

Tesis de Posgrado

Estudios inmunológicos, físicos, químicos y biológicos de antígenos cancerosos

Díaz Primerano, Ana María L.

1981

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Díaz Primerano, Ana María L.. (1981). Estudios inmunológicos, físicos, químicos y biológicos de antígenos cancerosos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1656_DiazPrimerano.pdf

Cita tipo Chicago:

Díaz Primerano, Ana María L.. "Estudios inmunológicos, físicos, químicos y biológicos de antígenos cancerosos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1656_DiazPrimerano.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS INMUNOLOGICOS, FISICOS, QUIMICOS Y BIOLOGICOS
DE ANTIGENOS CANCEROSOS.

AUTOR: Lic. Ana María L. Díaz Primerano.

DIRECTOR: Dra. Ana María F. Brunengo.

LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Inmunoquímica.

Departamento de Química Biológica.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS.

1981

1656
Ej. 2

A mi madre

A Alberto

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Ana María F. Brunengo que me inició en el camino de la investigación y me brindó su permanente apoyo.

A mis compañeros de laboratorio Lcdos. Ernesto J. Massouh, Graciela B. Rojas, Jorge L. Ubogui y Carlos A. Pujol, y Sres. Guillermo Assad Ferek y Juan M. Fló por su estímulo y colaboración.

Al Dr. Raúl A. Gutman y al Servicio de Endocrinología y Medicina Nuclear del Hospital Italiano, a la Dra. Margarita T. de Beveraggi y al Dr. Eduardo de Robertis por su desinteresada ayuda.

A la Dra. Celia E. Coto de Ravaschino y al Dr. Osvaldo A. Peso por su constante estímulo.

A las Cátedras de Microbiología e Inmunología, Virología, Química Biológica, Química Orgánica y Biología Molecular por la colaboración prestada.

A la Lda. Beatriz González y a la Prof. María Laura Cattáneo por el análisis estadístico de los resultados.

A la Sra. Liliana Inés Vázquez de Espoille por la tarea dactilográfica realizada.

A mi familia por su estímulo y comprensión.

INDICE

INTRODUCCION.

Antígeno carcinoembriónico. Generalidades.....	1
Distribución de antígeno carcinoembriónico en tejidos.....	5
Localización celular del antígeno carcinoembrónico.....	8
Composición química del antígeno carcinoembriónico.....	10
Anticuerpos anti antígeno carcinoembriónico en pacientes.....	14
Producción de antígeno carcinoembriónico in vitro.....	15
Niveles de antígeno carcinoembriónico.....	17
Aplicaciones clínicas del antígeno carcinoembriónico...	18

OBJETIVOS.....

MATERIALES Y METODOS.

Tejidos.....	23
Extracción de glicoproteínas.....	24
Purificación de antígenos Electroenfoque en gradiente de sacarosa.....	25
Filtración molecular.....	26

Obtención de antisueros

Antisero anti extracto perclórico de glico- proteínas de colon normal.....	27
Antisero anti extracto perclórico de glico- proteínas de colon tumoral.....	31
Antisero anti antígeno carcinoembriónico.....	36
Determinación de proteínas.....	39
Determinación de glicoproteínas.....	39
Marcación radioactiva.....	40
Condiciones de lectura ^{125}I	41
Electroforesis en gel de poliacrilamida	
Detección de proteínas.....	41
Detección de glicoproteínas.....	42
Inmunodifusión.....	43
Inmunoelectroforesis.....	44
Radioinmunoensayo.....	44
Titulación de antisuero.....	45
Reacción de radioinmunoensayo.....	46
Métodos comerciales de radioinmunoensayo.....	47
Método del Laboratorio Sorin Biomédica.....	47
Método Phadebas CEA Prist de Pharmacia	
Diagnostics AB.....	49

Análisis estadístico.....	50
---------------------------	----

RESULTADOS.

Extracción de glicoproteínas.

Colon normal.....	51
-------------------	----

Colon tumoral.....	52
--------------------	----

Electroenfoque en gradiente de sacarosa.

Colon normal.....	54
-------------------	----

Colon tumoral.....	54
--------------------	----

Filtración molecular.....	81
---------------------------	----

Equivalencia entre los distintos estados de

purificación.....	91
-------------------	----

Marcación radioactiva.....	92
----------------------------	----

Colon normal.....	92
-------------------	----

Colon tumoral.....	92
--------------------	----

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Colon normal.....	111
-------------------	-----

Colon tumoral.....	120
--------------------	-----

Caracterización de antisueros.

Concentración proteica.....	131
-----------------------------	-----

Titulación semicuantitativa de IgM e IgG.....	133
---	-----

Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	137
--	-----

Immunodifusión.....	150
Sueros anti extracto perclórico de glicopro-	
teínas de colon normal.....	150
Sueros anti extracto perclórico de glicopro-	
teínas de colon tumoral.....	156
Sueros anti antígeno carcinoembriónico.....	164
Inmunoelectroforesis.....	164
Radioinmunoensayo.	
Titulación de antisueros anti extracto perclórico	
de glicoproteínas de colon normal.....	176
Titulación de antisueros anti extracto perclórico	
de glicoproteínas de colon tumoral.....	183
Titulación de antisueros anti antígeno carcino-	
embriónico.....	201
Reacción de radioinmunoensayo.....	208
Análisis estadístico.	
Mezcla de sueros de concentración baja de antígeno	
carcinoembriónico.....	211
Mezcla de sueros de concentración alta de	
antígeno carcinoembriónico.....	213
Discusión.....	215
Bibliografía.....	234

ABREVIATURAS.

<i>g</i>	: aceleración de la gravedad.
Ac	: anticuerpo.
Ag	: antígeno.
CEA	: antígeno carcinoembrionario.
NCA	: antígeno no específico de reacción cruzada.
NFA	: antígeno normal de heces.
As	: antisuero.
cms	: centímetros.
col	: colaboradores.
cpm	: cuentas por minuto.
dil	: dilución.
DO ₂₈₀	: densidad óptica a 280 nanómetros.
NGP	: glicoproteína normal.
°C	: grados centígrados.
<i>g</i>	: gramo.
hs	: horas.
IgG	: inmunoglobulina G.
IgM	: inmunoglobulina M.
idp	: inoculación intradermoplantal.
im	: inoculación intramuscular.

sc : inoculación subcutánea.

kg : kilogramo.

l : litro.

log : logaritmo en base diez.

uCi : microcurie.

ug : microgramo.

ul : microlitro.

mA : miliamperio.

mCi : milicurie.

mg : miligramo.

ml : mililitro.

mm : milímetro.

ng : nanogramo.

nm : nanómetro.

Nº : número.

PM : peso molecular.

% U : porcentaje de unión.

PBS : solución reguladora de fosfatos 0,01 M pH 7,0.

St : standard.

vs : versus.

V : voltios.

INTRODUCCION.

ANTIGENO CARCINOEMBRIONICO.

GENERALIDADES.

El antígeno carcinoembriónico fue inicialmente descrito por Gold y Freedman en 1965 (23). Estos investigadores establecieron que los antígenos tumor-específicos detectados en cánceres del sistema digestivo son una manifestación de factores determinados por el sitio de origen más que por el sitio de crecimiento del tumor, así se excluye la posibilidad que estos antígenos sean productos de interacción entre la masa invasiva y el tejido digestivo normal vecino, o que estén relacionados a contaminación exógena por virus entéricos.

Las lesiones cancerosas desarrolladas en varios sitios del sistema digestivo humano de origen endodérmico (esófago, intestino, hígado y páncreas) contienen antígenos específicos de tumor comunes que no están presentes en tumores malignos de la parte superior del sistema digestivo: paladar, piso anterior de la boca, glándulas parótidas, siendo estos tejidos de origen ectodérmico; es decir, que existiría una relación

entre los antígenos específicos de tumor del sistema digestivo y el desarrollo embrionario del tracto gastrointestinal humano.

Los estudios llevados a cabo por Gold y col. (23) indicaron la existencia de relación entre estos antígenos y ciertos componentes del tejido embrionario del sistema digestivo humano; estos constituyentes antigénicos comunes fueron, entonces, llamados "antígeno carcinoembrionario" del sistema digestivo humano.

Durante los procesos embrionarios y fetales de diferenciación, especialización y organización, que tienen lugar durante la mayor parte de la gestación humana, el tejido endodérmico del sistema digestivo contiene componentes antigénicos específicos que desaparecen en los últimos estadios de gestación y normalmente no reaparecen en la vida adulta, sin embargo, durante los cambios anaplásicos de desorganización y dediferenciación asociados con el proceso de transformación maligna reaparecen estos componentes por un proceso de dediferenciación derrepresiva como antígenos específicos de tumor.

En los primeros estadios de la división celular embrionaria humana cada célula primitiva está dotada con la totalidad de la información genética heredada; este potencial genético

base a las subsecuentes generaciones de células somáticas (55) y bajo la influencia de ciertos "organizadores" se comienzan a desarrollar los distintos sistemas de órganos. Durante este proceso actúan mecanismos genéticos represores comparables a aquellos demostrados para sistemas bacterianos(35) suprimiendo las áreas del genoma no requeridos para la especialización de las células en consideración. Una vez lograda una adecuada diferenciación del tejido antes del nacimiento ciertos componentes celulares imprescindibles durante el curso de especialización no son ya necesarios y entonces ocurre la represión de la información genética cesando la producción de estos componentes "primitivos" (22).

Durante los eventos de carcinogénesis se induce la expresión de información genética que normalmente está reprimida en las células maduras que no sufren transformación maligna. Así recomienza la producción citoplasmática de componentes fetales o embrionarios. Es, así, posible que estos constituyentes puedan ser detectados como antígenos específicos de tumor. Stonehill y Bendich (64) llaman a este fenómeno oncológico de reaparición de materiales específicos del embrión "expresión retrogenética".

La función de los componentes carcinoembrionarios en las

células fetales y cancerosas sería mantener la viabilidad de las células en su estado incompletamente diferenciado (23). Así, cuando se completa la diferenciación en las células fetales los antígenos carcinoembrionicos desaparecen y pueden actuar otros mecanismos para mantener la salud y función de las unidades celulares especializadas; en las células cancerosas, sin embargo, donde generalmente no se alcanza la rediferenciación a células normales, estos constituyentes carcinoembrionicos deben ser producidos continuamente para mantener la vida de las células malignas.

Existen otras macromoléculas humanas, además del antígeno carcinoembrionico, que son normales durante la vida embrionaria, desaparecen en los tejidos adultos normales, pero están presentes en los tejidos tumorales (22). Se pueden clasificar en dos categorías dependiendo si se encuentran o no en fluidos del cuerpo; aquellas que se encuentran fuera del tumor pueden ser subdivididas en dos grupos de acuerdo a la presencia o no de actividad biológica (Tabla 1) (44).

1) Presentes en tumores y fluídos del cuerpo.

a) Sin efectos metabólicos conocidos.

Antígeno carcinoembriónico.

Alfa₁ fetoproteína.

Alfa₂ H fetoproteína.

Beta S fetoproteína.

Antígenos asociados a leucemia.

Antígeno fetal heterófilo.

Antígeno fetal sulfoglicoproteico.

b) Con efectos metabólicos conocidos.

Fosfatasa alcalina placentaria.

Hormonas placentarias y productos relacionados.

2) Presentes sólo en tumores.

Tabla 1: Macromoléculas humanas fetales
asociadas a tumores.

DISTRIBUCION DE ANTIGENO CARCINOELBRIONICO EN TEJIDOS.

El antígeno carcinoembrónico ha sido detectado en neoplasias primarias del tracto alimentario desde el esófago hasta el recto, incluyendo páncreas y sus metástasis; en tracto alimentario, páncreas e hígado de fetos humanos entre 2 y

6 meses de gestación (44).

Con el desarrollo de técnicas de radioinmunoensayo se ha comprobado la existencia de material similar al antígeno carcinoembriónico en el suero de adultos normales y de pacientes con una amplia variedad de desórdenes inflamatorios o regenerativos gastrointestinales y de colon, neoplasias malignas y benignas en diferentes sitios (67), pólipos de colon, carcinomas bronquiales (44), suero y tejido tumoral de pacientes con carcinoma medular de tiroides (27), heces de sujetos normales y pacientes con tumor de colon (44), lavados de colon de individuos adultos sanos (15).

Se ha comprobado (47) la existencia de un sitio antigénico presente en el antígeno carcinoembriónico común a tejidos de origen endodérmico y no endodérmico (tejido fetal, cáncer de mama, neoplasia gastrointestinal, tumor de cabeza o cuello); sería un sitio ión-sensitivo que además de localizarse en la molécula de este antígeno estaría también presente en moléculas estructural y químicamente similares a él, que se encuentran a bajas concentraciones en colon y pulmón normales. El colon o el hígado normales no presentan suficiente cantidad de antígeno carcinoembriónico (se necesita al menos 1 ug) para precipitar anticuerpos anti antígeno carcinoembrió-

nico (8).

Martin y Martin (50) detectaron dos antígenos relacionados a cáncer de colon, uno de los cuales puede ser identificado con el antígeno carcinoembriónico descrito por Gold y col. (23). Ellos demostraron que estos antígenos están también presentes en mucosa de colon no cancerosa pero en concentraciones mucho menores que en tumores intestinales, lo que indicaría que las diferencias entre tejidos digestivos normales y cancerosos pueden ser cuantitativas más que específicamente cualitativas; en casos de colon normal distal a un adenocarcinoma la presencia de estos antígenos podría deberse a una contaminación con tejido tumoral, pero esto no es posible cuando se trabaja con muestras extraídas quirúrgicamente de enfermos no cancerosos. Otra posibilidad sería que estos antígenos fueran producidos artificialmente en el proceso de extracción por acción de ácido perclórico sobre un antígeno relacionado presente en el colon normal, pueden ocurrir pequeñas modificaciones como hidrólisis de algún residuo de azúcar como fucosa o ácido siálico que produzcan cambios en la especificidad de algún antígeno; tampoco se puede descartar la posibilidad de una reacción cruzada con un antígeno estereoquímicamente similar, pero no igual, al antígeno carcinoembriónico.

LOCALIZACION CELULAR DEL ANTIGENO CARCINOEMBRIONICO.

Estudios morfológicos realizados por Gold y col.(24) indican que el antígeno carcinoembriónico está asociado con la superficie de la célula tumoral.

El antígeno carcinoembriónico se localiza en el glicocáliz de la célula cancerosa de colon (25). Hay evidencias que los constituyentes del glicocáliz son formados en la célula que ellos cubren y no son adsorbidos pasivamente del medio circundante (34), así el antígeno carcinoembriónico sería un producto específico de la célula cancerosa del sistema digestivo, esto se confirmaría por el hecho que las células de la mucosa normal de colon cercana a la masa cancerosa no presentan antígeno carcinoembriónico en su glicocáliz(25).

La posible función del antígeno carcinoembriónico en la célula cancerosa del sistema digestivo no está clarificada por su localización estructural. Se han propuesto varios roles para el glicocáliz normal (25): participación en los mecanismos de absorción y transporte, características eléctricas, comportamiento inmunológico y adhesión intracelular. Sería especulativo considerar las posibles modificaciones en estas funciones que se efectuarían por la aparición del antígeno

carcinoembrionario en el glicocáliz de la célula epitelial del sistema digestivo en su transformación maligna.

Varios estudios indican que la adquisición de un antígeno tumoral está acompañada por la pérdida de antígenos normales citoplasmáticos y superficiales(6,56) lo que sugiere que puede existir una relación precursor-producto entre el antígeno normal y el tumoral; el área de pérdida de los antígenos normales en un tumor encierra aquellas áreas en que se puede demostrar el antígeno carcinoembrionario.

La producción de antígeno carcinoembrionario es dependiente de la acción secuencial de glicosil transferasas. Según Hakomori y Murakami(26) el tumor falla en completar sus antígenos, al menos los de naturaleza lipídica, es decir que el antígeno carcinoembrionario podría ser un antígeno normal incompleto, cabiendo la posibilidad que el producto normal sea degradado a antígeno carcinoembrionario, lo cual explicaría su presencia en tejidos donde la autólisis o tratamientos químicos pueden producir pérdida de residuos terminales de hidratos de carbono (44).

Por estudios inmunoenzimológicos (31) el antígeno carcinoembrionario aparece como un componente íntimamente asociado con la capa externa del borde estriado de las células columna-

res de la mucosa rectocolónica normal, y con la capa externa del polo apical de células de cánceres de recto y colon. También aparece como componente intracelular de células epiteliales de mucosa rectocolónica normal y de células secretantes de mucus en tumores. Su presencia en la cubierta o en el interior de la célula está relacionada con su grado de diferenciación, sea o no cancerosa; se ha observado una progresiva acumulación del antígeno en células epiteliales de colon normal que sufren maduración. Es decir que el antígeno carcinoembrionario sería una glicoproteína normal constituyente de las células epiteliales de la mucosa rectocolónica adulta humana, sintetizada y descargada por estas células. La diferencia en el contenido del antígeno entre la mucosa normal y la tumoral parece ser cuantitativa y se puede explicar, en parte, por el hecho que en sujetos normales es excretado mientras que en cancerosos permanece en cavidades cerradas donde alcanza altas concentraciones.

COMPOSICION QUIMICA DEL ANTIGENO CARCINOEMBRIONICO.

El antígeno carcinoembrionario es un complejo proteína - polisacárido soluble en agua(41), en ácido perclórico 1,0 M y en sulfato de amonio 50% de saturación(67). Los análisis de peso molecular indican una media de 200.000 daltons con

variaciones entre 120.000 y 220.000 daltons(4,29,33). Tiene movilidad electroforética β en gel de agar (50). Su coeficiente de sedimentación es 7-8 S (22).

El contenido de hidratos de carbono varía entre 50 - 75% de la molécula (2) siendo el más abundante N-acetil glucosamina (aproximadamente 25% de cada preparación de antígeno carcinoembrionario) (4); presenta también residuos de galactosa, manosa, glucosa, fucosa y ácido siálico (41). La presencia de manosa y la ausencia de N-acetil galactosamina hace que este antígeno se diferencie de las sustancias de grupos sanguíneos (44).

El antígeno carcinoembrionario es electroforéticamente heterogéneo siendo responsable de este fenómeno el ácido siálico (4), se comprobó que hay correlación entre el aumento de carga negativa y el contenido creciente de ácido siálico (7).

El antígeno carcinoembrionario presenta 0,01% de ácidos grasos (4).

Krupey y col. (41) demostraron que este antígeno presenta 14 residuos de aminoácidos diferentes: contiene 26 residuos de tirosina(71) y de 12 a 17 de cisteína por molécula (3).

El antígeno carcinoembrionario más que una proteína homogénea simple sería un grupo de moléculas oncodesarrolladas es-

estrechamente relacionadas que comparten ciertas características generales: peso molecular aproximadamente 200.000, presencia en la mayoría de adenocarcinomas humanos de colon, solubilidad en ácido perclórico, etc (13, 45).

Se han descrito una serie de antígenos que dan reacción cruzada con esta glicoproteína: NCA (antígeno no específico de reacción cruzada) (40): NGP (glicoproteína normal) (49); NFA (antígeno normal de heces)(52) y otros antígenos similares (4).

NCA es una glicoproteína presente en tejidos humanos normales, no es específica de órgano ni de tumor, es de bajo peso molecular; su constante de sedimentación es 3-4 S, tiene movilidad electroforética β (40).

NGP es una glicoproteína de bajo peso molecular con movilidad electroforética β ; puede ser extraída en cantidades importantes de pulmón y bazo normales, y en menor grado de hígado, mama, próstata e intestino normales (49).

NFA es un antígeno extraído de heces de adultos normales que difiere inmunológicamente de NCA ó NGP (52).

La identidad parcial entre el antígeno carcinoembrionario y estas glicoproteínas normales podría deberse a que estén codificados por genes homólogos originados por duplicación de un

gen ancestral común (49).

Según Matsuoka y col (51) la molécula de antígeno carcinoembrionario presenta tres determinantes antigénicos: uno cáncer específico y otros dos que reaccionan cruzado con NCA y NFA respectivamente. Por tratamiento con pepsina se destruyen los tres, en cambio al digerir con pronasa E, una enzima proteolítica derivada de *Streptomyces griseus*, sólo se destruye el determinante cáncer específico y se liberan dos fragmentos antigénicos correspondientes a los determinantes NCA y NFA; estos resultados sugieren que el primero sería de naturaleza proteica; se debe tener en cuenta que al ser al antígeno carcinoembrionario de naturaleza glicoproteica puede tener también determinantes polisacarídicos, además puede haber determinantes secuenciales y conformacionales (2). La presencia de residuos de cisteína en la molécula del antígeno carcinoembrionario permite la formación de uniones disulfuro intramoleculares (21) que modificarían la estructura primaria e inducirían una conformación que podría estar involucrada en la actividad antixénica de esta glicoproteína, ya que se comprueba que la reducción de esas uniones disminuye en un 90% esta actividad (3).

Westwood y col (71) efectuaron sustituciones químicas

en los residuos de triptofano, tirosina, histidina y arginina del antígeno carcinoembriónico y observaron que no hubo cambios significativos en la capacidad de unión del antígeno al antisue-ro homólogo, es decir que estos residuos no estarían involucrados en la unión Ag-Ac.

ANTICUERPOS ANTI ANTIGENO CARCINOEMBRIÓNICO EN PACIENTES.

Por estudios serológicos se ha demostrado que el 70% de los pacientes de cáncer no metastásico del sistema digestivo, y un porcentaje similar de mujeres durante el embarazo y período post-parto contienen anticuerpos anti antígeno carcinoembriónico en su suero; pero en pacientes donde el tumor ha sufrido diseminación del sitio primario no se detectaron estos anticuerpos (24, 67). Se postularon dos explicaciones para esta observación:

- 1) puede ser que una gran masa de tumor absorba los anticuerpos anti antígeno carcinoembriónico al circular la sangre por el tejido tumoral.
- 2) es posible que el tejido tumoral libere antígeno carcinoembriónico directamente en circulación alcanzando una gran concentración, y se formen así complejos Ag-

Ac en exceso de antígeno, de tal manera que los anticuerpos anti antígeno carcinoembrionario no estén disponibles para participar en reacciones serológicas.

Puede ser que estos anticuerpos no sean citolíticos y actuarían entonces favoreciendo el crecimiento tumoral, ya que prevenirían el ataque del tumor por algún mecanismo celular citolítico (9 , 24).

Hellström y col. (30) han mostrado que el suero de pacientes con tumores contiene un factor bloqueante que protege al tumor del ataque por linfocitos sensibilizados, y que podría tratarse de un complejo Ag-Ac.

PRODUCCION DE ANTIGENO CARCINOEMBRIONICO IN VITRO.

Se ha comprobado la producción de antígeno carcinoembrionario por líneas celulares derivadas de carcinomas. Así, se han mantenido tejidos derivados de cáncer de colon por 7 años y de metástasis en hígado de un carcinoma gástrico por 8 años detectándose la producción de antígeno por inmunofluorescencia (22). Ellison y col. (17) establecieron una línea celular derivada de una metástasis en nódulo supraclavicular de un carcinoma bronquial y comprobaron que la cantidad de antígeno carcino-

embriónico liberado es directamente proporcional al número de células y permanece constante durante varias generaciones, al menos 80 pasajes, si no se modifican las condiciones de cultivo, pero si se alteran de modo que la división celular sea más rápida disminuye la cantidad liberada. Si se establecen condiciones tóxicas letales o subletales se produce una inmediata liberación de antígeno carcinoembriónico.

David y col. (10) comprobaron que el antígeno carcinoembriónico producido in vitro por un cultivo de células derivadas de un adenocarcinoma primario de colon humano tiene características similares al aislado de metástasis de tumor de colon.

Arnon y col. (2) sintetizaron un péptido constituido por los once amino-ácidos amino terminales del antígeno carcinoembriónico, y lo utilizaron para inmunizar conejos obteniendo un antisuero que no reaccionó con el antígeno puro y sí lo hizo con un extracto crudo, es decir que no reconoció a la proteína nativa pero sí a una forma modificada o a productos de degradación que estarían presentes en ese extracto. También reaccionó con suero de pacientes de adenocarcinoma de tracto digestivo y no con suero de pacientes de otras neoplasias o individuos normales: es decir que algunos pacientes

pueden contener en su suero antígeno carcinoembrionario intacto, y otros pueden contener productos de su degradación parcial o ambos productos.

NIVELES DE ANTIGENO CARCINOEMBRIÓNICO.

Egan y col (14) determinaron por reacción de radioinmunoensayo la concentración del antígeno carcinoembrionario en plasma estableciendo tres niveles:

Normal < 12,5 ng de CEA / ml de plasma.

Intermedio 12,5-40,0 ng de CEA / ml de plasma.

Alto > 40,0 ng de CEA / ml de plasma.

Si antes de la intervención quirúrgica el nivel de antígeno carcinoembrionario es alto decrecerá a valores normales entre dos y dieciocho días después de la operación, cuando el tumor ha sido completamente extirpado; en caso de mantenerse un nivel alto ello indicaría una enfermedad residual o metástasis (44).

Los niveles de antígeno carcinoembrionario son rápidamente clarificados de circulación a través del hígado (66).

APLICACIONES CLINICAS DEL ANTIGENO CARCINOEMBRIÓNICO.

Inicialmente el antígeno carcinoembriónico fue considerado una sustancia específica de cáncer del tracto digestivo inferior (23) pero estudios posteriores han detectado su presencia en tejidos normales, en diversas manifestaciones neoplásicas y en enfermedades benignas (15, 27, 44, 50, 67). Es decir que no es específico de tumor y las diferencias de su presencia en tejidos normales y neoplásicos es cuantitativa más que cualitativa.

Los valores plasmáticos del antígeno carcinoembriónico se encuentran elevados en individuos fumadores sanos, pacientes con tumores gastrointestinales, de vejiga y de mama (43), neuroblastomas, diverticulosis, úlcera péptica, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (44).

Debido a esta falta de especificidad no se puede utilizar la determinación de antígeno carcinoembriónico como un índice definitivo de diagnóstico de cáncer de colon ya que podrían obtenerse resultados falsos positivos.

Así, las principales aplicaciones clínicas de la estimación de antígeno carcinoembriónico son tres:

- 1) Constatar la efectividad de un tratamiento: la deter-

minación antes y tres semanas después de una operación da una indicación del éxito de la misma. La variación del nivel durante radioterapia o quimioterapia permite conocer la eficiencia del tratamiento y de las dosis usadas.

- 2) Detectar recurrencias o metástasis: la elevación del nivel de antígeno carcinoembrionario en individuos que habían alcanzado valores normales luego de una intervención quirúrgica, indica una recurrencia o metástasis.
- 3) Ayudar en el diagnóstico de cáncer como un complemento de otras observaciones clínicas.

El método que se usa normalmente para la detección del antígeno carcinoembrionario es el radioinmunoensayo que fue ensayado por primera vez para esta sustancia por Thomson en 1969 (67).

Este ensayo requiere la marcación con I^{125} del antígeno carcinoembrionario. Las moléculas marcadas y nativas se incuban de tal manera que compitan por los sitios específicos del anticuerpo anti antígeno carcinoembrionario efectuándose luego la separación del complejo Ag-Ac del antígeno libre, que se puede lograr por la técnica de Farr (19) que usa sulfato de amo-

nia al 50% para precipitar el complejo, se puede emplear un segundo anticuerpo (6) o un gel de fosfato de zirconilo (47).

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue aislar y purificar antígenos cancerosos, para tal fin se usaron tumores de colon de individuos adultos de raza caucásica. Se efectuaron estudios físicos, químicos e inmunológicos con los materiales obtenidos en las distintas etapas de purificación identificándose el antígeno carcinoembrionario y comprobándose el grado de pureza obtenido.

Estos antígenos fueron utilizados para inmunizar conejos, se obtuvieron así antisueros contra el extracto bruto de glicoproteínas y el antígeno carcinoembrionario puro. Se estudiaron las características de estos antisueros y se analizó por distintas técnicas inmunológicas la respuesta de los animales en los diferentes estadios de inmunización.

Se montó la técnica de radioinmunoensayo con los distintos antisueros y antígenos obtenidos y se usó para dosar el contenido de antígeno carcinoembrionario en mezclas de sueros de pacientes con alta y baja concentración del antígeno, medida previamente por métodos comerciales. Se compararon los resultados obtenidos con antisueros que habían tenido una buena respuesta al extracto bruto y pobre al antígeno puro y vice-

versa, buscándose la significación entre los distintos animales, sangrías, grado de purificación del antígeno e interacciones conjuntas. Asimismo se compararon con los resultados obtenidos con productos de naturaleza comercial, en los que el antisuero utilizado se obtiene por inmunización de animales con extracto de metástasis de tumor de colon.

Se trataron de establecer las mejores condiciones para una segura identificación y cuantificación del antígeno carcinoembrionario.

MATERIALES Y METODOS

TEJIDOS.

Todas las muestras utilizadas en este trabajo corresponden a tejidos humanos adultos.

Los tejidos normales fueron obtenidos de autopsias realizadas hasta 24 horas después de la muerte o de operaciones quirúrgicas de adenocarcinomas de colon, habiendo sido extraídos a una distancia mayor de 8 cms del tumor. Se procesaron 9 muestras con un peso total de 230 gramos.

Los tejidos tumorales se obtuvieron de individuos operados quirúrgicamente en el Hospital Italiano de Buenos Aires, de adenocarcinomas primarios de colon, diagnóstico establecido por observación histológica en todos los casos. El peso de las muestras, luego de haber separado los tejidos normales, varió entre 2,8 y 130,0 gramos. Se procesaron 32 tumores con un peso total de 1250 gramos.

Luego de su recepción las muestras se conservaron a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

EXTRACCION DE GLICOPROTEINAS.

Se siguió la técnica descrita por Edgington y colaboradores (13). El procedimiento fue el mismo tanto para muestras de colon normal como tumoral.

El tejido se cortó con bisturí en trozos de 1 - 2 mm y se homogeneizó con dos volúmenes de cloruro de sodio 1 M en homogeneizador Omni Mixer (Sorvall Inc.) a la máxima velocidad durante 20-30 minutos a 0°C. Se mantuvo 18 hs a 4°C. Al cabo de ese período se volvió a homogeneizar y se filtró a través de nylon. A fin de eliminar los restos celulares se centrifugó 2 horas a 68.000 x g a 0°C en ultracentrífuga Beckman Model L-2 con rotor Beckman SW-27 Swinging Bucket. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se dializó a 4°C durante 24 hs contra cuatro cambios de solución reguladora de fosfatos 0,01 M pH 7,0 (PBS) y luego 20 hs contra dos cambios de agua deionizada. El material insoluble se eliminó centrifugando nuevamente a 68000 x g durante 2 horas. Para extraer las glicoproteínas, el sobrenadante de esta centrifugación se llevó a 0,9 M en ácido perclórico agregando la cantidad adecuada de ácido concentrado. Se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugó en centrífuga refrigerada International PR-2 con rotor

284 a 1800 x g durante 30 minutos a 0°C. El precipitado se descartó y el sobrenadante, luego de ser neutralizado con hidróxido de amonio concentrado, se dializó durante 24 hs a 4°C contra cuatro cambios de agua deionizada, se liofilizó y conservó a 4°C.

PURIFICACION DE ANTIGENOS.

Electroenfoque en gradiente de sacarosa.

Se realizó electroenfoque en una columna LKB 7900 Uniphor de 90 ml (LKB Stockholm, Sweden). Todos los procedimientos se efectuaron de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (46).

Se usó un gradiente estabilizante de 0 a 50% de sacarosa con 1% de anfolito carrier Ampholine (LKB, Stockholm, Sweden) en un rango de pH de 3,5 a 6,0, ó 1% de anfolito carrier Pharmalyte (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) en un rango de pH de 2,5 a 6,5. La muestra (15 a 50 mg de glicoproteínas) fue distribuída a lo largo del gradiente de sacarosa, colocándola en el compartimento de la solución liviana del mezclador del gradiente.

El electrodo superior de la columna correspondió al cátodo y el inferior al ánodo. La solución catódica usada fue hidró-

xido de sodio 0,2 M y la anódica sacarosa 56% en ácido fosfórico 0,93%. El proceso de electroenfoque se realizó durante 24 hs a un voltaje constante de 600 V e intensidad de corriente variable entre 2,4 y 50,0 mA a 10°C. Al cabo de dicho tiempo el contenido de la columna fue eluído con una bomba peristáltica Amicon LP-1 a una relación de flujo de 90 ml/hora. Se recogieron fracciones de 4 ml y se midió el pH de cada una de ellas en un pHmetro Radiometer Copenhagen NV; las fracciones correspondientes al rango de pH del anfolito usado se dializaron 24 hs contra varios cambios de agua destilada a fin de eliminar sacarosa y anfolitos. Se midió la densidad óptica de cada dializado a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DB. Se hizo una mezcla con las fracciones obtenidas en distintas corridas de electroenfoque que presentaban igual rango de pH y picos de densidad óptica, se liofilizó y conservó a 4°C.

Filtración molecular.

La fracción de electroenfoque correspondiente a pH 4,60 - 4,95 se disolvió en PBS (1,4 - 3,4 mg/ml) y se sembró en una columna de Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals Ab, Uppsala Sweden) de 20 x 1,8 cm, equilibrada con el mismo buffer, que

también se usó para eluir (37). Se recogieron fracciones de 4ml a una relación de flujo de 40 ml/h. Se midió la densidad óptica a 280 nm; se mezclaron las fracciones que correspondían a picos de densidad óptica y se liofilizaron.

Previamente se calibró la columna con 2 mg de catalasa de hígado bovino C_{40} (PM: 250.000) y 2 mg de tripsina de páncreas Difco (PM: 23.800) disueltos en 2 ml de PBS, se trabajó en las mismas condiciones que con las muestras.

OBTENCION DE ANTISUEROS.

Antisuero anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

Se inyectaron una vez por semana 2 conejos de aproximadamente 2,5 kg de peso con extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal. En el Cuadro 1 se detalla el esquema seguido.

CONEJO	ANTIGENO	mg INYECTADOS.	TOTAL INYECTADO HASTA EL TIEMPO DE SANGRIA (mg)	VIA	DESCANSO	SANGRIA
Nº 1	Extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal con adyuvante de Freund completo.	0,35		2ml sc espalda.		
		0,35		2ml sc espalda.		
		0,35		2ml sc espalda.		
		0,35		2ml id.		

CONEJO	ANTIGENO	mg INYEC- TADOS	TOTAL IN- YECTADO HASTA EL TIEMPO DE SAN- GRIA(mg)	VIA	DESCANSO	SANGRIA
	Extracto perclórico de gli- coproteínas de co- lon nor- mal con adyuvante de Freund incomple- to.	0,35		2ml sc espal- da.	5 semanas	
		0,35		2ml sc espal- da.		
		0,35		2ml sc espal- da.		
		0,35		2ml idp.		
	idem	0,35		3ml sc espal- da.	4 semanas	
		0,35		3ml sc espal- da.		
		0,35		3ml sc espal- da.		
		0,35		3ml idp		
			4,20			1º san- gría: 17 semanas.
	idem	0,35		3ml sc espal- da.	4 semanas	
		0,35		3ml sc espal- da.		

CONEJO	ANTIGENO	mg INYEC- TADOS	TOTAL IN- YECTADO HASTA EL TIEMPO DE SAN- GRIA(mg)	VIA	DESCANSO	SANGRIA
		0,35		3ml sc espald- da.		
		0,35		3ml idp		
			5,60			2da. san- gría: 6 semanas (23 se- manas to- tales).
	idem	0,35		3ml im	4 semanas	
		0,35		3ml im		
		0,35		3ml im		
		0,35		3ml im		
					4 semanas	
	idem	0,35		0,5ml im		
		0,35		0,5ml im		
		0,35		0,5ml im		
		0,35		0,5ml im		
					4 semanas	
	idem	0,35		0,5ml im		
		0,35		0,5ml im		
		0,35		0,5ml im		

CONEJO	ANTIGENO	mg INYEC- TADOS	TOTAL IN- YECTADO HASTA EL TIEMPO DE SAN- GRIA (mg)	VIA	DESCANSO	SANGRIA	
		0,35	9,80	0,5ml im		3ra.san- gría: 19 semanas (42 sema- nas tota- les).	
Nº 2	Extracto perclóri- co de gli- coproteí- nas de co- lon normal con adyu- vante de Freund completo.	0,35		2ml sc espal- da.	5 semanas		
		0,35		2ml sc espal- da.			
		0,35		2ml sc espal- da.			
		0,35		2ml idp			
	Extracto perclóri- co de gli- coproteí- nas de co- lon normal con adyu- vante de Freund in- completo.	0,35		2ml sc espal- da.			4 semanas
		0,35		2ml sc espal- da.			
		0,35		2ml sc espal- da.			
		0,35		2ml idp			

CONEJO	ANTIGENO	mg INYEC- TADOS	TOTAL IN- YECTADO HASTA EL TIEMPO DE SAN- GRIA(mg)	VIA	DESCANSO	SANGRIA
	idem	0,35		3ml sc espal- da.		
		0,35		3ml sc espal- da.		
		0,35		3ml sc espal- da.		
		0,35		3ml idp		
			4,20		1 semana	1º san- gría: 17 semanas
			4,20			2da.san- gría: 1 (18 se- manas to- tales).

Cuadro 1: Inmunización de conejos con extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

Antisuero anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

Se inyectaron una vez por semana 3 conejos de aproximadamente 2,5 Kg de peso con extracto perclórico de glicoproteínas

de colon tumoral. En el Cuadro 2 se detalla el esquema seguido.

CONEJO	ANTIGENO	mg INYEC- TADOS	TOTAL IN- YECTADO HASTA EL TIEMPO DE SAN- GRIA(mg)	VIA	DESCANSO	SANGRIA	
Nº 3	Extracto perclóri- co de gli- coproteí- nas de tumor de colon con adyuvante de Freund completo.	6,00	10,2	3ml sc espalda.	4 semanas	1º san- gría: 9 semanas.	
		0,60		0,3ml sc es- palda.			
		0,60		0,3ml sc es- palda.			
		0,60		0,3ml idp.			
	Extracto perclóri- co de gli- coproteí- nas de tumor de colon con adyuvante de Freund incomple- to.	0,60		1,3ml sc espalda.			2 semanas
		0,60		1,3ml sc espalda.			
		0,60		1,3ml sc espalda.			
		0,60		1,3ml idp.			

CONEJO	ANTIGENO	mg INYEC- TADOS	TOTAL IN- YECTADO HASTA EL TIEMPO DE SAN- GRIA(mg)	VIA	DESCANSO	SANGRIA
	idem	0,60		4,5ml sc es- palda.		
		0,60		4,5ml sc es- palda.		
		0,60		0,6ml sc es- palda.		
		0,60		0,6idp.		
					2 semanas	
	idem	0,60		0,5ml sc es- palda.		
		0,60		0,5ml sc es- palda.		
		0,60		0,5ml im.		
		0,60		0,5ml im.		
					2 semanas	
	idem	0,60		0,8ml im.		
		0,60		0,8ml im.		
		0,60		0,8ml im.		
		0,60		0,8ml im.		

CONEJO	ANTIGENO	mg INYECTADOS	TOTAL INYECTADO HASTA EL TIEMPO DE SANGRIA (mg)	VIA	DESCANSO	SANGRIA
			17,4			2da. sangría: 19 semanas (28 semanas totales).
	idem	0,30		0,5ml sc espalda.	8 semanas	
		0,30		0,5ml sc espalda.		
		0,30		0,5ml sc espalda.		
		0,30		0,5ml idp.		
			18,6			3era. sangría: 13 semanas (41 semanas totales).
	idem	0,30		0,5ml sc espalda.	6 semanas	
		0,30		0,5ml sc espalda.		
		0,30		0,5ml sc espalda.		
		0,30		0,5ml idp.		

CONEJO	ANTIGENO	mg INYECTADOS	TOTAL INYECTADO HASTA EL TIEMPO DE SANGRIA (mg)	VIA	DESCANSO	SANGRIA
			19,8			4ta. sangría: 11 semanas (52 semanas totales).
	idem	0,30 0,30 0,30 0,30		1,2ml sc espalda. 1,2ml sc espalda. 1,2ml sc espalda. 1,2ml idp.	11 semanas	
			21,0			5ta. sangría: 16 semanas (68 semanas totales).
Nº 4 (Hasta la 4ta. sangría el esquema es similar al del Conejo Nº 3)					5 semanas	

CONEJO	ANTIGENO	mg INYECTADOS	TOTAL INYECTADO HASTA EL TIEMPO DE SANGRIA (mg)	VIA	DESCANSO	SANGRIA
	Extracto perclórico de glicoproteínas de tumor de colon con adyuvante de Freund incompleto.	1,25	21,05	5ml sc espalda.		5ta.sangría: 6 semanas (58 semanas).
Nº 5 Idem conejo Nº 3						

Cuadro 2: Inmunización de conejos con extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

Antisuero anti antígeno carcinoembriónico.

Se inyectaron semanalmente 2 conejos de aproximadamente 2,5 kg de peso con antígeno carcinoembriónico obtenido por purificación del extracto perclórico de glicoproteínas de colon

tumoral por electroenfoque y filtración molecular. En el Cuadro 3 se detalla el esquema seguido.

CONEJO	ANTIGENO	ug INYEC- TADOS	TOTAL IN- YECTADO HASTA EL TIEMPO DE SAN- GRIA(ug)	VIA	DESCANSO	SANGRIA
Nº 6	Antígeno carcino-embriónico con adyuvante de Freund completo.	25	100	0,3ml sc espalda.	4 semanas	1º san- gría: 3 semanas.
		25		0,3ml sc espalda.		
		25		0,3ml sc espalda.		
		25		0,3ml idp.		
	Antígeno carcino-embriónico en adyuvante de Freund incompleto.	25	200	0,3ml sc espalda.	3 semanas	2da. san- gría: 6 semanas (9 sema- nas tota- les).
		25		0,3ml sc espalda.		
		25		0,3ml sc espalda.		
		25		0,3ml idp.		

CONEJO	ANTIGENO	ug INYEC- TADOS	TOTAL IN- YECTADO HASTA EL TIEMPO DE SAN- GRIA (ug)	VIA	DESCANSO	SANGRIA
	idem	25 25 25 25	300	0,3ml sc espalda. 0,3ml sc espalda. 0,3ml sc espalda. 0,3ml idp.		3era. san- gría: 6 semanas (15 sema- nas tota- les).
Nº 7	Antígeno carcino- embrióni- co en ad- yuvante de Freund completo.	246,0 24,6 24,6 24,6	319,8	0,3ml sc espalda. 0,3ml sc espalda. 0,3ml sc espalda. 0,3ml idp.		1º san- gría: 3 semanas. 4 semanas.
	Antígeno carcino- embrióni- co en ad-	24,6 24,6		0,3ml sc espalda. 0,3ml sc espalda.		

CONEJO	ANTIGENO	ug INYEC TADOS	TOTAL IN YECTADO HASTA EL TIEMPO DE SAN- GRIA(ug)	VIA	DESCANSO	SANGRIA
	yuvante de Freund incomple- to.	24,6 24,6	418,2	0,3ml sc espalda. 0,3ml idp		2da. san- gría: 3 semanas (10 sema- nas).

Cuadro 3: Inmunización de conejos con antígenos carcino-embriónico.

En todos los casos los conejos fueron sangrados por punción cardíaca.

DETERMINACION DE PROTEINAS.

Se utilizó el método de Lowry y col. (48) para determinar la concentración de proteínas durante la purificación del antígeno carcinoembriónico y de los distintos antisueros obtenidos. Se usó sero albúmina bovina BDH como proteína standard.

DETERMINACION DE GLICOPROTEINAS.

Se determinó la concentración de glicoproteínas de acuerdo a Dubois y col.(12). Se usó una solución standard de manosa

(30 mg/ml) y galactosa (20 mg/ml) para realizar una curva de calibración.

MARCACION RADIOACTIVA.

Se marcaron con radioactividad según el método de Hunter y Greenwood (32), extractos perclóricos de glicoproteínas de colon normal y tumoral, fracciones de electroenfoque y antígeno purificado por filtración molecular.

La mezcla de reacción consistió en 50 ul de cloramina T (3,5 mg/ml en buffer fosfato 0,05 M pH 7,4), 50ug de proteína, 0,5 mCi de ^{125}I Na (New England Nuclear) y 25 ul de buffer fosfato 0,05 M pH 7,4. Se dejó en contacto un minuto a temperatura ambiente y se detuvo la reacción por adición de 75 ul de metabisulfito de sodio (4 mg/ml de buffer fosfato 0,05 M pH 7,4). La proteína marcada se separó del ^{125}I Na no reactivo por cromatografía en una columna de (27 x 1) cms de Sephadex G25 (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala Sweden) equilibrado con buffer fosfato 0,05 M pH 7,4, que también se usó para eluir. Se recogieron fracciones de 0,5 ml, y se midió la radioactividad de cada una.

CONDICIONES DE LECTURA PARA ^{125}I .

Se usó un contador de pozo Tecnuar-Tria 300 Modelo CP₂ con cristal de ioduro de sodio activado con talio de 1 3/4 x 2 pulgadas, fotomultiplicador tipo RCA GG55 A, Kv = 0,9 Atenuador x 1, v = 6,6, ancho de canal x 100, nivel de canal 1,2. Tiempo: entre 30 y 60 segundos.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Detección de proteínas.

Se realizó de acuerdo a la técnica de Davis y Ornstein (11). Se utilizó gel de acrilamida 7% como gel separador y 1,25% como gel espaciador en buffer tris-glicina pH 8,3. Se sembraron 250 ug de proteína por gel. La electroforesis se llevó a cabo durante 2,5 a 3 horas, el voltaje varió de 140 V al comienzo de la corrida a 300 V al término de la misma y la intensidad de corriente fue de 3 mA por tubo hasta que el colorante indicador (azul de bromofenol 1mg.% en agua destilada) atravesó el gel espaciador y luego se aumentó a 5 mA por tubo.

Una vez finalizada la corrida electroforética se separó el gel del tubo de corrida y se tiñó durante 18 horas con azul de Coomasie 10 mg % en metanol: ácido acético: agua destilada (4: 1: 5), y luego se destiñó con metanol: ácido acético: agua destilada (4: 1: 15). Una vez desteñidos los geles se determinó el perfil de densidad óptica a 590 nm en espectrodensitógrafo Crudo Camaño.

Cuando se trabajó con muestra marcada con ^{125}I se corrieron dos geles, uno se tiñó con azul de Coomasie, y el otro luego de separarlo del tubo de corrida, se mantuvo a -70°C durante 24 hs, posteriormente se cortó en discos de 1 mm de espesor y se midió la radioactividad de cada disco (8).

Detección de glicoproteínas.

Se efectuó de acuerdo a Segrest y col. (62). Se utilizó gel de acrilamida 7,5% en buffer fosfato 0,1 M pH 7,2; se sembraron 300 ug de glicoproteínas por gel. Se corrió con una intensidad de corriente de 6 mA por tubo hasta que el colorante indicador (azul de bromofenol 0,1% en agua destilada) se desplazó 7 cm del origen (aproximadamente 5 horas). Se fijó duran-

te 18 hs en etanol: ácido acético: agua destilada (40: 5: 55). Se oxidó con ácido periódico 0,7% en ácido acético 5% durante 2 horas; luego se trató durante 3 hs con metabisulfito de sodio 0,2% en ácido acético 5%, y finalmente se colocó en reactivo de Schiff en el que se conservó

INMUNODIFUSION.

Se titularon los distintos antisueros frente a diferentes antígenos por la técnica de doble difusión de Outcherlony (57) en portaobjetos. Se determinó también el título de IgM e IgG para lo cual se utilizaron sueros anti IgM y anti IgG de conejo producidos en cabra (Miles Yeda, Israel).

Se usó agar Oxoid N°2 1% en solución fisiológica (cloruro de sodio 0,15 M) con 0,01% de azida sódica. Se incubó en cámara húmeda a 4°C y se observó diariamente durante una semana. Al cabo de este período los portaobjetos se lavaron con solución fisiológica durante 48 hs y con agua destilada 24 hs, luego se secaron con papel de filtro a 37°C durante 48 hs y se tiñeron con Amido Schwartz B 0,1% en ácido acético 1 M: acetato de sodio 0,1 M: glicerina (45: 45: 10) y pos-

teriormente se decoloraron con ácido acético 7%.

INMUNOELECTROFORESIS.

Se realizó de acuerdo al micro método de J. J. Scheidegger (61). Se usó agar Noble Difco 1,5% en buffer veronal 0,05 M a pH 8,6. La corrida electroforética duró de 45 a 60 minutos con una intensidad de corriente de 8 mA por portaobjetos y voltaje entre 200 y 300 V. Luego de sembrar los antisueros los portaobjetos se incubaron en cámara húmeda a 4°C, y después del tiempo necesario para revelar las líneas de precipitación (8 días), se lavaron durante 48 hs con solución fisiológica y 24 hs con agua destilada, se secaron con papel de filtro a 37°C durante 48 hs y se tiñeron con Amido Schwartz B 0,1% en AcOH 1 M: acetato de sodio 0,1 M: glicerina (45: 45: 10) y luego se decoloraron con ácido acético 7%.

RADIOINMUNOENSAYO.

Se basó en una modificación de la técnica de coprecipitación - inhibición de Farr(19).

Titulación de antisueros.

Se usó como diluyente buffer borato 0,1 M, pH 8,3 con 1% de suero normal de conejo. Se hicieron diluciones seriadas de los antisueros y se colocó 0,4 ml de cada una de estas diluciones en sendos tubos de ensayos, se agregó 1,1 ml de buffer borato y 0,2 ml de trazador (extractos perclóricos de glicoproteínas de colon normal y tumoral, fracciones de electroenfoque y filtración molecular). Se incubó 72 hs a 4°C. Se agregó 1,7 ml de solución saturada de sulfato de amonio y se midió la radioactividad de cada tubo. Se continuó incubando otras 24 hs en las mismas condiciones. Al cabo de este período se centrifugó una hora a 1000 x g, y se descartó el sobrenadante. Se midió la radioactividad del precipitado y se calculó el porcentaje de unión Ag-Ac como:

$$\% \text{ de unión}_{\text{Ag-Ac}} = \frac{\text{cpm en el precipitado}}{\text{cpm totales}} \cdot 100 \quad (\text{A})$$

Se graficó porcentaje de unión versus dilución del antisuero (escala log) y se calculó la dilución del antisuero que produce un 30% de unión (69), siendo su inversa el título del antisuero.

REACCION DE RADIOINMUNOENSAYO.

Se hicieron diluciones seriadas de los diferentes antígenos (extractos perclóricos de glicoproteínas de colon normal y tumoral, fracciones de electroenfoque y filtración molecular) en buffer borato 0,1 M pH 8,3. Se colocaron 50 ul de cada una de estas diluciones en tubos de ensayo, se agregaron 50 ul de suero normal de conejo, 200 ul de buffer borato y 100 ul de antisuero en la dilución que produce un 30% de unión. Las soluciones resultantes se incubaron 24 hs a 4°C, y entonces se agregaron 100 ul de trazador (extractos perclóricos de glicoproteínas de colon normal o tumoral, fracciones de electroenfoque o filtración molecular) a cada tubo. La incubación continuó en las mismas condiciones otras 72 hs. Luego de este período se agregaron 500 ul de solución saturada de sulfato de amonio a cada tubo, se midió la radioactividad de cada uno de ellos y se incubó otras 24 hs. Finalizada esta incubación se centrifugó una hora 1000 x g y se descartaron los sobrenadantes. Se midió la radioactividad de los precipitados y se calculó el porcentaje de unión según la fórmula (A); se graficó porcentaje de unión versus cantidad de Ag.

Al trabajar con muestras de mezclas de sueros de nacientes de baja y alta concentración de antígeno carcinoembrionario se reemplazaron los 50 ul de antígeno por 50 ul de suero sin diluir, y no se agregó suero normal de conejo por lo que se debió agregar 250 ul de buffer borato en lugar de 200 ul, para igualar los volúmenes.

Métodos comerciales de radioinmunoensayo.

- Método del Laboratorio Sorin Biomédica (Vercelli, Italia) modificado por este laboratorio: Consiste en hacer diluciones seriadas al medio de una solución madre de 320 nanogramos de CEA por ml de buffer veronal pH 8,2 - 8,6 hasta 5 ng/ml (St 1 a 7).

El esquema de la reacción es el siguiente:

Todos los volúmenes están expresados en ul.

Luego de la última incubación se centrifuga 10 minutos a 1500 - 2000 g a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y se lee la radioactividad de cada precipitado. Se calcula el porcentaje de unión como:

$$\% \text{ de unión} = \frac{\text{cpm en el precipitado}}{\text{cpm totales}} \cdot 100$$

Se grafica concentración de CEA vs % de unión y se calcula con la curva obtenida cual es la concentración de CEA en las muestras desconocidas.

- Método Phadebas CEA Prist de Pharmacia Diagnostics AB (Uppsala, Sweden): Este método utiliza anticuerpos anti CEA acoplados a discos de papel. Se colocan estos discos en tubos de ensayo, se agregan 100 ul de solución standard de CEA (1,0; 3,0; 7,5; 20 y 50 ug/l) y 100 ul de muestra diluída 1:5 a sendos tubos. Se agita a temperatura ambiente 3 horas. Se descarta el líquido de cada tubo y se lava con solución fisiológica. Se añaden 50 ul de anticuerpo anti CEA-¹²⁵I. Se mide la radioactividad de cada tubo (cuentas totales). Se incuba 16 a 20 hs a temperatura ambiente. Se descarta el líquido y se lava tres

veces con solución fisiológica. Se determina la radioactividad de cada tubo (cuentas parciales) y se calcula el porcentaje de unión como:

$$\% \text{ de unión} = \frac{\text{cuentas parciales de cada tubo}}{\text{cuentas totales de cada tubo}} \cdot 100$$

Se grafica el % de unión vs la concentración de CEA y se construye la curva standard. Se lee la concentración de CEA en ug/l para cada muestra.

ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos de la reacción de radioinmunoensayo fueron tratados estadísticamente mediante un análisis de varianza de tres factores mixto con una observación por casilla, por lo que no se pudo estudiar la interacción de los tres juntos. Los factores considerados fueron: animal, sangría y grado de purificación del antígeno carcinoembrionario (extracto perclórico, fracción de electroenfoque y antígeno puro). Se compararon también los distintos niveles en el factor grado de purificación mediante intervalos de Bonferroni (60). Todos los resultados fueron analizados con $p < 0,05$.

RESULTADOS.

EXTRACCION DE GLICOPROTEINAS.

Colon normal:

Se procesaron 9 muestras que luego se separaron en 2 mezclas obteniéndose un rendimiento promedio de glicoproteínas de 0,095% (Cuadro 4).

Muestra	Masa muestra	Masa extracto perclórico.	% Rendimiento	Rendimiento promedio.
CN	71,0 g	123 mg	0,081	0,095 \pm 0,020
CA	80,0 g			
MR	5,0 g	85,4 mg	0,110	
EF	8,8 g			
WP	8,7 g			
VA	5,6 g			
MS	5,4 g			
EL	16,9 g			
RJ	18,3 g			
PO	8,7 g			

Cuadro 4: Extracción de glicoproteínas de colon normal.

Colon tumoral:

Se procesaron 32 muestras que se agruparon en 9 mezclas, obteniéndose un rendimiento promedio de glicoproteínas de 0,098% con una amplitud de 0,068 a 0,133% (Cuadro 5).

Muestra	Masa muestra (gramos)	Masa extracto perclórico (mg)	% Rendimiento	Rendimiento promedio
VA	18,0	281,572	0,133	0,098 \pm 0,019
SR	8,0			
WM	32,0			
MC	26,1			
MG	24,2			
FG	25,8			
GB	77,0			
NG	35,4	352,306	0,068	
GL	23,2			
TR	18,7			
CO	35,8			
CM	50,2			
TV	51,2			
BR	48,3			
DA	37,8			
GM	85,0			
TA	130,0			

Muestra	Masa muestra (gramos)	Masa extracto perclórico (mg)	% Rendimiento	Rendimiento promedio
SC	18,3	45,640	0,108	
FC	23,8			
CC	119,0	108,400	0,091	
SS	40,0	100,000	0,116	
JT	46,0			
TM	25,0	50,600	0,103	
BF	24,0			
MN	80,0	65,000	0,081	
MN1	112,8	112,850	0,100	
CT	6,6	28,600	0,084	
AM	8,4			
EA	5,8			
AG	6,9			
DT	3,2			
CJ	2,8			

Cuadro 5: Extracción de glicoproteínas de colon tumoral.

ELECTROENFOQUE EN GRADIENTE DE SACAROSA.

Colon normal.

Se realizaron dos corridas de electroenfoque en gradiente de sacarosa del extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal en el rango de pH 2,5 - 6,5, cuyos perfiles de pH y densidad óptica a 280 nm figuran en los Gráficos 1A y 1B; se detectaron dos picos de densidad óptica, a pH 4,6-4,7 y pH 5,5, y se mezclaron las fracciones correspondientes a pH 4,4 - 4,8. En el Cuadro 6 se detallan las cantidades de glicoproteínas sembrada y recuperada, y el rendimiento obtenido.

Masa de extracto perclórico de glicoproteínas sembrada.	Masa de fracción pH 4,4 - 4,8	% Rendimiento
26,80 mg	7,20 mg	13,89
25,00 mg		

Cuadro 6: Electroenfoque de glicoproteínas de colon normal.

Colon tumoral.

Se realizaron 20 corridas de electroenfoque en gradiente de sacarosa del extracto perclórico de glicoproteínas

GRAFICOS 1A Y 1B.

Perfiles de pH y densidad óptica a 280 nm de corridas de electroenfoque en gradiente de sacarosa de extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal, en el rango de pH 2,5 - 6,5. Se recogieron fracciones de 4 ml. Cantidades sembradas: Gráfico 1A: 26,80 mg.

Gráfico 1B: 25,00 mg.

----- pH.

_____ Densidad óptica a 280 nm.

●---●---● Concentración de antígeno carcinoembrionario en ng/ml.

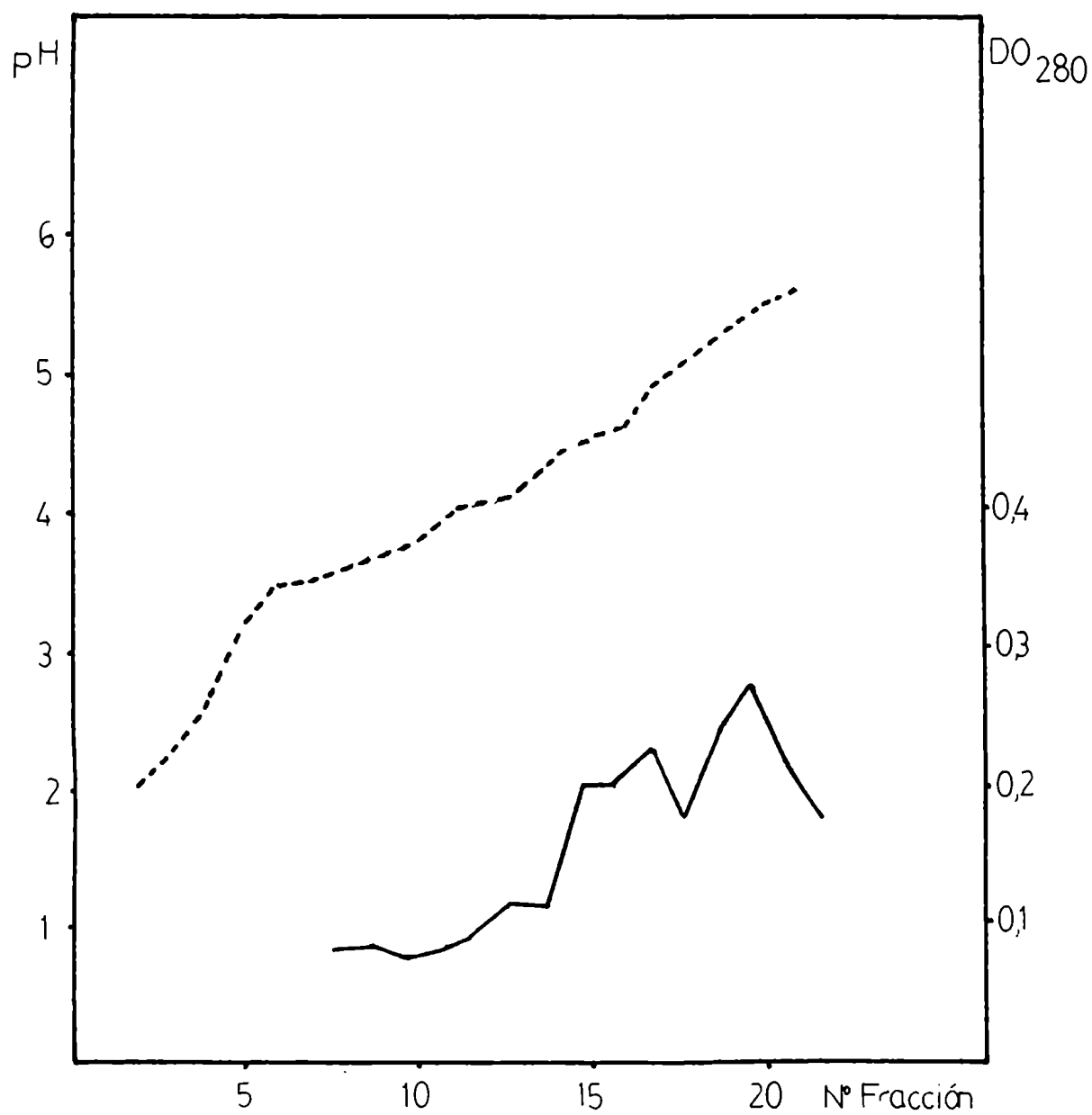


Gráfico 1A

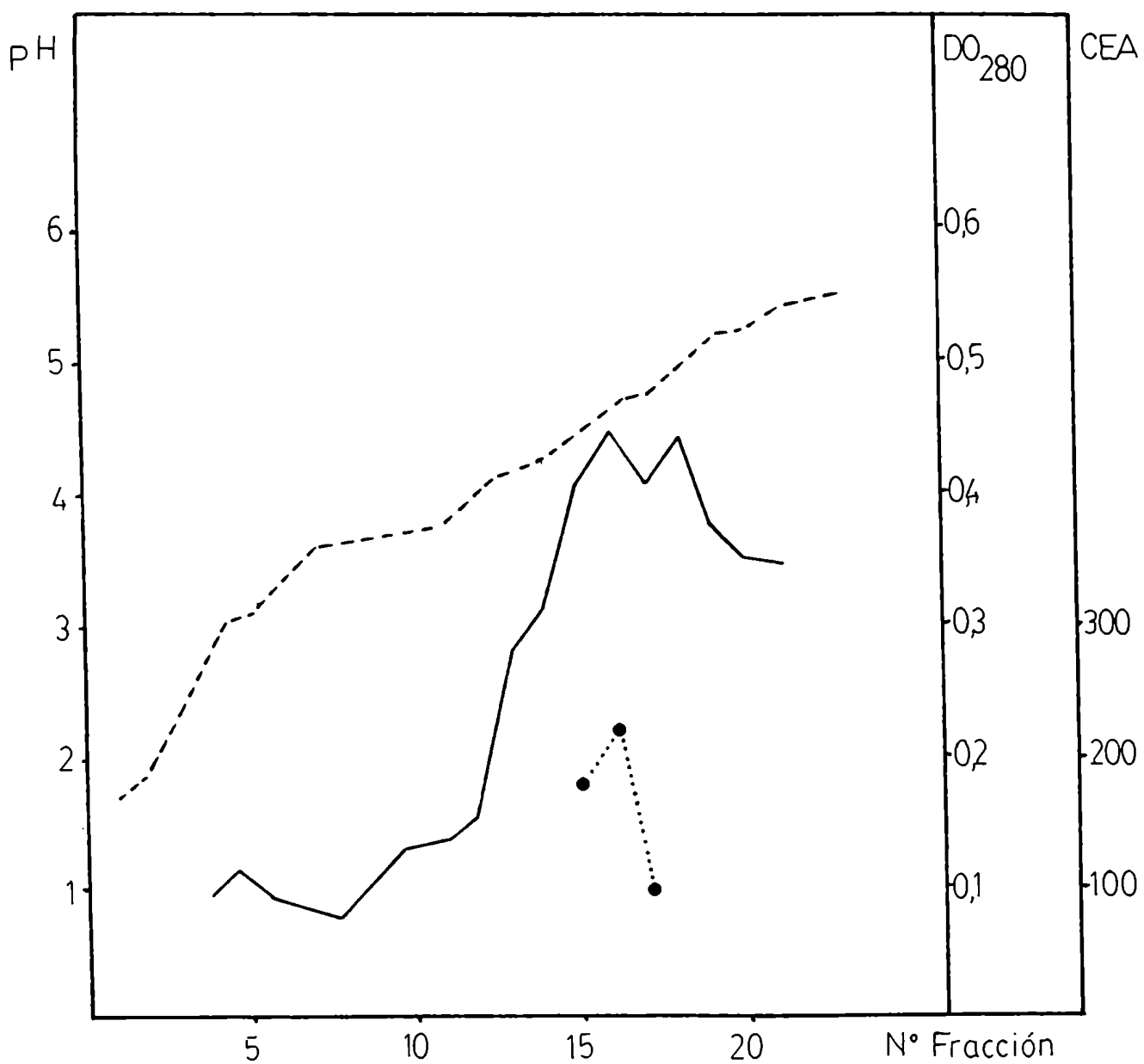


Gráfico 1B

de colon tumoral en el rango de pH 2,5 - 6,5. En los gráficos 2A a 2T figuran los perfiles de pH y densidad óptica a 280 nm, en los que se puede ver que existe heterogeneidad de carga en todas las muestras detectándose los principales picos de proteínas en los rangos de pH 3,80 a 4,20, 4,30 a 4,50, 4,60 a 4,95 y 5,00 a 5,40. Se hicieron mezclas de las fracciones correspondientes a esos rangos.

La fracción de pH 4,60 - 4,95 contiene el antígeno carcinoembrionario como se comprobó efectuando reacción de radioinmunoensayo con productos comerciales (Gráficos 2A y 2C). Se realizó también dicha reacción con la misma fracción correspondiente a glicoproteínas de colon normal siendo muy bajos los valores de concentración de antígeno carcinoembrionario obtenidos (Gráfico 1B). En el Cuadro 7 se detallan las cantidades de glicoproteínas sembrada y de antígeno carcinoembrionario recuperado, así como el rendimiento, que es inferior al obtenido con colon normal.

GRAFICOS 2A A 2T.

Perfiles de pH y densidad óptica a 280 nm de corridas de electroenfoque en gradiente de sacarosa de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral en el rango de pH 2,5 - 6,5.

Se recogieron fracciones de 4 ml. Cantidades sembradas:

Gráfico 2A	50,0 mg.
Gráfico 2B	25,0 mg.
Gráfico 2C	25,0 mg.
Gráfico 2D	50,0 mg.
Gráfico 2E	50,0 mg.
Gráfico 2F	50,0 mg.
Gráfico 2G	50,0 mg.
Gráfico 2H	50,0 mg.
Gráfico 2I	15,0 mg.
Gráfico 2J	50,0 mg.
Gráfico 2K	50,0 mg.
Gráfico 2L	50,0 mg.
Gráfico 2M	46,5 mg.
Gráfico 2N	45,6 mg.
Gráfico 2Ñ	50,0 mg.
Gráfico 2P	50,0 mg.
Gráfico 2Q	42,2 mg.
Gráfico 2R	50,0 mg.
Gráfico 2S	50,0 mg.
Gráfico 2T	30,8 mg.

----- pH.

_____ Densidad óptica a 280 nm.

•-•-•-•- Concentración de antígeno carcinoembriónico en ng/ml.

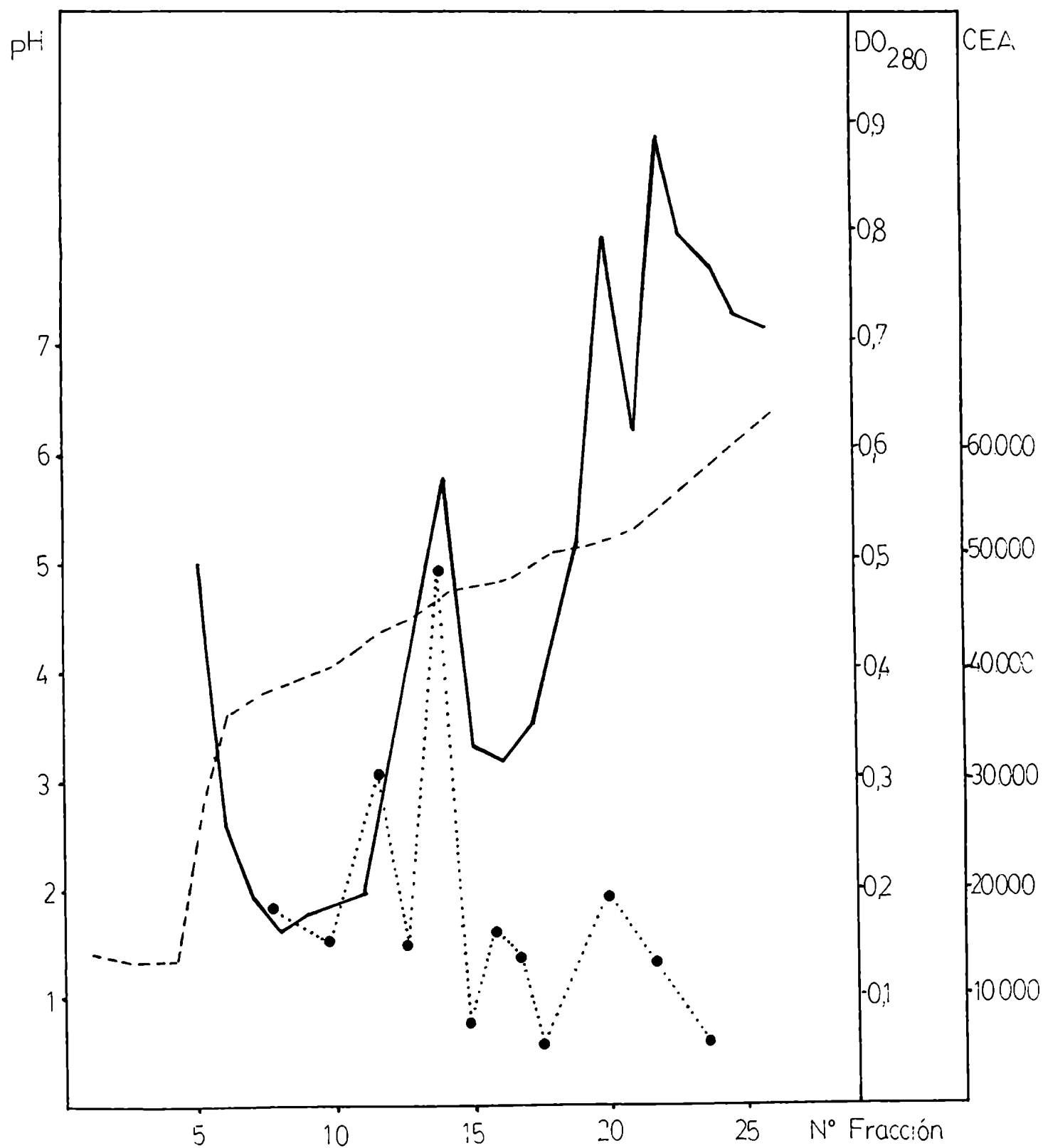


Gráfico 2A

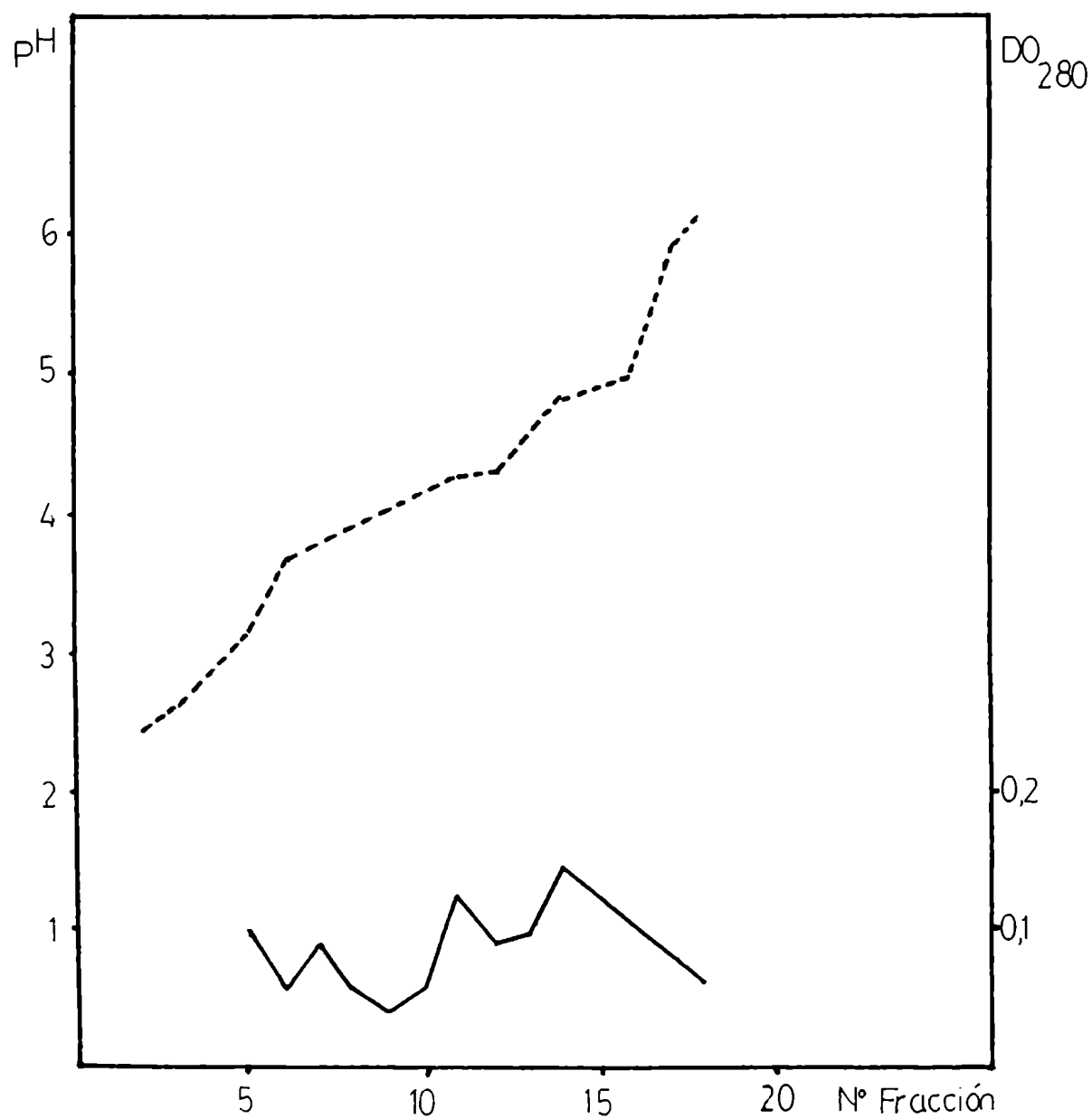


Gráfico 2B

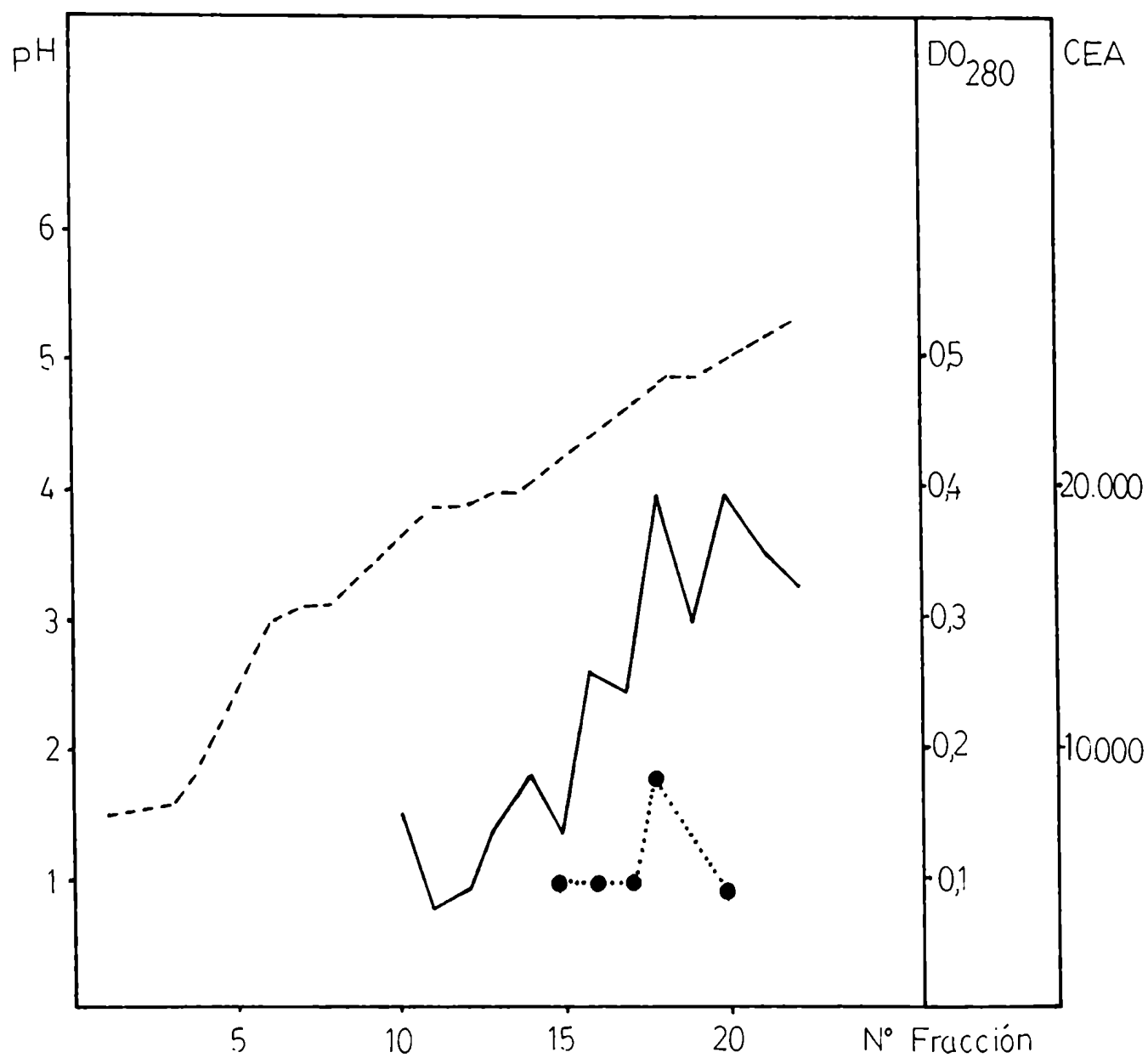


Gráfico 2C

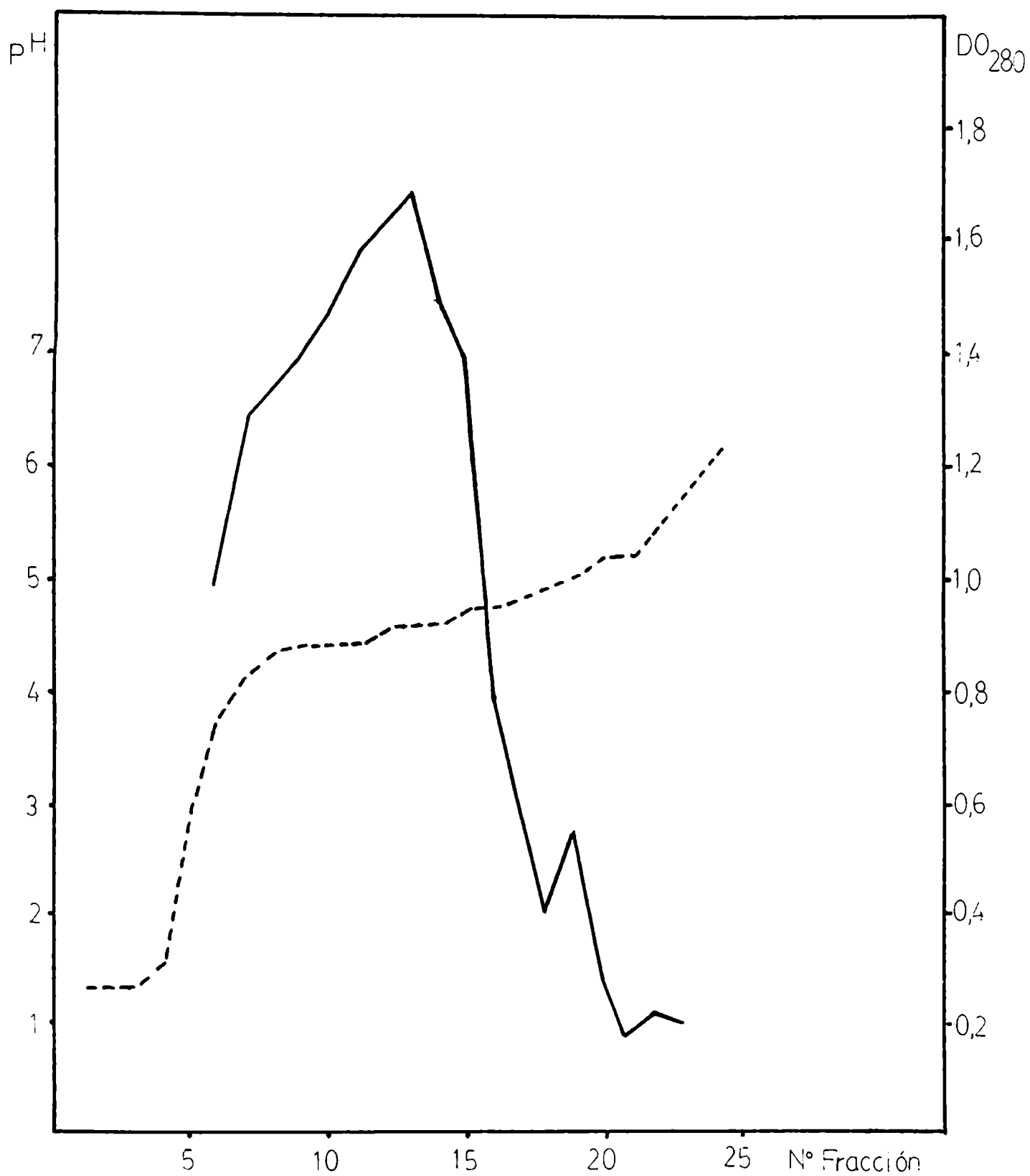


Gráfico 2D

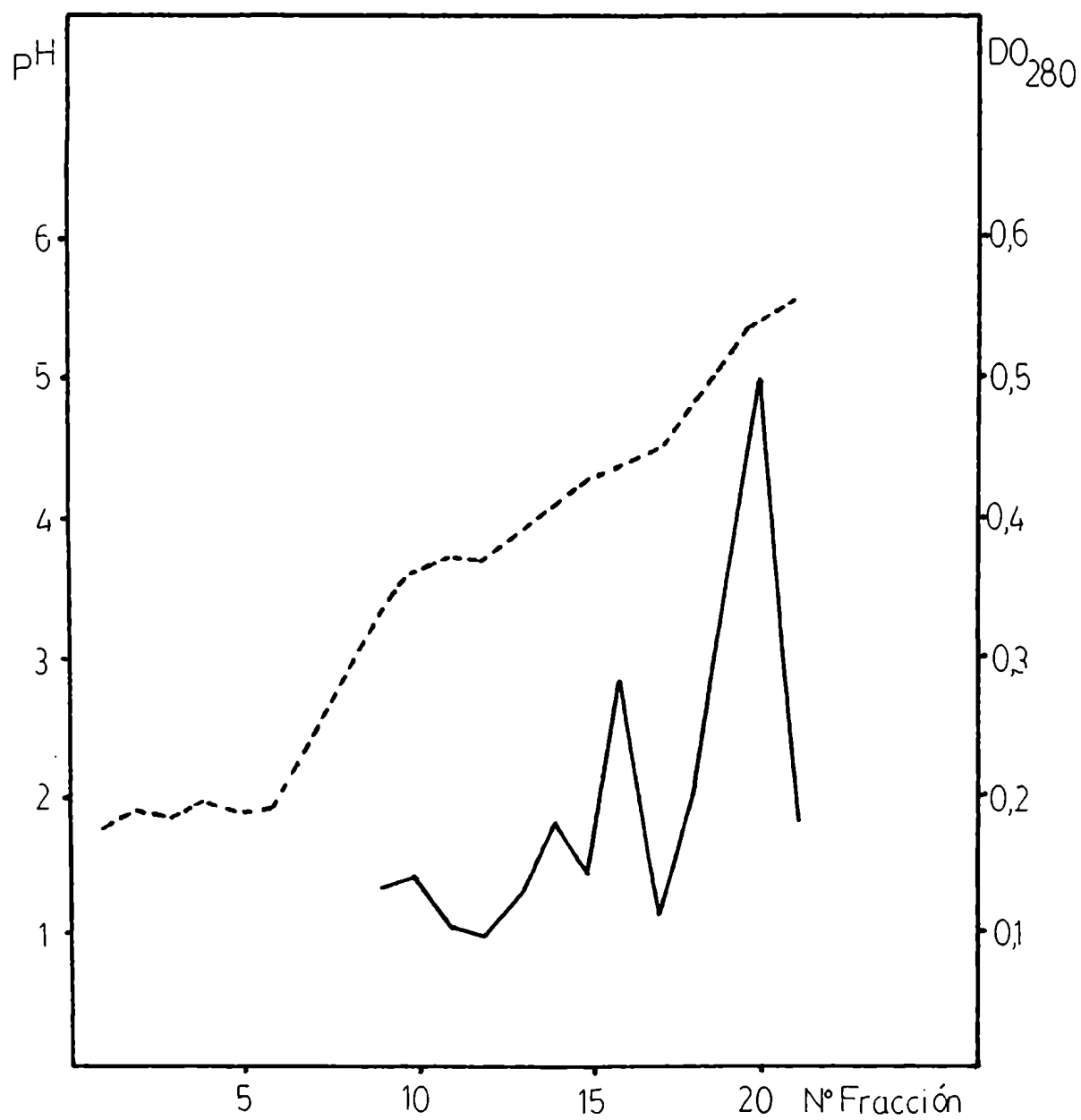


Gráfico 2E

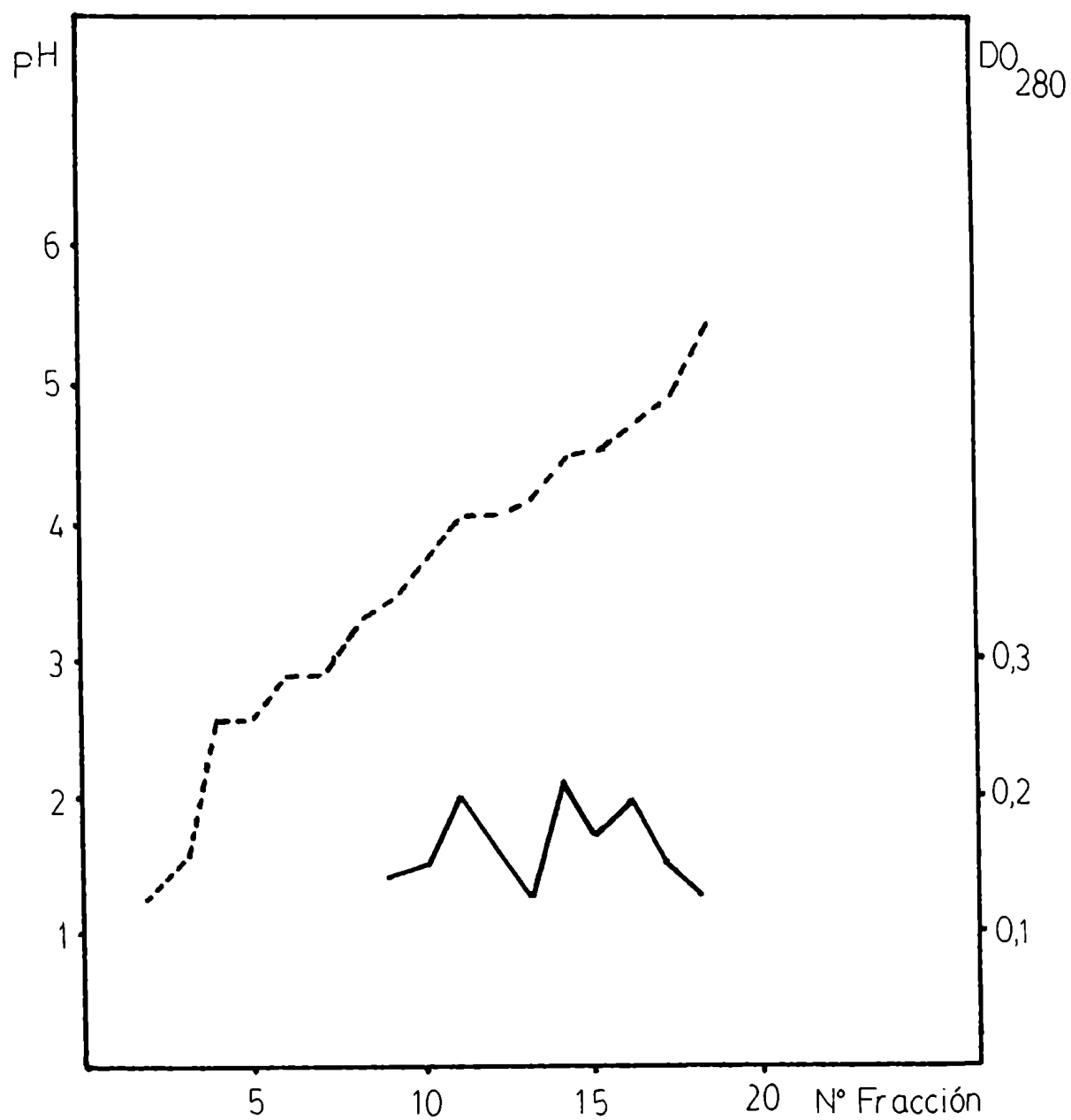


Gráfico 2F

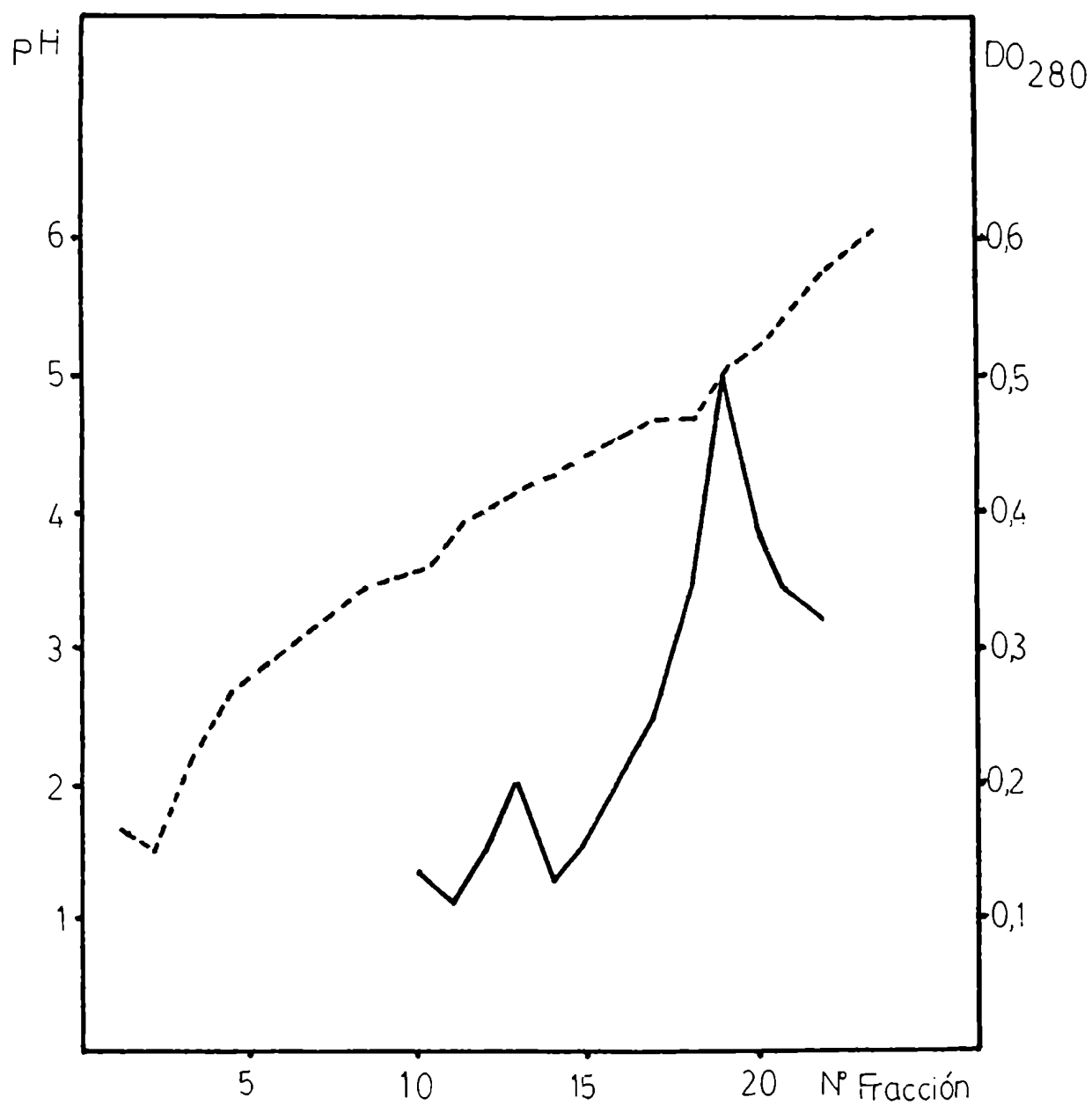


Gráfico 2 G

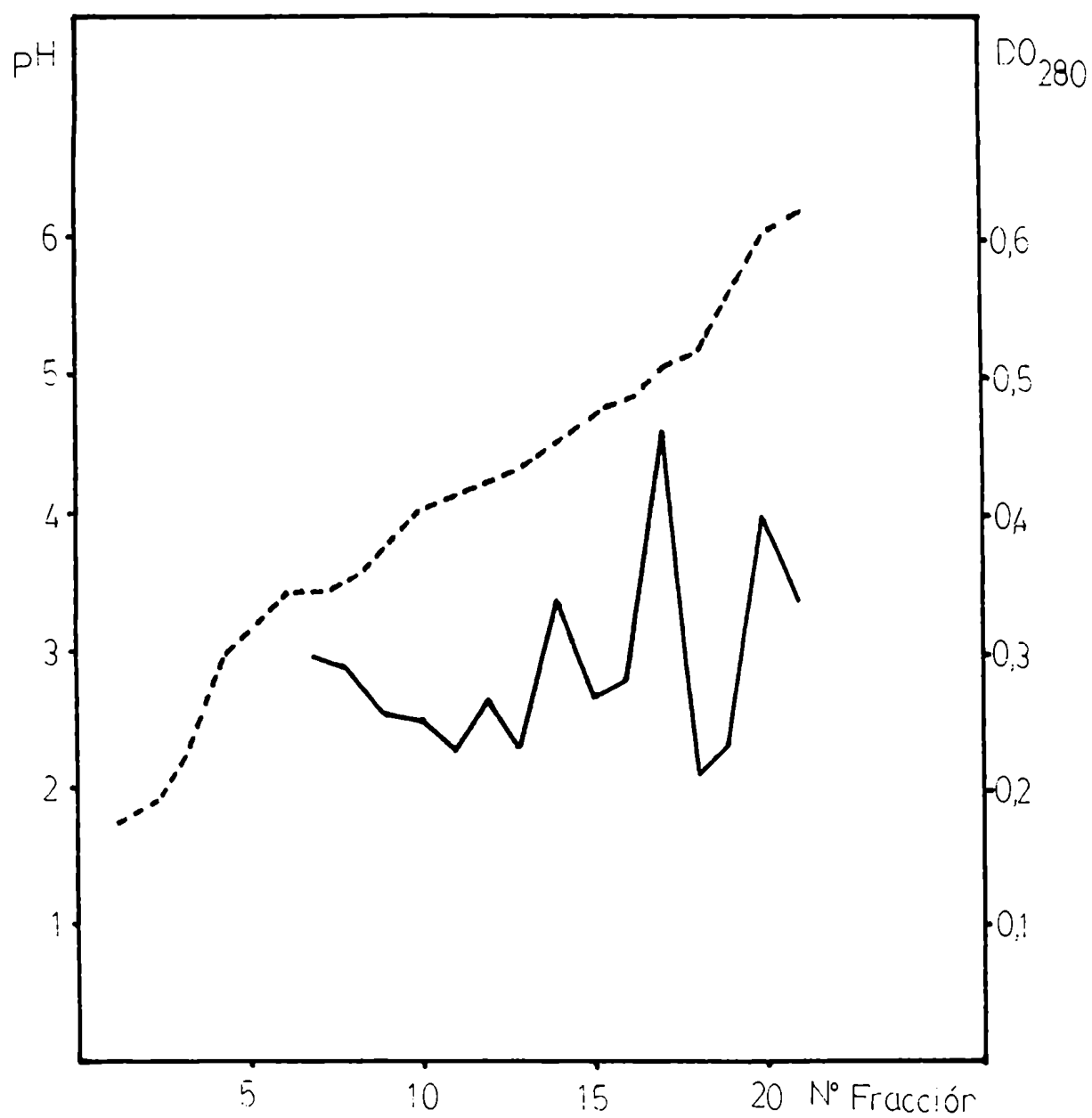


Gráfico 2H

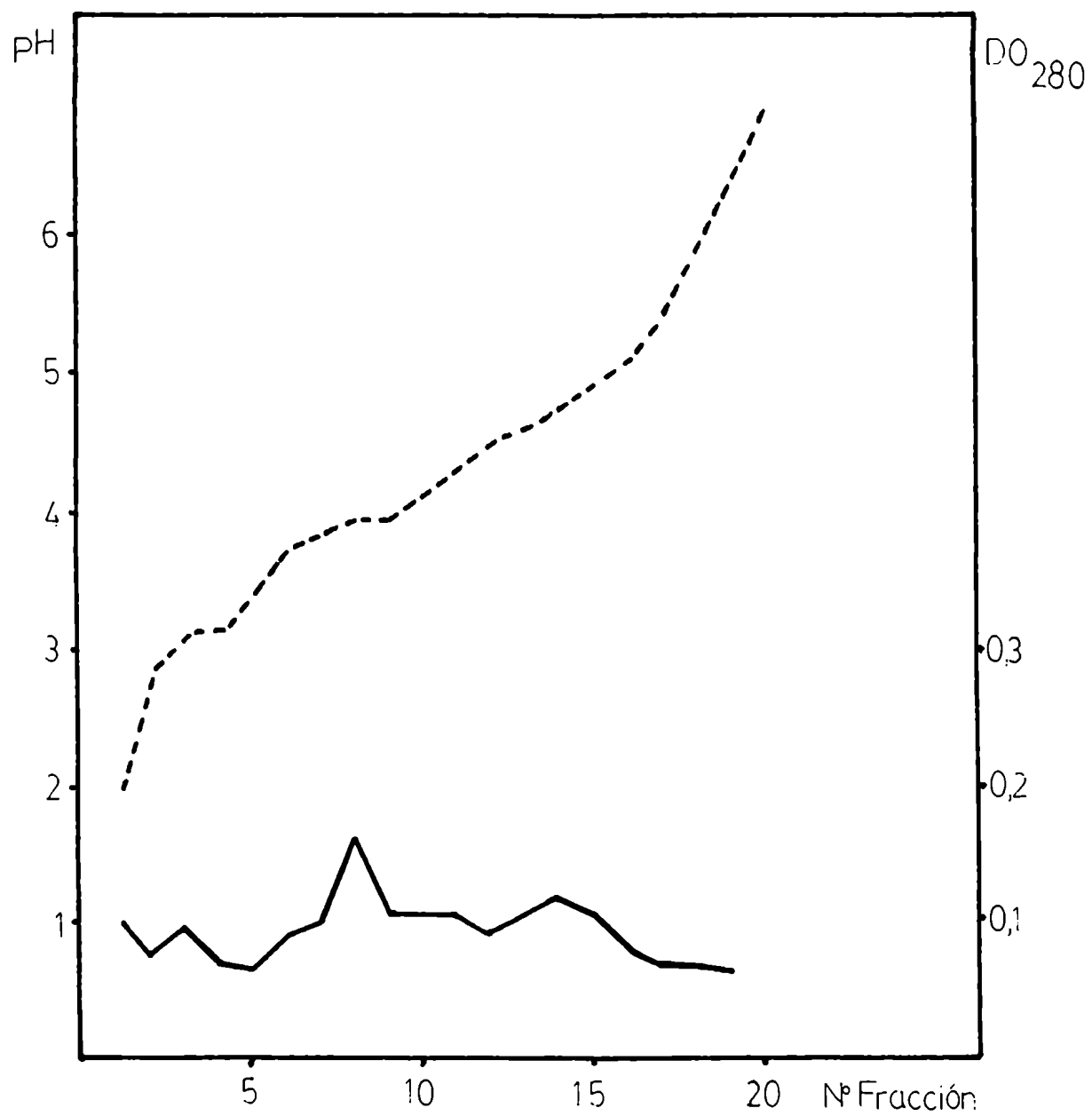


Gráfico 2I

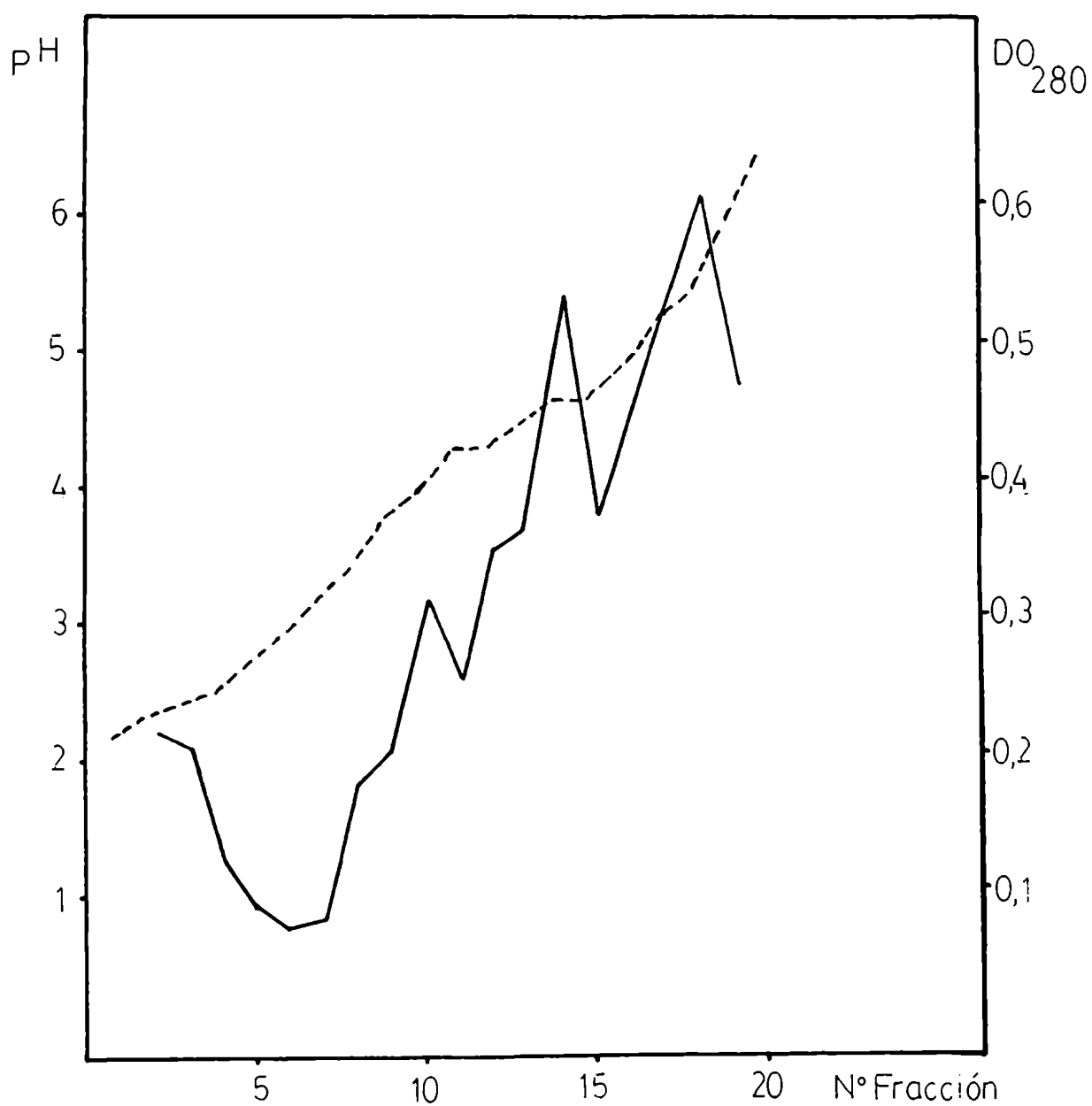


Gráfico 2J

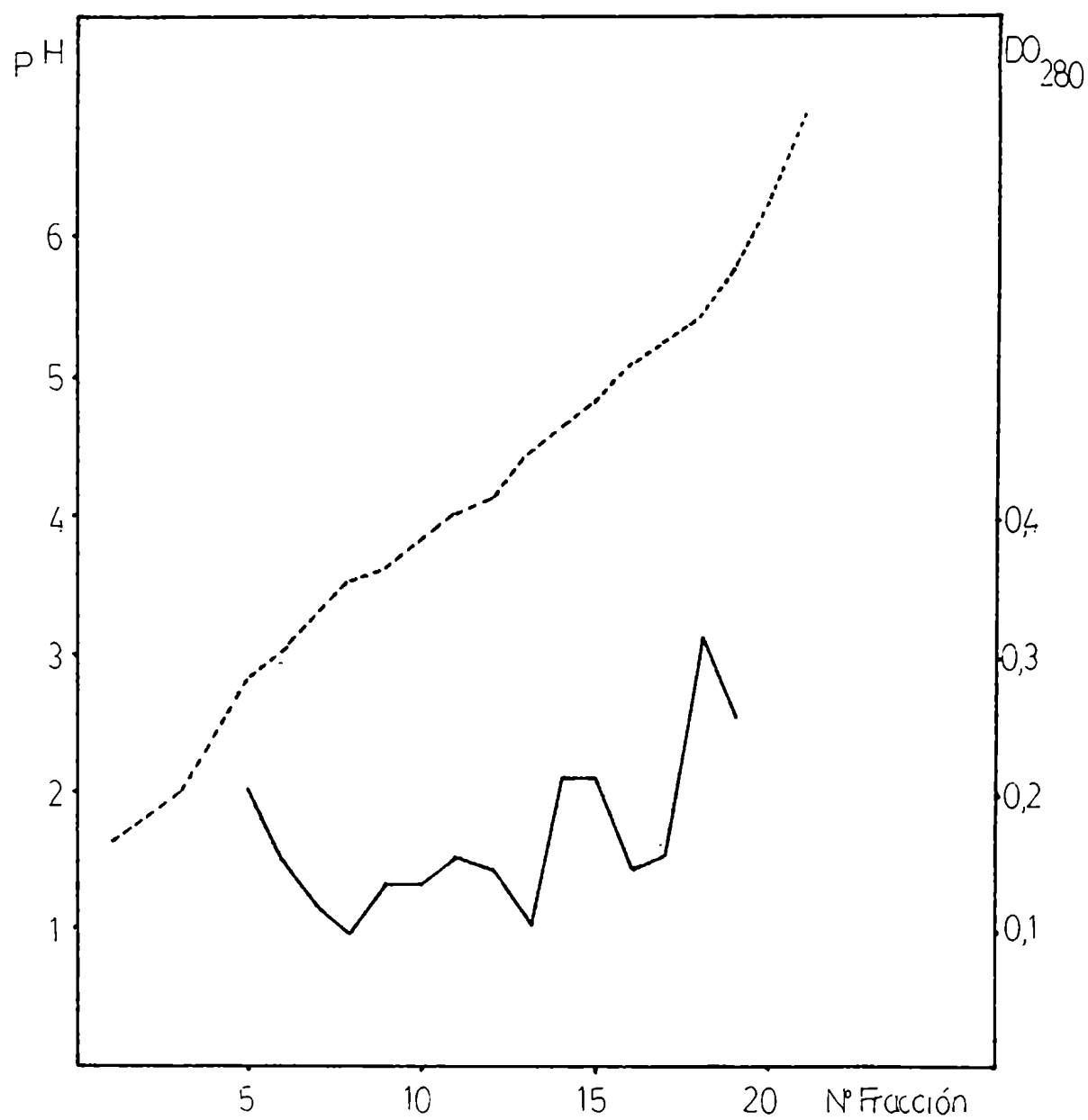


Gráfico 2K

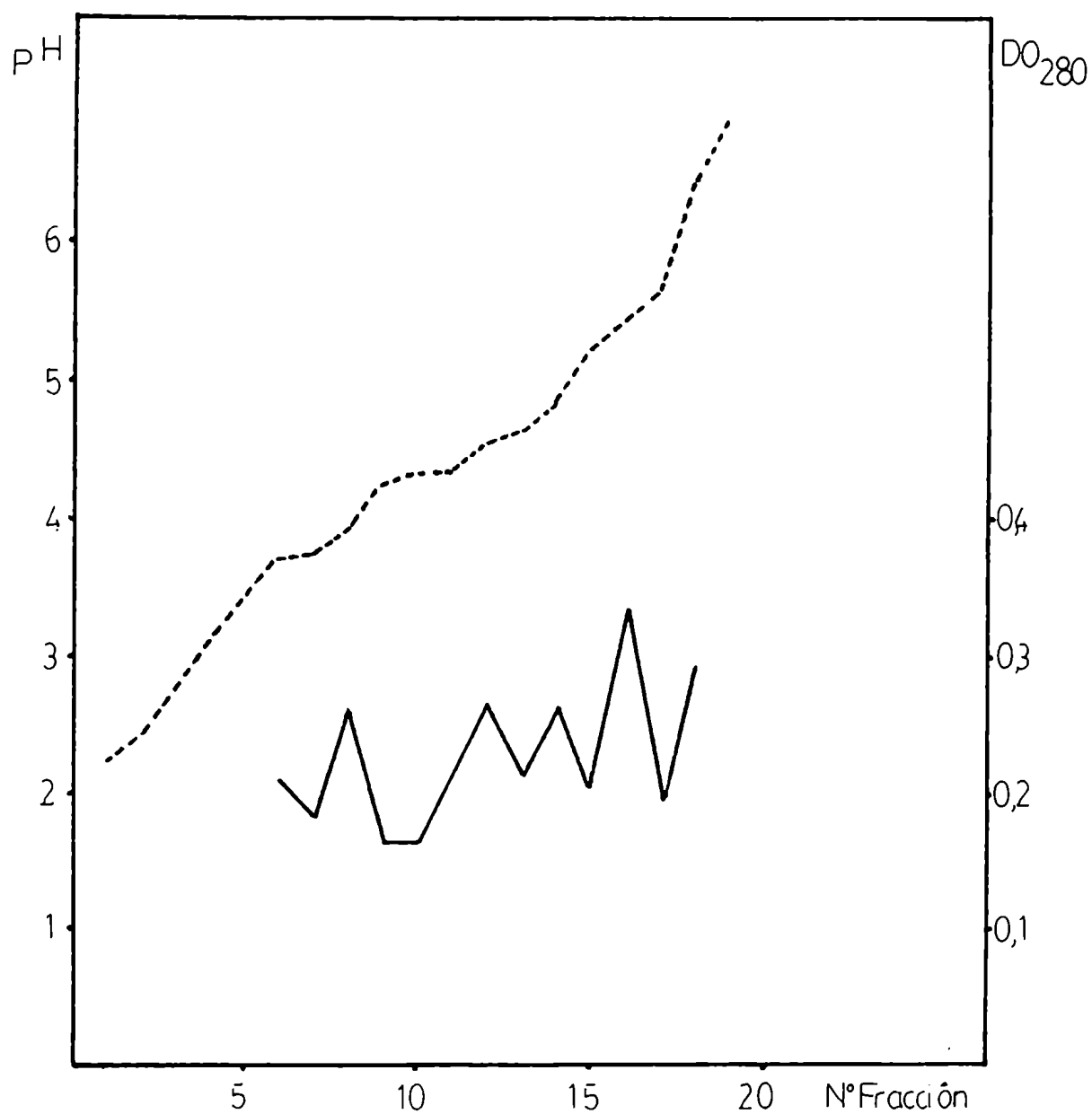


Gráfico 2L

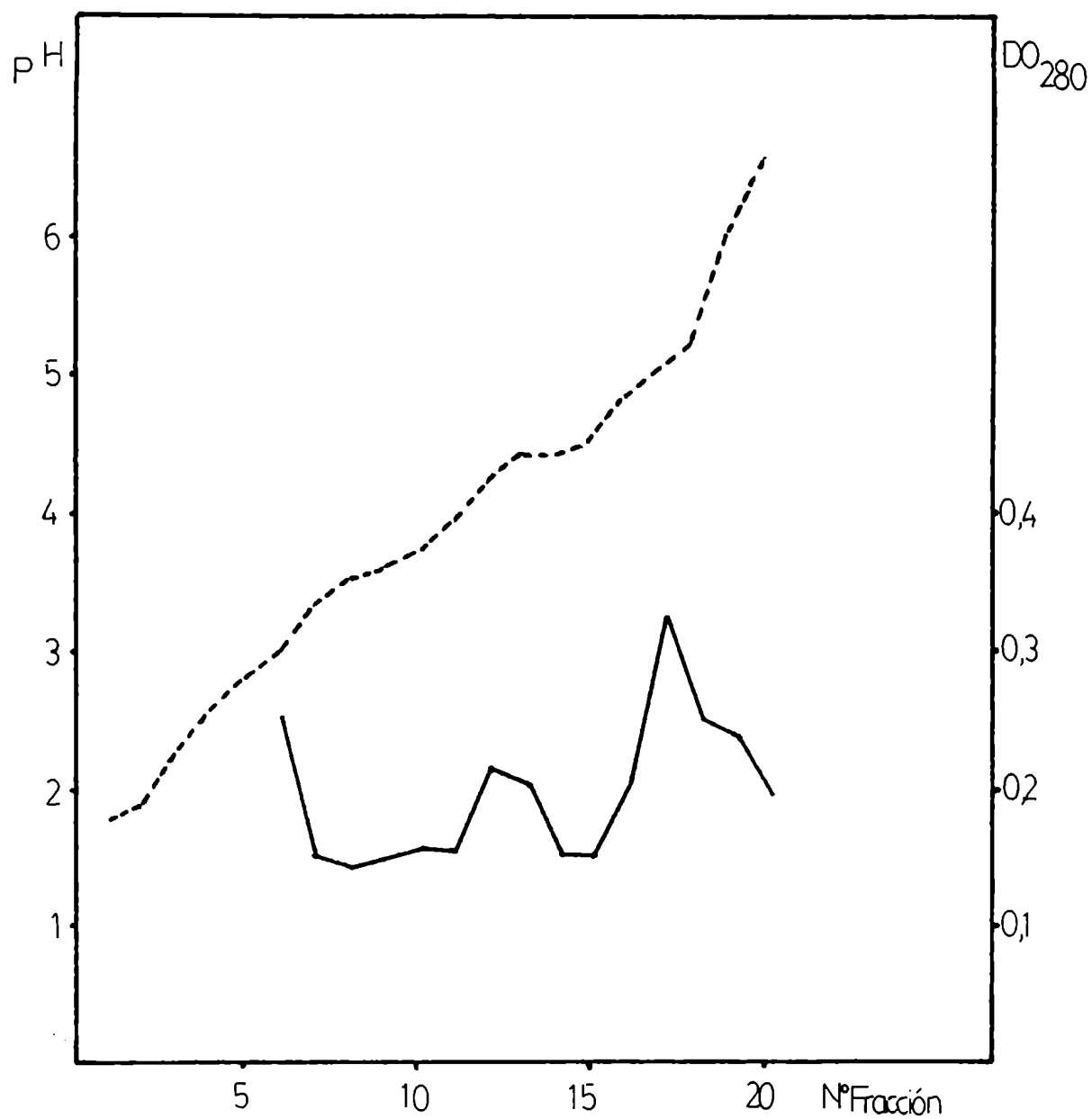


Gráfico 2M

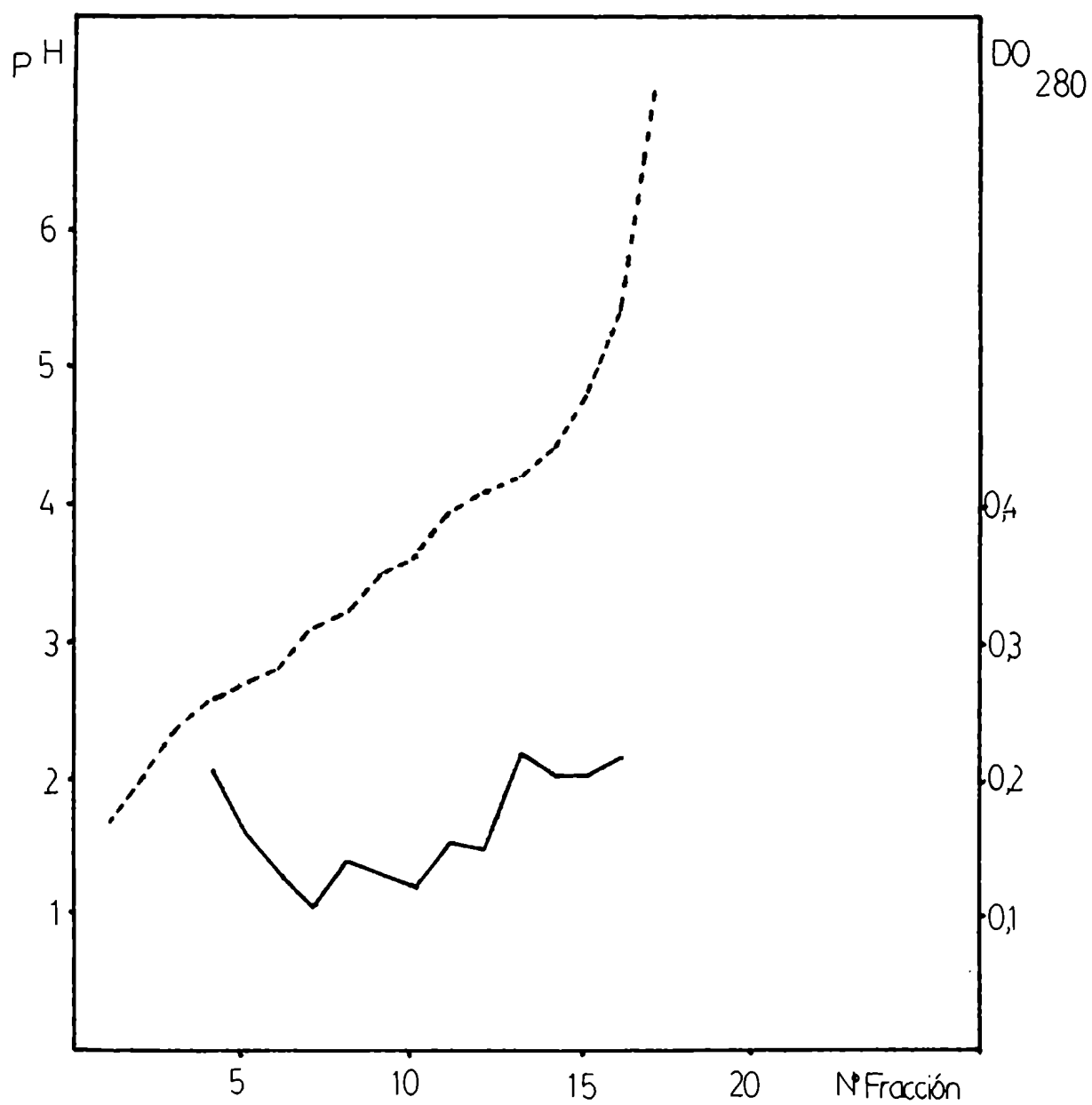


Gráfico 2N

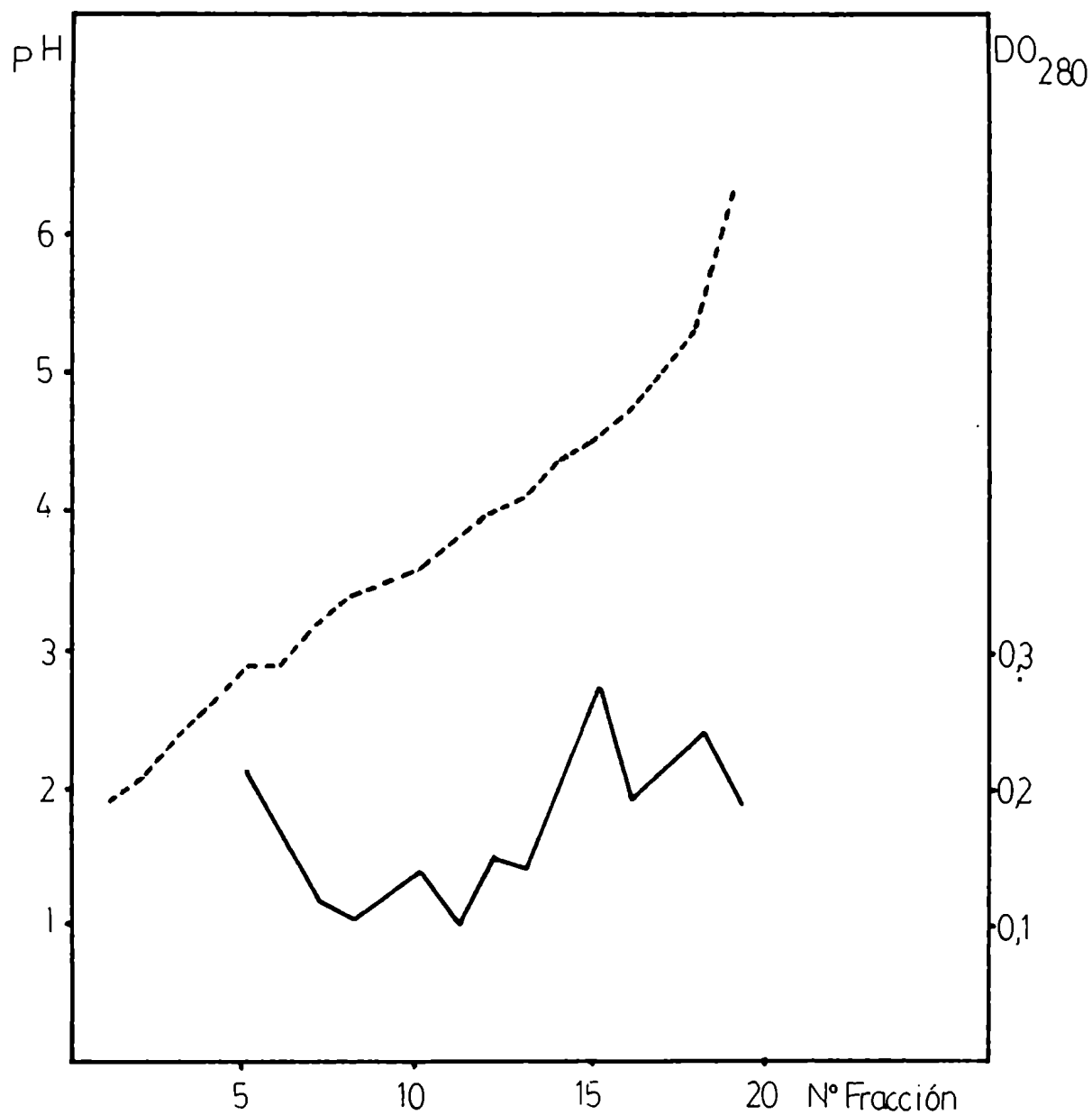


Gráfico 2Ñ

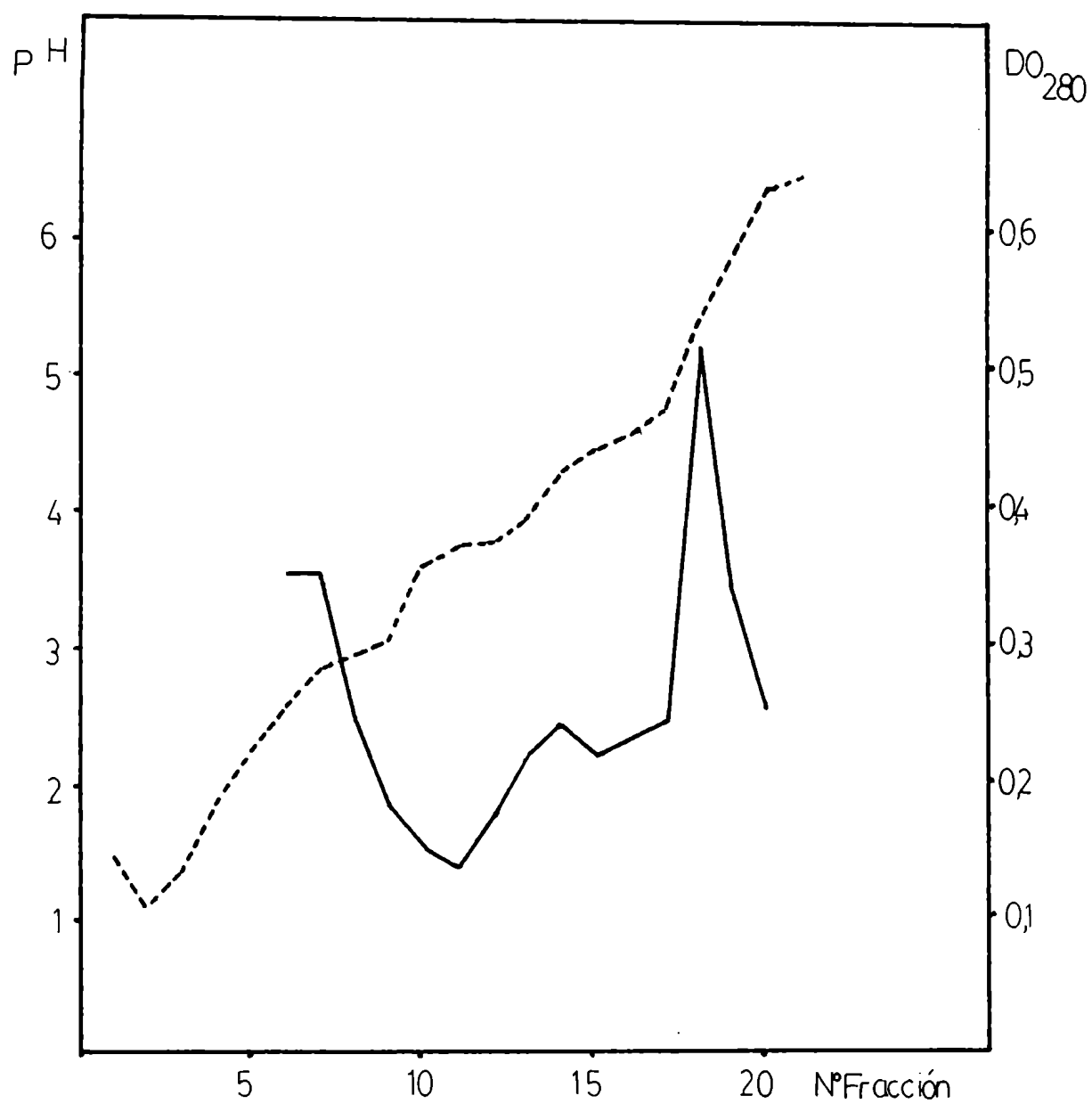


Gráfico 2P

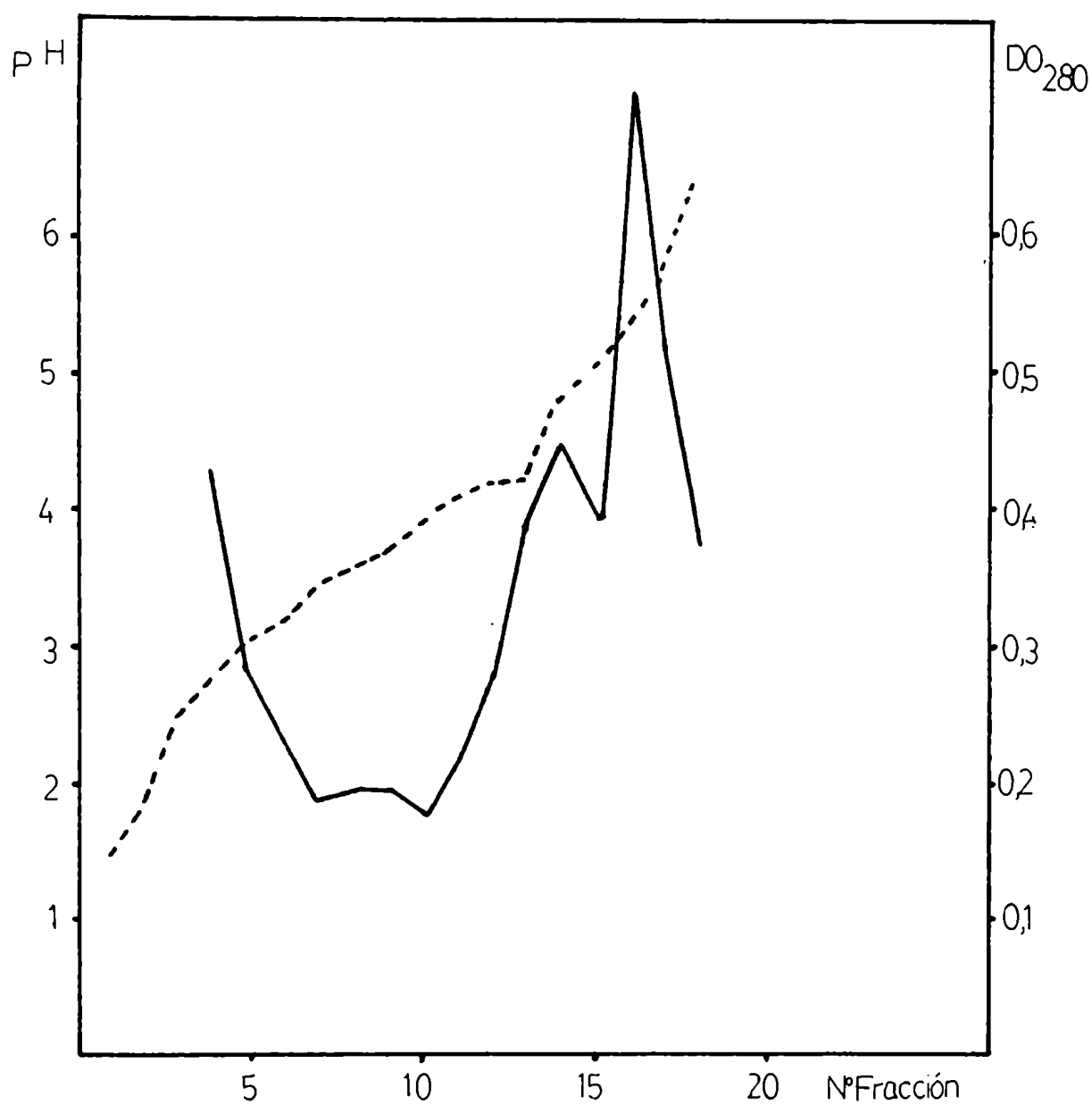


Gráfico 2Q

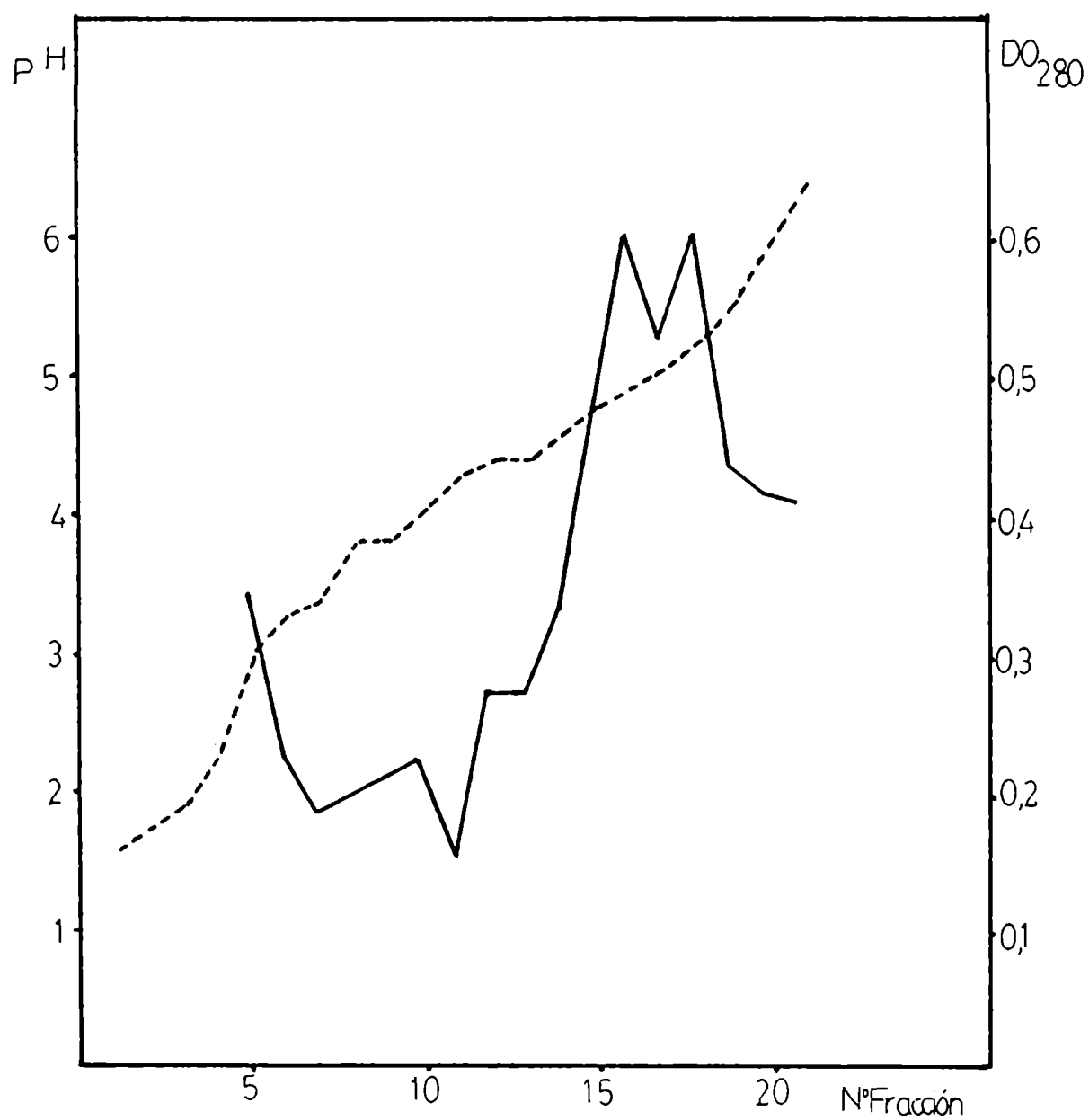


Gráfico 2R

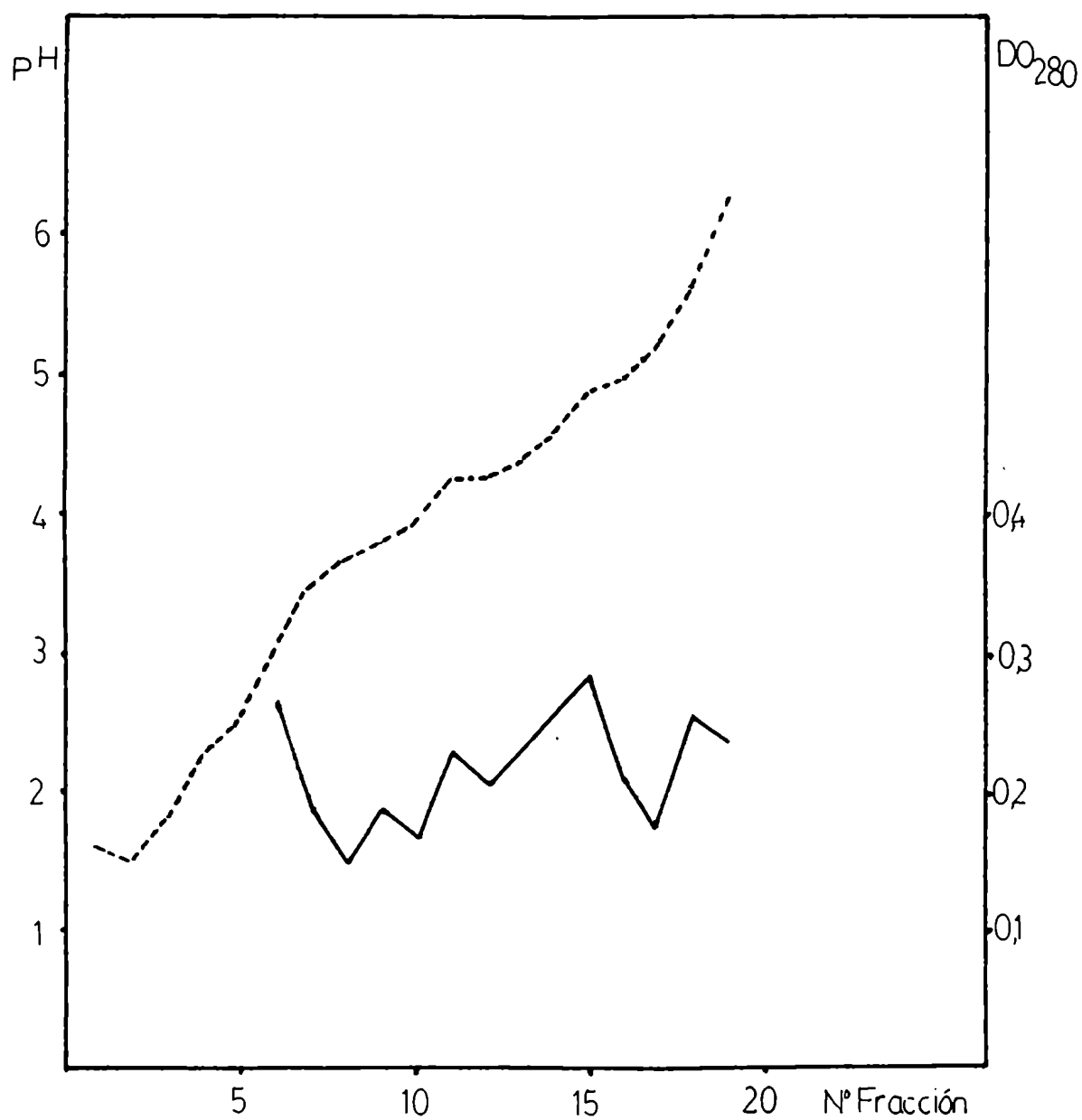


Gráfico 2S

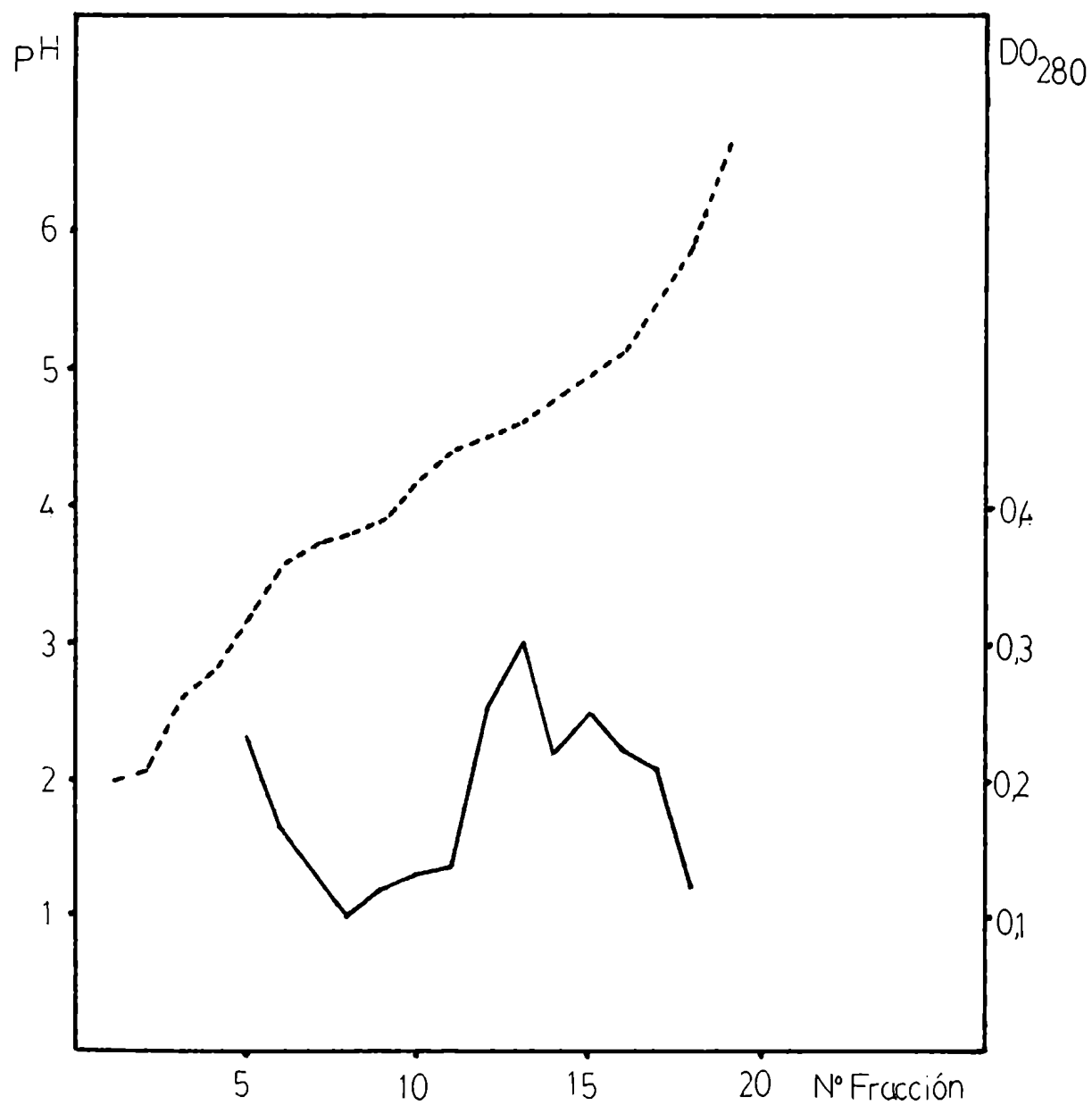


Gráfico 2T

Masa extracto perclórico de glicoproteí- nas.	Masa CEA (fracción pH 4,60 - 4,95	% Rendimiento	Rendimiento promedio.
50,0 mg 25,0 mg 25,0 mg 50,0 mg 50,0 mg 50,0 mg 50,0 mg 50,0 mg	22,80 mg	6,51	8,47 \pm 6,40
15,0 mg 50,0 mg 50,0 mg 50,0 mg 46,5 mg 45,6 mg 50,0 mg	47,00 mg	15,63	
50,0 mg 42,2 mg 50,0 mg 50,0 mg 30,8 mg	7,28 mg	3,27	

Cuadro 7: Electroenfoque de glicoproteínas
de colon tumoral.

Las propiedades electroforéticas de las glicoproteínas tumorales parecen ser estables durante el almacenamiento, ya que algunas de las muestras fueron sometidas a electroenfoque luego de haber sido mantenidas en forma liofilizada a 4°C durante varios meses, y el perfil de pH y densidad óptica a 280 nm que presentaron fue similar al de las muestras recién procesadas.

FILTRACION MOLECULAR.

En el Gráfico 3 se muestra el perfil de densidad óptica a 280 nm de la cromatografía en Sephadex G-200 de catalasa de hígado bovino y tripsina pancreática. Aparecen dos picos; el primero de ellos corresponde a la catalasa y el segundo a la tripsina de menor peso molecular.

Se hicieron seis corridas cromatográficas en Sephadex G-200 de la fracción de pH 4,60 - 4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral obteniéndose en todos los casos dos picos de densidad óptica a 280 nm (Gráficos 4A-F) correspondiendo, de acuerdo a la calibración efectuada, el segundo al antígeno carcinoembriónico de peso molecular alrededor de 200.000, similar al de la ca-

GRAFICO 3.

Cromatografía de catalasa de hígado bovino y tripsina pancreática en una columna de Sephadex G200 (20 x 1,8 cms.) equilibrado con PBS. Cantidades sembradas 2 mg de cada proteína disueltas en 2 ml de PBS. Buffer de elución: PBS. Volumen de fracciones recogidas: 4 ml.

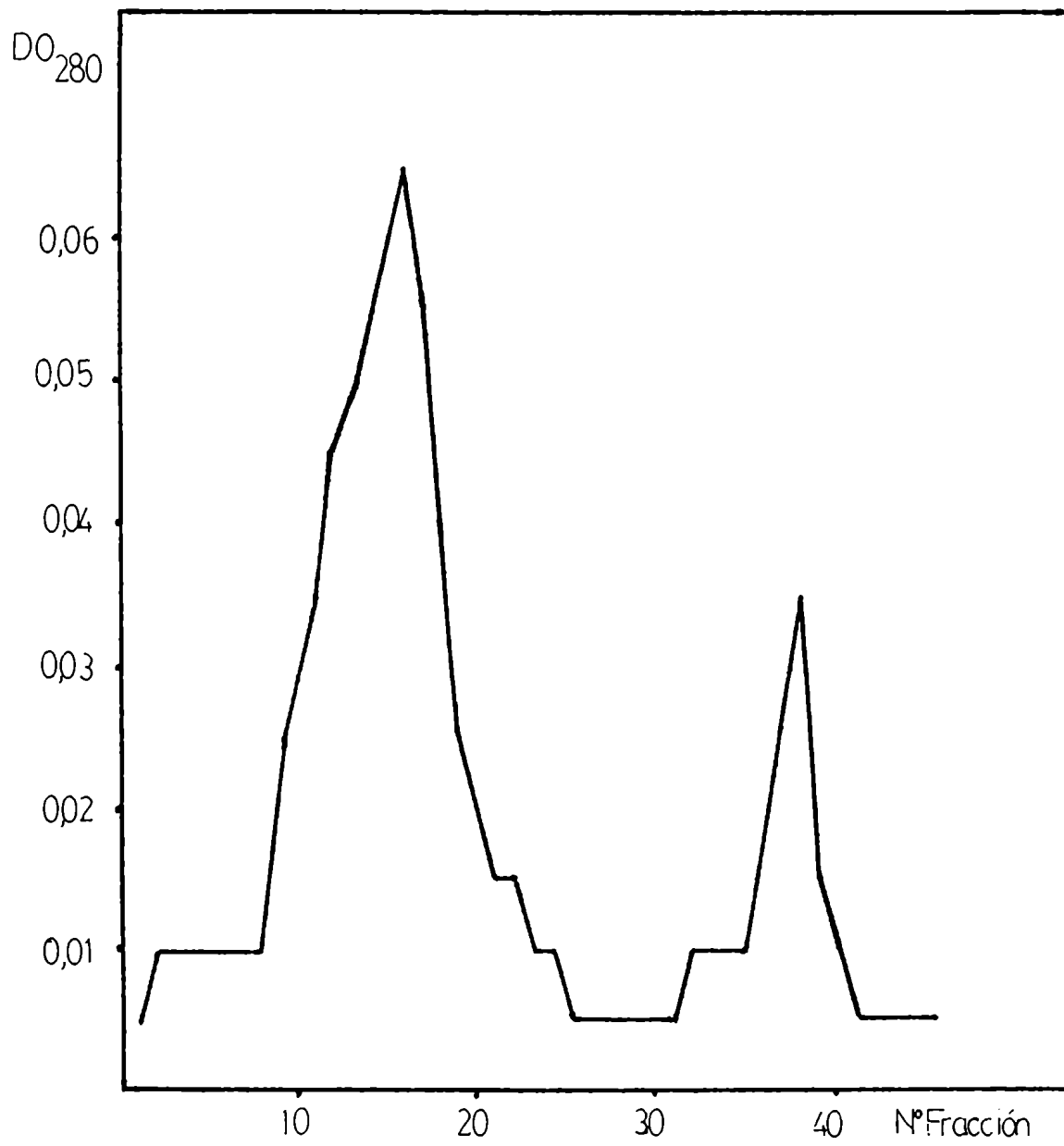


Gráfico 3

GRAFICOS 4A A 4F.

Cromatografía de antígeno carcinoembriónico en una columna de Sephadex G200 (20 x 1,8 cms) equilibrado con PBS. Buffer de elución PBS. Volumen de fracciones recogidas: 4 ml.

Cantidades sembradas (disueltas en 2 ml de PBS):

Gráfico 4A 3,740 mg.

Gráfico 4B 2,882 mg.

Gráfico 4C 3,117 mg.

Gráfico 4D 6,710 mg.

Gráfico 4E 5,264 mg.

Gráfico 4F 3,100 mg.

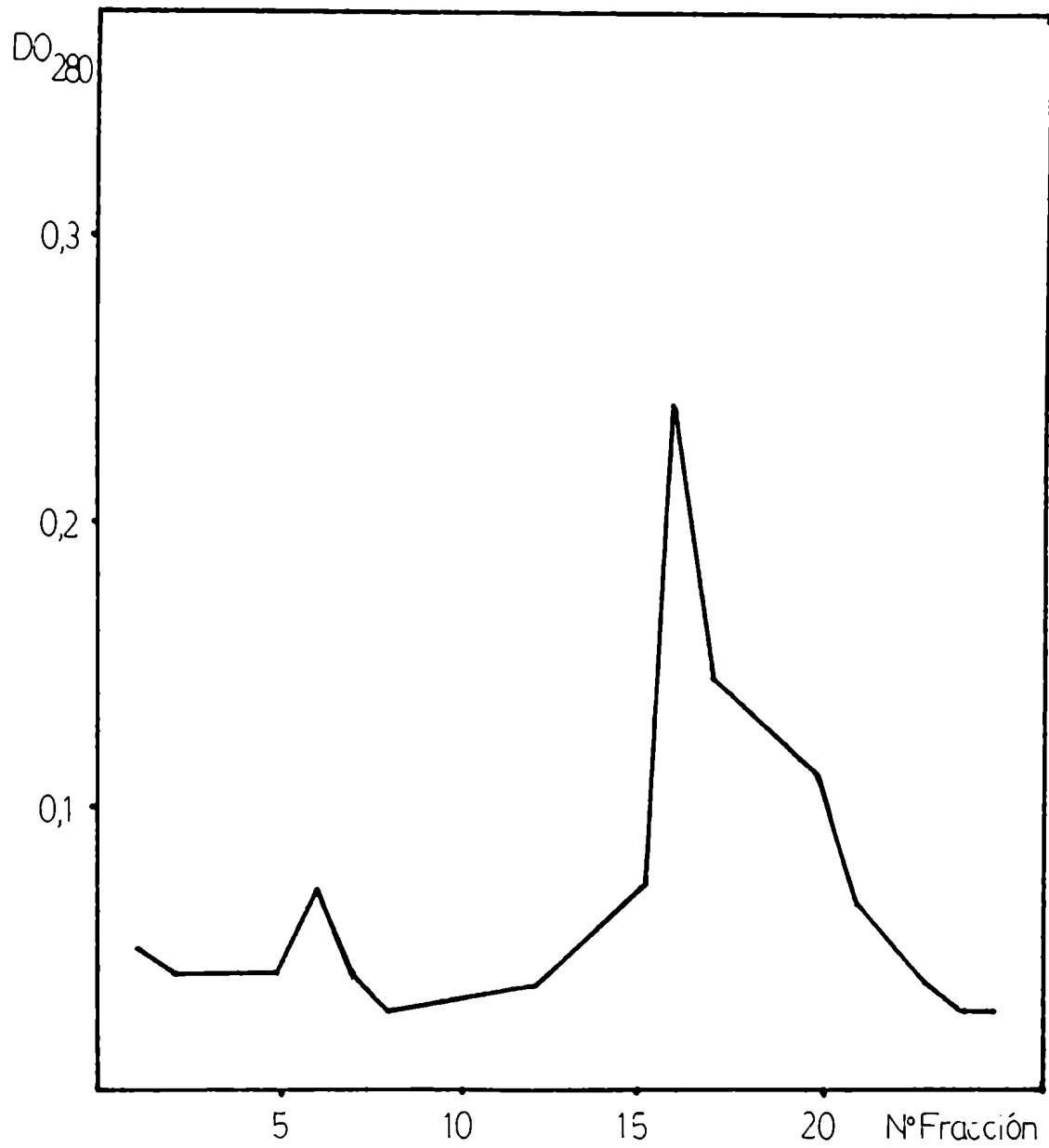


Gráfico 4A

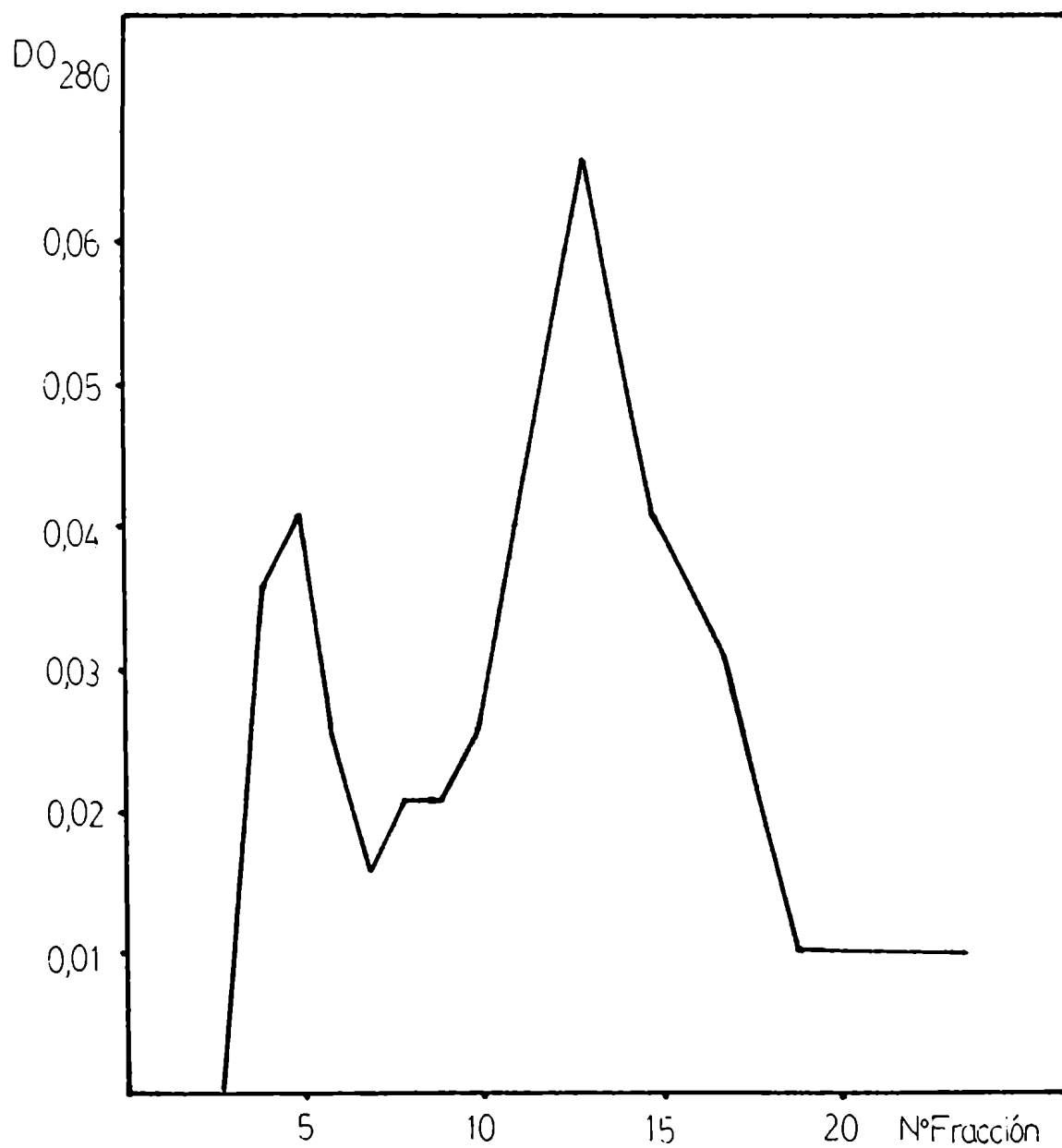


Gráfico 4 B

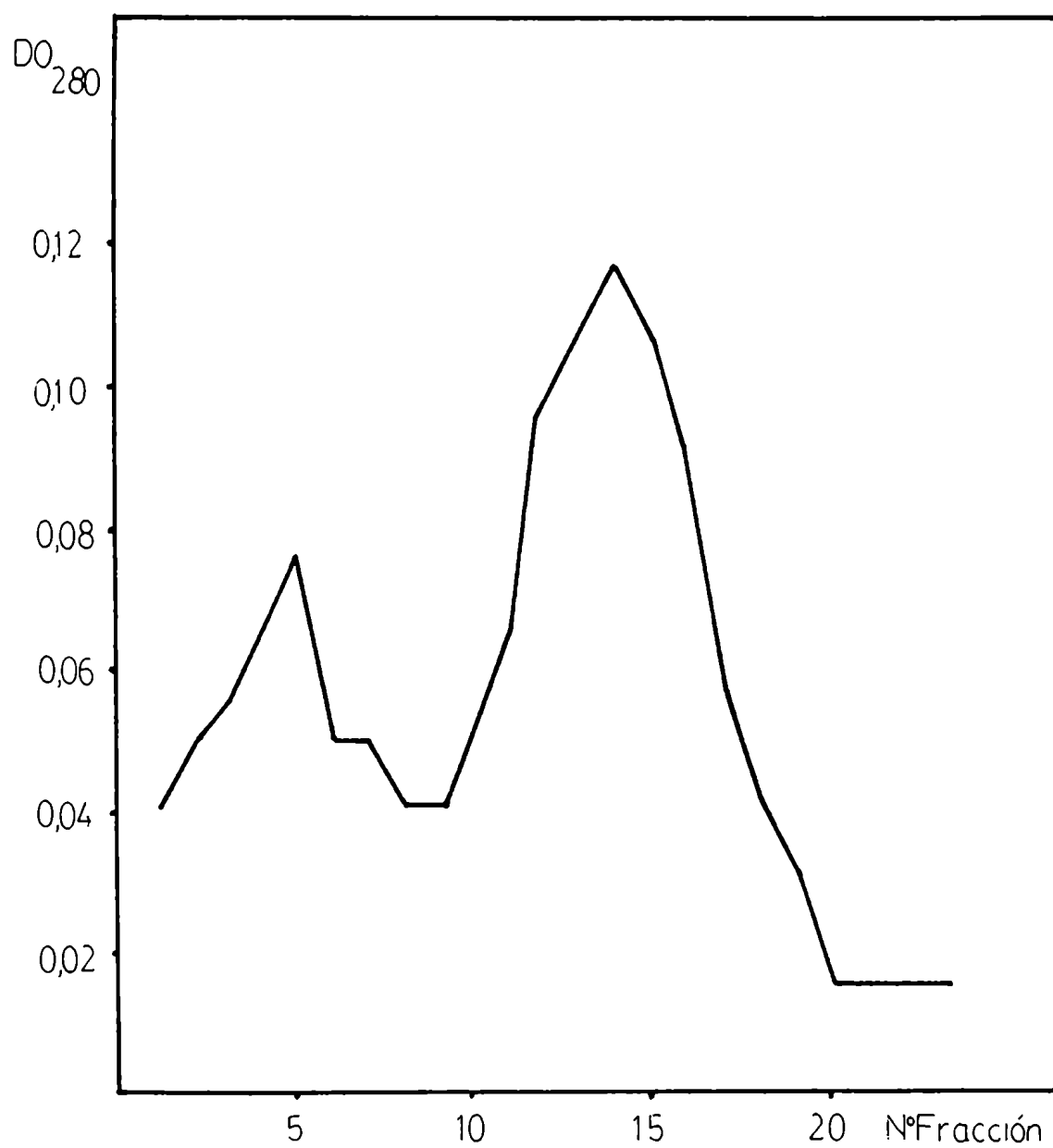


Gráfico 4C

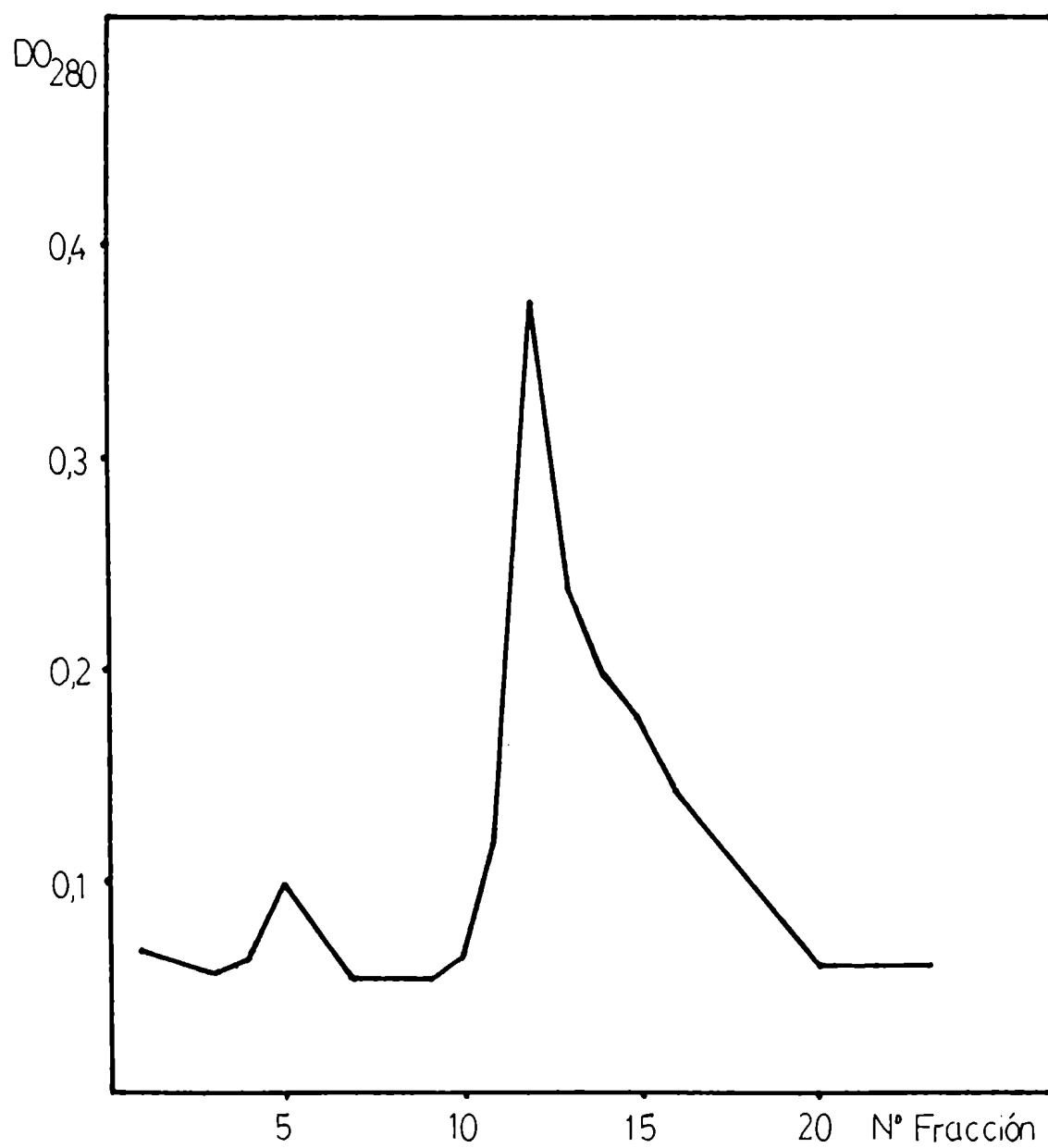


Gráfico 4D

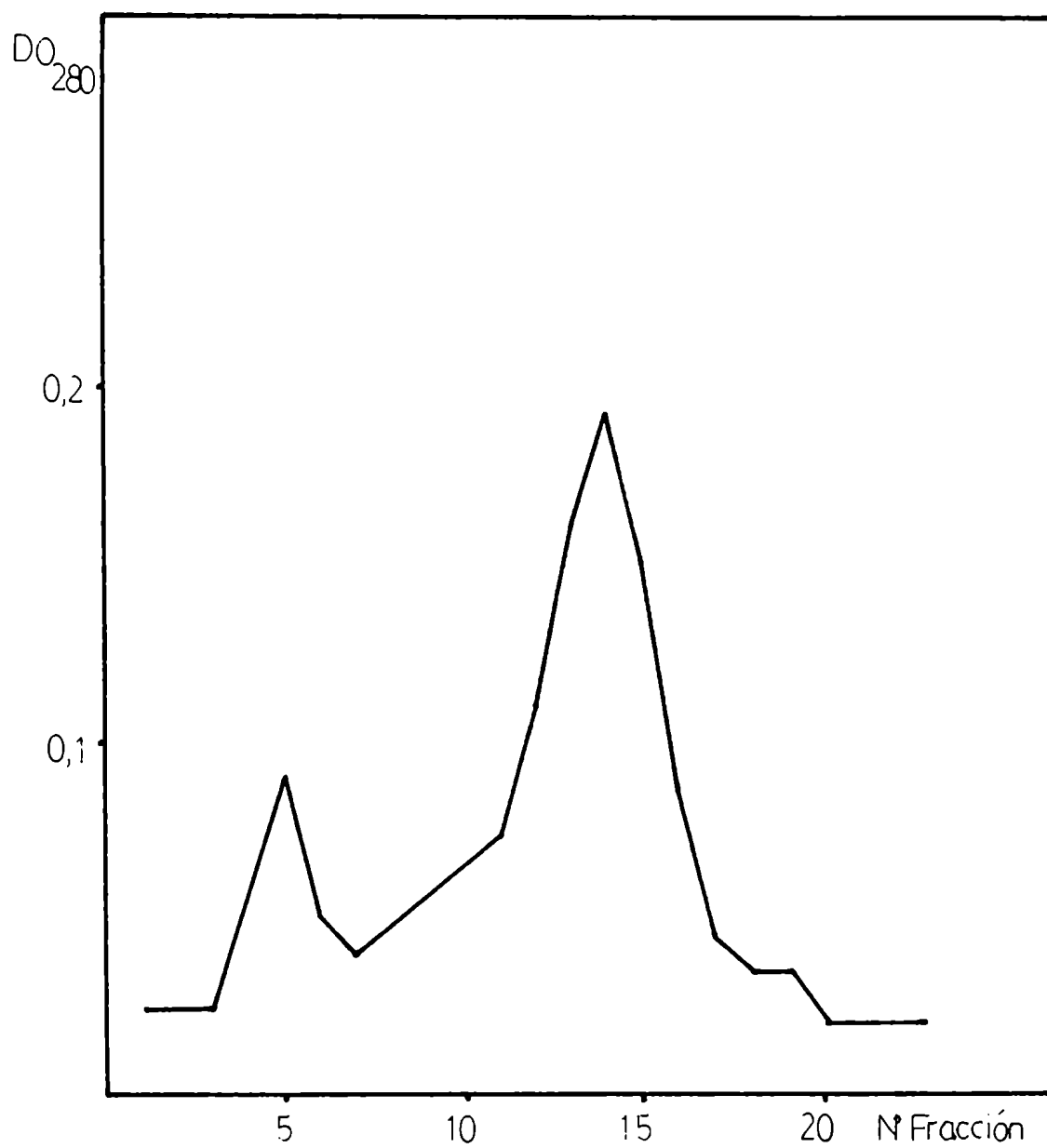


Gráfico 4E

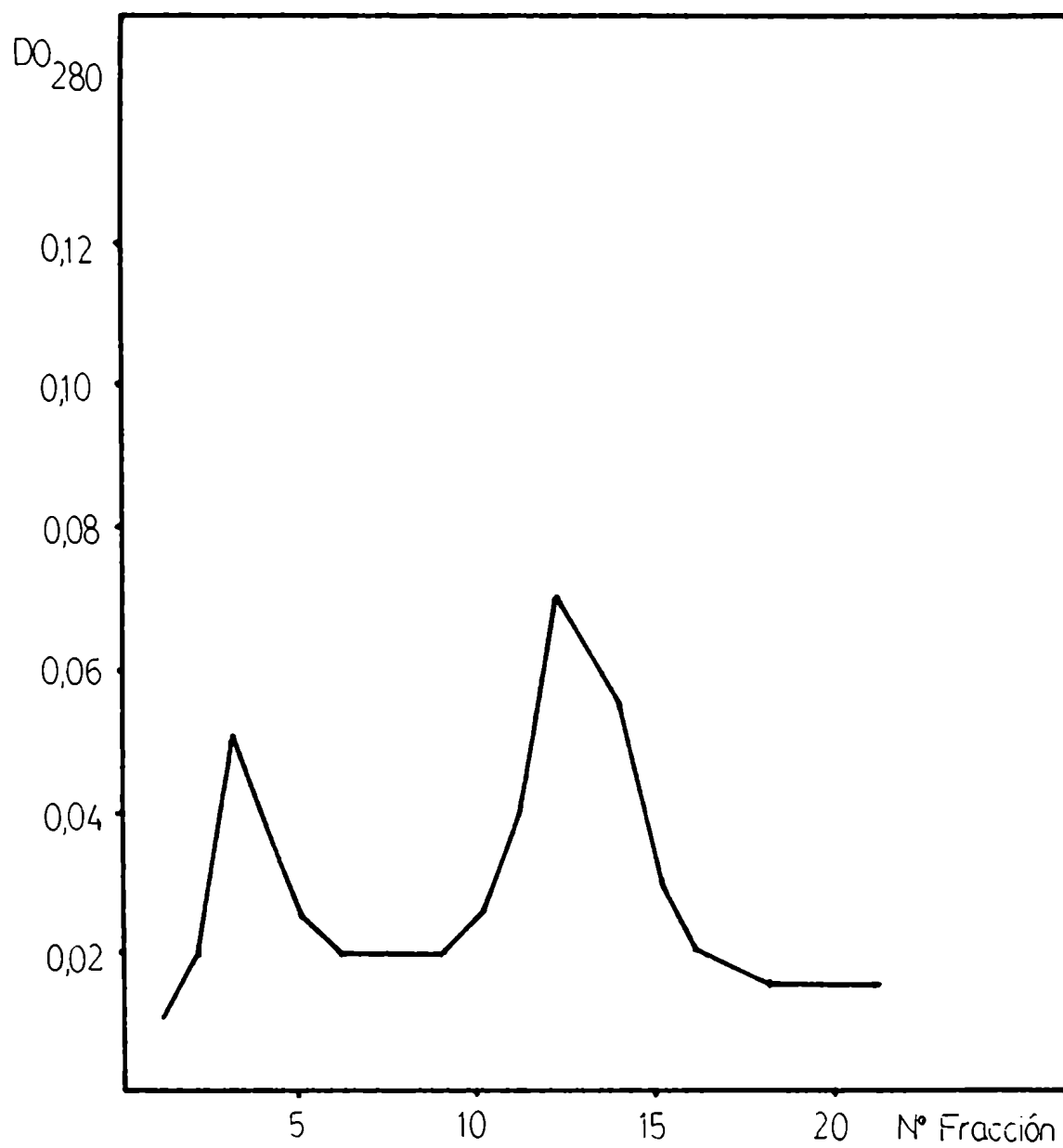


Gráfico 4F

talasa de hígado bovino.

En el Cuadro 8 se especifican las cantidades de antígeno sembrado y recuperado, y el rendimiento obtenido.

Masa de Ag sembrado.	Masa de Ag recuperado	% Rendimiento	Rendimiento
3,740 mg 2,882 mg	3,246 mg	49,01	41,98 \pm 9,93
3,117 mg 6,710 mg 5,264 mg 3,100 mg	6,360 mg	34,96	

Cuadro 8: Filtración molecular de antígeno carcinoembriónico.

EQUIVALENCIA ENTRE LOS DISTINTOS ESTADOS DE PURIFICACION.

En el Cuadro 9 se detallan las equivalencias entre los distintos estados de purificación de glicoproteínas de colon normal y colon tumoral.

Colon	Muestra	Extracto perclórico de glicoproteínas.	Antígeno purificado por electroenfoque	Antígeno purificado por filtración molecular.
Normal	100	0,095 100	$13,19 \cdot 10^{-3}$ 13,89	- -
Tumoral	100	0,098 100	$8,30 \cdot 10^{-3}$ 8,47 100	$3,48 \cdot 10^{-3}$ 3,55 41,98

Cuadro 9: Equivalencia entre los distintos estados de purificación de antígenos.

MARCACION RADIOACTIVA.

Se marcaron con ^{125}I por el método de la cloramina T los diferentes antígenos obtenidos.

Colon normal.

Se hizo una marcación del extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal (Gráfico 5) con una eficiencia de marcación de 38,0% y una actividad específica de 3,80 uCi/ug.

También se efectuó una marcación de la fracción de electroenfoque de pH 4,4 - 4,8 de glicoproteínas de colon normal (Gráfico 6). Se obtuvo una eficiencia de marcación de 42,81% y una actividad específica de 4,28 uCi/ug.

Colon tumoral.

Se marcaron tres muestras del extracto perclórico de gli-

conproteínas de colon tumoral (Gráficos 7 A-C) obteniéndose eficiencias de marcación de 25,39; 21,37 y 56,57% y actividades específicas de 2,54; 2,14; 5,65 uCi/ug respectivamente.

Del mismo modo se marcaron tres muestras de la fracción de electroenfoque de pH 4,60 a 4,95 de glicoproteínas de colon tumoral (Gráficos 8 A-C). Las eficiencias de marcación fueron de: 5,49; 3,73 y 6,04% y las actividades específicas de 0,55; 0,37 y 0,60 uCi/ug respectivamente. También se realizó la marcación de cuatro muestras de antígeno carcinoembriónico purificado (Gráficos 9 A-D) siendo, en estos casos, las eficiencias de marcación de 7,75; 8,54; 3,94; 7,23% y las respectivas actividades específicas de 0,77; 0,85; 0,39 y 0,72 uCi/ug.

GRAFICO 5.

Marcación con ^{125}I Na de extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal. Cromatografía en una columna de Sephadex G25 (27 x 1 cms) equilibrado con buffer fosfato 0,05 M pH 7,4. Buffer de elución: buffer fosfato 0,05 M pH 7,4. Volumen de fracciones recogidas: 0,5 ml.

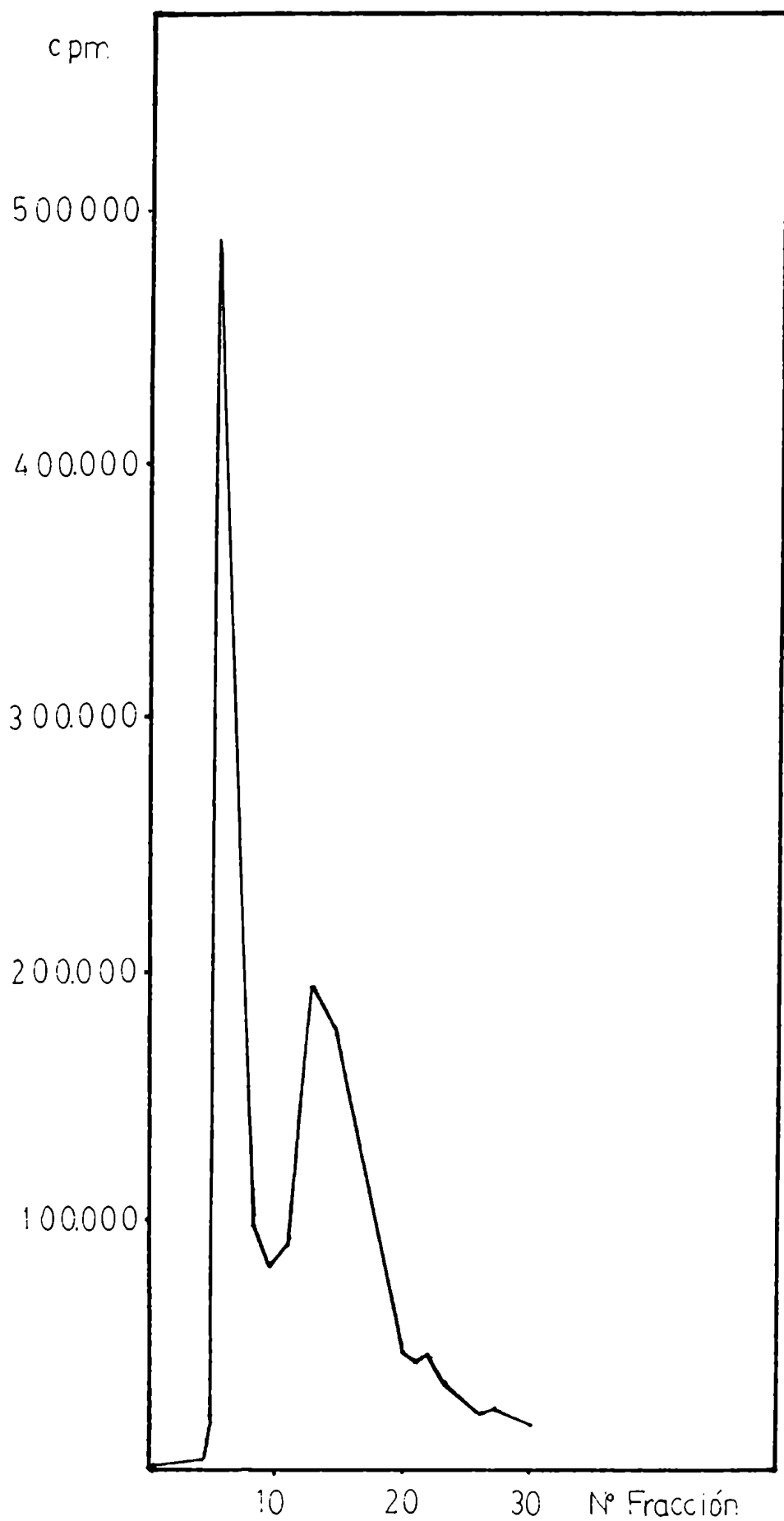


Gráfico 5

GRAFICO 6.

Marcación con ^{125}I Na de fracción de pH 4,4 - 4,8 de electro-
enfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon
normal. Cromatografía en una columna de Sephadex G25 (27 x
1 cms) equilibrado con buffer fosfato 0,05 M pH 7,4. Buffer
de elución: buffer fosfato 0,05 M pH 7,4. Volumen de frac-
ciones recogidas: 0,5 ml.

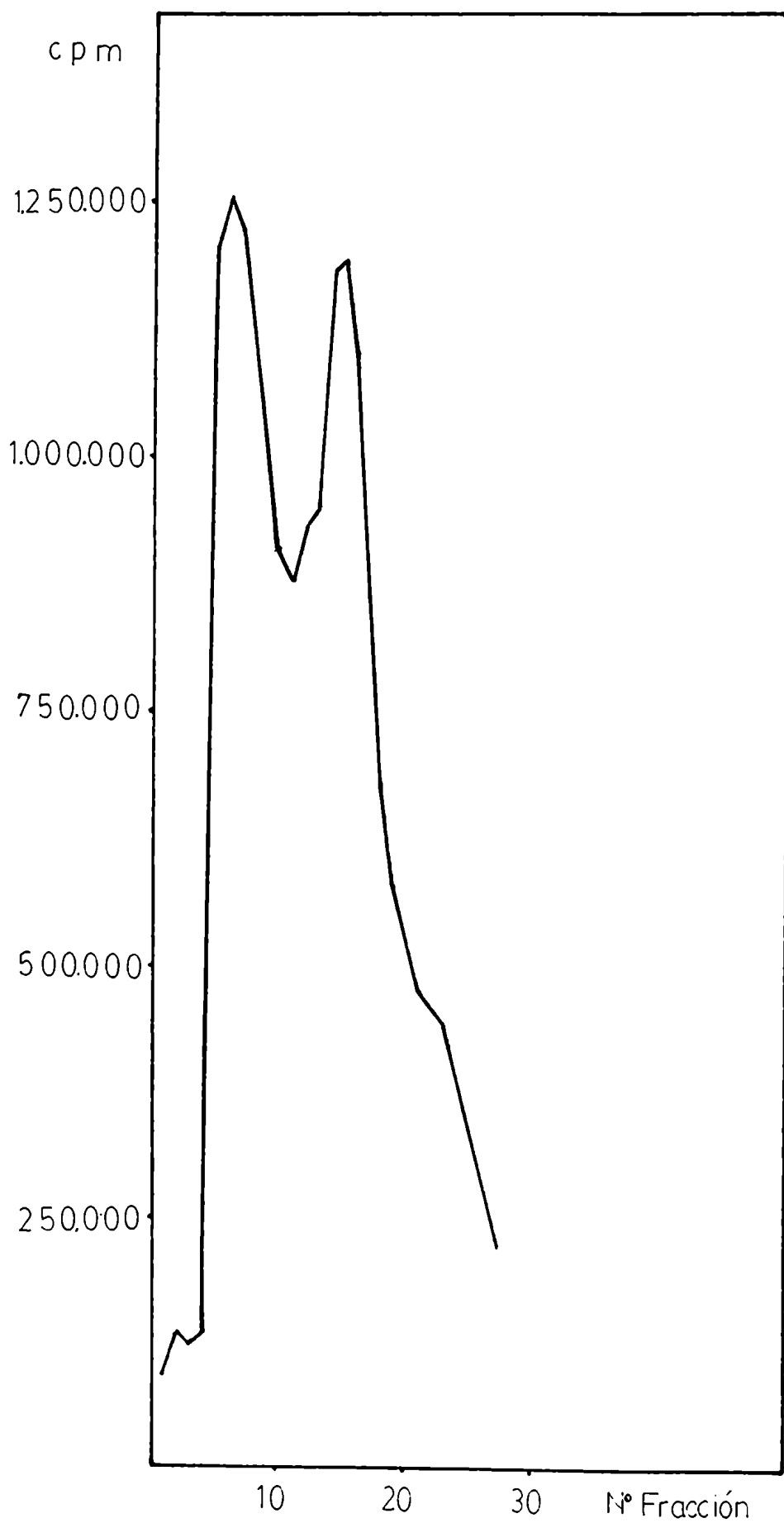


Gráfico 6

GRAFICOS 7A A 7C.

Marcación con ^{125}I Na de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral. Cromatografía en una columna de Sephadex G25 (27 x 1 cms) equilibrado con buffer fosfato 0,05 M pH 7,4. Buffer de elución: buffer fosfato 0,05 M pH 7,4. Volumen de fracciones recogidas: 0,5 ml.

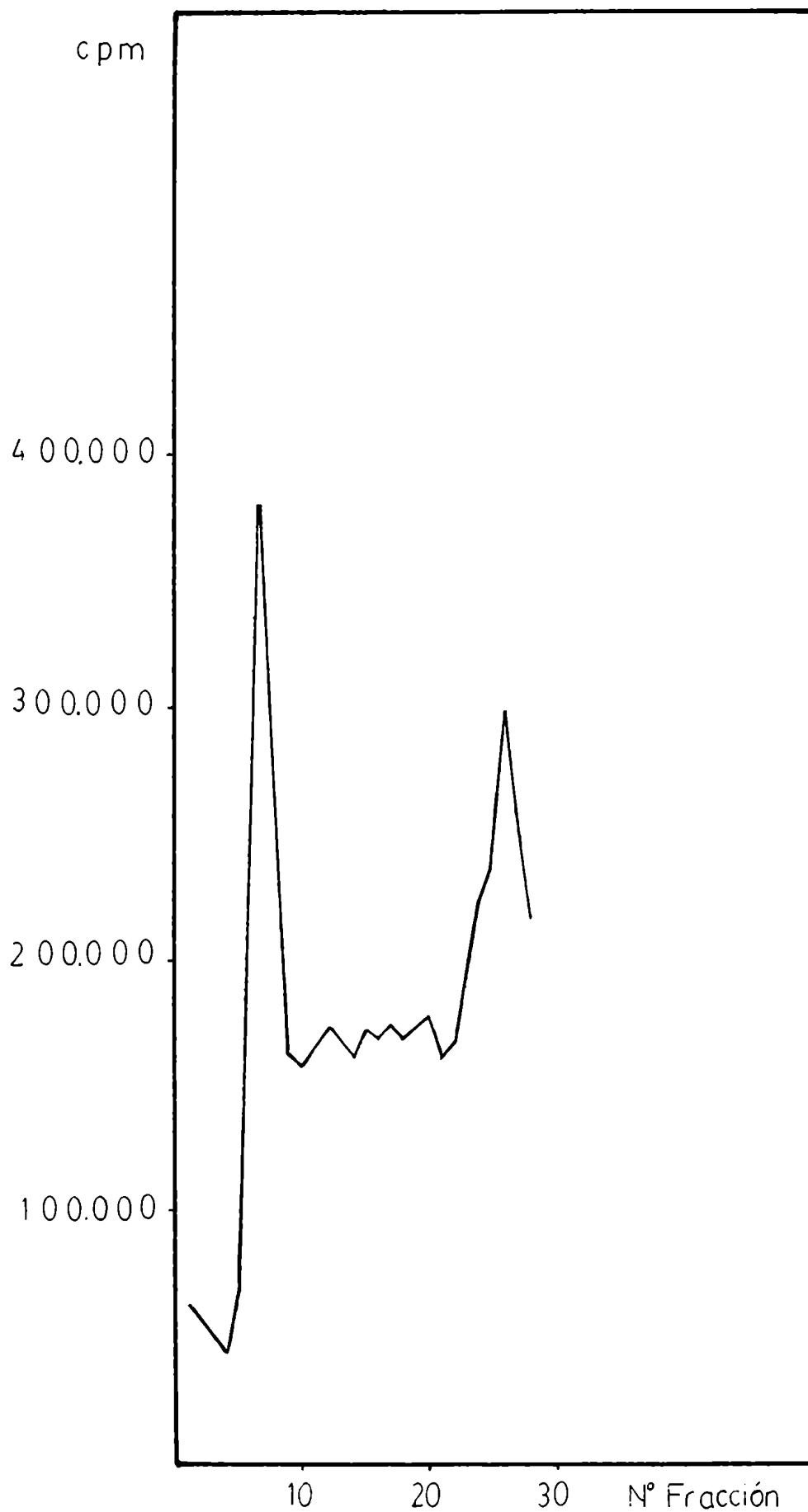


Gráfico 7A

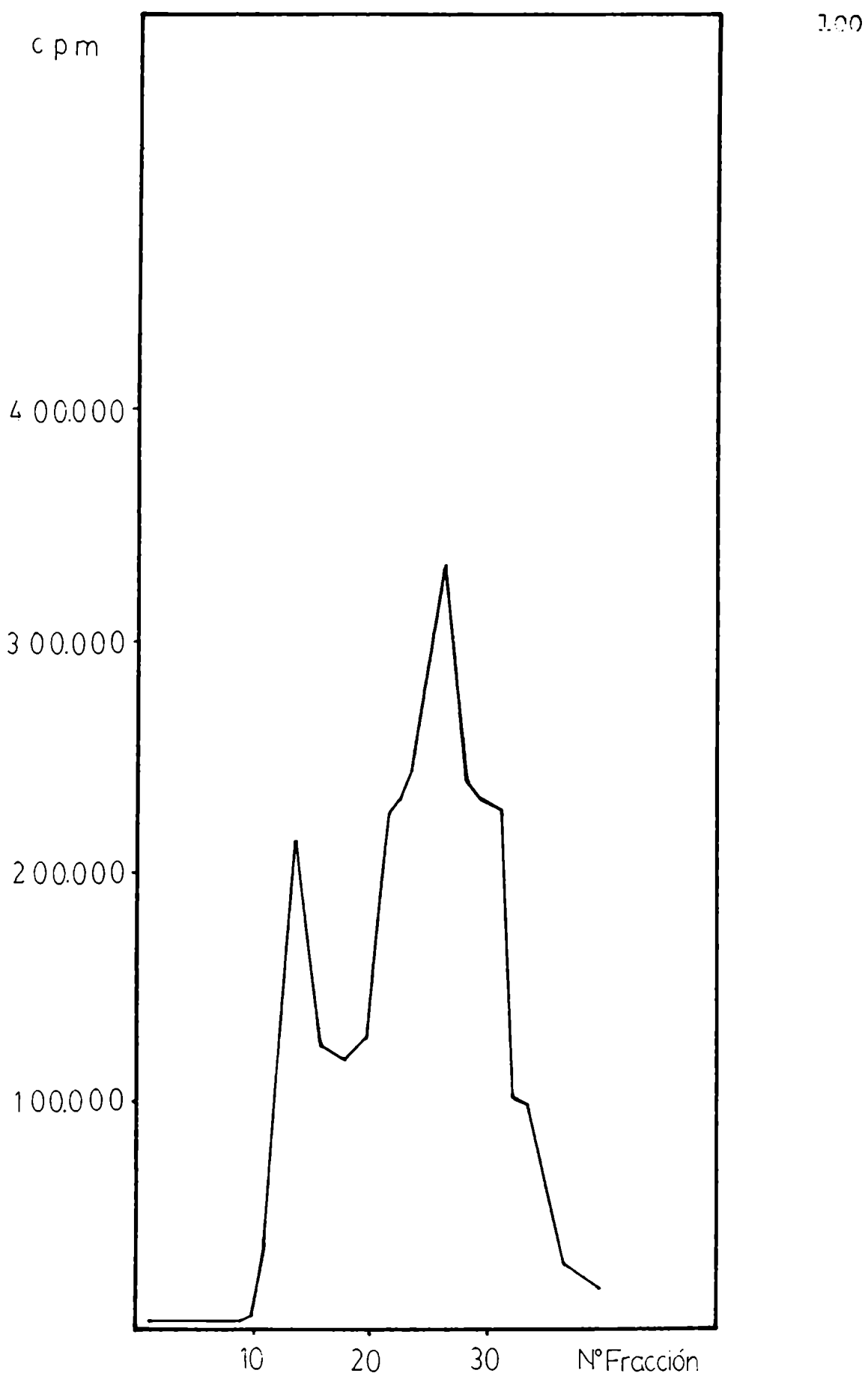


Gráfico 7B

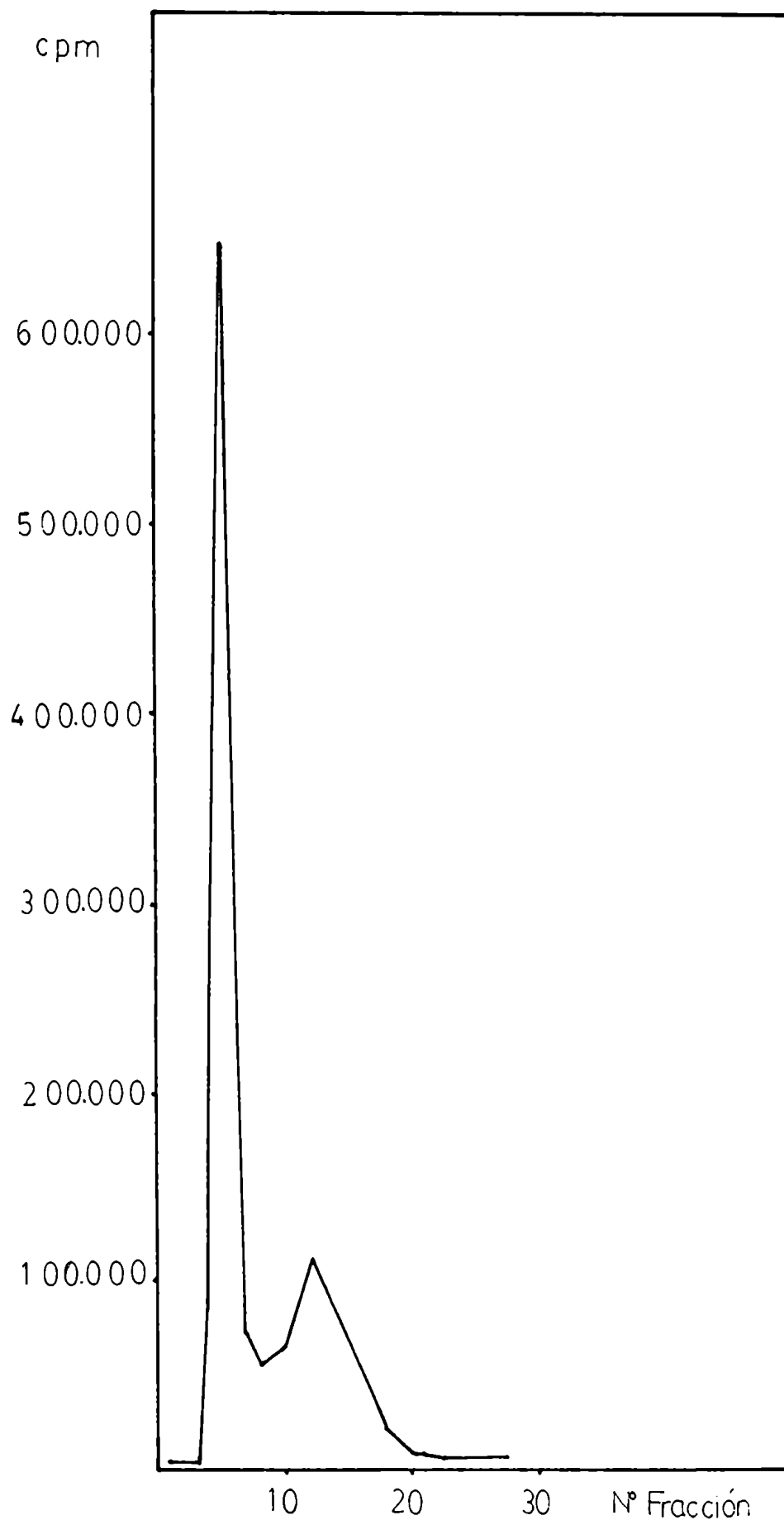


Gráfico 7C

GRAFICOS 8A A 8C.

Marcación con ^{125}I Na de fracción de pH 4,60 - 4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral. Cromatografía en una columna de Sephadex G25 (27 x 1 cms) equilibrado con buffer fosfato 0,05 M pH 7,4. Buffer de elución: buffer fosfato 0,05 M pH 7,4. Volumen de fracciones recogidas: 0,5 ml.

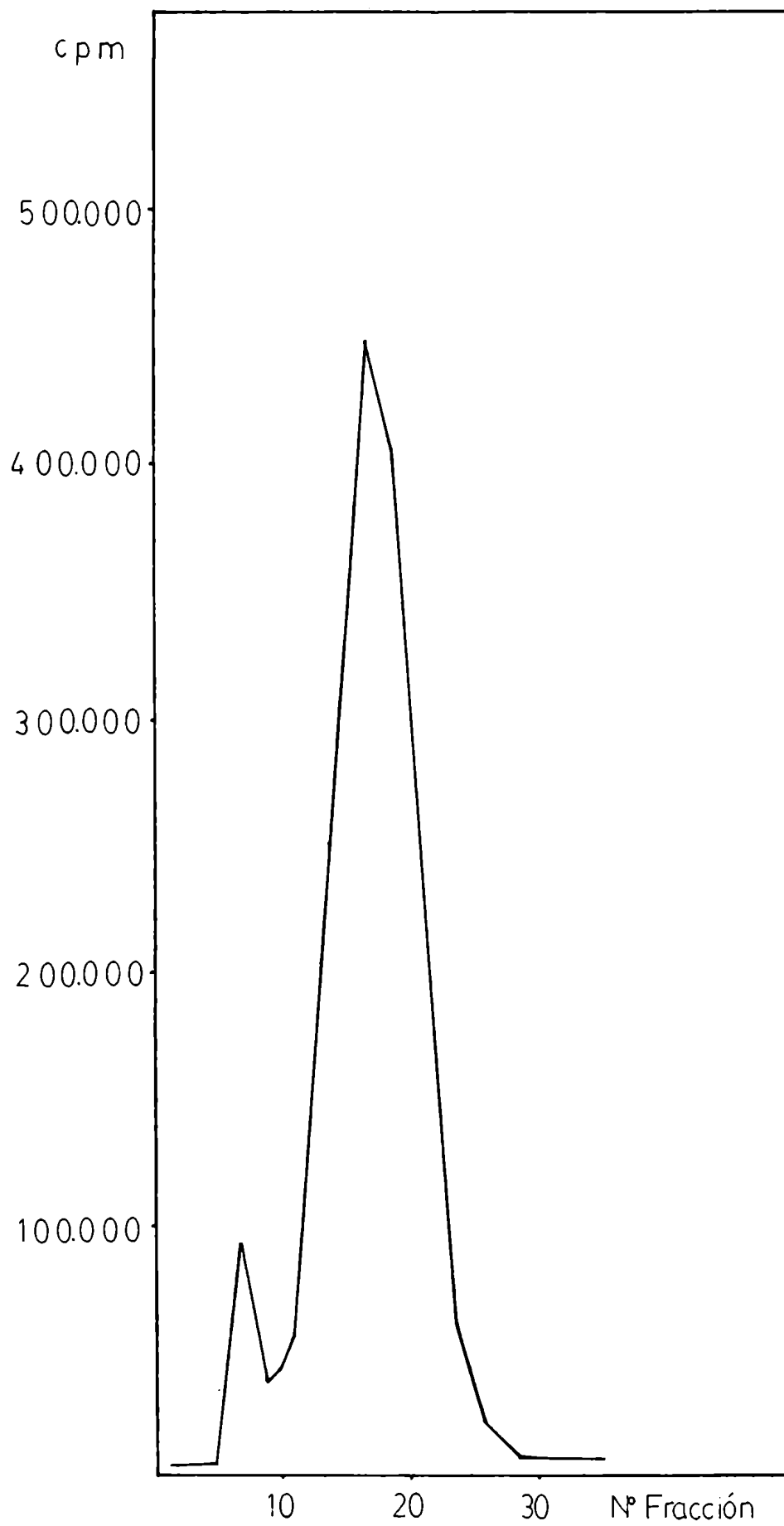


Gráfico 8A

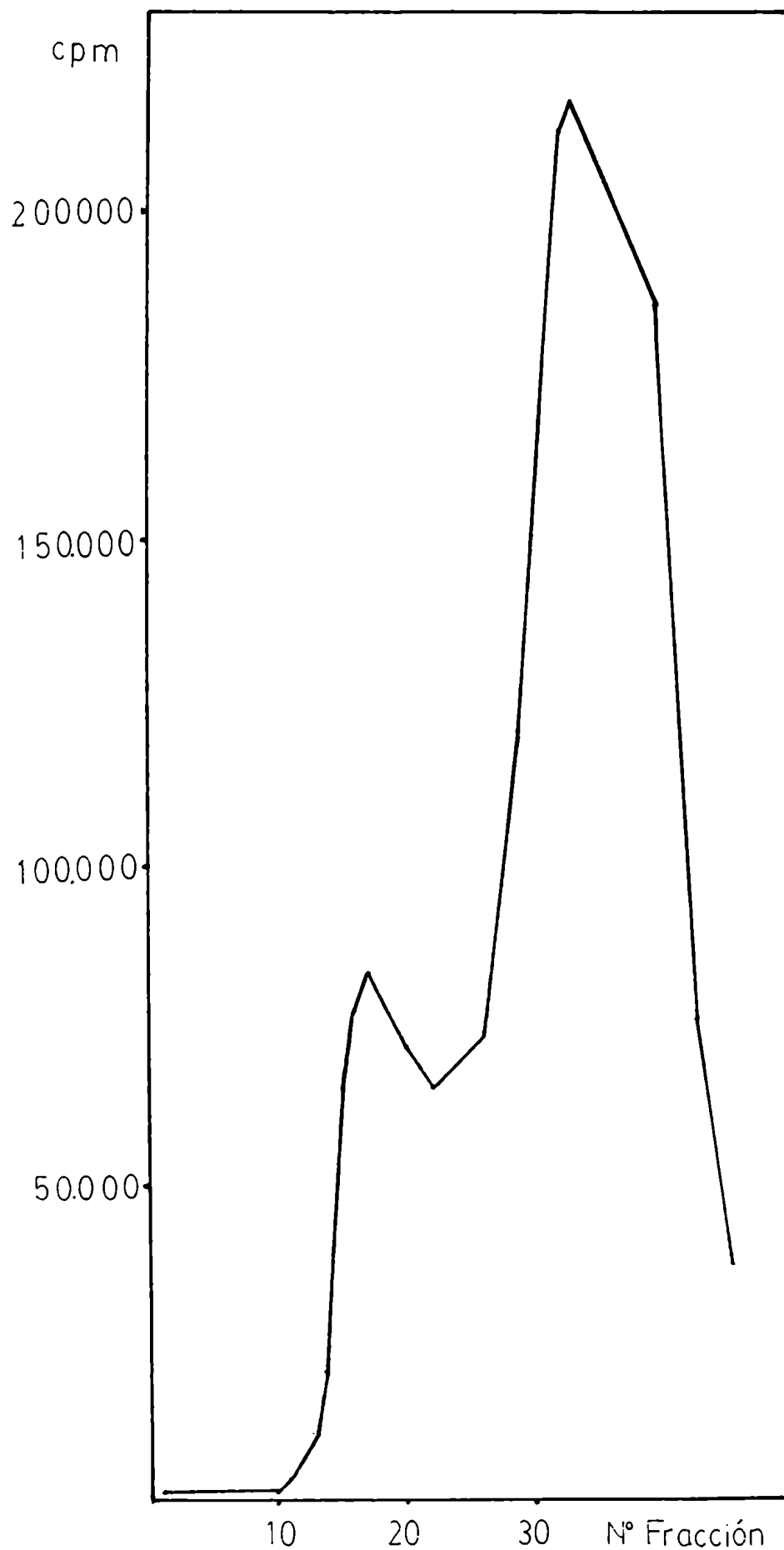
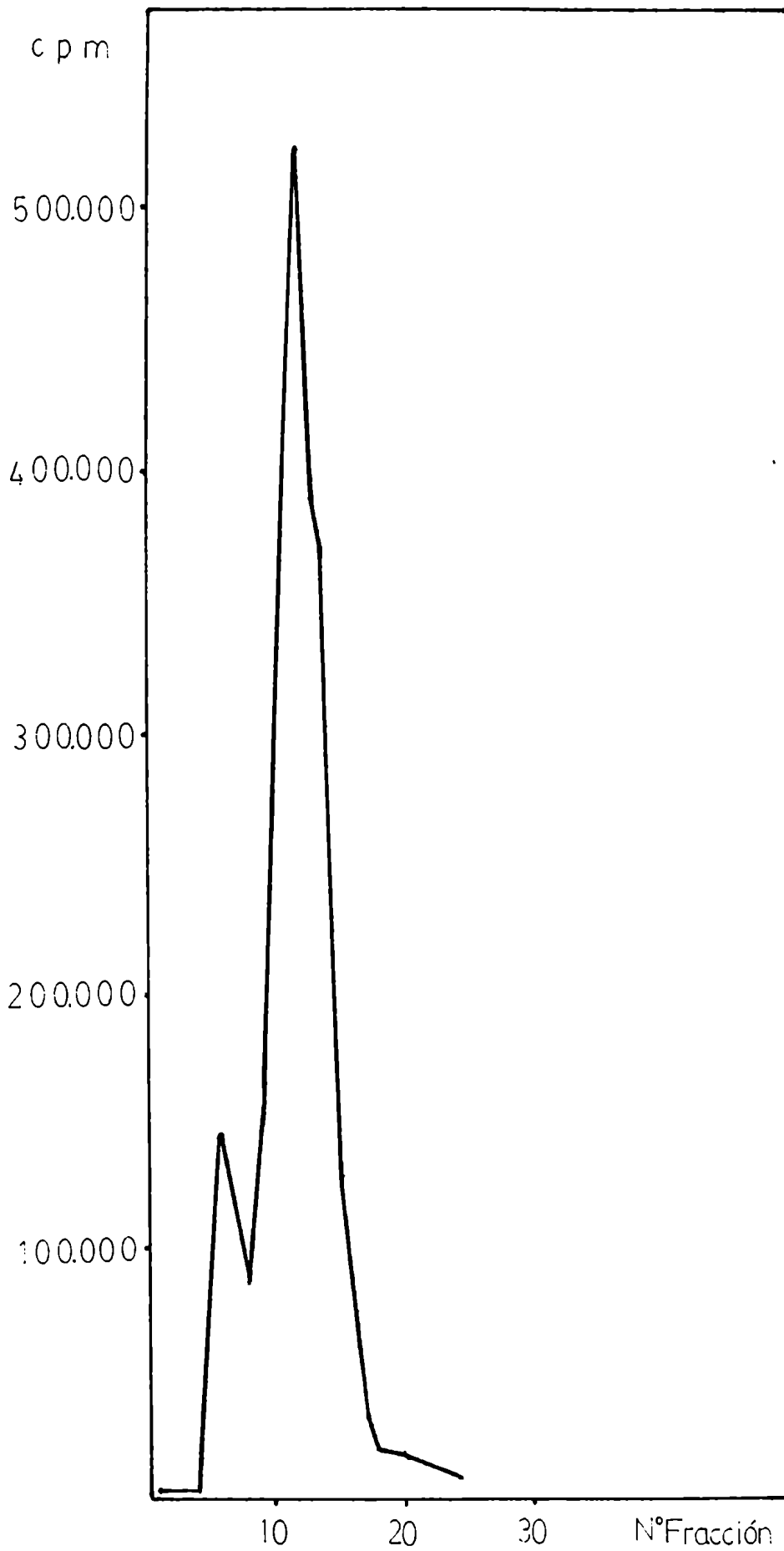


Gráfico 8B



105

Gráfico 8C

GRAFICOS 9A A 9D.

Marcación con ^{125}I Na de CEA purificado por filtración molecular. Cromatografía en una columna de Sephadex G25 (27 x 1 cm) equilibrada con buffer fosfato 0,05 M pH 7,4. Buffer de elución: buffer fosfato 0,05 M pH 7,4. Volumen de fracciones recogidas: 0,5 ml.

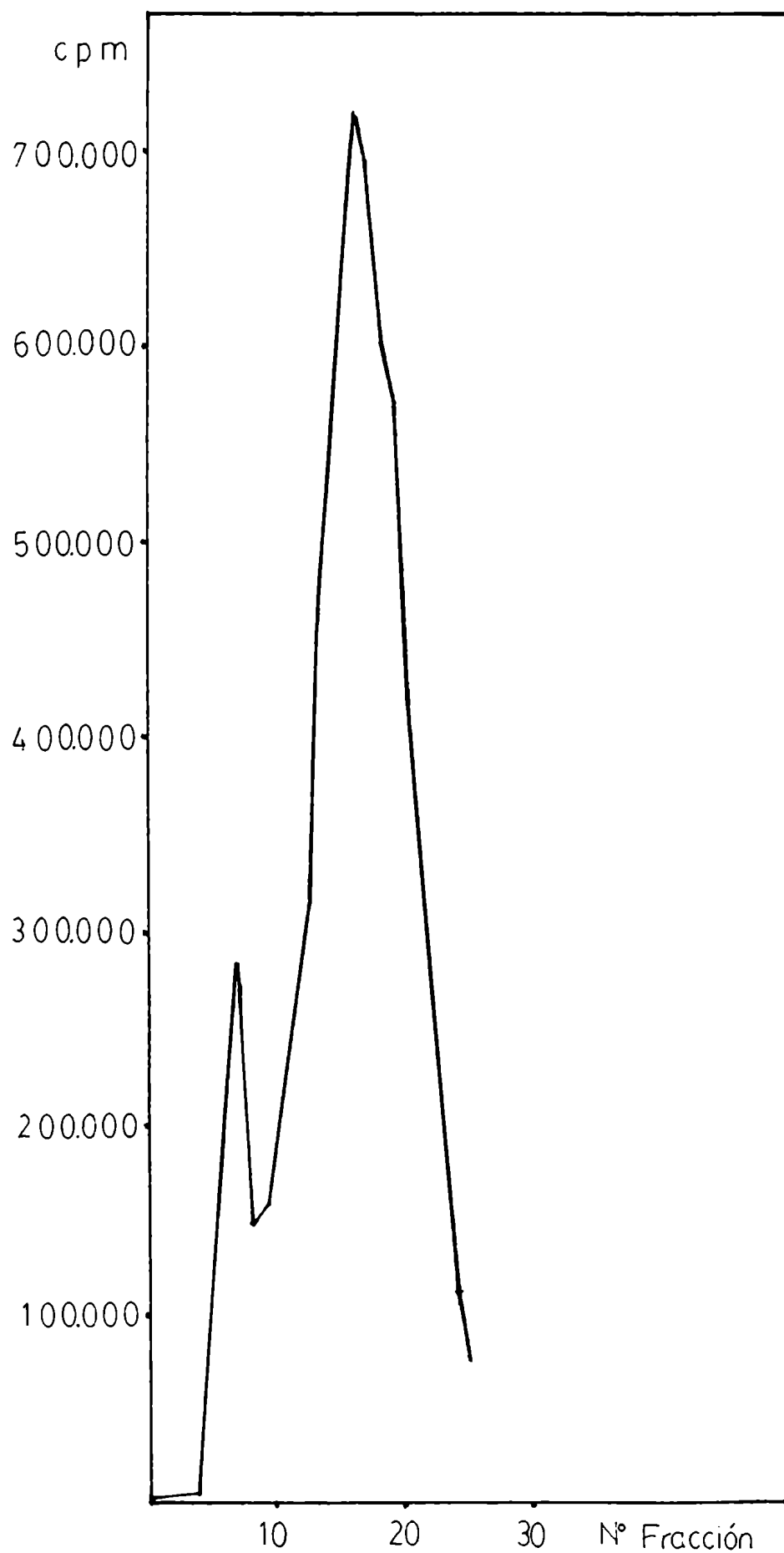


Gráfico 9A

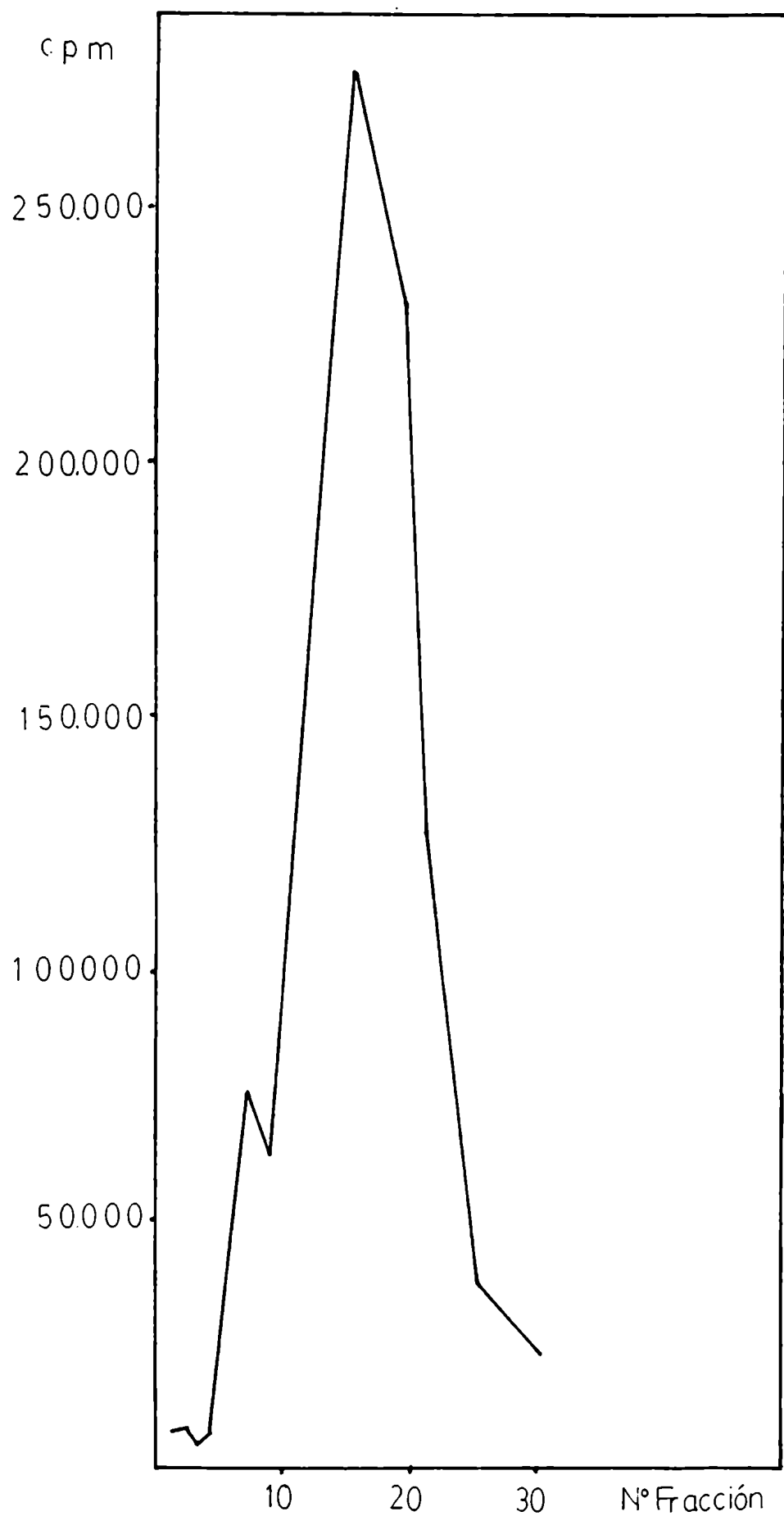


Gráfico 9B

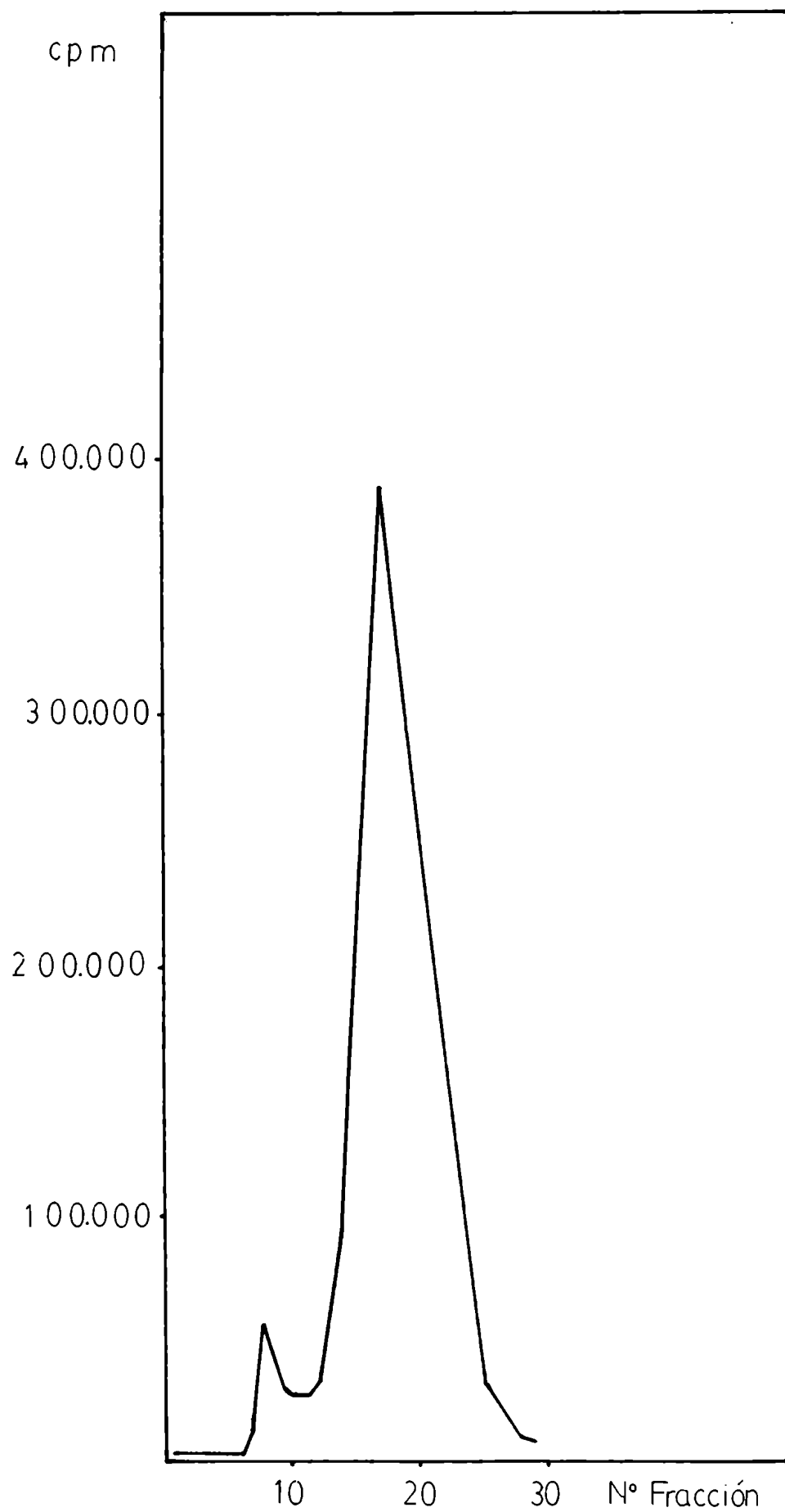


Gráfico 9C

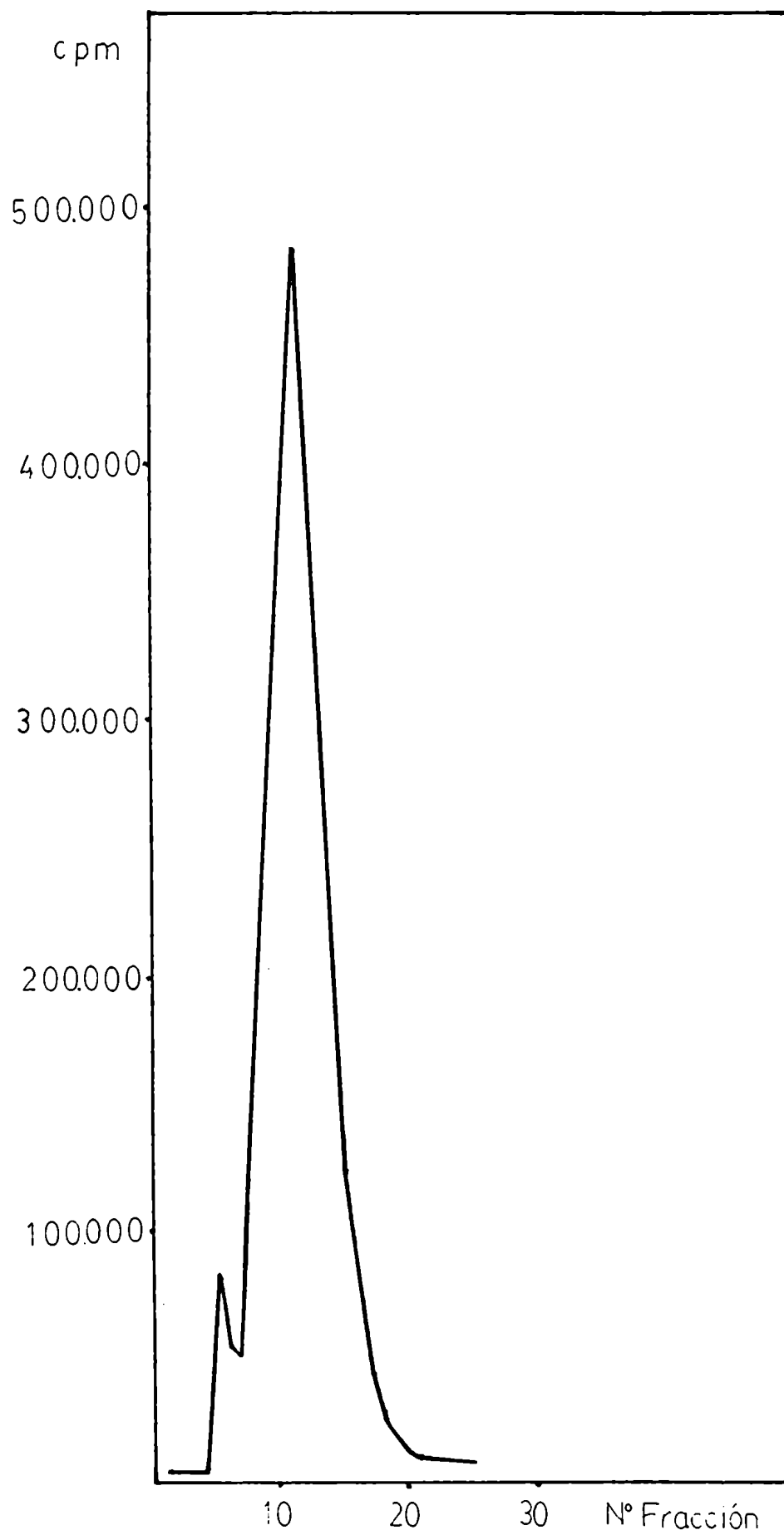


Gráfico 9D

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Colon normal.

Se realizaron corridas electroforéticas del extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal y la fracción de pH 4,4-4,8 de electroenfoque de dicho extracto. Se detectaron proteínas tiñendo con azul de Coomasie y glicoproteínas mediante reactivo de Schiff (Figuras 1 y 2 respectivamente). En ambos casos se aprecia que la muestra de extracto perclórico presenta heterogeneidad de carga, notándose bandas polidispersas en el caso de la tinción de proteínas; al purificar el antígeno por electroenfoque hay menor heterogeneidad de bandas detectándose en la tinción de proteínas una única banda polidispersa (la banda inferior corresponde al colorante indicador). En la tinción de glicoproteínas hay mayor heterogeneidad siendo las bandas bien definidas, en este caso una de las bandas correspondientes al extracto perclórico (la inferior) sufrió un desdoblamiento en dos bandas luego de la purificación.

También se corrieron muestras marcadas con ^{125}I que luego se cortaron en discos de 1 mm de espesor midiéndose la radioactividad de cada uno de ellos. Los perfiles obtenidos se ven



Figura 1

FIGURA 2.

Detección de glicoproteínas en gel de poliacrilamida por tinción con reactivo de Schiff.

A: extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

B: fracción de pH 4,4-4,8 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

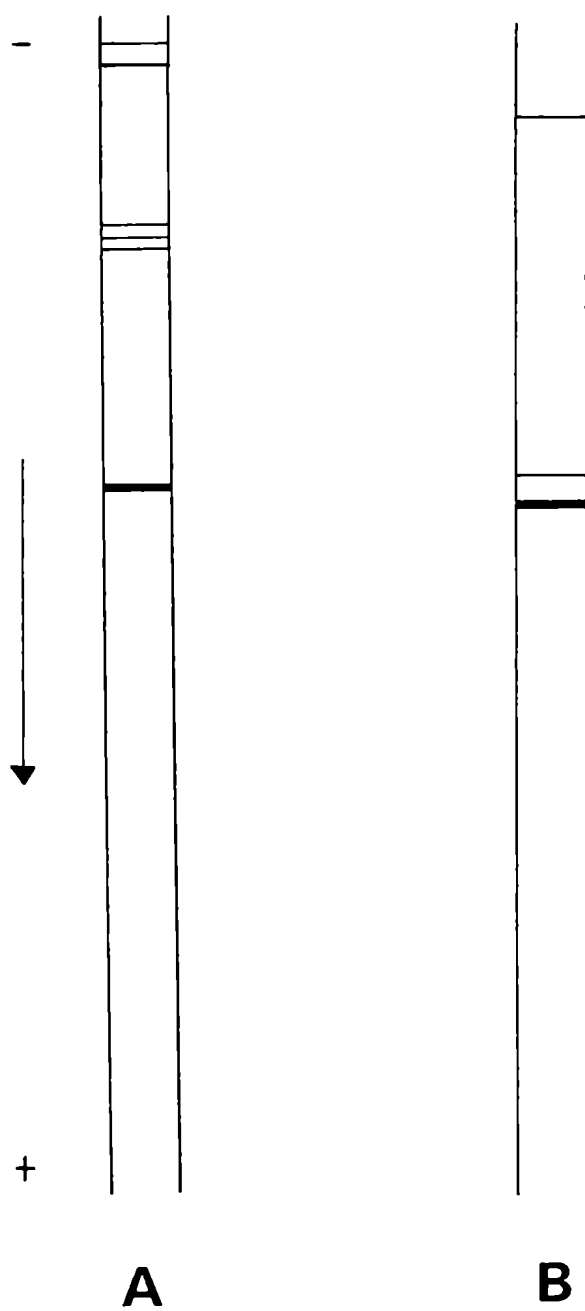


Figura 2

GRAFICO 10.

Perfil de radioactividad de electroforesis en gel de poli-
acrilamida de extracto perclórico de glicoproteínas de
colon normal marcado con ^{125}INa .

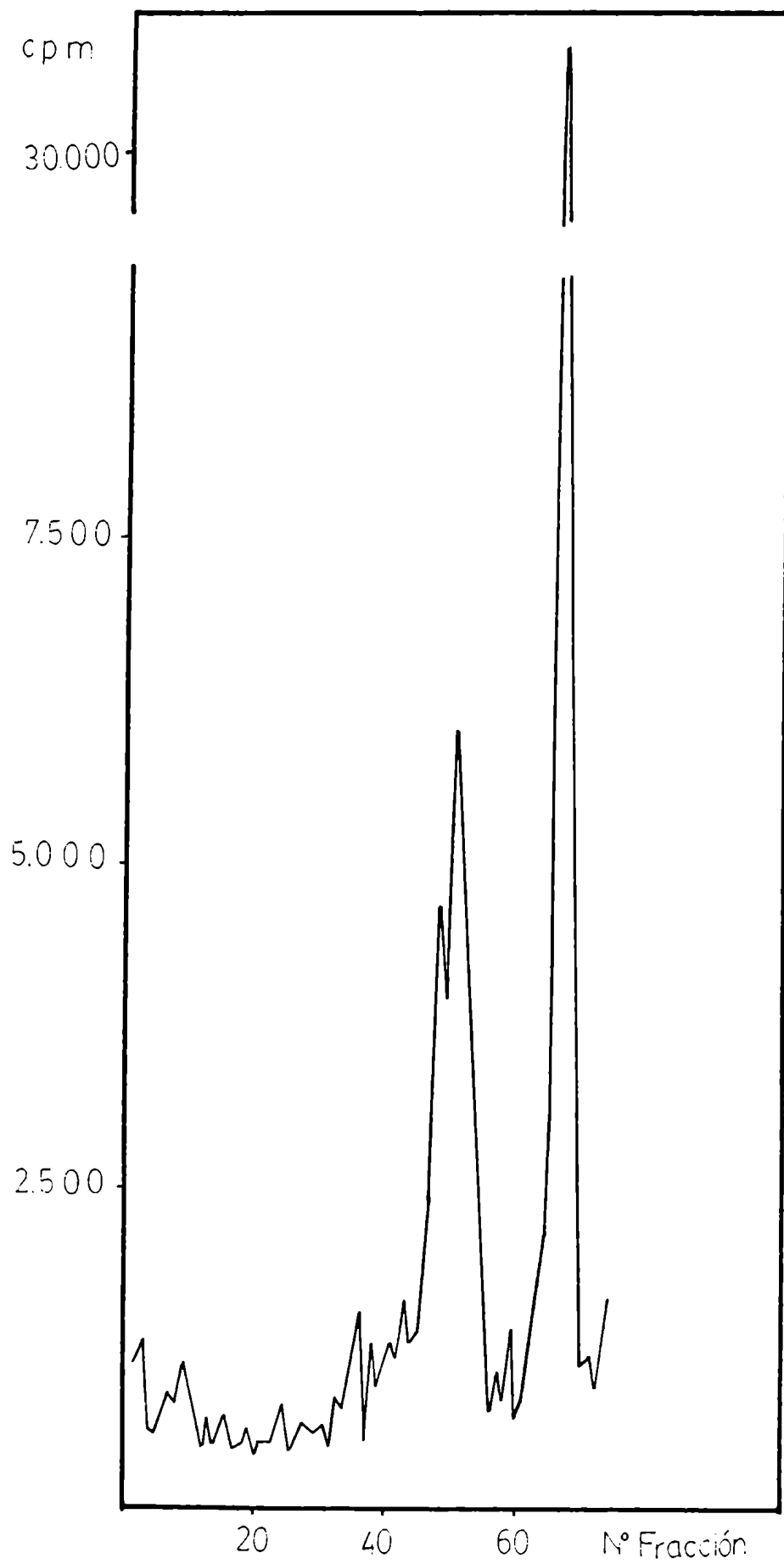


Gráfico 10

GRAFICO 11.

Perfil de radioactividad de electroforesis en gel de poliacrilamida de fracción de pH 4,4-4,8 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal marcada con ^{125}INa .

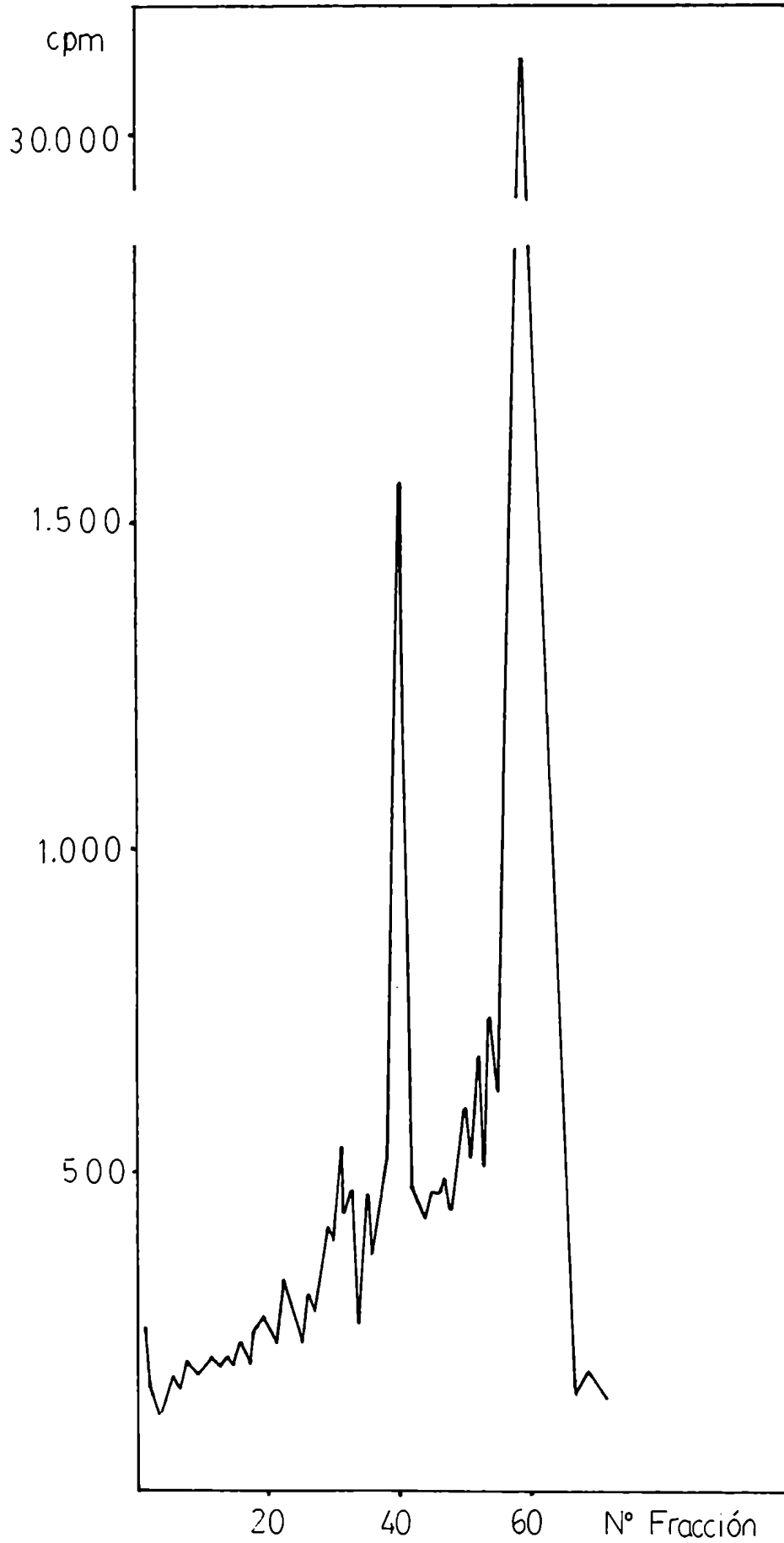


Gráfico 11

en los Gráficos 10 y 11. En estos casos se comprueba que las bandas radioactivas aparecen entre las fracciones 40 y 60 coincidiendo con las tinciones. En ambos Gráficos el último pico corresponde al colorante indicador que da un alto valor de lectura ya que el aparato utilizado es un espectrodensitógrafo.

Colon tumoral.

Se efectuaron los mismos tipos de tinciones para el extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral, la fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de ese extracto y el antígeno carcinoembrionario puro (Figuras 3 y 4). En estos casos también se comprueba que hay heterogeneidad que disminuye a medida que se purifica el antígeno: también en este caso las bandas son polidispersas difusas, en la tinción de proteínas y bien definidas en el caso de glicoproteínas. En la tinción de glicoproteínas del antígeno carcinoembrionario puro (Figura 4) aparece una única banda, es decir que sería homogéneo.

En los Gráficos 12, 13 y 14 aparecen los perfiles de las corridas de muestras radioactivas, en estos casos se comprueba

FIGURA 3.

Detección de proteínas en gel de poliacrilamida por tinción con azul de Coomassie.

C: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

D: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

E: antígeno carcinoembrionario puro.

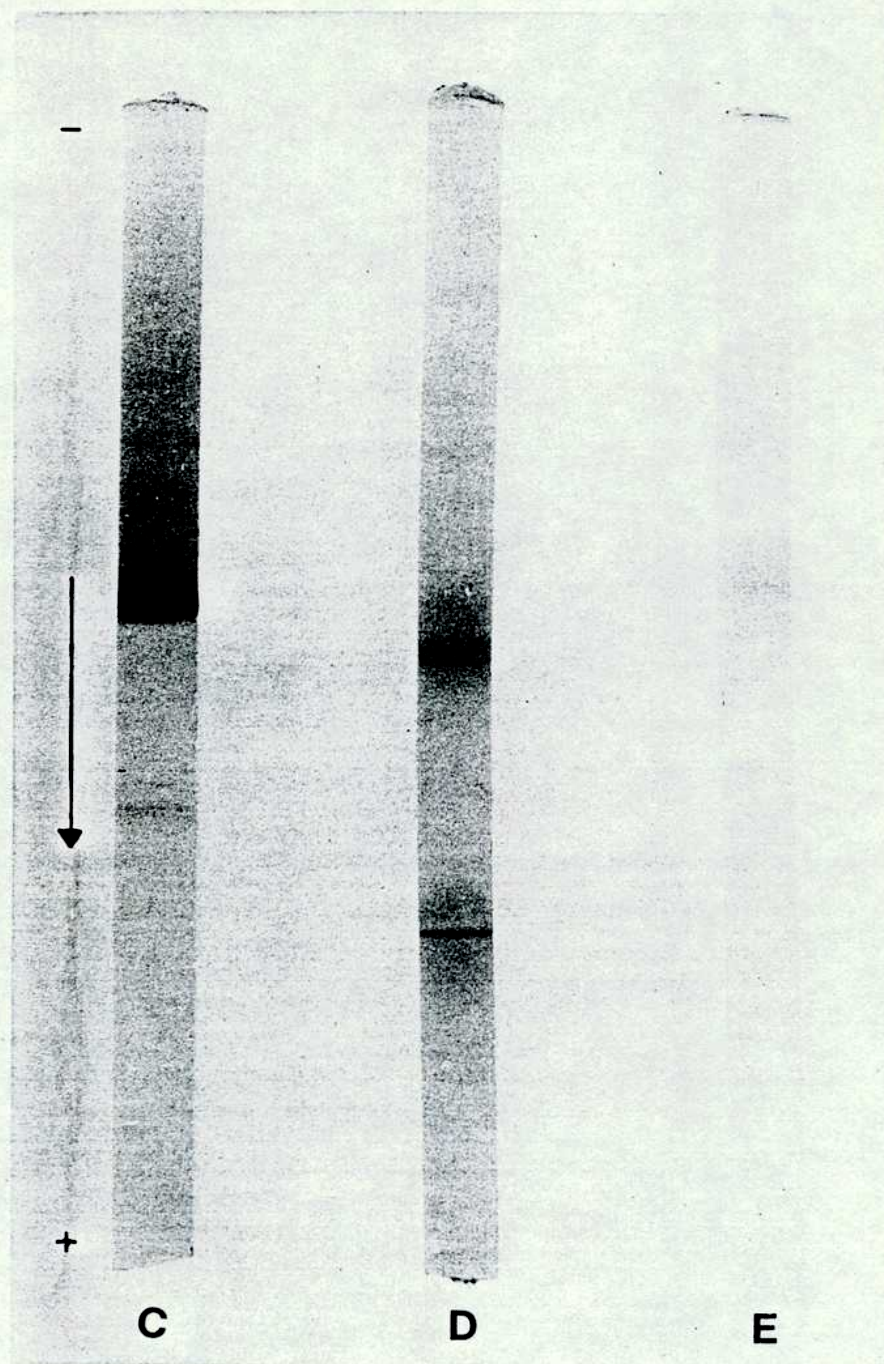


Figura 3

FIGURA 4.

Detección de glicoproteínas en gel de poliacrilamida por tinción con reactivo de Schiff.

C: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

D: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

E: antígeno carcinoembrionario puro.

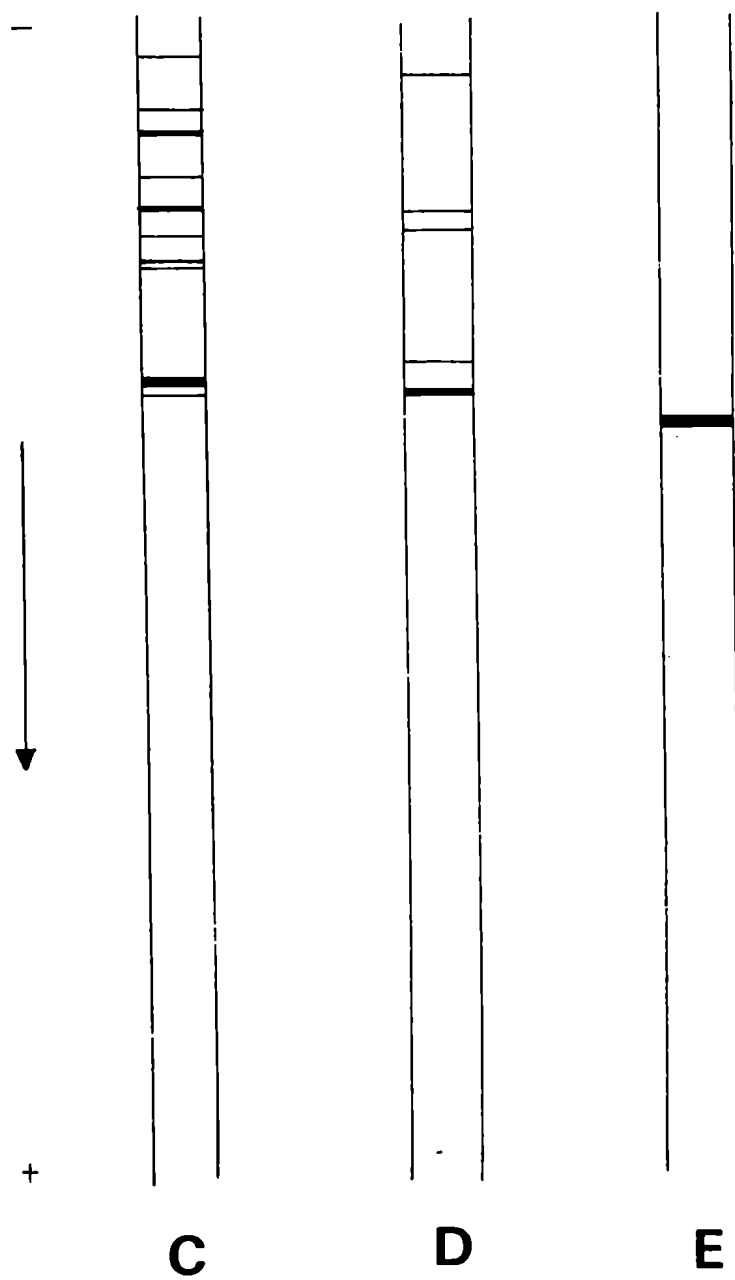


Figura 4

GRAFICO 12.

Perfil de radioactividad de electroforesis en gel de poliacrilamida de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral marcado con ^{125}INa .

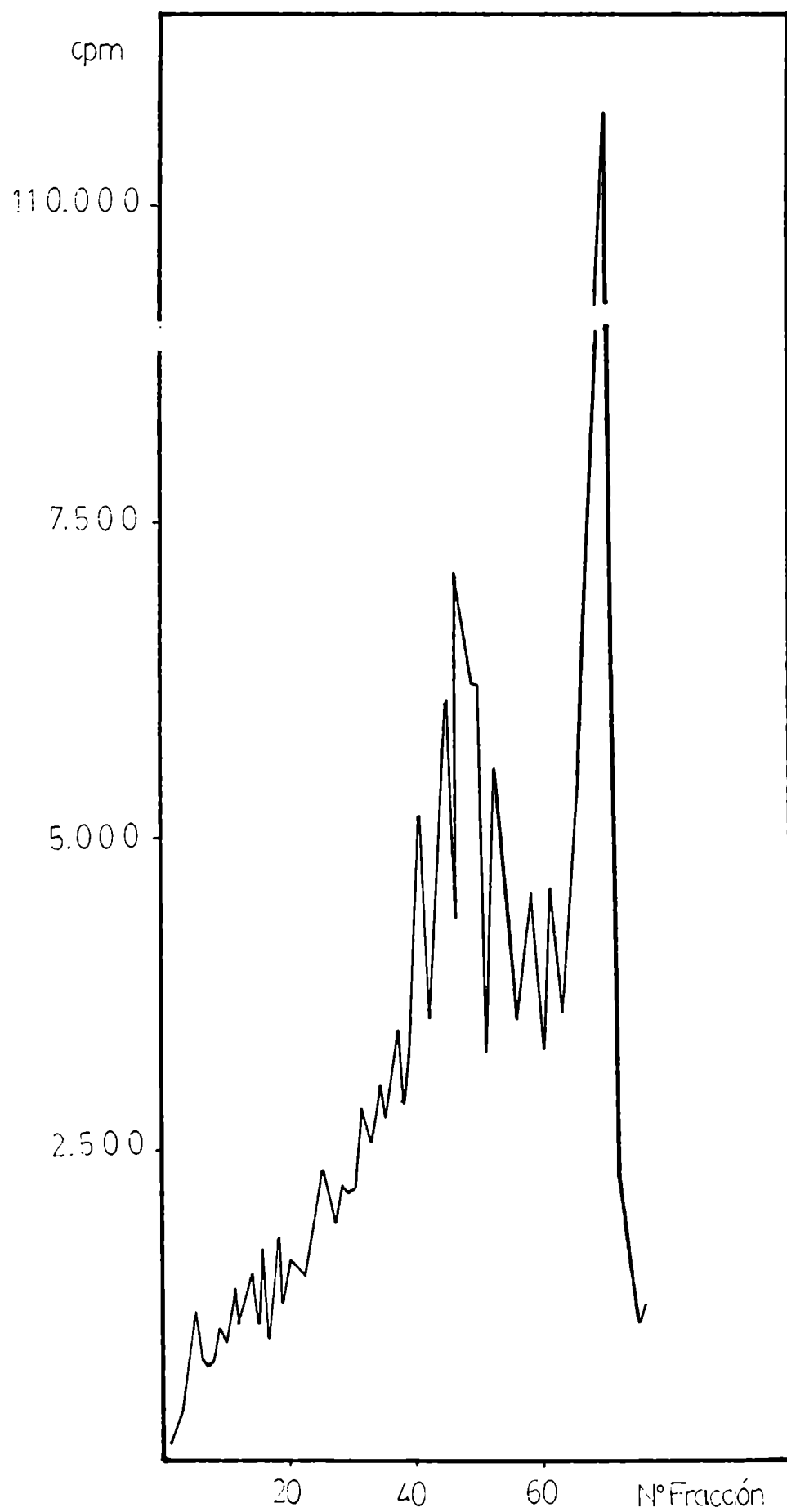
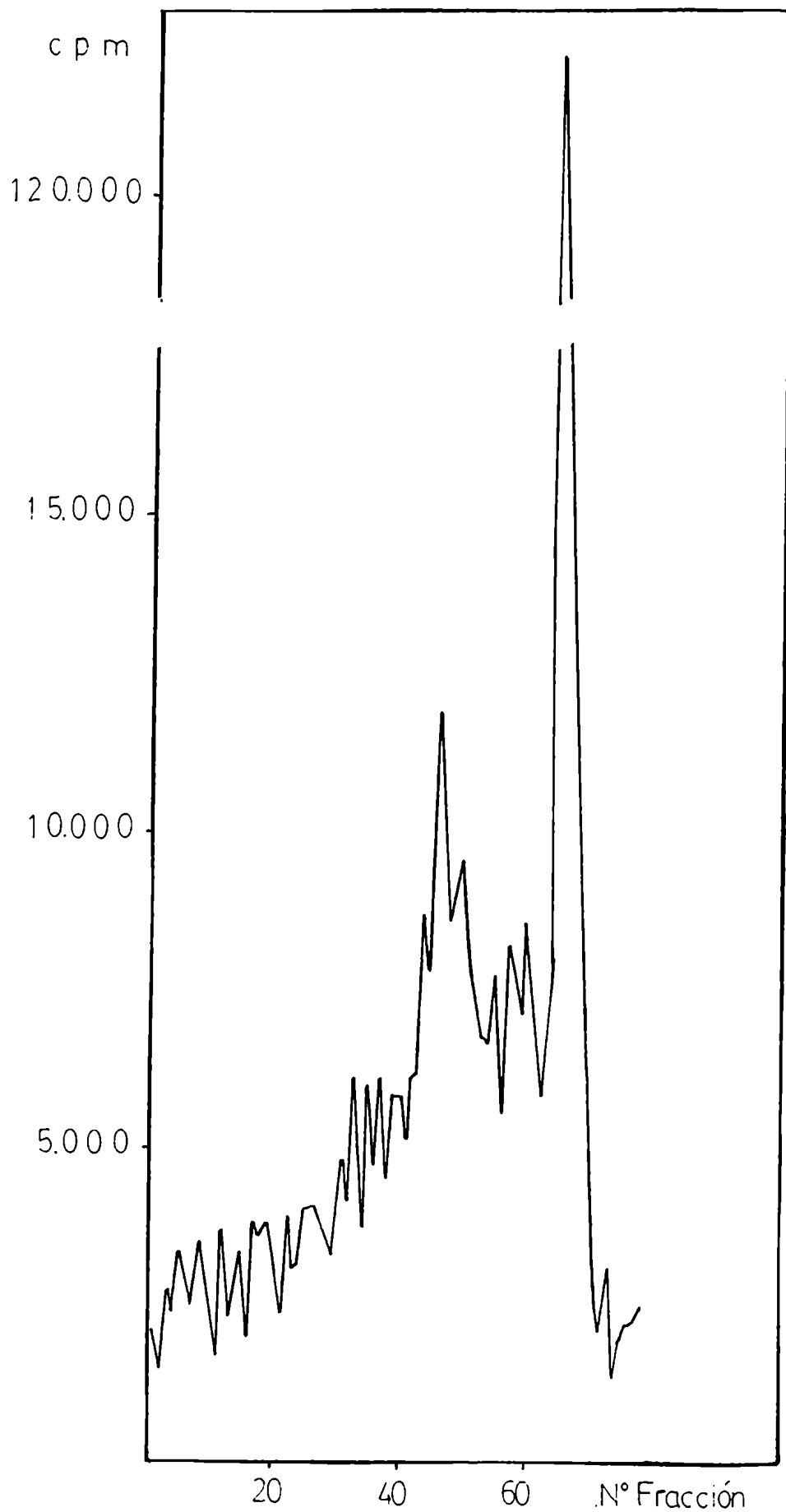


Gráfico 12

GRAFICO 13.

Perfil de radioactividad de electroforesis en gel de poliacrilamida de fracción de pH 4,65-4,90 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral marcada con ^{125}I Na.



128

Gráfico 13

GRAFICO 14.

Perfil de radioactividad de electroforesis en gel de poliacrilamida de antígeno carcinoembriónico puro marcado con ^{125}I Na.

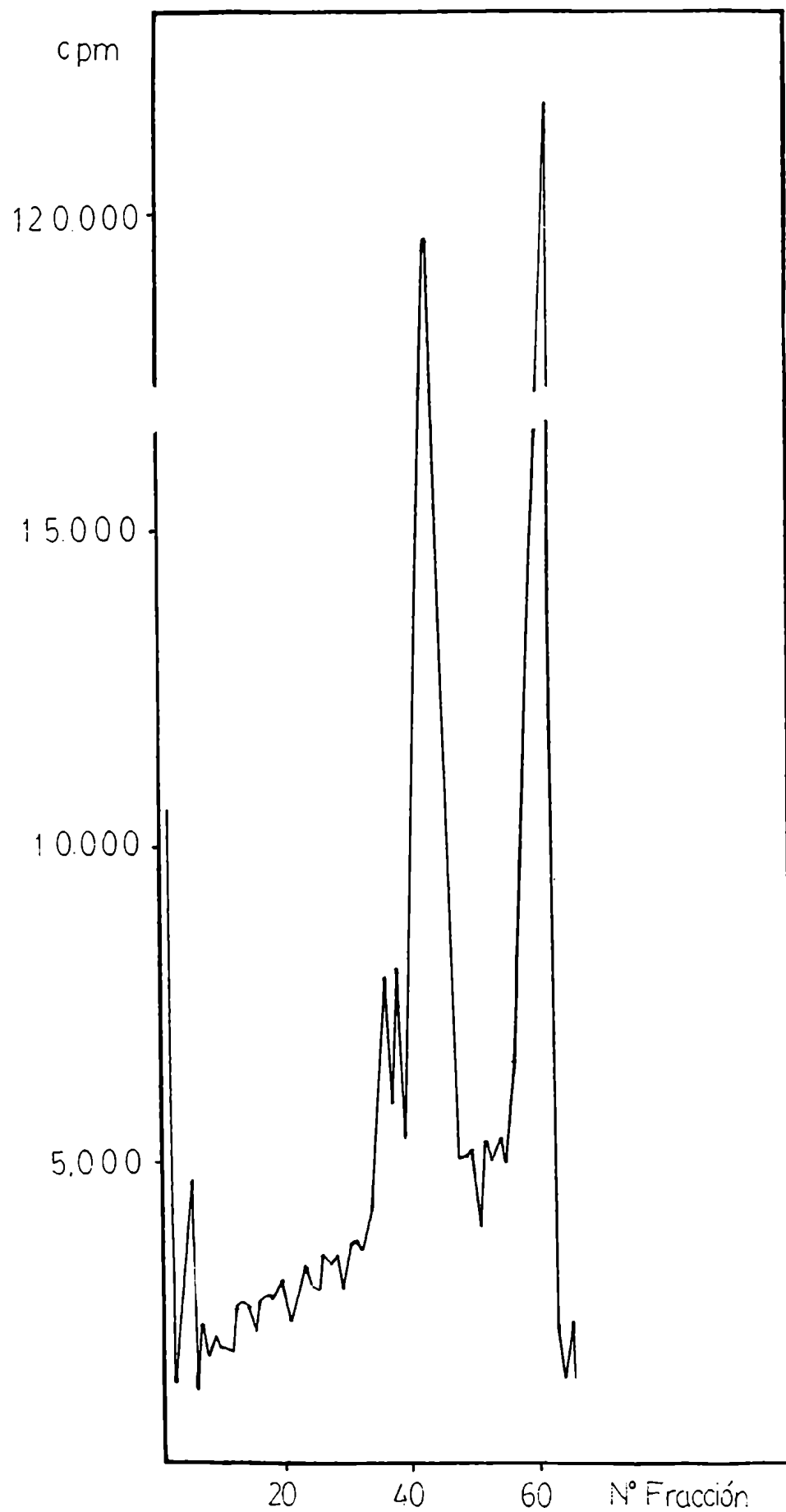


Gráfico 14

una mayor heterogeneidad que en las tinciones, este podría deberse a la mayor sensibilidad del método radioactivo respecto al de coloración.

CARACTERIZACION DE ANTISUEROS.

Concentración proteica.

En el Cuadro 10 se expresan las concentraciones proteicas de los sueros obtenidos en distintas sangrías de los conejos inmunizados con diferentes antígenos.

CONEJO	ANTIGENO	SANGRIA	CONCENTRACION PROTEICA EN mg %
Nº 1	Extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.	1º	18.000
		2º	40.000
		3º	95.000
Nº 2	Extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.	1º	15.000
		2º	16.000
Nº 3	Extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.	1º	12.800
		2º	12.200
		3º	14.200
		4º	12.200
		5º	16.500.

CONEJO	ANTIGENO	SANGRIA	CONCENTRACION PROTEICA EN mg %
Nº 4	Extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.	1º	13.000
		2º	12.200
		3º	11.600
		4º	19.400
		5º	4.100
Nº 5	Extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.	1º	19.400
		2º	21.600
		3º	15.200
		4º	21.200
		5º	15.800
Nº 6	Antígeno carcino- embriónico puro.	Previa	6.200
		1º	17.200
		2º	12.200
		3º	27.000
Nº 7	Antígeno carcino- embriónico puro.	Previa	8.800
		1º	15.200
		2º	23.500

Cuadro 10: Concentración proteica de antisueros.

El conejo Nº 4 pocos días después de la última sangría a que fue sometido murió por causas no determinadas, que podrían ser las responsables de la muy baja concentración de proteínas en su suero.

Titulación semicuantitativa de IgM e IgG.

Se determinó por inmunodifusión el título semicuantitativo de IgM e IgG de todos los antisueros obtenidos. Previamente se estableció cual era la dilución de trabajo óptima de los antisueros anti IgM y anti IgG enfrentándolos a suero normal de conejo sin diluir. El suero anti IgM se debió utilizar sin diluir y el suero anti IgG diluido al medio. El diluyente usado fue solución fisiológica.

Los títulos obtenidos están expresados en el Cuadro 11.

CONEJO	ANTIGENO	SANGRIA	TITULO IgM ⁺	TITULO IgG ⁺
Nº 1	Extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.	1º	2	1024
		2º	8	2048
		3º	4	2048
Nº 2	Extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.	1º	2	1024
		2º	4	1024
Nº 3	Extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral	Previa	1	128
		1º	4	256
		2º	2	512
		3º	2	1024
		4º	1	512
		5º	1	2048
Nº 4	Extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral	Previa	2	512
		1º	8	2048
		2º	4	4000
		3º	4	2048
		4º	4	1024
		5º	-	2048

CONEJO	ANTIGENO	SANGRIA	TITULO IgM ⁺	TITULO IgG ⁺
Nº 5	Extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral	Previa	2	256
		1º	8	1024
		2º	2	2048
		3º	2	1024
		4º	1	2048
		5º	4	2048
Nº 6	Antígeno carcino- embriónico puro.	Previa	2	512
		1º	2	1024
		2º	2	512
		3º	4	2048
Nº 7	Antígeno carcino- embriónico puro.	Previa	2	2048
		1º	4	2048

Cuadro 11: Titulación semicuantitativa de IgM e IgG.

+ El título es la inversa de la última dilución que dió banda de precipitación.

Se comprobó, en general, que en los primeros estadíos hubo un aumento de IgM que luego disminuyó, en cambio el título de IgG fue oscilante, aumentando al principio, luego disminuyendo y volviendo a aumentar a lo largo del período de inmunización.

También se realizaron reacciones de inmunolectroforesis de los antisueros correspondientes a los conejos Nº 3, 4 y 5, enfrentándolos a anti IgM y anti IgG. No se obtuvieron bandas de precipitación frente a anti IgM debido, quizás, a la baja concentración de esa inmunoglobulina en los antisueros anali-

FIGURA 5.

Inmunoelectroforesis de antisueros de conejo anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral enfrentados a antisuero de cabra anti IgG de conejo.

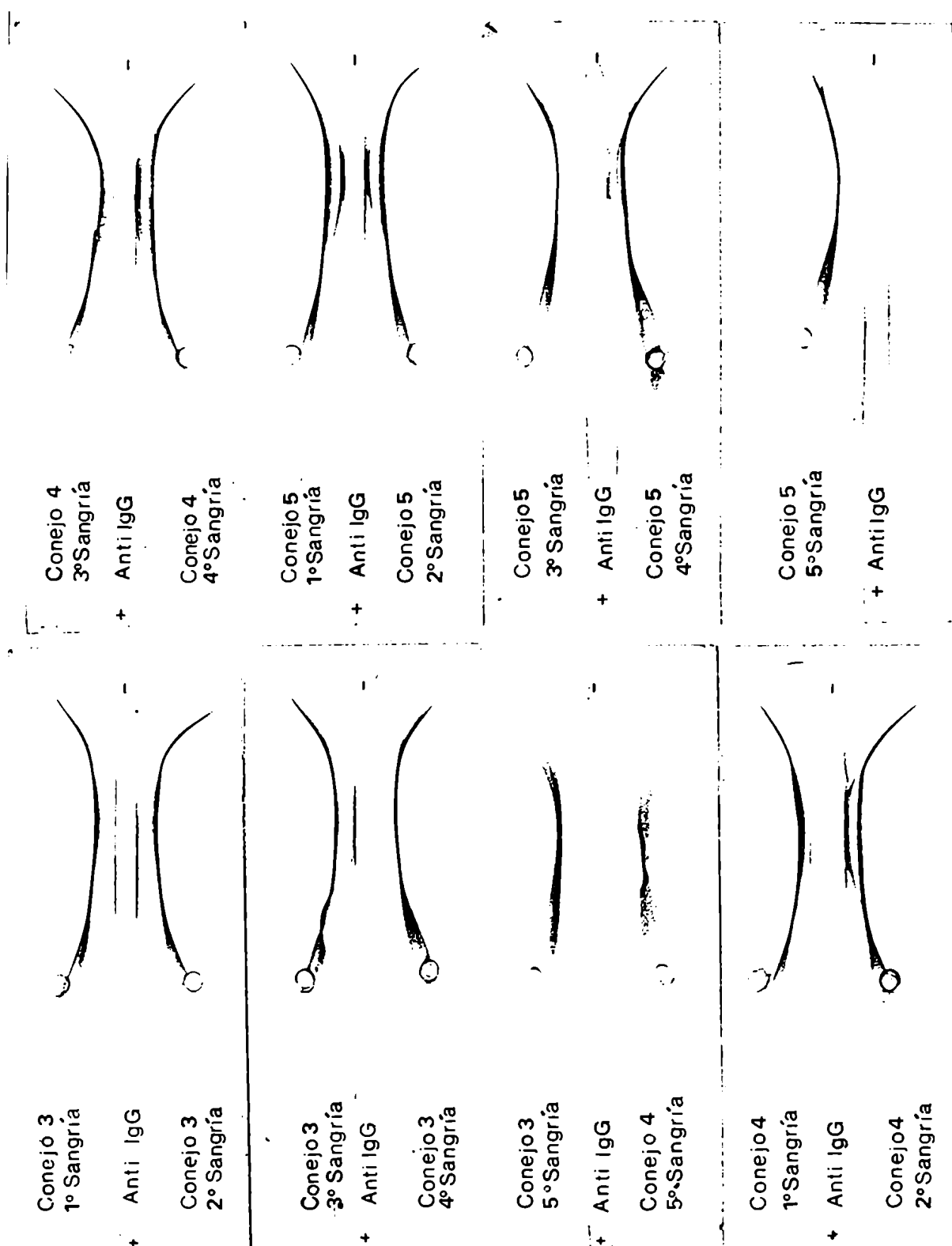


Figura 5

zados. Las bandas de precipitación IgG-anti IgG se ven en la Figura 5.

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Las Figuras 6 a 12 muestran los resultados obtenidos al efectuar electroforesis en gel de poliacrilamida de los diferentes antisueros estudiados y las Figuras 13 a 15 corresponden a las espectrodensitografías a 590 nm de algunos de esos geles.

Se puede comprobar que en los antisueros correspondientes a los animales inyectados con extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral (Figuras 8, 9, 10, 13, 14 y 15) hubo aumento de proteínas en la zona de $\delta 1$ con gran dispersión y un notable incremento de $\alpha 2$ que alcanzó su pico máximo en la tercera sangría y luego disminuyó; este aumento de $\alpha 2$ no se produjo con los antisueros de los conejos inmunizados con extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal (Figuras 6 y 7).

Al analizar los geles de los antisueros de los animales inmunizados con antígeno carcinoembriónico puro (Figuras 11 y 12) el incremento de $\alpha 2$ fue menos importante debido, quizás, a la menor cantidad de proteínas inyectadas y el menor tiempo de inmunización.

FIGURAS 6 A 12.

Electroforesis en gel de poliacrilamida de diferentes antisueros.
Tinción con azul de Coomasie.

Figura 6: Antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas
de colon normal (conejo N° 1).

Figura 7: Antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas
de colon normal (conejo N° 2).

Figura 8: Antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas
de colon tumoral (conejo N° 3).

Figura 9: Antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas
de colon tumoral (conejo N° 4).

Figura 10: Antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas
de colon tumoral (conejo N° 5).

Figura 11: Antisuero anti antígeno carcinoembriónico puro (cone-
jo N° 6).

Figura 12: Antisuero anti antígeno carcinoembriónico puro (cone-
jo N° 7).

CONEJO 1

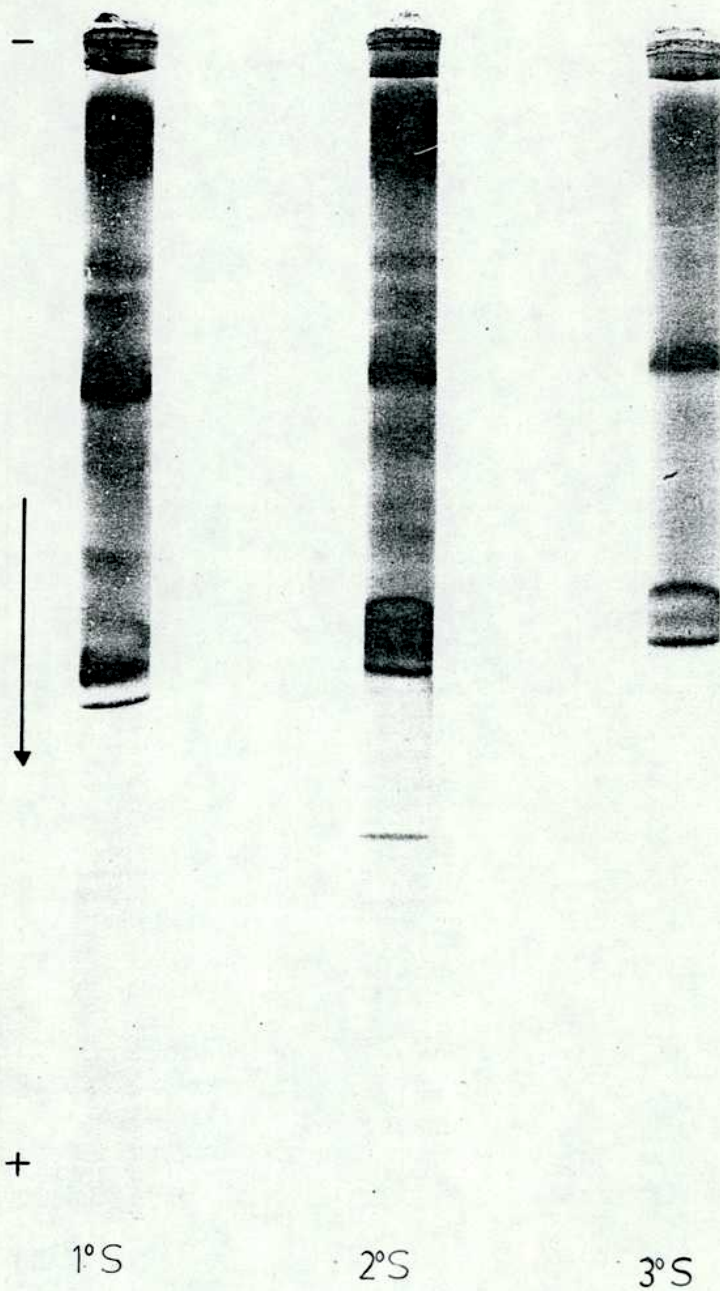
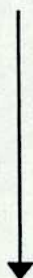


Figura 6

CONEJO 2

—



+

1° S

2° S

Figura 7

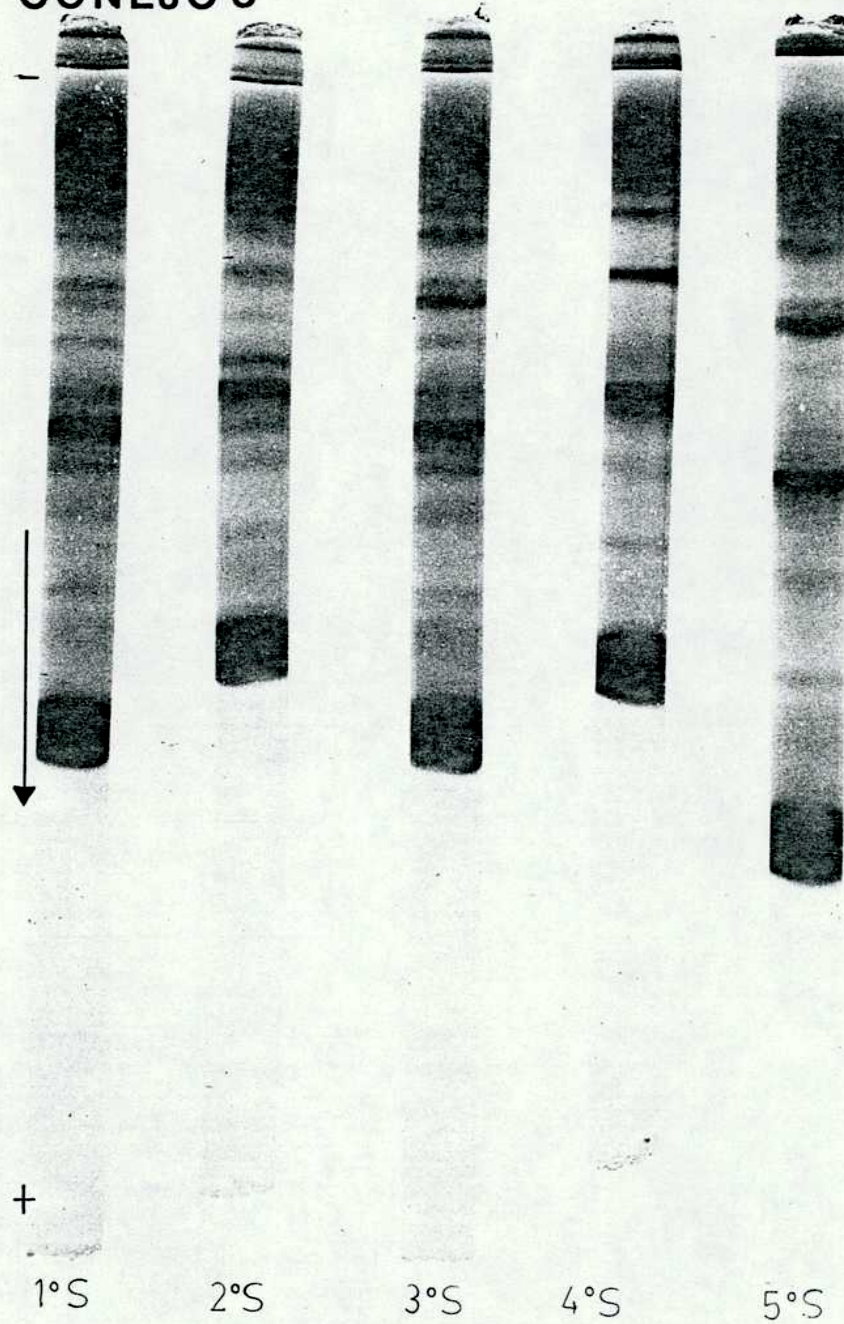
CONEJO 3

Figura 8



Figura 9

CONEJO 5

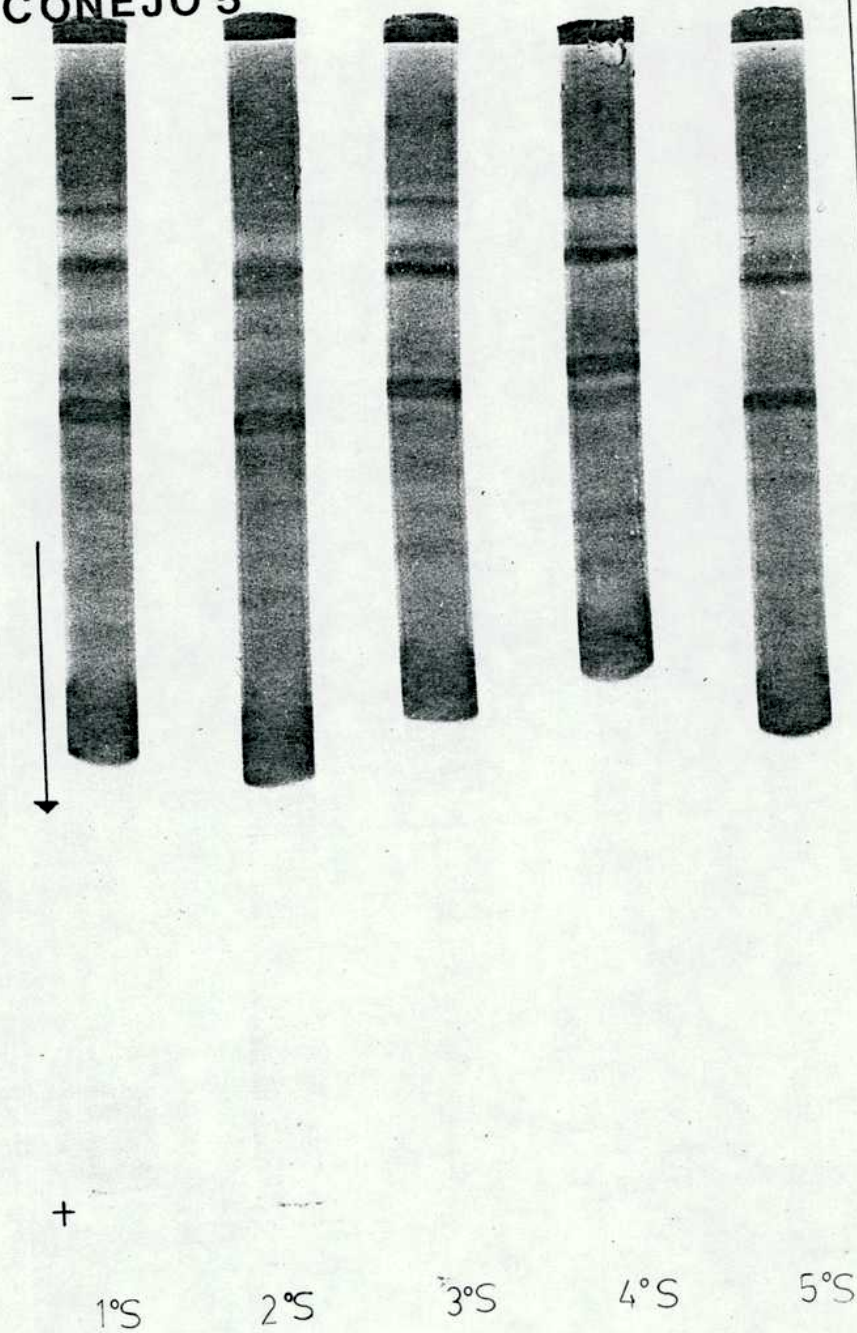


Figura 10

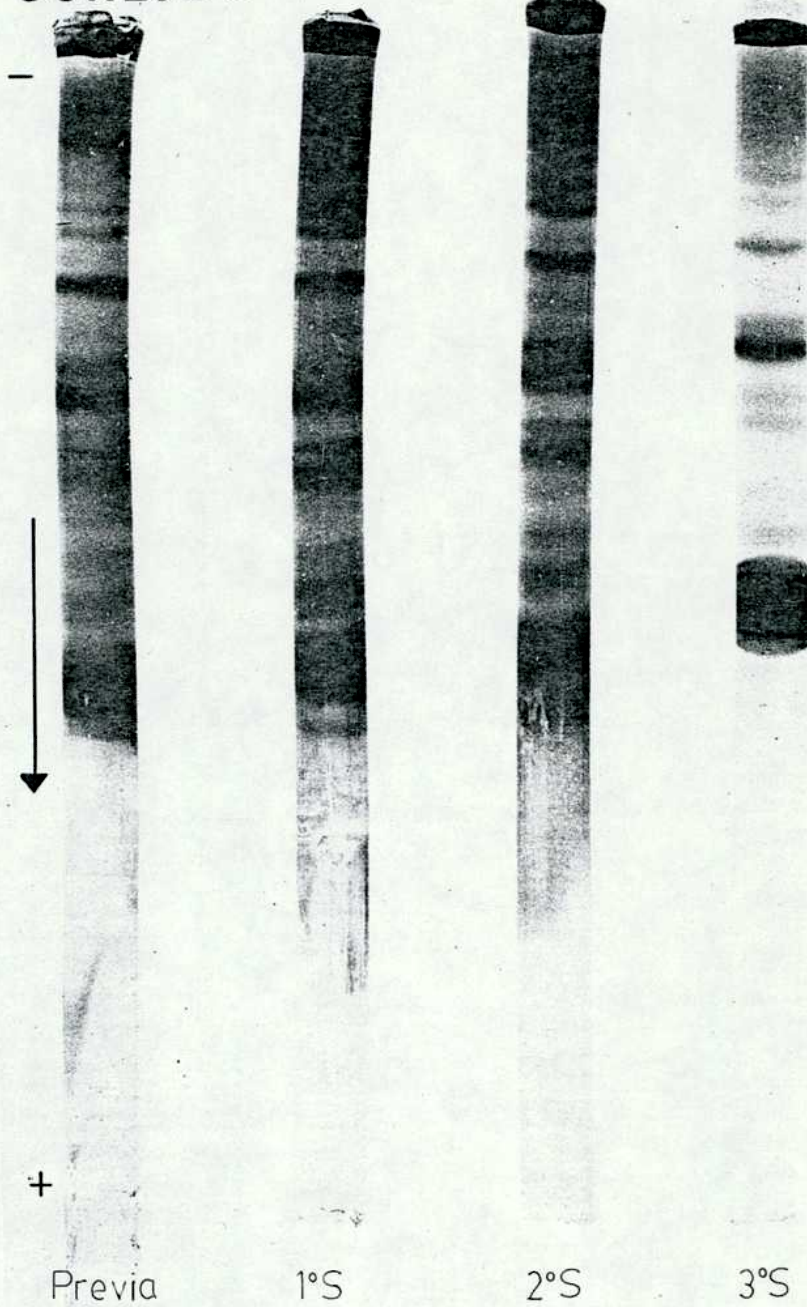
CONEJO 6

Figura 11

CONEJO 7

-



+

Previa

1° S

Figura 12

FIGURAS 13 A 15.

Espectrodensitografías a 590 nm de geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomasie correspondientes a diferentes antisueros.

Figura 13: Antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral (conejo N° 3).

Figura 14: Antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral (conejo N° 4).

Figura 15: Antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral (conejo N° 5).

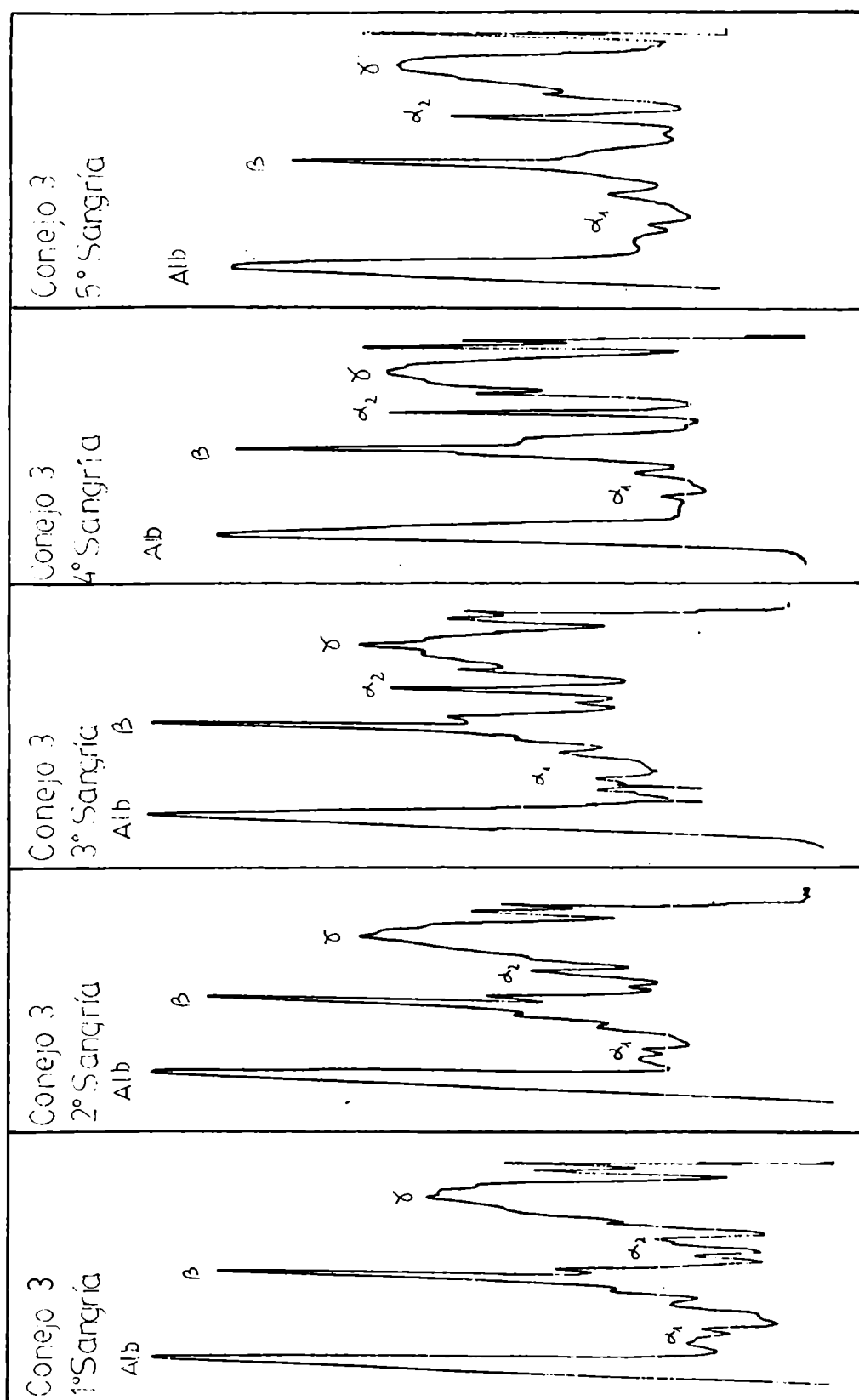


Figura 13

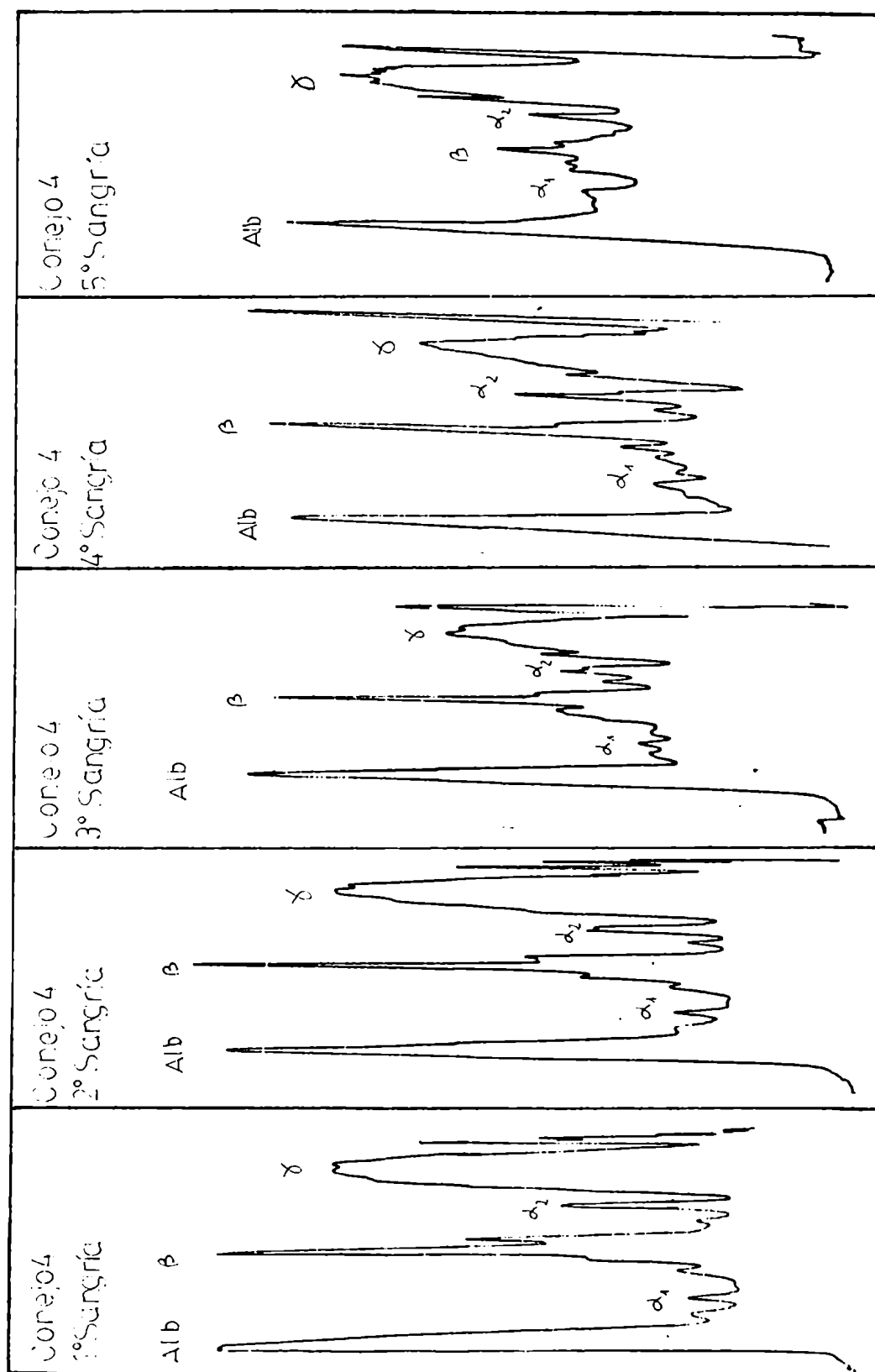


Figura 14

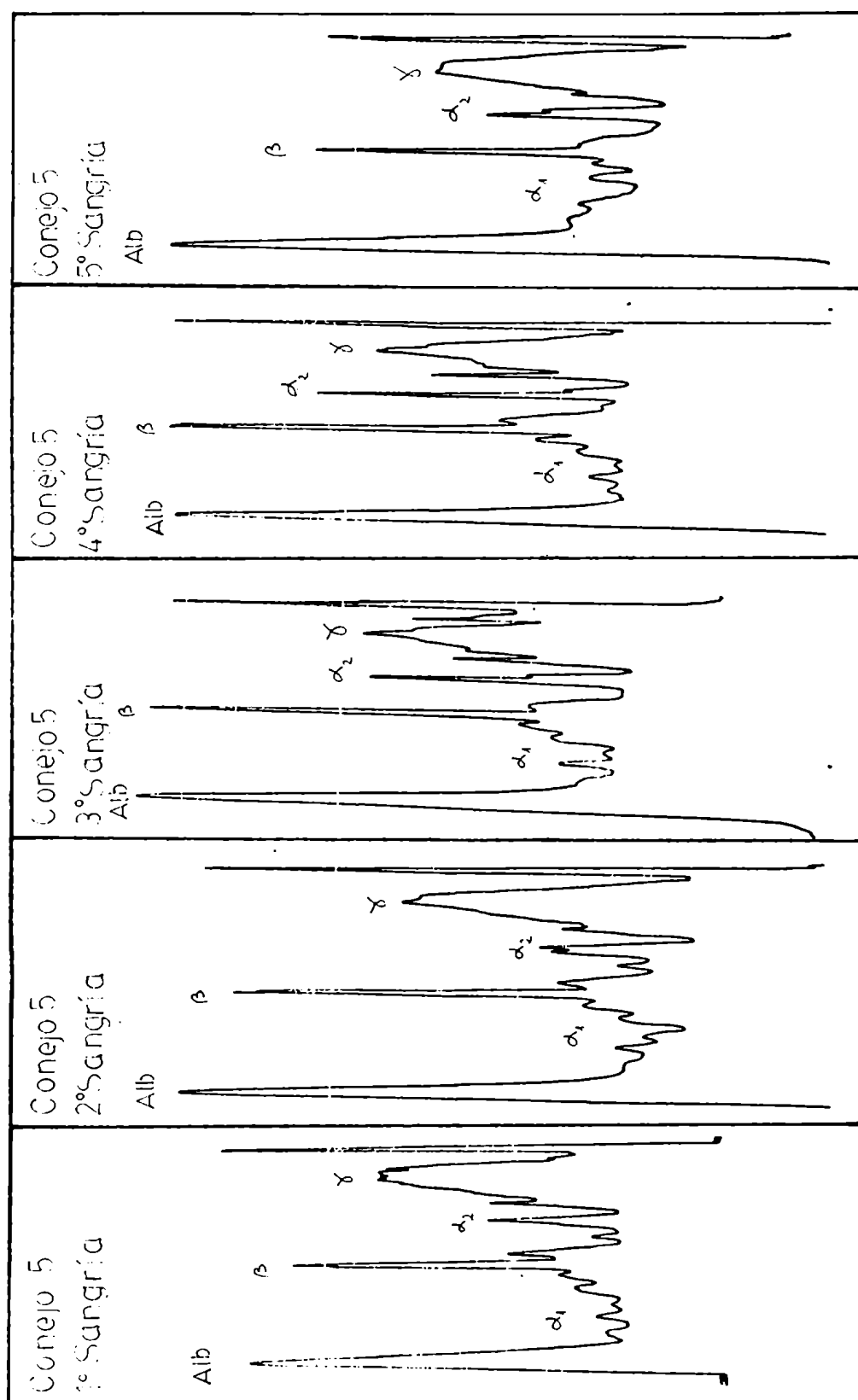


Figura 15

INMUNODIFUSION.

Se determinó por reacción de Outcherlony el título de los diferentes antisueros frente a los distintos antígenos. Se consideró como título la inversa de la última dilución de antisuero que dió banda de precipitación.

Sueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

En la Figura 16 se pueden observar los resultados obtenidos al enfrentar los sueros de diferentes sangrías del conejo N° 1 a extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal, fracción de pH 4,4-4,8 de electroenfoque de ese extracto, extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral y fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de dicho extracto. Se comprueba que el antisuero correspondiente a la tercera sangría produce dos bandas al enfrentarlo al último antígeno nombrado.

En la Figura 17 se esquematizan los resultados obtenidos con los antisueros correspondientes al conejo N° 2.

No se obtuvieron bandas de precipitación con ningún suero al enfrentarlos al antígeno carcinoembriónico puro, debido,

quizás a la baja concentración del antígeno.

Los títulos obtenidos son los siguientes (Cuadro 12).

Antígeno Antisuero	A ^o	B ^{oo}	C ^{ooo}	D ^{oooo}
Conejo 1 1° sangría	4	4	1	2
Conejo 1 2° sangría	4	4	4	4
Conejo 1 3° sangría	4	4	2	2
Conejo 2 1° sangría	8	1	4	2
Conejo 2 2° sangría	8	2	8	4

Cuadro 12: Títulos anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal, anti fracción de pH 4,4-4,8 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal, anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral y anti fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral de sueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

^oA: extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

^{oo}B: fracción de pH 4,4-4,8 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

^{ooo}C: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

^{oooo}D: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

FIGURA 16.

Inmunodifusión de antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal (conejo N° 1) frente a diversos antígenos.

Celdas superiores: Antisuero diluido: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8.

Celdas inferiores: Antisuero diluido: 1/16, 1/32, 1/64, 1/128.

Esquemas 1-2-3-4: Antisuero correspondiente a 1° sangría.

Esquemas 5-6-7-8: Antisuero correspondiente a 2° sangría.

Esquemas 9-10-11-12: Antisuero correspondiente a 3° sangría.

Celdas centrales: Antígeno.

Esquemas 1-5-9: Antígeno: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

Esquemas 2-6-10: Antígeno: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de glicoproteínas de colon tumoral.

Esquemas 3-7-11: Antígeno: extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

Esquemas 4-8-12: Antígeno: fracción de pH 4,4-4,8 de electroenfoque de glicoproteínas de colon normal.

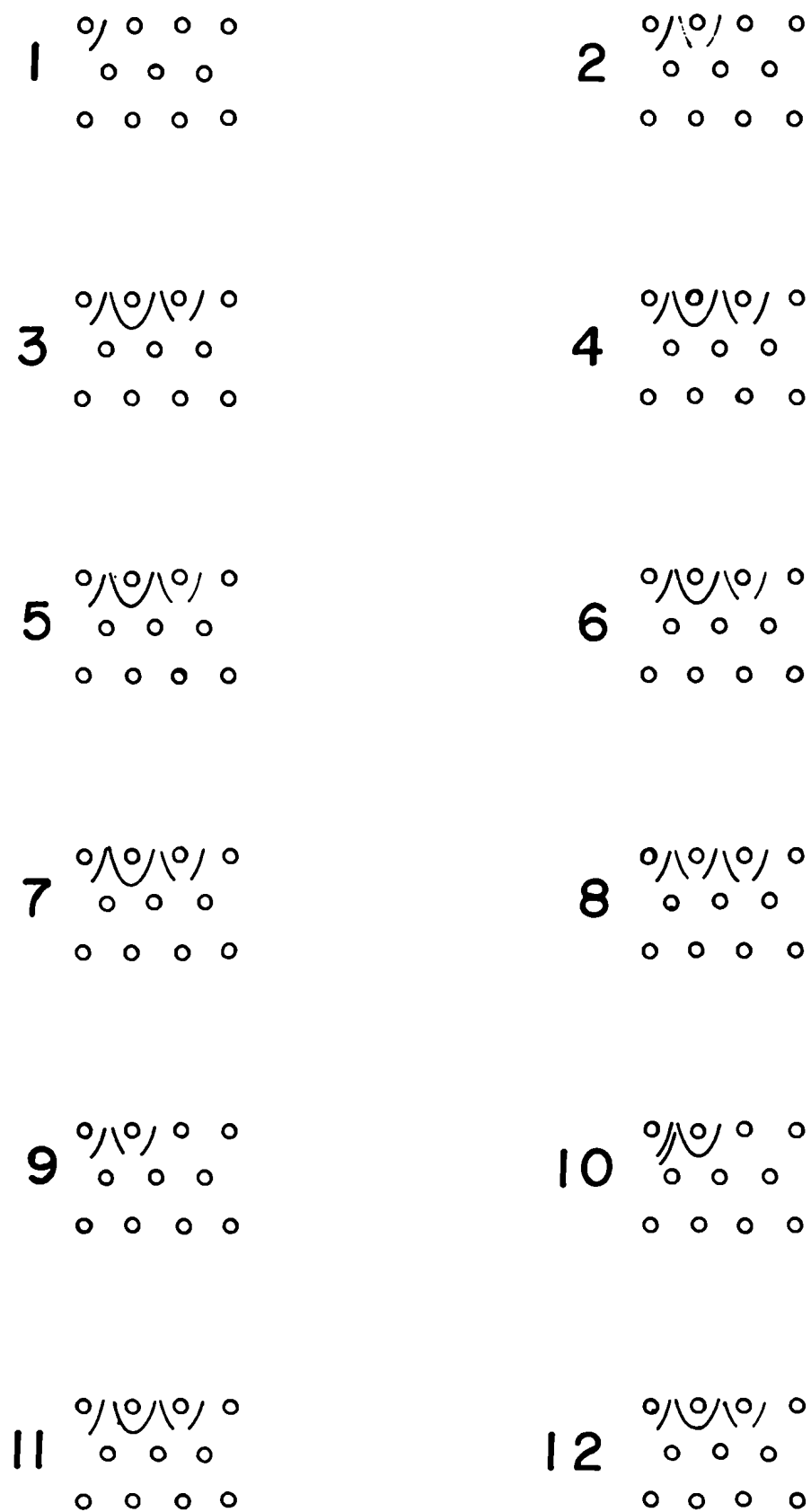


Figura 16

FIGURA 17.

Inmunodifusión de antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal (conejo N° 2) frente a diversos antígenos.

Celdas superiores: Antisuero diluído: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8.

Celdas inferiores: Antisuero diluído: 1/16, 1/32, 1/64, 1/128.

Esquemas 1-2-3-4: Antisuero correspondiente a 1° sangría.

Esquemas 5-6-7-8: Antisuero correspondiente a 2° sangría.

Celdas centrales: Antígeno.

Esquemas 1-5: Antígeno: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

Esquemas 2-6: Antígeno: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de glicoproteínas de colon tumoral.

Esquemas 3-7: Antígeno: extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

Esquemas 4-8: Antígeno: fracción de pH 4,4-4,8 de electroenfoque de glicoproteínas de colon normal.

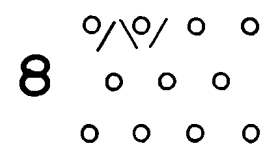
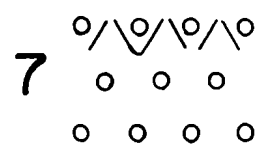
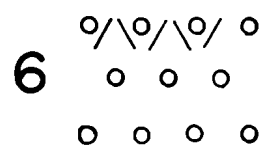
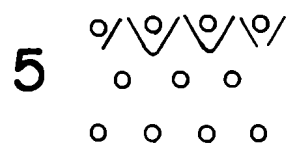
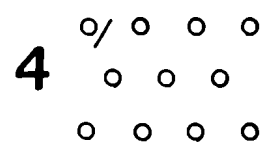
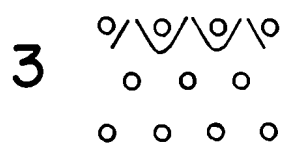
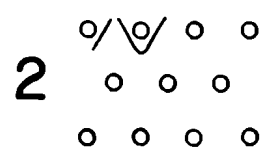
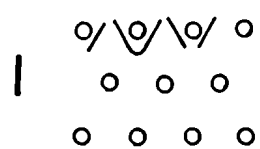


Figura 17

Sueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

En las Figuras 18, 19 y 20 se esquematizan los resultados obtenidos al enfrentar los antisueros de los conejos 3, 4 y 5 respectivamente a extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral y fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de ese extracto. Se puede ver que se obtienen bandas dobles de precipitación en varios casos, tanto para uno como para otro antígeno, lo cual indicaría una población antigénica heterogénea. En ningún caso se obtuvieron bandas de precipitación con el antígeno carcinoembrionario puro por baja concentración del mismo.

Los títulos obtenidos están especificados en el Cuadro 13.

Antígeno Antisuero	C ^o	D ^{oo}
Conejo 3 1° sangría	2	2
Conejo 3 2° sangría	2	4
Conejo 3 3° sangría	1	2
Conejo 3 4° sangría	nr	nr
Conejo 3 5° sangría	4	8
Conejo 4 1° sangría	2	1
Conejo 4 2° sangría	2	8
Conejo 4 3° sangría	8	16
Conejo 4 4° sangría	16	16
Conejo 4 5° sangría	1	1
Conejo 5 1° sangría	8	16
Conejo 5 2° sangría	8	16
Conejo 5 3° sangría	2	8
Conejo 5 4° sangría	4	8
Conejo 5 5° sangría	8	16

Cuadro 13: Títulos anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral y anti fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfocue de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral de sueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

^oC: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

^{oo}D: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfocue de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

nr: no realizado.

FIGURA 18.

Inmunodifusión de antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral (conejo N° 3) frente a diversos antígenos.

Celdas superiores: Antisuero diluido: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32.

Celdas inferiores: Antisuero diluido: 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048.

Esquemas 1-2: Antisuero correspondiente a 1° sangría.

Esquemas 3-4: Antisuero correspondiente a 2° sangría.

Esquemas 5-6: Antisuero correspondiente a 3° sangría.

Esquemas 7-8: Antisuero correspondiente a 5° sangría.

Celdas centrales: Antígeno.

Esquemas 1-3-5-7: Antígeno: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

Esquemas 2-4-6-8: Antígeno: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

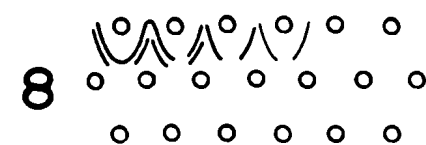
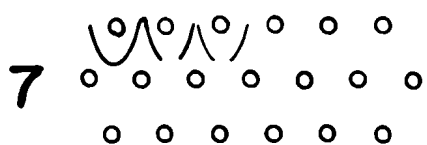
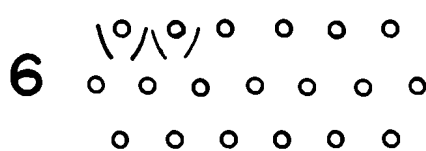
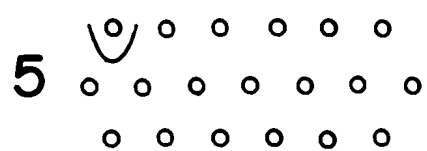
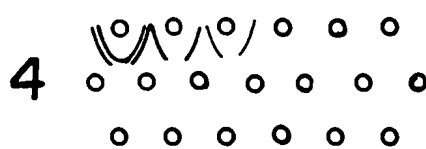
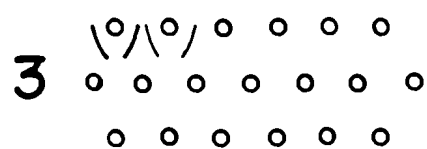
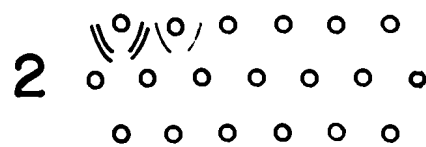
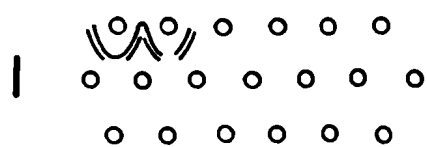


Figura 18

FIGURA 19.

Inmunodifusión de antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral (conejo N° 4) frente a diversos antígenos.

Celdas superiores: Antisuero diluído: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32.

Celdas inferiores: Antisuero diluído: 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048.

Esquemas 1-2: Antisuero correspondiente a 1° sangría.

Esquemas 3-4: Antisuero correspondiente a 2° sangría.

Esquemas 5-6: Antisuero correspondiente a 3° sangría.

Esquemas 7-8: Antisuero correspondiente a 4° sangría.

Esquemas 9-10: Antisuero correspondiente a 5° sangría.

Celdas centrales: Antígeno.

Esquemas 1-3-5-7-9: Antígeno: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

Esquemas 2-4-6-8-10: Antígeno: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

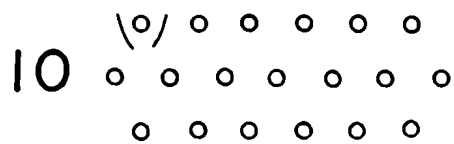
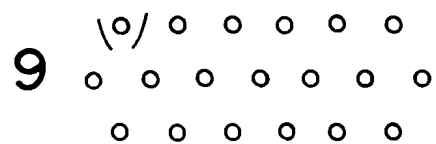
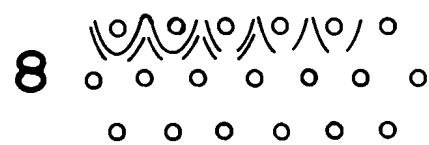
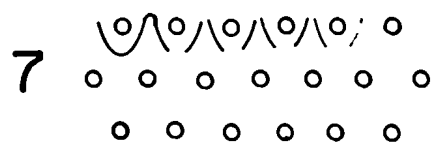
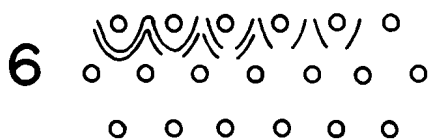
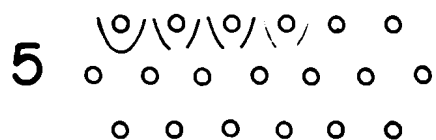
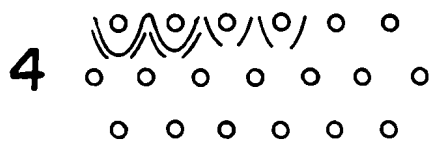
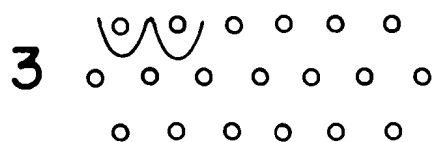
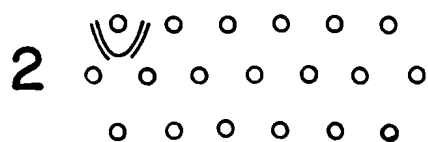
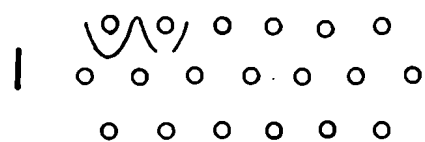


Figura 19

FIGURA 20.

Inmunodifusión de antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral (conejo N° 5) frente a diversos antígenos.

Celdas superiores: Antisuero diluído: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32.

Celdas inferiores: Antisuero diluído 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048.

Esquemas 1-2: Antisuero correspondiente a 1° sangría.

Esquemas 3-4: Antisuero correspondiente a 2° sangría.

Esquemas 5-6: Antisuero correspondiente a 3° sangría.

Esquemas 7-8: Antisuero correspondiente a 4° sangría.

Esquemas 9-10: Antisuero correspondiente a 5° sangría.

Celdas centrales: Antígeno.

Esquemas 1-3-5-7-9: Antígeno: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

Esquemas 2-4-6-8-10: Antígeno: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

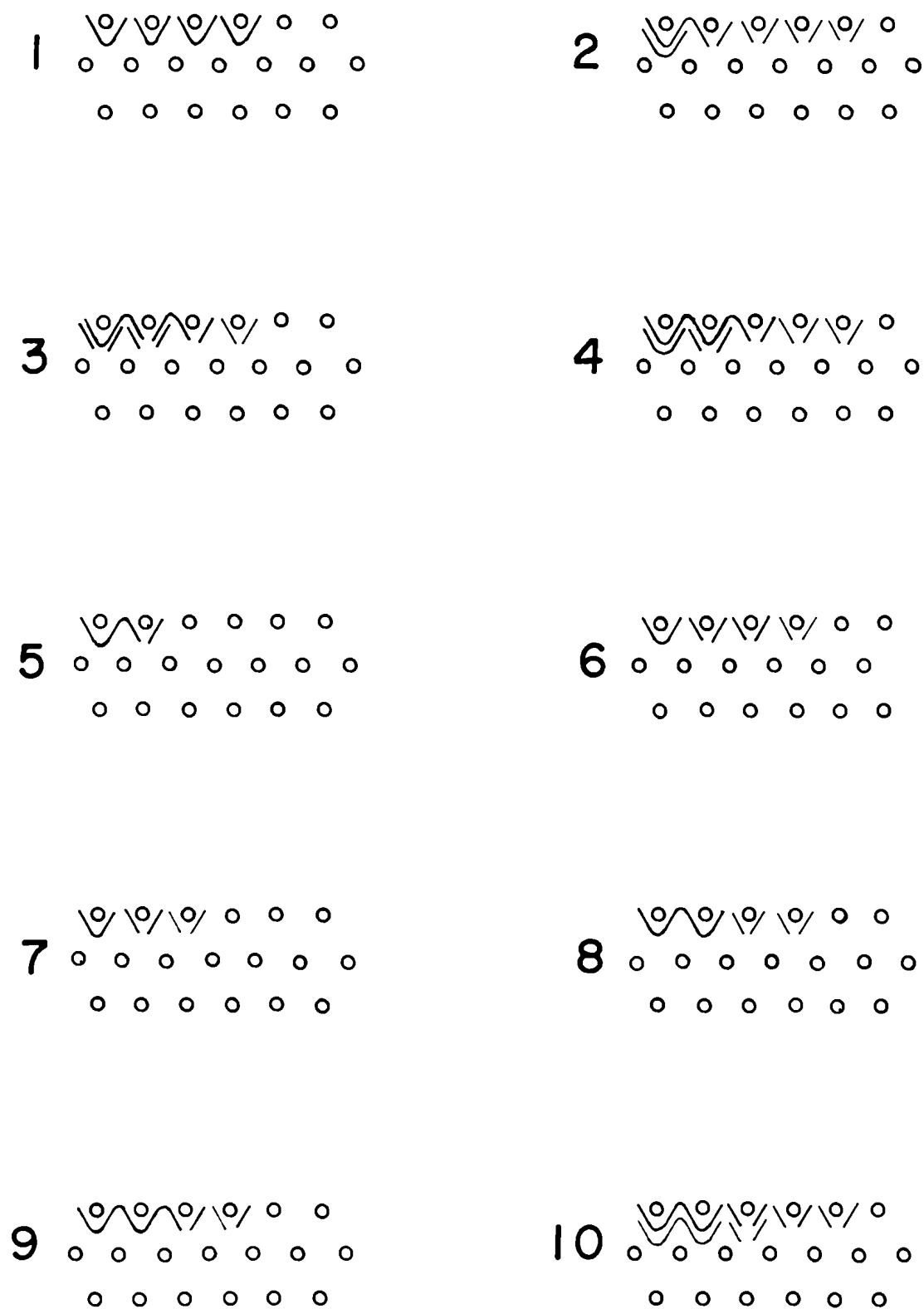


Figura 20

En general los títulos alcanzados son mayores para el antígeno obtenido por electroenfoque que para el extracto de glicoproteínas.

Sueros anti antígeno carcinoembrionario.

Estos sueros no dieron bandas de precipitación frente a ningún antígeno; este hecho puede deberse a que no tendrían anticuerpos a los principales determinantes presentes en el extracto perclórico o en la fracción de electroenfoque, y si bien habría anticuerpos anti antígeno carcinoembrionario la concentración no estaría de acuerdo con la sensibilidad del método.

INMUNOELECTROFORESIS.

En la Figura 21 están esquematizados los resultados obtenidos al correr electroforéticamente el extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral y enfrentarlo a los antisueros homólogos y a anti suero humano normal. En todos los casos se detectaron bandas de movilidad β frente a los anti sueros homólogos que no fueron reveladas por el anti suero humano normal. Esas bandas serían debidas a la precipitación del antígeno

carcinoembrionario, de movilidad β , con los correspondientes anticuerpos presentes en esos sueros.

También se efectuaron corridas de dicho antígeno enfren-tándolo a antisuero anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal y antisuero anti grupo sanguíneo A (Figura 22); sólo se detectó banda de movilidad β frente al antisuero correspondiente a la primera sangría del conejo 1 (Esquema A). No se revelaron bandas al enfrentar el antígeno al antisuero correspondiente a la tercera sangría de dicho conejo y al anti-suero anti grupo sanguíneo A (Esquema C).

Del mismo modo se efectuó esta reacción con la fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral frente a los antisueros a ese extracto (Figura 23) y también se obtuvieron, en general, bandas de movilidad β , que no se revelaron frente a antisueros humano normal (Esquema 8, Figura 23) ni a antisueros anti extracto perclórico de glicoproteína de colon normal ni a antisuero anti grupo sanguíneo A (Figura 24).

Se realizaron corridas de las fracciones de pH 3,80-4,20: 4,30-4,50 y 5,00-5,40 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral frente a antisueros a dicho extracto que habían revelado bandas de movilidad β en las in-

FIGURA 21.

Inmunoelectroforesis de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral enfrentado a diferentes antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral y anti suero humano normal.

Esquema 1: Canal superior: antisuero conejo 3 1º sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 3 2º sangría.

Esquema 2: Canal superior: antisuero conejo 3 3º sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 3 4º sangría.

Esquema 3: Canal superior: antisuero conejo 3 5º sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 4 5º sangría.

Esquema 4: Canal superior: antisuero conejo 4 1º sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 4 2º sangría.

Esquema 5: Canal superior: antisuero conejo 4 3º sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 4 4º sangría.

Esquema 6: Canal superior: antisuero conejo 5 1º sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 5 2º sangría.

Esquema 7: Canal superior: antisuero conejo 5 3º sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 5 4º sangría.

Esquema 8: Canal superior: antisuero conejo 5 5º sangría.

Canal inferior: antisuero humano normal.

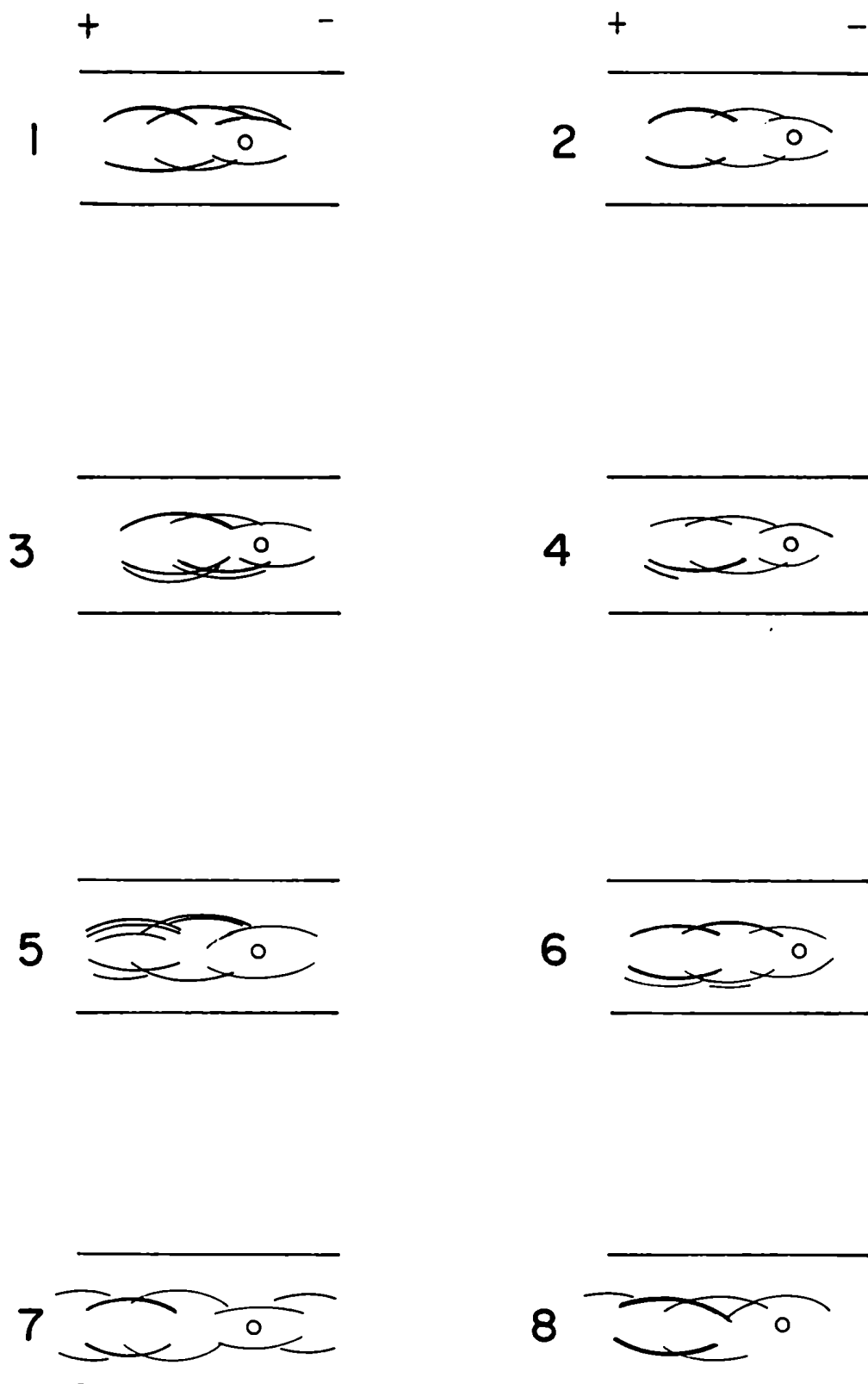


Figura 21

FIGURA 22.

Inmunoelectroforesis de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral enfrentado a diferentes antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal y anti grupo sanguíneo A.

Esquema A: Canal superior: antisuero conejo 1 1º sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 1 2º sangría.

Esquema B: Canal superior: antisuero conejo 2 1º sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 2 2º sangría.

Esquema C: Canal superior: antisuero conejo 1 3º sangría.

Canal inferior: antisuero anti grupo sanguíneo A.

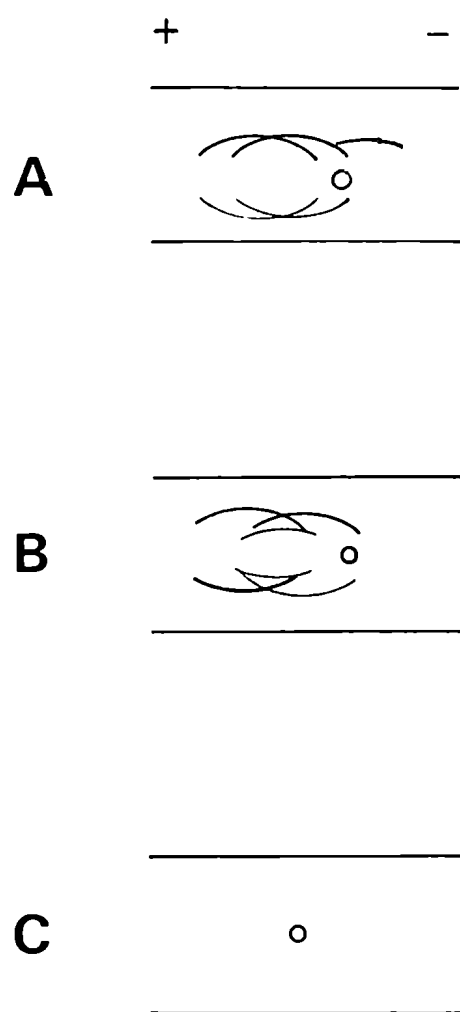


Figura 22

FIGURA 23.

Inmunoelectroforesis de fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral enfrentado a diferentes antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral y anti suero humano normal.

Esquema 1: Canal superior: antisuero conejo 3 1° sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 3 2° sangría.

Esquema 2: Canal superior: antisuero conejo 3 3° sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 3 4° sangría.

Esquema 3: Canal superior: antisuero conejo 3 5° sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 4 5° sangría.

Esquema 4: Canal superior: antisuero conejo 4 1° sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 4 2° sangría.

Esquema 5: Canal superior: antisuero conejo 4 3° sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 4 4° sangría.

Esquema 6: Canal superior: antisuero conejo 5 1° sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 5 2° sangría.

Esquema 7: Canal superior: antisuero conejo 5 3° sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 5 4° sangría.

Esquema 8: Canal superior: antisuero conejo 5 5° sangría.

Canal inferior: antisuero humano normal.

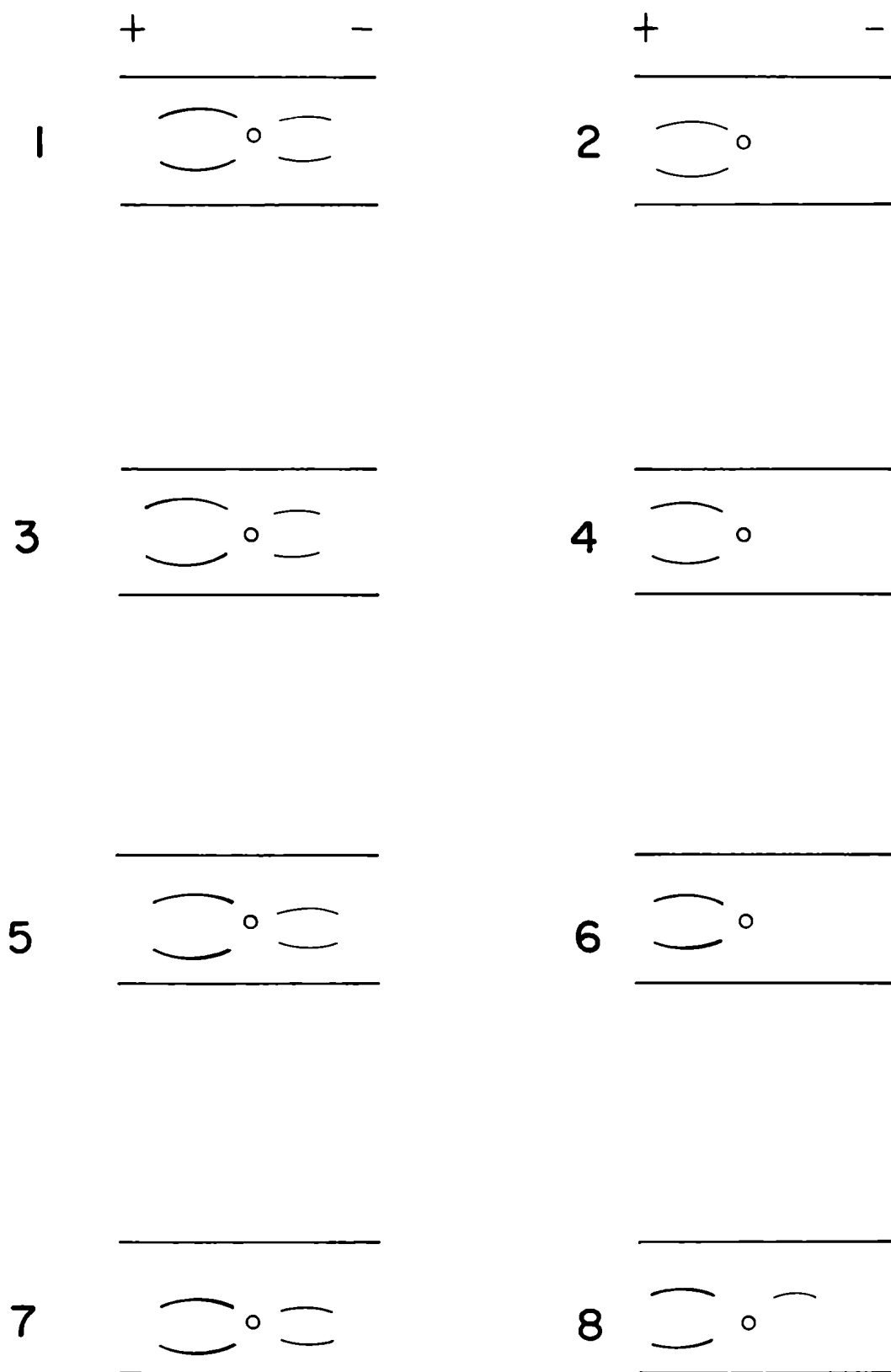


Figura 23

FIGURA 24.

Inmunoelectroforesis de fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral enfrentado a diferentes antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal y anti grupo sanguíneo A.

Esquema D: Canal superior: antisuero conejo 1 1° sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 1 2° sangría.

Esquema E: Canal superior: antisuero conejo 2 1° sangría.

Canal inferior: antisuero conejo 2 2° sangría.

Esquema F: Canal superior: antisuero anti grupo sanguíneo A.

Canal inferior: antisuero conejo 1 3° sangría.

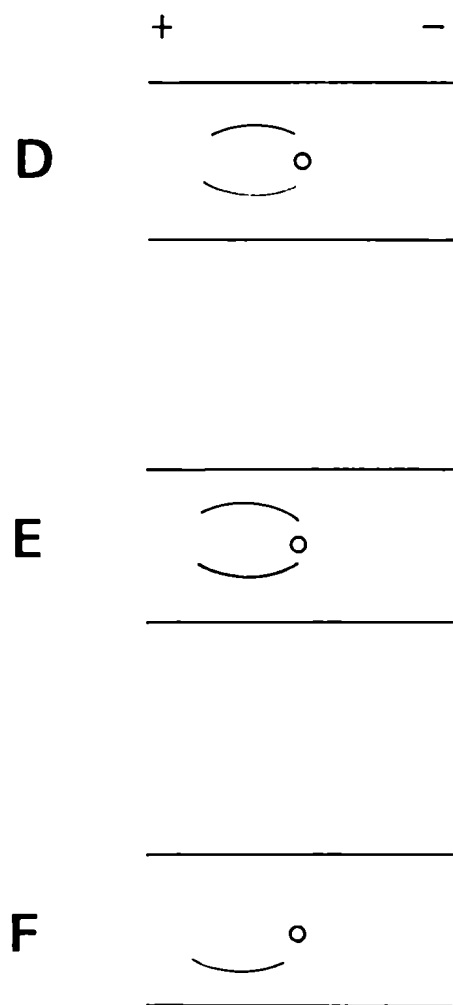


Figura 24

FIGURA 25.

Inmunoelectroforesis de distintas fracciones de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral enfrentadas a antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral y antisuero humano normal

Esquema U: Antígeno: fracción de pH 3,80 - 4,20.

Antisueros: Canal superior: conejo 3 4° sangría.

Canal inferior: conejo 5 3° sangría.

Esquema V: Antígeno: fracción de pH 3,80 - 4,20.

Antisueros: Canal superior: conejo 4 3° sangría.

Canal inferior: antisuero humano normal.

Esquema W: Antígeno: fracción de pH 4,30 - 4,50.

Antisueros: Canal superior: conejo 3 4° sangría.

Canal inferior: conejo 5 3° sangría.

Esquema X: Antígeno: fracción de pH 4,30 - 4,50.

Antisueros: Canal superior: conejo 4 3° sangría.

Canal inferior: antisuero humano normal.

Esquema Y: Antígeno: fracción de pH 5,00 - 5,40.

Antisueros: Canal superior: conejo 3 4° sangría.

Canal inferior: conejo 5 3° sangría.

Esquema Z: Antígeno: fracción de pH 5,00 - 5,40.

Antisueros: Canal superior: conejo 4 3° sangría.

Canal inferior: antisuero humano normal.

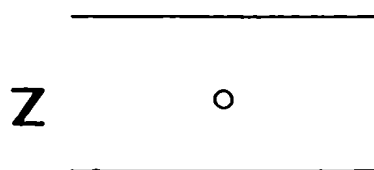
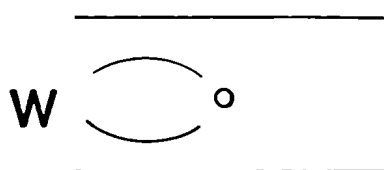
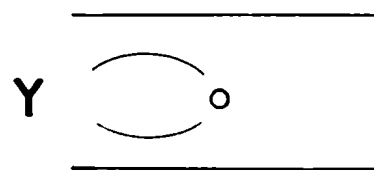
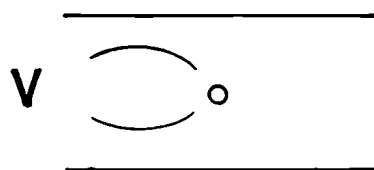
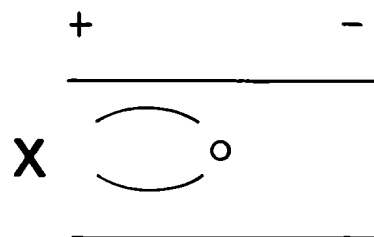
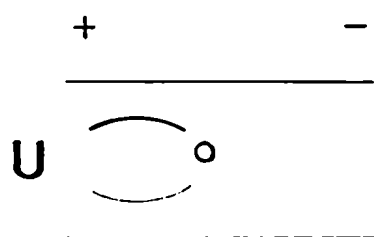


Figura 25

munoelectroforesis de la fracción de pH 4,60-4,95 y a antisuero humano normal (Figura 25); en ningún caso se obtuvo banda de movilidad β , confirmando este hecho que el antígeno carcino-embriónico se encontraría en la fracción de pH 4,60-4,95.

RADIOINMUNOENSAYO.

Titulación de antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

Se titularon estos antisueros tal como se describió en Materiales y Métodos, frente a los distintos antígenos obtenidos. Las curvas de unión resultantes se pueden ver en los Gráficos 15 a 19.

Los títulos se calcularon como la inversa de la dilución que produjo un 30% de unión antígeno - anticuerpo, y fueron los siguientes (Cuadro 14):

GRAFICOS 15 A 19.

Curvas de unión de distintos antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal con diferentes antígenos.

Gráfico 15: Antisuero conejo 1 1º sangría.

Gráfico 16: Antisuero conejo 1 2º sangría.

Gráfico 17: Antisuero conejo 1 3º sangría.

Gráfico 18: Antisuero conejo 2 1º sangría.

Gráfico 19: Antisuero conejo 2 2º sangría.

----- A: extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

----- B: fracción de pH 4,4-4,8 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.

----- C: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

----- D: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

..... E: antígeno carcinoembrionario puro.

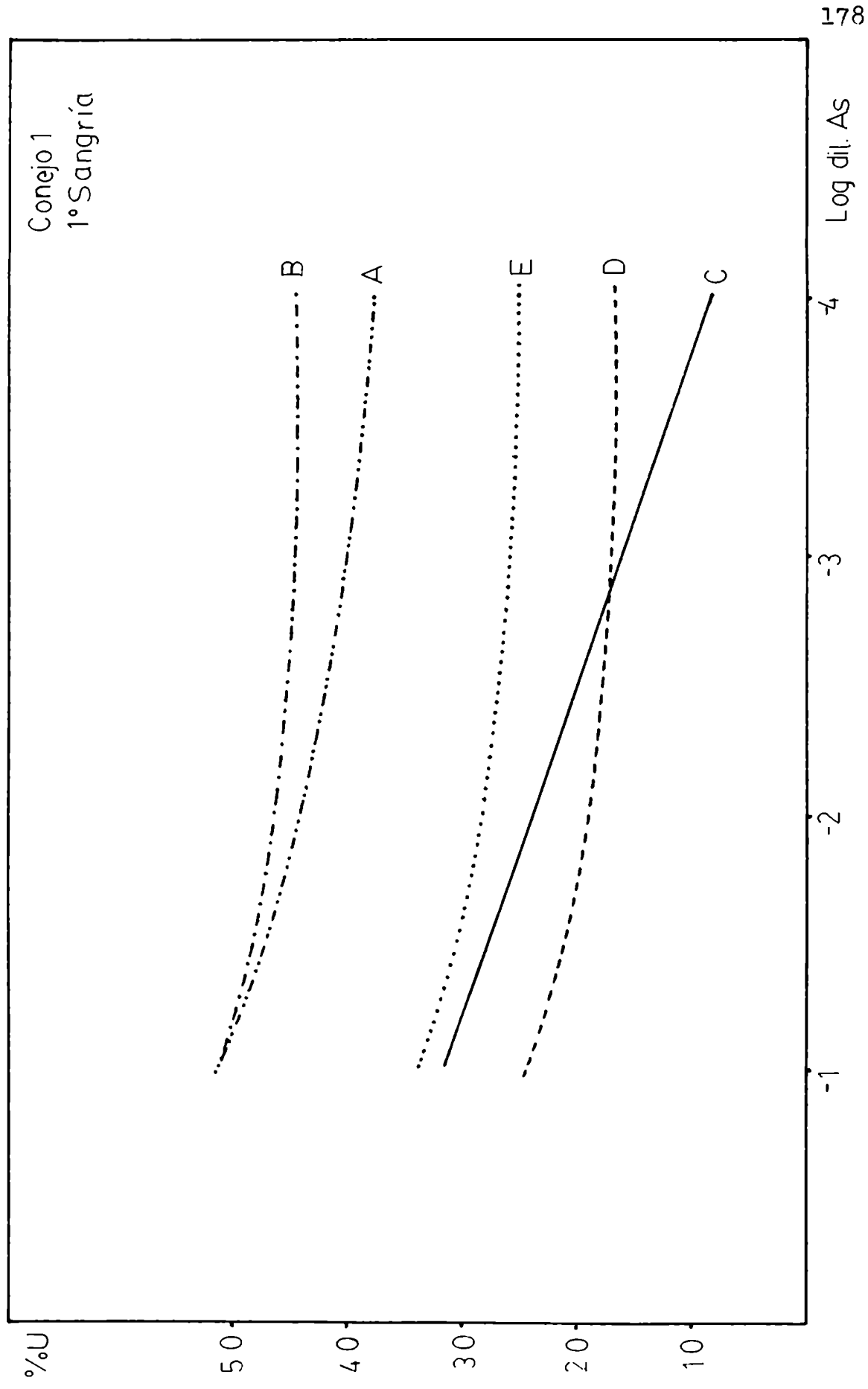


Gráfico 15

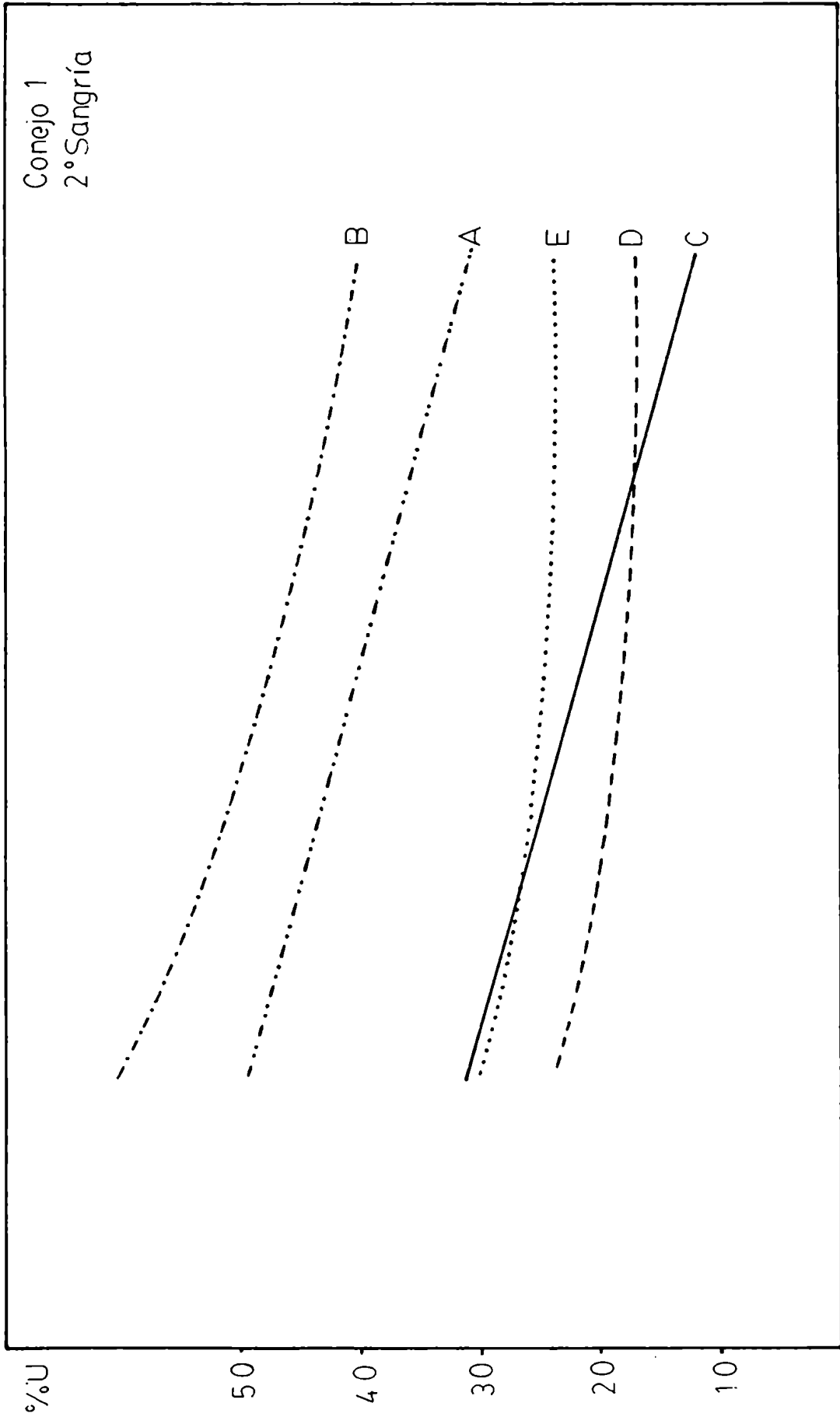


Gráfico 16

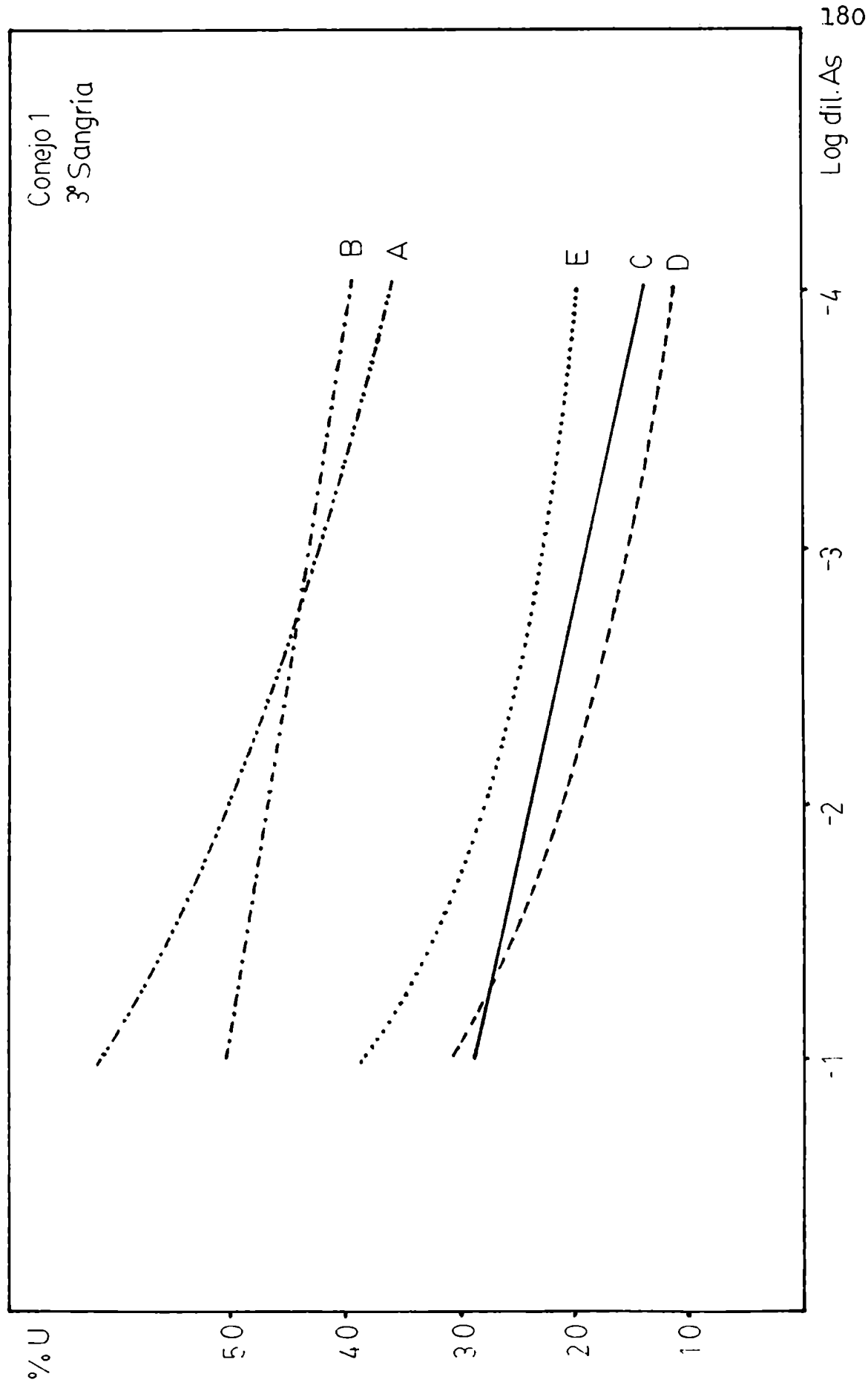


Gráfico 17

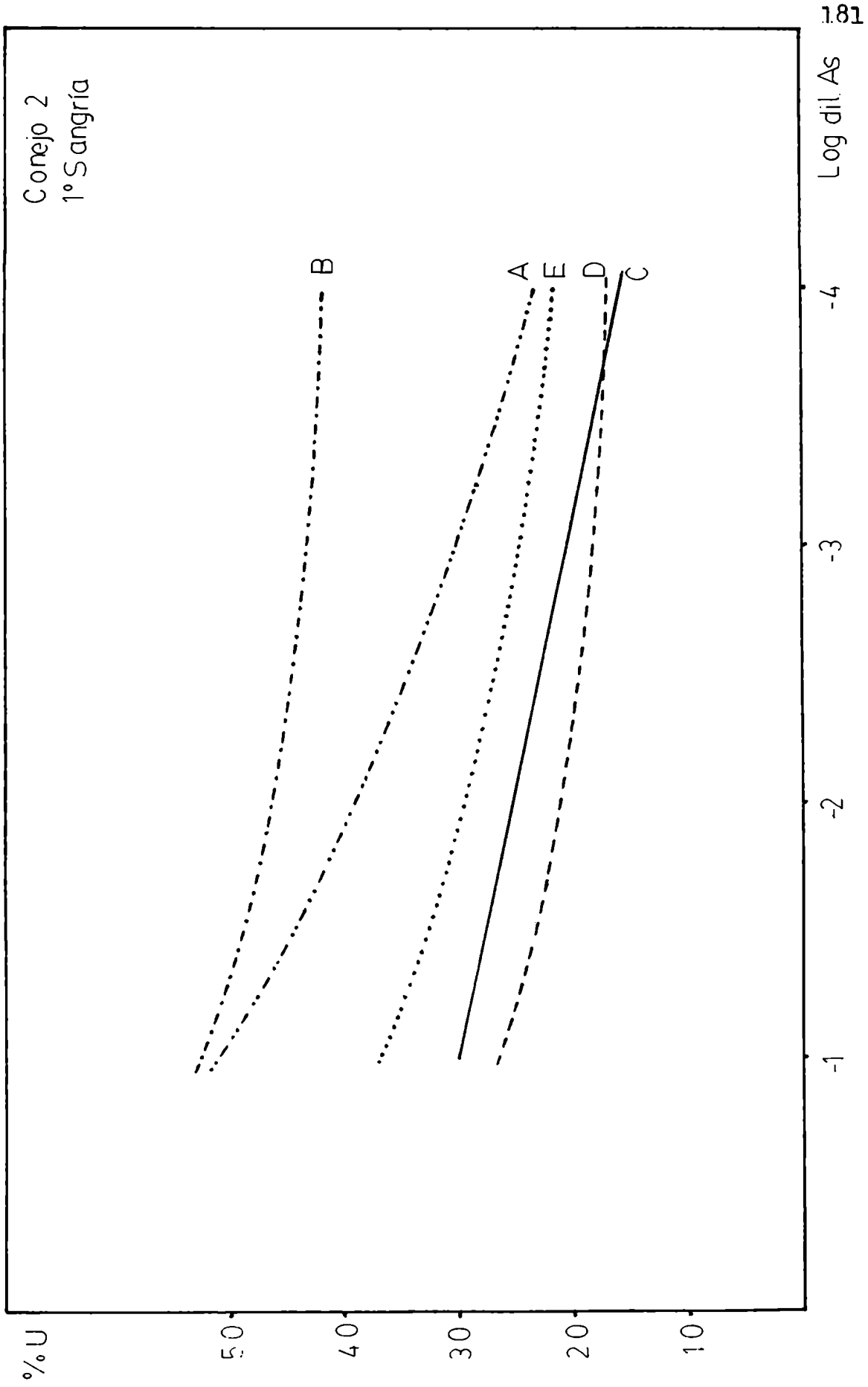


Gráfico 18

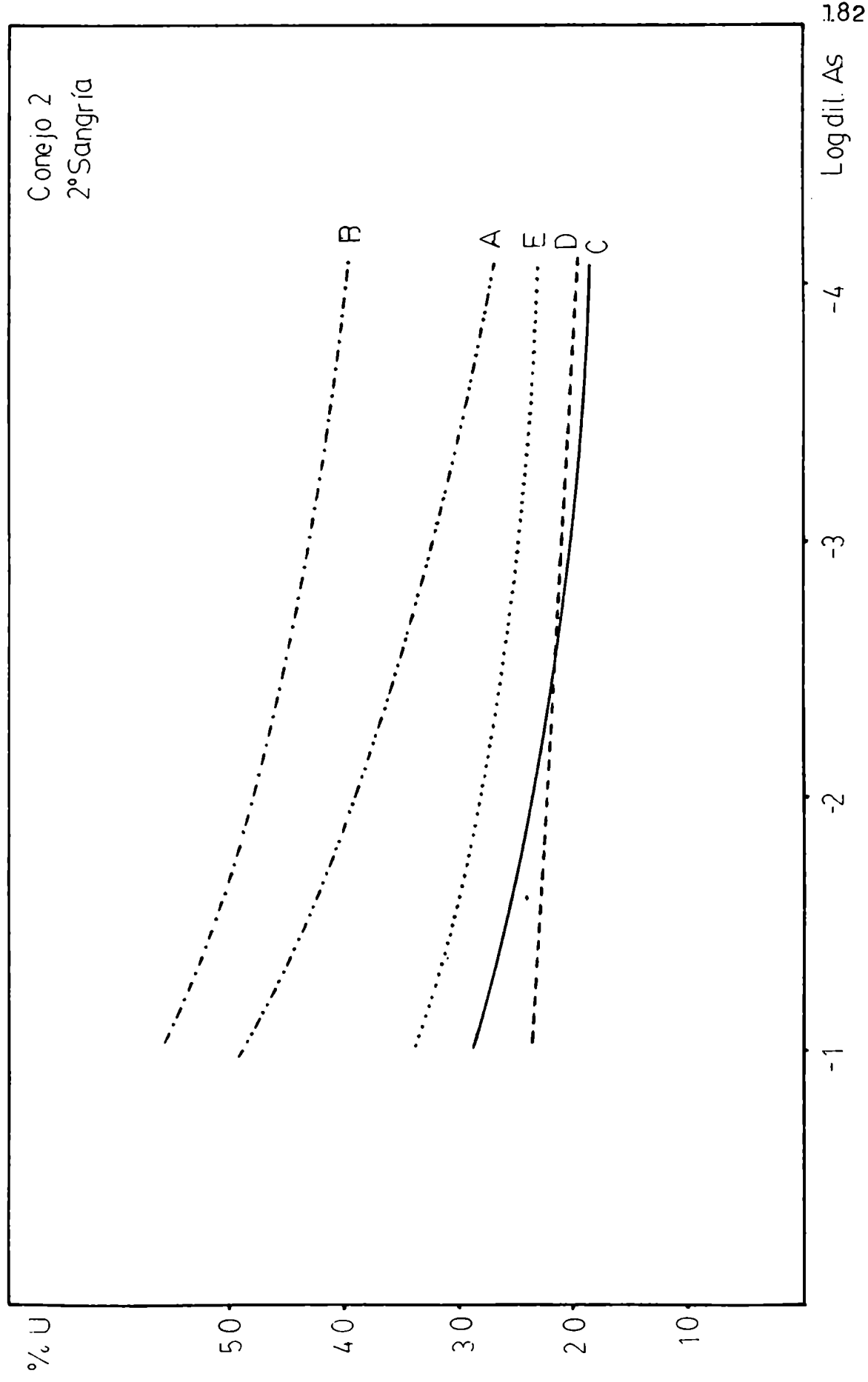


Gráfico 19

Antígeno Antisueros	A ^o	B ^{oo}	C ^{ooo}	D ^{oooo}	E ^{ooooo}
Conejo 1 1° sangría	>10240	>10240	22	<10	50
Conejo 1 2° sangría	>10240	>10240	17	<10	17
Conejo 1 3° sangría	>10240	>10240	<10	11	54
Conejo 2 1° sangría	1100	>10240	12	<10	93
Conejo 2 2° sangría	3250	>10240	<10	<10	60

Cuadro 14: Títulos de anti sueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal por reacción de radioinmunoensayo.

- °A: extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.
 °°B: fracción de pH 4,4-4,8 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal.
 °°°C: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.
 °°°°D: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.
 °°°°°E: antígeno carcinoembriónico puro.

Titulación de antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

Se realizó el mismo tipo de reacción para estos antisueros enfrentándolos a los antígenos derivados de colon tumoral. Las curvas de unión obtenidas están representadas en los Gráficos 20 a 24.

En el Cuadro 15 se especifican los títulos de los distin-

tos antisueros.

Antígeno Antisuero	C ^o	D ^{oo}	E ^{ooo}
Conejo 3 1° sangría	170	8600	< 10
Conejo 3 2° sangría	270	>10240	< 10
Conejo 3 3° sangría	< 10	600	30
Conejo 3 4° sangría	86	>10240	11
Conejo 3 5° sangría	660	>10240	< 10
Conejo 4 1° sangría	360	>10240	< 10
Conejo 4 2° sangría	270	>10240	< 10
Conejo 4 3° sangría	< 10	>10240	16
Conejo 4 4° sangría	< 10	7750	12
Conejo 4 5° sangría	30	>10240	< 10
Conejo 5 1° sangría	115	>10240	< 10
Conejo 5 2° sangría	250	>10240	< 10
Conejo 5 3° sangría	< 10	>10240	22
Conejo 5 4° sangría	< 10	>10240	23
Conejo 5 5° sangría	380	>10240	< 10

Cuadro 15: Títulos de antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral por reacción de radioinmunoensayo.

^oC: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

^{oo}D: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

^{ooo}E: antígeno carcinoembrionario puro.

GRAFICOS 20 A 34.

Curvas de unión de distintos antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral con distintos antígenos.

Gráfico 20 Antisuero conejo 3 1º sangría.

Gráfico 21 Antisuero conejo 3 2º sangría.

Gráfico 22 Antisuero conejo 3 3º sangría.

Gráfico 23 Antisuero conejo 3 4º sangría.

Gráfico 24 Antisuero conejo 3 5º sangría.

Gráfico 25 Antisuero conejo 4 1º sangría.

Gráfico 26 Antisuero conejo 4 2º sangría.

Gráfico 27 Antisuero conejo 4 3º sangría.

Gráfico 28 Antisuero conejo 4 4º sangría.

Gráfico 29 Antisuero conejo 4 5º sangría.

Gráfico 30 Antisuero conejo 5 1º sangría.

Gráfico 31 Antisuero conejo 5 2º sangría.

Gráfico 32 Antisuero conejo 5 3º sangría.

Gráfico 33 Antisuero conejo 5 4º sangría.

Gráfico 34 Antisuero conejo 5 5º sangría.

_____ C: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

----- D: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de glicoproteínas de colon tumoral.

..... E: Antígeno carcinoembriónico puro.

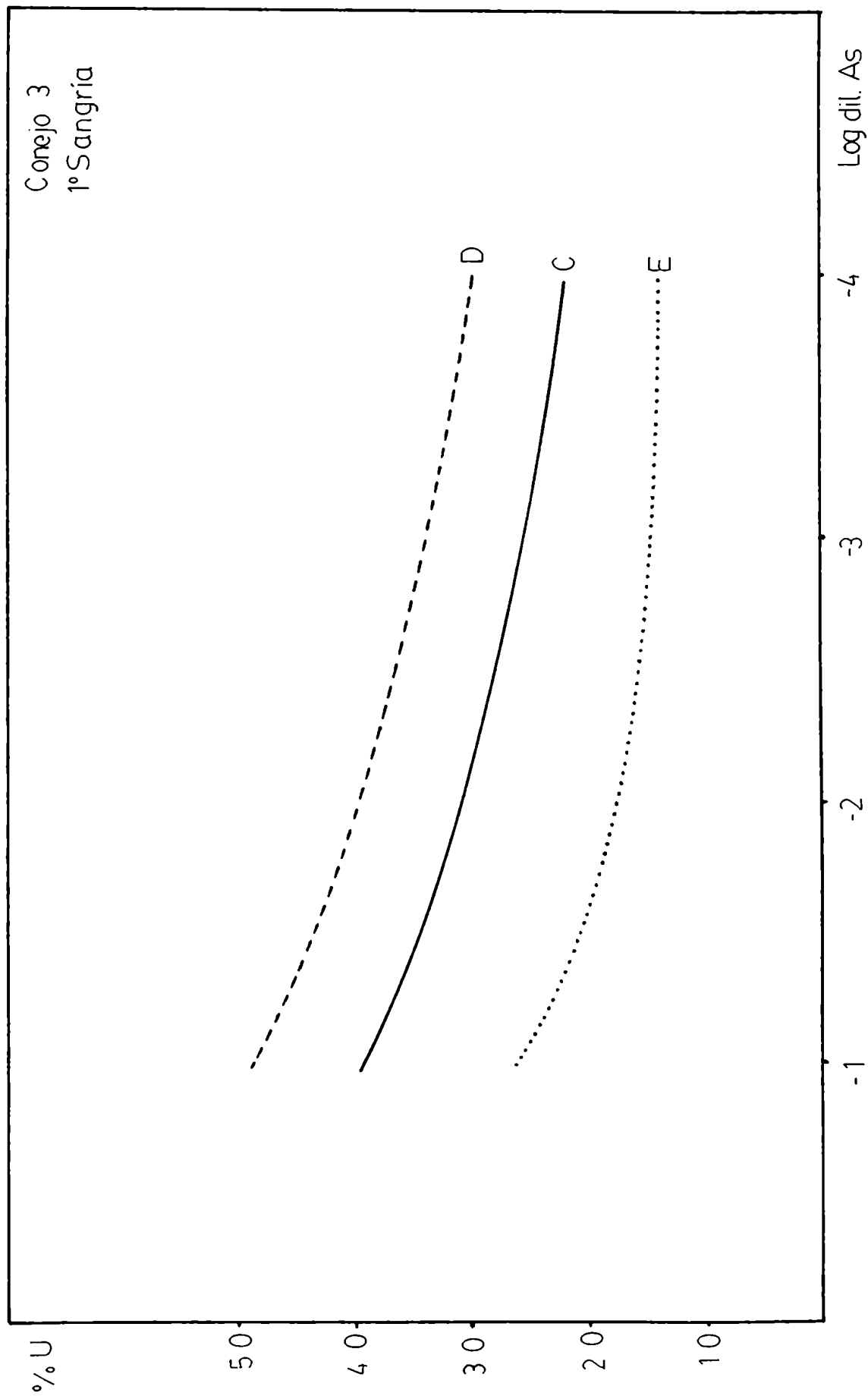


Gráfico 20

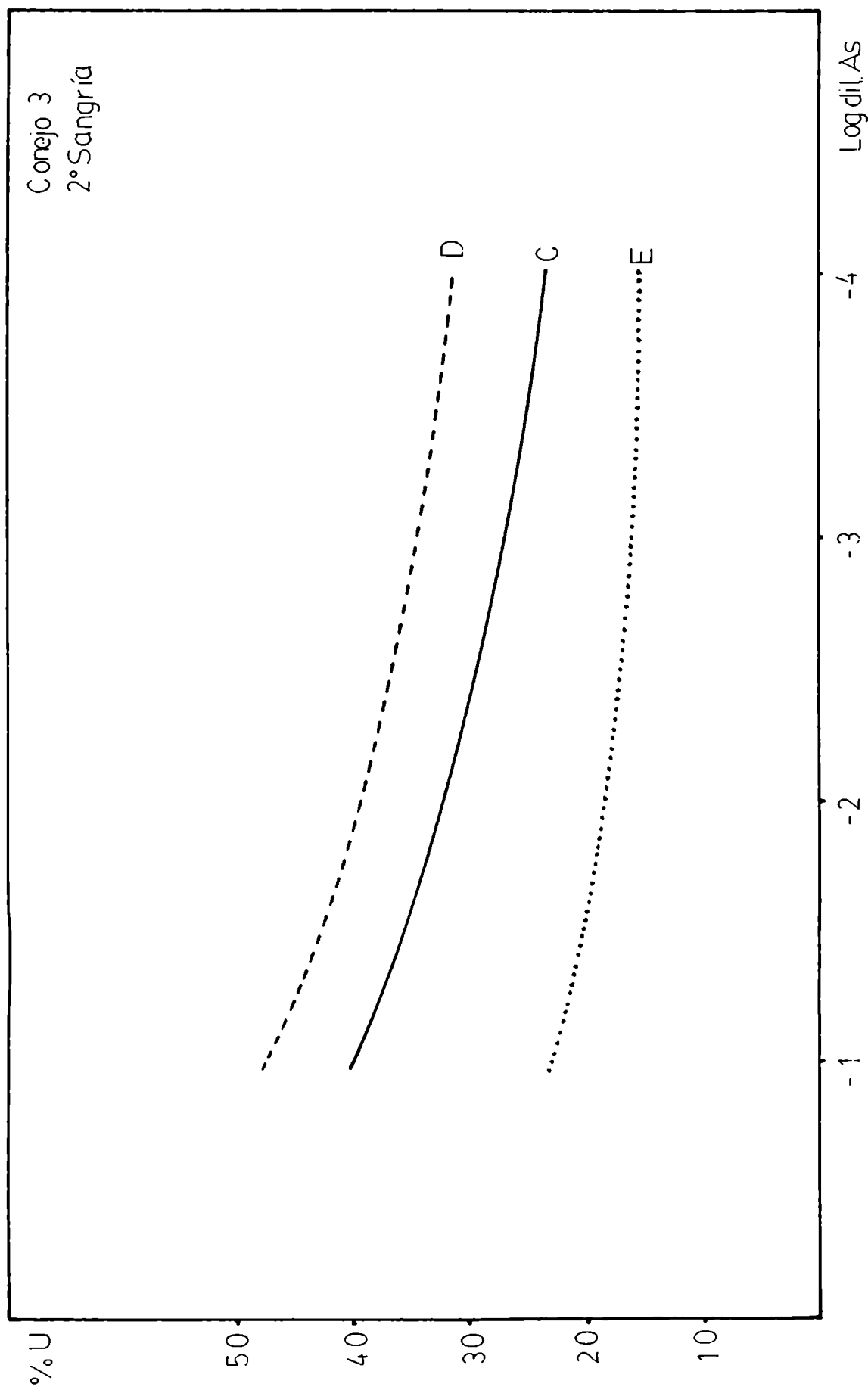


Gráfico 21

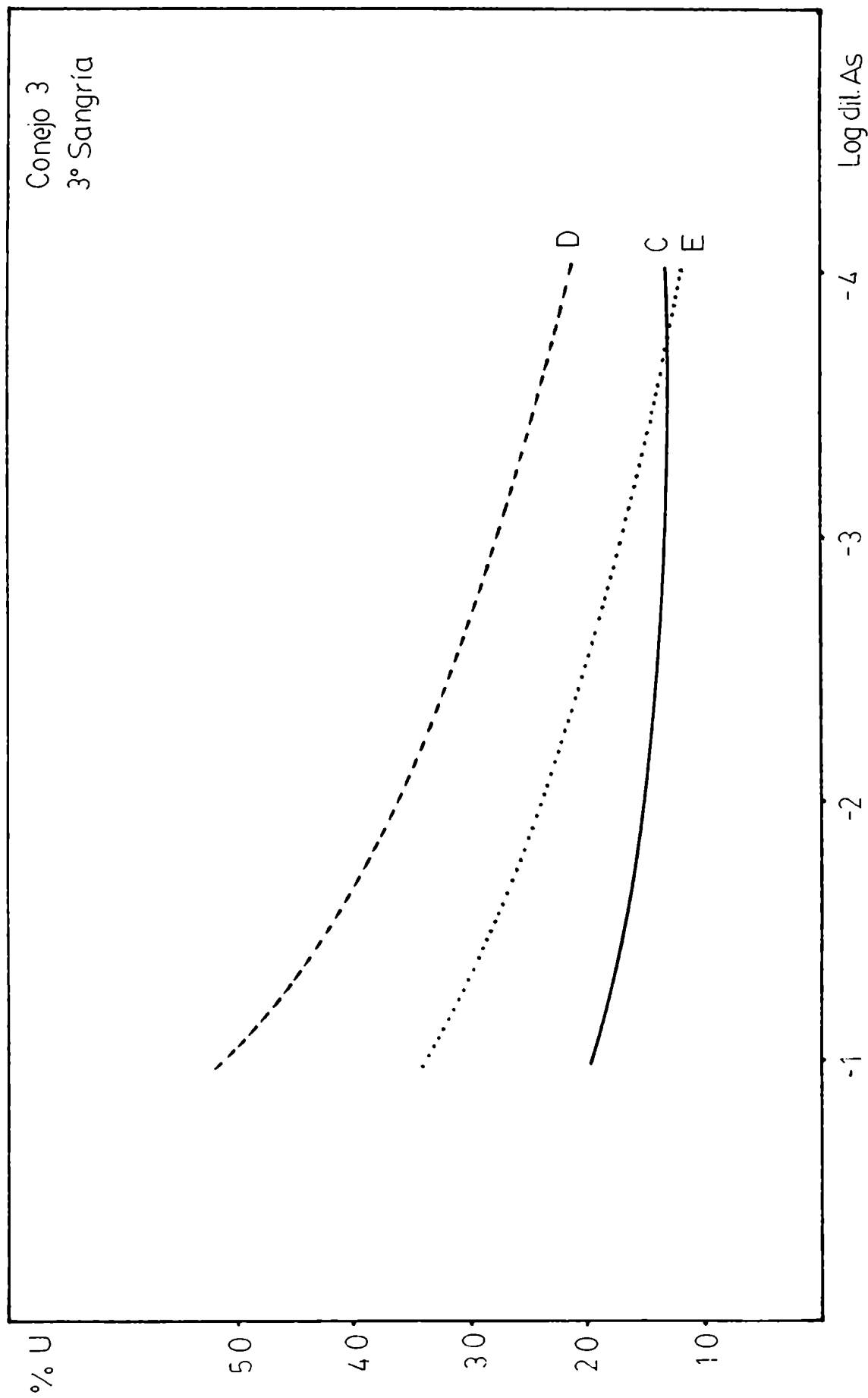


Gráfico 22

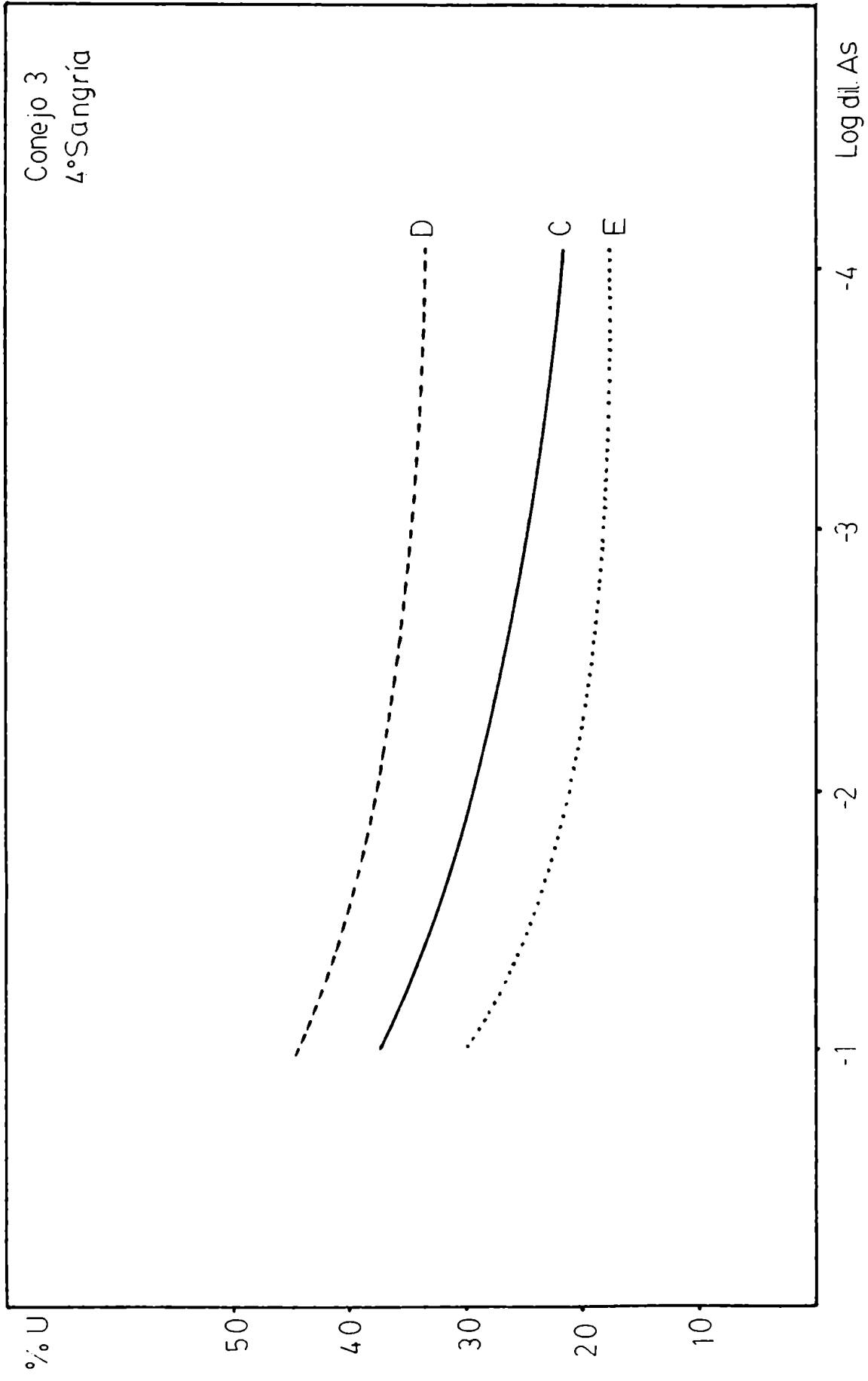
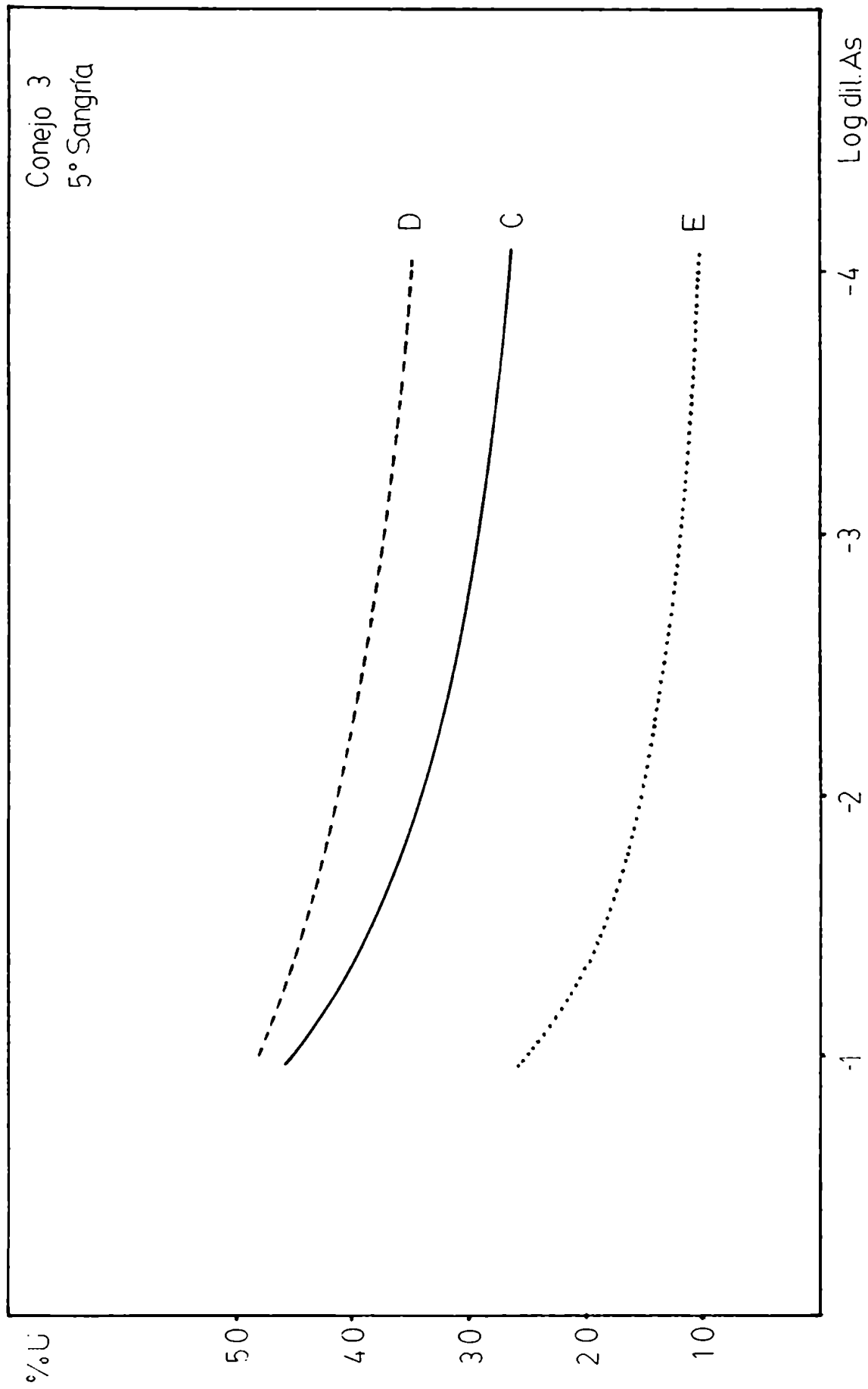


Gráfico 23



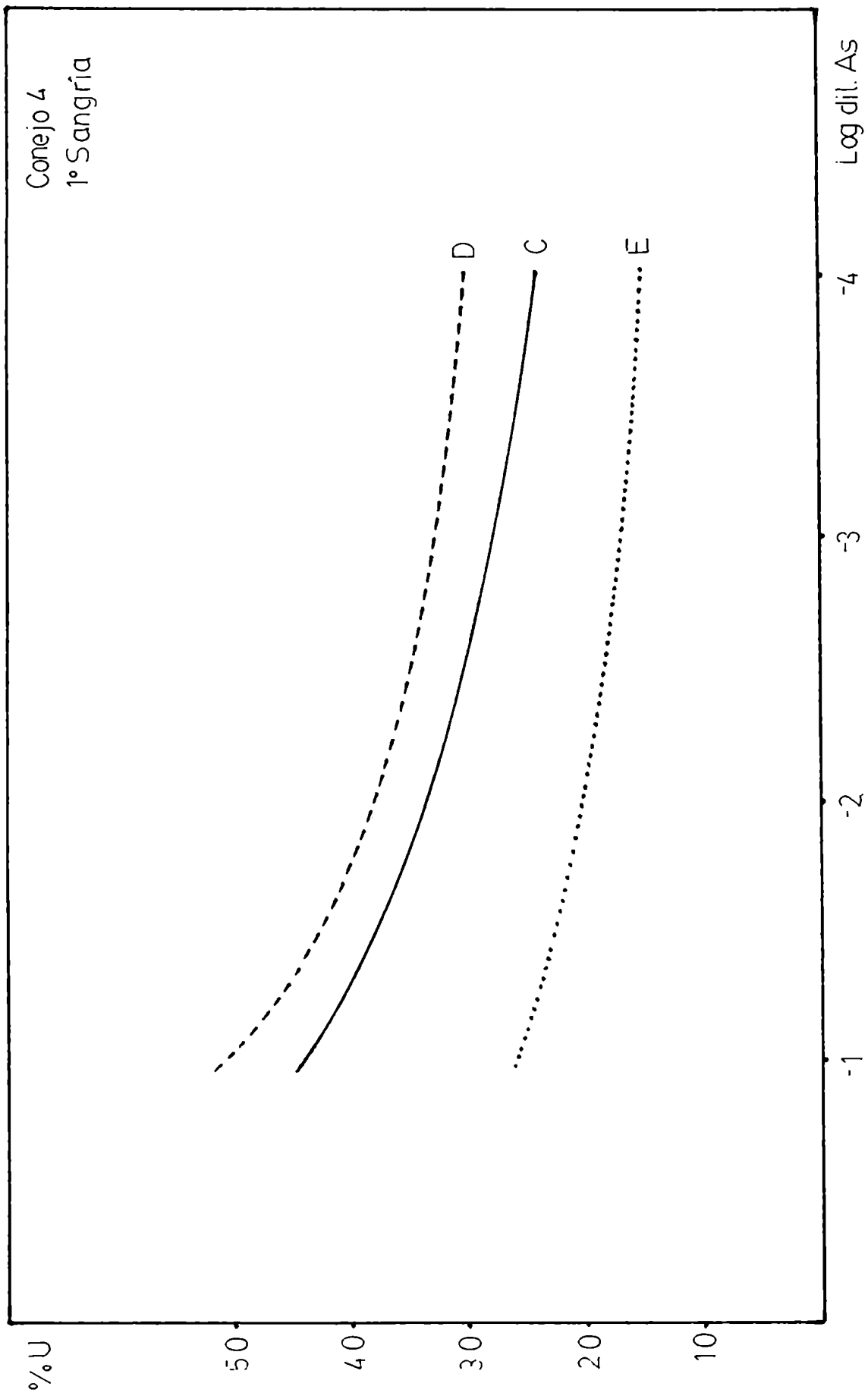
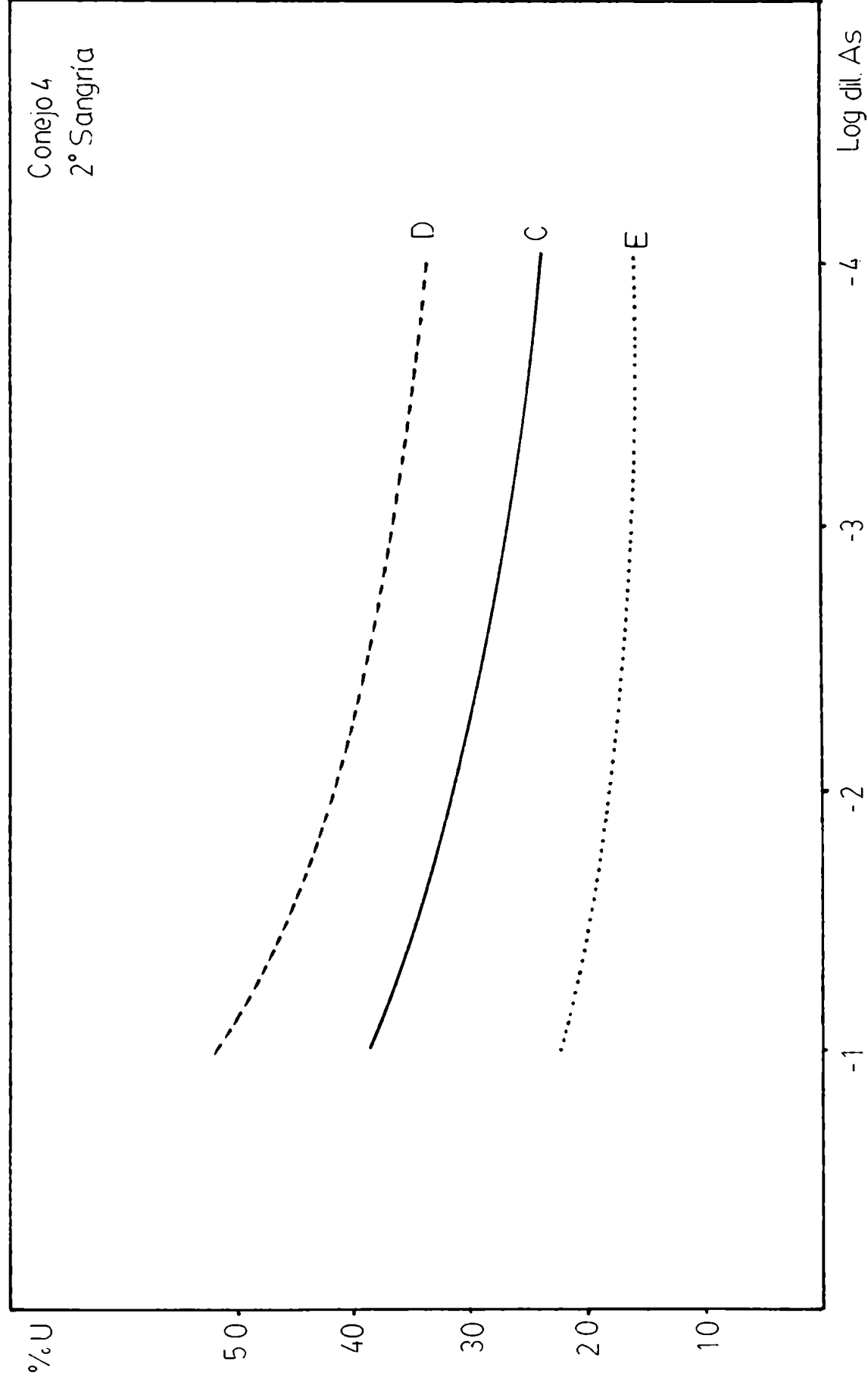
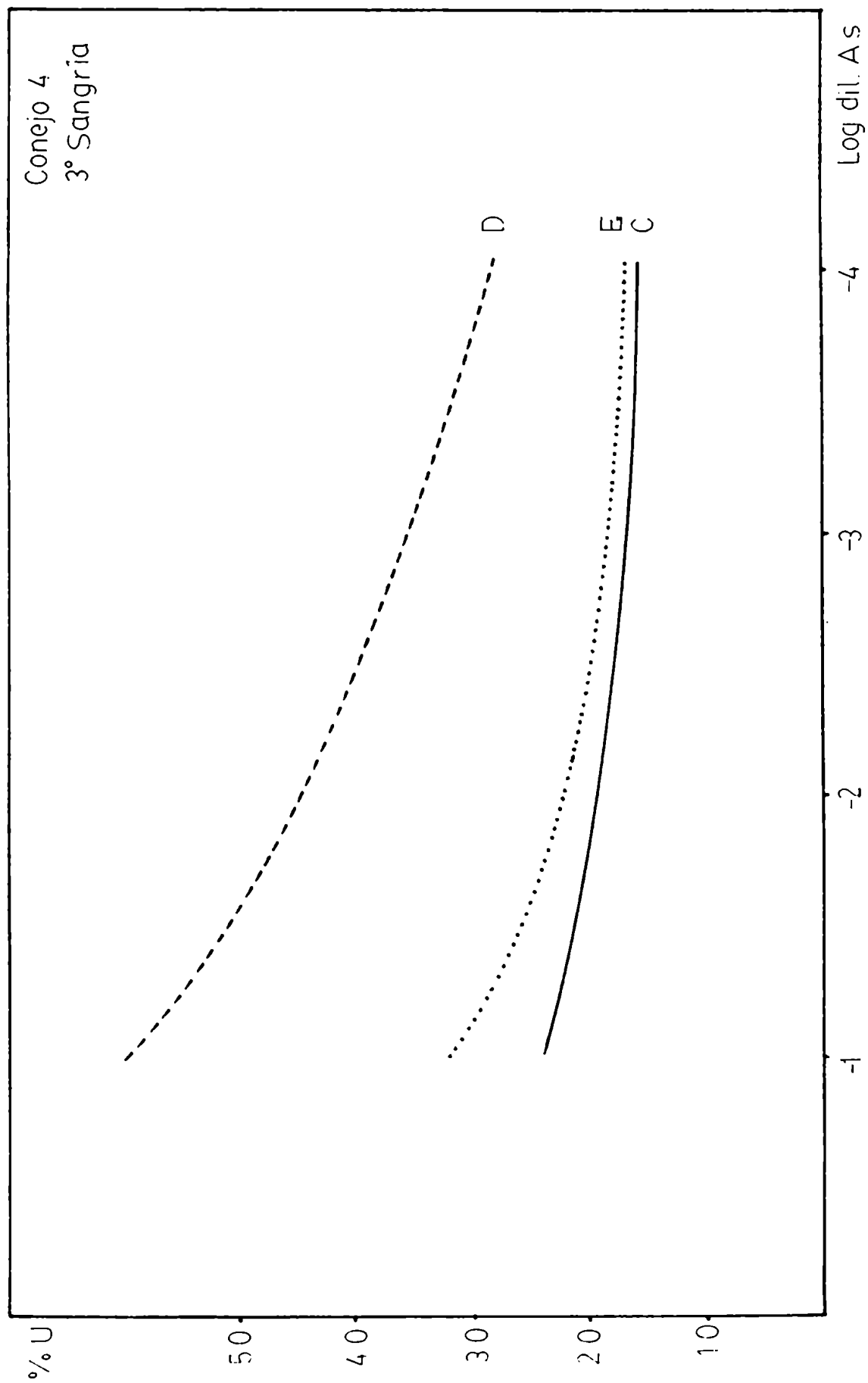
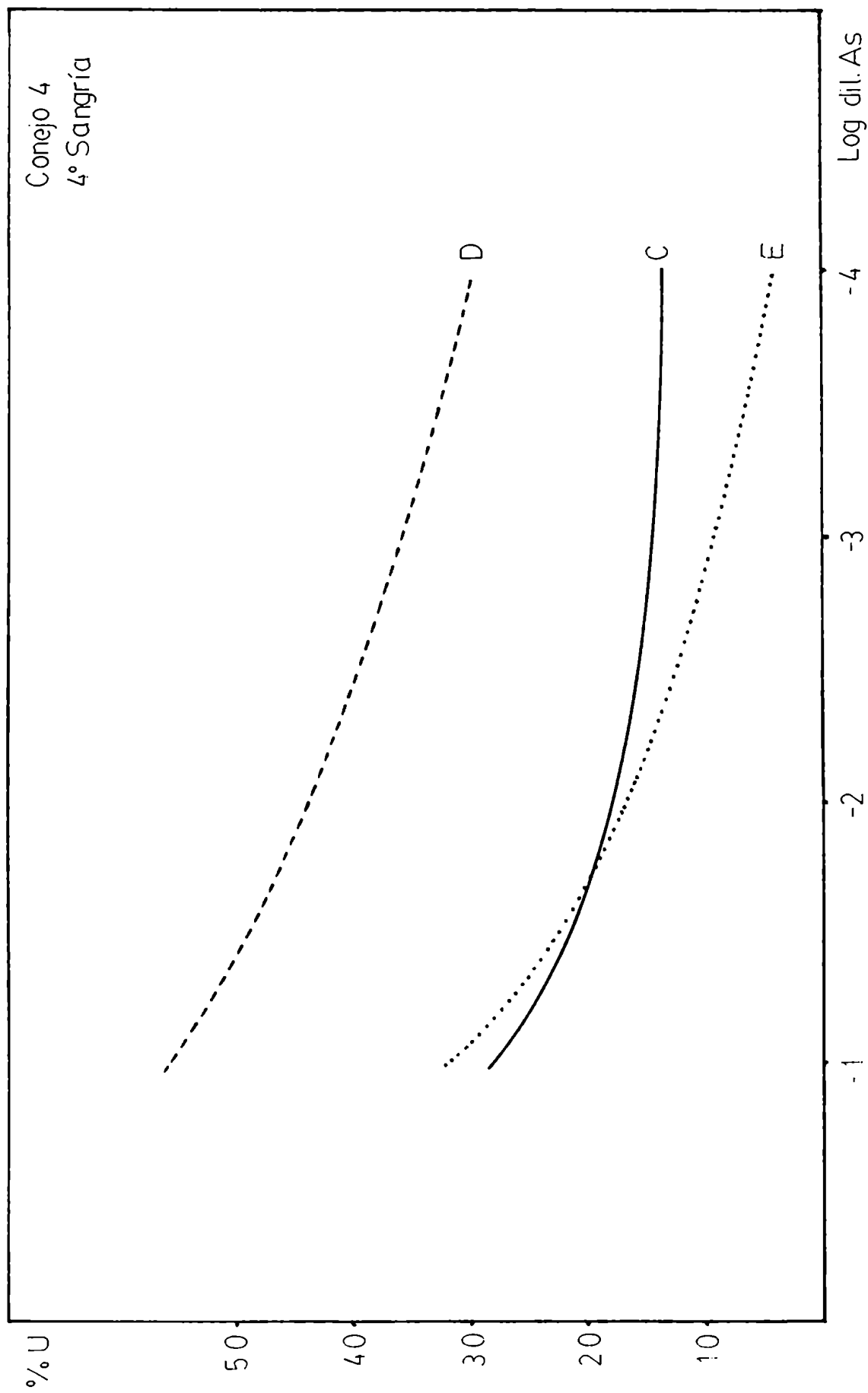


Gráfico 25







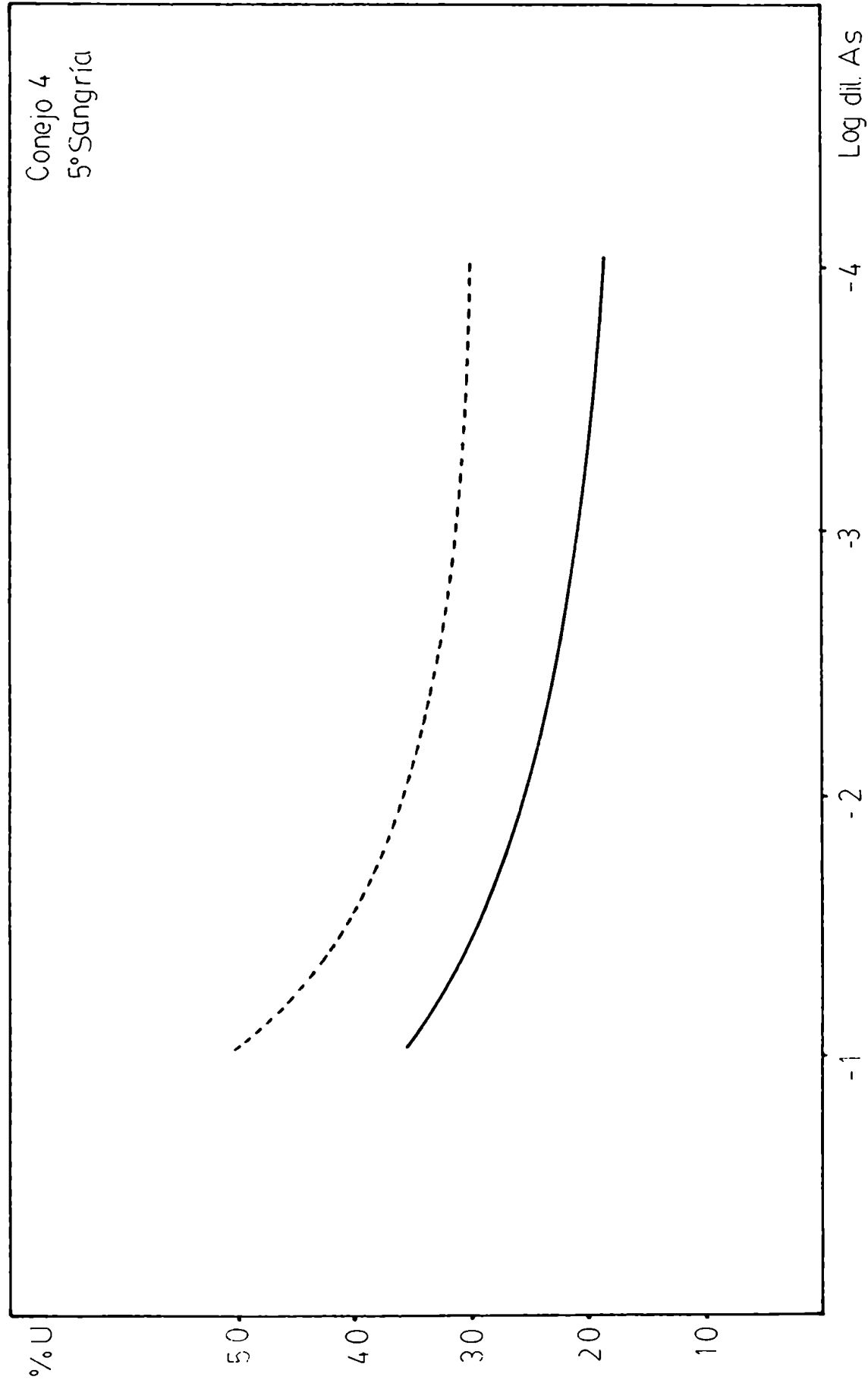
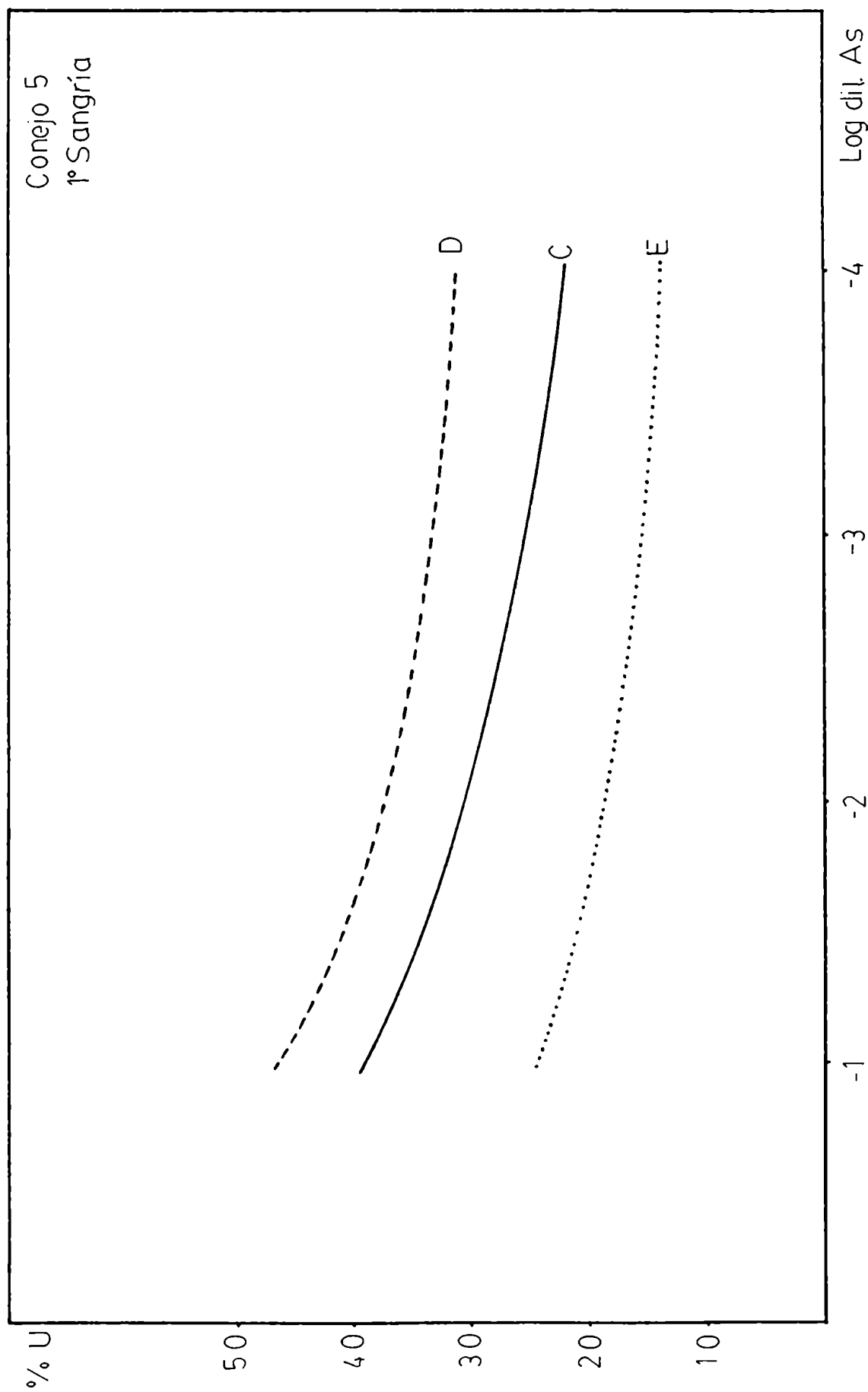
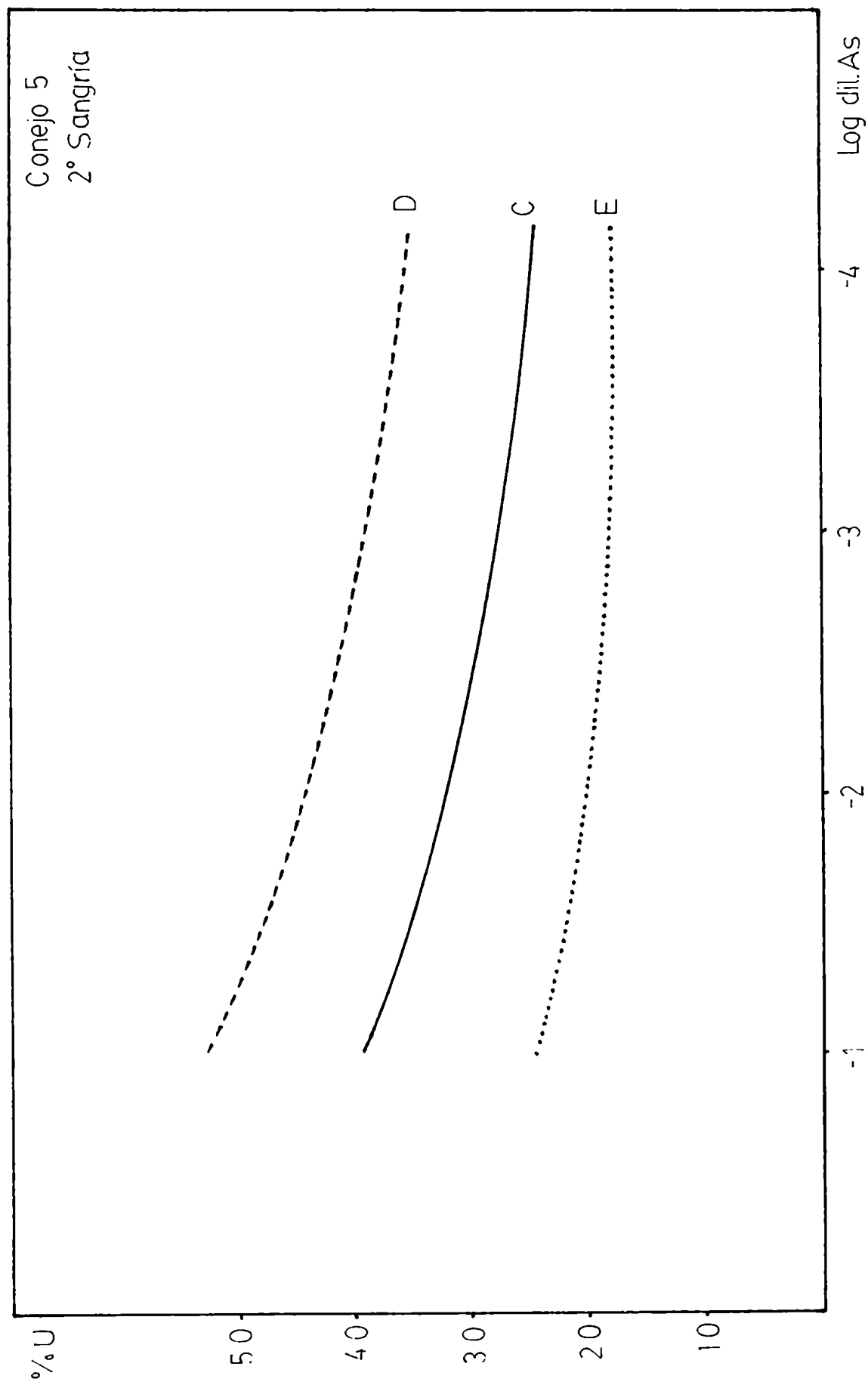
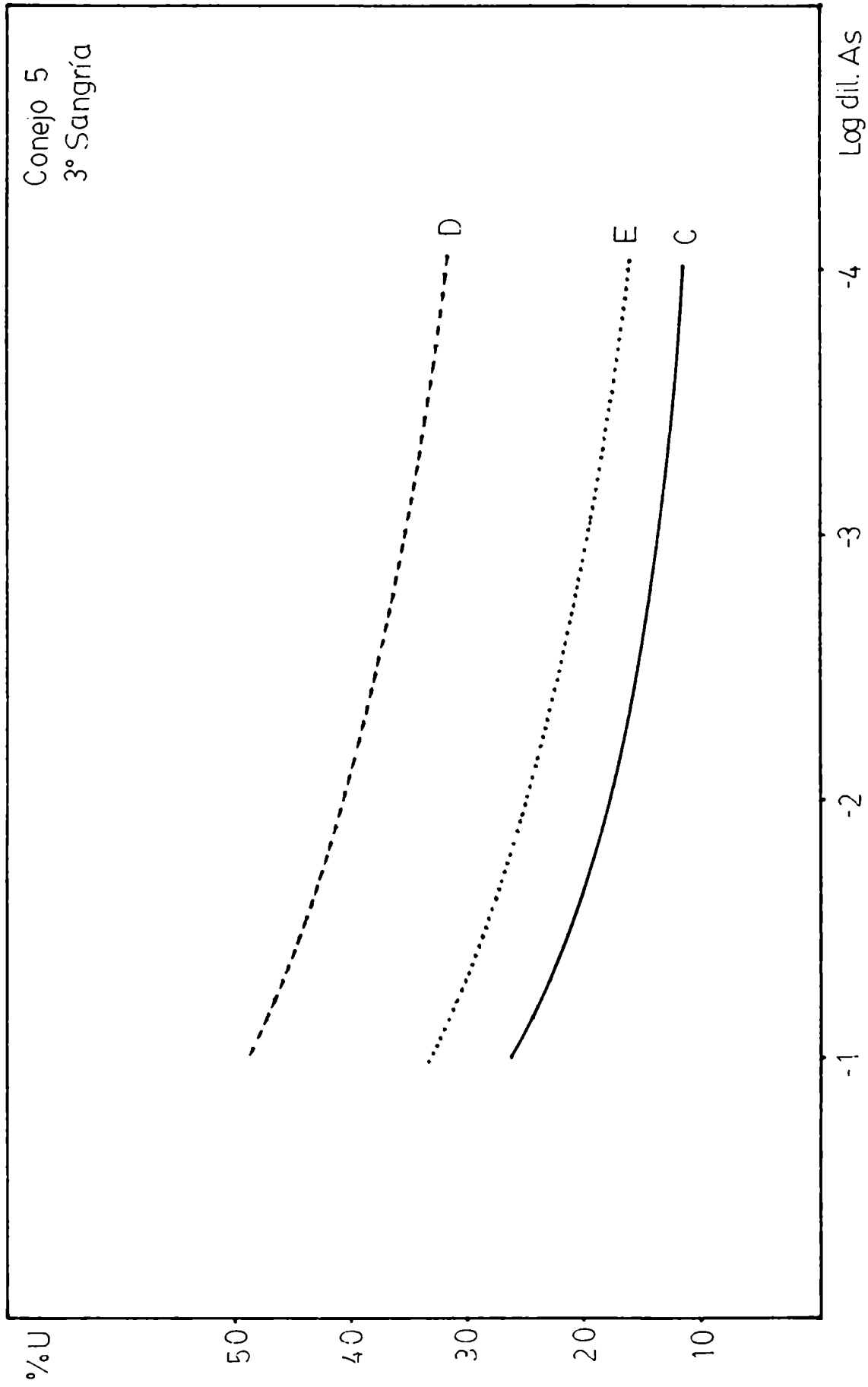
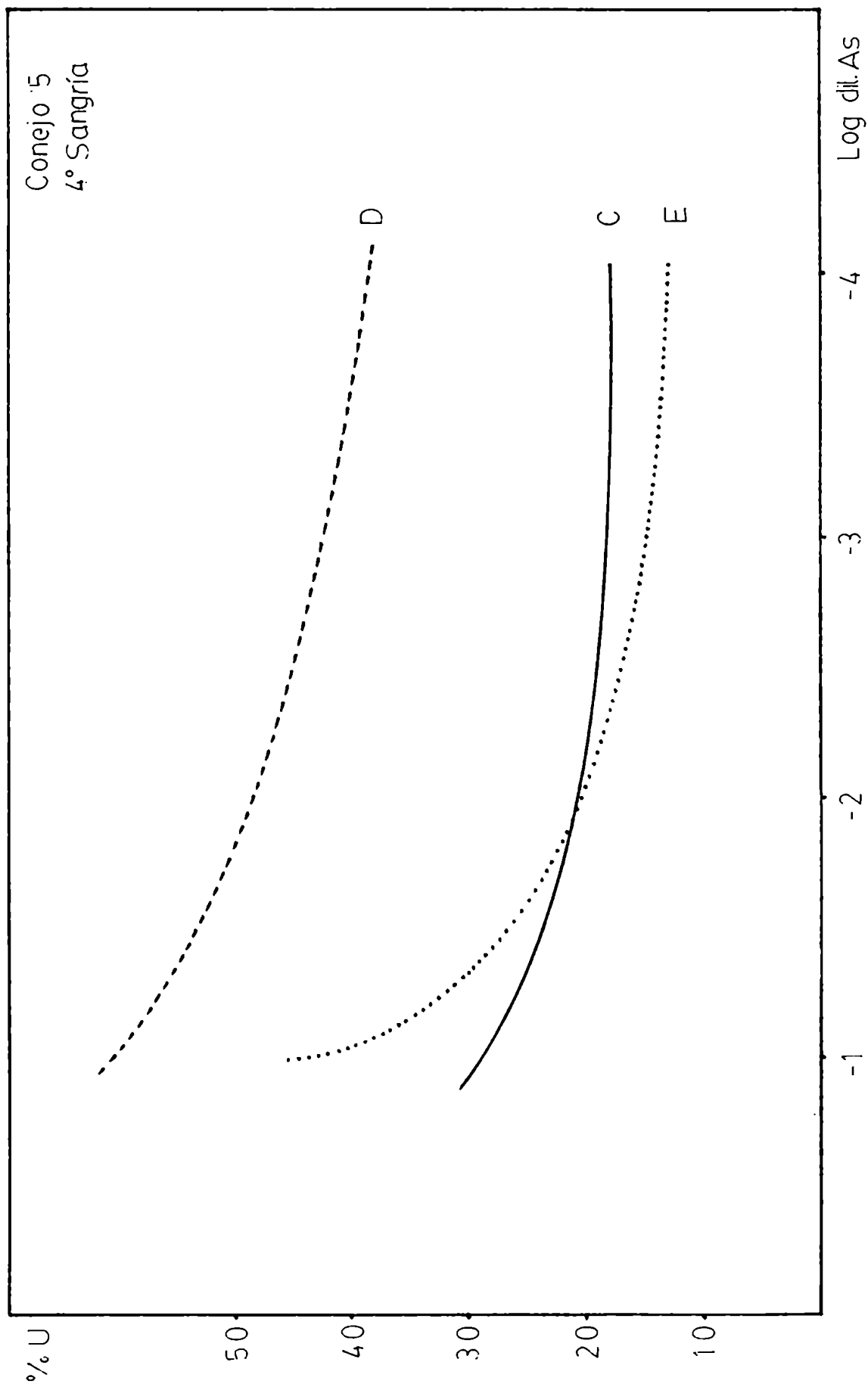


Gráfico 29









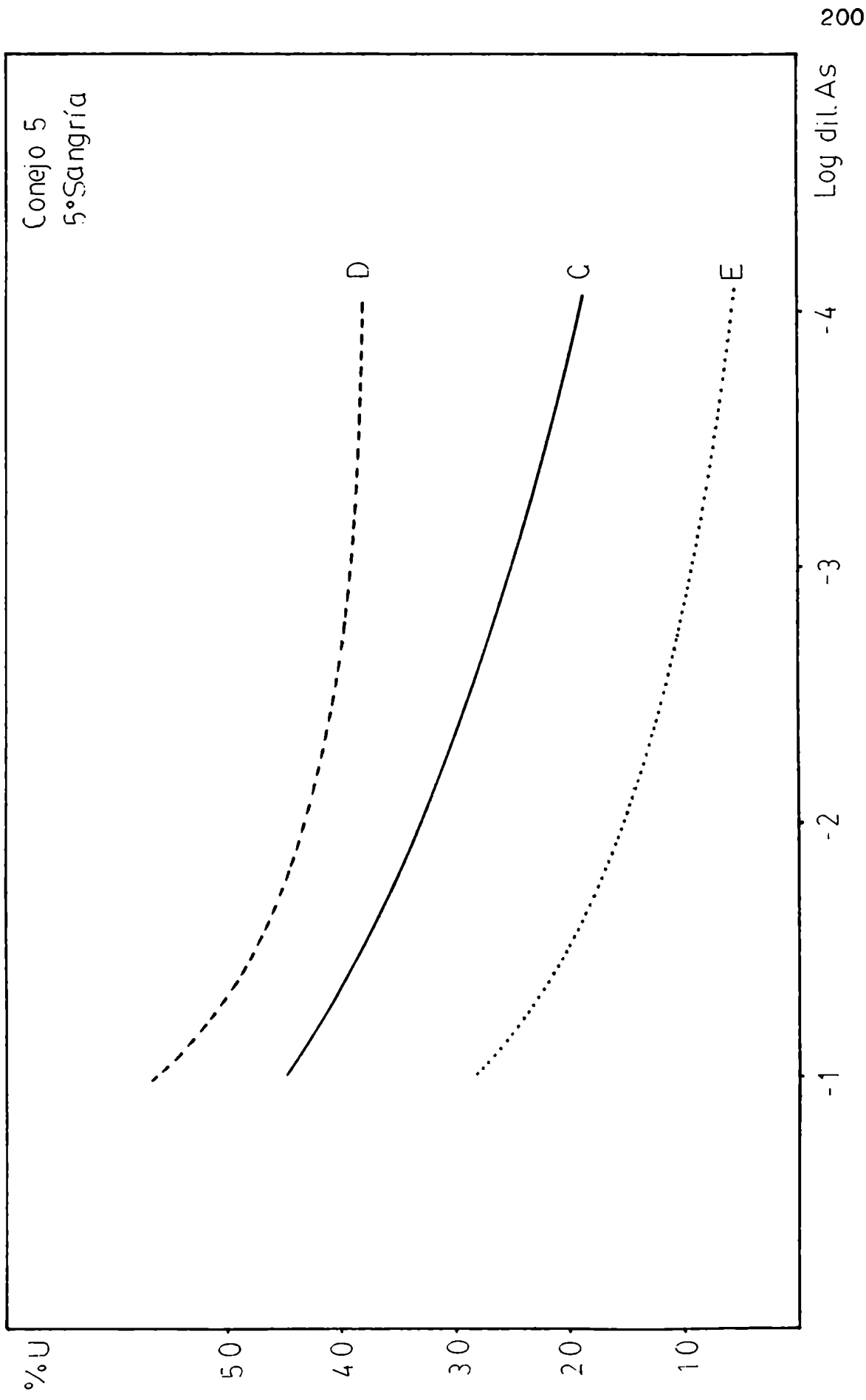


Gráfico 34

Titulación de antisueros anti antígeno carcinoembriónico.

Se procedió de igual manera con estos antisueros obteniéndose las curvas representadas en los Gráficos 35 a 39 de las que se pueden calcular los siguientes títulos (Cuadro 16).

Antígeno Antisero	C ^o	D ^{oo}	E ^{ooo}
Conejo 6 1° sangría	< 10	12	< 10
Conejo 6 2° sangría	110	30	60
Conejo 6 3° sangría	13	< 10	36
Conejo 7 1° sangría	< 10	< 10	< 10
Conejo 7 2° sangría	400	10240	250

Cuadro 16: Titulación de antisueros anti antígeno carcinoembriónico por reacción de radioinmunoensayo.

^oC: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

^{oo}D: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

^{ooo}E: antígeno carcinoembriónico puro.

En todos los casos se realizaron controles sin suero y controles de suero normal de conejo, obteniéndose siempre valores de porcentaje de unión antígeno-anticuerpo inferiores a 10%.

GRAFICOS 35 A 39.

Curvas de unión de distintos sueros anti antígeno carcino-embriónico con diferentes antígenos.

Gráfico 35 Antisuero conejo 6 1º sangría.

Gráfico 36 Antisuero conejo 6 2º sangría.

Gráfico 37 Antisuero conejo 6 3º sangría.

Gráfico 38 Antisuero conejo 7 1º sangría.

Gráfico 39 Antisuero conejo 7 2º sangría.

——— C: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

----- D: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de glicoproteínas de colon tumoral.

..... E: antígeno carcinoembriónico puro.

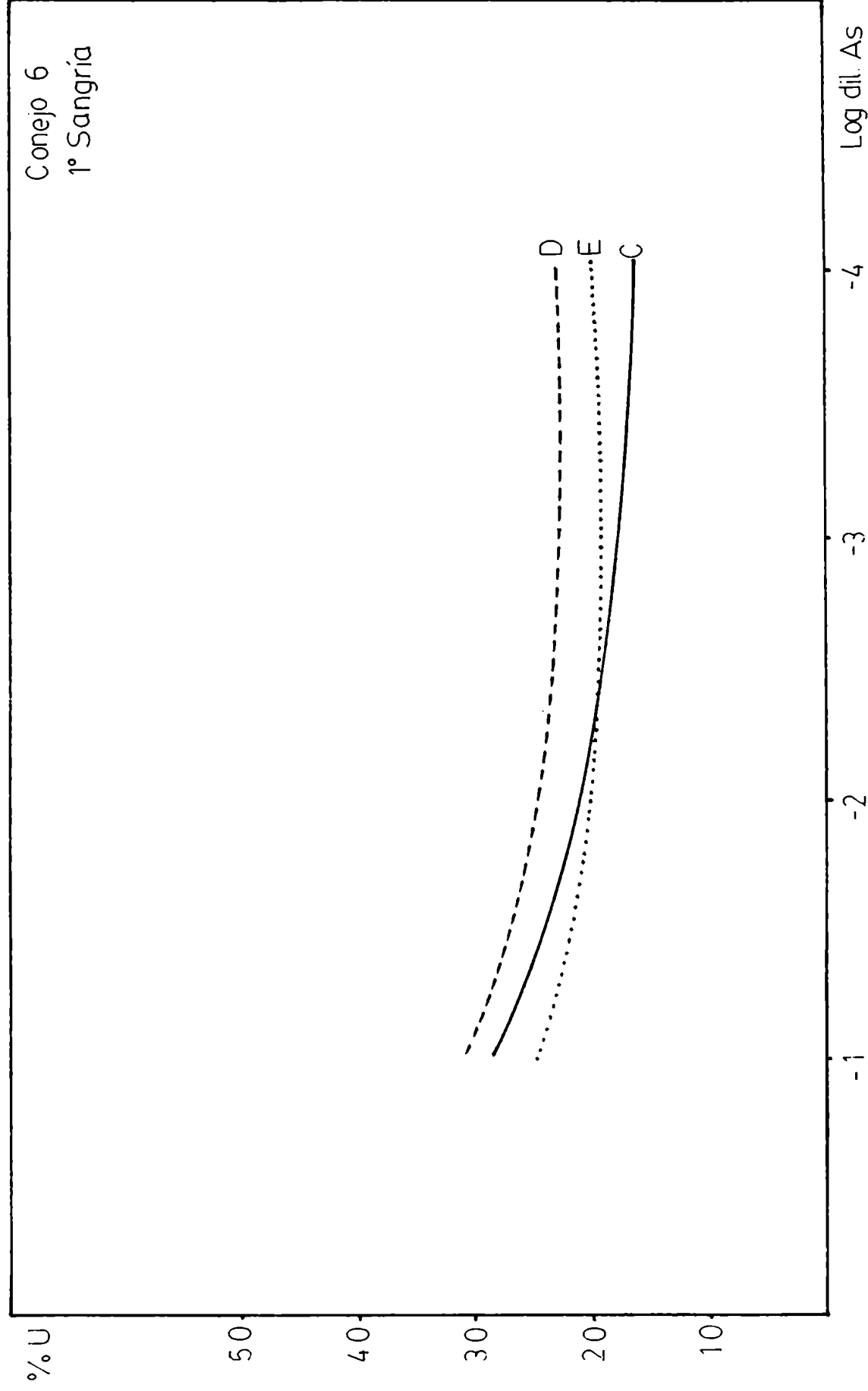


Gráfico 35

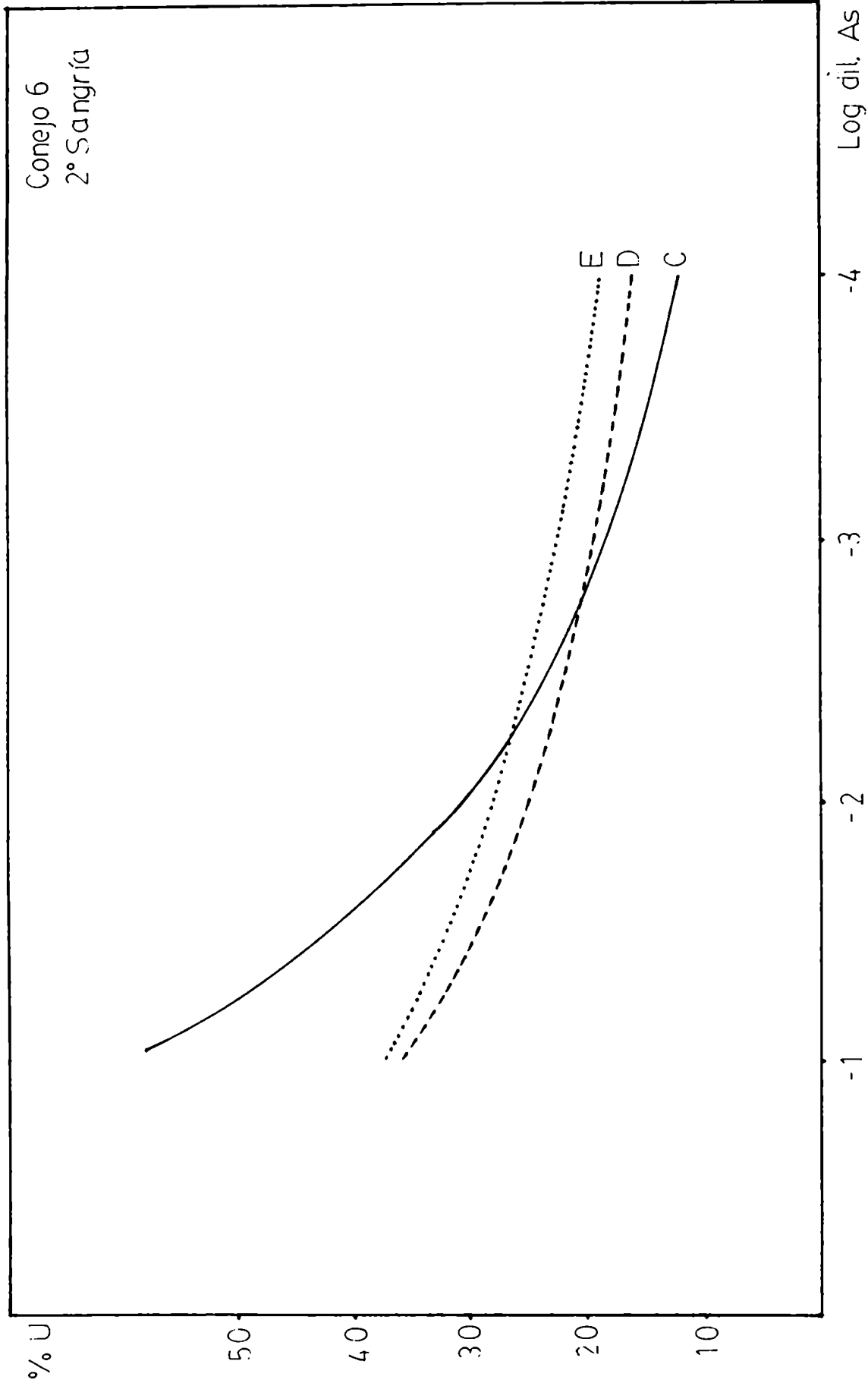
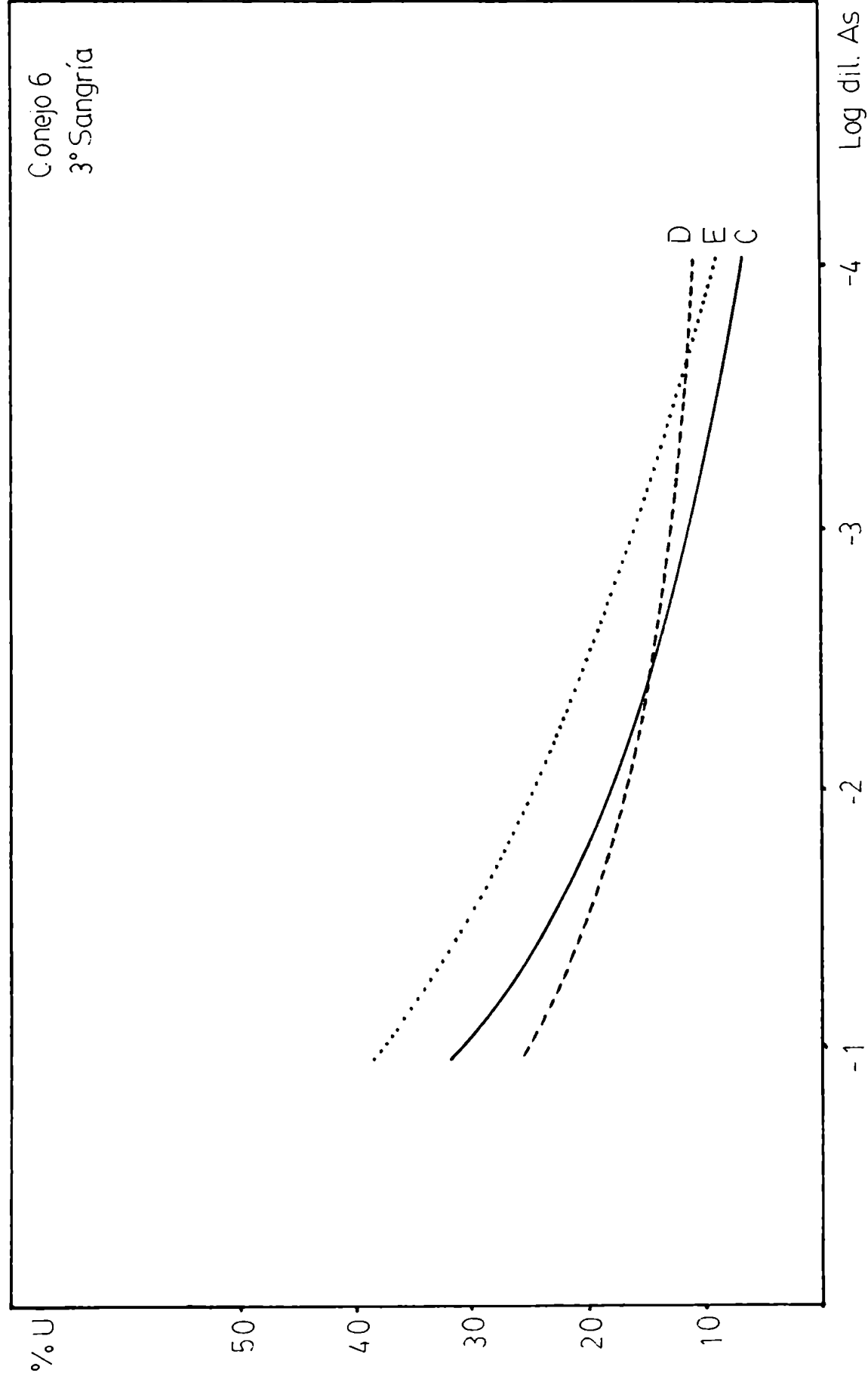


Gráfico 36



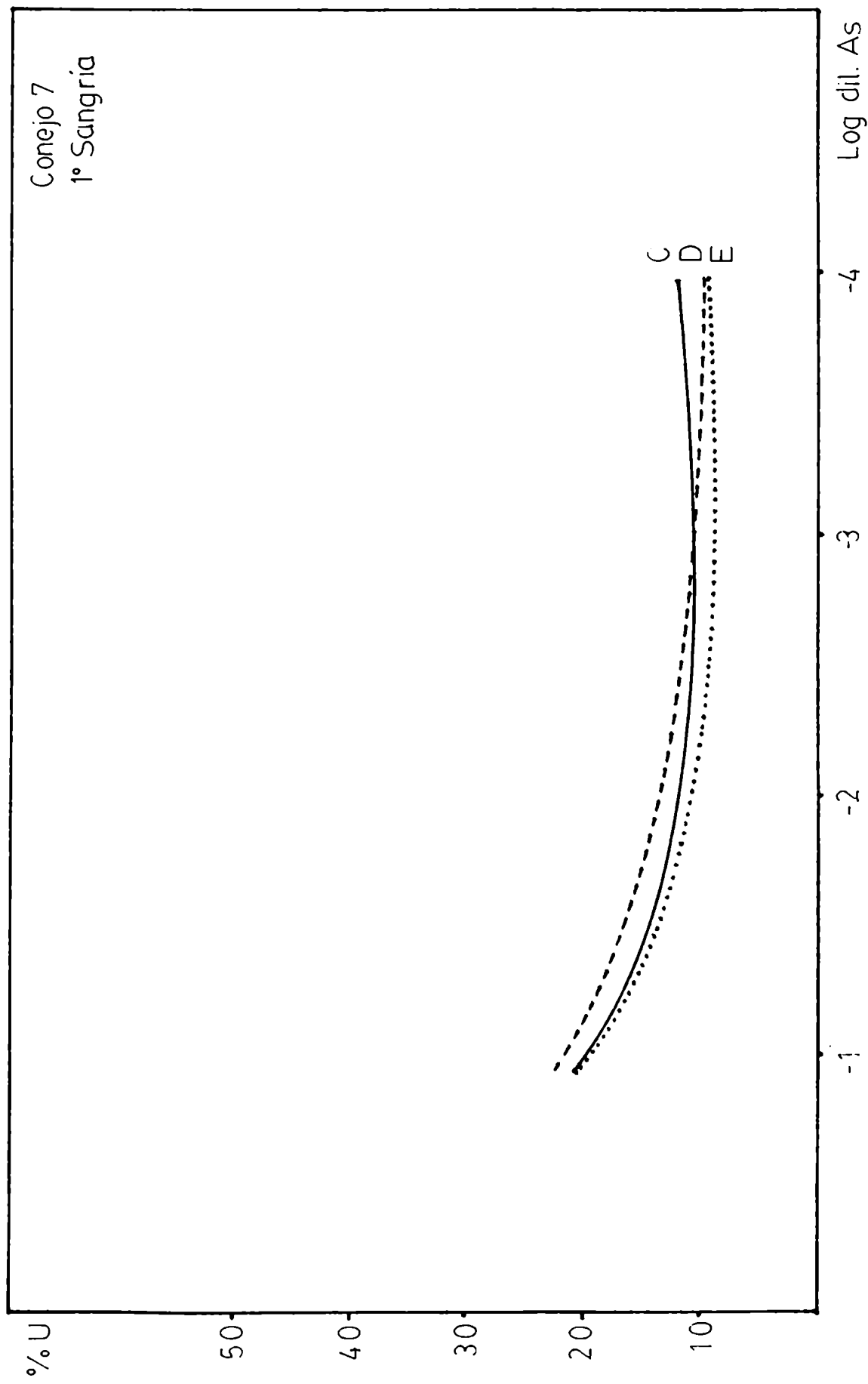


Gráfico 38

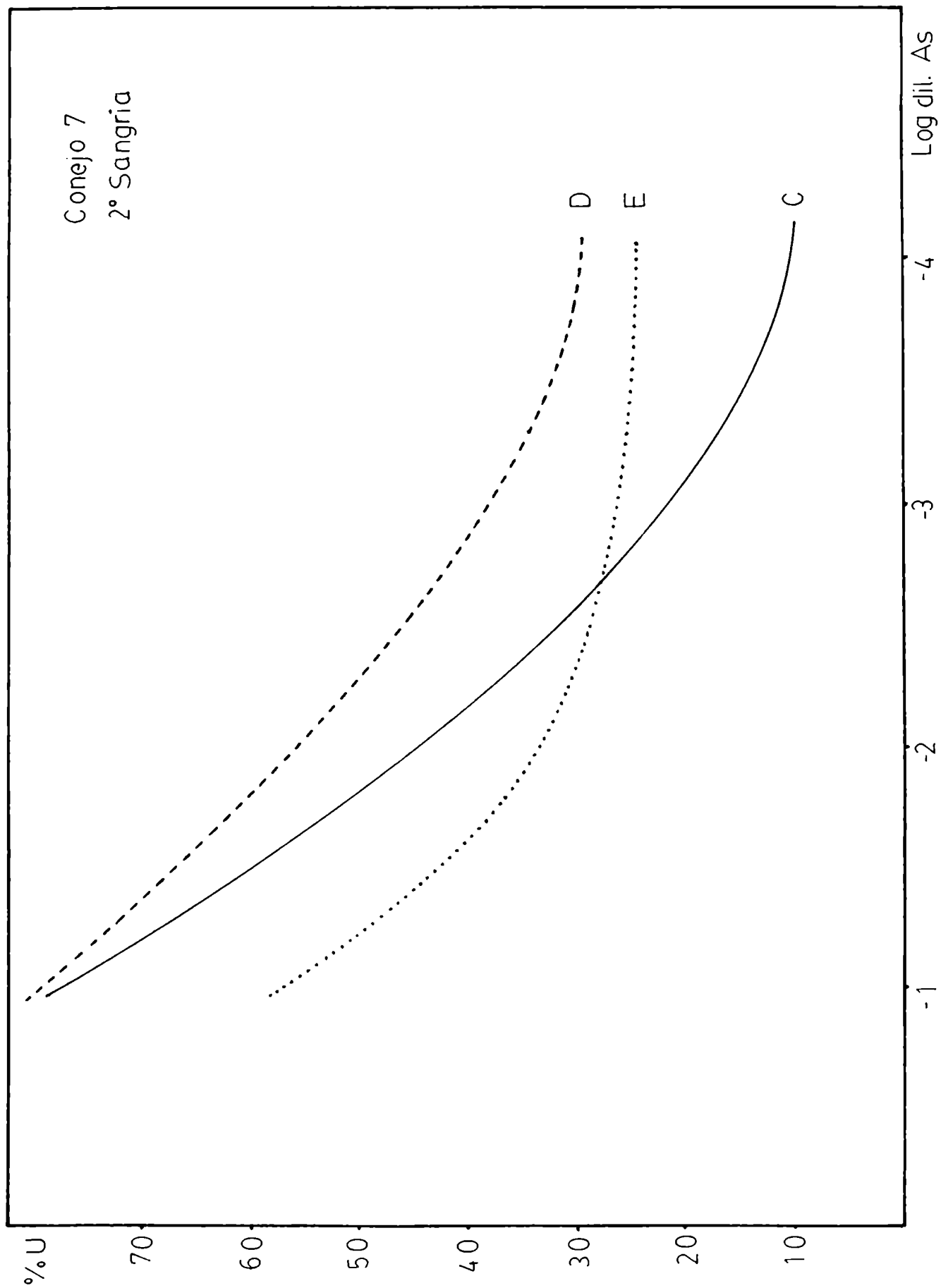


Gráfico 39

REACCION DE RADIOINMUNOENSAYO.

Se determinó la concentración de antígeno carcinoembriónico en muestras de mezclas de sueros de pacientes con baja o alta concentración de dicho antígeno. Se utilizaron los antisueros correspondientes a las tercera y quinta sangrías de los conejos 3, 4 y 5 en las diluciones que producen un 30% de unión Ag-Ac. Se eligieron estos antisueros ya que ellos combinan bajos títulos para el extracto perclórico y relativamente altos para el antígeno carcinoembriónico puro (tercera sangría) o altos títulos para el extracto y bajos para el antígeno puro (quinta sangría) siendo los títulos para la fracción de electroenfoque altos salvo en un caso (conejo 3 tercera sangría).

Se utilizaron como proteínas standard y trazadores extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral, fracción de pH 4,65-4,90 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral y antígeno carcinoembriónico puro. Los resultados obtenidos están especificados en el Cuadro 17.

ANTISUERO	PROTEINA STAN- DARD Y TRAZA- DOR.	MEZCLA DE SUE- ROS DE CEA BAJA EN ng/ml	MEZCLA DE SUE- ROS DE CEA ALTA EN ng/ml
Conejo 3 3° sangría	C°	< 5	112
	D°°	10	200
	E°°°	23	> 320
Conejo 3 5° sangría	C	< 5	80
	D	18	180
	E	10	90
Conejo 4 3° sangría	C	7	> 320
	D	13	81
	E	15	180
Conejo 4 5° sangría	C	5	130
	D	18	130
	E	17	140
Conejo 5 3° sangría	C	7	220
	D	14	130
	E	31	60
Conejo 5 5° sangría	C	< 5	102
	D	14	98
	E	15	76

Cuadro 17: Determinación de concentración de antígeno carcino-embriónico en mezclas de sueros de pacientes con baja y alta concentración de CEA utilizado distintos antisueros y proteínas, standard y trazador.

°C: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

°°D: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

°°°E: antígeno carcinoembriónico puro.

Se dosó el antígeno carcinoembrionario en esas mismas muestras, por el método de Sorin (tres determinaciones para cada mezcla) obteniéndose los siguientes resultados (Cuadro 18):

	MEZCLA DE SUEROS DE [CEA] BAJA EN ng/ml.	MEZCLA DE SUEROS DE [CEA] ALTA EN ng/ml.
	22,5	300,0
	16,0	247,0
	10,0	148,5
Valor medio	16,1	231,8
Desviación standard	6,2	76,8

Cuadro 18: Determinación de concentración de antígeno carcinoembrionario en mezclas de sueros de pacientes con baja y alta concentración de CEA por el método de Sorin.

Se realizó la misma determinación por el método de Prist (ocho y siete determinaciones para baja y alta concentración respectivamente) siendo los resultados obtenidos los especificados en el Cuadro 19.

	MEZCLA DE SUEROS DE (CEA) BAJA EN ng/ml.	MEZCLA DE SUEROS DE (CEA) ALTA EN ng/ml.
	5,0	132,5
	5,0	155,0
	12,5	100,0
	7,5	85,0
	15,0	120,0
	10,0	195,0
	12,5	120,0
	5,0	
Valor medio	9,06	129,64
Desviación standard	3,99	36,46

Cuadro 19: Determinación de concentración de antígeno carcino-embriónico en mezclas de sueros de pacientes con baja y alta concentración de CEA por el método de Prist.

ANALISIS ESTADISTICO.

Mezcla de sueros de concentración baja de antígeno carcino-embriónico.

Del análisis de varianza realizado se deduce que hay diferencias significativas entre los distintos estados de nuri-

ficación del antígeno, pero no así entre antisueros correspondientes a distintos animales o a distintas sangrías. Las interacciones tampoco fueron significativas. (Cuadro 20).

FUENTE DE VARIACION	F DE TABLAS	F CALCULADO	RESULTADO
Entre Animales	6,94	0,5974	No significativo
Entre Sangría	18,5	0,8120	No significativo
Entre Grado de purificación	6,94	22,8844	Significativo
Interacción animal - sangría.	6,94	1,3168	No significativo
Interacción animal - grado de purificación.	6,39	0,6716	No significativo
Interacción sangría - grado de purificación.	6,94	3,9901	No significativo

Cuadro 20: Tratamiento de los resultados de reacción de radioinmunoensayo para muestras de baja concentración de CEA (Cuadro 17) por análisis de varianza $p < 0,05$.

La significación entre los grados de purificación se analizó mediante intervalos de Bonferroni resultando ser significativa la diferencia entre el extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral y el antígeno carcinoembrionario, y no así cualquier otra combinación. (Cuadro 21).

FUENTE DE VARIACION	t DE TABLAS	t CALCULADO	RESULTADO
Interacción C° - D°°	4,604	3,7291	No significativo
Interacción C - E°°°	4,604	5,4177	Significativo
Interacción D - E	4,604	1,6886	No significativo

Cuadro 21: Análisis por intervalos de Bonferroni de la significación entre los grados de purificación de CEA (Cuadro 20) $p < 0,05$.

°C: extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

°°D: fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral.

°°°E: antígeno carcinoembriónico puro.

Mezcla de sueros de concentración alta de antígeno carcino-embriónico.

Del análisis de varianza realizado se concluye que hay diferencias significativas entre antisueros de distintas sangrías, pero no de distintos animales. Tampoco hay diferencias cuando se comparan los distintos grados de purificación del antígeno o las interacciones (Cuadro 22).

FUENTE DE VARIACION	F DE TABLAS	F CALCULADO	RESULTADOS
Entre Animales	6,94	0,8478	No significativo
Entre Sangría	18,5	20,7734	Significativo
Entre Grado de purificación.	6,94	0,1039	No significativo
Interacción animal - sangría.	6,94	0,1666	No significativo
Interacción animal - grado de purificación.	6,39	1,5337	No significativo
Interacción sangría - grado de purificación.	6,94	0,8931	No significativo

Cuadro 22: Tratamiento de los resultados de reacción de radio-inmunoensayo para muestras de alta concentración de CEA (Cuadro 17) por análisis de varianza $p < 0,05$.

DISCUSION.

El rendimiento obtenido en el aislamiento de glicoproteínas de colon tumoral es de 0,098% (Cuadro 5). Carrico y col (6) al aislar el antígeno carcinoembriónico por extracción con ácido perclórico obtuvieron también un rendimiento bajo, ellos postularon que habría pérdida de un 70% de materiales no solubles en el ácido; en contradicción con esto otros autores (50) obtuvieron una mayor concentración del antígeno en extractos perclórico que salinos.

El ácido perclórico puede tener varios efectos, como producir agregación irreversible de glicoproteínas (36,59), eliminar residuos de ácido siálico, modificar otras partes de las cadenas de hidratos de carbono produciendo cambios estructurales (50), alterar o destruir subunidades de antígeno carcinoembriónico presentes en el tejido tumoral afectando la producción de anticuerpos (36), aunque algunos investigadores sostienen que el tratamiento con ácido perclórico no afecta la concentración original del antígeno carcinoembriónico, o que sólo elimina aquél que está asociado a condiciones normales (28,54,63), en este caso no se daría esta posibilidad ya que los rendimientos obtenidos a partir de colon

normal y tumoral son prácticamente iguales (0,095 y 0,098% respectivamente, Cuadros 4 y 5).

Las muestras de colon normal se comportaron de igual manera ya sea que proviniesen de autopsias de individuos enfermos no cancerosos o hubiesen sido extraídos a más de 8cms de un adenocarcinoma de colon, en este caso se puede considerar normal ya que el tumor no se extiende más de 6 ó 7 cms del extremo proximal o distal visible (22).

Al realizar el proceso de electroenfoque de los extractos perclóricos se obtuvieron sólo dos picos de proteína en el caso de colon normal (Gráficos 1A-B), siendo mayor la heterogeneidad para colon tumoral (Gráficos 2A-T), indicando esto la presencia de proteínas distintas a las de las condiciones normales. Se pudo identificar el antígeno carcinoembrionario por reacción de radioinmunoensayo en la fracción de pH 4,60-4,95, coincidiendo con los datos aportados por la literatura (7,70).

En la purificación de la fracción de electroenfoque por cromatografía en Sephadex G-200 se obtuvieron dos picos de proteína (Gráficos 4A-F) correspondiendo, de acuerdo a la calibración efectuada, el segundo al antígeno carcinoembrionario, el primero podría tratarse de un agregado molecular (36).

Al efectuar la marcación radioactiva se comprobó que a medida que se purificó el antígeno las actividades específicas alcanzadas disminuyeron y fueron bajas comparadas, por ejemplo, con las de materiales empleados en ensayos de hormonas, pero éstas generalmente son proteínas puras de bajo peso molecular, en cambio el antígeno carcinoembriónico tiene un peso molecular de aproximadamente 200.000 y es fundamentalmente una glicoproteína con una concentración de tirosina e histidina de tan sólo 0,057 y 0,072 $\mu\text{moles/mg}$ respectivamente (67), de modo que los sitios de unión para I son limitados, resultando bajas la eficiencia de marcación y la respectiva actividad específica.

Al analizar las electroforesis en geles de poliacrilamida se comprobó que las preparaciones del antígeno carcinoembriónico presentaron heterogeneidad que puede deberse al ácido siálico (4) aunque no pueden descartarse otros factores como estructura proteica, alteraciones durante el proceso de aislamiento como cambios en el pK de aminoácidos cargados debido a perturbaciones en la estructura terciaria, variaciones en el grado de sustitución de residuos de carbohidratos y grupos amida en la cadena peptídica. Al avanzar el grado de purificación la heterogeneidad disminuyó, pero

las bandas continuaron siendo difusas en la tinción de proteínas. El perfil radioactivo mostró una mayor heterogeneidad que la observada en la coloración, lo que indicaría que estos materiales están realmente constituidos por un conjunto de proteínas de características similares (13,45). En la tinción para glicoproteínas por el método de Schiff las bandas fueron definidas y se comprobó que el antígeno puro es homogéneo en cuanto a este tipo de compuestos ya que apareció una única banda (Figura 4).

Una vez obtenidos los antígenos se inmunizaron conejos con estos materiales en distintos estados de purificación (extracto bruto y antígeno puro) para comprobar si existen diferencias entre los antisueros obtenidos, o si presentan características semejantes y son igualmente útiles para la detección e identificación del antígeno carcinoembriónico. Se hicieron controles con antisueros de conejos inmunizados con extracto de colon normal.

Estos conejos respondieron en forma individual a los antígenos inyectados, pero se pudo observar, en general, al titular en forma semicuantitativa por inmunodifusión el contenido de IgM e IgG de los antisueros obtenidos (Cuadro 11) que se produjeron aumentos muy leves de IgM en los primeros

estadios de inmunización, disminuyendo luego; en cuanto al contenido de IgG fue oscilante, presentando aumento y luego disminución en algunos casos.

Es de destacar que el conejo 1 entre la segunda y tercera sangría recibió una serie de inyecciones similar a la dada hasta la primer sangría no habiéndose producido aumento de IgG y sí disminución de IgM, es decir que no habría habido una estimulación mayor de células productoras de estos anticuerpos, quizás debido a parálisis inmunológica por dosis alta de antígeno (42).

En el caso del conejo 2 se realizó la segunda sangría luego de una semana de haberse efectuado la primera sin haber recibido ninguna inyección en ese lapso, y se comprobó que el contenido de IgG se mantuvo constante a pesar de la falta de reestímulo, y se produjo un cierto aumento de IgM que pudo deberse a la permanencia del antígeno en la zona de inoculación y lenta salida (16).

Al analizar los resultados obtenidos con los antisueros de los conejos 3, 4 y 5 se observó que hubo aumento del contenido de IgM en todos los casos, hasta la primer sangría (luego de 9 semanas de inmunización y dos series de inyecciones), que luego disminuyó, volviendo a aumentar sólo una vez

a lo largo de todo el curso de la inmunización (Conejo 5, quinta sangría). En cambio hubo incremento del contenido de IgG en general hasta la segunda sangría, con posterior disminución y aumento. Los títulos alcanzados no fueron, en líneas generales, superiores a los logrados con el extracto de colon normal, a pesar que las dosis de antígeno inyectado fueron muy superiores, fundamentalmente hasta la primer sangría, es decir que la influencia de la cantidad de antígeno en la producción de anticuerpos es importante, pudiendo ocurrir un fenómeno de parálisis frente a la alta dosis empleada (42).

El conejo 4 recibió la última serie de inyecciones en una sola inoculación, a diferencia de los conejos 3 y 5 que la recibieron repartida en cuatro inyecciones, a pesar de esto el título de IgG ha sido el mismo para los tres antisueros, no así el de IgM que no pudo ser detectada para el conejo 4, es decir que las células de memoria de IgM habrían sido inhibidas frente a tan alta dosis de antígeno.

Los conejos inyectados con antígeno carcinoembrionario puro respondieron en forma similar a los inyectados con el extracto perclórico.

Se debe hacer notar que no es tan importante la cantidad de globulinas totales, sino la calidad del anticuerpo

obtenido, que sea específico y de alta capacidad de unión a los antígenos utilizados. En general con ocho series de inmunizaciones a lo largo de un año y cuatro meses no hubo variaciones notorias, se pudo observar en los resultados de radioinmunoensayo (Cuadro 15) que la capacidad de unión al extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral disminuyó en la tercera sangría y luego volvió a aumentar, pero la fracción de electroenfoque se mantuvo en general constante y alta, y para el antígeno puro aumentó hacia la tercera sangría y luego disminuyó, pero las variaciones fueron muy leves.

En el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de los antisueros obtenidos se comprobó que existió un aumento de proteínas de movilidad γ_1 con gran dispersión en todos los casos, pero es de destacar en los antisueros de los conejos inyectados con extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral un notable incremento en la zona de α_2 macroglobulinas. Ese aumento se debería en parte a IgM que corre asociada a α_2 (18), pero de acuerdo a la titulación por inmunodifusión esa inmunoglobulina aumenta fundamentalmente en la primer sangría y luego disminuye, siendo, entonces ese incremento de α_2 debido también a otras proteínas que se sintetizarían por efecto de la inmunización alcanzando

su valor máximo en la tercera sangría, luego de diez meses de inmunización y seis series de inyecciones, disminuyendo luego. Es destacable en las Figuras 8, 9 y 10 la aparición de dos bandas en la zona de α_2 , la superior que enseguida disminuye correspondería a IgM y la inferior a las otras proteínas de movilidad α_2 que aumentan. En el caso de los antisueros de los conejos inyectados con extracto normal no se produjo ese incremento de proteínas α_2 , y en los antisueros anti antígeno carcinoembrionario hubo un leve aumento, no tan importante como para los antisueros de los conejos 3, 4 y 5, pero debe tenerse en cuenta que la cantidad de proteína inyectada fue menor y el esquema de inmunización duró menos tiempo. En base a estos resultados se puede postular que esas proteínas α_2 son inducidas por antígenos cancerosos luego de períodos largos de inmunización y con altas dosis de antígeno; su función no está aclarada pero podría especularse que funcionan como anticuerpos.

Se analizó por inmunodifusión la reacción entre antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal frente al antígeno homólogo y al purificado por electroenfoque, en ambos casos fueron bajos los títulos de los antisueros de las distintas sangrías de los dos conejos. En el

caso del conejo 1 fueron iguales para ambos antígenos, y los títulos del conejo 2 fueron mayores para el extracto bruto que para la fracción de electroenfoque, habiendo un aumento para ésta en la segunda sangría, coincidiendo con los resultados de la titulación de IgM. Al enfrentar estos antisueros a los antígenos derivados de colon tumoral los títulos obtenidos también fueron bajos, aunque equiparables a los alcanzados con los antígenos normales, es decir que se verifica que existe reacción cruzada entre el antígeno normal y el tumoral (40, 49 , 52).

El tipo de antisuero usado es de primordial importancia en la determinación de diferencias o similitudes entre antígenos aislados de tejidos normal y tumoral. Tomita y col (68) obtuvieron un tipo de antisuero contra antígeno carcinoembriónico en conejo que reaccionó cruzado con un antígeno de colon normal presente en tejidos normal y tumoral confirmando que se comparten determinantes antigénicos entre el antígeno normal y el carcinoembriónico; otro antisuero obtenido en cobayo no reaccionó con el antígeno normal y sólo lo hizo con el carcinoembriónico, dando evidencias de un determinante específico del tumor; y un tercer tipo de antisuero obtenido en conejos o cobayos reaccionó igualmente bien con

ambos antígenos no pudiendo distinguir entre ellos. Una situación de este último tipo se cumpliría con nuestros antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal, ya que se vuelve a repetir con los resultados de radioinmunoensayo.

Al analizar los resultados de inmunodifusión de los sueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral frente al antígeno homólogo y la fracción de electroenfocue se vió que los títulos también fueron bajos siendo, en general superiores para el antígeno purificado que para el extracto bruto, fenómeno que se repitió al analizar los resultados de radioinmunoensayo; se puede justificar este hecho suponiendo que al purificar el extracto se eliminan determinantes que serían no precipitantes, o se liberan determinantes crítics que estarían ocultos en el extracto bruto (45), y que al reaccionar con el antisuero producen precipitación. También es notable que en varios casos aparecen dos bandas de precipitación con uno u otro antígeno, pero fundamentalmente con el purificado por electroenfocue. Esto indicaría la presencia de dos antígenos distintos en las muestras sembradas, aunque también puede deberse a la acción del complemento (58), o a la polimerización del antígeno (39) producida por acción del ácido perclórico (36, 59). Kleiman y col (38) ante un caso

parecido consideraron que se trataría de dos antígenos con estructura básica similar pero de diferente peso molecular. Esta posibilidad ha sido estudiada en el caso de moléculas pequeñas como dextranos (20) pero no se puede descartar para moléculas grandes como el antígeno carcinoembriónico.

No se obtuvieron bandas de precipitación entre el antígeno carcinoembriónico puro y ningún antisuero y tampoco entre los antisueros anti antígeno carcinoembriónico y ningún antígeno, debido, quizás, a que las concentraciones utilizadas no fueron las adecuadas, no pudiéndose repetir las reacciones por falta de materiales.

En el análisis de las inmunolectroforesis del extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral frente a los antisueros homólogos se comprobó que cualquiera fuera el estado de inmunización de los animales, siempre se revelaron bandas de movilidad β , características del antígeno carcinoembriónico (50) (Figura 21). Este tipo de bandas no fueron reveladas por antisuero humano normal, es decir que no presentaría anticuerpos capaces de reaccionar con el antígeno carcinoembriónico. También se enfrentó a los sueros de los conejos inyectados con extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal produciéndose únicamente una banda con esas

características contra el antisuero obtenido en la primer sangría del conejo 1 (Figura 22) o sea que en esas circunstancias presentaría anticuerpos a los determinantes del antígeno carcinoembrionario que luego desaparecerían. Tampoco hubo reacción al enfrentarlo a antisuero anti grupo sanguíneo A (Figura 22), indicando que no existe reacción cruzada entre este grupo sanguíneo y el antígeno carcinoembrionario (44).

Se hicieron los mismos tipos de análisis con la fracción de pH 4,60-4,95 de electroenfoque de extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral (Figura 23). En el caso del conejo 3 se revelaron bandas β con los antisueros de primera y segunda sangría, pero no con el de tercera sangría, coincidiendo con los resultados de inmunodifusión ya que en este estadio es cuando se detectó el menor título para ese antígeno; con los antisueros de las sangrías posteriores se vuelve a revelar esa banda. Los conejos 4 y 5 se comportaron de manera similar detectándose bandas β recién a partir de los antisueros de tercera sangría. Al enfrentar esta fracción a los antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon normal, anti suero humano normal y anti grupo sanguíneo A no se revelaron bandas de movilidad β ; estos resultados coinciden con los observados por Coligan y col (8).

También se enfrentaron otras fracciones de electroenfoque a los antisueros que habían revelado las mejores bandas β frente a la fracción de pH 4,60-4,95, en ningún caso hubo bandas de este tipo, es decir que el antígeno carcinoembrionario sólo estaría presente en esta última fracción.

Otro tipo de análisis que se realizó fue radioinmunoensayo, trabajándose con los distintos antisueros y antígenos obtenidos.

Se titularon los antisueros de los conejos 1 y 2 frente a los antígenos homólogos y se obtuvieron títulos altos (Cuadro 14), siendo en el caso del conejo 2 mayores para la fracción de electroenfoque que para el extracto bruto, hecho opuesto a lo observado en la inmunodifusión (Cuadro 12); pero se debe tener en cuenta que el método de radioinmunoensayo tiene mayor sensibilidad.

También se titularon esos antisueros frente a los antígenos de origen tumoral resultando ser bajos los títulos para el extracto bruto y la fracción de electroenfoque (Cuadro 14), en cambio para el antígeno puro se obtuvieron títulos relativamente altos, o sea que se produciría una fuerte reacción cruzada que confirmaría la existencia de determinantes comunes entre el antígeno tumoral y los normales, recordemos que el antígeno

carcinoembrionario da reacción cruzada con NCA (40), NGP (49) y NFA (52). En el caso del extracto bruto o la fracción de electroenfoque puede ocurrir que ante la presencia de contaminantes esos determinantes comunes estén enmascarados y no se encuentren disponibles para reaccionar con los anticuerpos a las proteínas normales de colon, pero al purificar el antígeno existe la posibilidad de reacción cruzada por lo que se obtienen títulos altos.

Los títulos de los sueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral fueron bajos para el antígeno homólogo, altos para la fracción de electroenfoque y muy bajos para el antígeno puro (Cuadro 15) repitiéndose el fenómeno ya observado en inmunodifusión, donde en general los títulos fueron más altos para la fracción de electroenfoque que para el extracto bruto. Podría ocurrir que las proteínas de esa fracción sean más altamente inmunogénicas que el resto de las proteínas presentes en el extracto bruto y se fabriquen fundamentalmente anticuerpos a ellas y por eso la reacción antígeno-anticuerpo sería más poderosa con el extracto purificado que el bruto. Otra posibilidad sería que los determinantes antigénicos estuviesen enmascarados por la presencia de gran cantidad de materiales y al purificar puedan reaccionar más

fácilmente. También puede suceder que como resultado de la purificación haya una pérdida de residuos de ácido siálico, éstos producen una hidratación rígida de la molécula de glicoproteína de modo que reducen su capacidad de unión al correspondiente anticuerpo, de tal forma sería menor la posibilidad de unión con el extracto bruto que con la fracción de electroenfoque. Este fenómeno es observable también con muestras de antígeno carcinoembrionario de origen gástrico que tienen mayor cantidad de ácido siálico que el aislado de colon y presentan menor capacidad de unión a anticuerpos (4). Se puede suponer, también, que en la fracción de electroenfoque se pongan en evidencias determinantes crípticos por desdoblamiento de la molécula, que estarían ocultos en el extracto bruto (45). Otra posibilidad es que en el extracto bruto haya proteínas agregadas que serían incapaces de responder en el radioinmunoensayo (36). Llamo la atención por los títulos para el antígeno carcinoembrionario puro sean bajos, en general menores que con los antisueros al extracto normal. Esto podría deberse a que el tiempo de incubación del antígeno con el antisuero no haya sido suficiente para llegar al equilibrio Ag-Ac, o que no se haya alcanzado el equilibrio de precipitación en el lapso que media entre el agregado del sulfato de amonio y la centrifugación (53).

Ante la posibilidad que se hubiera producido un fenómeno de parálisis inmunológica por alta dosis de antígeno (42) se decidió inyectar un animal (conejo N° 6) con baja dosis de antígeno carcinoembrionario puro, menor que la cantidad que contenía el extracto bruto inyectado. Se titularon esos anticueros y se comprobó que los títulos fueron muy bajos para los tres antígenos de origen tumoral (Cuadro 16), es decir que se podría descartar la posibilidad de parálisis.

Se inyectó también un animal (conejo N° 7) con cantidades de antígeno carcinoembrionario puro equivalentes a la cantidad de extracto bruto inyectado, se comprobó en este caso que en la primer sangría los títulos fueron bajos, pero en la segunda sangría, luego de dos series de inyecciones se alcanzaron títulos altos para la fracción de electroenfocue del extracto tumoral y relativamente altos para el extracto y el antígeno puro, mayores que los logrados con los anticueros de los conejos N° 3, 4 y 5 (Cuadro 16). Esta situación puede ser debida a que al inyectar el extracto bruto se origine una competencia intermolecular entre los distintos antígenos presentes en el inóculo, entre los que se encuentra el carcinoembrionario; es un hecho que un gran exceso de un determinado antígeno puede suprimir la respuesta a otro que se encuentra en menor

relación (65), debemos tener en cuenta que la concentración del antígeno carcinoembriónico en el extracto bruto es baja: 3,55% (Cuadro 9) lo que justificaría esta postulación.

Se proyectó realizar mediciones de antígeno carcinoembriónico por radioinmunoensayo utilizando todos los antisueros obtenidos, pero por razones económicas sólo pudo efectuarse con alguno de ellos, seleccionándose, entonces, aquellos antisueros anti extracto perclórico de glicoproteínas de colon tumoral que habrían dado los mayores títulos para el antígeno puro y los menores para el extracto bruto (tercera sangría) y viceversa (quinta sangría) (Cuadro 15). Se utilizaron como proteína standard y trazador el mismo material, ya sea extracto bruto, fracción de electroenfoque o antígeno puro. Se dosaron muestras de mezclas de sueros con baja o alta concentración de antígeno carcinoembriónico que habían sido previamente medido con productos comerciales, en los que los antisueros provienen de animales inyectados con extractos de metástasis de tumor de colon. Se encontraron, en general, coincidencias con los dos métodos comparados, sobre todo para concentraciones bajas del antígeno.

Se hizo un análisis estadístico de los datos obtenidos y se encontró que al trabajar con muestras de concentración

baja sólo se producen diferencias significativas al considerar los grados de purificación del antígeno usado como standard y trazador, y específicamente entre el extracto bruto y el antígeno puro, pero los resultados equivalentes cualquiera sea el antisuero que se use. En la medición de muestras de concentraciones altas del antígeno carcinoembriónico se producen diferencias significativas sólo al analizar las distintas sangrías de los animales estudiados. Si se comparan los resultados con los de los otros métodos de radioinmunoensayo es posible postular que resultan más confiables los obtenidos con los antisueros de quinta sangría.

Los estudios futuros se orientan hacia la obtención de anticuerpos monoclonados de una dada especificidad. Acolla y col (1) fusionaron células de bazo de ratones inmunizados con antígeno carcinoembriónico puro con una línea celular de mieloma obteniendo así híbridos secretantes de anticuerpos que reaccionaron específicamente con determinantes del antígeno carcinoembriónico. Esos anticuerpos serían producidos en forma ilimitada una vez establecida la línea celular y podrían ser utilizados como reactivo standard para radioinmunoensayo.

Hasta tanto esto suceda se deberá tener en cuenta, de acuerdo a los resultados aquí expuestos, que para cubrir un

amplio rango de concentraciones de antígeno carcinoembrionario en el dosaje de ese marcador tumoral en el suero de pacientes bajo control periódico de enfermedad por reacción de radioinmunoensayo, es suficiente purificar el antígeno que se usará como trazador y standard hasta la etapa de electroenfocue del extracto perclórico de colon tumoral, ya que los resultados no presentan diferencias con los obtenidos al usar el antígeno puro, y además los antisueros presentan altos títulos para esa fracción; se pueden utilizar antisueros obtenidos por inoculación de animales con extractos de metástasis o de tumor primario libre de tejidos normales. Sería interesante probar el antisuero correspondiente al conejo 7 que al ser inyectado con cantidades de antígeno puro equivalentes a las presentes en el extracto bruto rindió elevados títulos de anticuerpos.



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Accolla, R.S.; Carrel, C.; Mach, J.P. Monoclonal antibodies specific for carcinoembryonic antigen and produced by two hybrid cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 563-566, 1980.
- 2.- Arnon, R.; Bustin, M.; Calef, E.; Chatchick, S.; Haimovich, J.; Novik, N.; Sela, M. Immunological cross-reactivity of antibodies to a synthetic undecapeptide analogous to the amino terminal segments of carcinoembryonic antigen, with the intact protein and with human serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 2123-2127, 1976.
- 3.- Baldi, A. Radioinmunoanálisis en oncología. *Acta Bioq. Clin. Lat.* 14: 339-351, 1980.
- 4.- Banjo, C.; Shuster, J.; Gold, P. Intermolecular heterogeneity of the carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 34: 2114-2121, 1974.
- 5.- Burtin, P.; von Kleist, S.; Sabine, M.C. Loss of normal colonic membrane antigen in human cancers of the colon. *Cancer Res.* 31: 1038-1041, 1971.
- 6.- Carrico, R.J.; Usategui-Gómez, M. The isolation of carcinoembryonic antigen from tumor tissue at neutral pH.

- Cancer Res. 35: 2929-2934, 1975.
- 7.- Coligan, J.E.; Henkart, P.; Tood, C.; Terry, W. Heterogeneity of the carcinoembryonic antigen. *Immunochemistry*. 10: 591-599, 1973.
 - 8.- Coligan, J.E.; Lautenschlager, J.; Egan, M.; Tood, C. Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen. *Immunochemistry*. 9: 377-386, 1972.
 - 9.- Chao, H.; Peiner, S.; Aach, R.; Parker, C. Introduction of cellular immunity to a chemically altered tumor antigen. *J. Immunol.* 111: 1800-1803, 1973.
 - 10.- David, G.S.; Reisfeld, R.A.; Chino, T.H. Continuous production of carcinoembryonic antigen in hollow fiber cell culture units. *J. Natl. Cancer Inst.* 60: 303-306, 1978.
 - 11.- Davis, B.; Ornstein, L. Disc electrophoresis, acrylamide gel columns. In Williams, C. and Chase, M. (Eds.) *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Vol.II pag 38-47, New York, Academic Press, 1968.
 - 12.- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356, 1956.
 - 13.- Edgington, T.; Asterita, P.; Plow, E. Association of an isomeric species of carcinoembryonic antigen with neoplasia

- of the gastrointestinal tract. N. Eng. J. Med. 293: 103-107, 1975.
- 14.- Egan, M.L.; Lautenschlager, J.T.; Coligan, J.E.; Tood, C.M. Radioimmune assay of carcinoembryonic antigen. Immunochemistry. 9: 289-299, 1972.
- 15.- Egan, M.L.; Eritchard, D.; Tood, C.; Co, W. Isolation and immunochemical and chemical characterization of carcinoembryonic antigen-like substances in colon lavages of healthy individuals. Cancer Res. 37: 2638-2642, 1977.
- 16.- Eisen, H.N. Antibody formation. En Davis, B.D.; Dulbecco, P.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. (Eds.) Microbiology, pag. 420-450, New York, Harper and Row Pub., 1980.
- 17.- Ellison, M.L.; Lamb, D.; Rivett, J.; Munro Neville, A. Quantitative aspects of carcinoembryonic antigen output by a human lung carcinoma cell line. J. Nat. Cancer Inst. 59: 309-312, 1977.
- 18.- Fahey, J.L.; Terry, E. W. Ion exchange chromatography and gel filtration. En Weir, D. M. (Ed.) Handbook of experimental Immunology, Vol. I pag 8.1-8.16, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1978.
- 19.- Farr, P.S. A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between 125 I-BSA and antibody. J. Infect.

- Dis. 103: 239-262, 1958.
- 20.- Flinger, I.; Kabat, E.A.; Bezer, A.E.; Kidd, A. Agar diffusion studies in the dextran-antidextran system. *J. Immunol.* 84: 227-230, 1960.
- 21.- Fuks, A.; Banjo, C.; Shuster, J.; Freedman, S.O.; Gold, P. Carcinoembryonic antigen (CEA). Molecular biology and clinical significance. *Biochem. Biophys. Acta.* 417: 123-152, 1975.
- 22.- Gold, P. Antigenic reversion in human cancer. *Ann. Rev. Med.* 22: 85-94, 1971.
- 23.- Gold, P.; Freedman, S. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122: 467-481, 1965.
- 24.- Gold, P.; Gold, M.; Freedman, S.O. Cellular location of carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *Cancer Res.* 28: 1331-1334, 1968.
- 25.- Gold, P.; Krupey, J.; Ansari, H. Position of the carcinoembryonic antigen of the human digestive system in ultrastructure of tumor cell surface. *J. Natl. Cancer Inst.* 45: 219-225, 1970.
- 26.- Nakonori, S.; Murakami, W. E. Glycolipids of hamsters fibroblast and derived malignant transformed cell lines.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 59: 254-261, 1968.
- 27.- Hamada, S.; Hamada, S. Localization of carcinoembryonic antigen in medullary thyroid carcinoma by immunofluorescent techniques. Br.J. Cancer. 36: 572-576, 1977.
- 28.- Hansen, H.J.; Primus, F.J.; Mac Donald, R.; La Fontaine, G.S. Assay of carcinoembryonic antigen activity of plasma with a solid phase radioimmunoassay employing ^{125}I -labeled affinity purified anti carcinoembryonic antigen. Fed. Proc. 35: 275, 1976.
- 29.- Harvey, S.R.; Chu, F.M. Demonstration of two molecular variants of carcinoembryonic antigen by concavalin A Sepharose affinity chromatography. Cancer Res. 35: 3001-3008, 1975.
- 30.- Hellström, I.; Sjögren, H.A.; Warner, G.A.; Hellström, K.E. Blocking of cell mediated tumor immunity by sera from patients with growing neoplasms. Int. J. Cancer. 7: 226-237, 1971.
- 31.- Huitric, E.; Laumonier, R.; Burtin, P.; von Kleist, S.; Chevanel, G. An optical and ultrastructural study of the localization of carcinoembryonic antigen (CEA) in normal and cancerous human rectocolonic mucosa. Lab. Inv. 34: 97-107, 1976.

- 32.- Hunter, W.H.; Greenwood, F.C. A radioimmuno-electrophoretic assay for human growth hormone. *Biochem. J.* 91: 43-64, 1964.
- 33.- Ichiki, A.T.; Wenzel, K.L.; Quirin, Y.P.; Lange, R.D.; Eveleigh, J. Immunochemical studies of carcinoembryonic antigen (CEA) variants. *Brit. J. Cancer.* 33: 273-278, 1976.
- 34.- Ito, S. Structure and function of the glycocalyx. *Fed. Proc.* 28: 12-25, 1969.
- 35.- Jacob, F.; Monod, J.J. Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318-356, 1961.
- 36.- Kimball, P.M.; Brattain, M.G. A comparison of methods for the isolation of carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 38: 619-623, 1978.
- 37.- King, T.P. Chromatography on cross-linked dextran gels (Sephadex). In: Williams, C.; Chase, M. (Eds.) *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Vol. II. Pag. 135-142. New York, Academic Press, 1968.
- 38.- Kleinman, M.S.; Harwell, L.; Turner, M.D. Studies of colonic carcinoma antigens. *Gut.* 12: 1-10, 1971.
- 39.- von Kleist, S.; Burtin, P. Isolation of a fetal antigen from human colonic tumors. *Cancer Res.* 29: 1961-1964, 1969.
- 40.- von Kleist, S.; Chevanel, G.; Burtin, P. Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts

- with the carcinoembryonic antigen. Proc. Natl. Sci. USA. 69: 2492-2494, 1972.
- 41.- Krupey, J.; Gold, P.; Freedman, S. Physicochemical studies of the carcinoembryonic antigens of the human digestive system. J. Exp. Med. 128: 387-398, 1968.
- 42.- Lachmann, P.J. Immunological tolerance and unresponsiveness. En Hobart, M.J.; Mc Connell, I. (Eds.) The immune system, pag. 152-164. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1978.
- 43.- Laurence, D.; Stevens, U.; Bettelheim, R.; Darcy, D.; Leese, C.; Turberville, C.; Alexander, P.; Johns, E.; Munro Neville, A. Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal, mammary and bronchial carcinoma. Br. Med. J. 3: 605-609, 1972.
- 44.- Laurence, J.R.; Munro Neville, A. Foetal antigens and their role in the diagnosis and clinical management of human neoplasms. Br. J. Cancer. 26: 335-355, 1972.
- 45.- Leung, J.P.; Plow, E.F.; Eshdat, Y.; Marchesi, V.; Edgington, T.S. Delineation of three classes of CEA antigenic determinants: identification of membrane-associated CEA as an independent species of CEA. J. Immunol. 119: 271-276, 1977.
- 46.- LKB 7900 Uniphor columns electrophoresing system. Instruc-

- tions manual. LKB-Produkter. AB(Ed.) Sweden. 1970.
- 47.- Lo Gerfo, P.; Krupcey, J.; Hansen, H. Demonstration of an antigen common to several varieties of neoplasia. N. Eng. J. Med. 285: 138-141, 1971.
- 48.- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Randall, E.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 295-275, 1951.
- 49.- Mach, J.P.; Pusztaszeri, G. Carcinoembryonic antigen (CEA): demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein. Immunochemistry. 9: 1031-1034, 1972.
- 50.- Martin, F.; Martin, M.S. Demonstration of antigens related to colonic cancer in the human digestive system. Int. J. Cancer. 6: 352-360, 1970.
- 51.- Matsuoka, Y.; Koga, Y.; Maruta, H.; Yoshino, M.; Tsuru, E. Proteolytic release of antigenic fragments corresponding to normal fecal antigen and non-specific cross-reacting antigen from carcinoembryonic antigen. Int. J. Cancer. 21: 604-610, 1978.
- 52.- Matsuoka, Y.; Tsuru, E.; Sawada, H. Preparation and evaluation of antisera directed against cancer specific moiety of antigenic determinants on carcinoembryonic antigen. Immunochemistry. 12: 779-782, 1975.

- 53.- Minden, P.; Farr, R.S. Ammonium sulphate method to measure antigen-binding capacity. En Weir, D.M.(Ed.) Handbook of Experimental Immunology. Vol. I. pag. 13.1-13.22. Oxford. Blackwell. Scientific Publications, 1978.
- 54.- Mistretta, A.P.; Bartorelli, A.; Golferini, A.; Tassi, G.C.; De Barbieri, A.; Accini, R. CEA isolation from hepatic metastases of primary colon adenocarcinoma and preparation of specific antiserum. Boll. Ist. Sieroterap. Milan. 52: 327-332, 1973.
- 55.- Monod, J. Summary of Symposium. En Gelhorn, E.; Hirschberg, E. (Eds.) Basic problems in neoplastic disease, pag. 218, New York. Columbia Univ. Press, 1962.
- 56.- Nairn, R.C.; Fethergill, J.E.; Mc Entegart, M.G.; Richmond, H.G. Loos of gastrointestinal-specific antigen in neoplasia. Br. Med. J. 1: 1791-1793, 1962.
- 57.- Outcherlony, O. Antigen-antibody reactions in gels. Arch. Kemi. Mineral.Geol. 268: 1-9, 1949.
- 58.- Paul, W.E.; Benacerraf, B. Problems encountered in double diffusion analysis in agar of hapten specific immune system I. Complement dependent precipitation. J. Immunol. 95: 1067-1073, 1966.
- 59.- Rule, A.; Goleski-Reilly, C. Phase-specific oncocolon

- antigens: a theoretical framework for carcinoembryonic antigen specificities. *Cancer Res.* 34: 2083-2087, 1974.
- 60.- Scheffe, H. The analysis of variance. John Wiley and Sons, Inc. 1959.
- 61.- Scheidegger, J.J. Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. *Int. Arch. Allergy.* 7: 103-110, 1955.
- 62.- Segrest, J.P.; Jackson, R.L. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulphate. *Methods Enzymol.* 32: 54-63, 1972.
- 63.- Slayter, H.S.; Coligan, J.E. Characterization of carcinoembryonic antigen fractionated by concanavalin A chromatography. *Cancer Res.* 36: 1696-1704, 1976.
- 64.- Stonchill, E.H; Bendich, A. Retrogenetic expression: the reappearance of embryonal antigens in cancer cells. *Nature, Lond.* 228: 370-372, 1970.
- 65.- Taussig, M.J. Antigenic competition. En Hobart, M.J.; McConnell, I. (Eds.) *The immune system*, pag. 165-178. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1973.
- 66.- Thomas, P.; Hems, D.A. The hepatic clearance of circulating native and asialo carcinoembryonic antigen by the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 1205-1209, 1975.
- 67.- Thomson, D.; Krupay, J.; Freedman, S.; Gold, P. The radio-

- immunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. Proc. Natl. Acc. Sci. USA. 64: 161-167, 1969.
- 68.- Tomita, J.T.; Safford, J.W.; Hirata, A.A. Antibody response to different determinants on carcinoembryonic antigen. Immunology, 26: 291-298, 1974.
- 69.- Travis, J.C. Fundamentals of RIA and other ligand assays. California, Scientific Newsletters Inc, 1977.
- 70.- Turner, M.; Olivares, E.; Harwell, L.; Kleinman, M. Further purification of perchlorate-soluble antigens from human colonic carcinomata. J. Immunol. 108: 1328-1339, 1972.
- 71.- Westwood, J.H.; Thomas, P.; Edwards, R.C.; Scopes, P.M.; Barrett, M.W. Chemical modifications of the proteins of carcinoembryonic antigen: associated changes in immunological activity and conformation. Br. J. Cancer. 37: 183-189, 1978.

W. Turner

ORD.