUCH; B. LIESEGANG y K. RAJEWSKY (1979). *A new mouse myeloma cell line which has lost immunoglobulin expression but permits construction of antibody-secreting hybrid cell lines.* J. Immunol. **123**: 1548-1550.

KOHLER, G. y C. MILSTEIN (1975). *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.* Nature **256**: 495-497.

KÖHLER, G. (1981). *The technique of hybridoma production.* Immunological Methods. Vol. II. Eds. I. Lefkovits, B. Pernis. Academic Pres., New York, pp. 285-298.

LANE, D. P. y G. B. LANE (1981). *A rapid antibody assay system for screening hybridoma cultures.* J. Immunol. Meth. **47**: 303-307.

LOMBARDERO, J.; L. CABRERA; S. HERNANDEZ y A. LAGE (1984). *Control de proliferación de células tumorales humanas en cultivo. II. Células de neuroblastoma.* Rev. Cub. Oncol. (aceptado para publicar).

MENARD, S.; E. TAGLIABUE; S. CANEVARI; G. FOSSATI y M. I. COLNAGHI (1983). *Generation of monoclonal antibodies reacting with normal and cancer cells of human breast.* Cancer Res. **43**: 1295-1300.

NADLER, L. M.; P. STASHENKO; E. L. REINHERZ; J. RITZ; R. HARDY y S. F. SCHLOMSSMANN (1982). *Expression of normal differentiation antigens on human leukemia and lymphoma cells.* En: Malignant Lymphomas: Ethiology, Immunology, Pathology and Treatment. Eds. S. A. Rosenberg, H. Kaplan, Bristol Mayers Cancer Symposia. Academic Press. New York-London, pp. 107-119.

PAPSIDERO, L. D.; T. NEMOTO; L. VALENZUELA y T. MING CHU (1982). *Hybridoma antibody to breast cancer immune complexes.* Hybridoma **1**: 275-282.

PAPSIDERO, L. D.; G. A. CROGHAN; M. J. O'CONNELL; L. A. VALENZUELA; T. NEMOTO y T. MING CHU (1983). *Monoclonal antibodies (F36/22 and M7/105) to human breast carcinoma.* Cancer Res. **43**: 1741-1747.

PARKINSON, D. R. y J. W. MIER (1983). *T. lymphocyte malignancies: recent advances in the understanding of their biology, diagnosis and treatment.* Clin. Immunol. Rev. **2**: 59-121.

PASCUAL, M. R.; A. MACIAS; L. MORENO y A. LAGE (1984). *Factors associated with prognosis in human breast cancer. V. The simultaneous use of Estrogen and Progesterone receptor measurements for prediction of short term relapse.* Neoplasma (aceptado para publicar).

PEREZ, R.; M. R. PASCUAL; A. MACIAS y A. LAGE (1984). *Epidermal growth factor receptors in human breast cancer.* Breast Cancer Research and Treatment **4**: 189-193.

READING, C. (1982). *Theory and methods for immunization in culture and monoclonal antibody production.* J. Immunol. Meth **53**: 261-291.

SOULE, H. D.; A. VAZQUEZ; A. LONG; S. ALBERT y M. BRENNAN (1973). *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.* J. Natl. Cancer Inst. **51**: 1409-1413.

SCHOTTENFELD, D. (1981). *The epidemiology of cancer: an overview.* Cancer **47**: 1095-1108.

WALDMAN, H. y C. MILSTEIN (1982). *Monoclonal antibodies.* En: Clinical Aspects of Immunology. Eds. P. J. Lachmann, D. K. Peters. Vol. 1. Blacwell Sci. Pub. Oxford-London-Edinburgh-Boston-Melbourne, pp. 476-503.