

Anticuerpos monoclonales contra el antígeno carcinoembrionario en ensayos inmunohistoquímicos e inmunoquímicos

J. V. GAVILONDO¹, A. M. VÁZQUEZ¹, S. FONG², E. RENGIFO¹, A. FERNÁNDEZ¹, C. A. GARCÍA¹, A. VELANDIA¹, A. PAVLENKO³, S. HERNÁNDEZ¹, N. RUISÁNCHEZ¹, U. SUNDIN⁴, M. E. FAXAS¹

1. Departamento de Biología, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR), 29 y E, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba

2. Departamento de Medicina Nuclear, INOR

3. Instituto de Química Biorgánica del Pacífico, Academia de Ciencias de la URSS, Sección Lejano Este, Vladivostok, URSS

4. Departamento de Inmunología Clínica, Hospital Universitario de Huddinge, Huddinge, Suecia

Recibido en enero de 1986

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la obtención de cinco clones de hibridomas de ratón, secretores de anticuerpos monoclonales que reconocen una preparación de antígeno carcinoembrionario (CEA). Durante el proceso de tamizaje y selección de estos clones, se empleó fundamentalmente un sistema de radioinmunoensayo, donde se compararon los sobrenadantes de cultivo o los ascitis tumorales con un antisuero policlonal de referencia, con respecto a su enlazamiento y especificidad por ¹²⁵I-CEA. Los anticuerpos monoclonales seleccionados pertenecen a las clases G y M de inmunoglobulinas de ratón, y dos de ellos manifestaron bajo o ningún reconocimiento del antígeno de reactividad cruzada no específico (NCA). Los anticuerpos IOR-CEA 3 (IgM) e IOR-CEA 5 (IgG1) se estudiaron para su reconocimiento de tejidos fetales humanos, lesiones benignas de la mama, y cánceres de mama, pulmón y colon. El IOR-CEA 3 puede ser utilizado para estudios de confirmación histológica diagnóstica por técnica de inmunofluorescencia indirecta en tejido fresco. Los anticuerpos IOR-CEA 1 (IgG1) e IOR-CEA 2 (IgM) se ensayaron mediante diferentes combinaciones en un sistema ELISA para conocer su capacidad de detectar CEA purificado. Los resultados preliminares indican un adecuado nivel de reconocimiento cuando se utiliza como primer anticuerpo el antisuero policlonal anti-CEA de referencia y el monoclonal IOR-CEA 1 como segundo anticuerpo.

ABSTRACT

The paper reports the obtainment of five mouse hybridoma clones, producing monoclonal antibodies that recognize a preparation of carcinoembryonic antigen (CEA). A radioimmunoassay system was essentially employed for the screening and selection of these clones; the binding to and specificity for ¹²⁵I-CEA of culture supernatants and tumor ascitis were compared to the ones exhibited by a polyclonal antiserum. The selected monoclonal antibodies belong to the G and M classes of mouse immunoglobulins and two of them exhibited a low or no recognition of the non-specific cross reacting antigen (NCA). The antibodies IOR-CEA 3 (IgM) and IOR-CEA 5 (IgG1) were studied for their recognition characteristics against human fetal tissues, benign lesions of the breast, and breast, lung and colon cancers. It was demonstrated that IOR-CEA 3 can be used for diagnostic confirmation in immunohistological studies, by indirect immunofluorescence techniques in fresh tissue.

The IOR-CEA 1 (IgG1) and IOR-CEA 2 (IgM) antibodies were assayed in different combinations in an ELISA for their ability to detect purified CEA. The preliminary results indicate an adequate level of recognition when the reference polyclonal anti-CEA anti-serum is used as first antibody and the monoclonal IOR-CEA 1 as a second antibody.

INTRODUCCION

El antígeno carcinoembrionario (CEA) incluye una familia de glicoproteínas de peso molecular entre 120 y 300 kilodalton, dependiendo de la fuente de obtención, con una relación carbohidrato/proteína de aproximadamente 2.5, que se ha localizado en la periferia de las células normales y tumorales y es considerado como un producto de secreción de las mismas (Banjo *et al.*, 1974; De Young y Ashman, 1978). Originalmente aislado por Gold y Freedman (1965) a partir de tumores gastrointestinales y de tejido embrionario intestinal, el CEA fue definido inicialmente como un antígeno oncofetal asociado a tumores de esa localización (Goldenberg, 1976), pero el desarrollo de potentes inmunoensayos con antisueros policlonales contra este antígeno ha dejado establecido que este se encuentra presente en tejido tumoral y/o en el plasma de pacientes portadores de cánceres de mama, ovario, páncreas, pulmón y otras localizaciones (Goldenberg *et al.*, 1978; O'Brien *et al.*, 1980; Van Nagell *et al.*, 1980; Adophs y Oehr, 1982). La presencia de CEA se ha detectado también en la sangre de pacientes portadores de algunas enfermedades no malignas y en individuos fumadores, así como en tejido normal (Von Kleist y Burtin, 1966; Alexander, 1976; Primus *et al.*, 1981; Matsouka *et al.*, 1982).

En una reciente conferencia (NIH Consensus Conference 1981), se estableció que los ensayos para la detección de CEA circulante en sangre utilizando antisueros convencionales, constituyen la mejor técnica no invasiva existente para el seguimiento clínico con vista a determinar la recurrencia del cáncer colorrectal, siendo de alguna utilidad también en el monitoraje de pacientes con cánceres de mama, de los aparatos digestivos y urogenital y en el cáncer de pulmón, con las precauciones que se derivan de la existencia de factores no relacionados al cáncer, que llevan al aumento del CEA circulante y de pacientes con enfermedad neoplásica avanzada que no experimentan elevaciones importantes. Aun así, estas técnicas no poseen la sensibilidad (frecuencia de positivos verdaderos) o la especificidad (frecuencia de negativos verdaderos), para discriminar entre tumores malignos localizados y desórdenes benignos, y el verdadero valor de los ensayos de CEA para el pesquizaje de la población asintomática y la vigilancia de los grupos de *alto riesgo* está aún por esclarecer.

La falta de especificidad de los inmunoensayos es atribuida a diversas causas entre las cuales se incluyen la heterogeneidad del CEA purificado de distintas fuentes y la posible variabilidad intramolecular del antígeno (Rogers, 1976; De Young y Ashman, 1978). También se ha tratado de explicar por el método de tratamiento del suero o plasma utilizado en los ensayos y el hecho de que algunos determinantes antigénicos presentes en el CEA e identificados por los antisueros convencionales están asociados a moléculas circulantes similares al CEA, sintetizadas y secretadas por tejidos normales (Von Kleist y Burtin, 1979; Malsouka *et al.*, 1982; Primus *et al.*, 1983a).

Luego del desarrollo de la tecnología para la obtención de anticuerpos monoclonales por hibridación (Kohler y Milstein, 1975; Kohler, 1981; Waldman y Milstein, 1982) un conjunto de autores (Hedin *et al.*, 1982a; Accolla *et al.*, 1981; Primus *et al.*, 1983b; Thompson *et al.*, 1983; Rogers *et al.*, 1981; Mitchell, 1980) han realizado esfuerzos en la obtención de anticuerpos monoclonales capaces de detectar en el CEA secretado por los tumores la presencia de epítopes no compartidos por otras moléculas similares sintetizadas en los tejidos normales, así como de discriminar variaciones en las moléculas del CEA producidas por distintos tumores. Por esta razón, los anticuerpos monoclonales representan una nueva vía para la solución del problema expuesto, alternativa a los esfuerzos basados en la absorción de los antisueros frente a extractos de proteínas normales o moléculas tipo CEA purificadas, así como el procesamiento

de los determinantes antigénicos. Por otra parte, los anticuerpos monoclonales anti-CEA pueden abrir nuevas posibilidades en el diagnóstico inmunohistoquímico confirmativo, así como en el estudio del valor pronóstico de las diferencias antigénicas entre tumores de igual histología, pero diferente comportamiento biológico (Hockey *et al.*, 1984; Rolf-Smith *et al.*, 1982; Primus *et al.*, 1983a).

Por último, los anticuerpos monoclonales anti-CEA pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de técnicas de radiolocalización específica de tumores (Farrands *et al.*, 1982; Hedin *et al.*, 1982b; Haskell *et al.*, 1983; Lumbroso *et al.*, 1983; Fairweather *et al.*, 1983).

En el presente trabajo se reporta la obtención y caracterización de cinco hibridomas de ratón, secretores de anticuerpos monoclonales que reconocen una preparación de CEA. Se reportan datos sobre su especificidad, así como estudios preliminares dirigidos a validar su empleo en ensayos inmunohistoquímicos e inmunoquímicos.

MATERIALES Y METODOS

Antígeno

La preparación de CEA utilizada en las inmunizaciones para la posterior fusión y la producción del antisuero policlonal de referencia, se obtuvo a partir de metástasis hepáticas de pacientes con neoplasias primarias de colon. Este método, al igual que el marcaje del CEA con ^{125}I ya ha sido reportado previamente (Fong *et al.*, 1982).

En las técnicas inmunoenzimáticas se empleó una preparación de CEA altamente purificada, con escaso contenido de NCA, aportada por el Instituto de Química Biorgánica del Pacífico (Vladivostok, URSS).

Inmunizaciones

Se obtuvo un antisuero policlonal específico anti-CEA en conejo, mediante un esquema de inmunización de tres dosis semanales de $10\ \mu\text{g}$ de CEA en adyuvante completo de Freund (Difco), seguidas por tres dosis de reactivación a intervalos de 40 días. Este antisuero se absorbió extensivamente con proteínas provenientes de extractos de pulmón, colon, hígado, bazo, estómago y suero humano normales, inmovilizadas con glutaraldehído (Fong *et al.*, 1982). Para la inmunización con vista a la fusión se inyectaron subcutánea e intraperitonealmente (i.p.) ratones BALB/cHab con el antígeno liofilizado siguiendo el esquema: $5\ \mu\text{g}$ en 0,1 ml de adyuvante completo, seguido 21 y 42 días después por 10 y $20\ \mu\text{g}$ en adyuvante incompleto (Difco). Una semana más tarde se extrajo sangre de los ratones por la vía retroorbital para evaluar la presencia de anticuerpos contra el antígeno, y dos semanas después —tres días antes de la fusión—, el ratón con mejor respuesta se inyectó i.p. con $30\ \mu\text{g}$ de antígeno en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF), pH 7,2.

Protocolo de fusión

Para la hibridación se siguió esencialmente el método sugerido por Kohler (1981) empleando el mieloma de ratón P3/x63-Ag8-653, (P3/653, Kearney *et al.*, 1979). Se utilizó polietilenglicol 4000 (Merck) y una relación mieloma/células esplénicas de 1 a 10. La suspensión de células fundidas se distribuyó a razón de aproximadamente $1 \cdot 10^6$ células totales por pozo de 4 placas Costar 3524. Cada pozo contenía $4 \cdot 10^4$ células de exudado peritoneal de ratón BALB/cHab y 2 ml de medio HAT (DME Gibco, suplementado con 26 mM de CO_3HNa , 18 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, $5 \cdot 10^{-5}$ M de 2-mercaptoetanol, 100 U-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de penicilina-estreptomicina, 10 por ciento de suero fetal bovino (Difco), 5 por ciento de sobrenadante de cultivo de células de cordón umbilical humano (SnCEH) (Astaldi, 1980) e hipoxantina (H), aminopterina (A) y timidina (T) a concentraciones de 10 mM, $4 \cdot 10^{-7}$ M y $1,6 \cdot 10^{-5}$ M respectivamente).

A los 14 días se eliminó la aminopterina de los cultivos y se comenzó el ensayo para anticuerpos contra CEA.

Radioinmunoensayo

El sistema de radioinmunoensayo (RIE) empleado en este trabajo fue descrito previamente por Fong *et al.*, 1982. Para el tamizaje de la presencia de anticuerpos anti-CEA en el suero de los ratones inmunizados con el antígeno, los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas o sus ascitis, se emplearon dos variantes de RIE: a) 20 μ l de la muestra se diluyeron con tampón borato-BSA y se calculó el enlazamiento de 125 I-CEA en los precipitados finales luego de las incubaciones correspondientes, como porcentaje del enlazado por el antisuero específico anti-CEA, y restando siempre, y previamente, la radiactividad inespecífica precipitada en ausencia de anticuerpos, y b) luego de diluir las 20 μ l de cada muestra con el tampón, se incubaron 24 horas con una solución que contenía 10 μ g/ml de extracto de órganos normales y suero humano (Moroz *et al.*, 1978); después de esta incubación se prosiguió con la técnica, y la especificidad de los anticuerpos se estableció mediante el cociente: por ciento de enlazamiento de 125 I-CEA en presencia del extracto de órganos y sueros normales/por ciento de enlazamiento en ausencia del extracto. Este mismo proceso fue realizado para el antisuero policlonal específico anti-CEA. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Clonaje y expansión de hibridomas

Los cultivos de hibridomas seleccionados por su producción de anticuerpos se clonaron y reclonaron por el método de dilución limitante (Hudson y Hay, 1980), utilizando medio HT y placas Costar 3596. Los clones seleccionados se expandieron en medio HT con 7 por ciento de suero bovino y 3 por ciento de SnCEH. Estos cultivos fueron utilizados para la recuperación de anticuerpos monoclonales a partir de los sobrenadantes, así como para la criopreservación de las células y su inoculación a ratones.

Cariotipo

Se procesaron los cultivos en crecimiento exponencial de cada hibridoma y del mieloma parental tal y como recomienda Hsu (1973), utilizando 0,05 μ g/ml de colchicina (Merck) y 2 horas de incubación a 37°C en el mismo medio de cultivo. Se estudió el número de cromosomas por células, así como la frecuencia y tipo de marcadores presentes.

Producción de ascitis

Para la producción de líquido ascítico tumoral rico en anticuerpos monoclonales se inocularon i.p. $1-2 \cdot 10^6$ células de los hibridomas de interés a ratones BALB/cHab, inyectados por igual vía y una semana antes con 0,5 ml de adyuvante incompleto de Freund, o mediante la inoculación intraesplénica de $2-5 \cdot 10^4$ células, referido por Witte y Ber (1983), pero modificada de forma tal que las células se transfundieron por punción a través de la pared abdominal expuesta, inmovilizando el bazo con ayuda de pinzas romas. Entre 14 y 25 días después se recogió la ascitis y se clarificó por centrifugaciones sucesivas de 600, 1 200 y 10 000 G, distribuyéndose en alícuotas para su conservación a 20°C hasta su uso. En los experimentos se utilizó también ascitis producido por el crecimiento de células P3/653 en los ratones.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

En células: se obtuvo una preparación de granulocitos humanos a partir de un donante voluntario por la técnica descrita por García y Silva, 1979. La IFI en estas células y en eritrocitos de diferentes grupos sanguíneos se realizó como reportado antes por García *et al.*, 1984.

En tejido: se obtuvieron cortes por criostato en tejidos frescos que fueron secados al aire y fijados en acetona durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron en SSTF y se bloquearon con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) al 0,1 por ciento en SSTF durante 30 minutos, se incubaron con el anticuerpo monoclonal a concentraciones de 50 μ g/ml por igual tiempo, se lavó 15 minutos con SSTF y se aplicó un antisuero de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón, conjugado con FITC (Meloy) por 30 minutos. Después de un lavado de 15 minutos se contrastó con azul de Evans al 0,045 por ciento y se montó en glicerina-SSTF (9:1).

Las preparaciones se observaron en microscopio Ortholux II (Leitz).

Ensayo inmunoenzimático tipo ELISA

Las placas de poliestireno Costar (3590) se cubrieron con: a) 200 μ l de la fracción IgG del antisuero policlonal anti-CEA de referencia, en concentración de 5 μ g/ml, disuelto en tampón carbonatobicarbonato

0,01 M, pH 9,6 o; b) 200 μ l de los anticuerpos monoclonales purificados, en concentración de 5 μ g/ml, disueltos en igual tampón. Las placas se incubaron durante 16 horas a 4°C en cámara húmeda, se lavaron tres veces con SSTF-Tween 20 al 0,05 por ciento durante cinco minutos y bloquearon con BSA al 2 por ciento en tampón de acoplamiento durante dos horas, a temperatura ambiente. Después de repetir los lavados en iguales condiciones, se añadió a cada pozo 100 μ l de una solución de CEA a diferentes concentraciones (1-100 μ l/ml) incubándose durante una hora a temperatura ambiente. Inmediatamente se lavó y se depositaron 100 μ l de una dilución 1/1 000 de los anticuerpos monoclonales purificados (concentraciones de 5 μ g/ml), incubándose 90 minutos a temperatura ambiente; luego se lavó con PBS-Tween y se incubaron durante 90 minutos las placas con una dilución 1/2 000 de un antisero comercial anti IgG de ratón, conjugado con peroxidasa (Meloy). Finalmente se lavó y añadió 200/ μ l de la solución del sustrato (ortofenilendiamina, Sigma) en tampón citrato pH 5. La reacción se detuvo con 50 μ l de HCl 2N y se leyó a 492 nm.

Immunodifusión radial doble

Se empleó la técnica de Ouchterloney y Nielssen (1978), empleando anticuerpos específicos contra clases y subclases de inmunoglobulinas de ratón (Miles).

Purificación de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales IOR-CEA 1 e IOR-CEA 5 fueron purificados por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Affi-Blue (BioRad) y gel filtración en Sephacryl S-200 (Pharmacia). Los líquidos ascíticos fueron sometidos a una extracción con cloroformo a partes iguales (v/v) para eliminar los componentes lipídicos y lipoproteicos, y se centrifugaron a 1 750 xg durante 30 minutos. Se tomó la fase superior y se centrifugó por última vez a 6 000 xg por una hora. El precipitado se desechó y el sobrenadante se dializó contra 100 volúmenes de tampón TRIS-HCl 0,02 M, pH 7,2. Los fluidos ascíticos así procesados se depositaron en una columna de 50 ml de DEAE-Affi-Blue, equilibrada contra el tampón referido.

La proteína enlazada se eluyó mediante un gradiente discontinuo de 25, 50 y 60 mM de NaCl en el mismo tampón. La columna se lavó con 0,5 M de NaCl y guanidina 6 M. El proceso de purificación se siguió mediante inmunodifusión simple contra antiseros específicos. Las fracciones eluidas a 50 mM se procesaron por gel-filtración en Sephacryl S-200 para eliminar la transferrina que copurificó con los anticuerpos monoclonales y se ajustaron a las concentraciones de trabajo.

Los anticuerpos monoclonales IOR-CEA 2 e IOR-CEA 3 se purificaron por cromatografía de adsorción en una matriz de HA-Ultrogel (LKB). Los líquidos ascíticos, procesados de forma semejante a la descrita antes, se dializaron contra tampón fosfato 10 mM, pH 6,8. La proteína enlazada fue eluida de la matriz con un gradiente discontinuo de 100, 200 y 300 mM del mismo tampón a igual pH. Los picos fueron monitoreados a 280 nm y mediante inmunodifusión simple. Las fracciones eluidas a 200 mM se ajustaron a las concentraciones de trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Obtención de anticuerpos monoclonales anti-antígeno carcinoembrionario

El 72,2 por ciento (7/11) de los sueros de los ratones inmunizados con la preparación de CEA manifestaron en el RIE algún tipo de enlazamiento, respecto a la radiactividad enlazada por el anticuerpo policlonal de referencia. Los valores variaron entre 0,97 y 7,6 por ciento, escogiéndose el animal que exhibía mayor título para el *booster*. Según el sistema de inmunización desarrollado, adaptado de un reporte anterior (Hämmerling *et al.*, 1981), esta última dosis debía administrarse por la vía endovenosa, pero en pruebas previas se detectó una frecuente reacción anafiláctica al utilizarse esta ruta y se empleó finalmente la vía intraperitoneal.

Luego de la hibridización por fusión de las células P3/653 y las células esplénicas del ratón escogido, se detectaron hibridomas resistentes al medio selectivo en el 63,7 por ciento (61/96)

de los pozos; de estos, se ensayaron 27 cultivos resultando 11 sobrenadantes positivos en el RIE con el antígeno radioiodado. Finalmente se clonaron y reclonaron cuatro de los cultivos originales, dando lugar a cinco clones de hibridomas diferentes que se denominaron IOR/CEA 1, IOR/CEA 2, IOR/CEA 3, IOR/CEA 4 e IOR/CEA 5. En la selección de estos se empleó de nuevo el RIE, aunque se compararon los enlazamientos de CEA radioiodado, respecto al policlonal de referencia, antes y después de preincubar las muestras con un extracto de órganos y sueros normales.

En la tabla 1 se muestran los resultados referidos, tanto al probar los sobrenadantes de los cinco clones, como el líquido ascítico tumoral producido por los hibridomas en ratones BALB/cHab. Al emplear la ascitis, los enlazamientos y la especificidad –calculada a partir de la comparación de los valores antes y después de preincubación con el extracto–, se incrementaron para varios clones. Los cinco anticuerpos monoclonales escogidos mostraron en esta prueba una especificidad semejante o superior al antisuero policlonal de referencia.

TABLA 1
PORCENTAJE DE ENLAZAMIENTO DE 125 I-CEA DE SOBRENADANTES Y ASCITIS DE CINCO CLONES DE HIBRIDOMAS Y ESPECIFICIDAD FRENTE AL EXTRACTO DE PROTEÍNAS NORMALES

	% enlazamiento		% enlazamiento en presencia de proteínas normales ^b		% especificidad ^d	
	SN	ASC	SN	ASC	SN	ASC
IOR-CEA.1	9,2	11,7	6,37	11,7	69,2	100,0
IOR-CEA.2	4,42	4,7	3,25	4,3	73,3	91,5
IOR-CEA.3	3,74	5,6	2,88	4,1	77,0	73,1
IOR-CEA.4	5,65	14,4	4,26	10,1	75,4	70,1
IOR-CEA.5	7,24	7,0	6,05	7,0	83,6	100,0
PCEC ^a	54,7 ^c	49,2 ^c	38,4 ^c	33,2 ^c	70,3	67,5

a – antisuero policlonal específico anti-CEA; *b* – extracto de proteínas de órganos y suero humanos normales; *c* – % de enlazamiento con respecto a la radiactividad total; *d* – el % de especificidad se calculó según la relación: enlazamiento en ausencia de extracto de proteínas normales/enlazamiento en presencia del extracto (x 100); SN – sobrenadante de cultivo; ASC – ascitis tumoral.

La inclusión del paso de preincubación con el extracto de órganos y sueros normales tiene su base en la información existente acerca de la presencia de moléculas con cierta identidad química e inmunológica con el CEA en la circulación y los tejidos del organismo. Entre estas están el antígeno de reactividad cruzada no específico o NCA (Von Kleist y Burtin, 1979) presentes en pulmón, bazo y los granulocitos; el NCA-2 aislado del meconio y las heces adultas (Burtin *et al.*, 1973); el antígeno fecal normal (Matsouka *et al.*, 1982); la glicoproteína biliar I o BGP-1 (Svenberg *et al.*, 1979); el antígeno del meconio, o MA, (Primus *et al.*, 1983), y otras. Algunos trabajos recientes basados en el empleo de antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales han indicado que el CEA posee epítopes únicos, no compartidos con el NCA y el MA; Primus *et al.*, 1983b, han establecido que el CEA posee al menos tres clases de epítopes –denominadas I, II y III–, de las cuales la I y II son compartidas por el CEA con el

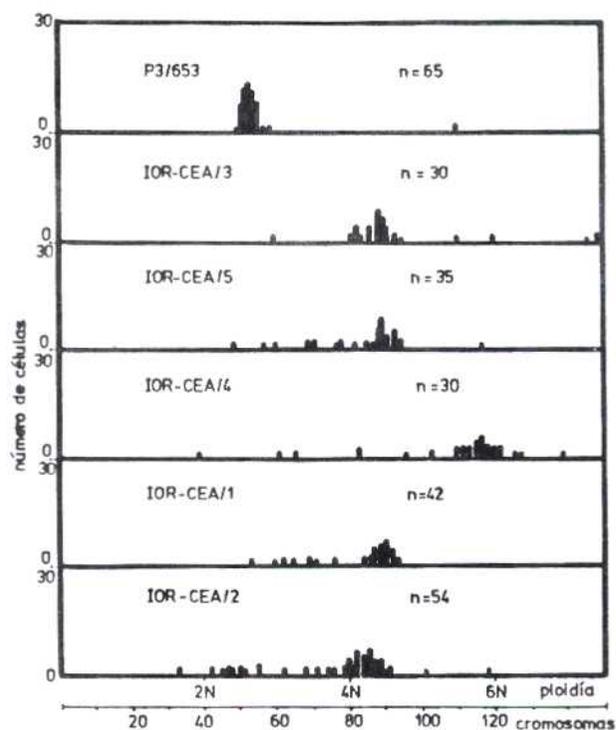


FIG. 1. Resultados del estudio cromosómico del mieloma parental y las cinco clases de hibridomas: *Abscisa*: número de cromosomas y ploidías ($N=20$ para la especie ratón); *ordenada*: número de células con un determinado contenido cromosómico (n – número total de células examinadas para cada cultivo). Todas las líneas presentaron marcadores submetacéntricos y subteloacéntricos, así como diminutos.

Características del reconocimiento tisular de los anticuerpos IOR-CEA 3 e IOR-CEA 5

Una de las aplicaciones perspectivas más importantes de los anticuerpos monoclonales contra antígenos tumor-asociados –y entre ellos el CEA –, está en su empleo en pruebas inmunohistoquímicas. Estas pueden estar enfocadas hacia: a) la confirmación diagnóstica de tumores primarios o secundarios, b) la detección temprana de lesiones precancerosas, y c) la creación de grupos de pacientes con distintos pronósticos, que a pesar de poseer semejante histología tumoral exhiben diferente patrón antigénico en las células del tumor (Stramignoni *et al.*, 1983).

Para validar la utilidad de los monoclonales anti-CEA obtenidos, se comenzó a ajustar la tecnología estudiando las características del reconocimiento de dos de los anticuerpos pertenecientes a subclases diferentes de inmunoglobulinas, sobre un panel de tejidos tumorales y fetales. Para ello, los anticuerpos IOR-CEA 3 (IgM) e IOR-CEA 5 (IgG1) fueron primeramente purificados por cromatografías de adsorción, e intercambio iónico-gel filtración, respectivamente. La purificación de IgM monoclonal en HA-Ultrogel resultó muy eficaz; detalles del comportamiento de esta matriz se reportan en otro artículo (Velandia *et al.*). El uso de concentraciones conocidas de anticuerpos purificados permitió estandarizar rápidamente las técnicas

NCA, y la I con el MA. En definitiva, la obtención de anticuerpos monoclonales contra el CEA, debe estar dirigida hacia la selección de aquellos con menor reactividad cruzada posible con estas moléculas, como forma de incrementar la especificidad de ellos.

Nuestro grupo decidió evaluar la preincubación con el extracto de órganos y sueros normales, como posible método discriminativo durante la selección inicial de los clones de hibridomas, para proceder luego con otras pruebas más directas. En la tabla 2 se presentan los estudios de la reactividad de los cinco monoclonales frente al NCA presente en la superficie de los granulocitos (Wahren *et al.*, 1980; Primus *et al.*, 1983b) y los antígenos de grupo sanguíneo, que también se ha reportado presentan reactividad inmunológica con epítopes del CEA. Aparecen también las subclases de inmunoglobulinas determinadas por inmunodifusión radial doble para estos anticuerpos. Los resultados indican que los anticuerpos monoclonales IOR-CEA 1, IOR-CEA 2 e IOR-CEA 5 presentan importantes reactividades cruzadas con el NCA, y de ellos, el primero y el último también con el antígeno A de grupo sanguíneo. El IOR-CEA 3 demostró la mayor especificidad para el CEA en estas pruebas.

TABLA 2

ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES
FRENTE A MOLECULAS DE REACTIVIDAD CRUZADA CON EL CEA

Muestra ^a	Clase y subclase	Polimorfonucleares ^b	Eritrocitos ^b		
			A	B	O
IOR-CEA.1	IgG1	54,0%	7,5%	0%	0%
IOR-CEA.2	IgM	38,0%	0,4%	0%	0%
IOR-CEA.3	IgM	0%	0%	0%	0%
IOR-CEA.4	IgG1	16,0%	0%	0%	0%
IOR-CEA.5	IgG1	29,0%	10,6%	0%	0%
P3/653	—	0%	0%	0%	0%

a — ascitis tumoral; b — % determinados por inmunofluorescencia indirecta en células en suspensión.

Los estudios del cariotipo de los cinco hibridomas demostraron que para cuatro de los clones, este se estabilizó a niveles cercanos al tetrapoide, lo que concuerda con el origen de los híbridos a partir de linfocitos y el mieloma parental, que no es estrictamente diploide.

En la figura 1 se observa también que a pesar de los procesos de clonaje y reclonaje, existe una cierta dispersión en los cariogramas, provocada quizás por la rápida diversificación que sufren en general los clones de células tumorales (Nicolson, 1984). Ello refuerza la necesidad de la congelación temprana de los hibridomas y/o su clonaje repetido. Por último, y a pesar de haberse generado en el marco de la misma fusión, el hibridoma IOR-CEA 4 presentó una clase modal cromosómica que sugiere que este pudiera haberse originado a partir de la fusión de tres parentales.

de IFI en tejidos frescos. La tabla 3 muestra que tanto el tejido fetal de pulmón y colon como los tumores de colon y recto ensayados, fueron reconocidos por ambos monoclonales, tal y como debía esperarse por su expresión de CEA (Goldenberg, 1976) (figura 2).

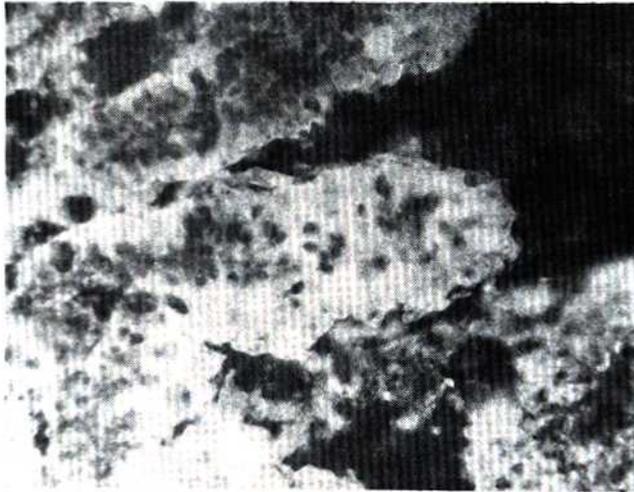


FIG. 2. Reconocimiento evidenciado por el IOR-CEA 3 (50 $\mu\text{g/ml}$) en tejido fresco de colon humano fetal por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (con contraste de azul de Evans). Se destaca la intensa fluorescencia en citoplasma y membrana de las células epiteliales y en el detritus presente en la luz intestinal (x 630).

TABLA 3
ENSAYOS DEL RECONOCIMIENTO TISULAR DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES
IOR-CEA.3 e IOR-CEA.5

Tejido	IOR-CEA.3	IOR-CEA.5
Mama (adulto):		
- lesiones benignas		
- papiloma distal	0/1	0/1
- fibroadenoma	5/8	3/6
- displasia fibroquística	2/2	2/2
- cistosarcoma phyllodes	0/1	0/1
- carcinoma	2/4	NE
Pulmón (adulto):		
- carcinomas a células grandes	3/4	2/4
Intestino (adulto):		
- carcinoma de colon	3/3	3/3
- carcinoma de recto	1/1	1/1
Feto:		
- pulmón	10/10	5/5
- colon	10/10	5/5
- riñón	0/10	0/5
- hígado	0/10	0/5

NE - no ensayado. Los números representan las muestras positivas, respecto al total estudiado.

El reconocimiento exhibido en otros tumores y lesiones premalignas, indicó una cierta heterogeneidad en el marcaje a pesar de que estos se clasificaron homogéneamente por su histología.

De los dos monoclonales ensayados, el IOR-CEA 3 mostró el marcaje más intenso. Ello puede deberse tanto a que reconocen epítopes diferentes a la molécula de CEA, que pueden estar más o menos representados topográficamente, o a que el IOR-CEA 3 es un IgM y puede amplificar la fluorescencia con un segundo anticuerpo que reconozca bien las cadenas ligeras.

Están en ejecución también otros ensayos con la técnica de inmunoperoxidasa, con vista a determinar las características de las células reconocidas por estos anticuerpos.

Estudios inmunoenzimáticos para la detección de CEA con los monoclonales IOR-CEA 1 e IOR-CEA 2

En trabajos recientes (Acolla *et al.*, 1980; Buchegger *et al.*, 1982; Hedin *et al.*, 1983) los anticuerpos monoclonales anti-CEA han comenzado a emplearse en el montaje de sistemas inmunoenzimáticos (EIA) para la detección de CEA circulante con el objetivo primario de sustituir a los radioinmunoensayos.

La especificidad de los monoclonales permite prever que, estos EIA alcanzarán niveles de detección comparables o superiores a los métodos tradicionales, pero además, abrirán otras posibilidades diagnósticas y pronósticas de mayor trascendencia, ya que al detectar epítopes exclusivos para el CEA, se podrán discriminar: a) los verdaderos niveles de CEA circulantes, excluyendo otras moléculas asociadas a este, y/o b) las variaciones inmunológicas en las moléculas del CEA secretadas por tejidos normales y por diferentes tumores.

En la figura 3 se observan los resultados de nuestros estudios preliminares, donde se realizaron una serie de variantes de ELISA para la determinación del CEA. Estas consistieron

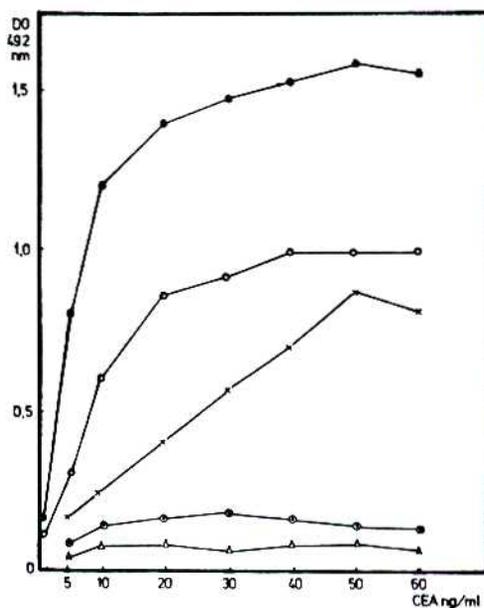


FIG. 3. Resultados de las diferentes combinaciones utilizadas en el ensayo inmunoenzimático para la determinación de CEA: (●) policlonal anti-CEA/IOR-CEA 1; (○) policlonal anti-CEA/IOR-CEA 2; (×) IOR-CEA 2/IOR-CEA 1; (○) IOR-CEA 1/IOR-CEA 1; (△) IOR-CEA 2/IOR-CEA 2. En estas descripciones el orden de aparición indica: primer anticuerpo (antígeno), segundo anticuerpo.

en ensayos *sandwich* indirectos con el antisuero policlonal de referencia, o los anticuerpos monoclonales purificados, en calidad de primer anticuerpo y los anticuerpos monoclonales como segundo anticuerpo.

De las diferentes variantes ensayadas, la combinación policlonal de referencia como primer anticuerpo y el IOR-CEA 1 en calidad de segundo anticuerpo, dio la mayor sensibilidad, discriminando entre aproximadamente 1 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de CEA purificado. Cuando se emplearon combinaciones de un mismo anticuerpo monoclonal, se observó una completa inhibición del ensayo, como era de esperar si el antígeno tuviera saturados los epítopes reconocidos. Como se observa también en la figura, el antisuero comercial reconoce el anticuerpo IOR-CEA 2 (IgM) por sus cadenas ligeras; los niveles inferiores exhibidos por la combinación policlonal-IOR-CEA 2 deben ser ascritos, por tanto, a la especificidad de este último. Empleando el IOR-CEA 2 como primer anticuerpo y el IOR-CEA 1 como segundo, se observaron niveles bajos de identificación, lo que puede deberse entre otras, a razones semejantes a la comentada. Actualmente se estudian diversas combinaciones con los restantes anticuerpos monoclonales con el fin de explorar la generación de un ELISA basado en este tipo de anticuerpos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su reconocimiento al trabajo técnico de Hortensia Font, Ana M. Suárez, Miriam Merino, Irene Beausoleil y Miriam Zaldívar, a los doctores Luis Moreno, Gilberto Fleites, Moisés Habech; a Luisa Bolaños por el suministro de tejidos y a Teresa Wong por la mecanografía. Este trabajo fue ejecutado en el marco de la colaboración existente entre el Departamento de Biología del INOR y el Departamento de Inmunología Clínica del Hospital Universitario de Huddinge, parcialmente financiado por la agencia sueca SAREC.

REFERENCIAS

- ACOLLA, R. S.; S. CARREL y J.-P. MACH (1980). *Monoclonal antibodies specific for carcinoembryonic antigen and produced by two hybrid cell lines*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 563-566.
- ACOLLA, R. S.; F. BUCHEGGER; S. CARREL y J.-P. MACH (1981). *Monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen and their possible applications*. Res. Monogr. Immunol. 3: 209-217.
- ALEXANDER, J. C. (1976). *Effect of age and cigarette smoking on CEA levels*. JAMA 235: 245-250.
- ASTALDI, G. C. B.; M. C. JANSEN; P. M. LANDORP; C. WILLERUS; W. P. ZEIJMBAKER y F. OBSTERHOF (1980). *Human endothelial culture supernatant (HECS): a growth factor for hybridomas*. J. Immunol. 125: 1411-1418.
- BANJO, C.; J. M. GOLD; J. SHUSTER y P. GOLD (1974). *Carcinoembryonic antigen: immunochemistry, physical chemistry and clinical implications*. Isr. J. Med. Sci. 10: 856-865.
- BUCHEGGER, F.; M. PHAN; D. RIVIER; S. CARREL; R. S. ACOLLA; J.-P. MACH (1982). *Monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen (CEA) used in a solid phase enzyme immunoassay. First clinical results*. J. Immunol. Methods 49: 129-139.
- BURTIN, P.; G. CHAVANAL y H. HIRSCH-MARIE (1973). *Characterization of a second normal antigen that cross-reacts with CEA*. J. Immunol. 111: 1926-1928.
- DE YOUNG, N. J. y L. K. ASHMAN (1978). *Physicochemical and immunochemical properties of carcinoembryonic antigen from different tumor sources*. Int. J. Exp. Biol. Med. Sci. 56: 321-331.
- FAIRWEATHER, D. S.; A. R. BRADWELL; P. W. DYKES; A. T. VAUGHAN; S. F. WATSON-JAMES y S. CHANDLER (1983). *Improved tumor localization using indium-111 labelled antibodies*. British Medical Journal. 287: 167-173.

- FARRANDS, P. A.; M. V. PIMM; M. J. EMBLETON; A. C. PERKINS; J. D. HARDY; R. W. BALDWIN y J. D. HARDSCASTLE (1982). *Radioimmuno-detection of human colorectal cancers by an antitumor monoclonal antibody*. *Lancet*, Aug 21st: 397-400.
- FONG, S.; M. BETANCOURT; H. COSTA y S. MOROZ (1982). *The radio-immunoassay of a carcino-embryonic antigen fraction*. *Neoplasma* 29: 9-18.
- GARCIA, C. A. y C. SILVA (1979). *Cultivo y estimulación de linfocitos humanos purificados con Vero-grafin*. Reporte preliminar, *Rev. CENIC* 10: 199-203.
- GARCIA, C. A.; J. 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.
- GOLD, P. y S. O. FREEDMAN (1965). *Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system*. *J. Exp. Med.* 122: 467-481.
- GOLDENBERG, D. M. (1976). *Oncofetal and other tumor-associated antigens of the human digestive system*. *Curr. Top. Pathol.* 63: 289-342.
- GOLDENBERG, D. M.; R. M. SHARKEY y F. J. PRIMUS (1978). *Immunocytochemical detections of carcinoembryonic antigen in conventional histopathology specimens*. *Cancer (Phi)* 42: 1546-1553.
- GOSLIN, R. H. (1981). *CEA: a useful monitor of therapy of small cell lung cancer*. *JAMA* 246: 135-146.
- HÄMMERLING, G. J.; V. HAMMERLING y J. F. KEARNEY (1981). *Monoclonal antibodies and T cell hybridomas*; En: *Research Monographs in Immunology*. Ed. J. L. Turk Vol. 3, pp. 453-457. Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, Oxford.
- HASKELL, C. M.; F. BUCHEGGER; M. SCHREYER; S. CARREL y J-P. MACH (1983). *Monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen: Ionic strength as a factor in the selection of antibodies for immunoscintigraphy*. *Cancer Research* 43: 3857-3864.
- HEDIN, A.; S. HAMMARSTRÖM y A. LARSSON (1982a). *Specificities and binding properties of eight monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen*. *Molecular Immunol.* Vol. 19, No. 12: 1641-1648.
- HEDIN, A.; B. WAHREN y S. HAMMARSTRÖM (1982b). *Tumor localization of CEA-containing human tumors in nude mice by means of monoclonal anti-CEA antibodies*. *Int. J. Cancer* 30: 547-552.
- HEDIN, A.; L. CARLSSON; A. BERLUNG y S. HAMMARSTRÖM (1983). *A monoclonal antibody enzyme immunoassay for serum carcinoembryonic antigen with increased specificity for carcinomas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 3470-3474.
- HILL, S.; E. MARTIN; E. C. ELLISON y W. E. HUNT (1980). *Carcinoembryonic antigen in cerebrospinal fluid of adult brain tumor patients*. *J. Neurosurg.* 53: 627-632.
- HOCKEY, M. S.; H. J. STOKES; H. THOMPSON; C. S. WOODHOUSE; F. MACDONALD; J. W. L. FIELDING y C. H. J. FORD (1984). *Carcinoembryonic antigen (CEA) expression and heterogeneity in primary and autologous metastatic gastric tumours demonstrated by a monoclonal antibody*. *Br. J. Cancer* 49: 129-133.
- HSU, T. (1973). *Preparation and analysis of karyotypes and idiograms*, En: *Tissue Culture, Methods and Applications*. Eds. P. Kruse y R. Patterson, pp. 764, Academic Press, New York.
- HUDSON, C. y F. HAY (1980). *Practical Immunology*, pp. 319, Blackwell Sci. Po. London-Edinburgh-Boston-Melbourne.
- KEARNEY, J. F.; A. RADBRUCH; B. LIÉSEGRANG 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.
- KOHLER, G. (1981). *The technique of hybridoma production*. *Immunological methods*, Vol. II: 285-298.
- LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROWGH; A. I. FARR y R. J. RANDALL (1981). *Protein measurement with the folin-ciocalteau reagent*. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- LUMBROSO, J.; C. BERCHE; J-P. MACH; P. ROUGIER; F. AUBRY; F. BUCHEGGER; P. LASSER; C. PARMETIER y M. TUBIANA (1983). *Utilization en tomoscintigraphie d'anticorps monoclonaux radio-marqués pour la détection chez l'homme des cancers digestifs et des cancers médullaires de la thyroïde*. *Bull Cancer (Paris)* 70, 2: 96-102.
- MATSUOKA, Y.; M. KUROKI; Y. KOGA; H. KURIYAMA; T. MORI y G. KOSAKI (1982). *Immunoche-*

- mical differences among carcinoembryonic antigen in tumor tissues and related antigens in meconium and adult feces. *Cancer Res.* 42: 2012-2018.
- MITCHELL, K. F. (1980). *A carcinoembryonic antigen (CEA) specific monoclonal hybridoma antibody that reacts only with high molecular weight CEA.* *Cancer Immunol. Immunother.* 10: 1-5.
- MOROZ, S.; S. FONG; A. PAVLENKO y A. M. SUAREZ (1978). *La especificidad del antígeno carcinoembriionario.* Resum. V Congreso Cubano de Oncología y I para los Países de la Cuenca del Caribe. pp. 111, La Habana.
- NICOLSON, G. L. (1984). *Cell surface molecules and tumor metastasis. Regulation of metastatic diversity.* *Expl. Cell Res.* 150: 3-22.
- NIH Conference (1981). *Carcinoembryonic antigen: its role as a marker in the management of cancer.* National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. *Cancer Res.* 41: 2017-2018.
- O'BRIEN, M. J.; N. ZAMCHUK; B. BURKE; S. E. KIRKHAM; C. A. SARAVIS y L. S. GOTTLIEB (1981). *Immunocytochemical localization of carcinoembryonic antigen in benign and malignant colorectal tissues. Assessment of diagnostic value.* *Am. J. Clin. Pathol.* 75: 283-290.
- OUCHTERLONY, O. y L. A. NIELSSON (1978). *Immunodiffusion and immunoelectrophoresis.* En: *Handbook of Experimental Immunology*, pp. 196. Ed. D. M. Weir Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edimburgh, Melbourne.
- PRIMUS, F. J.; D. A. CLARK y D. M. GOLDENBERG (1981). *Immunoperoxidase localization of carcinoembryonic antigen in normal human intestine mucosa.* *J. Natl. Cancer Inst.* 67: 1031-1039.
- PRIMUS, F. J.; W. J. KUHN y D. M. GOLDENBERG (1983a). *Immunological heterogeneity of carcinoembryonic antigen: immunochemical detection of carcinoembryonic antigen determinants in colonic tumors with monoclonal antibodies.* *Cancer Res.* 43: 693-701.
- PRIMUS, F. J.; K. D. NEWELL; A. BLUE y D. M. GOLDENBERG (1983b). *Immunological heterogeneity of carcinoembryonic antigens: antigens determinants on carcinoembryonic antigens distinguished by monoclonal antibodies.* *Cancer Res.* 43: 686-692.
- PRIMUS, F. J.; J. W. FREEMAN y D. M. GOLDENBERG (1983c). *Immunological heterogeneity of carcinoembryonic antigen: purification from meconium of an antigen related to carcinoembryonic antigen.* *Cancer Res.* 43: 679-685.
- ROGERS, G. T. (1976). *Heterogeneity of carcinoembryonic antigen. Implications on its role as a tumor marker substance.* *Biochem. Biophys. Acta* 458: 355-373.
- ROGERS, G. T.; G. A. RAWLINS y K. D. BAGSHAW (1981). *Somatic cell hybrids producing antibodies against CEA.* *Br. J. Cancer* 43: 1-4.
- ROLFSMITH, S.; A. HOWELL; A. MINAWA y J. M. MORRISON (1982). *The clinical value of immunohistochemically demonstrable CEA in breast cancer: A possible method of selecting patients for adjuvant chemotherapy.* *Br. J. Cancer* 46: 757-764.
- STEWART, A. M.; D. NIXON; N. ZAMCHEK y A. AISENBERG (1974). *Carcinoembryonic antigen in breast cancer patients: serum levels and disease progress.* *Cancer* 33: 1246-1252.
- STRAMIGNONI, D.; R. BOWEN; B. F. ATRINSON e I. SCHOM (1983). *Differential reactivity of monoclonal antibodies with human colon adenocarcinomas and adenomas.* *Int. J. Cancer* 31: 543-552.
- SVENBERG, T. (1976). *Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization.* *Int. J. Cancer*, 17: 588-596.
- THOMPSON, C. H.; S. L. JONES; E. PHIL e I. F. McKenzie (1983). *Monoclonal antibodies to human colon and colorectal carcinoma.* *Br. J. Cancer* 47: 595-605.
- VELANDIA, A.; A. M. BARRAL; A. M. VAZQUEZ y R. CASTILLO. *Estudio comparativo de los procesos de purificación de anticuerpos monoclonales por cromatografía de adsorción en hidroxilapatita (en preparación).*
- VAN NAGELL, J. R.; E. KIN; S. CASPER; F. J. PRIMUS; S. BENNET; FH. DELAND y D. M. GOLDENBERG (1980). *Radioimmuno-detection of primary and metastatic ovarian cancer using radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen.* *Cancer Res.* 40: 502-506.
- VON KLEIST, S. y P. BURTIN (1966). *Mise en evidence dans les tumeurs coloniques humaines d'antigenes non presentes dans la muqueuse colique de l'adulte normal.* *C. R. Acad. Sci (Paris)* 263: 1543-1546.
- VON KLEIST, S. y P. BURTIN (1979). *Antigens cross-reacting with CEA.* En: *Immunodiagnosis of Cancer.* Eds. R. B. Heberman, K. R. McIntire, pp. 322-341. Marcel Dekker Inc, New York.
- WAHREN, B.; G. GAHRTON y S. HAMMARSTRÖN (1980). *Non specific cross-reacting antigen in normal and leukemic myeloid cells and serum of leukemic patients.* *Cancer Res.* 40: 2039-2043.
- WALDMANN, H. y C. MILSTEIN (1982). *Monoclonal antibodies.* En: *Clinical Aspects of Immunology.*

- Eds. P. J. Lachmann, D. K. Peters, Vol. 1: 476-503. Blackwell Sci. Pub. Oxford-London-Edinburgh-Boston-Melbourne.
- WITTE, P. L. y R. BER (1983). *Improved efficiency of hybridoma ascites production by intrasplenic inoculation in mice.* J. Natl. Cancer Inst. **70**: 575-577.
- ZAMCHEK, N. (1978). *Factors controlling the circulating CEA levels in pancreatic cancer.* Cancer **42**: 1492-1497.