Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Obtención y caracterización del anticuerpo monoclonal Fc-5.01, reactivo con cáncer de mama, melanoma y otros tumores humanos

Barrio, María Marcela

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:
Barrio, María Marcela. (1998). Obtención y caracterización del anticuerpo monoclonal Fc-5.01, reactivo con cáncer de mama, melanoma y otros tumores humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3087_Barrio.pdf

Cita tipo Chicago:
Barrio, María Marcela. "Obtención y caracterización del anticuerpo monoclonal Fc-5.01, reactivo con cáncer de mama, melanoma y otros tumores humanos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3087_Barrio.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL FC-5.01, REACTIVO CON CÁNCER DE MAMA, MELANOMA Y OTROS TUMORES HUMANOS

Autora
María Marcela Barrio

Director de Tesis
Dr. José Mordoh

Lugar de Trabajo: **Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar"**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
Orientación: Ciencias Biológicas

1998

N° 0874

RESUMEN

Con el objeto de producir anticuerpos monoclonales (AMCs) dirigidos contra antígenos (Ags) expresados por células tumorales indiferenciadas, los cuales podrían ser comunes a varias neoplasias, se utilizaron las células IIB-BR-G como inmunógeno. Esta línea celular de carcinoma mamario presenta características sumamente indiferenciadas y fue derivada de un tumor primario de mama altamente indiferenciado, que no expresa receptores hormonales. Se seleccionó un AMC denominado FC-5.01 (IgG2a), el cual reconoce distintos carcinomas humanos y el 100% de los melanomas malignos. Su reactividad con la mayoría de los tejidos normales es escasa, ya que FC-5.01 reconoce algunas células del sistema neuroendócrino, macrófagos y algunos túbulos contorneados proximales en el riñón, mayormente con un patrón intracelular.

A nivel bioquímico, el Ag reconocido por FC-5.01 es una glicoproteína heterogénea (banda ancha con un peso molecular de 30-60 kDa) en melanomas y carcinomas humanos. El epitope reside en el núcleo protéico (25kD) y es presumiblemente conformacional, con puentes disulfuro implicados en el reconocimiento del AMC. En esta Tesis se demuestra que FC-5.01 reacciona con el Ag CD63, inicialmente descripto como un Ag asociado a melanoma, y miembro de la superfamilia Tetraspan o Tetraspaninas. La reactividad de FC-5.01 con CD63 se demostró por Western blot, con ensayos de inmunodepleción con otro anticuerpo anti-CD63 y por análisis de FACS (fluorescence activated cell sorting) de la línea celular de melanoma KM3 (CD63-negativa) luego de la transfección con la copia genómica de CD63. El epitope reconocido por el AMC FC-5.01 es diferente del reconocido por otro AMC anti-CD63 (ME491), como se demostró por un radioimmunoensayo de inhibición cruzada. Opuestamente a lo propuesto para el AMC ME491, no se observaron diferencias significativas en la expresión de CD63 entre melanomas primarios y metastásicos usando AMC FC-5.01, por medio de inmunohistoquímica.

Por inmunofluorescencia indirecta realizada a 4°C con células vivas, se determinó que el Ag reconocido por FC-5.01 está presente en las membranas plasmáticas de células IIB-BR-G y otras células neoplásicas. En células permeabilizadas, FC-5.01 co-localiza con el colorante naranja de acridina en vesículas acídicas (compartimiento lisosomal/endosomal). Por análisis de Scatchard realizado con células IB-BR-G, se calculó una constante de afinidad de $1.4 \pm 0.4 \times 10^7\ M^{-1}$ y 2.1×10^6 sitios antigénicos por célula.

El AMC FC-5.01 no media reacciones citotóxicas contra células $CD63^+$ (fijación de complemento ni ADCC= antibody dependent cellular cytotoxicity), pero el complejo FC-5.01-CD63 es eficientemente internalizado hacia vesículas intracitoplasmáticas, como se observó en un ensayo de inmunofluorescencia posterior a la incubación a 37°C. El catabolismo celular del AMC unido por las células IIB-BR-G se estudió usando [^{125}I]-FC-5.01. Luego de 18 hs a 37°C, >70% de la radioactividad se encontró en el sobrenadante del cultivo como fragmentos degradados (TCA-solubles). En células IIB-BR-G se demostró rápida re-expresión del Ag luego de la internalización. El AMC FC-5.01 disminuyó la migración de células $CD63^+$ en un ensayo de cámara de Boyden. Estas propiedades permitirían el uso del AMC FC-5.01 como un vehículo para dirigir diferentes compuestos dentro de células $CD63^+$.

Luego de haber logrado la radioinmunolocalización de xenotransplantes de carcinoma mamario humano creciendo en ratones nude (IIB-BR-G_{NUDE}) con [^{125}I]-FC-5.01,se formuló un kit de marcación en un paso, para obtener [^{99m}Tc]-FC-5.01, con posible utilidad en diagnóstico por imágenes. Este kit se preparó por reducción del AMC con 2-mercaptoetanol y la adición de difosfonato de metileno (MDP) como ligando transquelante. Luego de la marcación con [^{99m}Tc] eluído de generador, las especies marcadas se analizaron por ITLC (instant thin layer chromatography) y HPLC (high performance liquid chromatography). La eficiencia

de marcación fue superior al 90% y la conservación de la inmunoreactividad se verificó con células IIB-BR-G. En el modelo IIB-BR-G_{NUDE} se realizaron biodistribuciones e imágenes en cámara gamma con [^{99m}Tc]-FC-5.01. A las 24 hs la radioactividad se incrementó en los tumores (14.4 ± 5.3 % de la dosis inyectada/ gr tumor) y disminuyó en la sangre y los principales órganos, y los tumores se radioinmunodetectaron perfectamente en la cámara gamma. Los controles de calidad demostraron que el kit resulta estable por un período de hasta 120 días. Alícuotas de este mismo kit se inyectaron a dos pacientes con melanoma maligno (0.5 mCi/paciente), y en uno de ellos fue posible localizar, a las 24 hs, una metástasis en un gánglio linfático axilar, que ya había sido detectada por medio de tomografía computada. Este kit preparado para radioinmunodetección (RID) *in vivo* podría ser utilizado en el futuro con fines diagnósticos en pacientes con melanoma u otros tumores CD63$^+$.

Dados estos resultados, se utilizó el mismo modelo *in vivo* para experimentos de radioinmunoterapia (RIT). Se investigó la capacidad de [^{131}I]-FC-5.01 para controlar el crecimiento de los tumores IIB-BR-G_{NUDE}. En un primer experimento de RIT se observó una inhibición significativa del crecimiento tumoral ($p<0.05$) en animales portadores de tumor, tratados con [^{131}I]-FC-5.01 (900 μCi) fraccionados en tres dosis semanales, respecto de los animales control. Se observó cierto grado de toxicidad hematológica (pérdida de peso corporal, hipoplasia de la médula ósea, bajos recuentos de leucocitos totales). No se observaron regresiones o curas. También se observó incremento de la probabilidad de supervivencia debida al tratamiento con [^{131}I]-FC-5.01 en uno de los experimentos. El nivel de toxicidad fue disminuído reduciendo la dosis de [^{131}I]-FC-5.01 y por administración de G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) como complemento de la RIT.

Palabras clave: anticuerpo monoclonal FC-5.01; Ag CD63, internalización radioinmunodetección, radioinmunoterapia.

Los resultados presentados en esta Tesis fueron parcialmente publicados en:

- Ballare C., **Barrio M M,** Portela P and Mordoh J. **Functional properties of FC-2.15, a monoclonal antibody that mediates human complement cytotoxicity against breast cancer cells.** Cancer Immunology Immunotherapy 41: 15-22, (1995).

- **Barrio M M,** Bravo A I, Portela P, Hersey P, Mordoh J. **A New epitope on human melanoma-associated antigen CD63/ME491 expressed by both primary and metastatic melanoma.** Hybridoma 17: 355-364 (1998).

- Bover L, **Barrio M M,** Bravo I A, Slavutsky I, Larripa I, Bolondi A, Ayala M and Mordoh J. **The human breast cancer cell line, IIB-BR-G has amplified *c-myc* and *c-fos* oncogenes *in vitro* and is spontaneously metastatic *in vivo*.** Cellular Molecular Biology 44: 493-504, (1998).

- **Barrio, M M,** Viaggi M, Donaldson M, Portela P, Bover L, Mordoh J and Castiglia, S G de. **Tumor imaging with ^{99m}Tc-labeled FC-5.01 monoclonal antibody using a single step labeling method**. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry (aceptado, en prensa) (1999).

- **Barrio M M,** Portela P and Mordoh J. **Monoclonal antibody FC-5.01, directed against CD63 antigen, is internalized into cytoplasmic vesicles in the IIB-BR-G human breast cancer cell line.** (enviado a publicación, Septiembre de 1998).

TITTLE: **PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY FC-5.01, REACTIVE WITH BREAST CANCER, MELANOMA AND OTHER HUMAN TUMORS**

AUTHOR: **María Marcela Barrio**

DIRECTOR: **Dr. José Mordoh**

INSTITUTION: **Instituto de Investigaciones Bioquímicas, F.C.E. y N y "Fundación Campomar".**

ABSTRACT

In a research project directed to produce monoclonal antibodies (mAbs) towards undifferentiation antigens (Ags), which could be common to several tumors, immunization with extremely undifferentiated tumor cells was attempted. One of such cells is the human breast cancer cell line, IIB-BR-G, developed in our laboratory and derived from a highly undifferentiated breast tumor. A mAb designated FC-5.01(IgG2a) was selected, that binds to several human carcinomas and malignant melanoma. It has null or very low reactivity with most human normal tissues, with the exception that FC-5.01 binds to some cells from the neuroendocrine system, macrophages and some renal proximal convolute tubules.

Biochemical studies indicate that FC-5.01 recognizes an heterogeneous glycoprotein (broad band between 30-60 kDa) in melanoma tumors. The epitope resides in the protein core and is presumably conformational, with disulphide bonds implicated in mAb recognition. In this Thesis it is demonstrated that mAb FC-5.01 reacts with CD63 Ag, which has been initially described as a melanoma-associated Ag, and is a member of the tetraspan superfamily. Reactivity of mAb FC-5.01 with CD63 was demonstrated by Western blot, immunodepletion assays and FACS analysis of the CD63-negative melanoma cells (KM3) after transfection with the genomic copy of CD63. The epitope recognized by mAb FC-5.01 is different from the epitope recognized by another anti-CD63 mAb, ME491, as

shown by an inhibition radioimmunoassay. Opposite to what has been stated for mAb ME491, no significant differences were found in CD63 expression between primary and metastatic melanoma using mAb FC-5.01.

The Ag recognized by mAb FC-5.01 is located in the plasma membranes of IIB-BR-G and other neoplastic cells, as detected by indirect immunofluorescence performed at 4°C on live cells. When the cells are permeabilized, mAb FC-5.01 recognizes acidic vesicles which colocalize with acridine orange (lysosomal/ endosomal compartment). Scatchard plot analysis performed on IB-BR-G cells demonstrated a $1.4 \pm 0.4 \times 10^7$ M^{-1} affinity constant and 2.1×10^6 antigenic sites per cell.

mAb FC-5.01 is not able to mediate C (complement) fixation or antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) towards $CD63^+$ cells, but the FC-5.01-CD63 complex is efficiently internalized into cytoplasmic vesicles, as shown by an acid wash immunofluorescence assay. Cellular catabolism of the bound antibody by IIB-BR-G cells was studied using [^{125}I]-FC-5.01. At 18 hs, >70% of the radioactivity was present in the supernatant as degraded fragments (TCA-soluble). After internalization, rapid Ag re-expression could be demonstrated in IIB-BR-G cells. mAb FC-5.01 diminished migration of $CD63^+$ cells, in a Boyden chamber assay. These properties would enable to use mAb FC-5.01 as a vehicle to target different compounds inside $CD63^+$ cells.

After demonstrating positive radioimmunolocalization with [^{125}I]-FC-5.01 of human breast growing in nude mice, a one-step labelling kit was specially formulated for this mAb in order to obtain [^{99m}Tc]-FC-5.01. This kit was produced by mAb reduction with 2-mercaptoethanol and by adding methylene diphosphonate (MDP) as the transchelating ligand. The labeled species were analyzed by instant thin layer chromatography (ITLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Labeling efficiency was greater than 90%. Immunoreactivity was assessed on IIB-

BR-G cells. Biodistribution of [^{99m}Tc]-labeled mAb FC-5.01 and tumor imaging were performed in nude mice bearing breast cancer IIB-BR-G_{NUDE} xenografts. At 24 hs accumulation of [^{99m}Tc] increased in tumor (14.4 ± 5.3 % injected dose/ gr tumor) and decreased in blood and most organs. Quality control tests demonstrated that the kit was stable for up to 120 days. Therefore, animal studies demonstrated good and specific *in vivo* tumor targeting.

Given these results, the ability of [^{131}I]-FC-5.01 to influence tumor growth *in vivo* was further investigated. Preliminary radioimmunotherapy (RIT) experiments showed that there was a significative tumor growth inhibition ($p<0.05$) in animals treated with 900 μCi fractionated into three doses (one week apart), respect to control mice. Some degree of hematological toxicity was observed (bone marrow hipoplasia, low white blood cell counts). Increase in survival probability due to [^{131}I]-FC-5.01 treatment was also evident in one of such experiments. We did not observe tumor regressions or cures. Hematological toxicity was decreased by reducing [^{131}I]-FC-5.01 dose and by administration of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) as a complement for RIT.

References:

The results presented in this Thesis have been partially published in:

- Ballare C., **Barrio M M,** Portela P and Mordoh J. **Functional properties of FC-2.15, a monoclonal antibody that mediates human complement cytotoxicity against breast cancer cells.** Cancer Immunology Immunotherapy 41: 15-22, (1995).

- **Barrio M M,** Bravo A I, Portela P, Hersey P, Mordoh J. **A new epitope on human melanoma-associated antigen CD63/ME491 expressed by both primary and metastatic melanoma.** Hybridoma 17: 355-364 (1998).

- Bover L, **Barrio M M,** Bravo I A, Slavutsky I, Larripa I, Bolondi A, Ayala M and Mordoh J. **The human breast cancer cell line, IIB-BR-G has amplified *c-myc* and *c-fos* oncogenes *in vitro* and is spontaneously metastatic *in vivo*.**. Cellular Molecular Biology 44: 493-504, (1998).

- **Barrio M M,** Viaggi M, Donaldson M, Portela P, Bover L, Mordoh J and Castiglia, S G de. **Tumor imaging with ^{99m}Tc-labeled FC-5.01 monoclonal antibody using a single step labeling method**. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry (in press) (1999).

- **Barrio M M,** Portela P and Mordoh J. **Monoclonal antibody FC-5.01, directed against CD63 antigen, is internalized into cytoplasmic vesicles in the IIB-BR-G human breast cancer cell line.** (submitted for publication) (1998).

Key Words: mAb FC-5.01; CD63 Ag, radioimmunodetection, radioimmunotherapy internalization.

ÍNDICE

Página

- ***INTRODUCCIÓN GENERAL*** 1

1.- Neoplasia: Definición y clasificación de tumores..... 1

1.1.- Etiología del cáncer y heterogeneidad celular tumoral..... 3

2.- Cáncer y sistemas de estudio..... 6

2.1.- Cultivo de tejidos..... 6
2.2.- Biopsias 8
2.3.- Modelos animales 9

3.- Cáncer de mama 11

3.1.- Histopatología del cáncer de mama..... 11
3.2.- Clasificación histopatológica de los carcinomas mamarios 12

4.- Melanoma cutáneo. Biología del melanocito y del melanoma.. 15

4.1.- Histopatología del melanoma..... 15
4.2.- Características clínicas del melanoma..... 17
4.3.- Melanoma primario y metastásico..... 20

5.- Anticuerpos Monoclonales..... 22

5.1.- Anticuerpos: estructura y diversidad..... 22
5.2.- Diversidad genética..... 24
5.3.- Producción de Anticuerpos Monoclonales contra cáncer..... 25

6.- Inmunología tumoral..... 27

6.1.- Respuesta inmune humoral y celular frente al cáncer..... 27
6.2.- Antígenos asociados a tumor (ATT)..... 29
6.3.- Estrategias de inmunoterapia antitumoral..... 37
6.4.- Utilización de AMCs en diagnóstico y terapia del cáncer..... 39

- ***OBJETIVOS*** 49

• **CAPÍTULO I: OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL AMC FC-5.01 - FRAGMENTACIÓN Y MARCACIÓN CON [^{125}I].**

INTRODUCCIÓN 51

I-1.- Obtención y selección de anticuerpos monoclonales (AMCs)..... 52

I-2.- Determinación de isotipo del AMC FC-5.01..... 54

I-3.- Purificación de AMC FC-5.01 a partir de líquido ascítico de ratones BALB/C..... 55

I-4.- Obtención de fragmentos F(ab')$_2$ y radiomarcación con [^{125}I] 60

DISCUSIÓN 59

• **CAPÍTULO II: EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AG RECONOCIDO POR EL AMC FC-5.01**

INTRODUCCIÓN 60

II-1.- Reactividad con líneas celulares..... 60

II-2.- Localización del Ag 5.01 en células FC-5.01$^+$ 62

II-3.- Reactividad con tumores y tejidos normales..... 65

a) Neoplasias humanas..... 65

b) Tejidos normales humanos y patologías benignas..... 69

II-4.- Naturaleza bioquímica del Ag 5.01..... 72

II-5.- Identidad del Ag reconocido por FC-5.01 con CD63..... 77

a) Comparación de reactividad frente a tumores humanos y células IIB-BR-G 77

b) Comparación bioquímica del Ag reconocido por FC-5.01 con el Ag CD63..... 80

i) Western-blot..... 80

ii) Inmunodepleción 80

iii) Análisis de células CD63$^+$ y CD63 $^-$ (FACS)..... 81
iv) Competencia con AMC ME491 (análisis del epitope reactivo)... 82
c) Análisis complementarios de la reactividad de FC-5.01..... 85
i) Comparación estadística de la expresión de CD63 en melanomas primarios y metastásicos..... 85
ii) Reactividad de FC-5.01 con plaquetas humanas..... 88
iii) Reactividad de FC-5.01 con HUVECs..... 89

DISCUSIÓN 91

• **CAPÍTULO III: PROPIEDADES FUNCIONALES DEL AMC FC-5.01 *IN VITRO***

INTRODUCCIÓN 97

III-1.- Análisis de la unión FC-5.01-Ag en células IIB-BR-G..... 97
III-2.-Internalización del AMC FC-5.01..... 97
a) Ensayos de inmunofluorescencia (IF)..... 97
b) Radioinmunoensayo celular - Catabolismo del AMC internalizado... 101
c) Cinética de la internalización del complejo Ag-AMC y re-expresión del Ag en la superficie celular..... 103

III-3.- El AMC FC-5.01 no media reacciones citotóxicas con células 5.01$^+$
a) Curvas de crecimiento en presencia de AMC FC-5.01..... 104
b) Citotoxicidad mediada por complemento (CMC) FC-5.01 dependiente..... 105
c) Citotoxicidad celular anticuerpo - dependiente (ADCC)..... 106

III-4.- Efecto de AMC FC-5.01 en la migración de células IIB-BR-G..... 107

DISCUSIÓN 110

CAPÍTULO IV: ESTUDIOS *IN VIVO* EN EL MODELO DE CANCER DE MAMA HUMANO IIB-BR-G_{NUDE}

INTRODUCCIÓN 113

IV-1.- Modelo de cáncer de mama IIB-BR-G_{NUDE} 113

IV-2.- Radioinmunodetección (RID) 115

a) AMC FC-5.01 marcado con [^{125}I] 115

b) AMC FC-5.01 marcado con [^{99m}Tc] 121

IV-3.-Tratamiento de tumores IIB-BR-G_{NUDE} con FC-5.01 marcado con [^{131} I]. Curvas de volumen tumoral y sobrevida - Análisis histopatológico de los tumores tratados y toxicidad 126

DISCUSIÓN 138

- **CAPÍTULO V: CLONADO Y SECUENCIACIÓN DE REGIONES VARIABLES DE FC-5.01**

INTRODUCCIÓN 144

V-1.- Amplificación de regiones variables de la cadena pesada y la cadena liviana de AMC FC-5.01 144

V-2.- Secuenciación de regiones variables de AMC FC - 5.01 146

DISCUSIÓN 150

- ***CONCLUSIONES*** 152

• ***MATERIALES Y MÉTODOS*** 155

SECCIÓN I: Obtención, selección y purificación de AMC FC-5.01

I-1.- Células utilizadas 155

a) Líneas celulares 155

i) Cáncer de mama humano
ii) Melanoma humano
iii) Cáncer de colon humano

b) Células tumorales aisladas de biopsias humanos 155

c) Células aisladas de sangre periférica 156

i) Leucocitos polimorfonucleares (PMN) y mononucleares (MN) humanos
ii) Plaquetas

d) Células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs) 156

I-2.- Obtención de anticuerpos monoclonales 157

a) Inmunización 157

b) Obtención de los hibridomas 157

c) Selección de clones positivos 157

d) Obtención de líquido ascítico 158

I-3.- Purificación de AMC FC-5.01 y obtención de fragmentos $F(ab)_2$ y F(ab') 158

a) Determinación de isotipo de AMC FC-5.01 158

b) Purificación 158

c) Preparación de Fragmentos $F(ab')_2$ y F(ab' 159

I-4.- Radiomarcación de AMC FC-5.01 159

a) Iodinación de anticuerpos 159

i) Radioinmunoensayo en fase sólida

b) Marcación de AMC FC-5.01 con [^{99m}Tc] 160

i) Reducción de FC-5.01

ii) Radiomarcación y control de calidad

iii) Conservación de la immunoreactividad

iv) Estabilidad de [^{99m}Tc]-FC-5.01:

c) Análisis de Scatchard - Determinación de la constante de avidez 161

I.5.- Otros AMCs utilizados 161

SECCIÓN II: Expresión y caracterización del Ag reconocido por FC-5.01

II-1.- Expresión del Ag 5.01 162
a) Inmunocitoquímica..... 162
b) Inmunohistoquímica en cortes de tejidos..... 162
c) Inmunofluorescencia indirecta..... 162
d) Co-localización de FC-5.01 con naranja de acridina:..... 163
II-2.- Bioquímica del Ag 5.01..... 163
a) Preparación de extractos de membranas y citoplasma a partir de células en cultivo o muestras de tumores humanos..... 163
b) Western-blot..... 163
c) Tratamientos enzimáticos y químicos de extractos de membrana..... 164
i) Tratamientos enzimáticos
ii) Otros tratamientos
II-3.- Comparación del Ag 5.01 con el Ag CD63..... 165
a) Análisis de FACS..... 165
b) Inmunodepleción cruzada..... 165
c) Ensayo de inhibición de binding..... 165

SECCIÓN III: Propiedades funcionales del AMC FC-5.01 *in vitro*

III-1.- Internalización del complejo AMC FC-5.01- Ag CD63..... 166
a) Inmunofluorescencia indirecta..... 166
b) Radioinmunoensayo celular..... 166
c) Velocidad de internalización del complejo Ag-AMC y re-expresión del Ag 5.01 en la superficie celular..... 167
III-2.- Curvas de crecimiento..... 168
III-3.- Ensayos de citotoxicidad..... 168
a) Complemento..... 168
b) Citotoxicidad mediada por complemento (CMC) AMC-dependiente.... 168
c) Citotoxicidad celular anticuerpo dependiente (ADCC)..... 169
III-4.- Ensayos de migración..... 169

SECCIÓN IV: Estudios *in vivo* en el modelo de cáncer de mama humano IIB-BR-G_{NUDE}

IV-1.- Tumores IIB-BR-G en ratones atímicos (*nude)* 170

IV-2.- Radioinmunolocalización y biodistribución de tumores de mama humanos y en ratones nude..... 170

a) Con anticuerpo FC-5.01 marcado con [^{125}I]..... 170

b) Con anticuerpo FC-5.01 marcado con [^{99m}Tc]..... 170

IV-3.- Radioinmunoterapia de tumores IIB-BR-G_{NUDE} con FC-5.01 marcado con [^{131}I] 171

a) Esquema de tratamiento..... 171

b) Análisis de la toxicidad hematológica y en órganos..... 172

SECCIÓN V: Clonado y secuenciación de las regiones variables de FC-5.01

a) Extracción de RNA total del hibridoma productor de AMC FC-5.01... 172

b) Amplificación y clonado de las regiones variables de FC-5.01..... 172

c) Análisis de las secuencias en base de datos..... 174

d) Northern Blot..... 174

- ***REFERENCIAS*** 175
- ***ABREVIATURAS***..... 190
- ***AGRADECIMIENTOS***..... 193

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

A continuación, y previo al desarrollo del trabajo experimental, se definen **conceptos básicos** empleados en este estudio, se presentan los sistemas corrientes de clasificación de neoplasias, los distintos modelos experimentales de trabajo utilizados en la investigación del cáncer, así como algunos aspectos teóricos relevantes y antecedentes que han servido de base a este trabajo de Tesis. También se señalan aspectos relativos a la inmunología tumoral, a la importancia que han tenido los **Anticuerpos monoclonales** en el estudio del cáncer, y sus posibles aplicaciones clínicas en la detección de las neoplasias y en la terapia antitumoral.

1- NEOPLASIA: DEFINICIÓN Y CLASIFICACION DE TUMORES

Las evidencias actuales indican que el cáncer es una enfermedad de origen genético que resulta de la acumulación de cambios (heredables) en una célula somática. Estos cambios llevan a una proliferación descontrolada y a la capacidad de invadir tejidos adyacentes y colonizar otros órganos [Klein G., 1985; Vogelstein B., 1993; Hoskins K., 1994; Fearon E.R., 1990].

Dado que el crecimiento y renovación de los tejidos de un organismo está homeostáticamente controlado, los diversos tipos celulares ya diferenciados deben mantenerse en cantidad y posiciones relativas adecuadas. Si una célula pierde el control de la proliferación se originará un **tumor** o **neoplasia.** Sin embargo, esto no necesariamente constituye un cáncer. De acuerdo a su comportamiento los tumores pueden ser clasificados en "**benignos**" o "**malignos**":

1- Decimos que un tumor es benigno cuando las células neoplásicas permanecen circunscriptas a una única masa tumoral en el lugar de origen, es decir sin invadir tejidos adyacentes. Estos tumores generalmente presentan un crecimiento lento, pueden alcanzar volúmenes muy grandes y en general no

representan un peligro para la vida del paciente. El tejido normal circundante está siempre bien delimitado y puede obtenerse una completa cura por remoción quirúrgica del tumor.

2- En cambio un tumor es considerado **maligno** o **canceroso** cuando sus células tienen la capacidad de invadir los tejidos adyacentes y migrar hacia otros órganos. La invasividad usualmente implica la liberación de células a partir del tumor primario con capacidad de alcanzar vasos sanguíneos o linfáticos, entrar en el torrente circulatorio, extravasarse en sitios distantes del lugar de origen, implantarse y proliferar en el nuevo ambiente, formando un tumor secundario o **metástasis**. Al multiplicarse las células metastásicas destruyen la arquitectura normal de los tejidos que invaden, alterando la fisiología del órgano afectado.

Las neoplasias malignas pueden originarse en muchos tipos celulares y se clasifican según el tejido y tipo celular de origen. Así, un hepatoma es un cáncer de células de hígado, un glioma es un cáncer de células gliales, un melanoma es un cáncer originado en las células productoras de melanina, denominadas melanocitos, etc. La gran diversidad de tumores malignos humanos se pueden clasificar en tres grandes categorías:

i) Carcinomas: Se originan a partir de tejidos epiteliales y constituyen más del 90 % de los cánceres humanos, siendo los más frecuentes los carcinomas de pulmón, mama y colon.

ii) Sarcomas: Neoplasias de origen mesenquimático (hueso, músculo, vasos sanguíneos, fibroblastos). Representan aproximadamente el 8 % de los tumores humanos.

iii) Leucemias y Linfomas: Cuando las neoplasias provienen de células hematopoyéticas, tanto de células circulantes como del sistema linfoide.

Existen además **tumores** originados en **tejido nervioso.** Estos tipos tumorales se subdividen en otras varias categorías según el tipo celular involucrado, la localización en el organismo y la estructura del tumor.

1.1.- Etiología del cáncer y heterogeneidad celular tumoral:

Aunque no existe una perfecta correlación, existe una tendencia a desarrollar cáncer en aquellas células que continúan proliferando en la vida adulta, a diferencia de las células nerviosas, que raramente desarrollan cáncer en los adultos. También existe una tendencia a desarrollar carcinomas con mayor frecuencia en los epitelios que están en contacto con agentes externos potencialmente nocivos, de allí la importancia de los hábitos alimentarios, del contacto con sustancias tóxicas y de la exposición de la piel a factores ambientales perjudiciales. Experimentalmente se ha podido identificar una primera etapa en la progresión tumoral (etapa de iniciación), irreversible, en la que las células adquieren la capacidad de crecer indefinidamente en cultivo pero aún no son tumorigénicas, es decir no producen tumores al ser inyectadas en ratones atímicos (ver sistemas de estudio, en ésta Introducción) [Giovanella B, 1985]. La capacidad tumorigénica es adquirida posteriormente, en etapas más avanzadas de la progresión neoplásica.

Durante la progresión tumoral ocurren diversas mutaciones, anormalidades cromosómicas y aún cambios epigenéticos, evidenciándose una tendencia de la población neoplásica a incrementar su capacidad proliferativa y lograr una mayor independencia de los mecanismos que regulan la división celular [Vogelstein B., 1993; Solomon E., 1991; Fujii H., 1996]. Estos cambios permiten a su vez que las células malignas puedan adquirir la capacidad de invadir el tejido adyacente y metastatizar [Fidler I.J, 1982; Frixen U.H, 1991; Takeichi M., 1993]. Se ha reportado muchas veces que las células cancerosas se caracterizan por una elevada inestabilidad genómica, es decir que presentan tasas de mutación varios órdenes de magnitud superiores a las células normales. Esto es especialmente evidente en cuanto a la frecuencia de grandes rearreglos cromosómicos como amplificaciones y translocaciones [Tlsty T.D, 1989; Wright J.A, 1990]. Los mecanismos subyacentes a esta inestabilidad genética están recién comenzando a comprenderse. Distintos trabajos han demostrado que mutaciones en el gen p53 tendrían un rol central

en este proceso [Hartwell L.,1992; Livingstone L.R., 1992; Yin Y.,1992]. Sin embargo, existen evidencias de que éste no sería el único mecanismo involucrado [Fishel R., 1996; Kahlenberg M.S., 1996].

Los múltiples avances en la comprensión de la biología del cáncer han demostrado claramente que el desarrollo y progresión de un tumor están estrechamente ligados a alteraciones en los mecanismos moleculares que controlan el ciclo de división celular. Por lo tanto, numerosas investigaciones en los últimos años se han dirigido al estudio de los genes regulatorios involucrados en el control de la proliferación. Dichos genes han sido clasificados en términos generales en dos grandes grupos: aquellos cuya expresión estimula un incremento en el número de células y aquellos cuyo producto contribuye a disminuirlo.

Correspondientemente, hay dos caminos mutacionales posibles hacia la pérdida del control de la proliferación celular e invasividad característicos del cáncer:

- Transformar un *gen estimulatorio* en hiperactivo. Este tipo de mutación tiene en general un efecto dominante y el gen alterado es llamado **oncogen** (siendo el alelo normal un proto-oncogen).
- Inactivar un *gen inhibitorio*. Estas mutaciones usualmente tienen un efecto recesivo, es decir que ambas copias génicas en la célula deben ser inactivadas o delecionadas para liberar a la célula de la inhibición. Este tipo de genes son llamados **genes supresores de tumor**.

Durante las distintas etapas de la progresión tumoral ocurren diversas mutaciones que activan oncogenes específicos e inactivan genes supresores de tumor. En los últimos años se ha progresado en la identificación de estos genes y su rol en la carcinogénesis [Bishop J.M., 1991; Hunter T., 1993; Hinds P.W., 1994; Weinberg R.A., 1994; Cox L.A., 1994; Fearon E.R.,1990].

Debido a que estos cambios sucesivos ocurren paulatinamente y no en todas las células simultáneamente, la progresión tumoral traerá como consecuencia una gran heterogeneidad celular en el tumor. A esta heterogeneidad debe sumarse la que proviene de la diferenciación celular que normalmente se

presenta en los tejidos en renovación, que frecuentemente originan los tumores. En éstos, las células funcionales diferenciadas, normalmente se van perdiendo y son reemplazadas por la proliferación de células más primitivas. Aunque en ciertos casos la renovación no resulte tan evidente, todos los epitelios mantienen su estado estacionario en esta forma, si bien sus tasas proliferativas difieren ampliamente entre ellos dependiendo de las pérdidas celulares [Potten C.J., 1979]. Es decir que las células troncales (stem) tienen capacidad de auto-renovación, manteniendo así constante su propia población, y la capacidad de originar una progenie de células que alcanzarán la diferenciación funcional, compensando las pérdidas fisiológicas [Buick R.N, 1984 (1), (2)]. De esta forma se establece una jerarquía celular en el tumor donde las células presentan propiedades que van cambiando gradualmente en forma unidireccional. Así, a medida que las células avanzan en esta jerarquía irán perdiendo progresivamente la capacidad proliferativa y adquiriendo características de diferenciación asociadas con la función específica del tejido [Buick R.N., 1984 (1), (2)]. En los tejidos normales el estado estacionario es mantenido por un balance estrictamente controlado entre proliferación, diferenciación, muerte y renovación celular a partir de células troncales.

Distintas evidencias apuntan a que en los tumores malignos esta jerarquía celular continúa funcionando y que las neoplasias se originarían a partir de un evento carcinogénico a nivel de las células stem del tejido [Mackillop W.J. 1983; Buick R.N., 1984 (1), (2)]. El incremento de la población celular podría ocurrir por exceso de proliferación, bloqueo de la diferenciación celular, inadecuada remoción de células por el proceso normal de pérdida celular, o un desbalance entre los eventos de auto-renovación y expansión clonal en la población de células stem [Buick R.N., 1984 (2); Mackillop W.J., 1983; Selby P., 1983].

Podemos concluir entonces que las células de un tumor serán heterogéneas en cuanto a potencial proliferativo y características de diferenciación celular, con propiedades que irán variando gradualmente a medida que la célula se mueve en la jerarquía. Es decir que este mecanismo de renovación celular y diferenciación representa una importante fuente de heterogeneidad celular en

los tumores, que se suma al fenómeno previamente descripto, de progresión tumoral.

En base a estos conceptos, las células altamente indiferenciadas, con elevado potencial proliferativo representan el principal blanco hacia donde deberían dirigirse las distintas estrategias terapéuticas para la cura del cáncer.

2.- CANCER Y SISTEMAS DE ESTUDIO

A pesar de que en los múltiples proyectos de investigación en cáncer se persigue lograr una mayor comprensión de la biología de los tumores humanos y en última instancia llegar a su curación, debido a razones éticas, las posibilidades de experimentación directa en pacientes son obviamente muy limitadas. Por lo tanto, se han desarrollado diversos sistemas experimentales utilizados como modelo para el estudio del cáncer en el laboratorio. El empleo de **animales portadores de tumores** autólogos o bien xenotransplantados con tumores humanos, es de gran utilidad como sistema *in vivo* para la investigación tanto básica como aplicada en cáncer. Sin embargo, en muchos casos es necesario contar con modelos simplificados para realizar estudios a nivel tisular, celular, subcelular o molecular. Para esto resultan útiles tanto las muestras tumorales provenientes de **biopsias**, como los sistemas de **cultivo de tejidos**, ya sean cultivos primarios de corta duración o líneas celulares obtenidas a partir de células cancerosas. Por último, con el advenimiento de la **biología molecular** aplicada al cáncer, se logra estudiar íntimamente las modificaciones moleculares que ocurren en una transformación maligna.

2.1.- Cultivo de tejidos

La mayoría de las células animales y vegetales pueden dividirse y aún diferenciarse en placas de cultivo de tejidos. Para esto es necesario un ajuste adecuado de las condiciones experimentales en las cuales se intenta cultivar las células (agregado de nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, sustrato para la adhesión celular, control del pH y temperatura) según sean los

requerimientos de las mismas.

El comportamiento de las células neoplásicas puede ser estudiado mediante la utilización de cultivos celulares. Se puede así ensayar el efecto del agregado o remoción de moléculas específicas al cultivo (como hormonas o factores de crecimiento), evaluar la acción citotóxica de diversos tratamientos antitumorales (drogas quimioterapéuticas, tratamientos hormonales, anticuerpos), estudiar la expresión de antígenos presentes en tumores mediante técnicas inmunológicas, etc.

Es posible preparar cultivos celulares directamente a partir de tejido tumoral obtenido de biopsias (**cultivos primarios**). En estos casos es necesario degradar la matriz extracelular y disociar las células del tejido, generalmente mediante el empleo de enzimas proteolíticas, hasta obtener una suspensión de células aisladas. A partir de esta suspensión, varias técnicas pueden utilizarse para separar los distintos tipos celulares presentes en el tejido, ya sea en base a sus propiedades diferenciales (por centrifugación, adherencia a plástico o vidrio, etc.) o mediante el empleo de anticuerpos específicos. Si bien el trabajo con cultivos primarios es complejo y de corta duración, para ciertos estudios resultan interesantes ya que reflejan bastante fielmente las características de las células tal cual fueron obtenidas del tumor.

En muchos casos las células de los cultivos primarios pueden removerse de las placas de cultivo y re-plaquearse formando entonces cultivos secundarios. Este procedimiento puede repetirse por semanas o meses. La mayoría de las células son capaces de proliferar en cultivo un número limitado de generaciones y luego mueren. Ocasionalmente algunas pocas sufren cambios genéticos que les permiten atravesar el período de crisis, adquiriendo la capacidad de multiplicarse indefinidamente. Estas células "inmortalizadas" constituyen una **línea celular** continua. Si bien el establecimiento de líneas celulares a partir de tejidos normales es posible, resulta bastante más probable partiendo de células provenientes de tumores malignos. La adquisición del fenotipo canceroso permite una más fácil adaptación al crecimiento indefinido en cultivo.

Las líneas celulares son muy útiles como fuente constante de células bien

caracterizadas y de un tipo relativamente uniforme. Más aún, dichas células pueden conservar su viabilidad indefinidamente si se congelan en nitrógeno líquido. Por otra parte permiten realizar experimentos usando medios de crecimiento bien definidos y así poder medir las respuestas celulares a diversos factores externos. Sin embargo, es importante tener en cuenta cuando se trabaja con líneas celulares, que estas células casi siempre difieren en forma importante de sus progenitoras en los tejidos de los cuales derivan. La mayoría de las veces sufren cambios a través de los sucesivos pasajes, mostrando incluso alteraciones en el número de cromosomas (aneuploidía). De manera que, aunque representa una gran ventaja el poder estudiar el comportamiento complejo de las células en las condiciones estrictamente definidas de una placa de cultivo, las observaciones y conclusiones deben en última instancia verificarse a través de experimentos *in vivo*.

Líneas celulares de cáncer de mama: Diversas líneas celulares de carcinoma mamario humano han sido establecidas. En nuestro laboratorio se ha establecido una nueva línea celular hormono-independiente, IIB-BR-G, a partir de células obtenidas por disgregación de un carcinoma primario de mama [Bover L., 1991]. Dicha línea celular presenta características indiferenciadas, con alto índice mitótico, capacidad tumorigénica y metastásica en ratones atímicos (ver más adelante) y no expresa receptores de estrógeno ni progesterona. Dicha línea celular se ha utilizado en este trabajo de Tesis, esencialmente como inmunógeno para la obtención de anticuerpos monoclonales y como modelo de cáncer de mama tanto *in vivo* como *in vitro*.

2.2.- Biopsias

El estudio de biopsias tumorales obtenidas quirúrgicamente tiene la ventaja de reflejar fielmente las características del tumor tal cual se presenta en el paciente. En primer lugar, el análisis de la biopsia permite su clasificación anatomopatológica; esto aporta información sobre el origen de la neoplasia, su grado de agresividad y pronóstico. Ofrece además la posibilidad de investigar, sobre cortes histológicos de las muestras tumorales, la expresión de diversas moléculas (antígenos asociados a tumor, receptores celulares, productos de

oncogenes, etc.), habiéndose desarrollado para esto distintas técnicas como la inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, hibridización *in situ* y más recientemente PCR (*polymerase chain reaction*) *in situ*. Las biopsias conservadas en condiciones apropiadas proveen también abundante material para la obtención de proteínas y ácidos nucleicos para estudios a nivel molecular.

2.3.- Modelos animales

Los **animales portadores de tumores** son ampliamente utilizados en el estudio del cáncer; ya sean tumores autólogos (espontáneos o inducidos artificialmente) o tumores humanos transplantados (xenotransplantes). El uso de xenotransplantes de tumores humanos es especialmente útil en evaluaciones pre-clínicas de nuevos tratamientos, como la aplicación de drogas quimioterápicas, empleo de anticuerpos monoclonales solos o conjugados con radioisótopos, drogas o toxinas, etc.

Para la realización de estos transplantes se requiere que el sistema inmune del animal esté deprimido o sea de alguna manera anulado. Se usa entonces una cepa mutante de ratones carentes de timo, inmunodeficientes, denominados ratones atímicos o "nude mice". Debido a la deficiencia inmunológica en células T, estos animales pueden aceptar xenotransplantes de distintos tejidos, incluyendo tumores humanos [Shin S.I., 1979]. Para la obtención del tumor en el ratón pueden realizarse injertos subcutáneos de pequeños fragmentos tumorales provenientes de biopsias, o bien inocularse células tumorales de cultivos. Una vez desarrollado el tumor, éste puede re-transplantarse de ratón en ratón por tiempo indefinido. Sin embargo es importante tener en cuenta que cuando el tumor es pasado de animal en animal por muchas generaciones sucesivas, sus propiedades pueden modificarse. Generalmente a través de los pasajes ocurre una selección de células con mayor capacidad proliferativa.

Para el desarrollo de la presente Tesis se ha hecho uso del modelo *in vivo* IIB-BR-G_{NUDE} originado por el xenotransplante del tumor primario de mama que permitió el establecimiento de la línea celular IIB-BR-G. Estos tumores creciendo en ratones *nude* conservan características histopatológicas similares

al tumor de origen, son capaces de generar metástasis espontáneamente en un alto porcentaje de recipientes y han sido caracterizados en detalle recientemente [Bover L., 1998].

Otra técnica en uso es el ensayo de la cápsula subrenal, en la cual se transplantan pequeños fragmentos tumorales heterólogos en ratones que pueden ser o no inmuno-deficientes. Esta técnica permite solamente ensayos a corto plazo pues deben realizarse dentro de los primeros 5 a 7 días de transplantado el tumor, antes que se produzca el rechazo del mismo. Se utiliza especialmente para la determinación de la respuesta a quimioterapia de tumores humanos [Griffin T.W, 1983].

Por otra parte, gracias a los importantes avances tecnológicos de los últimos años, es posible introducir genes en forma permanente en ratones, inyectando el ADN en óvulos fertilizados. Estos a menudo desarrollarán en un ratón conteniendo el fragmento de ADN con el gen de interés integrado en alguno de sus cromosomas. Si el cromosoma modificado está presente en las células de la línea germinal, este animal pasará el gen extraño a la progenie. Animales que han incorporado de esta forma permanentemente el ADN son denominados **transgénicos** y el gen extraño, **transgen** [Palmiter R.D., 1986; Boyd A.L., 1993]. Estos ratones transgénicos han resultado de enorme utilidad para el estudio de la función y regulación de diversos genes.

Varias cepas de ratones transgénicos han sido generadas llevando genes implicados en el desarrollo y/o evolución del cáncer (oncogenes). Los transgenes pueden expresarse en todos los tejidos o diferencialmente en ciertos tejidos de interés, según la especificidad del promotor bajo el cual hayan sido colocados. Esta metodología permite estudiar la participación de distintos oncogenes en el proceso de carcinogénesis. Más aún, por cruzamientos entre cepas transgénicas para distintos oncogenes ha podido obtenerse progenie llevando ambos simultáneamente, lo que permite analizar la acción sinergística de distintos oncogenes para el desarrollo de una neoplasia [Adams J.M., 1991; Fanidi A., 1992; Hunter T., 1991].

3- CANCER DE MAMA

3.1.- Histopatología del cáncer de mama:

El carcinoma mamario es el tipo de cáncer más común entre las mujeres y, luego del pulmonar, es el que presenta el mayor índice de mortalidad [Lippman M.E., 1993; Marshall E., 1993]. A pesar de los importantes avances realizados en los últimos años en la detección y tratamiento del carcinoma de mama localizado, poco se ha progresado en el manejo terapéutico de la enfermedad en estadíos avanzados. Los mecanismos básicos involucrados en la iniciación y desarrollo del cáncer de mama humano y su progresión maligna, son hasta el momento escasamente comprendidos.

Se han identificado diversos factores de riesgo, entre ellos: historia menstrual y reproductiva (menarca a edad temprana, menopausia tardía, edad avanzada al nacimiento del primer hijo), historia familiar de carcinoma mamario, dieta, tratamientos hormonales, exposición a radiación, etc. Mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* han sido asociadas a susceptibilidad hereditaria a cáncer de mama. Sin embargo, aproximadamente un 70 % de las mujeres que desarrollan esta enfermedad no poseen factores de riesgo identificables [Harris J.R., 1993; Kelsey J.L., 1996].

Por otra parte, existe una gran diversidad en el comportamiento de los carcinomas mamarios, observándose patrones de evolución muy diferentes. Muchos cánceres humanos presentan una evolución más uniforme; en el caso del carcinoma de pulmón de células pequeñas por ejemplo, sin quimioterapia aproximadamente un 70 % de los pacientes con enfermedad en estadío I mueren en un año y menos del 10 % sobreviven luego de dos años [Smith H.S., 1984]. Contrariamente, el carcinoma de mama se comporta en forma más variable; mientras que ciertos tumores alcanzan un gran tamaño en la mama sin invasión vascular ni linfática, en otros casos aparecen metástasis a distancia antes que se produzca un importante crecimiento del tumor primario. Más aún, si bien en algunos pacientes las metástasis aparecen y crecen rápidamente, en otros lo hacen luego de 10 a 30 años. La determinación del estadío clínico de los pacientes según la extensión de la enfermedad, el

compromiso de los ganglios linfáticos, el análisis histopatológico de los tumores, así como la detección de receptores de estrógeno y de progesterona en el tumor, constituyen indicadores pronósticos tradicionales y representan los métodos más confiables disponibles hasta el momento para predecir la evolución de la enfermedad. Sin embargo, con frecuencia se observa que pacientes correspondientes a un mismo estadío clínico, con igual diagnóstico histopatológico y contenido de receptores hormonales, evolucionan en forma diferente. Es por esto que grandes esfuerzos en la investigación en cáncer mamario están destinados a la búsqueda de nuevos indicadores que permitan predecir con mayor certeza la marcha de la enfermedad y en lo posible provean información acerca de la capacidad del tumor de responder a determinadas terapias antineoplásicas.

Existe actualmente una gran variedad de drogas para el tratamiento del cáncer mamario, incluyendo agentes citotóxicos, hormonales, modificadores de la respuesta biológica, etc. La clínica oncológica cuenta con una amplia gama de tratamientos disponibles: distintos esquemas quimioterapéuticos, diversas modalidades de hormonoterapia, así como regímenes que contienen combinaciones de agentes que pueden actuar sinergísticamente sobre las células tumorales. No obstante, a pesar de esta creciente complejidad en la terapia del cáncer mamario, la sobrevida de las pacientes con enfermedad metastásica no ha mejorado consistentemente en las últimas décadas [Marshall E., 1993]

3.2.- Clasificación histopatológica de los carcinomas mamarios :

Clasificación según el tipo histológico : Existen distintos sistemas de clasificación en uso, de los cuales el de van Bogaert y Maldague es uno de los más ampliamente adoptados [van Bogaert L.J., 1978; Azzopardi J.G., 1979]. De acuerdo a éste los carcinomas mamarios se dividen en dos grandes categorías: **ductales** y **lobulillares**, según se desarrollen en los conductos mamarios o en los lobulillos (estructuras histológica - y citológicamente identificables en la mama) respectivamente. Cada uno de estos grupos puede

a su vez subdividirse en carcinoma ***in situ*** e **infiltrante** según sus propiedades invasivas. Básicamente, existen entonces cuatro categorías:

1) Carcinoma ductal *in situ* o intraductal:

Las células tumorales se encuentran sólo dentro del lumen de los conductos y no invaden el estroma circundante. El carcinoma *in situ* constituye sólo una etapa temprana en la progresión de la enfermedad a cáncer invasivo, en la que las células malignas aún no han perdido su control posicional.

2) Carcinoma ductal infiltrante:

En este caso las células tumorales de origen ductal invaden el estroma.

- Aquellos carcinomas ductales invasivos en los que no se reconocen rasgos histológicos especiales son designados ***NOS*** (*not otherwise specified*) y representan casi el 70 % de los cánceres mamarios. En general este tipo de tumores metastatizan a ganglios linfáticos axilares y son, dentro de los carcinomas ductales, los de peor pronóstico.

- Se han descripto además una gran variedad de tipos histológicos: ***medular, mucinoso*** o ***coloidal, comedocarcinoma infiltrante, tubular, papilar, escamoso, adenoquístico, secretorio, carcinosarcoma***, etc. Estos difieren en sus características de invasividad, patrón de crecimiento y metástasis, grado de infiltración linfocitaria, formación de túbulos (estructuras semejantes a los conductos), características de la matriz extracelular, pronóstico, etc.

3) Carcinoma lobulillar *in situ* :

Las células tumorales se encuentran confinadas dentro de los lobulillos mamarios y no invaden el estroma. Al igual que el carcinoma intraductal, éste constituye un estadío temprano en la evolución de la enfermedad.

4) Carcinoma lobulillar infiltrante:

Representa entre 5 y 10 % de los carcinomas mamarios. Típicamente está compuesto por células pequeñas que invaden en un arreglo lineal ("fila india") con una tendencia a crecer alrededor de los conductos y lobulillos.

Clasificación según grado tumoral o grado de diferenciación: La determinación del tipo histológico de un tumor no siempre brinda la información

suficiente para predecir el curso clínico de la enfermedad o decidir la terapia adecuada. En general un mismo tipo histológico comprende un rango muy amplio de patologías, desde aquellas con bajo índice proliferativo que raramente dan metástasis, hasta otras de crecimiento rápido, con alta capacidad metastásica y muy difícilmente curables. La clasificación en "grados" intenta determinar el grado de malignidad independientemente del tipo celular, y está basada en la evaluación de distintos parámetros que varían ligeramente de acuerdo al sistema de clasificación utilizado. Uno de los más ampliamente aceptados es el de Bloom y Richardson [Bloom H.J.G., 1957]. Numerosos trabajos han demostrado el importante valor pronóstico del grado tumoral [Bloom H.J.G., 1957; Stenkvist B., 1982; Alderson M.R. 1971; Carter C.L., 1989].

Básicamente los parámetros tenidos en cuenta en esta clasificación son: 1) grado de diferenciación estructural, determinado por la formación tubular, 2) cantidad de mitosis, 3) pleomorfismo nuclear (tamaño, forma y tinción de los núcleos).

De acuerdo al análisis de estos items los tumores son clasificados en tres grados:

- **grado I :** bien diferenciados, bajo grado de malignidad
- **grado II :** moderadamente diferenciados, grado de malignidad intermedio
- **grado III :** pobremente diferenciados o indiferenciados, alto grado de malignidad

4.- MELANOMA CUTÁNEO - BIOLOGÍA DEL MELANOCITO Y DEL MELANOMA

4.1.- Histopatología del melanoma

El melanoma cutáneo surge por la transformación maligna de las células pigmentadas de la piel, los melanocitos. Por ende gran parte de las características de las células del melanoma cutáneo reflejan las de su contraparte normal, los melanocitos epidérmicos. Sin embargo las diferencias

entre las células de melanoma y las de los melanocitos son muy marcadas: las células de melanoma crecen independientemente del agregado de factores de crecimiento, poseen acentuadas anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, son capaces de invadir otros tejidos y de generar metástasis.

Los melanocitos embriológicamente derivan de una población troncal (stem) de melanoblastos que se originan en la cresta neural inmediatamente luego del cierre del tubo neural. La migración de los melanoblastos comienza muy temprano, a la segunda semana y media de la gestación del embrión humano. Los melanoblastos ya están comprometidos a diferenciarse en melanocitos antes o durante la migración desde el tubo neural. Los melanoblastos *in vivo* comienzan a melanizarse justo antes de llegar a su destino [Nordlund J.J., 1986; Rawles M., 1947; Weston J.A., 1970]. En el lugar de destino, los melanocitos son células dendríticas pigmentadas (melanina) que se localizan en la base de la epidermis. La población de melanocitos en la piel es particularmente densa en los **nevos**, comúnmente llamados lunares. También se encuentran en el ojo y otros epitelios, incluyendo orofaringe, esófago, intestino delgado y grueso, vejiga, ano y vagina. Se han encontrado melanocitos en la cápsula de los ganglios linfáticos, dando lugar a la especulación de que algunos melanomas de origen primario desconocido, podrían derivar de ganglios linfáticos. En la piel, los melanocitos están presentes en la capa basal y despliegan sus dendritas hacia los queratinocitos que los rodean. La melanina, el pigmento sintetizado por la enzima tirosinasa, es transportada en melanosomas a través de las prolongaciones dendríticas hasta los queratinocitos. En el adulto los melanocitos se dividen con una frecuencia muy baja, tal vez una vez al año [Pawelek J., 1979]. Avances muy recientes en técnicas de cultivo han permitido delinear cuales son los factores que controlan el crecimiento de melanocitos normales, melanocitos de nevos no malignos y de células de melanoma. El estudio de los requerimientos para la proliferación *in vitro* de melanocitos normales ha ayudado a identificar factores que están activados en las células malignas y que serían potencialmente responsables de la independencia que exhiben las células malignas a factores exógenos de crecimiento y diferenciación.

Las células de melanoma, a diferencia de los melanocitos normales, presentan importantes parámetros diferenciales cuando son puestas en cultivo: 1- cambios morfológicos, 2- vida media ilimitada en cultivo, 3- numerosas anomalías cromosómicas, 4- alta densidad de saturación de la monocapa, 5- crecimiento independiente de anclaje en agar blando, 6- tumorigenicidad en ratones atímicos, 7- ausencia o menor requerimiento de factores de crecimiento exógenos, y 8- producción de factores de crecimiento endógenos.

Lesiones precursoras más comunes de melanoma: Si bien existen muchas controversias respecto de la naturaleza y características de las lesiones que potencialmente puedan dar origen a un melanoma, se ha puesto especial interés en identificar dichas lesiones, cuyo análisis resulta muy útil, no sólo para la comprensión de la biología del melanoma, sino también para la detección de individuos con riesgo de contraer melanoma (**Tabla 1**).

Por muchos años se ha señalado que los nevos (denominados lunares) tienen cierta relación con el melanoma [Elder D.E., 1987; Greene M.H., 1985]. Uno de los factores de riesgo que mejor correlaciona con el melanoma es la presencia de nevos displásicos en individuos con historia de melanoma familiar [Greene M.H., 1985; Reimer R.R., 1978]. También se cree que los nevos gigantes congénitos pueden derivar en melanomas, así como también los de tamaño intermedio y pequeño [Reed W.B., 1985]. Sin embargo, hay una gran proporción de melanomas que parece desarrollarse sin la evidencia de un nevo contiguo [Elder D.E., 1987; Gruber S.B., 1989]. Esta modalidad de origen de melanoma puede estar relacionada con una proliferación *de novo* de los melanocitos de la epidermis basal y probablemente hayan sido mejor analizados en los casos de LMM (lentigo maligna melanoma) y de ALM (acral lentiginous melanoma) [Clark W.H., 1969].

Tabla 1: Precursores potenciales de melanoma y proliferaciones melanocíticas *de novo*:

Nevos melanocíticos:
Nevos displásicos
Nevos comunes adquiridos
Nevos congénitos:
Gigantes
Pequeños e intermedios
Nevos azules
Proliferaciones melanocíticas *de novo*:
Lentigo maligna
Melanoma *in situ*
Proliferaciones lentiginosas de palma, planta y mucosas

4.2.- Características clínicas del melanoma

Poblaciones de alto riesgo: El típico paciente de melanoma es de piel blanca con tendencia a las quemaduras solares antes que al bronceado, aún luego de una breve exposición solar. El fenotipo pelirrojo está asociado con un riesgo relativo 3 veces mayor, los individuos de pelo rubio con un 60% más de riesgo, y los de piel blanca con un doble de riesgo. El riesgo de desarrollar un melanoma primario es elevado en pacientes con múltiples nevus displásicos o con antecedentes familiares de melanoma y en aquellas personas con más de 20 nevos [Balch C.M., 1992].

Signos y síntomas: Si bien el melanoma puede localizarse en cualquier sitio del cuerpo, es más común en las extremidades inferiores en las mujeres y en el torso en los hombres. Entre las características típicas del melanoma cutáneo se incluyen la variación del color de la piel, la superficie irregular con relieve, el perímetro irregular con indentaciones y los cambios en el tamaño. **El común**

denominador de todos los tipos de melanomas cutáneos es su naturaleza cambiante. Cualquier lesión pigmentada que sufre cambios en el tamaño, configuración o color debería considerarse como un potencial melanoma, y debe analizarse histopatológicamente.

Patrones de crecimiento: Los patrones de crecimiento representan entidades patológicas diferentes y tienen características clínicas únicas, con diferentes pronósticos. La confirmación histológica es esencial antes de iniciar cualquier tratamiento. Los cuatro principales patrones de crecimiento son:

1. ***MELANOMA EXTENSIVO SUPERFICIAL - "Superficial Spreading Melanoma" (SSM).*** Cerca de 70% de los melanomas son SSM. Generalmente se desarrollan en nevus preexistentes y pueden llegar a ocurrir a cualquier edad después de la pubertad. Al principio la lesión se presenta chata, luego la superficie se torna irregular, usualmente asimétrica. A medida que la lesión crece, la superficie se vuelve brillante y los bordes indentados.

2. ***MELANOMA NODULAR - "Nodular Melanoma" (NM).*** El segundo tipo más frecuente de melanoma es el NM (15-30% de los pacientes). Son tumores muy agresivos y generalmente se desarrollan con mayor rapidez que los SSM. Pueden darse a cualquier edad y los sitios más comunes son el tronco, cabeza y cuello. Generalmente son más oscuros y con más relieve que los SSM, y más uniformes en su coloración. Una característica típica es que carecen de fase de crecimiento radial u horizontal.

3. ***MELANOMA LENTIGO MALIGNO - "Lentigo Maligna Melanoma" (LMM).*** Este tipo de melanoma parece ser una entidad separada de los otros tipos de melanoma, con menor capacidad de metastatizar. Se da en un bajo porcentaje (4-10%), generalmente en el rostro de mujeres de piel blanca.

4. ***MELANOMA ACRAL LENTIGINOSO - "Acral Lentiginous Melanoma" (ALM).*** La característica principal de este tipo de melanoma es que se manifiesta en la palma de las manos, planta del pie o cerca del nacimiento de las uñas. El ALM aparece en muy baja proporción en pacientes blancos (2-8%) pero constituye el 35-60% de los casos de melanomas en pacientes de piel oscura, incluyendo asiáticos e hispánicos. La irregularidad de la coloración es uno de los rasgos típicos del ALM. Son mucho más agresivos que los LMM y con mayor tendencia a generar metástasis.

Sistema de clasificación y estadificación: La existencia de un sistema uniforme de clasificación y estadificación del melanoma es de fundamental importancia para la comparación de resultados de los distintos tratamientos entre los diversos centros sanitarios de un país o entre países. En 1988 la

AJCC (American Joint Committee on Cancer) junto con la UICC (Union Internationale Contre le Cancer) realizaron una propuesta unificadora para clasificar el melanoma cutáneo. Este sistema de clasificación universal fue desarrollado a nivel internacional con la colaboración y concertación de centros de todo el mundo relacionados con el melanoma (**Tabla 2**).

Tabla 2 : Sistema de estadificación para el melanoma de la AJCC/UICC, 1988

ESTADIO	CRITERIO
IA	Melanoma primario ≤ 0.75 mm de profundidad y/o nivel de Clark II (pT1); sin metástasis ganglionares o sistémicas (N0, M0)
IB	Melanoma primario 0.76 a 1.50 mm de profundidad y/o nivel de Clark III (pT2); N0, M0
IIA	Melanoma primario 1.51 a 4.00 mm de profundidad y/o nivel de Clark IV (pT3); N0, M0
IIB	Melanoma primario > 4.00 mm de profundidad y/o nivel de Clark V (pT4); N0, M0
III	Metástasis en ganglios locoregionales y/o en tránsito (Cualquier pT, N1 o N2, M0)
IV	Metástasis sistémicas (Cualquier pT, cualquier N, M1)

pT: tumor primario (primary Tumor); **N:** Nódulos linfáticos; **M:** Metástasis

La invasividad tumoral y las metástasis son las mayores causas de fracasos en los tratamientos de pacientes con cáncer y especialmente en melanoma. Un estudio de sobrevida de 15 años, llevado a cabo en las Universidades de Alabama, en Birminghan y la Universidad de Sidney, realizado en más de 4,000 pacientes con melanoma, demostró que los pacientes con estadios de melanoma III y IV al momento del primer diagnóstico, afortunadamente sólo

constituyen el 15% del total [Ketcham A.S. y Balch C.M., 1992 (1)]. Este porcentaje presenta, de acuerdo al grado de compromiso metastásico, diferentes pronósticos. Según Balch CM y col [1981], el 40% de los pacientes con melanoma estadío III, con metástasis en un sólo nódulo linfático loco-regional, presenta una sobrevida mayor a 10 años; por el contrario, sólo el 15% de aquellos con dos o más ganglios involucrados permanece con vida a los 10 años del diagnóstico. Los pacientes con metástasis sistémicas de melanoma, estadío IV, tienen un pronóstico muy poco alentador, con una sobrevida promedio de tan sólo 6 meses [Balch C.M., 1992 (2) y 1983; Nambisam R.N., 1987]. El paciente con enfermedad metastásica sucumbe por el compromiso anatómico directo y las alteraciones fisiológicas causadas por las metástasis en los órganos comprometidos y/o por las complicaciones asociadas a la terapia antineoplásica. Estos datos estadísticos y clínicos de melanoma metastásico evidencian la gran capacidad de los melanocitos malignos de invadir y desarrollar colonias metastásicas en otros órganos.

4.3.- Melanoma primario y metastático

El melanoma primario cutáneo puede originarse en o cerca de una lesión precursora de las mencionadas anteriormente (**Tabla 1**) o en la piel normal (Gruber SB., 1989). Cualquiera sea el precursor, el crecimiento del melanoma puede darse de dos maneras, que han sido designadas como **crecimiento bifásico** o **crecimiento monofásico** [Clark W.H. Jr, 1967 y 1987; Reed R.J., 1985].

Crecimiento bifásico:

El patrón bifásico de crecimiento se caracteriza por un componente intraepidérmico que contiene melanocitos proliferando por un período de meses o años, predominantemente en la epidermis.

Si no es interrumpido por la terapia, eventualmente se puede formar un tumor invasivo, con capacidad de generar un nódulo expansible que puede invadir e infiltrar la dermis reticular o el tejido adiposo subcutáneo.

La fase intraepidérmica del crecimiento bifásico ha sido denominado como ***fase de crecimiento radial*** [Clark W.H.Jr, 1967 y 1984; Elder D.E., 1979]. El subsecuente crecimiento del nódulo expansible dentro de la dermis se denomina ***fase de crecimiento vertical*** [Clark W.H. Jr, 1984; Elder D.E., 1979]. SSM, LMM y ALM presentan este patrón de crecimiento radial.

Crecimiento monofásico:

En este caso el crecimiento del melanoma procede puramente en ***fase vertical***, sin fase de crecimiento radial. El melanoma con este patrón de crecimiento es también conocido como NM, porque en la mayoría de las instancias, cuando el tumor es diagnosticado, ya se ha desarrollado un nódulo expansible en la dermis papilar. [Clark W.H. Jr, 1967 y 1987; Elder D.E., 1979].

Existen diferencias biológicas entre la fase de crecimiento radial y vertical. La fase de crecimiento radial se caracteriza porque la lesión crece en forma autónoma e invade la dermis papilar, pero usualmente carece de potencial metastásico [Clark W.H.Jr, 1987; Elder D.E., 1984]. La fase de crecimiento vertical implica un cambio cualitativo que resulta en la selección de una población o clon de células que tiene ventajas proliferativas respecto de las demás células. Además, la propiedad de formar agregados compactos de células parece correlacionar con la capacidad de metastatizar [Clark W.H.Jr, 1987]. El crecimiento vertical difiere del crecimiento radial desde el punto de vista citológico y arquitectónico. La fase de crecimiento vertical generalmente presenta células de mayor tamaño, con mayor grado de atipía y aumento del tamaño nuclear, respecto de la fase de crecimiento radial. También las células que entran a la fase vertical de crecimiento pueden concomitantemente reducir, o directamente perder, la síntesis de pigmentos, de allí que los nódulos y metástasis sean frecuentemente amelanóticos.

Para analizar el proceso metastásico, los investigadores han separado invasión y metástasis en una serie de pasos secuenciales bien definidos. Para describir la secuencia de eventos bioquímicos que ocurren durante la invasión de la célula tumoral a la matriz extracelular, ha sido propuesta una hipótesis por Poste G y Fidler IJ, (1980) que considera tres etapas:

1) En la primer etapa la célula tumoral se adhiere a la matriz extracelular, ECM (Extracellular Matrix). Este proceso puede estar mediado por glicoproteínas específicas o factores de adhesión tales como laminina y fibronectina, y por receptores en la membrana basal de la célula tumoral.
2) El segundo paso es la degradación local de la matriz por proteasas asociadas a la célula tumoral o célula huésped. Estas proteasas pueden degradar las proteínas de adhesividad y estructurales, como el colágeno de la ECM. La cantidad de enzimas proteolíticas activas en la superficie de la membrana celular sería tan alta que se produce un desbalance en detrimento de los inhibidores naturales de proteasas que están presentes tanto en la ECM como en el plasma.
3) En la tercer etapa se produce la locomoción de la célula tumoral hacia la región de la matriz modificada por la proteólisis. La dirección de la locomoción puede ser influenciada por factores quimiotácticos del órgano huésped (órganos preferenciales para la colonización metastásica) y también por factores de locomoción propios de la célula tumoral. La invasión contínua de la matriz extracelular se realiza por repeticiones cíclicas de estos tres eventos.

5.- ANTICUERPOS MONOCLONALES

5.1.- Anticuerpos: estructura y diversidad

Los anticuerpos (AC) son inmunoglobulinas (Ig) producidas por el organismo en respuesta a la presencia de sustancias extrañas, los antígenos (Ags). Los AC poseen una región de unión específica que reconoce un determinante antigénico denominado epítope, en la molécula del Ag. La unión Ag-AC es de naturaleza física. En determinados casos la combinación del AC con el Ag inicia una serie de procesos biológicos que resultan en la destrucción y eliminación del Ag, o de la célula portadora.

Un Ag puede tener varios epítopes diferentes, cada uno de los cuales puede estimular la producción de diversos AC por linfocitos B (células productoras de

AC). El linfocito B estimulado tiene la capacidad de diferenciarse en una célula plasmática secretora de ACs, y a su vez esta célula producirá un AC específico contra un sólo determinante antigénico. Si se inmuniza un animal con un Ag, dicho animal producirá y secretará al suero una mezcla de ACs, cada uno de ellos dirigido contra un determinante antigénico diferente. Esta mezcla de ACs provenientes de varios clones de linfocitos B estimulados, se denomina **anticuerpos policlonales**.

Estructura de los Anticuerpos:

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas, y existen cinco grandes clases: IgG, IgM, IgA, IgE, e IgD. Las más comunes son las IgG e IgM.

La IgG está constituida por dos cadenas grandes referidas como pesadas o H (Heavy) y dos cadenas livianas o L (Light), cuyos pesos moleculares son aproximadamente 50.000 y 25.000 daltons respectivamente. La molécula entera tiene un peso molecular de alrededor de 150,000 daltons. En el ratón existen 4 clases de cadenas pesadas, por lo tanto hay 4 tipos diferentes o isotipos de IgG, que se denominan IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, e IgG_3. Las cadenas livianas pueden ser de dos tipos, denominadas *kappa* (κ) y *lambda* (λ). En cada molécula de AC, tanto las dos cadenas pesadas como las dos livianas son del mismo tipo.

Las cuatro cadenas de la molécula de Ig están unidas por puentes disulfuro. El sitio de combinación del AC, que reconoce el Ag, es la región variable, y la secuencia de aminoácidos de esta porción de la molécula es la que confiere al anticuerpo propiedades específicas de unión al Ag. Como se mencionó anteriormente, el AC se une al Ag por uniones físicas, esencialmente interacciones iónicas, no covalentes, y de hecho existe un equilibrio entre AC y Ag unido y libre. Si se aplica la Ley de Acción de Masas a esta interacción, se puede calcular una constante de equilibrio K, que es una medida de la fuerza de interacción Ag-AC. Esta afinidad, o más apropiadamente avidez del AC, se expresa en unidades de M^{-1}. La mayoría de los AC presentan valores de K que se sitúan en el rango de 10^6-10^9 M^{-1}.

5.2.- Diversidad genética

Se estima que un ratón puede producir entre 10^6 y 10^9 moléculas de anticuerpo diferentes, que reciben el nombre de *repertorio de anticuerpos*. Este repertorio es aparentemente lo bastante grande como para asegurar que existirá un sitio de unión al Ag para casi cualquier determinante antigénico. Dado que los ACs son proteínas, la capacidad de un animal de producir millones de ACs diferentes en el plasma, plantea la existencia de mecanismos genéticos especiales, para obtener dicha diversidad proteica.

Los AC se producen a partir de tres grupos de genes separados, que codifican las cadenas κ, λ y H, respectivamente. En cada grupo, los segmentos génicos separados que codifican las distintas zonas de las regiones variables de las cadenas L y H se pueden unir por eventos de recombinación específicos durante la diferenciación de los linfocitos B. Los grupos génicos de las cadenas L contienen uno o más genes constantes (C) y conjuntos de segmentos génicos variables (V) y de unión (J). El grupo génico de las cadenas H contiene un conjunto de genes C y conjuntos de segmentos génicos V, de diversidad (D) y J.

Se han propuesto cinco mecanismos diferentes que los mamíferos podrían utilizar para generar diversidad en las porciones variables de sus Igs:

1- G*enes múltiples:* Existen muchos genes separados (V1-Vn), cada uno codificando para un segmento V.

2- *Mutación somática:* Un gen primordial V muta (durante la ontogenia de las células B), generando secuencias variantes en distintos clones de células B.

3- *Recombinación somática:* Los genes J (J1-Jn) se recombinan para unirse a la porción principal de genes de la región V. Esto ocurre durante la ontogenia de las células B y resulta en una proteína que contiene elementos codificados por diferentes segmentos génicos.

4- *Conversión génica:* Porciones de ADN de varios pseudo-genes de la región variable podrían convertirse en nuevos genes de región V.

5- *Adición de nucleótidos:* Se podrían insertar nucleótidos extra en el límite de

las regiones V y J, antes de la recombinación, codificándose así aminoácidos adicionales.

Todas las células B producen inicialmente AC IgM. Más tarde pasan a producir AC de otras clases, que tienen el mismo sitio de unión al Ag que los AC IgM originales. Este cambio de clase permite que los mismos sitios de combinación con el Ag se distribuyan entre anticuerpos con diferentes propiedades biológicas.

5.3.- Producción de anticuerpos monoclonales contra cáncer

Durante muchos años se han realizado investigaciones tendientes a desarrollar anticuerpos que reconozcan moléculas expresadas diferencialmente por células tumorales, con el objeto de utilizarlos para el diagnóstico y la terapia antitumoral. En un principio se inmunizaron animales con células tumorales o extractos de las mismas y esto permitió obtener anticuerpos con cierto grado de especificidad hacia el tejido tumoral, pero simultáneamente se obtenían otros, dirigidos contra diversas moléculas comunes a tejidos normales. Posteriormente, y con la idea de disminuir la producción de anticuerpos inespecíficos, se usaron antígenos (Ag) purificados en lugar de extractos celulares como inmunógenos.

Utilizando estos **anticuerpos policlonales** se desarrollaron técnicas inmunológicas que posibilitaron la identificación de células tumorales o moléculas secretadas por éstas, sobre biopsias o sueros de pacientes con cáncer. Estas técnicas como la inmunohistoquímica (IHQ) inmunofluorescencia (IF), el uso de anticuerpos unidos a isótopos radioactivos, etc.- contribuyeron significativamente al diagnóstico y tipificación de tumores. Sin embargo, estos anticuerpos reaccionan frecuentemente en forma cruzada con moléculas propias de tejidos normales, afectando la interpretación de los resultados.

A los fines terapéuticos su utilización ha sido muy limitada por diversos

factores, incluyendo: la necesidad de inyectar altos niveles de proteína (con el consecuente riesgo de anafilaxis al no ser el suero de origen humano), la reactividad cruzada con tejidos normales y la dificultad de normalizar los distintos lotes de un anticuerpo.

En 1975 Köhler y Milstein reportaron la producción de anticuerpos homogéneos denominados **anticuerpos monoclonales** (AMCs) lo que representó un extraordinario avance que permitió superar en gran medida los problemas antes mencionados. Dichos AMCs poseían una especificidad única, y eran producidos a partir de células híbridas, resultantes de la fusión de una célula productora de anticuerpos (linfocito B), sensibilizada contra un determinado Ag, y una célula proveniente de un mieloma. Esta célula híbrida (**hibridoma)** secretaba anticuerpos cuya especificidad estaba determinada por el linfocito B y era a su vez virtualmente inmortal debido a la naturaleza maligna del mieloma [Köhler G.,1975]. La técnica evolucionó rápidamente, eliminándose la contaminación con anticuerpos derivados del mieloma utilizando una línea celular de mieloma no secretora [Galfre G., 1981].

Desde entonces una inmensa variedad de AMCs han sido desarrollados contra diversos tipos de Ags tumorales lo que ha generado múltiples posibilidades de uso para el diagnóstico y tratamiento antitumoral. **Una de las grandes ventajas de la metodología de obtención de hibridomas es que al mismo tiempo de generar ACMs contra Ag conocidos, también se puede usar para investigar Ag tumorales todavía no identificados.**

La posibilidad de poder aislar e identificar ACMs, significa poder obtener en forma pura y en cantidades apreciables, Ags que luego pueden ser utilizados para inmunizar animales y generar otros ACMs contra ese mismo Ag. Esta "segunda generación" de ACMs puede tener ventajas potenciales sobre el ACM original por varios motivos, como pueden ser mayor avidez, diferente isotipo, mejor acción fisiológica (p.e. fijación de complemento ó ADCC), mejores características para la fragmentación con proteasas, entre otras ventajas.

6.- INMUNOLOGIA TUMORAL

6.1.- Respuesta inmune humoral y celular frente al cáncer

El proceso de malignización puede estar asociado con la expresión de antígenos asociados a tumor (AAT) en las células tumorales que, en ciertos casos, son reconocidas como extrañas por el sistema inmunológico. Estas moléculas, como detallaremos más adelante, pueden resultar totalmente extrañas al huésped porque nunca habían sido expresadas en tejidos propios antes del desarrollo del tumor o fueron expresadas anteriormente en cantidades tan bajas que no pudieron inducir tolerancia. Por ende, pueden inducir respuestas inmunes específicas contra las células tumorales. De hecho, diversas observaciones clínicas y experimentales sugieren que el tumor puede estimular respuestas inmunes en el huésped [Abbas A.K., 1994].

Una observación histológica común que sugiere que los tumores pueden ser inmunogénicos es la presencia de infiltrados mononucleares compuestos por linfocitos T. Estos infiltrados pueden observarse en cualquier tipo de injuria tisular, pero están presentes en determinados tipos de tumores, incluyendo seminoma testicular, timoma, carcinoma medular de mama y melanoma, independientemente de la presencia de estímulos inflamatorios, tales como infección ó necrosis. Otra indicación histopatológica que sugiere que los tumores estimulan una respuesta inmune es la frecuente observación de proliferación linfocitaria (hiperplasia) en los ganglios linfáticos que drenan los sitios de crecimiento tumoral.

Entonces, si las células cancerosas frecuentemente expresan moléculas que pueden actuar como Ags en el huésped, es posible que el sistema inmune pueda reconocer y destruir estas células anormales antes de que desarrollen un tumor, o bien pueda destruir un tumor ya formado. Este rol teórico del sistema inmunológico frecuentemente es denominado como **inmunovigilancia.** El concepto de inmunovigilancia fue aplicado originalmente por Paul Ehrlich a principios de siglo y fue expandido en los 50' y 60' [Burnet F.M., 1970]. Si el

concepto de inmunovigilancia fuera válido, las células efectoras del sistema inmune, tales como linfocitos B, linfocitos T colaboradores (helper), linfocitos T citotóxicos (CTLs), deberían ser capaces de reconocer al Ag tumoral y posteriormente destruir la célula que lo esté expresando. Aunque todavía no existe evidencia directa de que la inmunovigilancia proteja a los individuos de contraer tumores, ciertas observaciones respaldan la validez de este concepto. Por ejemplo, la frecuencia de aparición de tumores malignos exhibe dos picos, uno en la niñez y otro en la vejez, que corresponden a períodos donde el sistema inmune no es totalmente funcional. En pacientes transplantados que reciben grandes dosis de potentes drogas inmunosupresoras, también se observó que hay un aumento en la incidencia de ciertos tipos de tumores, y en estos últimos años se ha observado en pacientes infectados con el virus HIV la tendencia ha desarrollar determinados tipos de enfermedades malignas. Otra evidencia que sostiene esta teoría es la correlación clínico-patológica que muestra que la presencia de infiltrado linfocitario en algunos tumores, por ejemplo, carcinoma medular de mama y melanoma maligno [Thorn M., 1994; Monsson-Brahme E., 1994], está asociada con un mejor pronóstico comparado con tumores similares sin infiltrado. Además existen abundantes datos experimentales que sugieren que los tumores pueden inducir respuestas inmunes mediadas por linfocitos T; entre estos, recientemente, se han identificado varios antígenos restringidos a HLA clase I, que son reconocidos por CTLs *in vitro*, que corresponden a formas mutadas de proteínas celulares normales.

Desafortunadamente, la inmunovigilancia es ineficaz, como lo indica el hecho de que se desarrollan tumores en individuos inmunocompetentes. Los mecanismos por los cuales un tumor puede evadir la respuesta inmune del organismo se engloban dentro del término **escape inmunológico**. Los factores que pueden contribuir al escape inmunológico de los tumores incluyen la cinética de crecimiento tumoral, la modulación de la expresión de antígenos, factores bloqueantes, tolerancia, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y factores genéticos, entre otros muchos [Dawson M., 1989]. De todas maneras, el escape inmunológico no necesariamente invalida

la teoría de inmunovigilancia, porque es muy probable que muchas células malignas puedan ser eliminadas antes de que su presencia sea detectable. El concepto de inmunovigilancia dio fundamento a uno de los principales objetivos en la investigación en el área de la inmunología y oncología actuales, esto es, el desarrollo de nuevas metodologías que aumenten la respuesta inmune del huésped contra el tumor: **la inmunoterapia.**

Inmunidad humoral frente al cáncer: Mediante el uso de sueros de pacientes con cáncer o de sueros de animales portadores de tumores o inmunizados con ellos, se ha buscado identificar Ags únicos de tumor. Si bien solo existen escasos ejemplos de moléculas antigénicas expresadas exclusivamente por los tumores, mediante el uso de AMCs se han definido diversos tipos de antígenos asociados a tumor (AAT) a pesar de que, en la gran mayoría de los casos, no despiertan una respuesta inmune específica en el paciente. Sus principales características se resumen en la siguiente sección.

6.2.- Antígenos asociados a tumor (ATT)

Los marcadores tumorales son la manifestación de los cambios producidos en las células cancerosas, ya que comprenden moléculas de muy diversas clases que se encuentran normalmente ausentes, o existentes en bajas concentraciones en células normales, como por ejemplo productos de genes mutados, o producidos por la desregulación de la expresión de genes normales, expresión de genes en etapas inadecuadas del desarrollo, etc. Están presentes en el tejido tumoral o en fluídos corporales de pacientes con cáncer, y su detección resulta de utilidad para establecer o precisar el diagnóstico, como indicador pronóstico de la evolución de la enfermedad, o para orientar o monitorear terapias.

Esta definición incluye entonces una gran cantidad de moléculas "asociadas a tumor", ya sean propias de un tipo de tumor o de un estadío particular, o indicadoras de ciertas características como agresividad, potencial metastásico, sensibilidad o resistencia a determinados tratamientos, etc. Estas moléculas

pueden estar presentes en la membrana de células tumorales, intracelularmente, en la matriz extracelular, o ser liberadas a sangre u otros fluídos corporales. Debido a la distinta naturaleza química y localización de los marcadores tumorales, las técnicas de detección serán también muy diversas, incluyendo métodos bioquímicos, inmunológicos, histoquímicos, moleculares, etc.

Una gran proporción de estas moléculas han sido identificadas mediante el uso de técnicas inmunológicas. Como mencionáramos anteriormente, en muchos casos fueron **detectadas a través de anticuerpos** xenogenéicos, es decir producidos en otras especies animales, luego de la inmunización con células de un tumor o por la técnica de AMCs. Existen diferentes clases de AAT, y varios de ellos pueden ser expresados en el mismo tumor. A pesar del hecho de que no parecen jugar un papel importante en la respuesta inmune protectiva en el huésped, estos AAT son importantes con fines diagnósticos y son potenciales moléculas "blanco" de tratamientos contra el cáncer.
A continuación se enumeran brevemente algunos de los múltiples marcadores tumorales.

•**Antígenos oncofetales:** Se han denominado así a moléculas que normalmente se expresan en determinados tejidos durante el desarrollo fetal, dejan de expresarse -o lo hacen en cantidades mínimas- en tejidos del adulto, y son re-expresadas (por mecanismos todavía desconocidos) en células cancerosas. Dado que estos marcadores son moléculas normales, no resultan inmunogénicas cuando reaparecen en el tumor. La mayor importancia de estos Ags oncofetales es que pueden ser marcadores para el diagnóstico y seguimiento de tumores. Los dos Ags oncofetales más exhaustivamente caracterizados son la α-fetoproteína (AFP) y el antígeno carcinoembrionario (CEA) [Gold P., 1965 (1), (2); Thompson J.A, 1991; Robbins P.F, 1993].

•**Marcadores específicos de tejido o de diferenciación:** Son moléculas que se expresan comúnmente en un determinado tejido, en cierto estadío de la diferenciación celular normal. Las células tumorales suelen presentar

marcadores de diferenciación propios del tejido del cual se originan. Siendo estas moléculas normales para el organismo, evidentemente no inducirán respuesta inmunológica al ser expresadas en los tumores. Estos marcadores, si bien no son específicos de tumor, resultan de suma importancia para establecer o precisar diagnósticos. Corrientemente, el examen de una muestra tumoral por el patólogo se basa en el análisis macro- y microscópico de rasgos arquitecturales, histológicos y citológicos. En casos donde el material a analizar es escaso, resulta particularmente útil el estudio de marcadores específicos de tejido. Numerosos AMCs han sido desarrollados contra distintos marcadores, y estos en general son evaluados por técnicas de inmunohistoquímica o citometría de flujo. Estos estudios son especialmente útiles en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas, para establecer el linaje celular y estadío específico. También se utilizan habitualmente para determinar el origen de una metástasis en casos donde el tumor primario no ha sido identificado, o para detectar micrometástasis en ganglios linfáticos o médula ósea. En algunos tumores indiferenciados de origen incierto, es necesario utilizar una batería de AMCs contra marcadores específicos de tejido [Batifora H., 1988]. Un ejemplo de este tipo de marcadores, ampliamente utilizado en la detección de metástasis ocultas en médula ósea, son las citoqueratinas, características de células de origen epitelial [Ellis G., 1989; Schlimok G., 1990; Azumi N., 1987].

•**Glicoproteínas y glicolípidos de membrana aberrantemente glicosilados:**
La mayoría de los tumores presentan en su superficie glicoproteínas y glicolípidos anormales como resultado de alteraciones en la adición secuencial de carbohidratos al "core" proteico o a la molécula lipídica. Entre los ejemplos se incluyen los gangliósidos aberrantes, tales como el GD_3 (trisialoganglíósido), GD_2 (disialoganglíósido), expresados en melanoma humano [Pukel C.S., 1982] y Ags modificados de grupo sanguíneo en varios carcinomas. Muchos de los aspectos del fenotipo maligno de las células tumorales, incluyendo invasión de tejidos y comportamiento metastásico, se deben en parte a las funciones alteradas mediadas por las moléculas de superficie celular con síntesis

anormal de glicolípidos y glicoproteínas de membrana citoplasmática [Hakomori S., 1985; Taki T.,1996; Imai K., 1996]. Como consecuencia de esta glicosilación aberrante pueden producirse cambios conformacionales en las moléculas y exponerse nuevos epitopes, normalmente ocultos o ausentes en la molécula normal. Por lo tanto estos glicoconjugados modificados pueden servir como marcadores tumorales.

Una variedad muy amplia de AMCs ha sido desarrollada contra estos tipos de Ags, especialmente contra el grupo carbohidrato. Aunque ninguno de los epitopes está exclusivamente expresado en tumores, la abundancia relativa es superior en células cancerosas. Estos tipos de AATs continúan siendo los favoritos de las terapias contra el cáncer basadas en AMCs [Hakomori S., 1985; Kim Y.S., 1992 y 1990; Ho S.B., 1991].

•**Oncogenes:** Los proto-oncogenes codifican para proteínas que actúan normalmente como factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señales, reguladores transcripcionales y reguladores de funciones nucleares. Este sistema integrado juega un rol fundamental en el control de la proliferación celular. Distintas alteraciones en estos genes pueden conducir a su activación, transformándolos en oncogenes. Los oncogenes pueden codificar para proteínas cuya expresión en las células tumorales sea sólo cuantitativamente diferente a las células normales (por amplificación genética o sobre-expresión), o para productos cualitativamente diferentes (por mutaciones en la secuencia codificante). En ambos casos la identificación de estos oncogenes o sus productos resulta importante, ya que pueden servir como marcadores tumorales de valor pronóstico, diagnóstico, y aún terapéutico.

Uno de los oncogenes más frecuentemente alterados en cáncer y por lo tanto más investigados como marcador tumoral es ***erbB-2***, también llamado *HER-2/neu*. Este gen codifica para un receptor transmembrana de 185 kDa con actividad de tirosina kinasa, altamente homólogo al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [Bargmann C.I., 1986; Yamamoto T., 1986]. *erbB-2* es un miembro de una familia de genes relacionados que incluye

además a *erbB-1* (gen del EGFR), *erbB-3* y *erbB-4;* los cuatro genes son generalmente co-expresados en distintas combinaciones, en diversos tejidos humanos. Una variedad de péptidos ligandos con capacidad de estimular al receptor erbB-2 han sido descriptos, llamados en conjunto neuregulinas (NRGs). Distintos estudios mostraron que estos no se unen directamente a erbB-2, sino que erbB-3 y erbB-4 actúan como correceptores: las NRGs se unen a erbB-3 y erbB-4 y la heterodimerización de los receptores permite la activación de erbB-2 [Hynes N.E., 1994]. Se ha demostrado que las NRGs pueden inducir crecimiento y diferenciación en células epiteliales, gliales y musculares, y cumplen roles esenciales durante el desarrollo embrionario [Meyer D., 1995]. Distintos mecanismos pueden llevar a la activación de *erbB-2* transformándolo en oncogénico, básicamente: 1) sobre-expresión de la proteína normal, ya sea por amplificación genética [Hung M-C., 1995; Hynes N.E., 1994], y/o alteraciones en la transcripción y 2) mutaciones puntuales en el dominio transmembrana [Hynes N E 1994]. La presencia aumentada de erbB-2 en células tumorales y su localización en la superficie celular, hacen de esta proteína un blanco ideal para dirigir terapias antineoplásicas [Hartwell L., 1992; Kasprzyk P.G., 1992; De Santes K., 1992].

•**Genes supresores de tumor:** Como se mencionara anteriormente, otro grupo de genes que juegan un rol esencial en la regulación de la proliferación celular son los "supresores de tumor". Estos genes codifican para proteínas que actúan normalmente limitando la proliferación; por lo tanto su inactivación puede provocar la pérdida del control de la división celular, resultando en una proliferación descontrolada. Deleciones o mutaciones que inactiven estos genes pueden ser críticas en la iniciación y progresión neoplásica. La identificación de estas alteraciones –tanto a nivel de ADN, ARN o proteína– puede resultar de gran valor para el diagnóstico, pronóstico, monitoreo y tratamiento del cáncer.

Un ejemplo interesante es el gen ***p53***. La inactivación de este gen es el evento genético más frecuentemente detectado en cánceres humanos. *p53* está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica para una proteína

nuclear de 53 kDa que funciona como regulador negativo de la proliferación y se expresa en la mayoría de las células del organismo [Revisiones: Hinds P.W., 1994; Malkin D., 1994; Donehower L.A., 1993]. La proteína p53 actúa como factor transcripcional, regulando la expresión de otros genes. Entre ellos induce la transcripción del gen *WAF1* (= *CIP1* = *p21*) cuyo producto se une al complejo de ciclina G_1 - Cdk2 (Cdk2: proteína kinasa dependiente de ciclina) que normalmente permite a la célula atravesar la transición G_1/S del ciclo celular. La unión del producto de *WAF1* inhibe la actividad de este complejo, bloqueando así el pasaje a fase S.

En células normales los niveles de p53 son bajos y están regulados durante el ciclo celular: p53 aumenta en fase G_1 tardía y es degradada rápidamente (vida media: 30 a 60 minutos). Estos niveles se incrementan en respuesta a la presencia de daños en el ADN, determinando la detención del ciclo celular antes de la transición G_1/S. Esto permite a la célula reparar su ADN, de lo contrario entra en proceso de apoptosis [Hinds P.W., 1994; Malkin D., 1994]. En aquellas células donde p53 está inactivada la detención en G_1 no ocurre y el ADN alterado se replica, fijándose la mutación. Esto puede representar uno de los pasos importantes en la iniciación del cáncer: al no estar p53 o estar inactiva, se pierde un sistema que podría bloquear la proliferación de células que han sufrido una mutación carcinogénica. A su vez, esto permite la generación y fijación de posteriores mutaciones importantes en la progresión neoplásica [Lane D.P., 1992; Malkin D., 1994].

Distintos tipos de mutaciones en *p53* han sido detectadas en múltiples cánceres humanos (mama, colon, gástrico, tumores de sistema nervioso, etc.). Cuando estas alteraciones fueron analizadas, el patrón más frecuente observado resultó ser una mutación puntual (generalmente sustitución de un aminoácido por otro) en uno de los alelos de *p53*, acompañada por pérdida del otro alelo. Sin embargo, en algunos casos pudo identificarse un tipo particular de mutantes que presentaba un alelo no-mutado y el otro con una mutación dominante que codifica para una proteína inactiva, cuya conformación se encuentra alterada. En estos mutantes la oligomerización entre proteínas no-mutadas y mutantes (p53 normalmente se agrega formando oligómeros)

determina que el complejo adopte una conformación alterada y sea inactivo [Donehower L.A., 1993; Malkin D., 1994].

Un análisis detallado de las mutaciones de *p53* detectadas en tumores mostró que la gran mayoría ocurren en determinados "puntos calientes" localizados en regiones muy conservadas en la evolución; por ejemplo, en carcinomas de colon y mama más del 90 % de las mutaciones observadas mapean en cuatro "puntos calientes". En contraste con la proteína p53 no-mutada, estas formas mutantes resultan ser más estables y acumularse intracelularmente; por lo tanto pueden ser fácilmente detectadas por inmunohistoquímica [Donehower L.A., 1993; Finlay C.A., 1988].

Diversos trabajos han demostrado que la determinación de estas alteraciones de p53 en el tejido tumoral pueden ser un buen indicador pronóstico de la sobrevida y evolución del paciente [Donehower L.A, 1993]. En general, la presencia de altos niveles de p53 determinados por inmunohistoquímica, o la detección directa de mutaciones por técnicas moleculares, han sido asociadas con mal pronóstico, especialmente en carcinomas mamarios. Aquí, la discriminación de p53 podría ser útil, contribuyendo a identificar aquellos pacientes sin metástasis en ganglios linfáticos regionales pero cuyos tumores son de crecimiento agresivo, y en los cuales es necesario una quimio - u hormonoterapia adyuvante [Allred D.C., 1993; Silvestrini R., 1993; Patel D.D., 1996; Bergh J., 1995]. Si bien hay aún algunos resultados controvertidos respecto del uso de p53 como marcador, la discusión está básicamente centrada en la técnica utilizada para detectar las mutaciones y no en el valor pronóstico de éstas [Sjogren S., 1996; Kovach J.S., 1996; Chen Y.H., 1995; Lohmann D., 1993].

•**Receptores hormonales:** Algunos tumores, como el carcinoma mamario, son especialmente influenciados en su comportamiento por la acción de distintas hormonas. En estos casos la determinación de la presencia de receptores hormonales en el tumor representa un marcador de gran valor. En carcinomas mamarios por ejemplo, la evaluación de receptores de estrógeno (RE) y de progesterona (RPg) resulta doblemente importante. En primer lugar

permite predecir la respuesta clínica a tratamientos endócrinos, ya que se ha demostrado que la capacidad de responder a hormonoterapia está asociada con la presencia en el tumor de RE y RPg. La segunda razón es que, pacientes cuyos tumores presentan RE y RPg evolucionan más favorablemente que aquellos que carecen de estos receptores.

Otros **Ags tumorales** que son específicamente **reconocidos por linfocitos,** incluyen una amplia variedad de proteínas celulares y virales, y han sido definidos por diferentes técnicas analíticas. Entre ellos se encuentran productos de genes silentes en situación normal, como el MAGE-1 (melanoma y carcinoma de mama), productos de oncogenes activados por mutaciones o rearreglos de genes normales como la proteína $p21^{ras}$ (mutación puntual en posición 12, en algunos carcinomas), el producto p210 del rearreglo bcr/abl (leucemia mieloide crónica) y productos de genes supresores tumorales mutados p53 (> 50% de los tumores humanos). También productos de genes virales en neoplasias asociadas a virus (Ag SV40 T en tumores de rata inducidos por virus SV40; proteínas E6 y E7 de papillomavirus humano en carcinoma cervical humano; producto del gen EBNA-1 del virus Epstein-Barr en linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo) [Pardoll D.M., 1993; Van der Bruggen P., 1991].

El gen humano denominado MAGE-1 (melanoma antigen-1), aislado partir de una línea de melanoma maligno [Chen Y.T., 1994], codifica una proteína que es procesada intracelularmente y presentada como un péptido en asociación con moléculas de HLA clase I (Human Leucocyte Antigen). Este complejo es reconocido por un clon CTL (cytotoxic T lymphocyte) Ag-específico derivado del mismo paciente del que se originó la línea de melanoma, observándose la lisis *in vitro* de las células de melanoma autólogo. La proteína MAGE-1 es expresada por más del 50% de los melanomas y por 25% de los carcinomas de mama, pero no es detectable en los tejidos normales [Zakut R., 1993]. Aunque no hay evidencia de que la expresión de MAGE-1 induzca una respuesta de rechazo tumoral, lo que está claro es que los pacientes de melanoma tienen CTLs con memoria específica para MAGE-1. Existe gran entusiasmo en la actualidad por desarrollar el uso de estos clones de CTLs y péptidos de MAGE

como herramientas terapéuticas contra el cáncer.

6.3.- Estrategias de inmunoterapia anti-tumoral - Presentación antigénica en tumores.

La hipótesis que se plantea en el desarrollo de la inmunoterapia anti-tumoral es que, dado que los antígenos de la célula tumoral inducen una respuesta inmune muy débil, ésta se puede incrementar con **inmunoterapia** para hacerla más efectiva en el control del crecimiento tumoral, o bien, que la respuesta inmune debilitada del paciente puede ser restaurada con estimulantes inmunológicos.

Se describirán a continuación algunos ejemplos de inmunoterapia tumoral que ya han sido probados en el pasado y otros que todavía son objeto de investigación.

1- Estimulación no específica del sistema inmune: La estimulación no específica del sistema inmune en pacientes portadores de tumores se realiza con adyuvantes, tales como el bacilo Calmette-Guérin (BCG) y el Corynebacterium parvum, que son inyectados en los sitios de crecimiento tumoral. Esta terapia se está aplicando desde hace muchos años, especialmente en carcinoma de vejiga y melanoma, y sirve principalmente para reclutar y activar macrófagos y en general todas las células presentadoras de Ag (APCs) [Lipton A,1983].

2- Inmunización activa contra tumores: Este método consiste en inyectar células tumorales autólogas o heterólogas, irradiadas o lisadas, o sobrenadantes de cultivos de líneas celulares, junto con adyuvantes inespecíficos. La estrategia de este enfoque terapéutico se basa en la hipótesis de que las células administradas tendrían mayor carga antigénica que las del huésped, y además al ser suministradas con un adyuvante, o bien haptenizadas, favorecerían la activación linfocitaria [Bystryn J-C, 1992; Morton D.L., 1992; Bover L., 1992]. Estas vacunas tumorales están siendo perfeccionadas constantemente, introduciendo en las células tumorales diversos genes, entre los que se cuentan los productores de citoquinas y genes de Ags tumorales, lo que permitiría a las células ser más inmunogénicas. La identificación de nuevos Ags tumor-específicos reconocidos por linfocitos T citotóxicos también podría ayudar al diseño de nuevas vacunas.

En este sentido, recientemente se están ensayando nuevas vacunas anti-tumorales que hacen uso de células dendríticas (DC) aisladas del propio paciente, como APCs cargadas exógenamente con ciertos péptidos derivados de AATs, para ser presentados a los linfocitos T, en el contexto de moléculas HLA [Gilboa E., 1998]. Estas vacunas tenderían a aumentar la presentación antigénica de dichos Ags, esperando que la respuesta generada sea efectiva contra las células del tumor presente en el paciente, que expresan los Ags elegidos para la terapia.
También se han ensayado vacunas con células tumorales transfectadas con construcciones de ADN que codifican para Ags tumorales y moléculas co-estimulatorias de la respuesta inmune (gen B7) o con citoquinas (ver siguiente párrafo), con el objeto de aumentar su inmunogenicidad en experimentos de protección tumoral realizados en animales. Sin embargo, mientras que muchos de estos esquemas resultan relativamente exitosos al conferir protección en animales frente a un desafío (challenge) con células tumorales, pocos son aún efectivos para el tratamiento de tumores establecidos.

3- Terapia celular adoptiva: Se refiere a la transferencia de células del sistema inmune cultivadas in vitro que tienen actividad antitumoral en el huésped portador del tumor. Existen dos variaciones en esta aproximación y que ya han sido probadas en experiencias clínicas:

a) Terapia con células asesinas activadas con linfoquinas, células LAK (Lymphokine Activated Killer cells): involucra la generación in vitro de células LAK que se obtienen cultivando leucocitos de sangre periférica del paciente con altas concentraciones de IL-2 (Interleuquina-2). Las células LAK, predominantemente derivadas de células NK (Natural Killer), son luego re-inyectadas al paciente [Rosemberg S A, 1987].

b) Terapia con linfocitos infiltrantes de tumor, células TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes): En este caso se producen in vitro células LAK a partir de células mononucleares que se aíslan del infiltrado inflamatorio que infiltra al tumor sólido. Esta terapia se basa en la hipótesis de que estos TILs están enriquecidos en células con capacidad citotóxica anti-tumoral, que incluyen células activadas NK y CTLs [Rosemberg S A, 1988].

4- Terapia pasiva con Anticuerpos anti-tumor: Existen múltiples variantes en el uso de AC administrados pasivamente en terapia contra el cáncer. Una de las estrategias es usar AC dirigidos contra AAT que transportan en su molécula sustancias citotóxicas y así producir la muerte selectiva de las células tumorales. Esta idea del uso de Ac en cáncer como "balas mágicas" ha sido muy seductora durante varios años y todavía continua siendo un área muy interesante de investigación. Como se mencionara anteriormente este tipo de terapia se inició administrando anticuerpos policlonales pero, en la actualidad se realiza casi exclusivamente con AMCs.

Las variantes de esta modalidad terapéutica incluyen la utilización de AMCs quiméricos murino-humanizados (ver más adelante) y el acople de distintas moléculas a los AMCs (toxinas, drogas citotóxicas, enzimas que activan pro-drogas y radioisótopos), con el objeto de dirigirlas contra las células tumorales [Pagliaro L.C., 1998]. Algunos aspectos de este tema se desarrollan brevemente en la siguiente sección.

5- Citoquinas: La producción de citoquinas recombinantes humanas altamente purificadas y en grandes cantidades ha hecho posible su uso en terapia. La estrategia de su uso terapéutico se basa en la capacidad de las citoquinas para estimular la función de uno o varios componentes del sistema inmune celular.

En general, los efectos de las citoquinas no son específicos para células efectoras antitumorales, motivo por el cual se está tratando de transfectar células tumorales con genes de citoquinas como se ha mencionado previamente, para incrementar la actividad específica sobre el tumor [Dalgleish A.G., 1994; Hock H, 1993]. Por ejemplo la administración de IL-2 produce un aumento de linfocitos totales y de células LAK y NK, un aumento sérico de TNF (Tumor Necrosis Factor), IL-1 (Interleuquina-1), y γ-IFN (γ-Interferon) [Nishimura T., 1986; Smith K.A., 1988]; el α-IFN, producido normalmente por los leucocitos posee efecto antiproliferativo tumoral in vitro, aumenta el potencial lítico de las células NK y la expresión de moléculas de HLA clase I en varios tipos celulares. Está demostrado además, que el α-IFN regula la expresión de Ags en la célula tumoral y se lo ha utilizado clínicamente en algunos casos, para aumentar la eficiencia de detección de tumores cuando se usa un AMC radiomarcado [Borden E.C, 1988]. Los ensayos clínicos con α-IFN indican que es una droga potencialmente útil en carcinoma renal, melanoma, sarcoma de Kaposi y algunos tipos de linfomas y leucemias. El tratamiento con γ-IFN se fundamenta en la activación de células NK y macrófagos, y el aumento de expresión de moléculas HLA.

6.4.- Utilización de AMCs en diagnóstico y terapia del cáncer

Los AMCs resultan de suma utilidad en oncología, tanto en el diagnóstico como en el tratamiento y ya sea en estudios *in vitro* como *in vivo*. Las aplicaciones actuales de los AMCs en oncología se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Aplicaciones actuales de AMCs en oncología

Diagnóstico y detección
• Inmunohistoquímica para detectar y clasificar tipos celulares por presencia o ausencia de marcadores en muestras de tumores o extendidos celulares
• Análisis de fluídos corporales (suero, orina, derrames pleurales, etc.) para detección de sustancias marcadoras por inmunoensayos
• Imágenes con AMCs radiomarcados (RID), incluyendo linfocentellografía
• Detección γ intraoperatoria con AMCs radiomarcados como sondas
Tratamiento
• Citotoxicidad directa de AMCs (mediada por Complemento o ADCC)
• Inhibición de receptores de factores de crecimiento
• Inmunoconjugados (radioisótopos, drogas, toxinas)
• Purga de células tumorales (*ex vivo*) de médula ósea almacenada para autotransplante
• Vacunas anti-idiotípicas

[Adaptado de Goldenberg D M, 1993]

De todas estas aplicaciones, a continuación desarrollaremos brevemente la radioinmunodetección y la terapia con inmunoconjugados.

• Las primeras aplicaciones de anticuerpos en el diagnóstico *in vivo* de pacientes con cáncer se realizaron con el fin de detectar y localizar tumores primarios o focos metastásicos, utilizándose para ello anticuerpos conjugados con radioisótopos. Por medio del monitoreo visual externo es posible detectar el radioinmunoconjugado que, dada su especificidad por algún marcador tumoral, deberá localizase mayoritariamente en la zona del tumor. Este método de diagnóstico por imágenes, denominado **radioinmunodetección (RID),** se ha perfeccionado mucho y su uso se ha extendido ampliamente en los últimos años. Inicialmente varios estudios fueron realizados utilizando anticuerpos policlonales antitumorales en modelos animales y luego en pacientes [Goldenberg D.M., 1974 y 1978; Mach J.P., 1974 y 1980; Ford C.H.J., 1986].

Con el desarrollo de los AMCs, los radioinmunoconjugados resultaron herramientas ideales para detectar metástasis ocultas, realizar monitoreos post-quirúrgicos y detectar recurrencias tempranamente [Colcher D., 1987; Esteban J.M., 1987; Goldenberg D.M.,1990; Hertel A., 1990; Gallinger S., 1993; Doerr R., 1991].

Numerosos AMC utilizados han sido utilizados para detectar diversos tipos de lesiones, no siempre de origen maligno. Esto incluye AMCs contra fibrina y plaquetas para obtener imágenes de trombos, contra marcadores de granulocitos para imágenes de abscesos e inflamaciones [Bai Y., 1984; Collet B., 1988], contra miosina para infarto de miocardio [Khaw B.A., 1980] y contra bacterias para imágenes de infecciones ocultas. Los AMCs contra miosina también se usaron exitosamente en la RID de rabdomiosarcomas y leiomiosarcomas [Cox P.H., 1988].

Primeramente el AMC debe mostrar reactividad con el tejido tumoral (se analiza una biopsia por IHQ). Con este método también se puede estudiar la reactividad cruzada con tejidos normales. Generalmente éste es el punto limitante del uso clínico de los AMCs. En general los AMCs utilizados en RID de tumores reconocen AAT de membrana citoplasmática, mientras que aquellos que reconocen Ags intracelulares han tenido poco interés. Sin embargo, se han reportado casos de Ags intracelulares que han sido exitosamente radioinmunodetectados en melanoma y carcinoma cervical [Welt S, 1987; Epstein LA, 1988].

Una gran variedad de AMCs se ha utilizado en RID de carcinomas de colon, recto, mama, vejiga, y páncreas, así como también de sarcomas, melanoma y leucemias [Perkins A.C., 1991]. Entre ellos podemos citar AMCs anti-CEA para detectar tumores de colon y mama [Goldemberg D.M., 1990 y 1992], anti-AFP para tumores de línea germinal e hígado, [Baum R.P., 1991], AMC LL2 para localización y estadificación de linfoma no-Hodgkin [Blend M.J., 1995].

Se considera que tres aspectos son críticos para la óptima detección de las imágenes: el isótopo, la forma del AMC y el proceso de captación de la imagen. La mayoría de los isótopos acoplados a AMCs utilizados en RID son emisores γ

ó β, puesto que la biodistribución tiene que ser detectada desde el exterior por el cristal de iodo de la cámara gamma, o por aparatos más modernos como el SPECT (emission computerized tomography). Como observamos en la **Tabla 4** los cuatro isótopos más usados en RID han sido [^{99m}Tc], [^{111}In], [^{131}I] y [^{123}I]. De todos ellos, el [^{99m}Tc] es el que ofrece mejores posibilidades debido al bajo costo de producción a partir de generadores portátiles, su corta vida media y una emisión γ única de alta energía (140 Kev). La detección de tumores *in vivo* con AMC marcado con [^{99m}Tc] dependerá de la rapidez con que el mismo se acumula en el tumor y es eliminado del pool sanguíneo, dada la corta vida media del isótopo. En los últimos años se han desarrollado diversos métodos, a fin de obtener kits de marcación de AMCs con [^{99m}Tc] en un sólo paso [Mather S.J. y Ellison D., 1990], para obtener imágenes pocas horas después de la inyección del radioinmunoconjugado (6-24 hs).

Tabla 4: Isótopos de uso frecuente en RID.

ISÓTOPO	VIDA MEDIA	EMISIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
^{99m}Tc	6.02 hr	γ (140 Kev)	Bajo costo (generador), imagen excelente	Metabolismo renal
^{111}In	3d	γ (173 y 247 Kev)	Costo intermedio, imagen excelente	Metabolismo hepático y captura en bazo
^{123}I	13h	γ (159 Kev)	Alto costo, imagen excelente	Disponibilidad
^{131}I	8d	γ (364 Kev)	Bajo costo	Emisor β
^{125}I*	60.4d	Electrones Auger	Bajo costo, emisión de bajo rango	Imágenes pobres
^{186}Re	3.4d	β	Buena imagen	Disponibilidad

* De uso frecuente en modelos animales de tamaño pequeño

Actualmente la RID se orienta al descubrimiento de tumores ocultos y la confirmación de sitios tumorales sugeridos por otros métodos de análisis más anatómicos (radiología, tomografía), aunque se han sumado evidencias de que

podría resultar de utilidad para el diagnóstico inicial, la estadificación del tumor y predicción de respuesta terapéutica [Larson S.M., 1990; Goldemberg D.M., 1993]. En este sentido, la RID puede determinar si un tumor dado expresa *in vivo* un Ag que será usado como blanco de inmunoterapia, en especial para radioinmunoterapia (RIT). También la RID puede ayudar a resolver problemas como por ejemplo diferenciar una lesión maligna de una cicatriz producida por terapia radiante o cirugía.

A la fecha, más de 10.000 pacientes en todo el mundo han sido estudiados por medio de RID sin evidencias de toxicidad, y la eficacia en la detección de lesiones conocidas varía entre el 60-90%, dependiendo del AMC, de la forma utilizada (Ig entera o fragmentos), del isótopo y del método de análisis de las imágenes. Con AMCs marcados con [^{99m}Tc] se han podido detectar tumores tan pequeños como 0.4-0.5 cm pero en general se considera que el límite de resolución esta entre 1-2 cm.

• El uso **terapéutico** de AMC dirigidos contra marcadores tumorales en pacientes con cáncer es un área de intensa investigación aunque con algunas limitaciones. Se han desarrollado distintas estrategias de aplicación, dependiendo de la naturaleza y localización celular del antígeno, así como de las propiedades del AMC.

a) AMC anti-tumor no-conjugados: La aplicación de un AMC no conjugado requiere que su unión al Ag específico pueda desencadenar alguna reacción de citotoxicidad directa hacia la célula blanco, o bien interferir con la proliferación y diferenciación celular. Aquellos AMCs con capacidad de mediar reacciones inmunológicas de citotoxicidad celular (ADCC = citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo), o bien lisis a través del sistema de complemento, pueden en principio ser utilizados sin modificaciones. Además, es necesario que el antígeno correspondiente sea expresado en la superficie celular, y que el complejo antígeno-AMC no sea rápidamente internalizado, sino que permanezca en la membrana celular el tiempo suficiente para permitir que ocurra la reacción de citotoxicidad. Es también importante que el antígeno esté

presente en la gran mayoría de las células tumorales, o al menos en la subpoblación de células stem, responsables de la proliferación celular en el tumor. Ejemplos de esta estrategia lo constituyen los *anticuerpos antidiotípicos* usados para el tratamiento de linfomas de células B, que expresan Ig de un idiotipo específico (Ag) en la superficie. Estos AMCs median la fijación de complemento o la ADCC para eliminar células de linfoma [de Kroon J.F., 1996]. Otro ejemplo es el AMC FC-2.15, un poderoso fijador de complemento que media la lisis de células tumorales de mama y colon y ha sido ensayado en pruebas clínicas [Mordoh J., 1994; Mordoh J., 1995].

La utilización de AMCs de origen murino en humanos genera cierta respuesta inmune asociada, denominada HAMA (human anti-mouse antibodies). Esta respuesta puede reducir el valor terapéutico del AMC murino. También la eficacia terapéutica puede verse disminuida por la debilidad del AMC murino para reclutar efectores del sistema inmune humano para ejercer su acción (por ejemplo en la ADCC). Existen dos categorías de moléculas recombinantes que se pueden generar para mejorar este problema. Un **anticuerpo quimérico** consiste en la sustitución de un dominio variable completo de un anticuerpo humano por su contraparte de ratón. En contraste un **anticuerpo humanizado** es aquel que incluye sólo la sustitución de los seis loops que unen el Ag (CDRs= combining determinant regions) de un anticuerpo humano, por los CDRs de un anticuerpo murino. Generalmente se requiere del cambio de algunos residuos por fuera de los CDRs, a fin de conservar la unión del anticuerpo humanizado al Ag con afinidad similar a la del AMC murino.

Varios AMCs quiméricos y humanizados se están ensayando actualmente en pruebas clínicas de terapia anti-cáncer, entre ellos podemos citar el anti-CD20 quimérico para linfoma no-Hodgkin de bajo grado [Shan D., 1998], el anti-p185 ^{HER2} para cáncer de mama [Pegram M.D., 12998] y el anti-CD4. [Delmonico F.L., 1996].

b) Depleción in vitro de células tumorales de médula ósea mediante lisis por complemento: Esta metodología es muy útil para transplantes autólogos

de médula ósea (MO) en pacientes con linfoma B. La eliminación de células tumorales residuales presentes en la MO con AMCs, se realiza previo al autotransplante, en protocolos de radio y quimioterapia [Hammert L.C., 1997; Mehta J., 1997].

c) Anticuerpos heteroconjugados y biespecíficos: Esta terapia podría contribuir a reclutar células con función citotóxica en la zona del tumor. Estos Ac contra un AAT tienen acoplado otro Ac, dirigido contra una proteína presente en una célula efectora citotóxica. Así, el complejo biespecífico atraería células del sistema inmune directamente sobre las células tumorales, favoreciendo su eliminación [Kufe P., 1997; Hartmann F., 1996]. Aquí también podemos citar las moléculas recombinantes scFv (single chain fragment variable), los fragmentos más pequeños de anticuerpo que retienen la especificidad de unión por el Ag, y comprenden las regiones variables de ambas cadenas (pesada y liviana) unidas por un polipéptido "linker". Con ellos se generan proteínas de fusión con la especificidad de los AMCs y diversas funciones efectoras anti-tumorales [Jannot C.B., 1997].

d) AMCs conjugados a toxinas, radioisótopos ó drogas: El uso de AMCs como vehículos para dirigir drogas citotóxicas o prodrogas [Kerr D.E., 1995], radioisótopos o toxinas [Pagliaro L.C., 1998] requiere el reconocimiento de un antígeno en la superficie de las células cancerosas, seguido generalmente de la endocitosis del conjugado AMC-droga o toxina. También en este caso es importante tener en cuenta qué población celular dentro del tumor expresa el antígeno, y será por lo tanto blanco de la terapia.

A continuación se desarrollan algunos aspectos relativos a la terapia con radioinmunoconjugados.

La terapia con AMCs acoplados a isótopos radioactivos, denominada **Radioinmunoterapia (RIT),** hace uso de la radiación como agente capaz de producir un daño irreversible que lleva a la muerte de las células tumorales reconocidas por el AMC. En este caso, la heterogeneidad antigénica es en

principio menos problemática que para los conjugados de toxinas o drogas, puesto que se requieren algunas células que expresen el antígeno para dirigir los radioisótopos al tumor, donde el efecto tóxico sería ejercido también sobre las células vecinas, independientemente de la expresión antigénica. La característica que hace atractiva ésta estrategia es que la mayoría de los órganos normales (dependiendo del Ag blanco) no deberían recibir radiación intensa respecto del tumor. Se requiere que el isótopo radioactivo se una fuertemente al AMC, ya sea directamente o a través de grupos intermediarios, sin afectar el reconocimiento antigénico.

Como se resume en la **Tabla 5** se está investigando una gran variedad de radionucleídos que difieren, principalmente, en la distancia que recorren en el tejido las partículas emitidas por cada uno de ellos. Las emisiones más importantes son la radiación γ, las partículas β, α y la captura electrónica. En el caso del [^{131}I] los rayos γ irradian los tejidos y órganos a distancia del depósito del isótopo en el tumor, y las partículas β recorren distancias cortas (< 1mm) debido a su baja energía cinética de emisión. En cambio el [^{90}Y] posee una mayor energía de emisión β, lo que le permite atravesar distancias de varios milímetros dentro de los tejidos. Las partículas α de alta energía, emitidas por ciertos radionucleídos ([^{211}At], [^{212}Pb], [^{212}Bi]) en cambio, atraviesan distancias de sólo 40-80 μm, pero son mucho más efectivas que las partículas β y la radiación γ, ya que una sola partícula α que impacte en el núcleo sería suficiente para matar la célula. Esto, sin embargo resulta útil para eliminar células individuales sin penetrar los tejidos normales, pero para obtener un efecto sobre todo el tumor requiere que todas las células del mismo sean reconocidas por el AMC. El [^{125}I] posee una emisión de electrones Auger, que depositan su intensa energía sólo a distancias muy cortas, del orden de los 20 nm, de modo que se requiere la proximidad al núcleo celular para matar la célula, pero no se afectan los tejidos normales [Goldemberg D.M., 1993]

Tabla 5: Isótopos principalmente utilizados en RIT

ISOTOPO	VIDA MEDIA	EMISION	VENTAJAS	DESVENTAJAS
[^{131}I]	8 d	β	bajo costo; imágenes	deiodinación; captación en tiroides
[^{90}Y]	2.5 d	β	química del In	pérdida del quelato; captación ósea; no-imágenes
[^{186}Re]	3.5 d	β	química del Tc; imágenes	Disponibilidad
[^{188}Re]	17 h	β	química del Tc; obtención a partir generador; imágenes	Disponibilidad
[^{67}Cu]	2.5 d	β	Imágenes	Disponibilidad
[^{211}At]	7 h	α; captura electrónica	química del In; corto alcance	No-imágenes
[^{125}i]	60.4 d	captura electrónica (Auger)	electrones de corto alcance	imágenes pobres

[Adaptado de: Goldemberg D.M., 1993]

Los avances en la clínica con RIT han sido más lentos que para la RID. La mayoría de los estudios en los últimos quince años se han realizado con Ac murinos enteros marcados con [^{131}I] [Buchsbaum D.J., 1990; Larson S.M., 1991; Behr T.M., 1997], encontrándose básicamente las siguientes conclusiones:

1- En ciertos tumores sólidos se pueden obtener respuestas parciales y transitorias (aproximadamente 20% de respuestas, con raras remisiones completas).

2- En general los linfomas y leucemias responden mejor al tratamiento (generalmente un 50% de los pacientes responden y hay remisiones completas).

3- Usualmente (no siempre) existe un efecto dosis-dependiente.

4- La toxicidad en médula ósea (MO) es el factor que limita la dosis y el sitio primordialmente afectado por toxicidad (muchos protocolos incluyen el auto-transplante de MO post- tratamiento).

5- La cantidad de radionucleído que se deposita en el tumor blanco es muy pequeña (0.0007% al 0.01% de la dosis inyectada por gramo).

6- La dosis total de radiación que se libera en el tumor es generalmente baja (<1200-2000cGy), especialmente para [^{131}I].

7- La aparición de HAMA ha limitado el uso de múltiples cursos de terapia (los pacientes con neoplasias linfoproliferativas, menos inmunocompetentes, suelen desarrollar baja respuesta HAMA).

Para resolver las limitaciones encontradas, se han introducido diversas innovaciones, entre las cuales podemos citar: métodos que aumentan la vascularización y permeabilidad vascular en el tumor [Msirikale J.S., 1987; Buschbaum D.J., 1995], la administración intratumoral o intracavitaria para aumentar la concentración del radioinmunoconjugado en el tumor [Riva P., 1991; Kemshead J.T., 1986], la utilización de fragmentos de Ig para disminuir la unión a células con receptores para Fc y aumentar la penetración a los tumores [Hopkins K., 1998; Ychou M., 1998], la utilización de cócteles de AMCs contra distintos Ag expresados por el tumor [Gaffar S.A., 1981] y métodos que aumenten la expresión de los Ag blanco, como por ejemplo el uso de interferón [Guadagni F., 1988].

Se están usando también factores de crecimiento hematopoyéticos (GM-CSF= granulocyte-macrophage colony stimulating factor; IL-1= interleuquina 1), para controlar la toxicidad hematológica [Blumental R.D., 1992; 1997].

Por último, las estrategias más novedosas en RIT hacen uso de la unión no-covalente de alta afinidad entre la avidina y la biotina, para generar un esquema terapéutico de dos o tres pasos. En primer lugar se administra, en forma endovenosa, el AMC anti-tumoral biotinilado y 1 a 3 días después se inyecta avidina no-marcada para remover el exceso de AMC libre en la circulación. Finalmente, se administra 48 hrs después una tercera inyección de un derivado de biotina radiomarcado. Con esta aproximación Paganelli y colaboradores han podido obtener respuestas parciales en cáncer [1997] e incluso remisiones totales en pacientes con cáncer orofaríngeo avanzado con AMC marcado con [^{90}Y] [1998].

OBJETIVOS

La obtención de nuevos anticuerpos monoclonales (AMCs) dirigidos contra tumores humanos ha permitido definir un número creciente de antígenos (Ag) asociados a tumor (AAT), especialmente aquellos que resultan altamente inmunogénicos en ratones. Muchos de éstos han resultado ser Ag oncofetales, de diferenciación o linaje celular específicos [Goldemberg D.M., 1990; Ellis G., 1989], que son expresados solo por una fracción de las células del tumor. **El principal objetivo de este trabajo de Tesis se orienta a obtener AMCs dirigidos contra células indiferenciadas, comunes a varios tumores, a la caracterización de los Ag reconocidos y a evaluar la posible utilidad diagnóstica y/o terapéutica de dichos AMCs.** La línea celular de cáncer de mama humano IIB-BR-G, establecida en nuestro laboratorio y derivada de un tumor primario altamente indiferenciado e independiente de hormonas, fue elegida para ese propósito. En base a estas premisas hemos desarrollado el **AMC FC-5.01.**

En los Capítulos I y II se presenta la selección del AMC FC-5.01, por medio de un screening de reactividad contra líneas celulares de cáncer humano, diversos tumores y tejidos normales. El Ag reconocido por FC-5.01 fue caracterizado e identificado bioquímicamente y se determinó su localización celular.

Desde el punto de vista funcional, como se presenta en el Capítulo III, se investigó la capacidad citotóxica/citolítica de FC-5.01 sobre células tumorales, su capacidad citostática (inhibición del crecimiento de líneas celulares tumorales *in vitro*) y la internalización y catabolismo de los complejos Ag-FC-5.01 en células reactivas. También se investigó el efecto de FC-5.01 sobre la migración de células neoplásicas.
Empleando como modelo *in vivo* la línea tumoral IIB-BR-G_{NUDE}, presentada en la Introducción, se evaluó la posibilidad de utilizar el AMC FC-5.01 unido a radioisótopos, con fines diagnósticos y terapéuticos (Capítulo IV).

Finalmente, en el Capítulo V se presenta el clonado y secuenciación de las regiones variables de dicho AMC, pasos indispensables para la construcción de moléculas de mayor potencial terapéutico, como anticuerpo humanizado o quimérico, o bien scFv-conjugados con péptidos o citoquinas que fueron descriptas en la Introducción.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I: OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL AMC FC - 5.01 - FRAGMENTACIÓN Y MARCACIÓN CON [^{125}I].

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la tecnología de hibridomas ha permitido no solamente la obtención de AMCs dirigidos contra prácticamente todo tipo de moléculas, sino también la identificación de nuevos Ags, entre ellos AAT, presentes en muestras complejas, como por ejemplo extractos de tumores o células neoplásicas enteras. Con el objeto de obtener nuevos AMCs dirigidos contra células neoplásicas altamente indiferenciadas, se eligió la línea celular IIB-BR-G como inmunógeno. Estas células derivan de un carcinoma primario de mama (ductal infiltrante) de características indiferenciadas. Las células IIB-BR-G presentan alta heterogeneidad morfológica y numerosas alteraciones citogenéticas [Bover L., 1991]. Entre sus características principales podemos citar la amplificación de oncogenes (c-*myc* y c-*fos*), este último con rearreglos cromosómicos, la independencia de hormonas para su crecimiento (no expresan receptores para estrógenos ni progesterona), y la alta tumorigenicidad en ratones nude, que generan metástasis espontáneas en ganglios linfáticos y pulmón [Bover L., 1991, 1998]. Las células IIB-BR-G no expresan Ags de diferenciación como CEA o NCA [Ballaré C., 1993; Podhajcer O.P.,1986] pero sí presentan expresión de PEM 200 kDa, una glicoproteína que es generalmente expresada por tumores de mama altamente indiferenciados [Ballaré C., 1993] y altos niveles de p53 [Poller D.N., 1993]. Estas células tampoco poseen Ags relacionados a grupo sanguíneo como sTn o Le^x (Lewis X), cuya expresión ha sido reportada en varios carcinomas de origen epitelial [Zhang S., 1997]. Otra característica que apunta a la naturaleza indiferenciada de las células IIB-BR-G es la capacidad de crecimiento en agar blando y la invasividad en ensayos in vitro.

I-1.- OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE AMCs

Luego de la fusión de las células de mieloma murino X63.A8 653 con los esplenocitos de un ratón Balb/c, inmunizado con células IIB-BR-G, se seleccionaron los hibridomas resultantes con medio HAT [Goding JW, 1983]. Luego de 10-15 días, se observó proliferación de clones únicos en 40/96 pocillos y por su óptimo crecimiento se seleccionaron 14 hibridomas para su estudio (screening). Los sobrenadantes de dichos clones se ensayaron sobre células IIB-BR-G y otras líneas celulares (cáncer de mama y melanoma) por ELISA, y sobre linfocitos normales humanos fijados con paraformaldehído al 4% (Inmunocitoquímica).

Tabla 6- Screening de hibridomas de la fusión por ELISA:

HIBRIDOMA	IIB-BR-G	MCF-7	MDA	IIB-MEL-J	IIB-MEL-LES	LINFOCITOS
VC4P1	-	+	+	-	-	+
VA6P1	-	-	-	-	nd	-
VD5P4	+	++	++			
VA4P1	-	-	-	-	nd	-
VA1P3	-	-	-	-	nd	-
VB2P1	-	-	-	-	nd	-
VC6P3	++	++	++			+
VD2P4	-	-	-	-	nd	-
VA3P1	+++	+++	++	+++	+++	
VB4P2	+	+	+	nd	-	+
VC1P2	++	++	++		+++	+
VB3P3	-	-	-	-	-	-
VD3P2	-	+	+/-	-	-	-
VB2P3	-	+	+/-	-	-	-

Intensidad de la reacción: (-) negativo, (+ /-) muy débil, (+) moderada, (++) intensa y (+++) muy intensa. nd: no determinado.

Se seleccionaron en este primer paso 4 hibridomas (VD5P4, VC6P3, VA3P1 y VC1P2) por su reacción positiva con las líneas celulares tumorales y negativa

con linfocitos normales. Como se observa en la **Tabla 6**, el hibridoma **VA3P1** resultó particularmente interesante ya que reconoció intensamente tanto células de cáncer de mama como de melanoma humano. Estos resultados fueron confirmados por Inmunocitoquímica (ICQ) sobre células fijadas con formaldehído 3.7% o acetona respectivamente (**Tabla 7**). La positividad de VA3P1 se observó tanto en membrana como citoplasma, para todas las líneas. Los 4 hibridomas fueron clonados por dilución límite (0.5 y 1 célula por pocillo, 48 pocillos/dilución) sobre *"feeder layer"* de macrófagos peritoneales de ratones Balb/c.

Tabla 7: Clonado de hibridomas, crecimiento de clones y reactividad por ICQ con células IIB-BR-G

Hibridoma #	n°pocillos con colonias	ICQ con positividad alta (+++/++)	Localización celular de la positividad
VA3P1	22/96	9/22	M y C
VC6P3	26/96	3/26	M
VD5P4	6/96	0/6	-
VC1P2	13/96	11/13	C

M: membrana, C: citoplasma

En la **Tabla 8** se observan los resultados del clonado del hibridoma VA3P1, y si bien varios clones presentaron reacción intensa con las líneas de melanoma (D1P1, C2P1, F4P1), el clon C2P1 fue el que presentó mayor estabilidad en cultivo y cuyas células se mantuvieron creciendo en suspensión, con aspecto redondeado y crecimiento óptimo durante la amplificación del cultivo.

Se designó FC-5.01 al hibridoma VA3P1, C2P1 y al anticuerpo monoclonal producido por él, **AMC FC-5.01.**

El hibridoma FC-5.01 se amplificó y se conformó un stock en Nitrógeno líquido a partir del cual posteriormente se determinó el isotipo de Ig a fin de diseñar la metodología para la purificación del AMC FC-5.01.

Tabla 8- Screening de clones del hibridoma VA3P1 por ELISA:

CLON	IIB-BR-G	MCF-7	MDA
A5P1	++	+++	+++
D1P1	+++	+++	++
D5P1	+	++	+
G6P1	-	-	-
B5P2	+	+	+
C3P1	++	++	++
E6P2	++	+++	++
C2P1			
A3P1	-	++	+
B2P1	-	-	-
E1P2	+	++	+
D3P1	+	++	++
F5P1	-	-	+
C3P2	+	+++	+
D4P1	+	++	+
D6P2	+	+	+
F1P1	++	+	++
F2P1	++	+	++
A6P1	++	+	++
A4P1	+	+++	++
F4P1	+++	+++	+++
F2P1	+	+/-	++

Intensidad del cromógeno: (-) negativo, (+ /-) muy débil, (+) moderada, (++) intensa y (+++) muy intensa. nd: no determinado.

I-2.- DETERMINACIÓN DE ISOTIPO DEL AMC FC-5.01

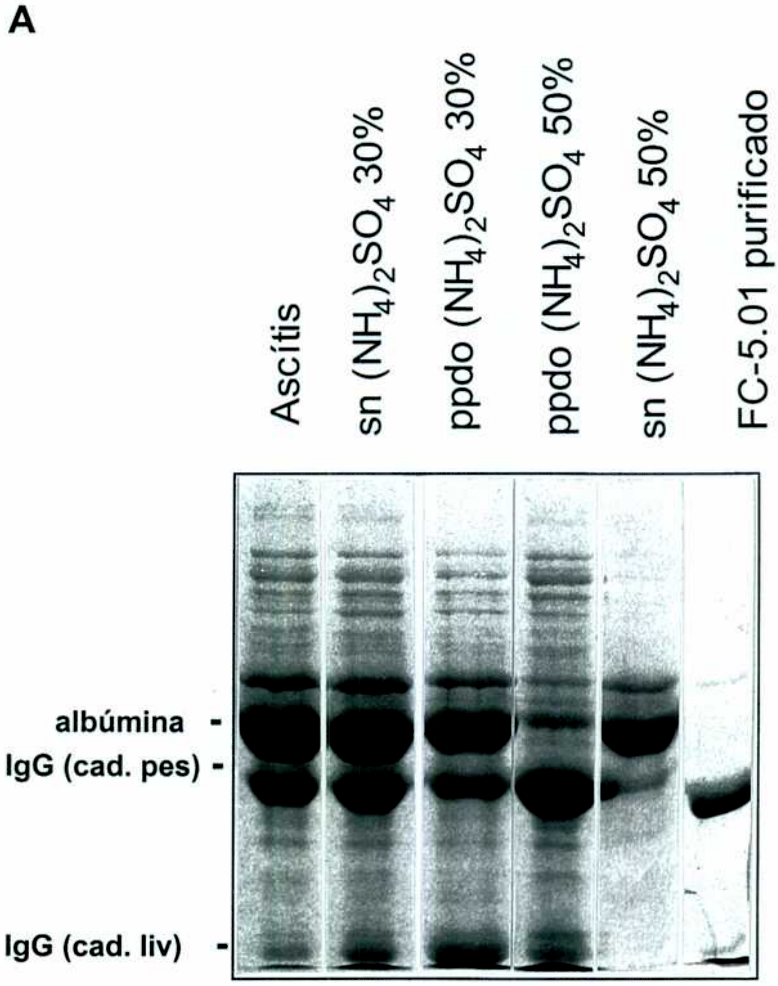
En primer término se realizó una marcación *in vivo* del hibridoma FC-5.01 con [^{35}S]-Met y se analizó una alícuota del sobrenadante de cultivo radiomarcado por SDS-PAGE y autorradiografía. Se determinó que el AMC producido correspondía a clase IgG y no IgM por medio de estándares corridos en paralelo (no mostrado). Posteriormente, se determinó que **el isotipo del AMC FC-5.01 corresponde a IgG2a**, por medio de la técnica de Outcherlony. Para ello, se testeó el sobrenadante de cultivo del hibridoma FC-5.01 crecido hasta

confluencia, luego de concentrarlo 10 veces por precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ al 50%.

I-3.- PURIFICACIÓN DE AMC FC-5.01 A PARTIR DE LÍQUIDO ASCÍTICO DE RATONES BALB/C

El hibridoma FC-5.01 fue capaz de crecer en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c, produciendo líquido ascítico a los 15 días después de inoculados. De cada ratón fue posible obtener aproximadamente 5 ml de ascítis por aspiración del fluído de la cavidad peritoneal con jeringa (dos extracciones por animal, cada 3-4 días). Luego de la clarificación por centrifugación (eliminándose el pellet y la capa oleosa superficial) se procedió a purificar la fracción IgG del líquido ascítico primero por medio de una precipitación con sulfato de amonio como se describe en Materiales y Métodos. La precipitación fraccionada resulta en un gran enriquecimiento de la Ig y en la separación de casi toda la albúmina contaminante **(Figura 1A).** Luego, por medio de una columna de intercambio aniónico (DEAE Sephacel) se completó la purificación del AMC FC-5.01 eluyendo las proteínas con un gradiente contínuo de NaCl (20-300 mM) en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8. Como se observa en la **Figura 1B** se obtiene un pico definido que eluye entre 75-100 mM NaCl y que corresponde a la Ig purificada corroborado por análisis de las fracciones por SDS-PAGE 10 %. Las fracciones conteniendo la Ig se reunieron, se cuantificó la proteína por Lowry y la pureza final se estimó >95% a partir de la corrida electroforética en SDS-PAGE y tinción con Coomasie Brilliant Blue. El rendimiento fue de ≅ 5 mg de AMC FC-5.01 por ml de ascítis.

A



B

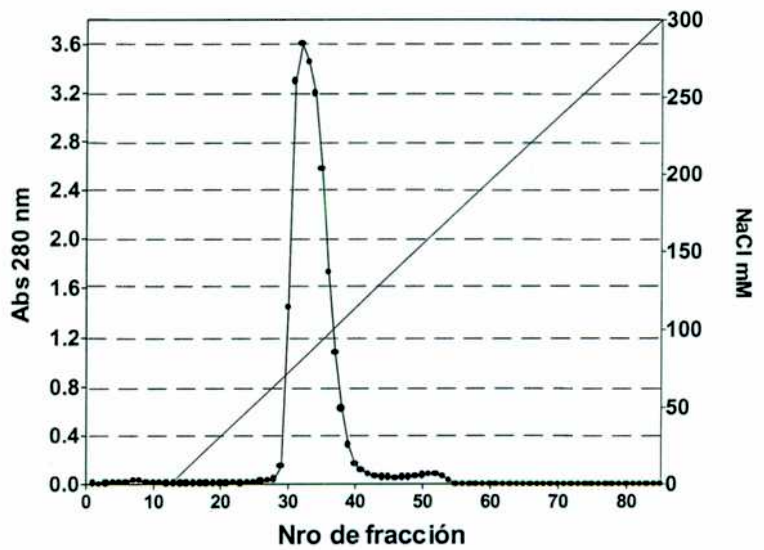


Figura 1: Purificación de AMC FC-5.01

A- Precipitación con $(NH_4)_2SO_4$. **B-**Perfil de elución de columna DEAE- Sephacel

I-4.-OBTENCIÓN de FRAGMENTOS F(ab')$_2$ Y RADIOMARCACIÓN CON [^{125}I]

La digestión del AMC FC-5.01 con Pepsina fue realizada en condiciones de pH= 3.8 a 37 ºC durante 4 hrs [Parham P., 1983]. Los péptidos de bajo peso molecular se eliminaron por centrifugación y lavados con Centricon CM30. Al analizar una alícuota de la digestión de la IgG$_2$a con Pepsina en SDS-PAGE 7.5%, en condiciones no-reductoras, se observó el producto esperado, que corresponde a fragmentos F(ab')$_2$ (118-110 kD) y fragmentos F(ab') (58 kD). Idéntico patrón se observó al digerir similarmente UPC10 (IgG$_2$a inespecífica). La marcación de AMC FC-5.01 y sus fragmentos (así como de UPC10) con [^{125}I] por el método de Iodogen, permitió obtener actividades específicas de 2-6 μCi/μg. Luego de las marcaciones, los geles se analizaron por autoradiografía.

En la **Figura 2B** se observan los resultados encontrados para el AMC FC-5.01: 160 kD (no-reductor), 55 y 26 kD (reductor), y 110 kD [F(ab')$_2$], 58 kD [F(ab')] (no reductor).

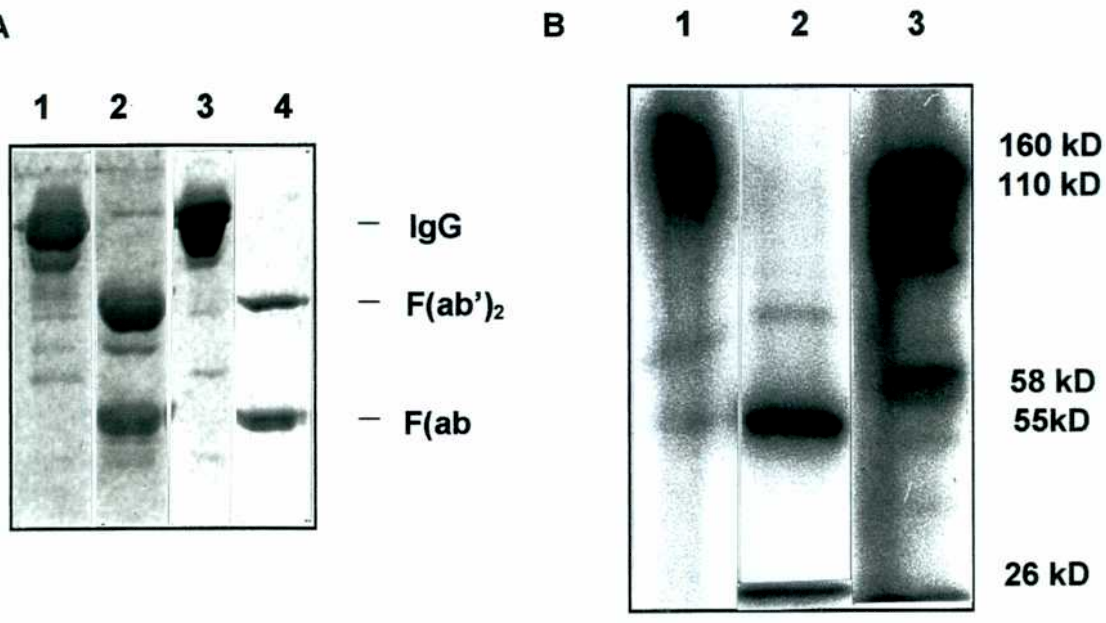


Figura 2: A- SDS-PAGE (no-reductor) FC-5.01 y F(ab')$_2$-5.01: 1- FC-5.01; 2- digestión con pepsina FC-5.01; 3- UPC10; 4- digestión con pepsina UPC10. **B- Autoradiografía de FC-5.01 y Fragmentos, marcados con [^{125} I]:** 1- ^{125}I-FC-5.01 (no-reductor); 2- ^{125}I-FC-5.01 (reductor); 3- Fragmentos [^{125}I]-F(ab')$_2$-5.01 y [^{125}I] -F(ab')-5.01

La conservación de la inmunoreactividad de las moléculas radiomarcadas se analizó por un radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida (**Tabla 9**), como se describe en Materiales y Métodos, usando distintos extractos de membrana, así como por el revelado de Western-Blots (ver más adelante).

Tabla 9: Conservación de la inmunoreactividad de FC-5.01 y sus fragmentos luego de la marcación con [^{125}I]

	ng incubados	ng unidos [X ± SEM]			
		MELANOMA #1	**IIB-BR-G**	**IIB-BR-**	**LINFOCITOS**
[^{125}I]-FC-5.01	350	55.4 ± 0.1	71.7 ± 2.4	49.5 ± 14.5	17.4 ± 2.0
	600	nd	nd	nd	24.1 ± 4.2
	1400	123.0 ± 6.6	nd	nd	37.2 ± 3.4
	1750	211.5 ± 3.5	254.3 ± 31.7	161.3 ± 1.5	nd
[^{125}I]-F(ab')$_2$ 5.01	30	10.4 ± 1.0	4.7 ± 0.2	4.6 ± 0.3	1.9 ± 0.2
	300	59.8 ± 8.4	31.6 ± 0.3	31.9 ± 0.2	13.6 ± 1.1
	600	87.8 ± 8.2	60.2 ± 0.5	65.3 ± 0.7	28.4 ± 1.6
	1100	124.6 ± 4.4	116.0 ± 5.4	114.7 ± 19.5	46.5 ± 1.2
[^{125}I]-F(ab')$_2$ UPC10	30	0.5 ± 0.03	nd	0.4 ± 0.0	nd
	300	2.3 ± 0.5	nd	1.6 ± 0.2	nd
	600	6.7 ± 3.4	nd	3.7 ± 0.8	nd
	1100	8.8 ± 2.1	nd	4.7 ± 0.9	nd

La unión inespecífica determinada en presencia de un exceso de anticuerpo no-marcado fue < 8%.

Observamos que tanto el AMC [^{125}I]-FC-5.01 como los fragmentos [^{125}I]-F(ab')$_2$ 5.01 se unieron específicamente a los extractos de células IIB-BR-G, tumores IIB-BR-G$_{nude}$ y melanoma #1, pero menos del 5% del total incubado se unió al extracto de linfocitos (negativos). Los fragmentos obtenidos a partir de UPC10 mostraron unión mínima a los extractos de los tumores (≅ 1 %).

DISCUSIÓN

Inmunizando ratones con células enteras IIB-BR-G, se seleccionaron cuatro hibridomas que reconocían las células neoplásicas testeadas (cáncer de mama y melanoma), pero que resultaron negativos contra linfocitos en la ICQ. Con este criterio se seleccionó el AMC FC-5.01 cuya expresión por ICQ se observó tanto en la superficie celular como en forma intracelular en dichas líneas celulares.

El clonado del hibridoma productor de AMC FC-5.01 permitió seleccionar un clon capaz de crecer en ratones generando líquido ascítico, a partir del cual se purificó FC-5.01 por medio de métodos convencionales. Fue posible obtener un producto de alta pureza, lográndose un alto rendimiento de AMC por ratón.

El fraccionamiento enzimático de FC-5.01 rindió los productos esperados para una Ig de clase IgG2a, obteniéndose una mezcla de fragmentos $F(ab')_2$ y F(ab) [Lamoyi E, 1986]. La radiomarcación de FC-5.01 y sus fragmentos con [^{125}I] por el método de Iodogen, que involucra la unión covalente del iodo a residuos de tirosina en la molécula de AMC, permitió obtener buena actividad específica, conservando la capacidad de unión al Ag como se constató por medio de un RIA.

CAPÍTULO II

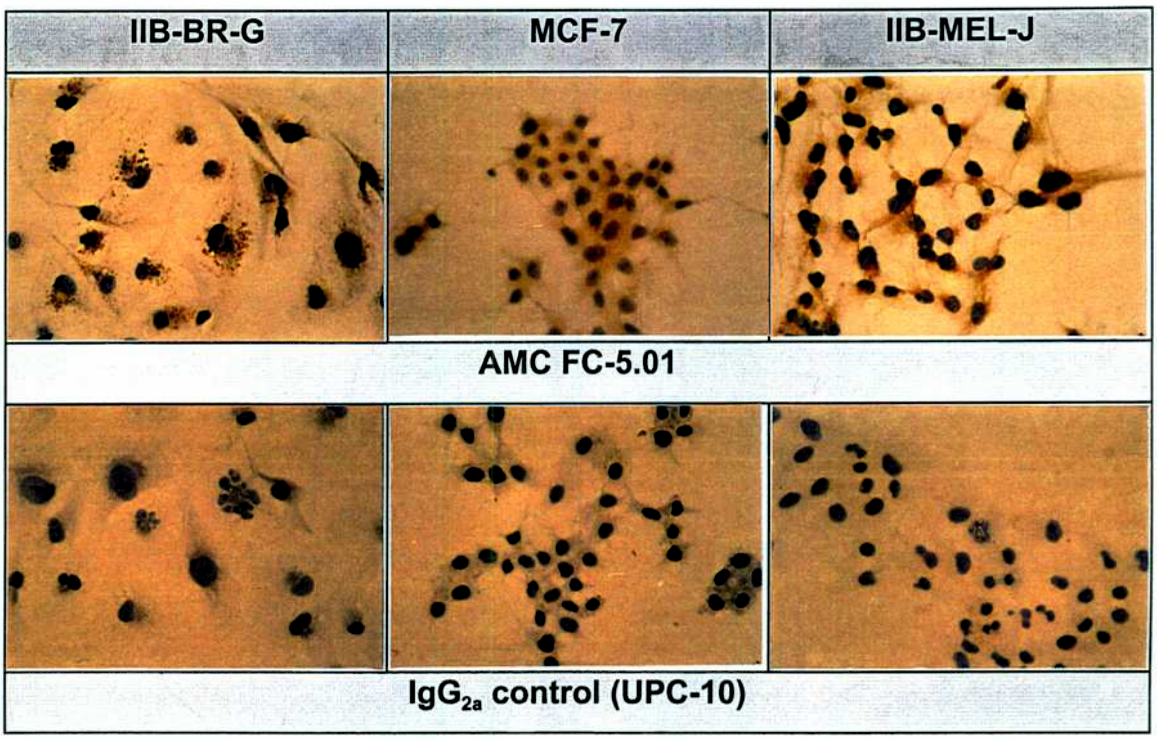
CAPÍTULO II: EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ANTIGENO RECONOCIDO POR EL AMC FC-5.01

INTRODUCCIÓN

Debido a la reactividad de FC-5.01 con líneas celulares de cáncer de mama y melanoma, extendimos el estudio a tumores humanos de diverso origen, así como a la localización del Ag reactivo en las células reconocidas. Numerosos AMCs han resultado reactivos con Ags expresados por células neoplásicas muy distintas, muchos de ellos siendo productos de genes supresores (p53) o de oncogenes (erb-B2) o Ags de grupo sanguíneo modificados (TAG-72, sLe^x). Investigamos las características bioquímicas del Ag y el epitope reconocidos por FC-5.01. Así mismo, a partir de los resultados obtenidos, establecimos una comparación con otros AAT ya descriptos y varios experimentos se realizaron para establecer la identidad del Ag reconocido por FC-5.01.

II-1.- REACTIVIDAD CON LÍNEAS CELULARES

En la **Figura 3** se ejemplifican las imágenes de inmunocitoquímica (ICQ) obtenidas para las líneas celulares analizadas con AMC FC-5.01. Las células IIB-BR-G y MCF-7 fijadas con formaldehído al 4% presentan fundamentalmente un patrón de reactividad intracelular de vesículas positivas y en algunos casos se observa reacción con la membrana plasmática. Un patrón similar se observó con las líneas de melanoma humano IIB-MEL-LES, IIB-MEL-J e IIB-MEL-IAN. La permeabilización con tritón X-100 al 0.1% o acetona sólo permitió observar las vesículas intracitoplasmáticas (no mostrado). En todos los casos la IgG_2a control (UPC10) dio resultado negativo.



AUMENTO= 400X. Se realizó contratinción de las células con hematoxilina.

Figura 3: Reactividad de FC-5.01 con líneas celulares (ICQ)

A fin de comparar la reactividad de AMC FC-5.01 con las diferentes líneas celulares (cáncer de mama y melanoma) se realizó un ELISA sobre células fijadas con formaldehído al 4% (10^4 células/well). Como se observa en la **Figura 4** las líneas celulares de melanoma presentaron una reactividad algo mayor con FC-5.01 que las líneas de cáncer de mama.

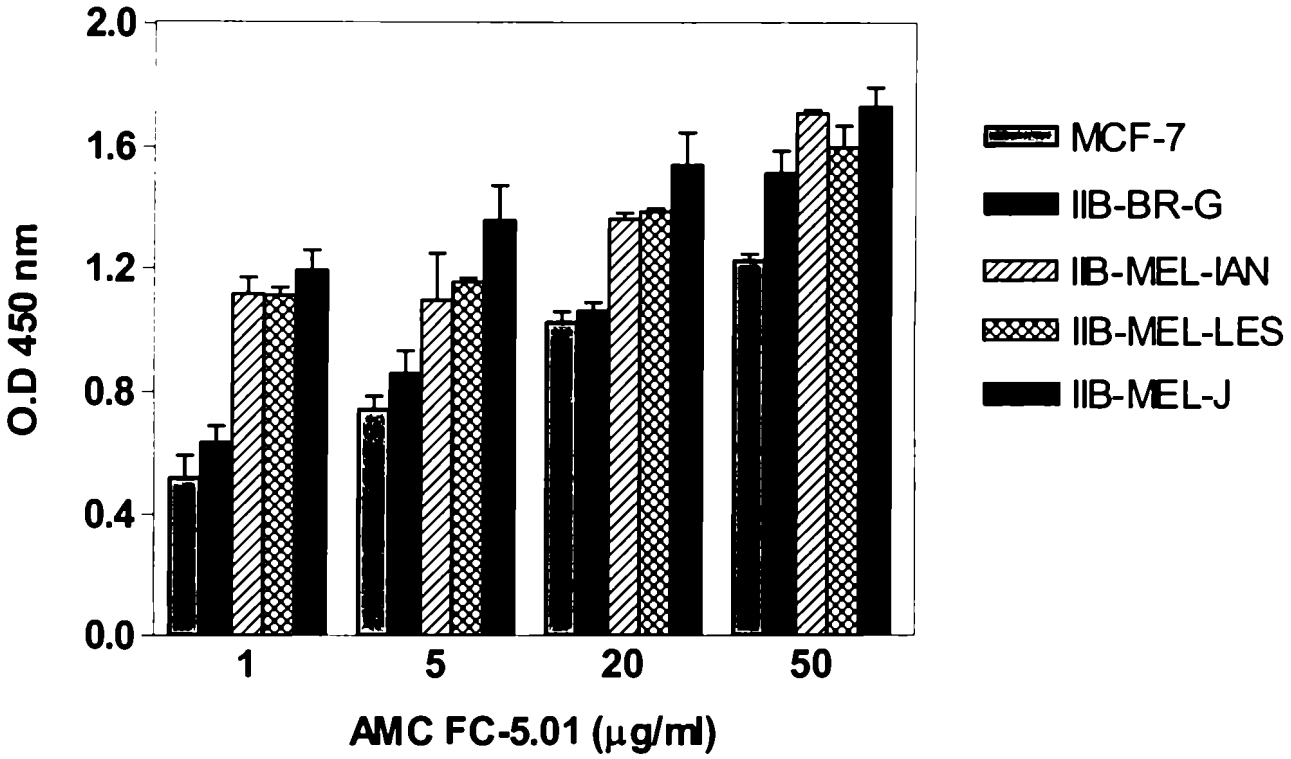


Figura 4: Reactividad de distintas líneas celulares con FC-5.01 por ELISA

Los valores obtenidos para las distintas líneas celulares se compararon por medio del test de student (prueba T) tomándolos de a pares, observándose diferencias significativas solo para IIB-BR-G vs IIB-MEL-J ($p=0.012$) y para MCF-7 vs las tres líneas de melanoma ($p<0.005$).

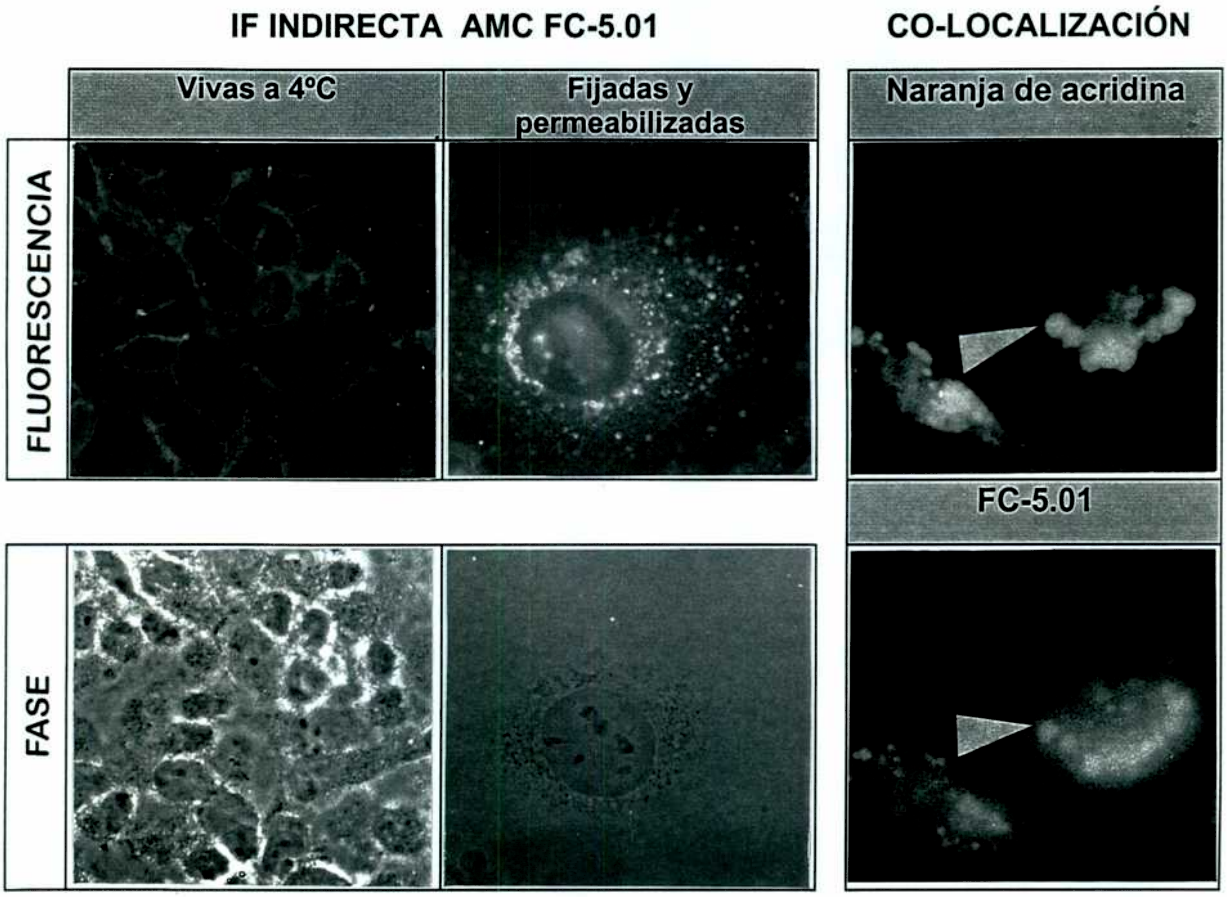
II-2.- LOCALIZACION DEL Ag 5.01 EN CELULAS FC-5.01$^+$

Con el objeto de localizar al Ag reconocido por FC-5.01 (Ag5.01) en las células IIB-BR-G, analizamos su expresión por inmunofluorescencia indirecta (IF) en células vivas, incubadas con FC-5.01 a 4°C y en células fijadas y permeabilizadas (0.2% saponina).

Cuando la IF se realizó a 4°C, se observó un típico patrón de membrana, detectándose un reforzamiento moderado de la membrana en aproximadamente el 100% de las células (**Figura 5**). De la misma manera se testearon células de endotelio humano (vena umbilical, HUVECs) que resultaron negativas (no mostrado). Esto indica que el Ag 5.01 está expresado en la superficie de células IIB-BR-G pero no se encuentra expuesto en células de endotelio humano.

Cuando las mismas células se fijaron y permeabilizaron para examinar los sitios intracelulares se detectó una fuerte tinción de abundantes vesículas o gránulos intracitoplasmáticos especialmente en localización perinuclear, aunque también se observaron cerca de la periferia de las células. Este patrón sugirió una localización lisosomal y/o endosomal del Ag 5.01 (**Figura 5**). Dicho patrón sí fue observado en células HUVECs permeabilizadas (no mostrado).

La localización intracelular del Ag 5.01 se comparó con la ubicación del colorante supravital naranja de acridina, específico de lisosomas [Hindenburg, 1989] que produce una fluorescencia roja cuando se encuentra en el interior del lisosoma, a pH <5.6. Para ello se realizó un experimento de co-localización donde células IIB-BR-G, incubadas con naranja de acridina, se fotografiaron y luego se fijaron, permeabilizaron y analizaron por IF con FC-5.01 (fluorescencia verde, de la fluoresceína acoplada al antisuero anti-Ig murina) según se describe en **Mat. y Met**. En la **Figura 5** se observa exacta co-localización de naranja de acridina y FC-5.01 en las mismas vesículas. No se observó fluorescencia verde en ausencia de FC-5.01, ni tampoco a la inversa, fluorescencia roja en ausencia de naranja de acridina, indicando ausencia de reacción cruzada.



AUMENTO=400X

Figura 5: Expresión de Ag 5.01 en células IIB-BR-G por IF

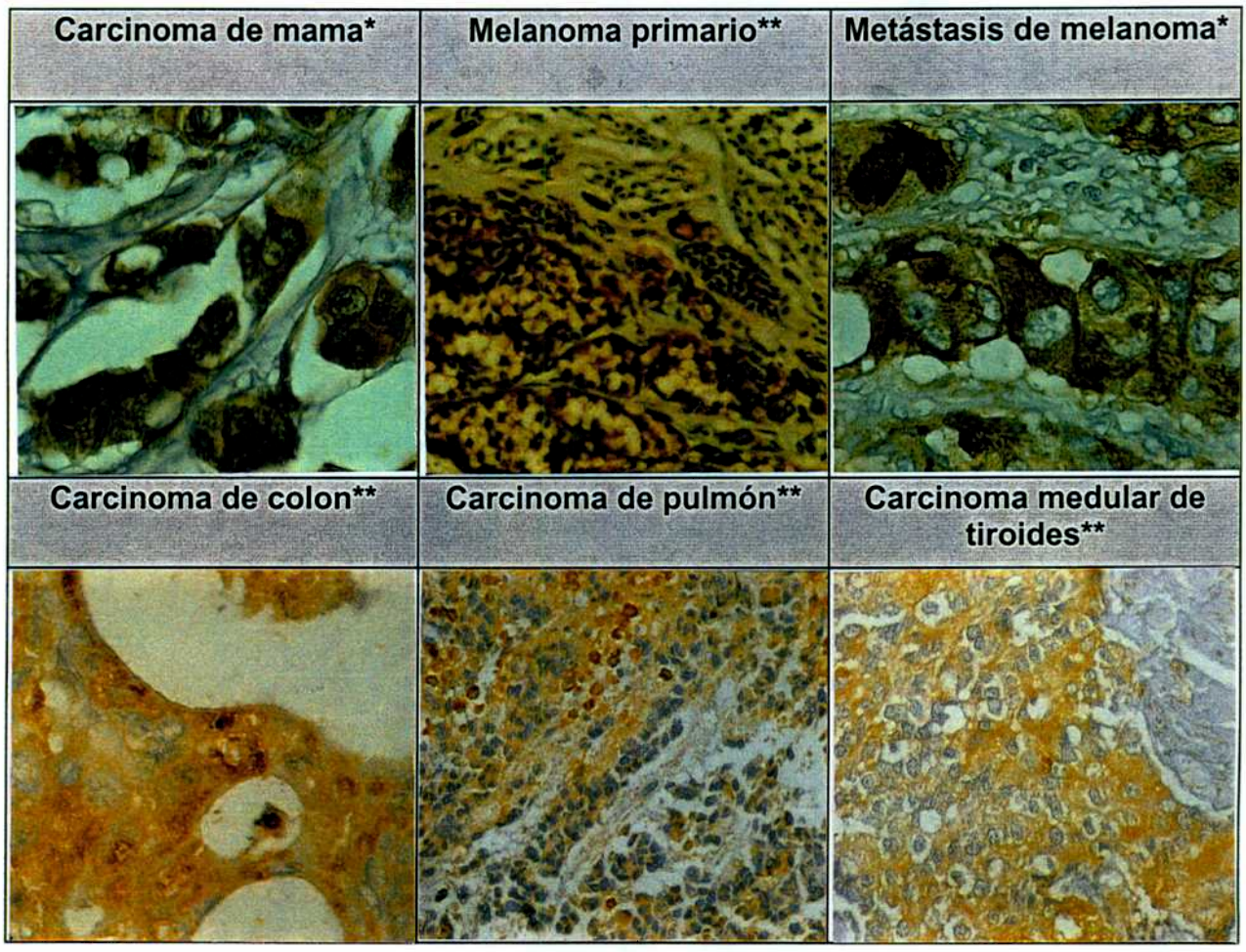
Los resultados obtenidos sugieren que el Ag reconocido por FC-5.01 se encuentra en la superficie celular y en vesículas intracelulares de las células positivas. La ubicación de las vesículas positivas en la IF (perinucleares), y la coincidencia con naranja de acridina en células IIB-BR-G, sugieren que la ubicación del Ag 5.01 podría ser lisosomal.

En células MCF-7, IIB-MEL-J y en células de melanoma obtenidas por disgregación mecánica de una metástasis en ganglio linfático (no-mostrado) se observó el mismo patrón de reactividad por IF con AMC FC-5.01, tanto en células vivas a 4ºC como permeabilizadas.

II-3.- REACTIVIDAD CON TUMORES Y TEJIDOS NORMALES

a) NEOPLASIAS HUMANAS

Se analizó la reactividad del AMC FC-5.01 con un panel de tumores humanos de diverso origen, por medio de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ), según se describe en **Mat. y Met**. En la **Tabla 10** y **Figura 6** se demuestra que FC-5.01 presentó un amplio reconocimiento de tumores humanos. Un 80% (20/25) de los tumores de mama analizados fueron positivos, mostrando una intensidad moderada en la reacción de peroxidasa. Asimismo, resultaron moderadamente reactivos, en cuanto a intensidad de reacción, carcinomas de colon, pulmón. El AMC FC-5.01 reaccionó positivamente también con tumores de origen neuroendócrino, como el carcinoma medular de tiroides. En éstos tumores la expresión del Ag 5.01 fue mayor en la zona de diferenciación neuroendócrina, hacia el polo de secreción. Merece especial atención el hecho de que el 100 % (9/9) de los melanomas primarios analizados resultaron fuertemente positivos, así como el 99.9 % (21/22) de los melanomas metastásicos, expresándose el Ag en prácticamente el 100% de las células tumorales (**Figura 6**). La tinción de peroxidasa se detectó en el citoplasma, en forma de vesículas o gránulos, similares a los observados en las líneas celulares de cáncer humano analizadas anteriormente, observándose en algunos casos un reforzamiento de membrana.



AUMENTO= * : 400 X; ** : 200 X.

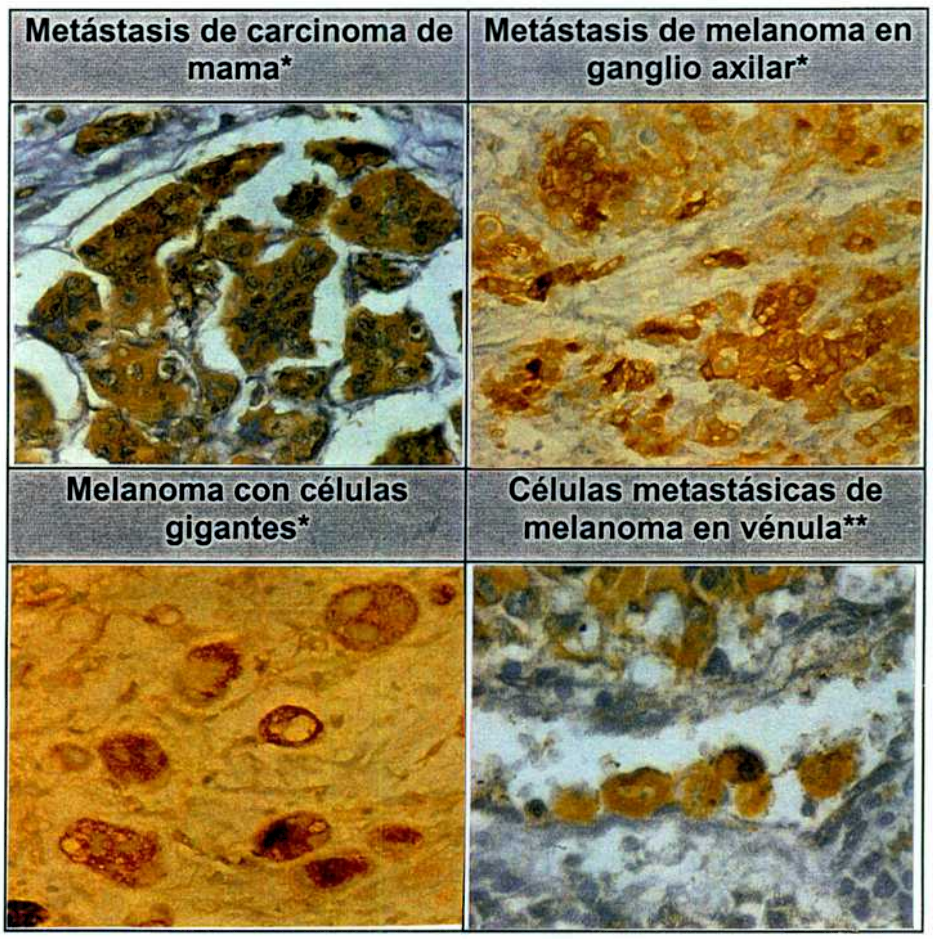
Figura 6: Reactividad de AMC FC-5.01 con distintas neoplasias humanas.

Tabla 10: Reactividad de AMC FC-5.01 con neoplasias humanas

Neoplasia	Positividad		
	Tumores[a]	Células[b]	Intensidad[c]
Carcinomas			
Mama	20/25	51-75%	++
Colon	11/12	76-100%	++
Pulmón	5/6	51-75%	++
Riñón (cél. claras)	2/2	51-75%	++
Piel (epidermoide)	4/4	51-75%	+++
Piel (basocelular)	1/1	1-25%	+
Ovario	1/1	51-75%	++++
Próstata	1/1	51-75%	++++
Glándula Parótida	1/1	51-75%	+++
Tiroides	2/2	51-75%	+++
Estómago	1/1	51-75 %	+
Otros			
Melanoma Primario (SSM; invasivo)	9/9	76-100%	
Melanoma (mts.)	21/22	76-100%	
Leiomiosarcoma	1/1	1-25%	
Liposarcoma	0/1		
Linfoma de Hodgkin	0/1	-	-

a) Número de tumores positivos / tumores totales ; b) los porcentajes de células tumorales positivas se expresan en cuatro categorías: 1-25%; 26-50%; 51-75%; 76-100%. El total de las células tumorales se consideró como el 100%; c) la intensidad de la reacción fue evaluada como: negativa = - débil = +; moderada = ++; moderada-intensa = +++; intensa= ++++.

Una peculiaridad en la expresión del Ag 5.01 fue la heterogeneidad observada dentro de un mismo tumor. Mientras que los nidos de células tumorales presentaron reacción moderada o débil con FC-5.01, los bordes invasivos de las metástasis, en directo contacto con el estroma del tumor, así como las células tumorales infiltrantes aisladas, resultaron intensamente teñidas (**Figura 7**). Este patrón heterogéneo de reconocimiento fue observado tanto en carcinomas de mama como en melanomas metastásicos. También fue posible observar células de melanoma intensamente positivas para FC-5.01 dentro de vénulas.



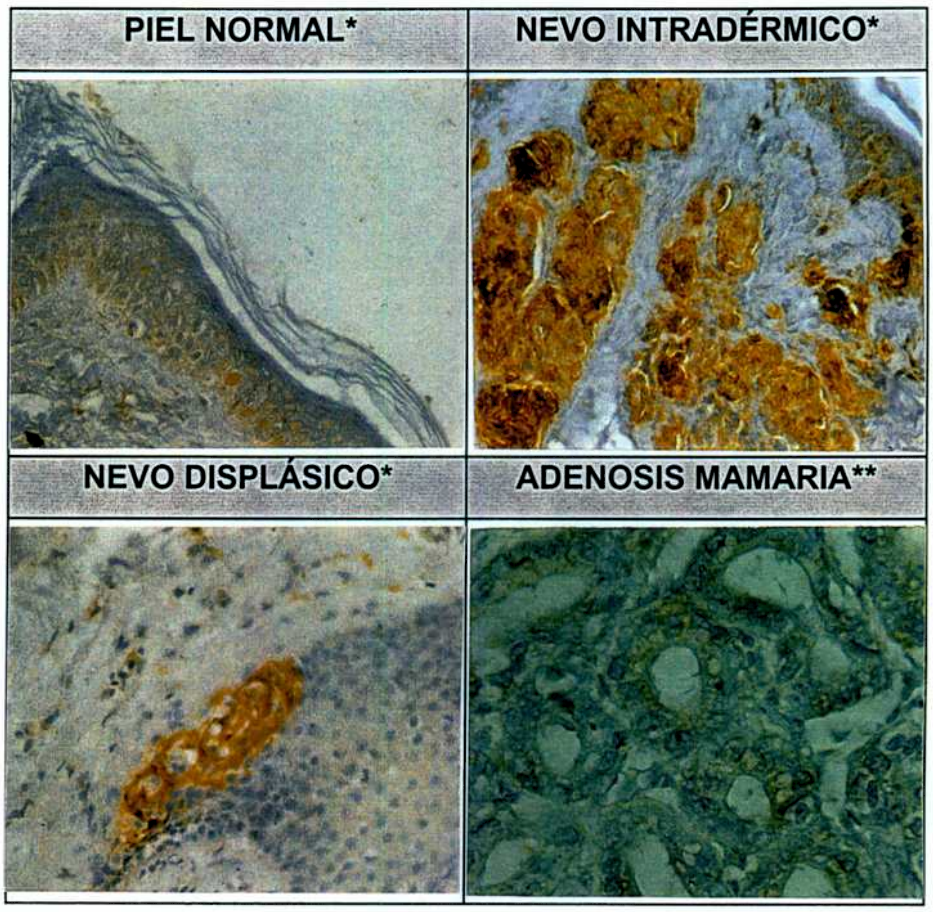
AUMENTO= *: 200 X; **: 400 X.

Figura 7: Detalle de la heterogeneidad de la expresión de Ag 5.01 en tumores humanos

Esta heterogeneidad en la expresión del Ag reconocido por FC-5.01 fue cuantificada por medio de un analizador de imágenes (**Materiales y Métodos**). Se analizaron 4 metástasis de melanoma y 3 carcinomas mamarios, encontrándose 4 ± 1.6 y 4.3 ± 2 veces mayor intensidad de la inmunoperoxidasa con FC-5.01 en los bordes invasivos del tumor, en contacto con el estroma, que en los nidos tumorales grandes, respectivamente.

b) TEJIDOS NORMALES HUMANOS Y PATOLOGÍAS BENIGNAS

En la **Tabla 11** se resumen los resultados encontrados al estudiar la reactividad de FC-5.01 con muestras de tejidos normales y patologías benignas. Se detectó fuerte reacción con la pulpa roja del bazo, islotes de Langherhans en el páncreas, glándulas del estómago y feocromocitos de la glándula adrenal. Los macrófagos de la piel se tiñieron intensamente. Sólo un bajo porcentaje de células de los túbulos contorneados proximales del riñón, intestino grueso y pulmón resultaron positivas con AMC FC-5.01. Los acinos pancreáticos, tiroides, células de Kuppfer en el hígado, músculo esquelético, testículo, ovario y oligodendroglía presentaron reacción muy débil y en bajo porcentaje de células. Reacción negativa fue observada con la pulpa blanca del bazo, hepatocitos, neuronas, músculo cardíaco y linfocitos periféricos. En la **Tabla 11** y **Figura 8** se muestran algunos de los resultados obtenidos con las patologías benignas. A pesar de que la piel normal sólo presenta débil reactividad, el 100% de los nevos intradérmicos comunes así como los nevos displásicos fueron muy positivos. En las patologías mamarias benignas sólo un bajo porcentaje de células fueron débilmente reconocidas.



AUMENTO = 200X.

Figura 8: Reactividad de FC-5.01 con tejidos normales y patologías benignas

Tabla 11: Reactividad de FC-5.01 con tejidos humanos normales y patologías benignas

TEJIDO	POSITIVIDAD		
	Casos[a]	Células[b]	Intensidad[c]
Tejidos normales			
Bazo	1/1		
pulpa roja		51-75%	
pulpa blanca			
Piel	25/26	76-100%	
Páncreas	2/2		
Acinos		1-25%	
Islotes de Langherhans		26-50%	
Riñón (túbulos cont. prox.)	1/1	1-25%	
Tiroides	1/1	1-25%	
Pulmón	2/2	1-25%	
Intestino grueso	2/2	1-25%	
Estómago	2/2	1-25%	
Testículo	1/1	1-25%	
Ovario	1/1	1-25%	
Glándula adrenal (feocromocitos)	1/1	76-100%	
Músculo esquelético	1/1	1-25%	
Músculo cardíaco	0/1		
Hígado	1/1		
Sistema Retículo Endotelial			
células de Kuppfer		1-25%	
endotelio vascular		1-25%	
Hepatocitos			
Cerebro	1/1		
Neuronas			
Oligodendroglia		1-25%	
Patologías Benignas			
Mama			
Enfermedad quística	0/3		
Adenosis mamaria	1/5	1-25%	
Fibroadenoma (ductos hiperplás.)	1/4	1-25%	
Nevos			
Intradérmicos comunes	25/25	76-100%	++++
Nevo displásico	1/1	76-100%	++++

a) Casos positivos / casos totales; b) y c) Las células positivas y la intensidad de la reacción se estimaron como en la Tabla 10.

II-4.- NATURALEZA BIOQUÍMICA DEL AG RECONOCIDO:

Habiendo establecido que el Ag 5.01 está asociado a membranas, tanto plasmáticas como intracelulares de las células positivas, se analizó la naturaleza bioquímica del Ag reconocido por FC-5.01. No fue posible detectar bandas proteicas específicas en inmunoprecipitaciones realizadas con FC-5.01 a partir de extractos de membranas (preparados con NP-40 o SDS, (en Materiales y Métodos), tanto de células IIB-BR-G marcadas con [^{35}S]-metionina o biotinadas en superficie (datos no mostrados).

Sólo pudo observarse un patrón específico de bandas, cuando los extractos de membranas totales se analizaron por Western-Blot, realizando el SDS-PAGE en condiciones no-reductoras. En diferentes melanomas metastásicos se observó un patrón heterogéneo de reactividad antigénica en la región de 30-60 kDa, en los extractos de SDS 1% (**Figura 9**, calles 1-5). En el melanoma # 1, se observa además otra banda ancha en la región de 65-90 kDa (calle 1), que está ausente en el extracto de NP-40 1% del mismo tumor (calle 6). Se observó un patrón similar con extractos de membranas de células IIB-MEL-J, IIB-BR-G y Caco-2 (**Figura 9**, calles 7-9), y en dos muestras de carcinoma de colon (no mostrado).

A

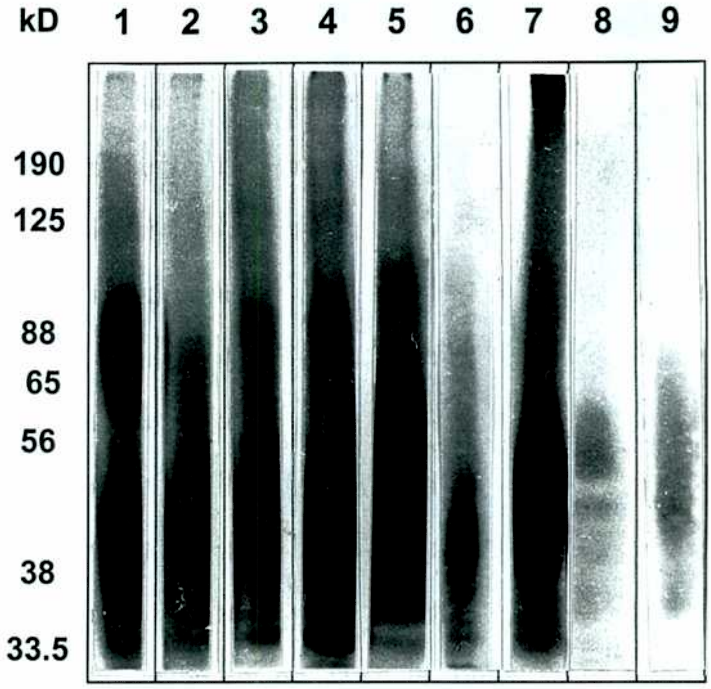


Figura 9: Detección del Ag 5.01 en diversos tumores y líneas celulares

La extracción del Ag se realizó como se describe en Materiales y Métodos y los extractos obtenidos se analizaron por Western blots en condiciones no-reductoras. **Calles 1-5**: extractos de 1% SDS de melanomas # 1-5; **Calle 6**: extracto de 1% NP-40 de melanoma # 1 (tumor # 1= 60 μg/calle; tumores # 2-5= 120 μg/calle); **Calles 7-9:** extractos de 1% SDS de células IIB-MEL-J, IIB-BR-G y Caco-2, respectivamente (120 μg/calle).

Ya que este tipo de bandas heterogéneas puede atribuirse frecuentemente a diferencias en la glicosilación de una proteína, se realizaron dos experimentos para investigar la naturaleza glicoproteica del Ag reconocido por FC-5.01. En primer lugar, se trataron los extractos de membranas de los melanomas #1 y #2 y los tumores de colon #1 y #2 con PNGasa F, enzima que hidroliza la unión entre el residuo asparagina y la N-acetil glucosamina más interna, en oligosacáridos de alta manosa, híbridos y complejos, de N-glicoproteínas. En la **Figura 10 A** se observa, para los extractos de melanoma, que la banda heterogénea se reduce a una banda definida de 25 kD en las muestras analizadas, si bien la digestión es parcial (la muestra no se puede

desnaturalizar completamente para el ideal acceso de la enzima, ya que no se puede incubar con 2-mercaptoetanol en el buffer desnaturalizante). El resultado con extractos de carcinoma de colon fue idéntico (no-mostrado)

Además, se realizó un Western blot a partir de células IIB-MEL-J incubadas en presencia de Tunicamicina (1 μg/ml, 24 hs a 37 °C), a fin de inhibir la N-glicosilación de las proteínas, y se observó igualmente, una débil banda de aproximadamente 25 kD (**Figura 10 A,** calles 5 y 6).

Cuando las membranas se extrajeron con Tritón-X114, el Ag 5.01 se particionó mayoritariamente a la fase orgánica, sugiriendo la naturaleza hidrofóbica de la glicoproteína. Este es el comportamiento esperado para una proteína integral de membrana [Bordier C, 1981] (datos no mostrados). El Ag se destruye cuando los extractos son tratados con 2-mercaptoetanol (0.1%), indicando que la configuración del Ag que es reconocida por FC-5.01, es dependiente de la presencia de puentes disulfuro (**Figura 10 B**, calles 1 y 2). En cambio, la incubación por 1 hr con periodato de sodio 50 mM, (calle 3) para producir la oxidación de los carbohidratos, no modificó el patrón de Western blot La digestión de los extractos con neuraminidasa no modificó la movilidad del Ag reconocido por FC-5.01 (no mostrado).

En ningún caso se observó reacción con la fracción soluble citoplasmática o cuando las membranas se incubaron con IgG_{2a} inespecífica (no mostrado).

Western-Blots realizados en condiciones nativas, no-reductoras (pH= 9.5) revelan un gran chorreado de poca movilidad electroforética lo que indicaría la poca carga de la proteína o el alto peso molecular de complejos formados en ausencia de SDS (**Figura 10 C**).

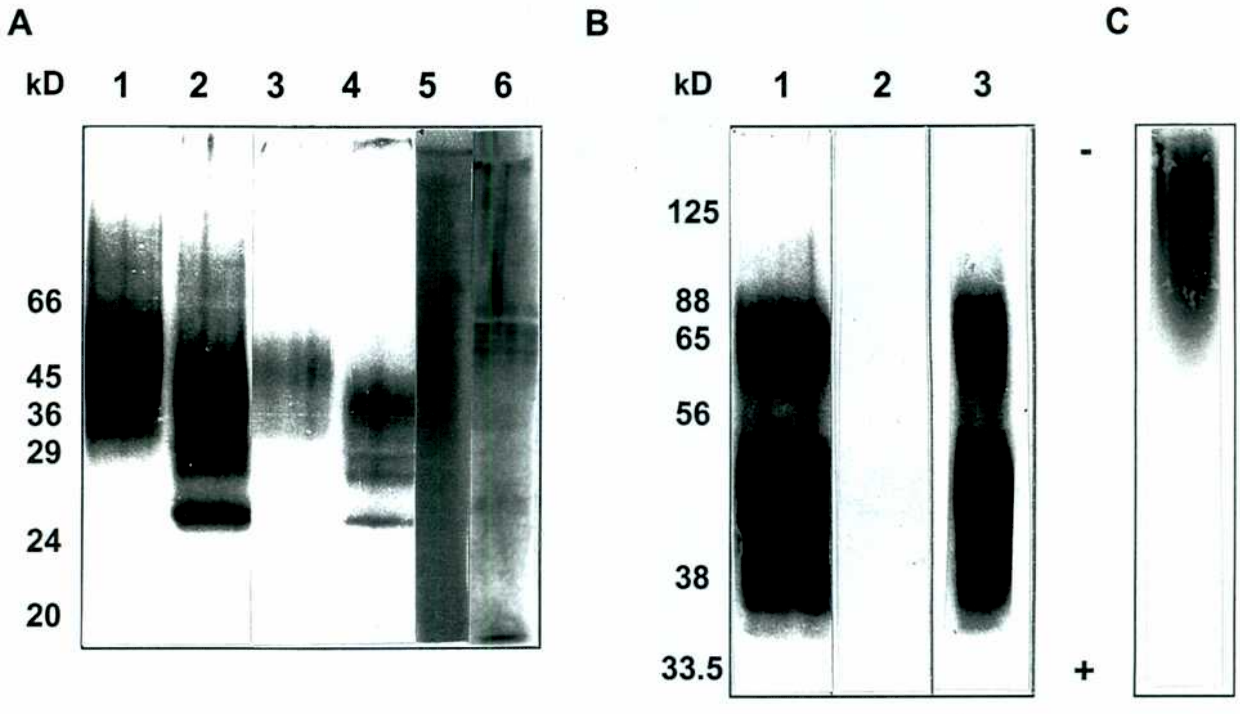


Figura 10: Naturaleza bioquímica del Ag 5.01 (Western Blots)

A- La digestión de los extractos de membrana (1% NP-40) de melanomas # 1 (calles 1 and 2) y # 4 (calles 3 y 4) con PNGasa F se realizaron como se describe en Materiales and Métodos. **Calles 1 y 3:** extractos control; **Calles 2 y 4**: extractos digeridos con PNGasa F (10μg/calle), **Calles 5 y 6:** extractos de membrana de IIB-MEL-J control y tratadas con tunicamicina, respectivamente.
B- 40 μg de extracto (1% SDS) de melanoma # 1, se sometieron a diferentes tratamientos y se analizaron por Western-blot. **Calle 1:** control**; Calle 2:** reducción con 2-mercaptoetanol; **Calle 3:** oxidación con periodato de sodio.
C- Electroforesis en condiciones nativas. Extracto de membranas de melanoma #1.

Estos resultados fueron confirmados exponiendo extracto de membranas totales de melanoma #1 (como fuente de Ag) a diferentes tratamientos químicos y enzimáticos y evaluando la reactividad por ELISA como se describe en Materiales y Métodos. Para testear la eficiencia de los tratamientos, se realizaron incubaciones en paralelo con extracto de células MCF-7 incubadas con AMCs control como se indica.

Los resultados se presentan en la **Figura 11**. El Ag reconocido por AMC FC-5.01 resultó estable luego del tratamiento con metanol, pero el reconocimiento se inhibió (46.1 ± 2.5 %). por calentamiento a 100°C durante 30 min. Por el contrario, la reactividad del AMC MBr1 (que reconoce un epitope glicolipídico)

con el extracto de MCF-7 fue afectada por el metanol (66.5 ± 10.6 % inhibición) pero fue estable luego del tratamiento con calor [Menard S, 1983]. El reconocimiento antigénico de FC-5.01 fue inhibido luego del tratamiento del extracto con diversas proteasas (pronasa E: 77.2 %; tripsina: 29.9 ± 0.2 %; proteinasa K: 56.6 ± 2.6 %) pero no fue afectado por neuraminidasa ni por la oxidación con periodato de sodio o la reducción con $NaBH_4$, nuevamente sugiriendo que el epitope reactivo no contiene un carbohidrato. El Ag 2.15 [Capurro M., 1997], cuyo epitope es el carbohidrato Le^x ,resultó afectado por la oxidación con periodato de sodio, en las mismas condiciones (47.8 ± 11.4% inhibición).

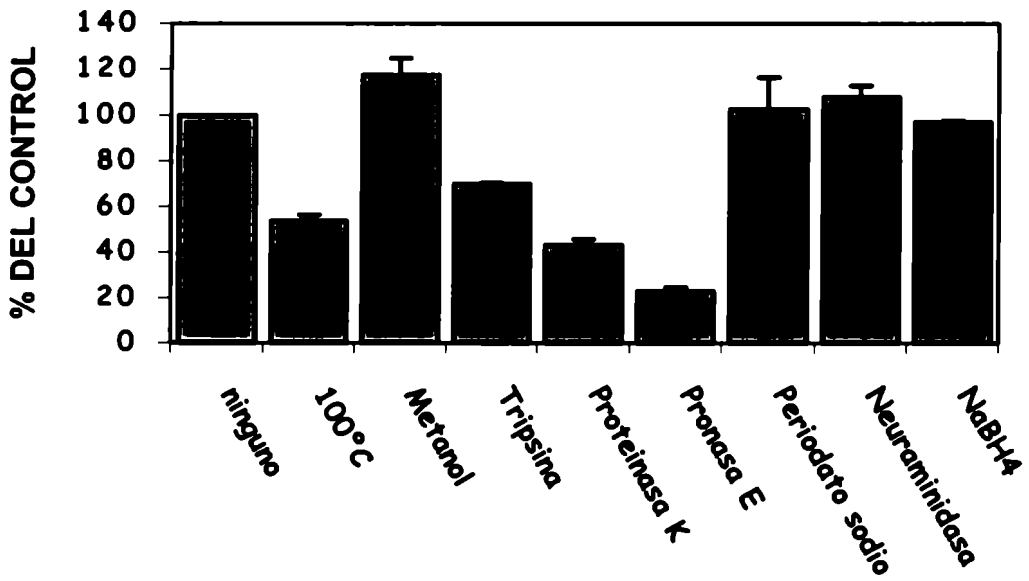


Figura 11: Conservación del epitope antigénico luego de diversos tratamientos químicos y enzimáticos (ELISA).

Por lo tanto, podemos concluir que el Ag reconocido por FC-5.01 es una glicoproteína heterogénea (30-60 kD) con un núcleo proteico de 25 kD, donde

reside el epitope antigénico, y que el reconocimiento es dependiente de la presencia de puentes disulfuro en la molécula.

II-5.- IDENTIDAD DEL AG RECONOCIDO POR FC-5.01 CON CD63

Existen reportes en la literatura describiendo el Ag CD63/ME491, el cual presenta gran similitud con el Ag 5.01, tanto en su peso molecular (MW), patrón general de reactividad y tamaño del núcleo proteico. CD63 ha sido descripto como una glicoproteína asociada a melanoma con un rango de peso molecular de 30-60 kDa, que se encuentra N-glicosilada y cuyo componente proteico es de 20-25 kDa [Metzelaar M.J., 1991]. Esta molécula se encuentra sobreexpresada en melanomas humanos, es un Ag de activación plaquetaria [Azorsa D.O., 1991] y está presente en membranas lisosomales. Conocida su secuencia ha sido clasificada como miembro de una superfamilia de glicoproteínas, denominadas Tetraspaninas, las cuales comparten una estructura en común, con cuatro porciones muy hidrofóbicas que atraviesan la membrana plasmática y pequeños dominios extracelulares y citoplasmáticos [Wright M.D., 1994]. La extracción del Ag reconocido por FC-5.01 preferentemente a la fase orgánica del detergente TX-114, sugiere la existencia de secuencias altamente hidrofóbicas.
Varios autores han descripto AMCs contra este Ag [Atkinson B., 1985; Vennegoor C, 1985] y Demetrich [1993] sugirió que los AMCs ME491, NKI/C-3 y anti-NGA, reconocían el mismo epitope antigénico de CD63.

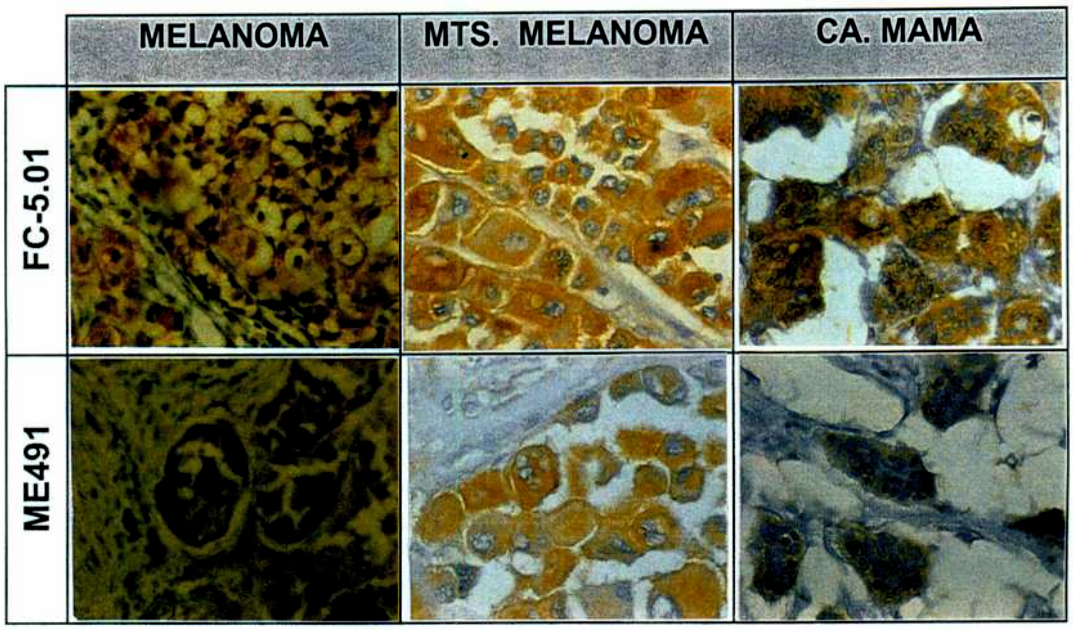
Varios experimentos se realizaron con el objeto de comparar las reactividades del AMC FC-5.01 y el AMC ME491 (anti-CD63).

a) COMPARACIÓN DE REACTIVIDAD FRENTE A TUMORES HUMANOS Y CÉLULAS IIB-BR-G

En primer lugar se comparó la reactividad de FC-5.01 y el AMC ME491 en cortes histológicos de diversos tumores humanos por IHQ. Ambos anticuerpos monoclonales reconocieron similarmente los tumores analizados. En la **Figura**

12 A se observan algunos ejemplos. La IF realizada sobre células IIB-BR-G, también reveló un patrón idéntico de reconocimiento (**Figura 12 B**), inclusive en el patrón intracelular característico detectado por FC-5.01.

A



B

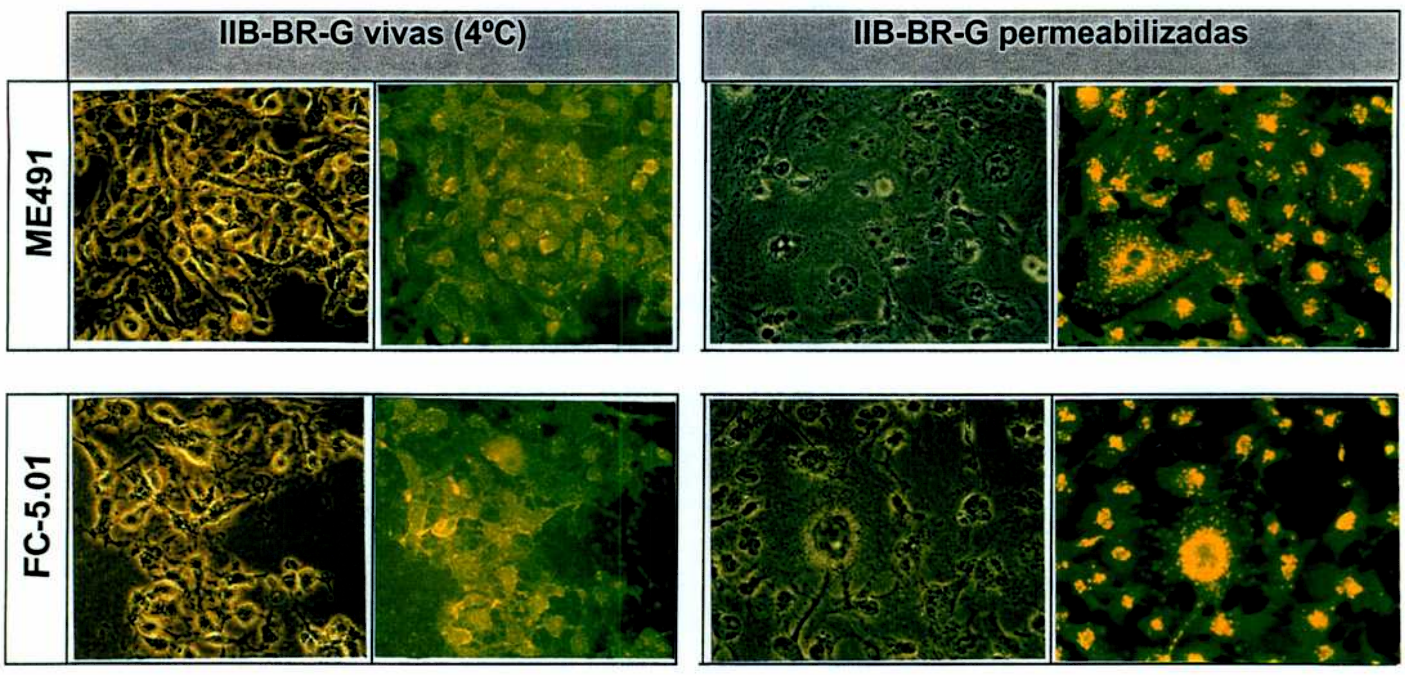


Figura 12: Comparación de reactividad de AMCs FC-5.01 y ME491. A- IHQ de tumores humanos. B- IF de células IIB-BR-G. Cada par de fotografías representa un mismo campo de células observadas bajo contraste de fase y microscopía de epifluorescencia. AUMENTO= 200X

b) COMPARACIÓN BIOQUÍMICA DEL AG RECONOCIDO POR FC-5.01 CON EL Ag CD63

i) WESTERN-BLOT

Extractos de membranas de los melanomas #1 y #2 y sus productos de-glicosilados con PNGasa F, se analizaron por Western-blot con los AMCs FC-5.01 y ME491 (**Figura 13**), encontrándose que ambos AMCs reaccionaban con idéntico patrón.

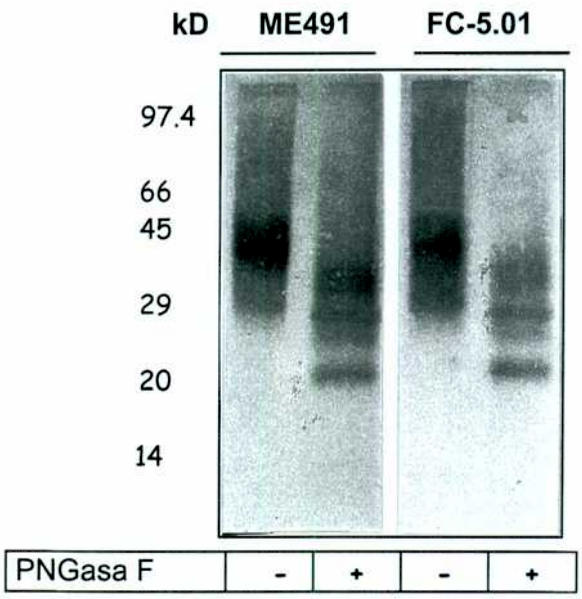


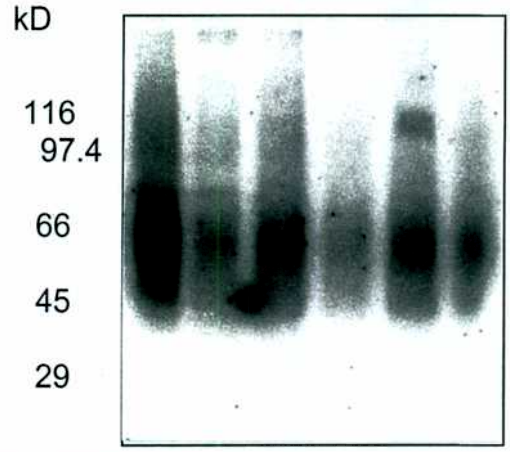
Figura 13: Comparación del Ag 5.01 con la glicoproteína CD63

Para el Western-blot se corrieron 15 μg/calle de extracto 1% NP-40 de membrana de melanoma #1,y se reveló con 20 μg/ml anti-CD63 (ME491) (calles 1 y 2) y AMC FC-5.01 (calles 3 y 4). kD: marcadores de peso molecular.

ii) INMUNODEPLECION

Por otro lado, se diseñó un experimento de immunodepleción con el objeto de determinar si la glicoproteína reconocida por FC-5.01 podía también unirse al AMC ME491. Como se observa en la **Figura 14**, la pre-adsorción del extracto de membrana de melanoma #1 con anti-CD63 (ME491) disminuyó considerablemente la unión posterior del Ag con [^{125}I]-FC-5.01, usado para

revelar el Western blot. Similarmente, la pre-adsorción con el mismo AMC FC-5.01 no marcado, produjo una depleción homóloga. Esta depleción fue específica ya que Ig inespecíficas del mismo isotipo (IgG1 e IgG2a, respectivamente) no depletaron el Ag del extracto.



FC-5.01	-	+	-	-	-	-
st IgG2a	-	-	+	-	-	-
ME491	-	-	-	+	-	-
stIgG1	-	-	-	-	+	-
PBS	-	-	-	-	-	+
Prot G sepharosa	+	+	+	+	+	+

Figura 14: Ensayo de inmunodepleción de Ag 5.01 con anti-CD63.

El ensayo de inmunodepleción de Ag 5.01 se realizó como se describe en Materiales y Métodos y la reactividad con Ag 5.01 se reveló con [^{125}I]- FC-5.01. Solo se muestran los sobrenadantes.

iii) ANÁLISIS DE CELULAS CD63$^+$ y CD63$^-$ (FACS)

Otro experimento fue realizado para investigar la identidad del Ag reconocido por FC-5.01 comparándolo con CD63. Radford y col. (1995), describieron una línea celular de melanoma humano, denominada KM3, que no expresa CD63 (no se detecta proteína ni ARNm) y ha podido transfectar dichas células con una copia genómica del gen CD63, generando el clon KM3/26. Este clon expresa CD63 en la superficie celular, demostrado por análisis de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) con el AMC LS62, anti-CD63 [Sikora L K,

1987]. Haciendo uso de este sistema de células de melanoma y análisis de FACS, observamos que FC-5.01 no reaccionó con las células KM3 parentales, pero sí reconoció al clon KM3/26 (**Figura 15**). Estos resultados demuestran una vez más que el AMC FC-5.01 es específico para el Ag CD63.

iv) COMPETENCIA CON AMC ME491 (Análisis del epitope reactivo)

Con el objeto de investigar si los AMCs FC-5.01 y ME491 se unían al mismo epitope en la molécula de CD63, se realizó un radioinmunoensayo de inhibición (competencia) como se describe en materiales y métodos. Como se observa en la **Figura 16 A y B**, ambos anticuerpos marcados con [^{125}I] son capaces de unirse específicamente al extracto de melanoma #1. Sin embargo, la unión de [^{125}I]- ME491 no pudo inhibirse en presencia de un exceso de AMC FC-5.01 no-marcado. Como control, se observó una inhibición casi total de la unión de [^{125}I]-FC-5.01 al extracto en presencia de un exceso de FC-5.01 no-marcado (**Fig. 16 C y D**).

Este resultado implica que si bien ambos AMCs reconocen el Ag CD63, el epitope reconocido por FC-5.01 es diferente del epitope reactivo con ME491.

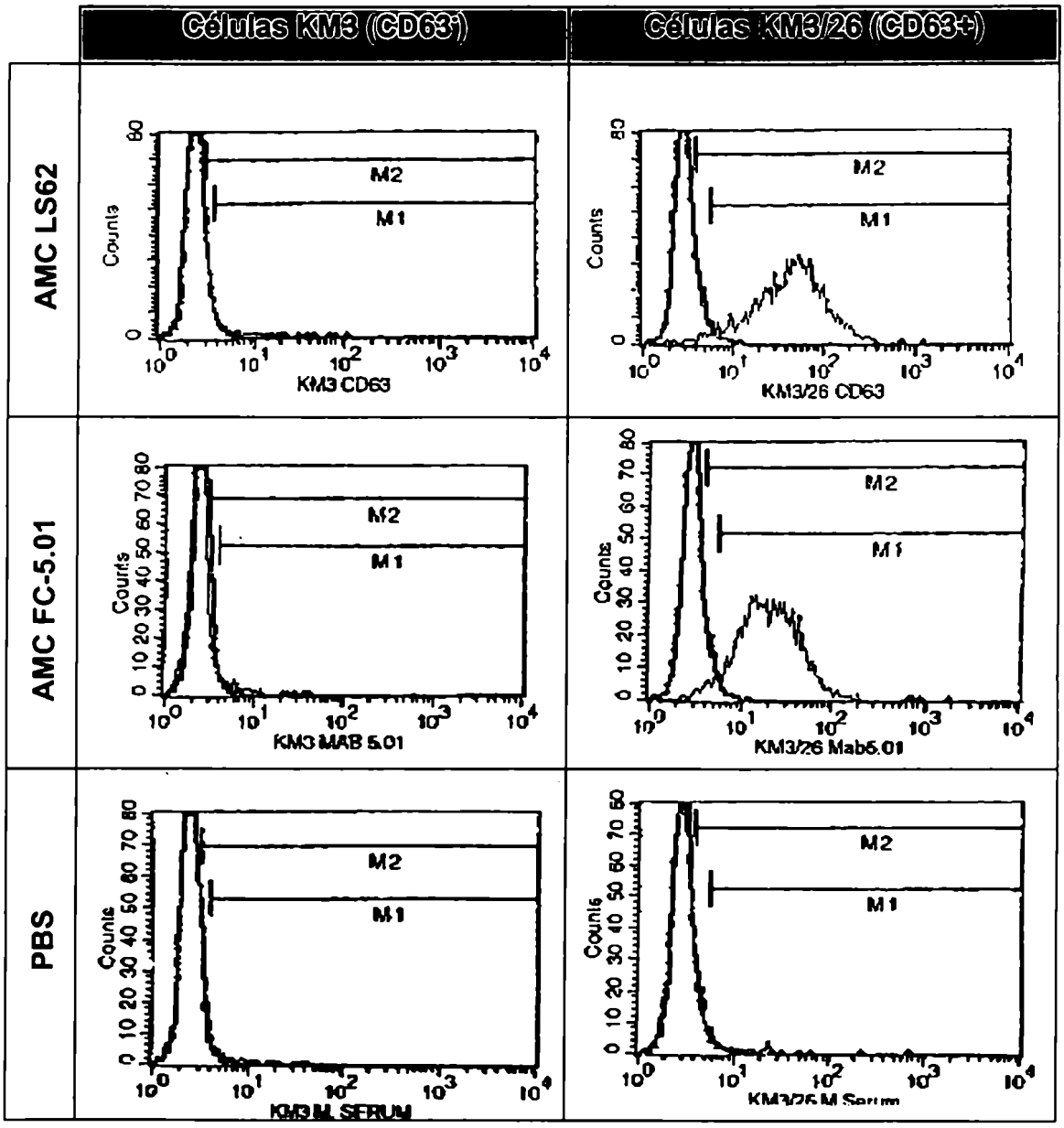


Figura 15: Anáiisis de células KM3 (CD63$^-$) y clon KM3/26, transfectado con CD63.

Los histogramas muestran que FC-5.01 reaccionó fuertemente con el clon CD63$^+$ KM3/26 (100% de células positivas), pero no reconoció las células parentales CD63$^-$, KM3 (9% positivas). Este resultado es semejante al obtenido con el AMC LS62 anti-CD63 usado como control.

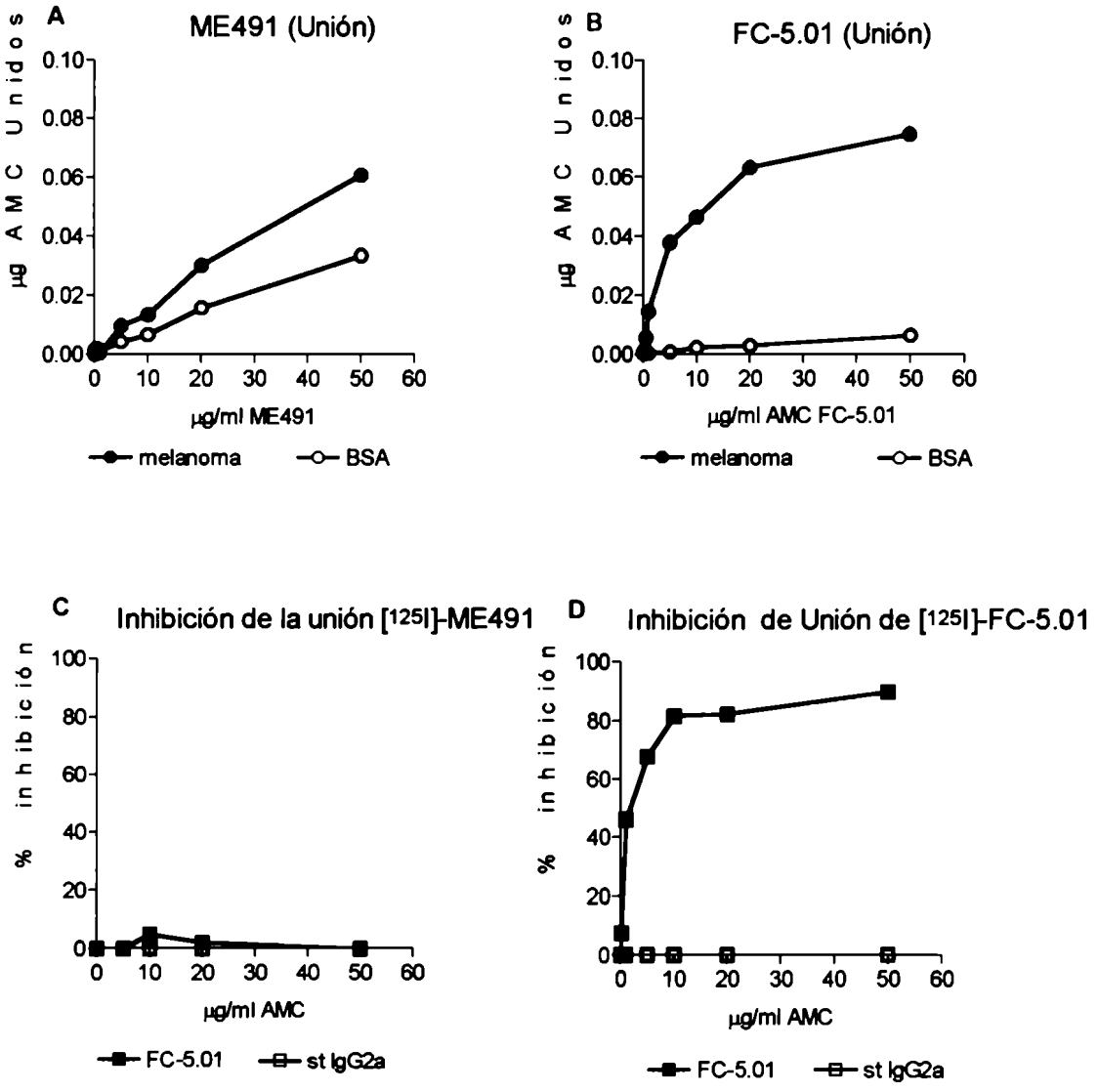


Figura 16: Radioimmunoensayos

A y B- Curvas de Unión al extracto de membrana de melanoma # 1 ; **C y D**- Análisis de unión al epitope
[^{125}I]-ME491 se testeó a 0.5 y 3.1 µg/pocillo y [^{125}I]-FC-5.01 se testeó a 0.5µg/pocillo. SEM de muestras por triplicado fueron <5%.

c) ANALISIS COMPLEMENTARIOS DE LA REACTIVIDAD FC- 5.01

i) COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LA EXPRESIÓN DE CD63 ENTRE MELANOMAS PRIMARIOS Y METASTÁSICOS

Dado que los resultados observados para el AMC FC-5.01 se contradicen con datos reportados por otros autores [Atkinson B., 1985] que asocian la expresión de CD63 con el potencial metastásico de los melanomas humanos (ver discusión), se evaluó en mayor detalle la reactividad del AMC FC-5.01 con melanomas humanos.

En primer lugar analizamos la expresión de CD63 en un gran número de biopsias de melanoma humano por medio de IHQ con FC-5.01. Como se detalla en las **Tabla 12 y 13**, el Ag CD63 (detectado por FC-5.01) se expresó en prácticamente todos los melanomas primarios y metastásicos analizados, independientemente de la fase de crecimiento radial o vertical o del sitio de metástasis, resultado similar al descripto anteriormente para el AMC NKI-C3 [Venegoor C, 1985] y se caracterizó por una tinción de intensidad marcada en un alto porcentaje de células.

Tabla 12: Expresión de Ag CD63 en melanomas primarios

Paciente	Fase de crecimiento [1]	Clark	Expresión de CD63	
			% de células [2]	Intensidad [3]
1	R	II	70	++++
2	R	II	100	++++
3	R	II	75	+++
4	R		100	++++
5	R	IV	80	++
6	R		100	++++
7	R	III	100	++++
8	R	III	100	++++
9	R		100	++++
10	V	III	100	++++
11	R		25-50	+
12	R	II	100	++++
13	V		100	++++
14	R	IV	100	++
15	R	II	100	++++
16	R		100	++
17	R	II	100	++++
18	R	II	100	++++
19	R	II	100	++++
20	R	II	100	++++
21	R	II y III	100	+++
22	R		75-100	++++
23	V	III	100	++++
24	R		100	++++
25	V	IV	80	+
26	R	I	100	++++
27	V	IV	70	+/++
28	R		100	++++

[1] V=fase de crecimiento vertical; R= fase de crecimiento radial
[2] los números indican el porcentaje de células positivas para CD63 en cada corte
[3] la intensidad de la reacción IHQ se determinó como en la Tabla 10.

Tabla 13: Expresión de CD63 en melanomas metastásicos

Paciente	Sitio de mts [1]	Expresión de CD63	
		% de células [2]	intensidad [3]
1	D	50	+
2	D	80	++++
3	D	5	++
4	G	100	++++
5	G	75-100	++++
6	D	70	+++
7	G	80	+/++
8	D	60	+/++
9	G	90	+
10	D	95	++++
11	D	45	+
12	D	80	++++
13	G Y PULMÓN	100	++++
14	G	100	+++
15	G	60	+++
16	D	70	++++
17	G	80	++++
18	D	100	++++
19	G	90	++++
20	G	100	++++
21	D	100	++++
22	G	100	++++
23	D	100	+++
24	G	90	++++
25	G	100	++++
26	CEREBRO	90	++
27	G	75	++
28	G	90	+++/++++
29	INT DELGADO	100	++++
30	D	70	++
31	D	60	+

[1] G= ganglio linfático; D= dérmica (subcutánea).
[2] los números indican el porcentaje de células positivas para CD63 dentro de cada corte
[3] la intensidad de la reacción IHQ se determinó como en la Tabla 10.

Posteriormente comparamos la expresión de CD63 entre melanomas primarios y metastásicos. En la **Tabla 14**, se puede observar que no existe diferencia estadísticamente significativa para la expresión del epitope 5.01, entre melanomas primarios (crecimiento radial) y melanomas metastásicos, luego de

haber analizado 22 y 31 tumores respectivamente, aún dividiendo en tres categorías de positividad los diferentes tumores.

Tabla 14: Expresión de CD63 en melanomas primarios y metastásicos[1]

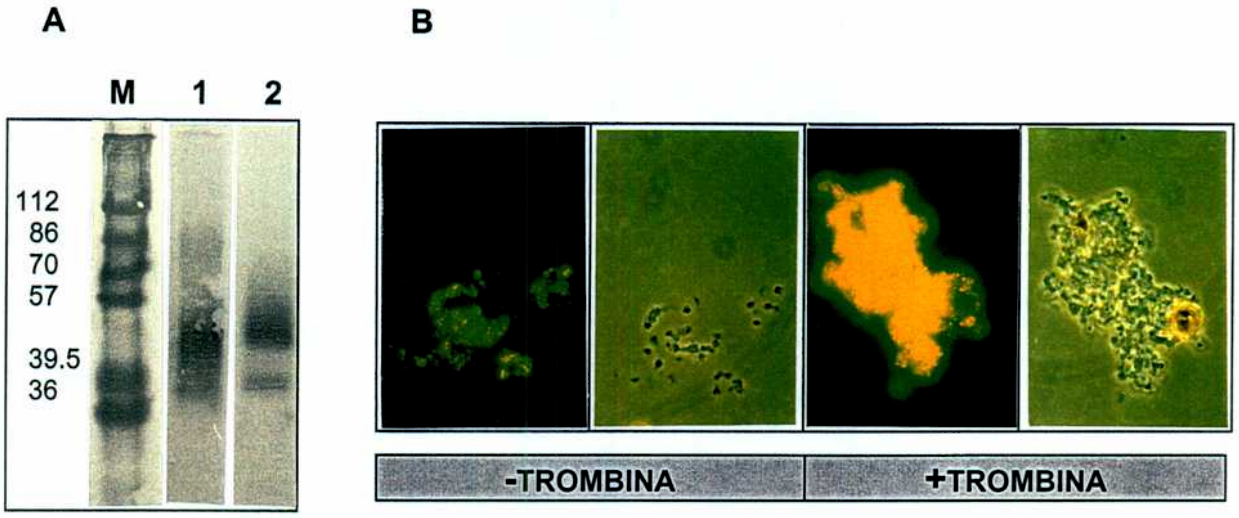
Melanomas	Expresión del epítope 5.01 (% de células positivas)	Tumores (%)[1]
Primarios (n=22)	<10%	0 (0)
	10-50%	1 (4.5)
	>50%	21 (95.5)
Metastásicos (n=31)	<10%	1 (3.2)
	10-50%	2 (6.4)
	>50%	28 (90.4)
valor p [2]		0.675

[1] Se indican números de casos en cada categoría. Entre paréntesis se indica el porcentaje de casos en cada categoría. [2] El valor *p* se calculó por el Test de χ^2.

ii) REACTIVIDAD DE FC-5.01 CON PLAQUETAS HUMANAS

En plaquetas, CD63 fue identificado como un Ag asociado a la activación, entre los que se encuentran la glicoproteína IIb/IIIa y el CD62 (GMP-140) [Coller BS, 1989; Metzelaar MJ, 1990]. Este Ag fue caracterizado como una glicoproteína lisosomal que es expuesta en la superficie celular de las plaquetas activas [Azorsa DO, 1991]. En melanomas humanos la banda heterodispersa que aparece al analizar el Western-Blot, tiene un peso molecular de 30-60 kD debido al extenso grado de glicosilación, pero la forma plaquetaria se ha descripto como una banda más definida, en un rango de 40-55 kD.

En la **Figura 17 A** observamos que al analizar el patrón de Western Blot de un extracto de membranas de plaquetas humanas con AMC FC-5.01 se detecta el Ag CD63 con un peso molecular similar al descripto, utilizando otros AMCs anti-CD63.



AUMENTO= 1000X

Figura 17: Detección de CD63 en plaquetas con FC-5.01

A-Western Blot de extractos de plaquetas.**Calle 1**: Melonada #1 (10 μg); **Calle 2**: extracto de plaquetas humanas (10 μg). M: marcadores de peso molecular.
B- IF de Plaquetas activadas con trombina. Para cada condición se muestra la microscopía de fase y la fluorescencia.

Asimismo, en plaquetas activadas con trombina (5 U/ml, 2 min.) fue posible observar expresión del Ag CD63 en la superficie celular, por IF indirecta. Como se observa en la **Figura 17 B**, sólo las plaquetas activadas presentaron intensa fluorescencia con FC-5.01.

III) REACTIVIDAD DE FC-5.01 CON HUVEC

En células endoteliales, CD63 ha sido identificado como un componente de los cuerpos de Weibel-Palade, gránulos secretorios especializados en el almacenamiento de factor de von Willebrand y P-selectina; en respuesta a la activación con trombina, éstas moléculas de adhesión son rápidamente movilizadas a la superficie celular por exocitosis [Vischer UM, 1993]. Utilizando FC-5.01, observamos que la expresión de CD63 en células HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells) solo se detecta en forma intracelular (células

permeabilizadas), con un patrón puntillado, característico de los cuerpos de Weibel Palade, y no detectamos expresión del Ag en la superficie de las células vivas (no-mostrado).

El Ag reconocido por FC-5.01 se expresa en varios tumores de origen epitelial así como también en el 100% de los melanomas primarios y metastásicos. Hemos observado muy abundante expresión del Ag reconocido por FC-5.01 en tumores de origen melanocítico, pero también está presente en tumores de orígen gastrointestinal, mamario y ginecológico. Estos resultados son similares a los encontrados para otros Ags asociados a melanoma, donde se ha detectado reactividad cruzada con tumores de orígen no-melanocítico [Ishii Y, 1982]. FC-5.01 presenta reacción débil o negativa con la mayoría de los tejidos normales. El Ag se encuentra tanto en la membrana plasmática como en vesículas intracitoplasmáticas, en las células neoplásicas analizadas.

Se ha establecido que el Ag reconocido por FC-5.01 es una proteína altamente N-glicosilada, con una distribución heterogénea de peso molecular (30-60 kDa), y un núcleo proteico de 25 kDa. Ensayos de ELISA y Western Blot con distintos tratamientos enzimáticos y químicos sugieren que el epitope antigénico reside en la estructura protéica y el determinante antigénico para FC-5.01 tiene una configuración dependiente de puentes disulfuro.

Hemos demostrado que el Ag reconocido por FC-5.01 es la glicoproteína asociada a melanoma CD63/ME491. Llegamos a esta conclusión a través de varios experimentos:

- por análisis de FACS, las células de melanoma KM3 ($CD63^-$) resultaron negativas para FC-5.01, pero fueron reconocidas luego de la transfección con una copia genómica de CD63, clon KM3 (CD63+); similares resultados se obtienen con otro AMC anti-CD63 (LS62).

- Con AMC ME491 (anti-CD63) se obtuvo un patrón de expresión similar al descripto para FC-5.01 en las mismas biopsias tumorales.

- En Inmunoblots las bandas obtenidas con extractos de membranas de melanomas metastásicos fueron idénticamente reconocidas por los AMCs FC-

los pesos de las bandas con datos reportados para CD63.

- En un ensayo de inmunodepleción secuencial, la preincubación de un extracto de membranas de melanoma humano, con el AMC anti-CD63 (ME491) redujo significativamente la cantidad de Ag disponible para la unión posterior a FC-5.01, y este evento fue específico.

- En un radioinmunoensayo de competencia se determinó que los AMCs ME491 y FC-5.01 no compiten por la unión en el mismo epitope o epitopes muy cercanos dentro de la molécula CD63/ME491.

La glicoproteína CD63 pertenece a una familia emergente de proteínas denominadas Tetraspaninas cuya estructura general se esquematiza en la **Figura 18.**

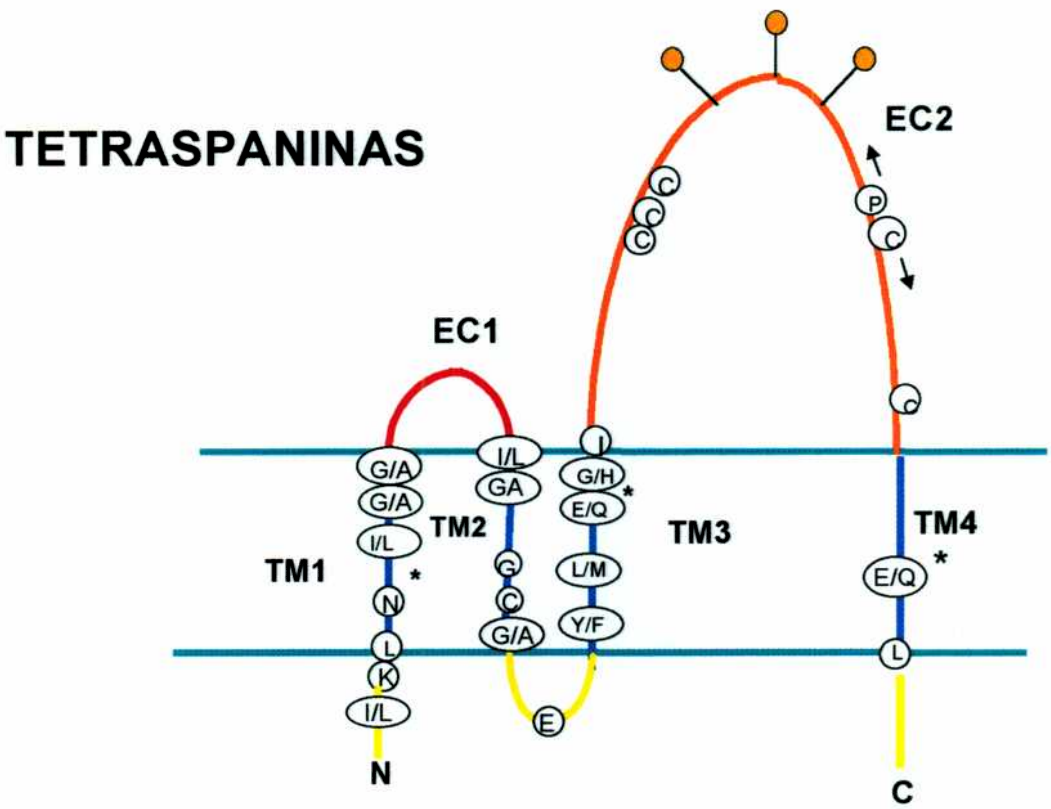


Figura 18: Estructura esquemática de las Tetraspaninas

Se indican los extremos carboxilo (C) y amino (N) terminal, los dominios extracelulares EC1 y EC2 (rojo), los dominios transmembrana (TM1 al TM4) (azul) y los dominios intracelulares (amarillo). En círculos se indican los aminoácidos muy conservados, presentes en por lo menos 12/18 tetraspaninas. Los asteríscos indican los aminoácidos cargados dentro de los dominios transmembrana. El motivo conservado PXSC se ubica en distintas posiciones dentro de EC2, y se indica con flechas. Adaptado de Horejsi V. y Vlcek C. [1991].

Se han descripto hasta la fecha unos veinte miembros de esta superfamilia, desde su descubrimiento en 1990, tras la comparación de los genes de CD37, CD81 (TAPA-1), sm23 y CD63. Todos los genes codifican para proteínas que atraviesan la membrana cuatro veces, formando dos loops extracelulares. Algunos de estos genes se encuentran en organismos tan primitivos como los nematodes (Caenorhabiditis elegans) y *Schistosoma*, lo que sugiere un rol conservado para estas proteínas a través de la evolución.

Entre las características más salientes de las Tetraspaninas podemos enumerar:

- cuatro dominios hidrofóbicos transmembrana altamente homólogos, con aminoácidos polares conservados
- dos dominos extracelulares EC1 (corto) y EC2 (largo), divergentes pero con cuatro cisteínas en posiciones conservadas
- extremos carboxi- y amino- terminal cortos
- presencia de sitios de glicosilación en EC2 (algunos miembros)

Atkinson y colaboradores [1984] fueron los primeros autores en describir un AMC contra el Ag CD63, denominado ME491. Estos autores propusieron que existía una relación inversa entre la expresión de CD63 y el potencial metastásico de los tumores, ya que los melanomas de crecimiento radial resultaban muy positivos para el AMC ME491, pero los de crecimiento vertical eran menos reactivos. A su vez, los tumores metastáticos eran negativos o muy débilmente reconocidos. Como ya mencionáramos, nuestros resultados se contradicen con éstas evidencias dado que nosotros no observamos diferencias en la expresión de CD63, detectado con FC-5.01, entre melanomas primarios y metastásicos, sino que el Ag se expresa con igual abundancia en ambos tipos de tumores. Similarmente Venegoor y colaboradores [1985] no encontraron dependencia del estadío de crecimiento de los melanomas y la reactividad con el AMC NKI-C3, cuyo epitope es idéntico al de ME491[Demetrick D.J., 1992].

El Ag CD63 es una glicoproteína presente en membranas lisosomales en la mayoría de las células normales y que se expresa en la superficie celular por ciertos fenómenos de activación celular. En células neoplásicas de diverso origen, principalmente en melanoma, se ha reportado su expresión en la membrana plasmática, aunque no se conoce el porqué de este hecho.

Nosotros observamos, tanto en metástasis de carcinomas de mama como de melanoma, que las células tumorales en contacto directo con el estroma son reconocidas mucho más intensamente por FC-5.01 (con reforzamientos de membrana) que aquellas células ubicadas en el centro de los nidos tumorales. Se podría especular que debido a su ubicación en membranas lisosomales y a su alto nivel de glicosilación, la presencia de CD63 en la superficie celular podría conferir protección a las membranas de las células en áreas de invasión tumoral o, tal vez podría reflejar la fusión de lisosomas con la membrana plasmática en células invasivas, permitiendo así la liberación de enzimas proteolíticas al estroma tumoral (**Figura 19**).

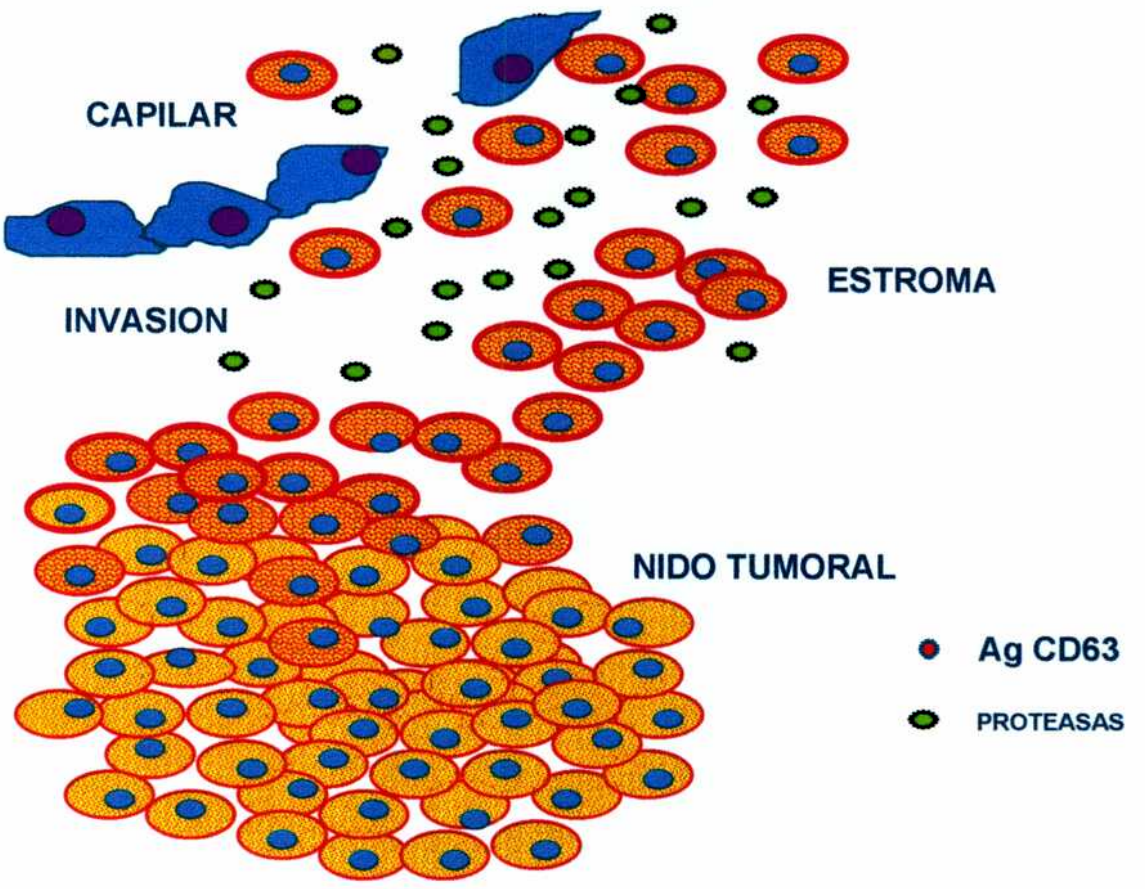


Figura 19: Heterogeneidad intratumoral de la expresión de CD63

En cuanto al epitope reactivo, si bien existe dependencia de puentes disulfuro para el reconocimiento antigénico, al igual que como se describió para otros AMCs anti-CD63 [Venegoor D.J., 1985; Ross A.H., 1985], por un ensayo de inhibición de unión, el epitope reconocido por FC-5.01 en la molécula CD63, sería diferente del reconocido por ME491. Una posible explicación para comprender la aparente contradicción encontrada respecto de la expresión de CD63 estadío-específica, podría ser que diferencias en la glicosilación del Ag entre tumores primarios y metastásicos, pudieran reflejarse en diferencias en la exposición del epitope antigénico para ME491, el cual podría quedar oculto o críptico en las metástasis. Dichas diferencias tendrían menos relevancia para el epitope reconocido por FC-5.01, que podría estar más expuesto o alejado de los sitios de N-glicosilación (**Figura 20**).

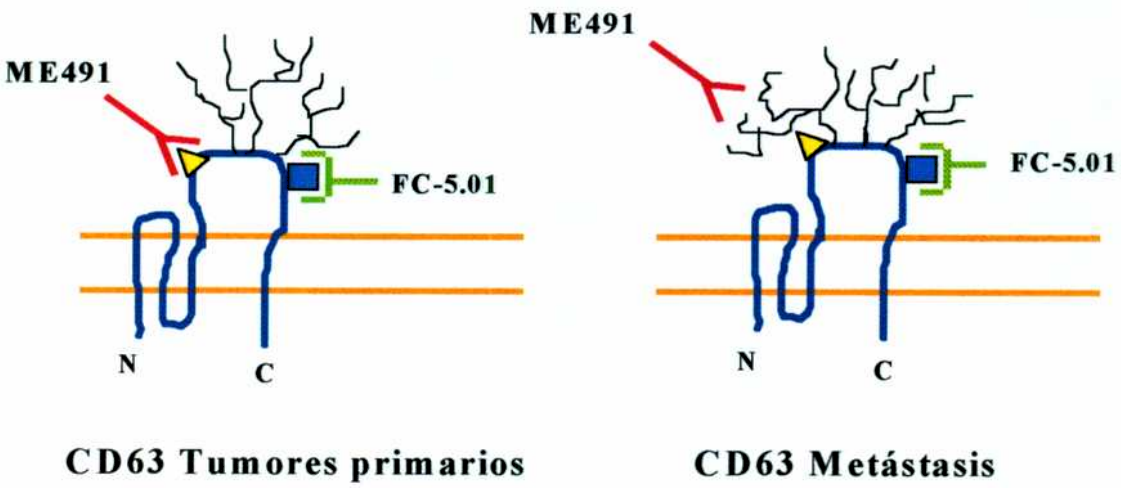


Figura 20: Diferentes epitopes de CD63 serían reconocidos por los AMCs FC-5.01 y ME491

En este sentido los reportes de la bibliografía acerca de la glicosilación de CD63 dan cuenta de la adición de azúcares complejos con ácido siálico, en líneas celulares de melanoma humano [Gruters R.A., 1989]. La extensa heterogeneidad reportada para CD63 sólo es comparable a la de otras glicoproteínas lisosomales [Lewis V., 1985]. No se han realizado estudios

melanomas primarios y metastásicos, aunque en un reporte reciente, el análisis por Western Blot no evidenció diferencias en cuanto al grado de variación del peso molecular entre dichos tumores [Smith M., 1997]. Las diferencias en la expresión de este Ag en los diversos tumores también pueden deberse a diferencias de afinidad de los AMCs o en la sensibilidad de los métodos de detección utilizados.

Como ya mencionáramos, CD63 ha sido también identificado como un Ag de activación plaquetaria. En plaquetas, la molécula se identificó como un componente de gránulos densos (granulofisina), que es rápidamente expuesto en la superficie de las mismas luego de la activación con trombina [Azorsa D.O., 1991]. Usando FC-5.01 pudimos observar el aumento de la expresión de del Ag reconocido en la superficie de las plaquetas activadas (agregadas), confirmando nuevamente la identidad con CD63. Además, el análisis de extractos plaquetarios por Inmunoblot reveló bandas con el peso molecular.

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III: PROPIEDADES FUNCIONALES DEL AMC FC-5.01 *IN VITRO*

INTRODUCCIÓN

Han sido descriptos varios AMCs que reaccionan con TAA, expresados en la superficie de células neoplásicas, los cuales median citotoxicidad por fijación de complemento (CMC) o a través de mecanismos que involucran la activación de células citotóxicas (ADCC) [Houghton A.N., 1985; LoBuglio A.F., 1988; Menard S., 1983]. Sin embargo, incluso AMCs que no medien este tipo de efectos citotóxicos pueden ser útiles en la detección y/o tratamiento del cáncer en humanos. Éste es el caso, por ejemplo, de los AMCs que se internalizan luego de la unión al Ag en la superficie celular, los cuales pueden ser conjugados a toxinas, drogas quimioterápicas, radioisótopos u otros agentes citotóxicos [Hellström I., 1990; Trail P.A., 1993] o que puedan inducir apoptosis [Shan D., 1998; Baselga J., 1994].

A continuación hemos investigado la capacidad de FC-5.01 de mediar efectos citotóxicos contra células tumorales. Hemos estudiado, además, las características de la unión y endocitosis de FC-5.01, ya que éstas propiedades pueden determinar el mejor modo de utilización del AMC en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

III-1.- ANÁLISIS DE LA UNIÓN FC-5.01-Ag CD63 EN CÉLULAS IIB-BR-G

La constante de afinidad (Ka) del AMC FC-5.01 y el número de sitios antigénicos en células IIB-BR-G se determinaron mediante el análisis de Scatchard, como se detalla en Materiales y Métodos. En la **Figura 21** se muestran los resultados obtenidos. Considerando una relación estequiométrica para la reacción Ag-AMC, éste análisis realizado sobre células vivas, mostró una abundante capacidad de unión con 2.1 $x10^6$ sitios antigénicos por célula y una relación lineal que indica la existencia de una población homogénea de sitios de unión, con una Ka $=1.43 \pm 0.4 \times 10^7\ M^{-1}$.

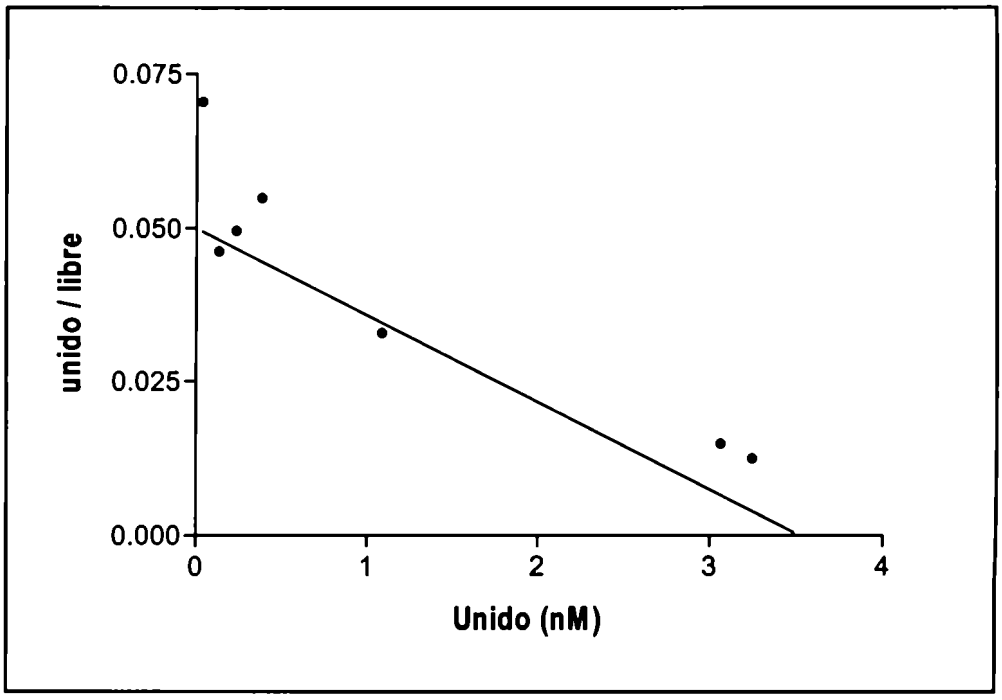


Figura 21: Análisis de Scatchard de FC-5.01 realizado sobre células IIB-BR-G. La figura muestra un gráfico representativo de 2 experimentos y cada punto corresponde al promedio de tres determinaciones. Ka = 1.43 x 10^7 M^{-1}: número de sitios antigénicos por célula = 2.1 x10^6.

III- 2.-INTERNALIZACIÓN DEL COMPLEJO FC-5.01 - Ag CD63:

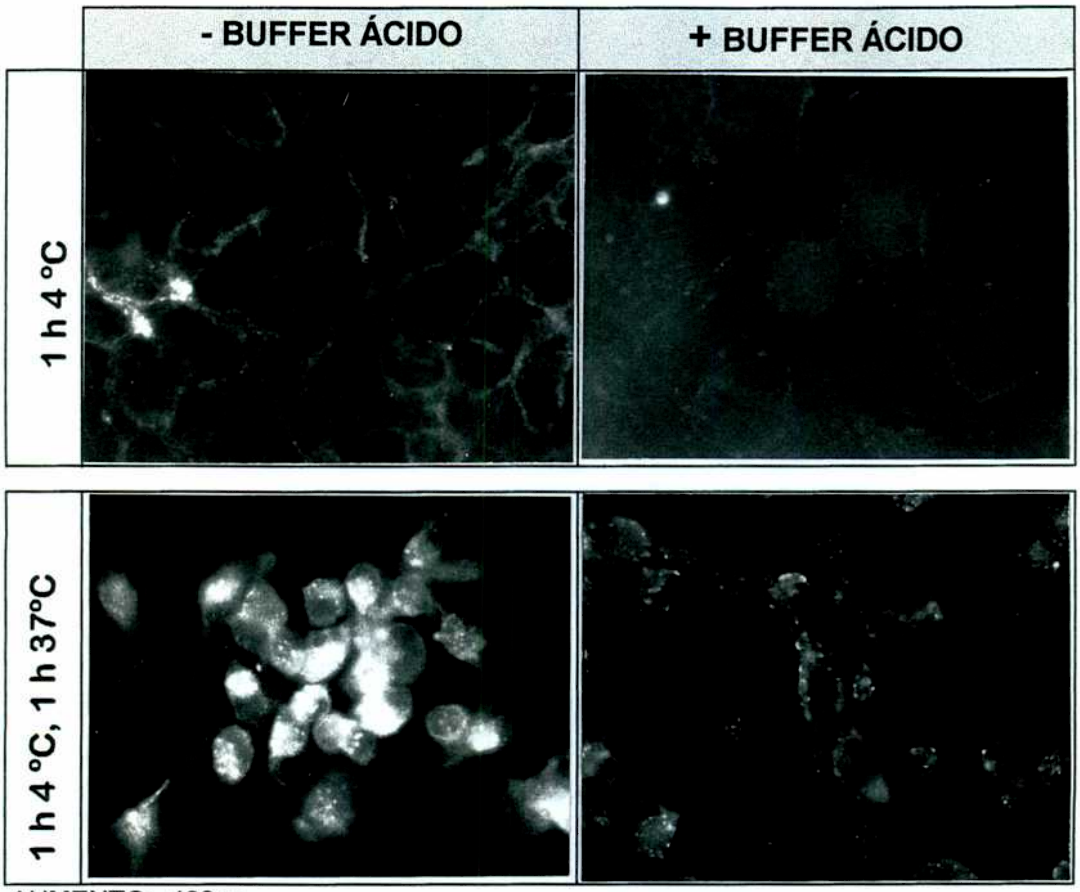
a) Ensayos de inmunofluorescencia (IF)

Algunos complejos Ag-AMC permanecen en la superficie celular por largos períodos de tiempo y son por lo tanto capaces de producir la muerte celular por medio de la activación de mecanismos inmunológicos del huésped o por la acción de radioisótopos conjugados al AMC. Otros complejos son internalizados, como es el caso de AMCs que reconocen receptores en la superficie celular y podrían por lo tanto ser útiles para la elaboración de inmunoconjugados efectivos, como ya se mencionó en la **Introducción**. Para investigar si el AMC FC-5.01 es internalizado luego de su unión al Ag en la superficie celular, se realizó un ensayo de endocitosis con células IIB-BR-G

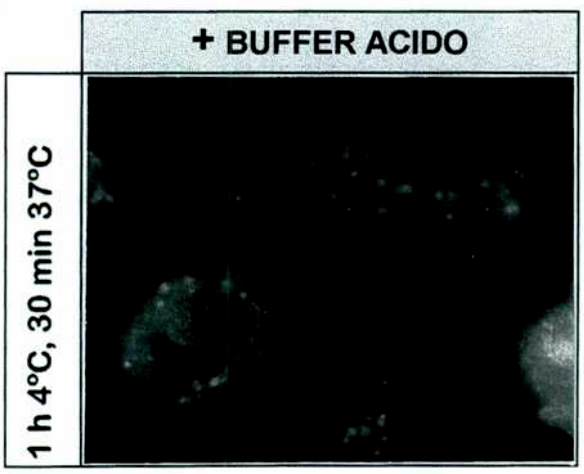
como se describe en Materiales y Métodos. Para esto, se agregó a un cultivo celular FC-5.01 por 1 hr con a 4°C, al cabo de la cual las células se lavaron e incubaron por distintos tiempos a 37°C, para permitir la internalización del AMC unido a las membranas. Luego de la incubación, las células se trataron con un buffer ácido para remover el AMC remanente presente en la superficie. La presencia y localización de FC-5.01 se detectó por IF como ya fuera descripto.

En la **Figura 22** se observan los resultados obtenidos. Luego de 1 hr de incubación la fluorescencia permaneció en la superficie de las células, mostrando un reforzamiento de las membranas. Con el lavado ácido, se eliminó prácticamente todo el AMC unido a la superficie. Cuando las células incubadas con AMC FC-5.01 a 4°C fueron lavadas e incubadas por 60 min adicionales a 37°C, se observó fuerte reacción intracelular presentando un patrón puntillado, especialmente concentrado en la región peri-nuclear, característico de endosomas o lisosomas. Este patrón pudo observarse incluso previamente al lavado con buffer ácido, al cual fue resistente, indicando su ubicación intracelular. Es importante destacar que también a tiempos más cortos de incubación a 37°C, (15 ó 30 min), se observó el mismo patrón, aunque en algunas células todavía se evidenciaba la presencia de AMC en la superficie celular.

El mismo ensayo de internalización fue estudiado en células IIB-MEL-J y en células de melanoma obtenidas por disgregación mecánica de un ganglio metastásico (**Materiales y Métodos**), y en ambos casos se repitió la observación del patrón de IF intracelular, luego de la incubación a 37°C (datos no mostrados).



AUMENTO: 400 x;



AUMENTO: 1000 x

Figura 22: Internalización de AMC FC-5.01 en células IIB-BR-G

b) Radioinmunoensayo celular - Catabolismo del AMC internalizado

La internalización y catabolismo del AMC FC-5.01 unido a las células IIB-BR-G fue demostrado cuantitativamente por medio de un radioinmunoensayo celular usando AMC FC-5.01 marcado con [^{125}I] como trazador radioactivo, como se describe en Materiales y Métodos. El AMC marcado fue unido a células IIB-BR-G en medio fresco a 37°C por 2 hs y luego se removió el exceso no-unido. El posterior procesado del AMC unido fue estudiado por un período de 44 hs (**Figura 23**). A los distintos tiempos, se analizaron la radioactividad (cpm) presente en el sobrenadante de cultivo y la radioactividad asociada a las células (que incluye tanto las cpm unidas en la superficie como la presente en el compartimiento intracelular). En el sobrenadante de determinó la presencia de productos de degradación del [^{125}I]-FC-5.01, por medio de una precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 5%. La radioactividad TCA-precipitable representa la fracción de AMC intacto, mientras que las cpm TCA-solubles corresponden a los productos de degradación del AMC radiomarcado (fragmentos de bajo peso molecular marcados).

Como se observa en la **Figura 23**, la radioactividad incorporada por las células IIB-BR-G fue gradualmente liberada al sobrenadante y a las 18 hs < 15% de la radioactividad inicial permaneció asociada a las células. Asimismo, 70.2% de las cpm liberadas al sobrenadante fueron TCA-solubles. Esto indica que el AMC FC-5.01 intacto tuvo que ser internalizado por las células IIB-BR-G y posteriormente degradado a fragmentos de bajo peso molecular, que no precipitan con TCA. Un control realizado en paralelo incubando células IIB-BR-G con ^{125}I-FC-5.01, pero incubado a 4°C por 24 hrs en lugar de 37°C, demostró que prácticamente todo el AMC presente en el sobrenadante fue TCA-precipitable (95 %), indicando que en éstas condiciones, no se produjo la internalización y degradación del AMC radiomarcado. Analizados en conjunto, estos experimentos sugieren fuertemente que el AMC FC-5.01 es capaz de internalizarse en células CD63 +.

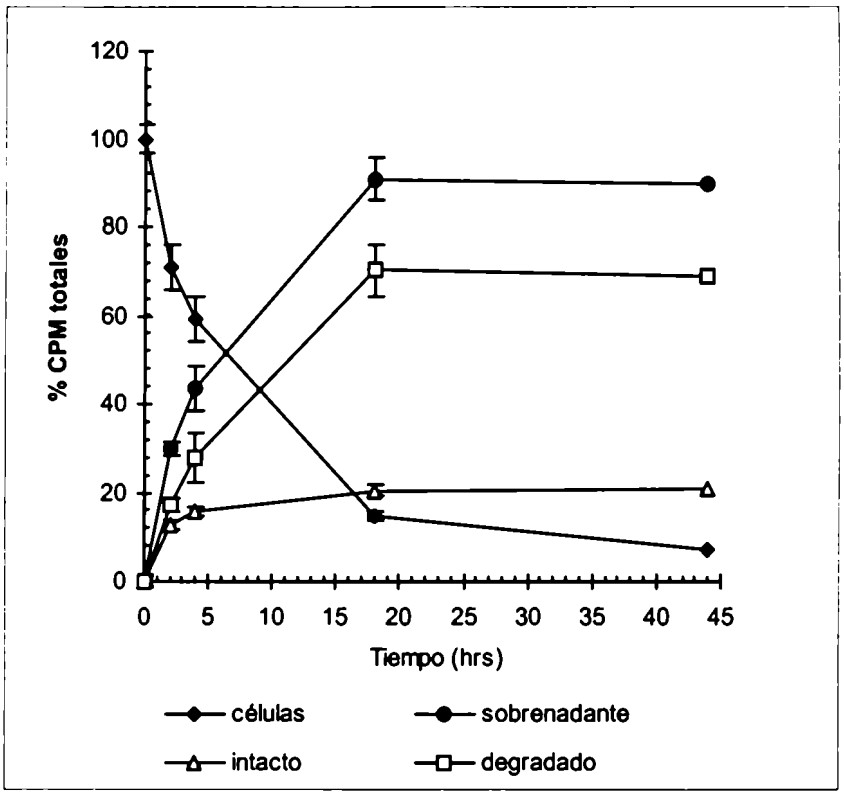


Figura 23: Internalización y catabolismo de FC-5.01 en células IIB-BR-G

El radioinmunoensayo celular se realizó con células IIB-BR-G,como se describe en Materiales y Métodos. Se calculó la distribución relativa de las CPM unidas a las células y las liberadas al medio de cultivo, como porcentaje de la radioactividad total del cultivo. El sobrenadante del cultivo se precipitó con TCA para distinguir el [^{125}I - unido a proteína] (AMC intacto), de los fragmentos pequeños solubles (AMC degradado). Cada punto es el promedio ± SD de muestras realizadas por triplicado.

También se realizó un experimento de internalización en células IIB-BR-G utilizando el AMC ME491 (anti-CD63) repitiéndose los mismos resultados que los observados para FC-5.01. Se realizaron los controles de isotipo (IgG1 e IgG2a respectivamente) que resultaron negativos en la IF (resultados no mostrados).

c) Cinética de la internalización del complejo y re-expresión del CD63.

La velocidad de internalización del AMC FC-5.01 fue investigada siguiendo el procedimiento de Opresco y Wiley [1987]. FC-5.01 se internalizó con una velocidad (Ke) de 0.0219 min^{-1}, como se calcula de la pendiente de la curva de cpm intracelular/cpm superficie *versus* tiempo, observada en la **Figura 24.** Esta velocidad de internalización sugiere que, bajo condiciones de saturación, el 50% del AMC unido en la superficie puede ser internalizado en 45.7 min (es decir, cuando el cociente cpm intracelular/cpm superficie es igual a 1).

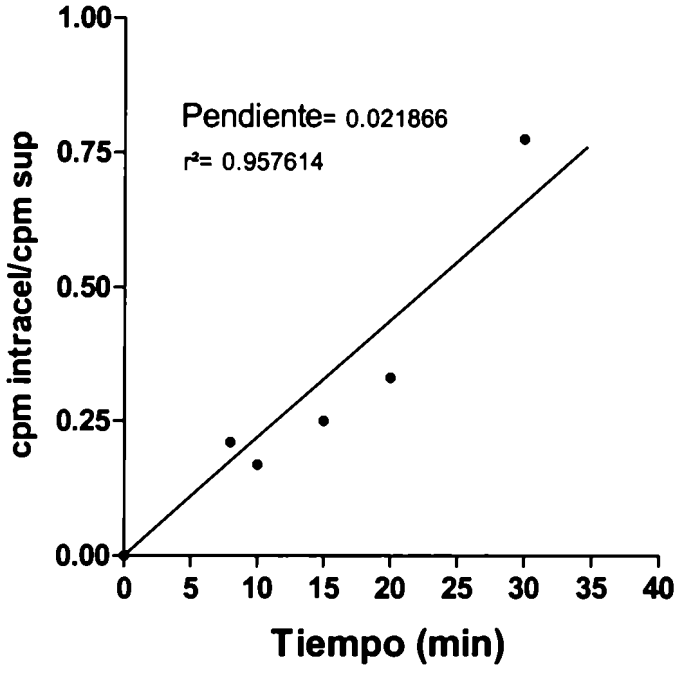


Figura 24: Velocidad de internalización de FC-5.01 en células IIB-BR-G

Ya que la rápida re-expresión del Ag, luego de la internalización del complejo Ag-AMC, es una propiedad importante que podría, por ejemplo, aumentar la acumulación de agentes citotóxicos acoplados al AMC en las células blanco, se evaluó la re-expresión de CD63 en células IIB-BR-G. Las células fueron pre-saturadas con FC-5.01 no-marcado, y la re-expresión del Ag se monitoreó cuantificando la capacidad de unión posterior de [^{125}I]-FC-5.01 a estas células

saturadas con AMC, luego de incubarlas a 37°C por distintos tiempos. A cada tiempo se cuantificó la unión máxima (sin pre-saturación). Observamos que a las 2 hrs, aproximadamente un 30% del Ag estaba disponible para la unión, y el porcentaje se incrementó hasta el 51.2 ± 7.1% a las 5 hs (**Figura 25**).

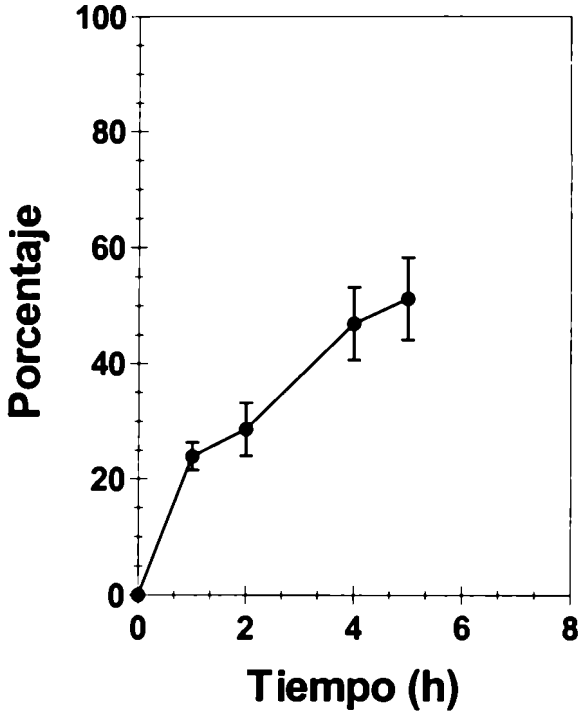


Figura 25: Re-expresión del Ag CD63

Cálculo de la capacidad de unión de [^{125}I]-FC5.01 relativa a la de células control, que no fueron pre-saturadas con FC-5.01 (no-radiomarcado). Cada punto representa el promedio ± SEM de muestras realizadas por cuadruplicado.

III- 3.- El AMC FC-5.01 NO MEDIA REACCIONES CITOTOXICAS CON CELULAS CD63$^+$

a) Curvas de crecimiento en presencia de AMC FC-5.01

El posible efecto del AMC FC-5.01 sobre la proliferación celular se investigó incubando las distintas líneas celulares con 50 μg/ml de AMC FC-5.01 en el medio de cultivo completo, reemplazando el AMC dos veces por día. Las curvas de crecimiento se siguieron durante 6 días, en el transcurso de los

cuales se tripsinizaron y contaron las células (por triplicado). Como control, las células se incubaron en presencia de medio completo más PBS. Como se aprecia en la **Figura 26** no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el crecimiento *in vitro* de varias líneas celulares en presencia de AMC FC-5.01 respecto de los controles sin tratar, aún cuando la concentración utilizada y la provisión diaria, aseguraron altos niveles de anticuerpo en el medio de cultivo.

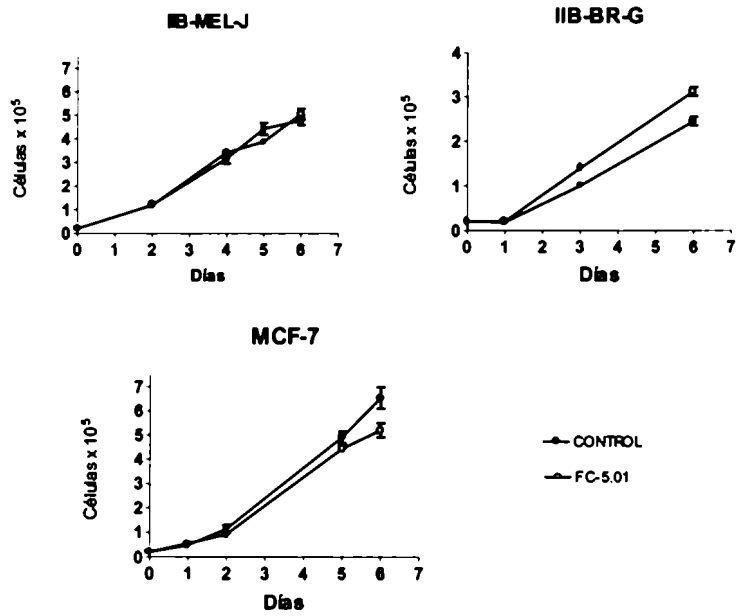


Figura 26: Efecto de FC-5.01 sobre el crecimiento celular.

b) Citotoxicidad mediada por complemento (CMC) FC-5.01 dependiente

Con el objeto de investigar la capacidad del AMC FC-5.01 de mediar efectos citotóxicos en presencia de complemento sérico contra células Ag+, se utilizó un ensayo de liberación de [^{51}Cr] (Materiales y Métodos). Para esto células IIB-BR-G fueron marcadas con [^{51}Cr] y posteriormente incubadas a 37°C con 50 µg/ml de FC-5.01 en DMEM, en presencia de suero humano como fuente de complemento (C_h'). También se testeó la capacidad de fijación de complemento de conejo purificado (C_c'). Finalizado el período de incubación (90 min) se cuantificó la radioactividad en los sobrenadantes y se calculó el porcentaje de citólisis específica. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Como se

muestra en la **Tabla 15** sólo se observó un bajo % de lisis dependiente de FC-5.01 en presencia de (C_c'), pero no hubo lisis específica en presencia de (C_h'). Como control positivo de la actividad del complemento humano, se realizaron experimentos en paralelo con AMC FC-2.15, que ejerce un potente efecto citotóxico contra células MCF-7 fijando (C_h') [Ballare C, 1995]. En dicho control se lisaron todas las células MCF-7 y no hubo ningún efecto sobre las células IIB-BR-G (Ag 2.15^-). En paralelo se controló la actividad del (C_c') utilizando AMC R_{24} [Ollert M.W., 1994] contra células IIB-MEL-IAN, observándose 71.2 ± 9.8 % lisis.

Tabla 15: CMC dependiente de FC-5.01

AGENTES	% LISIS (promedio ± SD)	
	IIB-BR-G	MCF-7
FC-5.01	<0	<0
FC-2.15	<0	< 0
complemento humano + FC-5.01	<0	0.9 ± 0.8
complemento humano + FC-2.15	<0	113.0 ± 4.5
complemento de conejo + FC-5.01	13.0 ± 2.7	9.5 ± 3.7

El porcentaje de lisis se calculó como se describe en Materiales y Métodos. La concentración de ambos AMCs testeados fue de 50 μg/ml.

c) Citotoxicidad celular anticuerpo - dependiente (ADCC)

Para estudiar la capacidad de FC-5.01 de mediar ADCC contra células Ag $CD63^+$ se utilizó un ensayo de liberación de [^{51}Cr] similar al de CMC, pero utilizándose diferentes células efectoras en lugar de complemento (Materiales y Métodos). Como blanco fueron utilizadas células IIB-BR-G y como efectoras leucocitos mononucleares totales, linfocitos aislados o PMN humanos. Se testearon también linfocitos preincubados con IL-2 como células efectoras, dado que distintos autores han reportado un aumento de actividad ADCC en

estas condiciones [Morgan A., 1989; Munn D., 1987]. Fueron ensayadas diversas relaciones célula blanco : célula efectora, variando en un rango entre 1:5 y 1:100, respectivamente.

En cada caso se evaluó el porcentaje de citólisis específica y en ninguna de las condiciones estudiadas se observaron efectos de citotoxicidad celular mediada por FC-5.01 (resultados no mostrados). Sin embargo bajo las mismas condiciones, el AMC 3F8, que media reacciones de ADCC en células Ag^+, resultó citotóxico frente a células de melanoma IIB-MEL-IAN (36.4% lisis).

III-4.- EFECTO DE AMC FC-5.01 EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS IIB-BR-G

En trabajos recientemente publicados se ha descripto la asociación del Ag CD63 a otros miembros de la superfamilia de las Tetraspaninas, CD9 y CD81 y a integrinas β_1 en líneas celulares de melanoma humano, fibrosarcoma y eritroleucemia [Hemler ME, 1996].

Las integrinas son un tipo de receptores celulares que reconocen ligandos de matriz extracelular y celulares los cuales transducen señales [Hynes R.O., 1992], haciendo de interfase con una cascada de segundos mensajeros [Juliano R.L., 1993]. Las integrinas están involucradas en la adhesión de las células de melanoma y otros tumores a los componentes de la matriz extracelular y en la regulación de una gran variedad de respuestas celulares, tales como la migración, proliferación, diferenciación y apoptosis [Juliano R.L., 1993]. Su expresión en el melanoma es considerada central para el proceso de metástasis, facilitando la migración e invasión [Edward M, 1995]. Las integrinas β -1 se han descripto directamente relacionadas con la capacidad de migración e invasividad de células de melanoma humano [Melchiori A, 1995].

El rol de CD63 en la migración de células de melanoma ha sido recientemente sugerido por Radford y colaboradores [1997] ya que células KM3 transfectadas con ADN genómico para CD63 evidenciaron inhibición de la motilidad en respuesta al suero fetal bovino en cámaras de Boyden, dependiendo del nivel de expresión de la glicoproteína CD63, y estos eventos resultaron influenciados por la presencia de AMCs contra el Ag.

Por este motivo, investigamos la posible influencia de AMC FC-5.01 en la motilidad de células $CD63^+$, en respuesta a componentes de la matriz extracelular, presentes en el medio condicionado de fibroblastos humanos (HFL-1), el cual contiene una mezcla de moléculas capaces de estimular la migración de las células invasivas [Mensing H., 1984]

Se analizó el efecto de FC-5.01 en la migración de células IIB-BR-G e IIB-MEL-J. La migración de las células se examinó por el ensayo de penetración en cámaras de Boyden (Materiales y Métodos). Al cabo de 3 hs de incubación, se cuantificaron ≈ 120-170 células migrantes/campo en respuesta al medio condicionado por células HFL-1, habiendo sembrando 10^5 células IIB-BR-G sobre filtros de 8 μm. Para las células IIB-MEL-J el tiempo de migración se fijó en 20 hs, obteniéndose cantidad de células migrantes. Los resultados se expresan como el promedio de muestras por triplicado ± SEM, donde cada muestra es el promedio de 10 campos en aumento = 200 X. Como se observa en la **Figura 27**, el agregado de FC-5.01 (50 μg/ml) a la parte superior de la cámara de Boyden disminuyó significativamente la migración de las células IIB-BR-G y en menor grado la de células IIB-MEL-J ($p= 0.15$) en estas condiciones. La presencia de UPC10 (IgG2a inespecífica) a la misma concentración, no tuvo efecto sobre la migración. La presencia de péptido RGD (50 μM) (antagonista de integrinas, [Craig W.S., 1995]) suprimió parcialmente la motilidad de las células, indicando que los efectos en la motilidad de las células podrían estar en parte relacionados con interacciones de las integrinas de las células con los sustratos de la matriz extracelular, presentes en el medio condicionado. La migración de ambas líneas celulares en este ensayo se debe a la respuesta a componentes de la matriz extracelular presentes en el medio condicionado, ya que en presencia de medio de cultivo (sin suero fetal bovino) conteniendo BSA al 0.2%, prácticamente no se observó migración (no mostrado).

Podemos entonces concluir que el AMC FC-5.01, ensayado en estas condiciones, inhibió parcialmente la migración de células $CD63^+$ en respuesta al quimioatractante y que este proceso estaría mediado por integrinas.

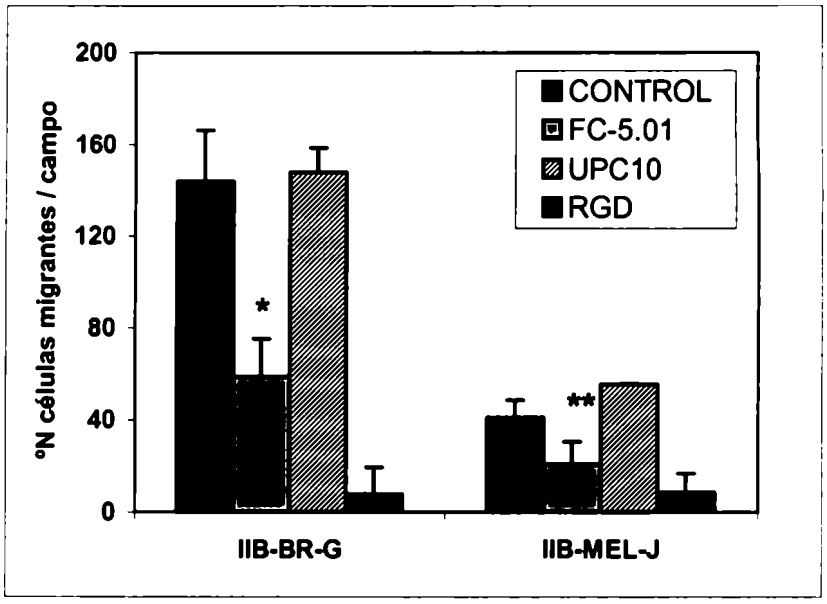


Figura 27: Efecto de FC-5.01 en la capacidad migratoria *in vitro* de las líneas celulares IIB-BR-G e IIB-MEL-J.

La migración a través de filtros de 8 µm se evaluó en cámaras de Boyden como se describe en Materiales y Métodos. FC-5.01 se usó a 50 µg/ml y el péptido RGD a 50 µM en medio de cultivo sin FBS. Los resultados mostrados son el promedio de dos experimentos realizados por triplicado ± SEM. La diferencia entre el tratamiento con FC-5.01 y el control respectivo es significativa (test Student) para células IIB-BR-G *: P =0.002; **: P= 0.16.

Se han desarrollado distintas estrategias para el uso terapéutico de AMCs: el uso de AMCs no-conjugados, o su unión a radioisótopos, toxinas o drogas. En el caso de AMCs no-conjugados se hace uso del efecto anti-tumoral del AMC por sí mismo o mediado por CMC o ADCC. En ese sentido, la internalización del AMC disminuiría su eficiencia terapéutica; en cambio para AMCs usados como vehículos que liberan drogas o toxinas, se requiere el reconocimiento de Ags con alta afinidad en la superficie celular, seguido de la endocitosis del inmunoconjugado. Como ejemplo del primer caso, podemos citar al AMC FC-2.15, desarrollado en nuestro laboratorio [Mordoh J., 1994] y dirigido contra el trisacárido Lewis^x [Capurro M., 1997]. El mismo reconoce una gran proporción de carcinomas epiteliales y es capaz de eliminar células tumorales por medio de un eficiente mecanismo de fijación de complemento [Ballare C., 1995] y por lo tanto resulta un agente útil para inmunoterapia pasiva de pacientes con neoplasias Lewis^x+ [Mordoh J., 1995]. Se ha demostrado que solo una baja proporción del AMC FC-2.15 unido en la superficie se internaliza muy lentamente, luego de unido a las células, por lo que el mismo permanecería en la superficie celular por suficiente tiempo para que la reacción de CMC concluya [Ballare C., 1995].

Por el contrario, la incapacidad de FC-5.01 para mediar reacciones citotóxicas contra células blanco podría explicarse por la rápida internalización del AMC observada luego de su unión a la superficie celular, lo que limitaría el tiempo de interacción para la activación de ADCC o la CMC, a pesar de que las Ig murinas de clase IgG2a son generalmente capaces de mediar eficientes reacciones de ADCC, luego de la unión a un Ag de la superficie celular [Christiaansen J.E., 1987].

La velocidad de internalización calculada para FC-5.01 en células IIB-BR-G es relativamente rápida, ya que implica que 50% del AMC unido puede internalizarse en unos 45 min. Estos valores están dentro de los reportados

para otros AMC internalizables [Stein R., 1990; Shih L.B., 1994], seguidos de la degradación a fragmentos de bajo peso molecular. Un AMC anti-CD63 fue descripto por Audran y colaboradores, con similar capacidad de internalizarse en macrófagos [1995].

Nuestros resultados sugieren que el Ag CD63 es rápidamente re-expresado en la superficie de células IIB-BR-G, luego de la internalización de los complejos Ag-FC-5.01. El re-equilibrio de los complejos Ag-AMC en el medio fresco solo podría explicar una porción menor de la incorporación de [^{125}I]-FC-5.01 en las condiciones ensayadas, ya que como se evidenció en los experimentos de catabolismo (**Figura 23**), sólo 10% del AMC intacto era liberado al medio a las 2 hrs. de incubación a 37°C y gradualmente se alcanzó un plateau cercano al 20%, a tiempos mayores. Por lo tanto, concluimos que, luego de la internalización, CD63 pudo ser re-expresado en la superficie celular de células IIB-BR-G cells, dado el incremento de la unión de [^{125}I]-FC-5.01 a 4°C (en superficie), como una función del tiempo de incubación a 37°C. Esta característica sería favorable para la liberación de agentes citotóxicos dentro de las células tumorales.

El hecho de que FC-5.01 se internaliza luego de su unión a la membrana de células CD63$^+$, sumado a la rápida re-expresión del Ag en la superficie celular y la alta reactividad con varios tumores humanos, hace del AMC un candidato atractivo para el desarrollo de inmunoconjugados con fines diagnósticos y/o terapéuticos. Podemos citar como ejemplo de este tipo de moléculas, al AMC BR96, dirigido contra el epitope Lewis y, expresado en un elevado número de carcinomas humanos, que es capaz de internalizarse en células adherentes (via *coated pits*) a endosomas, y finalmente degradado en lisosomas. Esta capacidad de internalización ha sido explotada para el desarrollo de inmunoconjugados con la droga citotóxica Doxorubucina [Trail P.A., 1993] y para la elaboración de diversas inmunotoxinas [Wargalla U.C., 1989; Vitteta E.S., 1991].

No se ha definido aún una función clara para la glicoproteína CD63, a pesar de que varios miembros de la superfamilia Tetraspaninas están asociados a la

transducción de señales [Tedder T.F., 1994]. Se ha especulado que por su gran contenido en azúcares podría conferir protección a las membranas lisosomales de la degradación por las enzimas lisosomales o, como mencionáramos anteriormente podría reflejar la fusión de lisosomas en la superficie celular en células activadas o algunos tumores. También podría implicar un rol funcional distinto para esta glicoproteína en la membrana celular. De hecho, varios autores han demostrado una asociación específica de CD63 con integrinas β1 en líneas celulares de melanoma y otros tumores [Berditchevsky F., 1996; Radford K.J., 1996]. En una revisión recientemente publicada, se sugirió un rol para las Tetraspaninas como " facilitadores moleculares", debido a la participación de muchos de sus miembros en la formación de diversos complejos funcionales, facilitando las interacciones entre varias proteínas, probablemente estabilizando los complejos [Maecker H T., 1997].

Hemos presentado evidencia de que FC-5.01 anti-CD63 influencia la motilidad celular *in vitro*, ya que la migración de las células IIB-BR-G e IIB-MEL-J se redujo en presencia del AMC. Estos resultados aparentemente contradicen los reportados por Radford y col. [1997] quienes informaron la supresión de la motilidad de células de melanoma que expresaban altos niveles de proteína CD63. En dichos experimentos, la presencia de AMC anti-CD63 tenía poco efecto sobre la ya escasa migración de las células con elevada expresión del Ag, pero inhibió significativamente la migración de células con baja expresión de CD63, que presentaban gran motilidad.

La migración de las células CD63+, en el ensayo realizado está mediada por integrinas, ya que también fue prácticamente suprimida por la adición de péptido RGD, agonista de integrinas. Teniendo en cuenta éstos datos, nuestros resultados sugieren que la molécula CD63 podría estar interactuando con integrinas durante el proceso de migración en respuesta al quimioatractante.

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV: ESTUDIOS *IN VIVO* EN EL MODELO DE CÁNCER DE MAMA HUMANO IIB-BR-G_{NUDE}

INTRODUCCIÓN

Como mencionáramos en la **Introducción General,** durante los últimos diez años mucho esfuerzo se ha enfocado al desarrollo de AMCs radiomarcados para su uso en diagnóstico y terapia. Por ese motivo, como se detalla a continuación, se investigó el uso potencial de FC-5.01 radiomarcado para la radioinmunodetección (RID) de tumores. Para ello, se realizaron primero experimentos con [^{125}I] y posteriormente se desarrolló un kit de marcación instantánea de FC-5.01 con [^{99m}Tc]. Estudiamos la eficiencia de marcación, estabilidad, conservación de la inmunoreactividad y biodistribución de [^{99m}Tc]-FC-5.01 en un modelo de cáncer de mama humano creciendo en ratones atímicos.

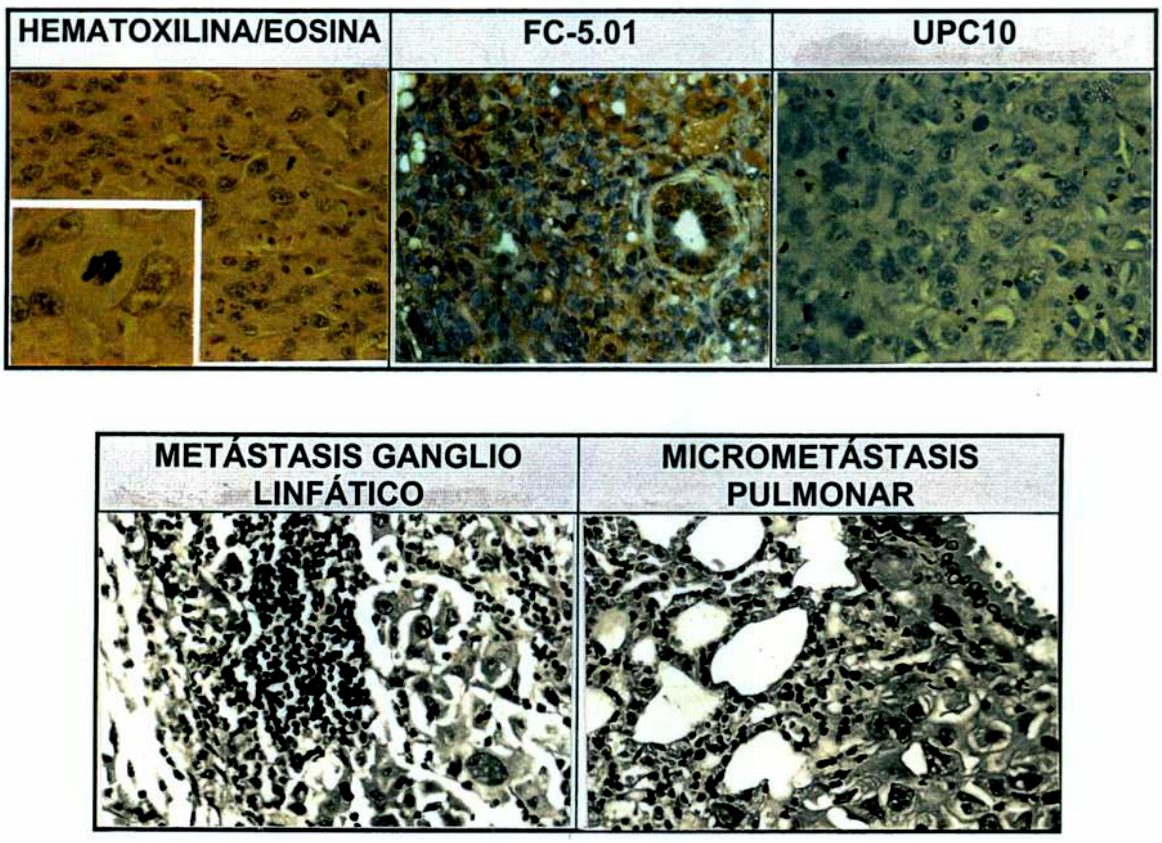
Posteriormente, en el mismo modelo animal, se realizaron experimentos preliminares de radioinmunoterapia (RIT) con FC-5.01 marcado con [^{131}I], analizando su efecto sobre el crecimiento tumoral y la toxicidad hematológica del tratamiento.

IV-1.- MODELO DE CÁNCER DE MAMA IIB-BR-G_{NUDE}

El transplante subcutáneo sucesivo en ratones atímicos (nude), a partir del tumor primario que originó la línea celular IIB-BR-G [Bover L., 1991], generó una línea tumoral *in vivo* denominada IIB-BR-G_{NUDE}. Estos xenotransplantes crecen en el flanco posterior de los ratones, con una cinética de crecimiento rápido, que se ha ido incrementando con los pasajes sucesivos [Bover L, 1998]. Dicho modelo de cáncer de mama humano presenta células altamente indiferenciadas que son capaces de crecer en forma hormono-independiente y conservan histología similar al tumor de origen. Los mismos presentan un alto índice mitótico, y marcado pleomorfismo nuclear (**Figura 28**). La reactividad de los xenotransplantes con FC-5.01 se determinó por IHQ, encontrándose un alto porcentaje de células marcadamente positivas.

Alrededor del pasaje #40 en ratones nude, los tumores IIB-BR-G_{NUDE} dieron lugar a la aparición de metástasis espontáneas generadas tanto por vía linfática como sanguínea, en 80 % de los recipientes. Los sitios más frecuentes de metástasis resultaron los ganglios axilares e inguinales, observables macroscópicamente y micrometástasis pulmonares [Bover L, 1998].

Este modelo fue utilizado para estudiar si los tumores IIB-BR-G_{NUDE} se podían radiolocalizar con AMC FC-5.01 radiomarcado, así como investigar el posible efecto terapéutico del AMC sobre el crecimiento y metástasis de dichos tumores.



Aumento: x200, inserto x400

Figura 28: Modelo tumoral IIB-BR-G_{NUDE}.

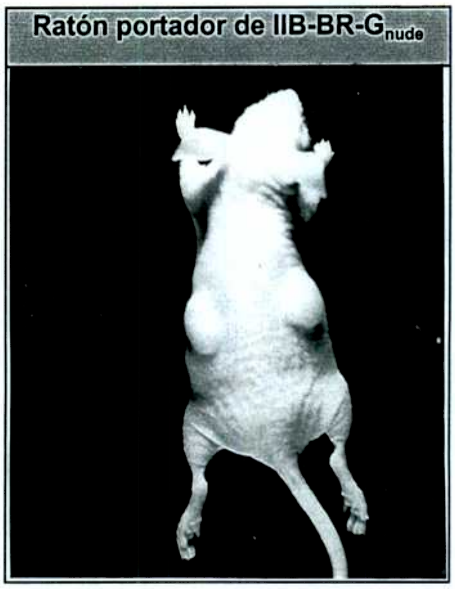
IV-2.- RADIOINMUNODETECCION (RID)

Con el objeto de establecer si el AMC FC-5.01 podía detectar los tumores IIB-BR-G_{NUDE} (CD63+) *in vivo*, se diseñaron experimentos con dos estrategias de marcación distintas. En principio se realizaron experimentos marcando FC-5.01 con [^{125}I], de fácil manejo en el laboratorio y bajo costo y posteriormente con [^{99m}Tc], el isótopo de elección para RID.

a) AMC FC-5.01 marcado con [^{125}I]: Se marcaron AMC FC-5.01 y los fragmentos ($F(ab')_2$ -F(ab'), obtenidos por digestión con pepsina (**ver Capítulo I-4**), con [^{125}I], como se describe en Materiales y Métodos. Se hicieron controles con IgG_{2a} inespecífica (UPC10) marcada de igual forma. Los ratones se inyectaron y procesaron como se describe en Materiales y Métodos.

En primer lugar se realizaron imágenes en cámara γ de animales portadores de dos tumores (derecho e izquierdo), a distintos tiempos post-inyección (1, 5, 7 y 8 días) de [^{125}I]-FC-5.01 y [^{125}I]-UPC10. El volumen de los tumores utilizados fue de 0.3-0.5 cm^3. En la **Figura 29** se puede observar que ambos tumores fueron radiolocalizados positivamente con [^{125}I]-FC-5.01, con una acumulación progresiva de la radioactividad en los mismos a lo largo del tiempo, hecho que no es evidente con [^{125}I]-UPC10.

A los 8 días post-inyección se sacrificaron los animales y se realizó la biodistribución como se describe en Materiales y Métodos. En la **Tabla 16** se resumen los datos obtenidos al calcular el porcentaje de la dosis inyectada normalizada por gramo de tejido (% DI). Los tumores presentaron mayor captación de [^{125}I]-FC-5.01 que el resto de los órganos, mientras que la inmunoglobulina inespecífica no se acumuló en los tumores.



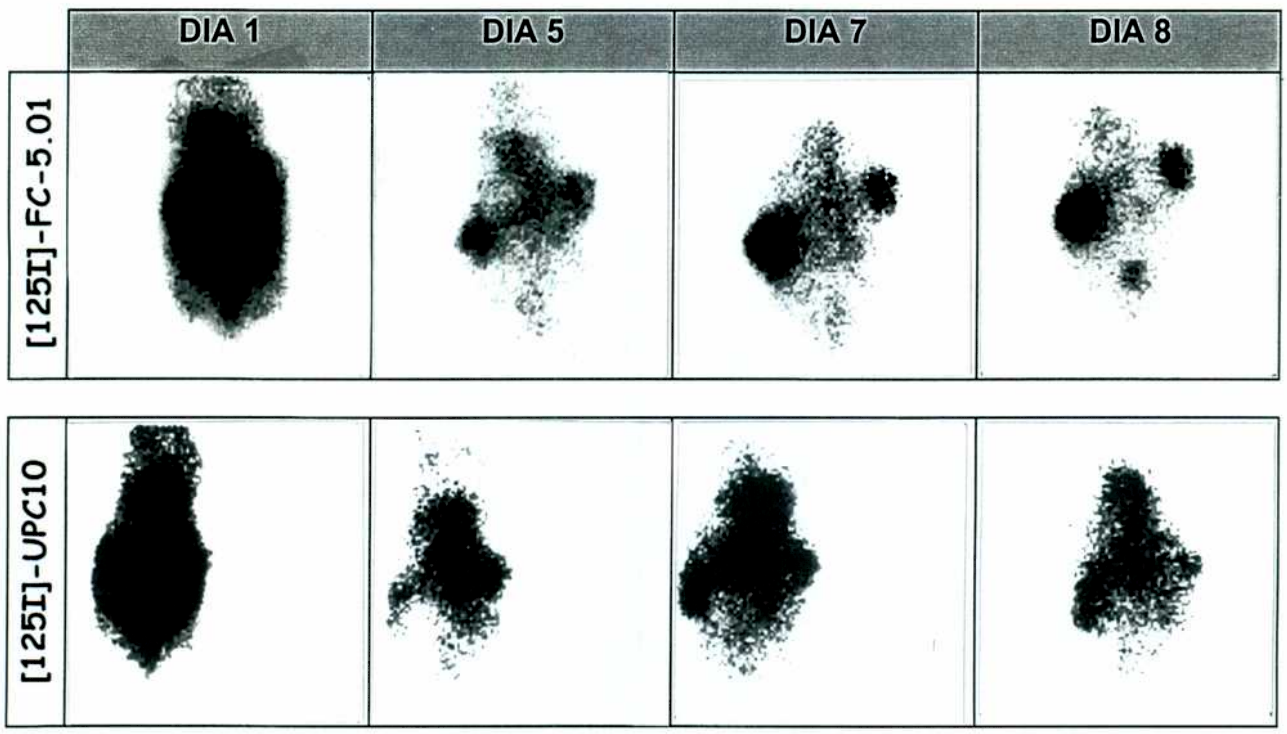


Figura 29: Radioinmunodetección de tumores IIB-BR-G$_{NUDE}$ con [^{125}I]- FC-5.01

Tabla 16: Biodistribución en ratones nude portadores de tumor IIB-BR-G_{nude}, a los 8 días post-inyección.

TEJIDO	% DOSIS INYECTADA / GR	
	[^{125}I]-FC-5.01	[^{125}I]-UPC10
TUMOR	1.51 ± 0.50*	0.75 ± 0.17
SANGRE	0.93 ± 0.44	1.66 ± 0.40
RIÑON	0.33 ± 0.14	0.68 ± 0.23
HIGADO	0.31 ± 0.12	0.58 ± 0.17
PULMÓN	0.39 ± 0.18	1.11 ± 0.16
BAZO	0.72 ± 0.10	1.35 ± 0.80
ESTERNON	0.38 ± 0.23	0.63 ± 0.13
PIEL	0.39 ± 0.19	0.88 ± 0.18

* Los valores indican el promedio ± SEM del % de la dosis inyectada por gramo de tejido, con n= 2 y donde cada ratón tiene 2 tumores.

En la **Figura 30** se grafican los cocientes Tumor : órgano obtenidos para [^{125}I]-FC-5.01 y [^{125}I]-UPC10. Este cociente indica cuántas veces el AMC se concentra en el tumor respecto de los diferentes órganos. Se observa que FC-5.01 presenta mayores cocientes tumor : órgano que la inmunoglobulina inespecífica UPC-10, la que presenta cocientes cercanos o menores que 1. Estos resultados muestran que la simple difusión de los anticuerpos radiomarcados no es suficiente para localizar los tumores, indicando que la acumulación de [^{125}I]-FC-5.01 en los mismos se debe a la unión específica del anticuerpo a las células tumorales.

En base a estos resultados se diseñó un experimento similar de biodistribución pero utilizando fragmentos $F(ab')_2$ y F(ab') obtenidos a partir de FC-5.01 por digestión con pepsina (Materiales y Métodos).

Estos fragmentos por tener menor peso molecular son capaces de penetrar más rápidamente los tejidos, alcanzando mayores cocientes tumor : órgano y en menor tiempo. La utilización de fragmentos de Ig tiene además la ventaja de no presentar unión inespecífica a tejidos y células circulantes que expresan

receptores de Fc, por carecer de dicha porción. Además, el clearance renal de estas moléculas es más eficiente comparado con la IgG entera, que es mayormente metabolizada por el hígado. De esta manera se disminuye el tiempo de exposición del organismo a la dosis de radioactivo inyectada.

En la **Figura 31 A** graficamos los cocientes tumor: órgano obtenidos para los fragmentos, comparando [^{125}I]-5.01 con [^{125}I]-UPC10, a lo largo del tiempo post-inyección (12, 24, 36, 48 y 72 hrs). Vemos que los fragmentos 5.01 se concentran paulatinamente en el tumor, obteniéndose cocientes más elevados que para los fragmentos de UPC10 (**Figura 31 B**).

Si comparamos los resultados obtenidos con FC-5.01 entero y sus fragmentos $F(ab')_2$ y F(ab') (**Tabla 17**), concluimos que estos últimos se concentran en los tumores más rápidamente que la Ig entera y que, si bien la retención total de radioactividad (% de DI/gr) es un orden de magnitud inferior para los fragmentos, los cocientes tumor:órgano aumentan considerablemente para todos los órganos, a excepción del riñón, debido a que la principal vía de eliminación de los mismos es renal.

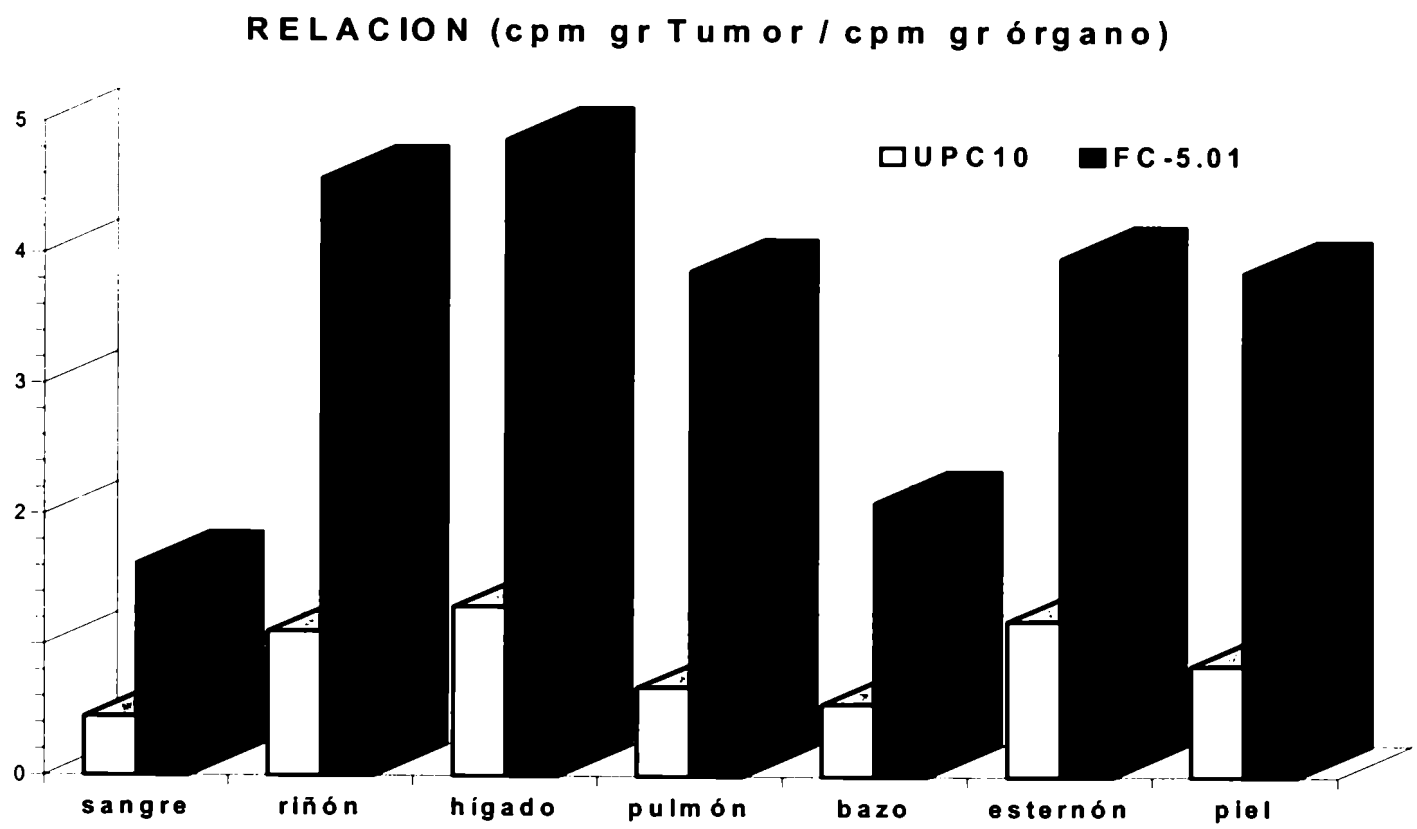
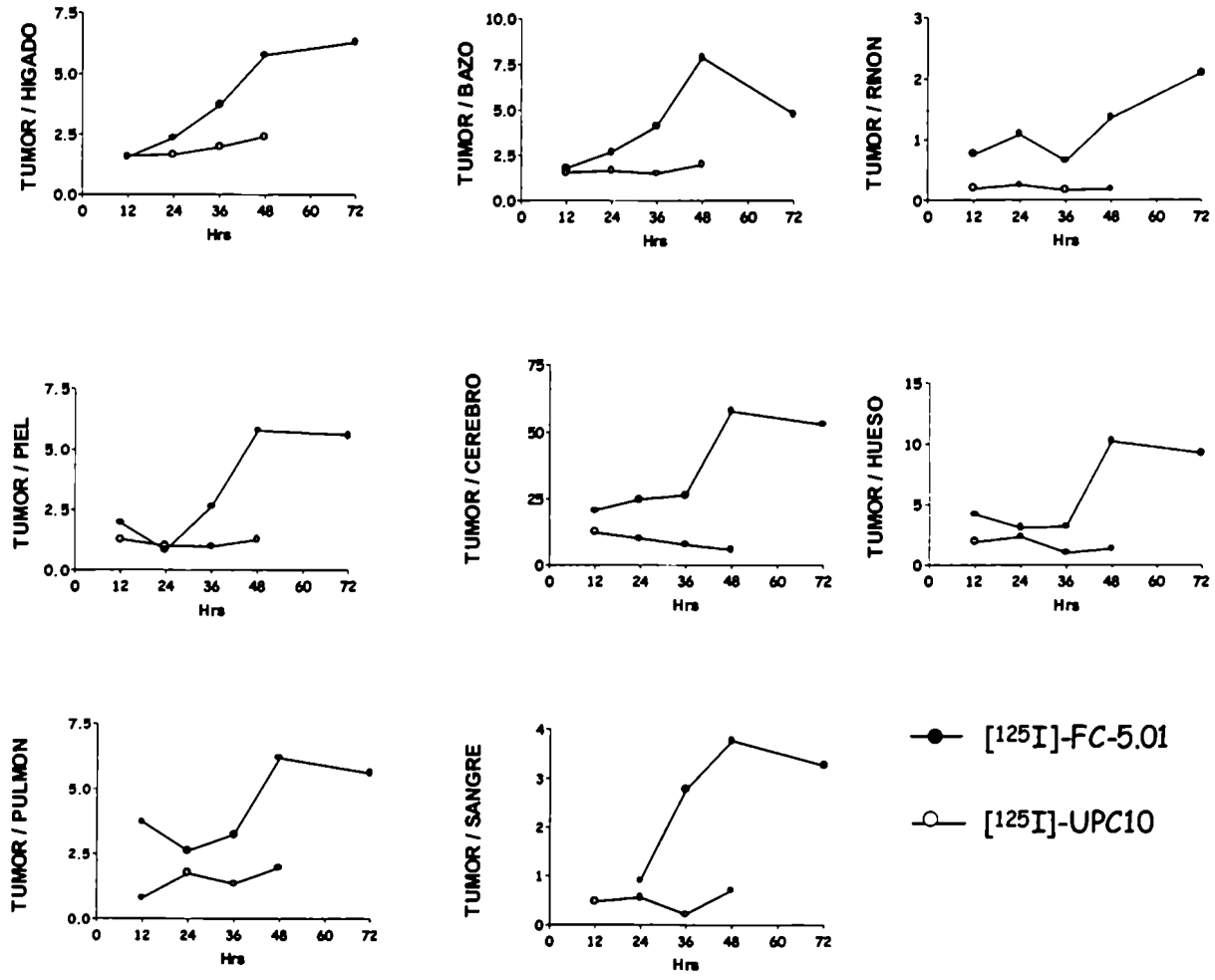


Figura 30: Biodistribución de [^{125}I]-FC-5.01 y [^{125}I]-UPC10 en ratones portadores de tumor IIB-BR-G $_{nude}$. Los cocientes Tumor : órgano se calcularon como se describe en Materiales y Métodos.

A



B

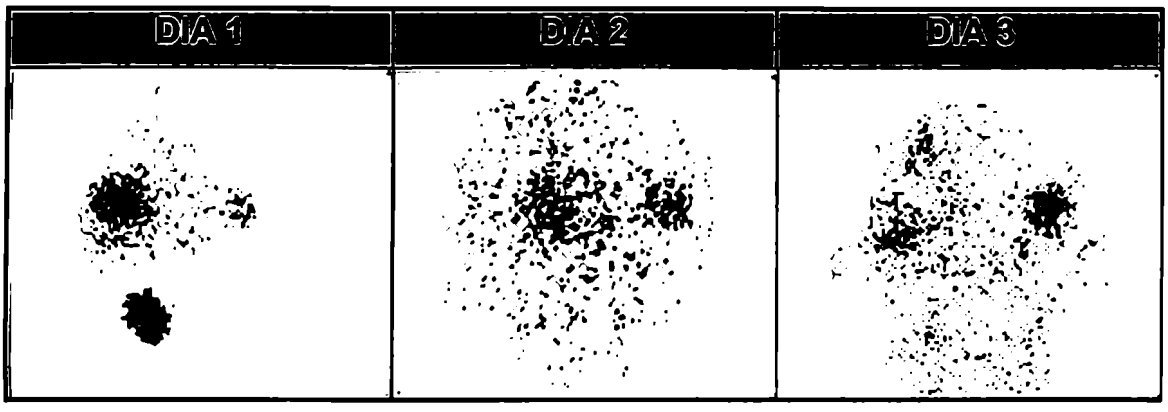


Figura 31: Radioinmunolocalización de tumores IIB-BR-Gnude con fragmentos F(ab')$_2$ y F(ab') FC-5.01 vs UPC10 marcados con [^{125}I]. A- Se grafican las relaciones de radioactividad tumor : órgano a distintos tiempos post-inyección. **B-** Imágenes en cámara γ de ratones inyectados con fragmentos [^{125}I]- 5.01.

Tabla 17: Radioinmunolocalización de tumores IIB-BR-Gnude con AMC FC-5.01 radiomarcado. Comparación entre inmunoglobulina entera y fragmentos obtenidos por digestión con pepsina.

TEJIDO	FC-5.01		F(ab')2 - F(ab')-5.01	
	% DI/gr *	TUMOR/ORG	% DI/gr	TUMOR/ORG
TUMOR	1.510 ± 0.50	1	0.173 ± 0.11	1
HIGADO	0.315 ± 0.12	4.87	0,030 ± 0.009	5.76
BAZO	0.725 ± 0.10	2.10	0.022 ± 0.002	7.86
PULMON	0.39 ± 0.18	3.87	0.028 ± 0.01	6.18
RIÑON	0.328 ± 0.14	4.57	0.128 ± 0.028	1.35
PIEL	0,395 ± 0.19	3.87	0.030 ± 0.008	5.77
CEREBRO	nd	nd	0.003 ± 0.001	57.7
HUESO	0.378 ± 0.23	3.97	0.017 ± 0.003	10.24
SANGRE	0.932 ± 0.44	1.62	0.046 ± 0.008	3.76
TIEMPO	8 DIAS		2 DIAS	

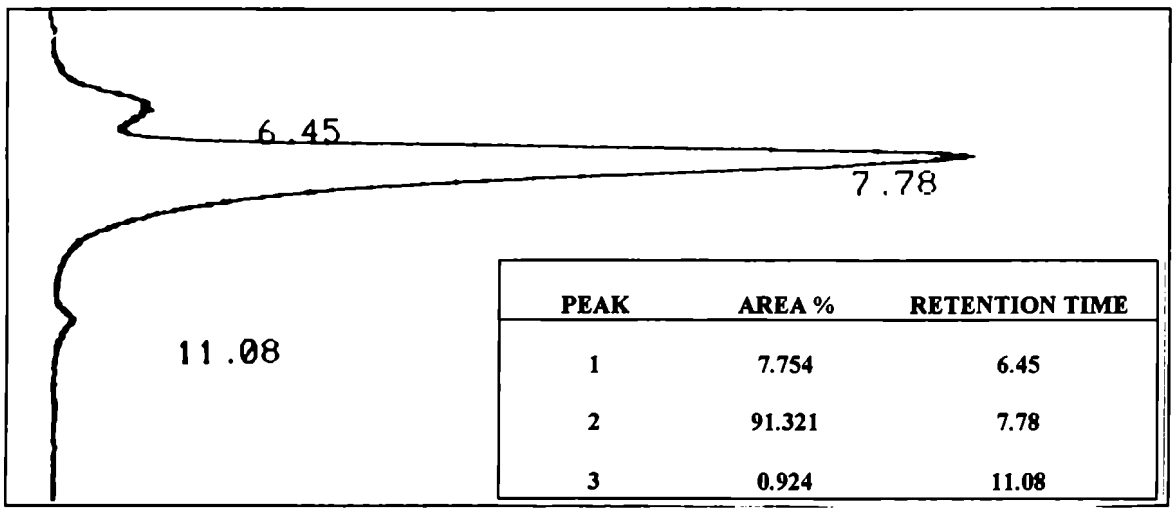
La relación Tumor : Órgano está expresada como el cociente cpm/g tumor : cpm/g órgano. Se comparan los tiempos de mayor radiolocalización en los tumores. Los resultados corresponden al promedio de 2 ratones ± SEM.

Por éstos resultados concluimos el AMC FC-5.01 inyectado en forma intraperitoneal llega y se fija específicamente en los tumores IIB-BR-G_{NUDE}, lo que permite la detección de los mismos por imágenes en cámara γ, y que la RID resulta más eficiente con los fragmentos de Ig, que con FC-5.01 entero, ya que éstos se concentran más en los tumores y a menor tiempo post-inyección.

b) AMC FC-5.01 marcado con [^{99m}Tc]: Debido a la utilidad del [^{99m}Tc] para la adquisición de imágenes en cámara γ, investigamos la marcación del AMC FC-5.01 con [^{99m}Tc] por medio de un método en un sólo paso para obtener un kit para RID de tumores. Este tipo de marcación podría resultar útil, en el futuro, para marcar similarmente el AMC con otros isótopos como el [^{186}Re] or [^{188}Re],

con las debidas modificaciones de la técnica, dadas las semejanzas en las propiedades químicas del [Re] y el [^{99m}Tc].

Adaptando el método de Mather y Ellison [1990], como se describe en Materiales y Métodos, se preparó un kit de marcación instantánea luego de la reducción controlada del AMC con 2-ME. Se obtuvo el mayor porcentaje de [^{99m}Tc] incorporado a FC-5.01 utilizando una relación molar 1000 : 1 (AMC : 2-ME). La eficiencia de radiomarcación evaluada por medio de ITLC (Instant Thin Layer Chromatography) y HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) resultó siempre superior al 90 % en esas condiciones. En la **Figura 32** se observa un ejemplo de perfil cromatográfico en HPLC de una reacción de marcación, donde el pico que eluye a los 7.78 min representa [^{99m}Tc]-FC-5.01 (91%), el pico que eluye a los 6.45 min, los agregados marcados (7.7%) y el tercer pico, al [Tc] libre y al MDP marcado (<1%).



PEAK	AREA %	RETENTION TIME
1	7.754	6.45
2	91.321	7.78
3	0.924	11.08

Figura 32: Eficiencia de radiomarcación de [^{99m}Tc]-FC-5.01. Análisis de los productos de marcación de un kit por HPLC (columna de exclusión). Los valores obtenidos para cada pico se muestran el inserto (área bajo el pico y tiempo de retención en la columna).

En cuanto a la estabilidad de la marcación, luego de 24 hs de incubación en suero humano fresco a 37 °C, no se detectaron especies de bajo peso molecular por el ensayo de ITLC. La retención de la inmunoreactividad del AMC FC-5.01 radiomarcado se determinó sobre células IIB-BR-G, por medio del método de Lindmo [1984]. La fracción inmunoreactiva resultó del 83.3%.

También se realizó un ELISA sobre las mismas células con FC-5.01 reducido con 2-ME, encontrándose valores equivalentes de absorbancia respecto del AMC nativo (datos no mostrados). Se estudió la transquelación a cisteína, a 5 relaciones molares cisteína : AMC (rango= 908 : 1 a 0.45 : 1) y el porcentaje de disociación obtenido fue del 28 al 3.8 %, respectivamente.

Inyectando [^{99m}Tc]-FC-5.01 (400 μCi) en ratones *nude* normales y portadores de tumores IIB-BR-G_{nude}, se estudió la RID por medio de imágenes en cámara γ a las 6 y 24 hs post-inyección, así como por la biodistribución a las 24 hs. En la Figura 32 se observa que en un ratón inyectado con [^{99m}Tc]-FC-5.01 la radioactividad total decreció a lo largo del tiempo y que el tumor se evidencia claramente a las 24 hs, sin necesidad de sustraer, con asistencia computarizada de la imagen, la radioactividad del pool sanguíneo (**Figura 33**).

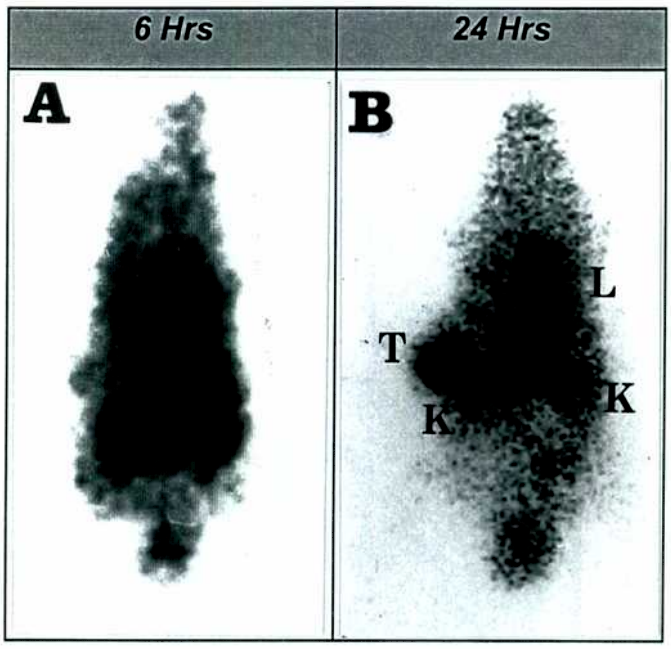


Figura 33: RID de tumor IIB-BR-G_{nude} con [^{99m}Tc]-FC-5.01.
Imágenes en Cámara γ (vista posterior) de un ratón portador de tumor, luego de la inyección i.v. de [^{9m}Tc]-FC-5.01. Se visualizan el tumor (T), riñones (K) y el hígado (L).

En la biodistribución (**Tabla 18**) observamos que la captación de [^{99m}Tc]-FC5.01 en los tumores alcanzó el 14 % de la DI/g.

Tabla 18: Biodistribución de [^{99m}Tc]-FC-5.01 en ratones normales y portadores de tumor IIB-BR-G_{nude}

Órgano	normales		IIB-BR-G_{nude}		
	% DI /g		% DI /g		Tumor / Organo
Sangre	6.4	(2.04)	12.0	(3.07)	1.20
Tumor			14.4	(5.28)	1.00
Hígado	2.4	(0.93)	3.4	(1.24)	4.23
Bazo	3.4	(1.07)	4.3	(0.95)	3.35
Pulmón	2.4	(0.65)	4.2	(1.42)	3.43
Intestino	0.9	(0.31)	1.8	(0.84)	8.00
Riñones	7.1	(2.36)	15.8	(4.90)	0.91

Cada valor representa el promedio del % DI /g (n=5) a las 24 hs post-inyección. Entre paréntesis ± SD.

De los resultados presentados concluimos que fue posible preparar un kit de marcación con [^{99m}Tc] en un solo paso, para el AMC FC-5.01. Así, luego del proceso de reducción, el anticuerpo puede ser alicuotado en dosis /paciente, liofilizado y almacenado a 4°C hasta su uso, por lo menos por 120 días. El AMC FC-5.01 puede ser radiomarcado por la simple adición de la actividad requerida de [^{99m}Tc] y una breve incubación de 10 min. Como ensayo preliminar de RID en pacientes con cáncer, se inyectó [^{99m}Tc]-FC-5.01 preparado a partir de un kit liofilizado (0.5 mCi), en dos pacientes portadores de melanoma metastásico y a las 24 hs se adquirieron imágenes en cámara γ. En uno de ellos fue posible detectar un ganglio axilar metastásico radiomarcado, cuya posición coincidió con una imagen previa obtenida por tomografía computada (**Figura 34**)

Figura 34: RID con [^{99m}Tc]-FC-5.01 en un paciente con metástasis de melanoma. La imagen fue captada a las 24 hrs post-inyección de [^{99m}Tc]-FC-5.01 Se indica con flechas la presencia de un ganglio metastásico que coincide con la imagen obtenida en la Tomografía Computada.

IV-3.-TRATAMIENTO DE TUMORES IIB-BR-G_{NUDE} CON FC-5.01 MARCADO CON [^{131}I]

Como demostramos anteriormente fue posible radioinmunodetectar tumores IIB-BR-G_{NUDE} usando FC-5.01 radiomarcado tanto con [^{125}I] como [^{99m}Tc], hecho que resultó específico ya que la inmunoglobulina control UPC-10 no se concentró en los tumores.

Con este modelo decidimos entonces estudiar si la administración de FC-5.01 marcado con un radionucleído citotóxico (Radioinmunoterapia, RIT) tenía algún efecto sobre el crecimiento de tumores ya establecidos. Para estos estudios elegimos el [^{131}I] debido a que la radiomarcación se podía realizar en idénticas condiciones a las ya utilizadas para [^{125}I] y porque éste, junto con el [^{90}Y], han sido ampliamente ensayados en el tratamiento de xenotransplantes humanos en ratones, así como en pruebas clínicas [Buchegger F, 1990; Sharkey R.M., 1988; Buchsbaum D.J., 1993; Press O.W., 1989; Behr T.M., 1996].

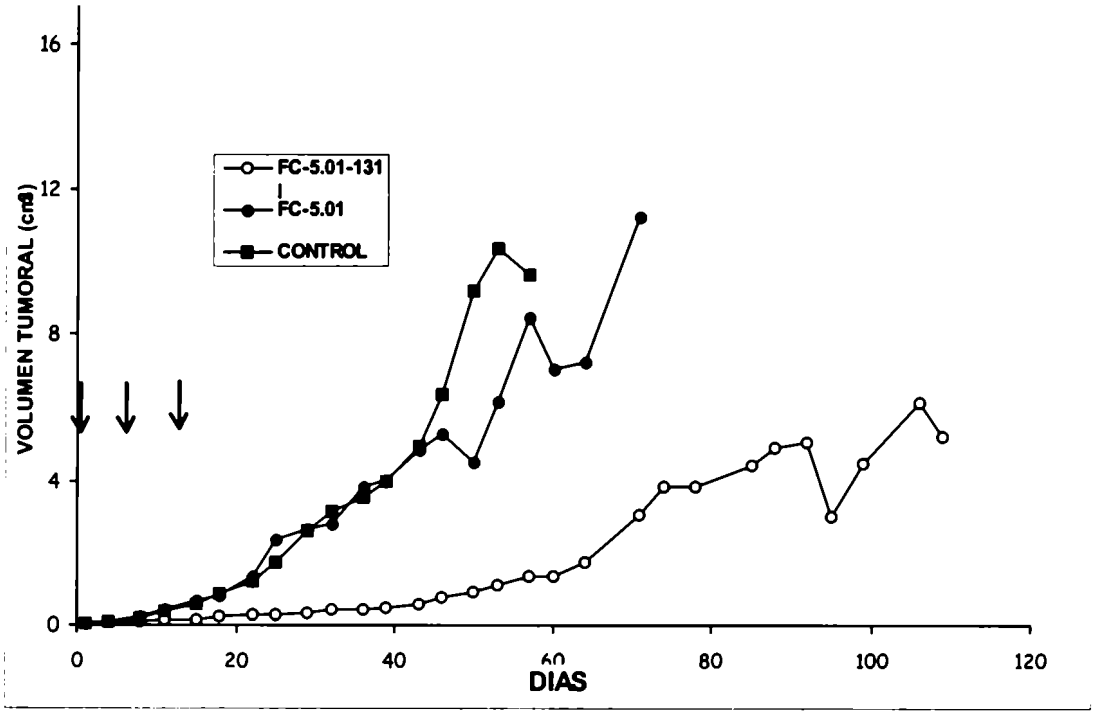
En diversos modelos de tumores sólidos creciendo en ratones nude se pudo observar inhibición del crecimiento tumoral con dosis tan bajas como 250 μCi de [^{131}I]-AMC [Lee Y-S, 1988] pero solo se registraron regresiones significativas con dosis de 500-1000 μCi [Buschbaum D, 1995], si bien a dichas dosis casi siempre se observó toxicidad hematológica en alrededor de 30% de los animales. Uno de los problemas para obtener curas por RIT es el límite de la dosis que se puede inyectar por la toxicidad en médula ósea. Se ha establecido que el fraccionamiento de la dosis en múltiples administraciones de [^{131}I]-AMC contra tumores sólidos, con un intervalo de 7 días o menos, produjo un efecto inhibitorio más prolongado y con menor toxicidad que una única administración [Schlom J, 1990; Buschbaum D J, 1990].

Como primer esquema de RIT elegimos la dosis total de 0.9 mCi fraccionados en 3 administraciones intraperitoneales (200 μCi, 350 μCi, 350 μCi), con un intervalo de una semana (Materiales y Métodos). La actividad específica promedio fue de 5.6 ± 2 μCi/μg FC-5.01 y en todos los casos el AMC radiomarcado inyectado presentó menos del 3% [^{131}I] libre determinado por cromatografía en papel (ver Materiales y Métodos). Los animales se dividieron

en tres grupos (Control, FC-5.01 no-marcado y [^{131}I]-FC-5.01) que portaban tumores IIB-BR-G_{NUDE} con volúmenes iniciales promedio de 69, 68 y 56 mm^3, respectivamente.

En la **Figura 35 A** y **B**, se observan los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento tumoral. Los tumores en el grupo Control crecieron rápidamente, alcanzando un tumor de 1 gr ($1cm^3$) a los 21 ± 5 días. El grupo tratado con FC-5.01 no-marcado siguió una cinética de crecimiento muy similar, alcanzando 1 gr de tumor a los 23 ± 8 días. Los ratones tratados con [^{131}I]-FC-5.01 a diferencia de los controles, presentaron una inhibición significativa del crecimiento tumoral y éstos comenzaron a crecer más tardíamente, alcanzando 1 gr recién a los 56 ± 16 días ($p<0.05$). No se observaron regresiones en los ratones tratados.

La inhibición del crecimiento fue transitoria, como se observa en la **Figura 36**. Luego de la primera inyección de [^{131}I]-FC-5.01 se registró una inhibición del crecimiento tumoral (% IC) del 40 y 48 %, respecto de los grupos Control y FC-5.01 no-marcado, respectivamente. La máxima inhibición observada fue del 87 %, pero luego de los 39 días los tumores comenzaron a crecer con una pendiente de crecimiento menor que ambos controles (0.079 ± 0.007 vs 0.185 ± 0.018). En la **Figura 36** se ilustran ejemplos de ratones del grupo Control y tratados con [^{131}I]-FC-5.01 a los 45 días, apreciándose no solo las diferencias de volumen tumoral sino también la presencia de metástasis muy evidentes en ganglios en algunos de los ratones Control.



B Curvas de crecimiento tumoral (individual)

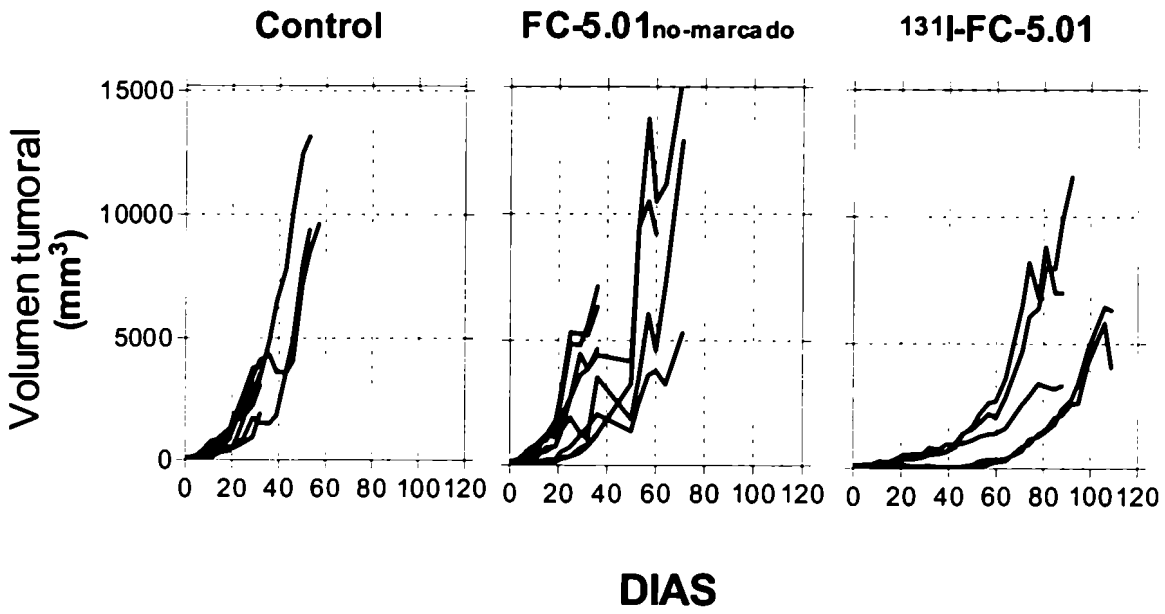


Figura 35: RIT de tumores IIB-BR-G_{NUDE} con [^{131}I]-FC5.01

A

DIA	% IC en tratados [^{131}I]-FC-5.01 respecto de	
	CONTROL	FC-5.01 no-marcado
8	40.0	48.4
15	69.9	70.1
22	71.3	74.3
29	84.0	84.7
36	85.4	86.6
43	85.4	81.2
50	87.7	ND*
57	82.6	80.5
64	-**	70.4
71	-**	66.7

* Las mediciones no se realizaron por ulceración de los tumores.

** Todos los ratones del grupo Control murieron a los 60 días.

B

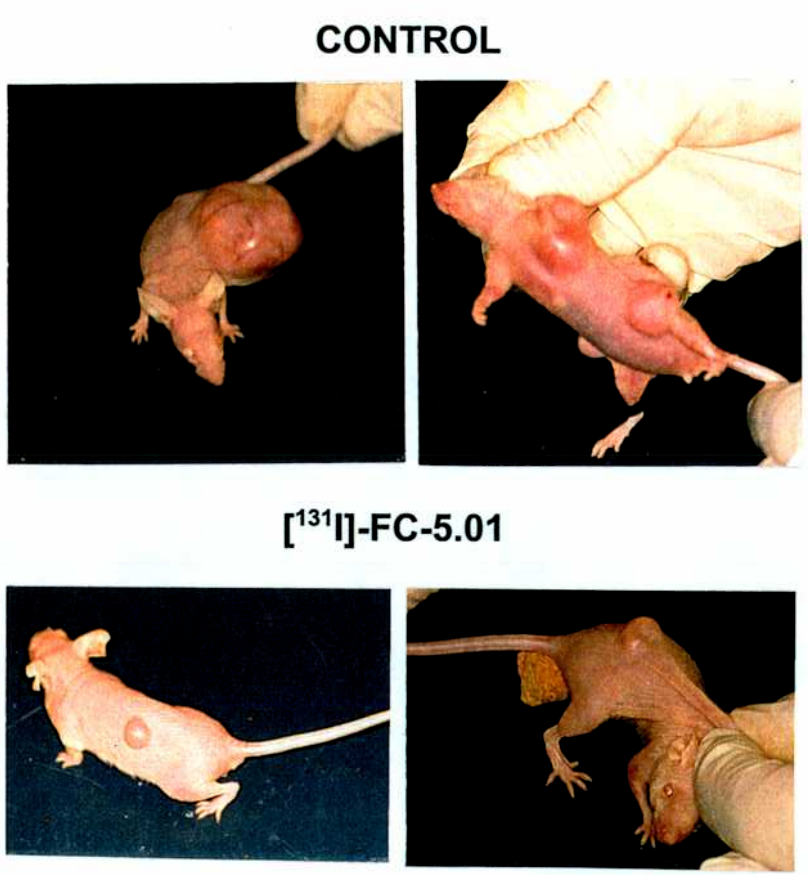


Figura 36: RIT de tumores IIB-BR-G_{NUDE} con [^{131}I]-FC-5.01

Para analizar la toxicidad en esta primer experiencia se registró el cambio de peso de los ratones en los distintos grupos hasta los 50 días después del inicio (**Figura 37**). La toxicidad observada en los animales tratados con [^{131}I]-FC-5.01 fue baja, ya que solo 1/6 ratones murió al día 18, presentando evidencias de caquexia (>15 % de pérdida del peso corporal al día 15, petequia cutánea). No fue posible fijar y analizar histológicamente éste ratón.

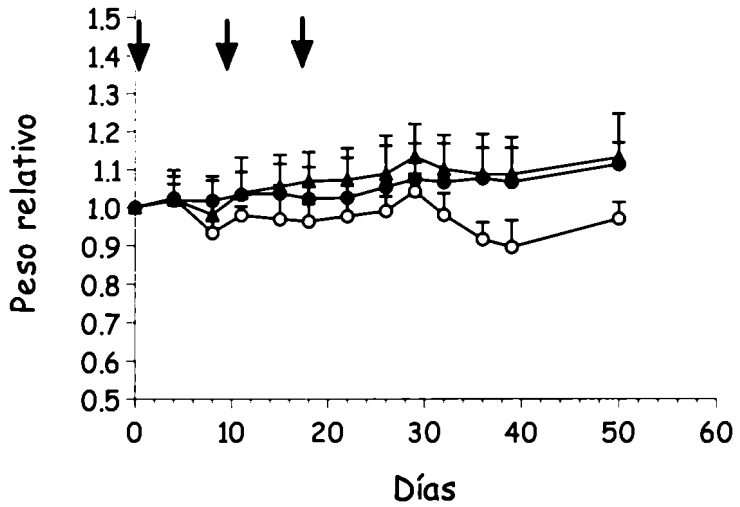


Figura 37: Toxicidad del tratamiento con[^{131}I]-FC-5.01.
Se grafica el peso promedio de los ratones relativo al peso inicial de los mismos. Los ratones fueron tratados con o [^{131}I]-FC-5.01, O FC-5.01 no-marcado ó ▲ Control. Las flechas indican la administración de las distintas inyecciones de anticuerpo.

La sobrevida de los ratones tratados con [^{131}I]-FC-5.01 fue mayor que la sobrevida de los ratones de ambos grupos control. En la **Figura 38** se muestra la curva de probabilidad de Kaplan Meier donde se observa que la sobrevida media del grupo Control fue de 36 días, la del grupo tratado con FC-5.01 no-marcado de 53.5 días y la de los ratones tratados con [^{131}I]-FC-5.01 alcanzó los 93 días. Las diferencias de probabilidad de sobrevida de los animales Tratados con anticuerpo radiomarcado fueron estadísticamente significativas respecto de ambos grupos Control (Logrank test, p= <0.05).

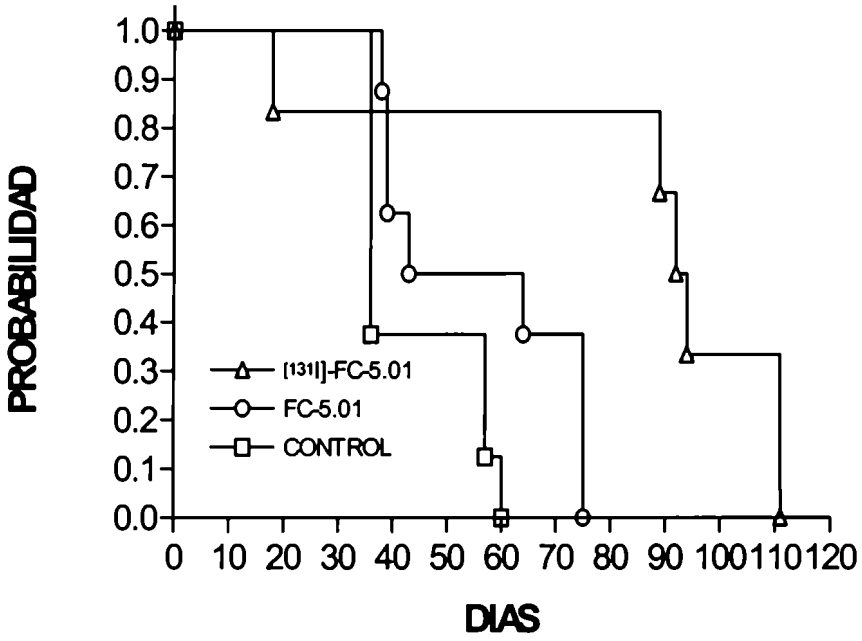


Figura 38: Sobrevida de los ratones tratados con [^{131}I]-FC-5.01.
Se calculó la sobrevida a partir del inicio del experimento; los tumores se transplantaron 12 días antes del inicio.

En este experimento, se analizaron histológicamente los órganos de los ratones que fueron sacrificados cuando se consideró que el animal estaba agonizante. Para los ratones Tratados con [^{131}I]-FC-5.01 esto implica que los tumores ya habían crecido a un tamaño comparable al de los grupos Control, por lo tanto no se pudieron observar diferencias en cuanto a la proporción de necrosis y porciones viables de los tumores. La IHQ con FC-5.01 reveló reacción positiva tanto para los tumores control como tratados (no-mostrado). Tampoco se observaron mayores diferencias en la frecuencia de aparición de metástasis espontáneas en ganglios linfáticos entre los tres grupos, aunque en los ratones Control (ambos grupos) éstas se visualizaron a los 43-46 días y en los ratones tratados recién a los 60-64 días.

En otro experimento, los ratones se trataron en forma similar al anterior experimento (grupo Control n= 10; grupo Tratado con [^{131}I]-FC-5.01 3 x 300 μCi n= 20) y se sacrificaron a tiempo más corto, con el objeto de evaluar en mayor detalle la posible toxicidad hematológica del tratamiento, así como analizar el aspecto de los tumores que estaban respondiendo a la terapia. Al momento del

sacrificio, se extrajo sangre por punción cardíaca para el recuento de leucocitos totales y se prepararon extendidos sanguíneos, los cuales se colorearon con Giemsa. Los ratones fueron fijados en formaldehído al 4% en PBS y los principales órganos, tumores y médulas óseas (esternón) analizados histológicamente como se describe en Materiales y Métodos.

En la **Figura 39** se observa que en los animales Tratados los tumores resultaron inhibidos significativamente en su crecimiento, en forma similar a la observada anteriormente, puesto que los tumores Control alcanzaron 1 gr a los 21 días y los tratados con [^{131}I]-FC-5.01 solo 0.085 gr (91.7% IC). Los animales se sacrificaron a los 15 días de finalizado el tratamiento (día 29).

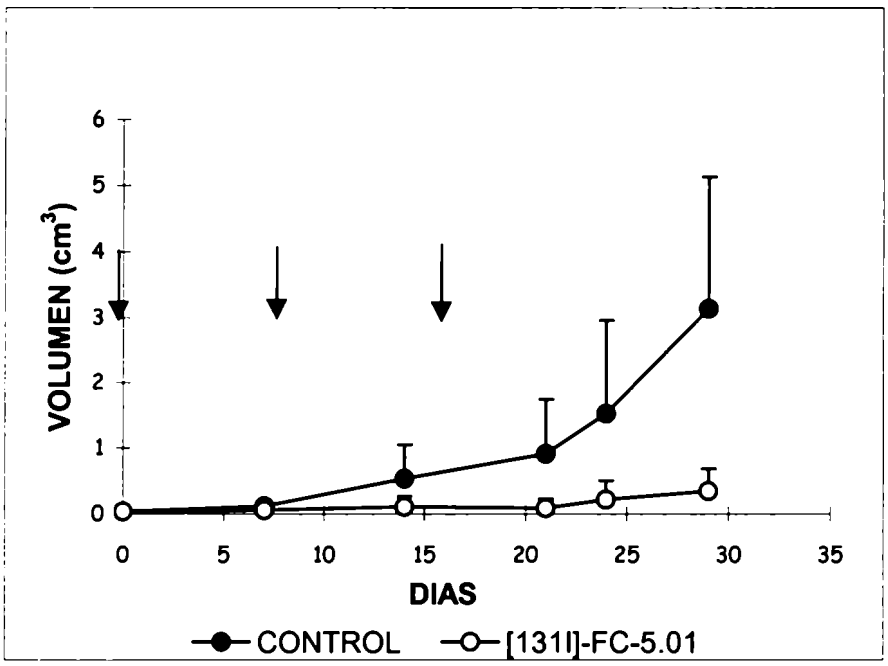


Figura 39: RIT de tumores IIB-BR-G$_{nude}$.
Curva de crecimiento tumoral vs tiempo.

El análisis histológico de los tumores (**Figura 40**) mostró que los del grupo Control poseían porciones viables muy extensas y vascularizadas, con gran

actividad mitótica, evidenciando la etapa de crecimiento exponencia. El centro de los tumores presentaba el aspecto típico de la necrosis, que siempre está presente en esa zona, por el rápido crecimiento periférico del tumor. Por el contrario, los pequeños tumores tratados con [^{131}I]-FC-5.01, apenas poseían una delgada capa de células viables, observándose algunos núcleos fragmentados y con condensación de la cromatina e infiltrado de polimorfonucleares. Se observa gran necrosis central, incluso cercana a los bordes tumorales.

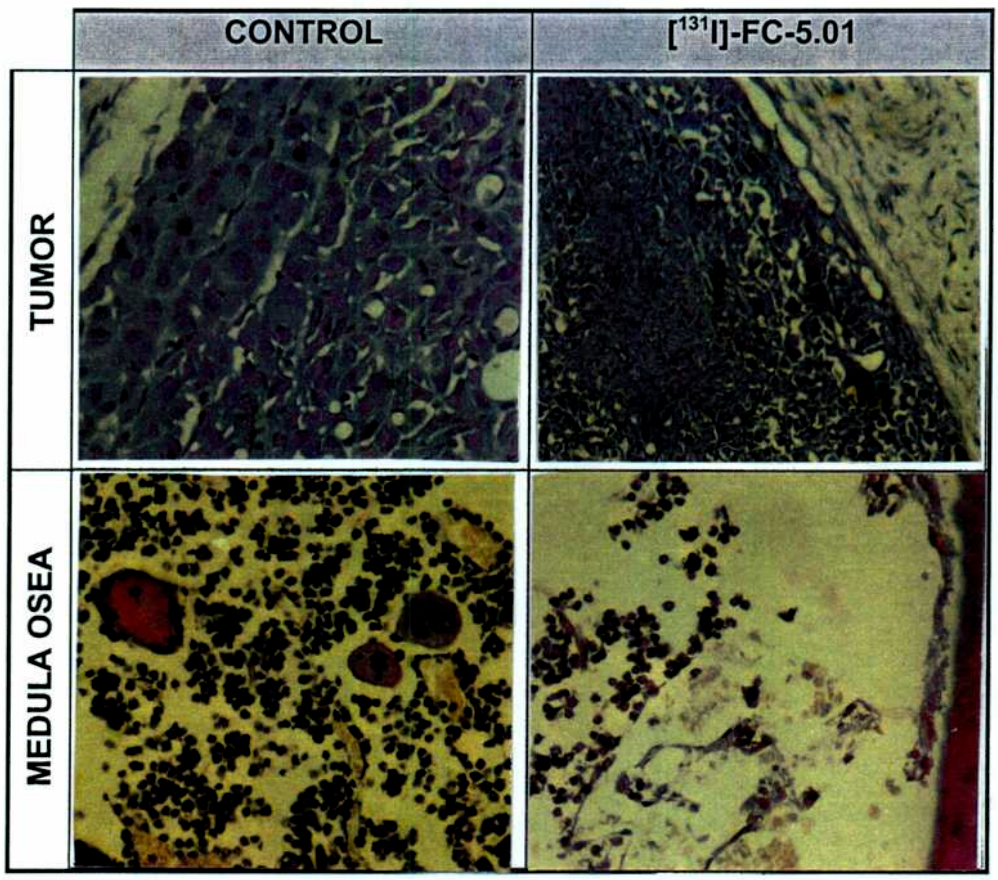


Figura 40: Análisis histopatológico de los tumores y médulas óseas en el experimento de RIT. Aumentos: Tumores: Control 400=; Tratado= 200 X ; Médulas óseas= 200 X

El recuento de leucocitos totales reveló que la mayoría de los ratones tratados con [^{131}I]-FC-5.01 presentaba leucopenia respecto de los animales Control. Está descripto que para los ratones nude, el número de leucocitos totales es variable dentro del rango (5000-18000) [Antoniew P., 1996]. Como se observa en la **Tabla 19**, **experimento 1**, 5/8 animales tratados con RIT, analizados a los 29 días, mostraron marcada neutropenia. La toxicidad hematológica también se evidenció en los cortes de MO (análisis del esternón), ya que casi todos los animales Tratados presentaron una clara hipoplasia mientras que los animales del grupo Control tenían una médula normo-celular, con las tres series progenitoras presentes (**Figura 40**). El recuento de los frotis realizados no evidenció diferencias en la formula sanguínea relativa entre los ratones Control y Tratados.

A partir de éstos resultados decidimos realizar un nuevo experimento reduciendo la dosis terapéutica total de [^{131}I]-FC-5.01 a 600 μCi/ratón fraccionados en tres inyecciones de 200 μCi con un intervalo de 7 días. Además incluímos 2 grupos más, tratando los ratones con un factor estimulador de la médula ósea (ver **Discusión**), con el objeto de disminuir la toxicidad hematológica. Utilizamos G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) recombinante humano, que es reconocido por el receptor correspondiente murino, altamente homólogo a su contraparte humana [Nagata S., 1990]. La administración se hizo durante 10 días, comenzando al día siguiente de la segunda dosis con el objeto de cubrir el período en que los animales poseen la mayor dosis acumulada de radiactividad. Se calculó una dosis equivalente a la utilizada en pacientes como tratamiento adyuvante en la radioterapia (0.5 μg/ratón/día).

En este experimento se utilizaron 8 ratones por grupo y nuevamente los ratones Tratados con [^{131}I]-FC-5.01 presentaron inhibición transiente del crecimiento tumoral respecto de los ratones Control (67%, a los 21 días), aunque a los 30-35 días desde el inicio del tratamiento, los tumores retomaron el crecimiento exponencial (**Figura 41**).

ratón	Experimento 1		Experimento 2			
	CONTROL*	[^{131}I]-FC-5.01	CONTROL	+ G-CSF	[^{131}I]-FC-5.01	[^{131}I]-FC-5.01 + G-CSF
1	6675	3675	11.175 ± 2.470	27.100 ± 1.540	11.700 ± 1940	1.275 ± 330**
2	4600	2675	14.420 ± 1.410	42.800 ± 7.980	3.075 ± 84**	4.500 ± 816
3	4475	29850	69.200 ± 3.390	44.300 ± 15.400	1.800 ± 95**	5.125 ± 170
4	14300	150**	18.550 ± 1482	26.000 ± 2400		15.325 ± 880
5		350**				
6		875**				
7		550**				
8		100**				
Hipoplasia médula ósea	0/4	7/8	0/4	0/4	2/3	0/4

Tabla 19: Toxicidad hematológica de ratones portadores de tumor IIB-BR-G_{nude} tratados con [^{131}I]-FC-5.01 . * se analizaron 4 ratones Control; ** se considera leucopenia. En el experimento 1 los animales se analizaron a los 29 días; en el experimento 2 a los días 42-48 desde el inicio del experimento.

En el grupo Tratado con [^{131}I]-FC-5.01 + G-CSF, la inhibición fue aún más marcada (82.3 %, a los 21 días) y por más tiempo ya que para los 48 días todavía se mantenía 71.4 % de inhibición de crecimiento tumoral.

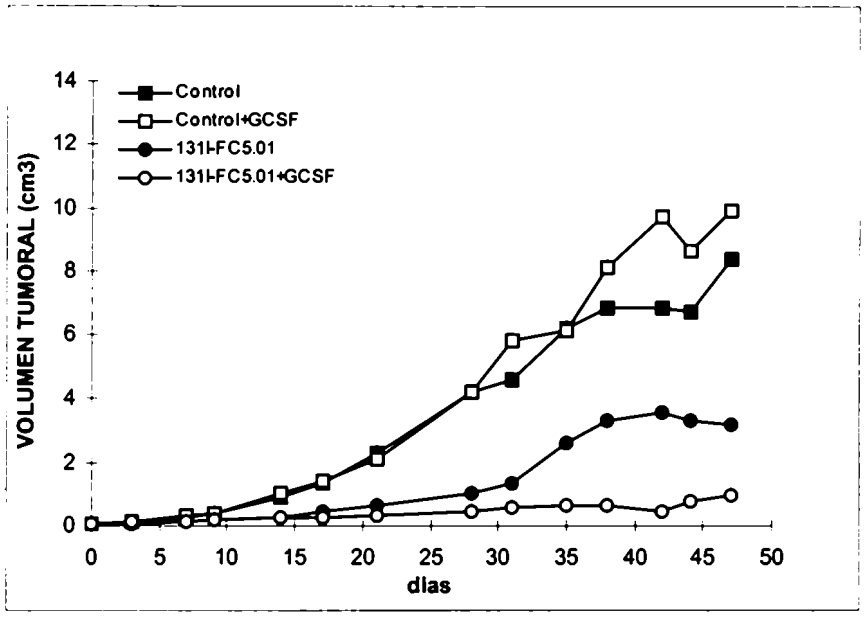


Figura 41: RIT de tumores IIB-BR-G$_{nude}$ (3 x 200 μCi +/- G-CSF)
Los volúmenes tumorales se calcularon como se describe en Materiales y Métodos. En todos los grupos n= 8 ratones.

Los ratones se sacrificaron entre los 42 y 48 días, cuando las diferencias de volumen tumoral de los ratones Tratados y Control era aún significativa, y se analizó la toxicidad como en el experimento anterior. Al momento del sacrificio, algunos de los tumores Tratados tenían volúmenes menores a 0.5 cm^3.

La neutropenia e hipocelularidad de la médula ósea en los animales tratados con [^{131}I]-FC-5.01 fue reducida por el tratamiento con G-CSF. En la **Tabla 19, (Experimento 2)** se observa que el número de leucocitos totales resultó restablecido en los ratones tratados con RIT y que recibieron G-CSF, respecto de aquellos que solo recibieron RIT. Además de los recuentos de leucocitos se observó, en algunos animales que recibieron la droga, hiperplasia de la pulpa blanca del bazo.

En este experimento, fue posible evaluar la aparición de metástasis (mts) pulmonares o en ganglios linfáticos, en los ratones Control y Control + G-CSF, ya que a los 48 días se observó mayor frecuencia de mts en estos grupos respecto de los grupos Tratados con anticuerpo radiomarcado **(Tabla 20).** Probablemente, la aparición de mts. esté directamente relacionada con el mayor volumen alcanzado en los tumores primarios de los ratones no tratados, ya que se ha observado que los tumores IIB-BR-G_{NUDE} generan metástasis cuando el mismo supera los 3 cm^3. Es decir que la inhibición del crecimiento tumoral debida a la administración de también evitó la aparición de mts.

La histología de los tumores mostró nuevamente que los tumores tratados poseían áreas viables muy escasas mientras que los tumores control presentaron un centro necrótico y una gruesa franja de tumor en crecimiento exponencial en la periferia (no mostrado).

Tabla 20: Aparición de mts espontáneas en ratones portadores de tumor IIB-BR-Gnude tratados con [^{125}I]-FC-5.01.

GRUPO	Mts. ganglio*	Mts. pulmonar**
CONTROL	4/8	2/5
G-CSF	5/8	2/5
[^{125}I]-FC-5.01	1/8	0/3
[^{125}I]-FC-5.01 + G-CSF	0/8	0/4

*= observables macroscópicamente; **= analizados por histología

DISCUSIÓN

A pesar de que se demostró que la sobreexpresión de CD63 en células de ratón NIH-3T3 transformadas con genes H-*ras*, está asociada a la supresión del crecimiento en ratones nude [Hotta H., 1991], los tumores IIB-BR-G_{NUDE} expresan dicho Ag en casi el 100% de las células y son capaces de crecer subcutáneamente en ratones atímicos y dan lugar a metástasis espontáneas [Bover L., 1998]. Radford y colaboradores encontraron un efecto similar de disminución de crecimiento *in vivo*, en células de melanoma transfectadas con CD63 y observaron menor número de metástasis experimentales por inyección intravenosa, respecto de las células CD63-. Sin embargo las metástasis generadas en los ratones nude portadores de tumor IIB-BR-G_{NUDE}, expresan el Ag CD63 (detectado por IHQ con FC-5.01), así como las sublíneas derivadas por transplante sucesivo de las metástasis en ganglios linfáticos [Bover L., 1998].

Los datos de RID obtenidos con [^{125}I]-FC-5.01 en el modelo IIB-BR-G_{NUDE} demostraron acumulación significativa y específica en los tumores alrededor de los 5-7 días post-inyección intraperitoneal. También se observó que con fragmentos $F(ab')_2$ de FC-5.01 las relaciones Tumor:órgano eran superiores.

Las propiedades únicas del [^{99m}Tc], tales como la dosimetría de baja radiación, bajo costo, corta vida media y excelentes características de las imágenes detectadas por SPECT (single-photon emission computed tomography) han sido ampliamente explotadas. Debido a su rápido clearance sanguíneo y cinética de localización, el [^{99m}Tc] parece ser el radionucleído de elección para RID, y varios AMCs marcados con [^{99m}Tc] se han usado para detectar tumores con alta sensibilidad [Goldemberg D.M., 1992; Beatty J.D.,1989].

Uno de los objetivos de esta parte del trabajo consistió en la evaluación de la marcación directa del AMC FC-5.01 con [^{99m}Tc], usando 2-ME como agente reductor, por medio del método de Mather y Ellison [1991]. Los métodos directos hacen uso de los sulfhidrilos endógenos, generados por reducción del anticuerpo, para unir establemente el tecnecio reducido. Este tiol ha sido utilizado

ampliamente para las marcaciones con [^{99m}Tc] [Schwarz A., 1987]. La principal ventaja del método directo de marcación es su simplicidad. En los métodos indirectos el [^{99m}Tc] se une a través de un agente quelante de síntesis compleja y requiere la purificación del radioconjugado posterior a la radiomarcación. La eficiencia de radiomarcación obtenida con el método de 2-ME (> 90%) nos permitió formular un kit en un solo paso. Luego de una reducción en batch, y las adiciones de componentes químicos, el AC puede ser alicuotado en dosis/paciente, liofilizado y conservado a 4°C por lo menos por 120 días. FC-5.01 se puede marcar por la simple adición de la actividad requerida de [^{99m}Tc] seguida de una breve incubación de 10 min. No se observó pérdida significativa de la inmunoreactividad dentro del período de 120 días.

Se realizaron biodistribuciones e imágenes en cámara γ de ratones portadores de tumor IIB-BR-G_{NUDE} y ratones normales. Los xenotransplantes pudieron ser claramente localizados usando [^{99m}Tc]-FC-5.01 obteniéndose más de un 14 % DI/gr tumor. Los cocientes tumor : órganos fueron superiores a 1 a excepción de tumor : riñón fueron (0.91), datos consistentes con lo observado en las imágenes de inmunocentellográficas.

Hnatowich y colaboradores [1993] demostraron la existencia de un mecanismo *in vivo* de transquelación del [^{99m}Tc] unido a los AMCs a cisteína endógena y que los altos niveles de radioactividad encontrados en el riñón en las biodistribuciones probablemente se deban a la retención de la cisteína marcada que es eliminada por éste órgano. *In vivo* la concentración de cisteína es menor a 1mM, y en esas condiciones (desafío con cisteína) $\leq$ 10 % del [^{99m}Tc] es removido del FC-5.01 radiomarcado. Se asume que cuanto mayor sea la resistencia al desafío con cisteína mayor será el tiempo de residencia del compuesto radiomarcado en sangre [Zamora P.O., 1993]. Por lo tanto el nivel de radioactividad observado en la biodistribución de [^{99m}Tc]-FC-5.01 (**Tabla 18**) probablemente represente la acumulación de cisteína marcada, eliminada a través de este órgano. El procedimiento establecido para radiomarcar FC-5.01 con [^{99m}Tc] podría ser

utilizado, con algunas modificaciones, para marcar este AMC con [^{186}Re] o [^{188}Re], debido a las similitudes en las propiedades químicas del [^{99m}Tc] y estos isótopos.

Este kit de AMC FC-5.01 puede resultar en el futuro una herramienta útil para la detección de tumores en pacientes con melanoma y otras neoplasias. De hecho, resultados preliminares de RID demostraron en un paciente con melanoma metastásico la capacidad de [^{99m}Tc]-FC-5.01 para localizar depósitos metastásicos en ganglios. **Ampliando el número de pacientes analizados por RID, se podrá evaluar el uso de éste AMC en RIT, especialmente para melanoma, donde las opciones terapéuticas son todavía escasas.**

En contraste a lo que sucede en los tejidos normales, muchos tumores malignos contienen una alta proporción de células muertas o en proceso de destrucción. La pérdida de integridad de la membrana que acompaña la degeneración celular permite que las macromoléculas, incluídos los AMCs, entren libremente al citoplasma. Desde este punto de vista, se puede plantear la hipótesis de que AMCs dirigidos contra Ags intracelulares podrían ser seleccionados como blanco para la terapia antitumoral [Chen F-M., 1989]. Además, la internalización de complejos Ag-AMC desde la superficie celular y la posterior re-expresión del Ag en la membrana plasmática podría contribuir a un aumento de la cantidad de AMC retenido en la zona del tumor. Teniendo en cuenta estos conceptos, el Ag CD63 podría ser utilizado como blanco para la RIT con [^{131}I]-FC-5.01. No es necesario que los AMCs radiomarcados sean internalizados, ya que ejercen su efecto tóxico a distancia en células adyacentes. Sin embargo, en el caso de AMCs que se internalizan, es necesario elegir cuidadosamente el radionucleído a usar. Por ejemplo el [^{111}In] o [^{90}Y] que tienden a ser retenidos dentro de las células una vez internalizados, serían preferibles a aquellos que tienen un tiempo de residencia más corto, como el [^{131}I]. También radionucleídos como [^{125}I] (captura electrónica) o [^{212}Bi] (emisores α) podrían ser utilizados para radiomarcar AMCs internalizables.

Los modelos animales han sido útiles para estudiar la localización, biología y farmacocinética *in vivo* de la RIT [Buschbaum D.J., 1995; Aas M., 1993]. Sin embargo, la extrapolación desde los modelos animales al hombre está limitada primariamente por el tamaño relativamente pequeño y el menor volumen de distribución en los animales (especialmente en roedores), lo cual afecta significativamente el % de la DI/gr del AMC radiomarcado en el tumor, y la vida media en el plasma [Wahl R.L. , 1994], entre otros factores. De todos modos, a pesar de las limitaciones, los modelos animales son todavía útiles y necesarios para evaluar muchos de los parámetros relativos a la aplicación de RIT antitumoral, especialmente la toxicidad en tejidos normales.

Los estudios preliminares de RIT con [^{131}I]-FC-5.01 resultaron alentadores por cuanto, en tres experimentos independientes, fue posible observar una inhibición significativa del crecimiento de tumores humanos IIB-BR-G$_{NUDE}$ establecidos. Sin embargo no se observaron regresiones tumorales y el efecto solo fue transitorio. La repoblación de los tumores luego del período de inhibición no se debió a la selección de células tumorales CD63 -, puesto que los tumores que progresaron expresaron el Ag, sino que probablemente, el tratamiento no eliminó todas las células tumorales iniciales.

Se eligió el fraccionamiento de la dosis (0.9 mCi) en tres inyecciones semanales, debido a que reportes de la bibliografía mostraron que el fraccionamiento resulta en menor toxicidad hematológica y mayor eficacia terapéutica que las dosis únicas [Schlom J., 1991]. Sin embargo, en el segundo experimento, la toxicidad hematológica fue considerable. Con el agregado de un factor estimulador de progenitores de MO (G-CSF) pudimos observar una mejora en la toxicidad debida al tratamiento con [^{131}I]-FC-5.01. Se ha reportado que el uso de factores estimuladores de progenitores hematopoyéticos ha acelerado la recuperación hematológica luego de la RIT y por lo tanto ha permitido el incremento de las dosis suministradas [Sharkey R.M., 1990].

Estos resultados son preliminares ya que sólo indican una tendencia favorable del tratamiento con [^{131}I]-FC-5.01 sobre el crecimiento de los tumores IIB-BR-G_{NUDE}. Las variables a estudiar son muchas y debemos evaluar todavía numerosos aspectos para determinar la eficacia de este tratamiento sobre el crecimiento de tumores CD63+. Entre ellos podemos citar:

- Determinar la dosis máxima tolerada (MTD), es decir la dosis máxima que resulta en mortalidad nula y la medición de la dosimetría en los tumores y principales órganos vitales.

- Planeamos ensayar un fraccionamiento más frecuente de la dosis (3, 5 días), así como también la administración del AMC radiomarcado en dos cursos (fraccionados) separados de un intervalo de 25-30 días, para eliminar las células residuales que pudieran sobrevivir al primer curso.

- Evaluar si el uso de factores estimuladores de progenitores de MO tiene incidencia en la sobrevida de los animales tratados. Estos factores (G-CSF, GM-CSF) son utilizados corrientemente en protocolos de radioterapia (RT) y RIT en humanos y han demostrado disminución de la toxicidad letal en dichos tratamientos [Sharkey R.M., 1990].

- Una vez elegido el esquema y dosis de tratamiento que produzca un resultado óptimo para controlar el crecimiento tumoral, debemos realizar un control de especificidad, utilizando una Ig de igual isotipo (UPC-10) marcada y administrada en idénticas condiciones.

- El uso de combinaciones de RT, quimioterapia y RIT también debe considerarse, por cuanto se han reportado algunos resultados favorables de dichas combinaciones. Podemos citar, por ejemplo por la combinación de 5-Fluorouracilo y [^{131}I]-AMC A33 contra cáncer de colon [Tschmelitsch J., 1997] y el uso de

esquemas de RT +RIT en pacientes con linfoma no - Hodgkin [Moskowitz CH, 1998].

CAPÍTULO V

CAPÍTULO V: CLONADO Y SECUENCIACIÓN DE REGIONES VARIABLES DE FC-5.01.

INTRODUCCIÓN

Como ya hemos mencionado en la Introducción General, la aplicación de AMCs murinos con fines terapéuticos en seres humanos produce consecuentemente el desarrollo de una respuesta HAMA (human anti-mouse antibodies) que puede no sólo limitar la administración de repetidos cursos de inmunoterapia por el peligro de una reacción inmunológica indeseable de anafilaxis, sino también neutralizar la acción antitumoral del AMC inyectado. Desde hace varios años se ha intentado inhibir la respuesta HAMA en pacientes tratados con inmunoterapia mediante el uso de agentes inmunosupresores [Lederman J.A., 1991] o fundamentalmente con la utilización de construcciones de moléculas quiméricas humano-murinas que portan las regiones variables del AMC de ratón y las porciones constantes humanas [Reichmann L., 1988; Orlandi R., 1992] o las versiones humanizadas, en las que los CDRs murinos están 'injertados' en moléculas de Ig humana.

Como primer paso para la preparación de una quimera murina-humana del AMC FC-5.01, que pudiera ser aplicada para terapia anti-tumoral en humanos en el futuro, encaramos el clonado y secuenciación de las regiones variables del anticuerpo.

V-1.- AMPLIFICACIÓN DE REGIONES VARIABLES DE LA CADENA PESADA Y LA CADENA LIVIANA DE AMC FC-5.01

Las secuencias codificantes para las regiones variables de las cadenas liviana y pesada de FC-5.01 fueron amplificadas por RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction), a partir del ARN total del hibridoma productor (2^{do} clonado). Primero se sintetizaron los ADNs complementarios (cADN) con RT (reverse transcriptase) utilizando uno de los oligonucleótidos del par empleado posteriormente. Luego se amplificaron las porciones variables por PCR con oligonucleótidos específicos diseñados para flanquear dichas regiones

[Bestagno M., 1993]: en un extremo, complementarios al límite de la región constante/variable (que presenta secuencias conservadas) y en el otro, complementarios a los extremos de las regiones variables, en el péptido señal, lejos de los CDRs (complementary determining regions), donde existen secuencias comunes a casi todas las familias de anticuerpos (**Figura 42**).

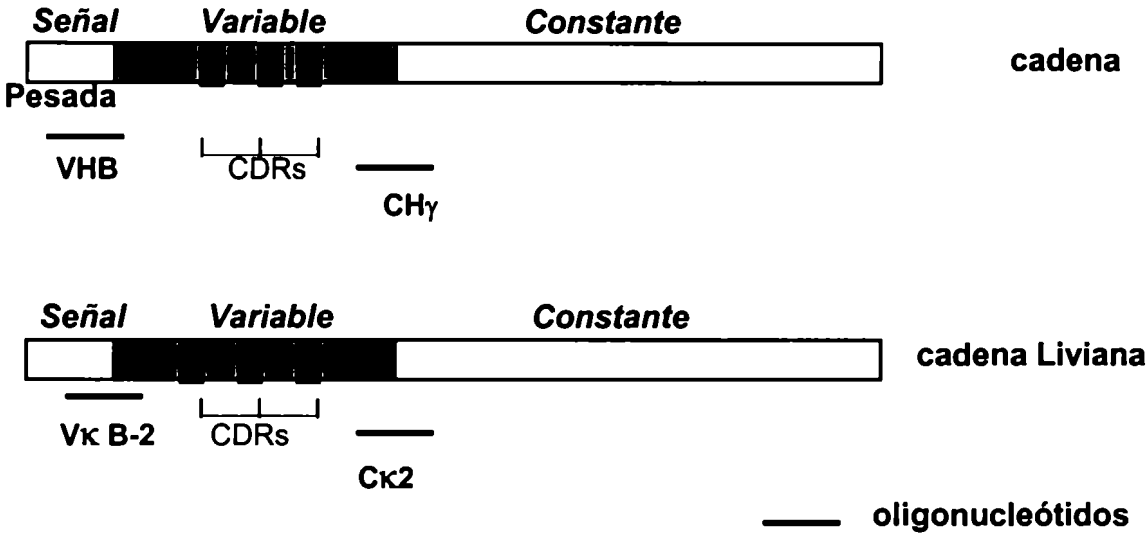


Figura 42: Estrategia de amplificación de regiones variables de Ig por RT-PCR

La reacción de PCR rindió productos de amplificación con una longitud aproximada de 350 pares de bases (pb) para la cadena liviana y 390 pb para la cadena pesada (**Figura 43 A**). En las muestras control (en ausencia de ARN del hibridoma), no se observó amplificación con ningún par de primers.

Por medio de un ensayo de Northern Blot del ARN del hibridoma hibridizado con el fragmento amplificado de la cadena pesada, marcado radioactivamente, se corroboró que el ARNm detectado posee el tamaño esperado para el transcripto citoplasmático de cadena pesada de Ig (H ARNm), de aproximadamente 1.8 kb (**Figura 43 B**). En el mismo Northern Blot se detectan también bandas más débiles, que podrían corresponder a los transcriptos primarios (intermediarios nucleares) de mayor tamaño [Schibler U., 1978], ya que se analizó una muestra de ARN total.

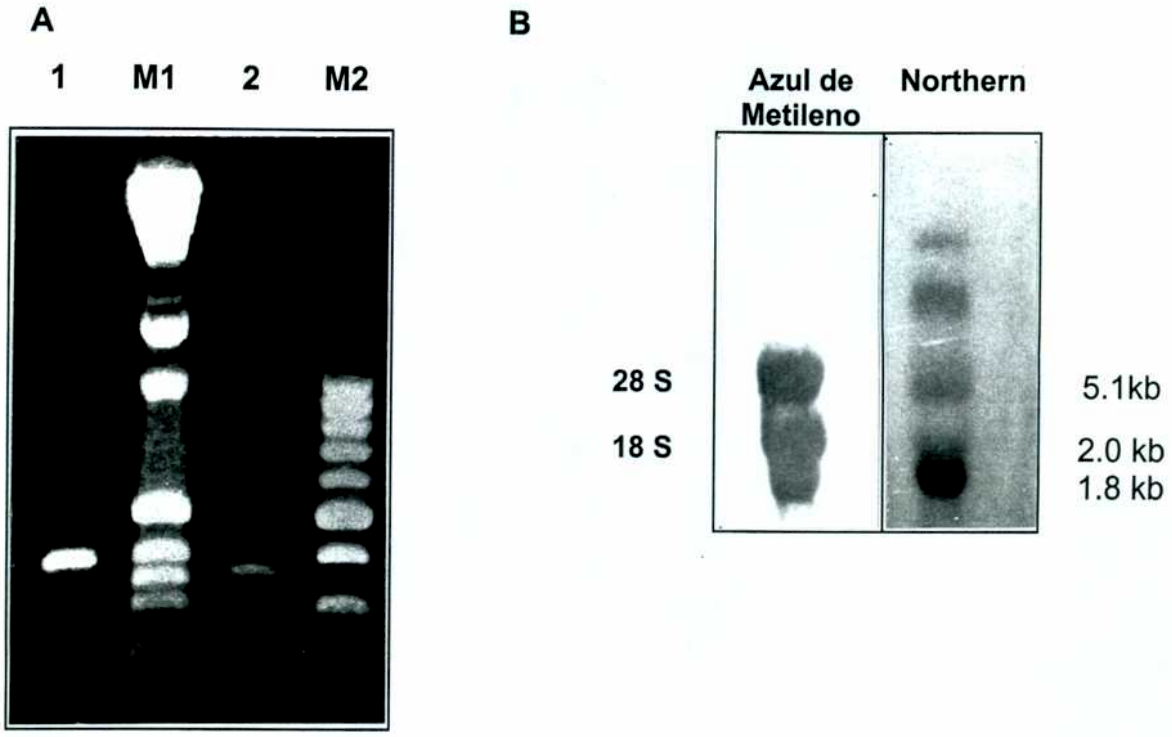


Figura 43: Amplificación de regiones variables de cadena pesada y liviana de AMC FC - 5.01.

1= producto de amplificación cadena pesada; 2= producto de amplificación cadena liviana; marcadores de longitud de ADN = M1: escalera de 1 kilobase (1 kb ladder= Se observan bandas de 220, 298, 344, 396, 506, 1.018, 1.636, 2.036 pb); M2: escalera de 100 pb (100 bp ladder= Se observan bandas de 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 pb)
Los tamaños de ARNr corresponden a: ARN 28S= 5.1 kb; ARN 18S= 2.0 kb

Los productos de amplificación por RT-PCR de ambas cadenas se clonaron en un vector pGEM-T (ver Materiales y Métodos) y se transformaron bacterias . Se obtuvieron varias colonias transformadas y una vez purificados los plásmidos purificados se secuenciaron los insertos correspondientes.

V-3.- SECUENCIACIÓN DE REGIONES VARIABLES DE AMC FC - 5.01

Las secuencias obtenidas para las regiones variables de las cadenas pesada y liviana del AMC FC-5.01, se presentan en la **Figura 44** y **45** respectivamente.

Se secuenciaron varios clones para cada cadena y a su vez las reacciones de secuenciación se realizaron en ambos sentidos para cada clon (utilizando primers adecuados).

Para la región variable de la cadena pesada se obtuvo una secuencia de 119 aminoácidos y para la cadena liviana de 105 aminoácidos. Se identificaron las regiones de combinación con el epitope (CDRs) y las regiones conservadas entre ellos (frames), haciendo uso de la Base de Datos de Secuencias de Interés Inmunológico de Kabat, (1998). La cadena pesada no pudo ser clasificada dentro de ningún subgrupo de Ig ya conocidos, considerándose que puede pertenecer al grupo de Ig denominadas misceláneas, que comprenden familias de miembros únicos [Base de Datos Kabat , 1998].

Para la cadena liviana, la Ig se clasificó dentro del sugbrupo V (Base de Datos Kabat, 1998).

Cadena pesada FC-5.01:

3/1 **FR1**

cag gtc cag ctg cag cag tca gga cct gag ctg gta aag cct ggg ggt tca gtg aag atg
gln val gln leu gln gln ser gly pro glu leu val lys pro gly gly ser val lys met

primer VHB

63/21 **CDR1**

tcc tgc aag gct tct gga tac aca ttc act acc tat gtt ata cag tgg gtg aag cag aag cct
ser cys lys ala ser gly tyr thr phe thr thr tyr val ile gln trp val lys gln lys pro

126/42 **FR2** **CDR2**

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att agt cct tac aat gat ggt act aag tac aat gac
gly gln gly leu glu trp ile gly tyr ile ser pro tyr asn asp gly thr lys tyr asn asp

189/63 **FR3**

aag ttc aaa ggc aag gcc aca ctg act tca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac atg gag
lys phe lys gly lys ala thr leu thr ser asp lys ser ser ser thr ala tyr met glu

249/83 **CDR3**

ctc agc agc ctg acc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gtg ggt ggt acc tca tat ttt
leu ser ser leu thr ser glu asp ser ala val tyr tyr cys val gly gly thr ser tyr phe

312/104 **FR4**

tat gct atg gac tac tgg ggt cga gga acc tca gtc acc gtc tcc tca gcc aaa aca aca gcc
tyr ala met asp tyr trp gly arg gly thr ser val thr val ser ser ala lys thr thr ala

REGIÓN CONSTANTE

372/124

cca tcg gtc tat cca ctg gcc
pro ser val tyr pro leu ala

primer CHγ

Figura 44: Secuencia de la porción variable de la cadena pesada de FC-5.01

Sombreado azul: sitios CDR (1 a 3): complementary determinant region= sitios de combinación con epitope);
Sombreado gris: comienzo de región constante.
FR (1- 4): Frames 1 a 4= regiones conservadas de la región variable
Se marcan en rojo la posición de los primers utilizados para la amplificación.

Cadena Liviana

3/1 **FR1** **CDR1**

ata aat atc tgg ctg tgt ctg cag gaa gaa aag gtc act atg aac tgt aag tcc agt caa agt
ile asn ile trp leu cys leu gln glu glu lys val thr met asn cys lys ser ser gln ser

primer VKB-2

66/22 **FR2**

gtt tta tac agt tca aat cag aag aac tac ttg gcc tgg tac cag cag aaa ccg gga cag tct
val leu tyr ser ser asn gln lys asn tyr leu ala trp tyr gln gln lys pro gly gln ser

129/43 **CDR2**

atc aag ctg ctg gtc tac tgg gca tcc act agg gaa tct ggt gtc cct gat cgc ttt aaa ggc agt
ile lys leu leu val tyr trp ala ser thr arg glu ser gly val pro asp arg phe lys gly ser

195/65 **FR3**

gga tct ggg aca gat ttt act ctt acc atc gat agt gtg caa act gaa gac ctg gca att tat tac
gly ser gly thr asp phe thr leu thr ile ser ser val gln thr glu asp leu ala ile tyr tyr

261/87 **CDR3** **FR4**

tgt cat caa tac ttc tcc tca tac acg ttc gga ggc ggg acc agg ctg gaa ata aaa cgg gct gat
cys his gln tyr phe ser ser tyr thr phe gly gly gly thr arg leu glu ile lis arg ala asp

REGIÓN

CONSTANTE

ggt gca cca act gta tcc aaa
ala ala pro thr val ser lys

primer CK2

Figura 45: Secuencia de la región variable de la cadena liviana de FC-5.01

Sombreado azul: sitios CDR (1 a 3): complementary determinant region= sitios de combinación con epitope);
Sombreado gris: comienzo de región constante.
FR (1- 4): Frames 1 a 4= regiones conservadas de la región variable
Se marcan en rojo la posición de los primers utilizados para la amplificación.

DISCUSIÓN

La inmunoterapia con AMCs murinos pone de manifiesto la aparición de una respuesta inmune neutralizante en los pacientes tratados, denominada HAMA. Como ya mencionamos en la Introducción de éste Capítulo, se utilizaron técnicas de ADN recombinante para tratar de encontrar una posible solución a esta dificultad. En la mayoría de los casos se obtuvieron moléculas quiméricas humano-murinas, en las que se clonaron, en un vector de expresión para células eucarióticas, la porción variable del AMC murino de interés (cadenas pesada y liviana) y la porción constante de IgG1 humana. Se selecciona este isotipo si se requiere que la quimera medie, por ejemplo acción citotóxica por fijación de complemento.

Otra aproximación propone la obtención de moléculas aún menos murinas, o 'humanizadas', mediante el denominado injerto de CDRs' (CDR grafting) ya que una vez conocidos los CDRs del AMC de interés, éstos pueden insertarse en las secuencias de Ig humana. [Jones P.T., 1986; Reichmann L., 1988]. Finalmente estas construcciones se expresan en células eucarióticas que se hacen crecer en bioreactores y los AC se purifican en grandes cantidades a partir de los medios condicionados de las células.

Varios de estos AMCs contra diferentes Ags humanizados o quiméricos se encuentran actualmente en pruebas clínicas, comprobándose que la administración de varios cursos de aplicación a pacientes, aunque no se ha logrado anular completamente la generación de una respuesta inmune contra ellos, en los pacientes tratados. Estas versiones 'más humanas' generan respuestas inmunes generalmente de poca magnitud pero que pueden ser neutralizantes, denominadas HAHA (human anti-humanized antibody) y HACA (human anti-chimeric antibody), ya que se producen anticuerpos contra el idiotipo murino de la nueva molécula.

Otro problema que ocurre frecuentemente es que el anticuerpo humanizado resulta con menor afinidad por el Ag, o bien se pierden afectos citotóxicos mediados por el AMC, debido a la disminución de la valencia del anticuerpo, cuando se humaniza (por ejemplo un AMC de clase IgM, que pasa a IgG).

La tecnología de ADN recombinante permite explotar la especificidad de los AMCs para la construcción de otro tipo de moléculas recombinantes. Una novedosa aplicación de moléculas recombinantes, los SCA (single chain antibodies) o moléculas scFv, son los fragmentos más pequeños de anticuerpo que retienen la especificidad de unión por el Ag, y comprenden las regiones variables de ambas cadenas (pesada y liviana) unidas por un polipéptido "linker". La tecnología recombinante permite la construcción de proteínas de fusión scFv con funciones efectoras diseñadas a voluntad, como por ejemplo péptidos fácilmente radiomarcables o drogas citotóxicas. Estos fragmentos presentan alta penetrabilidad en los tejidos cuando son infundidos y pueden ser expresados intracelularmente con el uso de vectores adenovirales, constituyendo una nueva herramienta para la terapia génica contra el cáncer. Con esta aproximación Cochet y colaboradores [1998] han podido transducir en forma intratumoral células HCT116 (carcinoma de colon) con un anti-Ras-scFv, logrando una sustancial regresión tumoral en ratones nude. Recientemente también se han diseñado receptores de linfocitos T quiméricos, redirigidos hacia ciertos Ags usando las porciones variables de AMCs (T-body) [Eshhar Z., 1997].

El clonado y secuenciación de las regiones variables de ambas cadenas de FC-5.01 permitirá utilizarlas para la construcción de moléculas recombinantes con fines terapéuticos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Inmunizando ratones con células indiferenciadas de carcinoma de mama IIB-BR-G, se seleccionó el AMC FC-5.01. El clonado del hibridoma productor de AMC FC-5.01 permitió obtener un clon capaz de crecer en ratones generando líquido ascítico, a partir del cual se purificó FC-5.01, obteniéndose un producto de alta pureza con alto rendimiento de AMC por ratón.

El Ag reconocido por FC-5.01 se expresa en varios tumores de origen epitelial así como también en el 100% de los melanomas primarios y metastásicos. Su expresión en tejidos normales es escasa y principalmente intracelular.

Se ha establecido que el Ag reconocido por FC-5.01 es una proteína altamente N-glicosilada, con una distribución heterogénea de peso molecular (30-60 kDa), y un núcleo proteico de 25 kDa. El epitope antigénico reside en la estructura proteica y tiene una configuración dependiente de puentes disulfuro.
Hemos demostrado que el Ag reconocido por FC-5.01 es la glicoproteína asociada a melanoma CD63/ME491, miembro de la superfamilia de Tetraspaninas. Está presente en membranas lisosomales de varios tipos celulares y en la superficie de algunas células normales activadas (plaquetas y endotelios) y neoplásicas.

Contrariamente a lo reportado para otros AMC anti-CD63, no observamos con FC-5.01 diferencias en la expresión de CD63, detectado, entre melanomas primarios y metastásicos, sino que el Ag se expresa con igual abundancia en ambos tipos de tumores.

Por la heterogeneidad en la expresión de CD63 observada en varios tumores metastásicos, se podría especular que debido a su ubicación en membranas lisosomales y a su alto nivel de glicosilación, la presencia de CD63 en la superficie celular podría conferir protección a las membranas de las células en áreas de invasión tumoral. Este hecho tal vez podría reflejar la fusión de lisosomas con la membrana plasmática en células invasivas, permitiendo así la

liberación de enzimas proteolíticas al estroma tumoral, aunque también podría implicar un rol funcional distinto para esta glicoproteína en la membrana celular.

La incapacidad de FC-5.01 para mediar reacciones citotóxicas contra células blanco podría explicarse por la rápida internalización del AMC observada luego de su unión a la superficie celular, lo que limitaría el tiempo de interacción para la activación de ADCC o CMC. Además, nuestros resultados sugieren que el Ag CD63 es rápidamente re-expresado en la superficie de células IIB-BR-G, luego de la internalización de los complejos Ag-FC-5.01.

Hemos presentado evidencia de que FC-5.01 anti-CD63 influencia la motilidad celular *in vitro*, ya que la migración de las células IIB-BR-G e IIB-MEL-J se redujo en presencia del AMC.

Haciendo uso del método de marcación directa fue posible elaborar un kit de marcación del AMC FC-5.01 con [^{99m}Tc], para utilizarlo en la RID de tumores IIB-BR-G_{NUDE}. Los datos de RID obtenidos con FC-5.01 marcado con [^{125}I] y [^{99m}Tc], demostraron en dicho modelo acumulación significativa y específica en los tumores luego de la inyección intraperitoneal y endovenosa respectivamente. Los xenotransplantes pudieron ser claramente localizados usando [^{99m}Tc]-FC-5.01 en imágenes inmunocentellográficas. En un paciente con melanoma metastásico se pudieron detectar con [^{99m}Tc]-FC-5.01 depósitos metastásicos en ganglios

Este kit de AMC FC-5.01 puede resultar en el futuro una herramienta útil para la detección de tumores en pacientes con melanoma y otras neoplasias

Los estudios preliminares de RIT con [^{131}I]-FC-5.01 resultaron alentadores por cuanto, en tres experimentos independientes, fue posible observar una inhibición significativa del crecimiento de los tumores humanos IIB-BR-G_{NUDE}. Se observó toxicidad hematológica que pudo ser controlada en parte con la administración de G-CSF.Se requiere de mayor número de experimentos para

determinar la potencialidad del AMC FC-5.01 para RIT en pacientes con tumores CD63 +.

El clonado y secuenciación de las regiones variables de FC-5.01 permitirá utilizar las para construir moléculas recombinantes de mayor potencial terapéutico para el tratamiento de tumores CD63+, en especial melanoma, para el cual las posibilidades terapéuticas son todavía escasas.

El hecho de que FC-5.01 se internalice luego de su unión a la membrana de células CD63$^+$, sumado a la rápida re-expresión del Ag en la superficie celular y la alta reactividad con varios tumores humanos, hace de este AMC un candidato atractivo para el desarrollo de inmunoconjugados con fines diagnósticos y/o terapéuticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

SECCIÓN I: OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE AMC FC-5.01

I-1.- CÉLULAS UTILIZADAS:

a) *Líneas celulares*

Para el desarrollo de este trabajo de Tesis se utilizaron las siguientes líneas celulares:

i) Cancer de mama humano: IIB-BR-G, establecida en nuestro laboratorio [Bover L., 1991], MCF-7 [Soule H.D., 1973] y MDA [Young R.K., 1974]. Las células IIB-BR-G se mantuvieron en cultivo en: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium) / mezcla de nutrientes Ham F12 (1:1) suplementado con suero fetal bovino (FBS, Gibco) al 10%, 2mM glutamina, 10μg/ml insulina (Sigma Co.), 100 U/ml de penicilina y 100 μg/ml estreptomicina (medio básico), suplementado con 20 nM selenito de sodio, 100 μM ácido ascórbico, 5ng/ml factor de crecimiento epidérmico (Collaborative Research), 5μg/ml prolactina (Sigma Co.), 1.4 μM hidrocortisona y 0.1 nM 17 β-estradiol.
Las células MCF-7 se cultivaron en medio básico y las células MDA en medio básico preparado sin nutrientes Ham F12.

ii) Melanoma humano: IIB-MEL-J [Guerra L, 1989], IIB-MEL IAN e IIB-MEL-LES [Kairiyama C, 1995], todas ellas desarrolladas en nuestro laboratorio y KM3 [Radford K.J, 1995], desarrollada en el laboratorio del Dr. P. Hersey. Las células IIB-MEL-J, IIB-MEL IAN e IIB-MEL-LES se cultivaron en medio básico (con 5 μg/ml insulina) suplementado con 10% FBS, 20nM selenito de sodio, 100 μM ácido ascórbico, 0.3 mg/ml galactosa, 0.15 mg/ml transferrina y 5 ng/ml factor de crecimiento epidérmico. Las células KM3 se cultivaron en DMEM suplementado con 5% FBS.

iii) Cáncer de colon humano: CACO-2 [Fogh J. 1977]. Se cultivaron en DMEM suplementado con penicilina y estreptomicina y FBS al 10%.

Todas las líneas celulares se crecieron a 37°C con atmósfera humidificada y 5% CO_2.
Para los distintos experimentos, las células fueron cosechadas por incubación de 10 min a 37°C en una solución conteniendo 15 mM citrato de sodio y 135 mM KCl y lavadas posteriormente con buffer fosfato salino (PBS).

b) *Células tumorales aisladas de biopsias humanas*

Se obtuvieron muestras quirúrgicas frescas de metástasis de melanomas humanos conservadas en DMEM/Ham F12 (1:1) y a partir de ellas se aislaron células tumorales vivas. En cada caso, el tumor fue limpiado de grasa, tejido necrótico y tejido normal adyacente, cortado en pequeños fragmentos que fueron disgregados mecánicamente por presión sobre una malla de nylon hasta obtener una suspensión celular relativamente homogénea, que luego fue filtrada a través de una gasa estéril. Posteriormente, la suspensión de células

tumorales (20 ml) se sembró sobre 12.8 ml de gradiente de Ficoll 9% -Hypaque 33.9% (22:10 v:v) diseñado para separar células vivas de células muertas [Mordoh J., 1981]. Se centrifugó por 30 minutos a 2500 rpm y las células viables se recuperaron de la interfase del gradiente, se diluyeron y lavaron dos veces con PBS.

c) ***Células aisladas de sangre periférica***

i) Leucocitos polimorfonucleares (PMN) y mononucleares (MN) humanos: PMN fueron obtenidos de muestras de sangre humana fresca proveniente de dadores normales. A partir de sangre heparinizada se realizó primero una sedimentación de eritrocitos con dextrán (concentración final 0.6%) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, 15 ml de sobrenadante fueron sembrados sobre 10 ml de un gradiente de Ficoll 9 % - Hypaque 33.9% (24:10 v:v) y se centrifugó 30 minutos a 1500 rpm. Los PMN fueron recuperados del pellet y los eritrocitos remanentes fueron lisados por incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de 0.1M EDTA - 10 mM KCO_3H - 155 mM NH_4Cl. Los PMN obtenidos se lavaron con PBS y se resuspendieron en DMEM para los ensayos.
Los MN se aislaron a partir de la interfase del gradiente de Ficoll - Hypaque, se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en DMEM para los ensayos. En los experimentos de lisis por ADCC, las células mononucleares fueron depletadas de monocitos, utilizándose la propiedad de éstos de adherirse a superficies plásticas. Para esto se incubaron los leucocitos mononucleares totales en placas de Petri, por 1 hora a 37°C en medio RPMI-1640, recuperándose los linfocitos del sobrenadante de las placas de cultivo.

ii) Plaquetas: Las plaquetas se aislaron a partir de sangre periférica, recogida sobre 1/10 volumen de una solución 135 mM de citrato de sodio. Se centrifugó por 15 minutos a 800 rpm y se separó el plasma rico en plaquetas. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos y se obtuvo un pellet libre de eritrocitos. Se lavó dos veces con PBS y se utilizaron para los experimentos.

d) **Células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs):** Células endoteliales humanas se obtuvieron a partir de un cordón humbilical fresco, conservado en medio HBSS conteniendo 100U/ml de penicilina y 100 μg/ml de estreptomocina (P/S) a 4°C hasta su procesamiento. En forma estéril se insertaron cánulas 16G en ambos extremos de la vena y con una jeringa de 20 ml se lavó repetidas veces con HBSS conteniendo P/S y Fungizone (1.25 μg/ml), removiendo los coágulos formados. Se llenó la vena con una solución de Colagenasa tipo A (*Clostridium histoliticum*, Sigma) 0.05 % en medio RPMI-1640 y se incubó a 37°C durante 15 min. Luego de la incubación se masajeó el cordón, se recogió el producto de la digestion enzimática y se lavó nuevamente con HBSS. La suspensión de células desprendidas se centrifugó a 1200 rpm por 5 min y las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 conteniendo

P/S, glutamina 2 mM, 10% FBS (GIBCO) y 10% suero bovino de recién nacido (New Born, GIBCO). Estas células se pueden cultivar por 4 o 5 pasajes y se recomienda utilizarlas en los experimentos en el segundo o tercer pasaje [Jaffe E.A., 1973].

I-2.- OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES:

a) Inmunización

Se inmunizaron ratones Balb/c inoculando células de la línea celular IIB-BR-G (cáncer de mama) por vía intraperitoneal (1.5 $x10^6$ células en 0.3 ml PBS) y sin adjuvantes. Este procedimiento se repitió 4 veces, con un intervalo de 2 semanas entre las inmunizaciones.

b) Obtención de los hibridomas

Cuatro días después de la última inyección, se sacrificaron los ratones y se les extrajo el bazo que se disgregó mecánicamente. Los esplenocitos obtenidos fueron fusionados con células de mieloma X63.Ag8 653 [Kearney J.F., 1979] siguiendo el protocolo de Goding [Goding JW, 1983]. Los hibridomas se seleccionaron en medio HAT (hipoxantina - aminopterina - timidina), y los sobrenadantes de las colonias creciendo en placas de 24 pocillos fueron ensayados posteriormente, como se detalla más adelante. Los hibridomas que presentaron reacción positiva se clonaron dos veces por dilución límite sobre *feeder layers* de macrófagos peritoneales de ratones Balb/c, en placas de 96 pocillos [Goding JW, 1983]. Para el crecimiento de los hibridomas en cultivo se utilizó el medio DMEM suplementado con glucosa (4.5mg/ml), 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, piruvato de sodio 0.15 mg/ml y FBS al 10%.
Se seleccionaron 3 clones productores de AMC, uno de los cuales FC-5.01 se eligió para la caracterización.

c) Selección de clones positivos

El screening de los AMCs producidos por ellos se realizó por la técnica de ELISA sobre células IIB-BR-G, MCF-7, MDA, IIB-Mel-J e IIB-Mel-Les fijadas con formaldehído al 4 %. Para ello las células (crecidas en placas de 96 pocillos) se bloquearon con 1% albúmina sérica bovina (BSA) en PBS y se incubaron a 4°C por 16 hrs con 100 µl de sobrenadantes de hibridomas (y posteriormente con los AMCs purificados en un rango de concentración 1-50 µg/ml). Luego de 3 lavados con PBS/BSA 0.1%, se incubaron por 2.5 hrs a temperatura ambiente con una dilución 1/250 de suero de conejo anti-Inmunoglobulina (Ig) de ratón conjugado con peroxidasa (DAKO). Luego de lavar con PBS, el color se desarrolló usando 1mg/ml de o-fenilendiamina como sustrato, preparada en buffer citrato de sodio 0.1M a pH 4.5 y 0.012 % H_2O_2 . La reacción se detuvo con el agregado de SO_4H_2 8N a los 15 min y la OD se determinó a 450nm.

d) Obtención de líquido ascítico

Ratones BALB/c de 6 semanas de edad fueron inyectados con 0.2 ml de Pristane (intraperitoneal). Al cabo de 2 semanas, los ratones se inocularon con 2 $x10^6$ células de hibridoma por la misma vía. A los 15-20 días los animales desarrollaron fluído ascítico el cual fue obtenido por aspiración abdominal con jeringa. El líquido ascítico se clarificó por centrifugación a 5000 rpm, durante 20 minutos. Los sobrenadantes se conservaron a -20°C hasta el momento de la purificación de la Ig.

I-3.-PURIFICACIÓN DE AMC FC-5.01 y OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS $F(ab)_2$

a) *Determinación de isotipo de AMC FC-5.01*

El hibridoma VA3P1 se marcó con [^{35}S]-Metionina (New England Nuclear) y el sobrenadante de cultivo se analizó como se describe en [Harlow E., 1993], para determinar si se trataba de IgG o IgM. La determinación del isotipo del AMC FC-5.01 se realizó por la técnica de Outcherlony [19 com[pletar..] que consiste en una doble inmunodifusión del AMC y de los antisueros específicos de conejo contra las distintas clases y subclases de Ig de ratón en agar al 1% - PBS. Para obtener la precipitación se utilizó un sobrenadante de hibridoma parcialmente purificado y concentrado 10 veces por precipitación con $(NH4)_2SO_4$ al 50 %. Como controles positivos se utilizaron Igs purificadas de ratón (Sigma) correspondientes a los diferentes isotipos. Al cabo de 4 días, las bandas de precipitación se visualizaron por tinción con Coomasie Brilliant Blue.

b) *Purificación*

El AMC FC-5.01 se purificó a partir del líquido ascítico conservado a -20°C. La Ig se precipitó por adición de $(NH4)_2SO_4$ saturado (primero hasta 30% de saturación y luego completando hasta 50 % de saturación). Luego de precipitar 30 min a 0°C, la muestra se centrifugó a 10000 rpm, se disolvió en PBS y se dializó contra buffer Tris-HCl 20 mM - NaCl 20 mM (pH 8). La fracción enriquecida en Ig se ultracentrifugó a 40000 rpm por 1 hr y se sembró en columna de intercambio iónico (DEAE-Sephacel, 35 ml). La columna se lavó con el mismo buffer y el anticuerpo se eluyó con un gradiente contínuo de NaCl de 20-300 mM en Tris-HCl (pH 8) 20 mM. Se tomaron fracciones de 5 ml y se determinó la absorbancia a 280 nm. Para localizar las fracciones que contenían anticuerpo, se tomaron alícuotas y se analizaron por SDS-PAGE al 10 % [Laemmli U.K., 1971], determinándose una pureza > 95%. Las fracciones apropiadas se juntaron y dializaron contra PBS. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry [Lowry O.H., 1951]. El rendimiento promedio de varios lotes de purificación fue de 15 mg de AMC FC-5.01 por ml

de ascitis aproximadamente. La reactividad del AMC fue determinada por ELISA usando células IIB-BR-G como se describió en el proceso de screening.

c) *Preparación de Fragmentos F(ab')$_2$*

Los fragmentos $F(ab)_2$ se produjeron mediante la digestión con Pepsina (Sigma Chemical Co.) según la técnica de Parham P. (1983). Se partió de 1.5 mg AMC FC-5.01 purificado, dializado contra buffer acetato de sodio 0.1 M (pH 7.2), y acidificado posteriormente con ácido acético hasta pH 3.8. Se utilizaron para la digestión 45 μg de Pepsina (Sigma) y la incubación se realizó por 4 hrs a 37 °C en un volumen de 1 ml. Se detuvo la reacción elevando el pH a 8 con Tris-base 2 M. Los fragmentos $F(ab')_2$ se dializaron contra buffer Tris-HCl 20 mM pH 8, se concentraron y purificaron de los péptidos de bajo peso molecular por centrifugación en Centricon CM 30 (Amicon). La pureza de los fragmentos se determinó por análisis en SDS-PAGE 7.5%, en condiciones no reductoras y la concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry.

I-4.- RADIOMARCACIÓN DE AMC FC-5.01:

a) *Iodinación de anticuerpos*

El AMC FC-5.01, sus fragmentos $F(ab')_2$ y la inmunoglobulina control IgG_{2a} (UPC 10) y sus fragmentos $F(ab')_2$, se marcaron con [^{125}I] por medio del método de Iodogen [Franker P.J., 1978]. Brevemente, 50 μg de Ig en un volumen de 50 μl de buffer fosfato de sodio (PH:7.4) 50 mM se agregaron a 0.5 mCi de $Na^{125}I$ en un tubo de vidrio previamente recubierto con 20 μg de Iodogen (Pierce) e incubados por 10 min a temperatura ambiente. La proteína marcada se separó del Iodogen insoluble y el [^{125}I] libre se separó del AMC por filtración a través de una columna de Sephadex G-25. El anticuerpo marcado se recogió en el primer pico (Vo) y la radioactividad incorporada se cuantificó en un contador γ. El protocolo de iodinación rindió anticuerpos y fragmentos con una actividad específica de 2-6 μCi/μg de proteína. Los anticuerpos marcados se analizaron en SDS-PAGE 7.5% y posterior autorradiografia. La conservación de la inmunoreactividad se analizó por medio de Western blot ($5x10^6$ cpm/ml) y radioinmunoensayo con extracto de membrana de melanoma #1.
Para marcar FC-5.01 con [^{131}I] para los experimentos de RIT, se utilizaron 600 μg AMC, aproximadamente 15 mCi de [^{131}I] (C.N.E.A) y 120 μg Iodogén, y se procedió de manera similar, a excepción de que la columna de Sephadex se equilibró y eluyó con PBS-BSA 1%. El porcentaje de [^{131}I] libre presente en el pico eluído se determinó sobre una alícuota por medio de cromatografía en papel, usando metanol / agua 85:15 como fase móvil.

i) *Radioinmunoensayo en fase sólida*

Con el objeto de evaluar la retención de la inmunoreactividad del AMC FC-5.01 luego de marcarlo con [^{125}I] se realizó un radioinmunoanálisis en fase sólida. Se sembraron placas de 96 pocillos con extractos de membranas (6 μg/pocillo)

de: células IIB-BR-G, tumor IIB-BR-G_{nude}, melanoma # 1 y linfocitos humanos. Loas placas se bloquearon con BSA al 1% por 1 hr, a fin de disminuir la unión inespecífica y posteriormente se incubaron con distintas diluciones de anticuerpo radiomarcado (30-1750 ng/100 µl) durante 16 hrs a 4°C. Algunos pocillos se compitieron con un exceso (100 veces) de AMC no-marcado, para calcular la unión inespecífica. Después de 3 lavados con PBS se contaron las cpm unidas en un contador γ (Packard) y se calcularon los ng unidos, realizándose cada punto por duplicado.

b) *Marcación de AMC FC-5.01 con [^{99m}Tc]*

Se generó un kit de marcación instantánea del AMC FC-5.01 con [^{99m}Tc] siguiendo un método directo [Mather S.J., 1990] con modificaciones como sigue:

i) Reducción de FC-5.01: Se concentró el AMC en PBS pH 7.4 hasta aproximadamente 10 mg/ml por ultrafiltración con Centricon-30 (Amicon, USA) y posteriormente se incubó por 30 min a temperatura ambiente con 2-mercaptoetanol (2-ME) a una relación molar de 1000:1 (2-ME:AMC), con el fin de reducir el AMC. 50 mg de FC-5.01 reducido se purificaron en una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) (2 x 10 cm) eluída con 0.01M buffer fosfato buffer pH=6.2, bajo corriente de N_2 en frio. Las fracciones se colectaron por medición de concentración de proteínas por abs. 280 nm. Se preparó una solución estéril y fresca (bajo N_2) conteniendo 1.0 mg/ml de metilen difosfonato (MDP) y 68 µg/ml de fluoruro estañoso (Sn F_2) y 50 µl de dicha solución se agregaron por mg de AMC reducido. Se alicuotaron a razón de 0.5 - 1 mg de AMC por ampolla y liofilizadas se almacenaron a 4°C hasta la marcación. La fórmula del kit fue: 1 mg de FC-5.01 reducido, 3 µg of SnF_2, 40 µg of MDP y sacarosa como protector de liofilización.

ii) Radiomarcación y control de calidad: Una ampolla de kit FC-5.01 (1mg) se reconstituyó con 1 ml de solución salina (0.9 % NaCl) y se marcó con 3-5 mCi de pertecnetato eluído fresco de un generador de ^{99}Mo/^{99m}Tc (CNEA, Argentina). Luego de agitar se esperaron 5-10 min para concluir la reacción. La eficiencia de marcación se determinó por cromatografía instantánea en capa delgada (ITLC, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) usando solución salina como fase móvil. El AMC radiomarcado se analizó por cromatografía líquida de alta performance (HPLC, Waters 600E) por medio de una columna de exclusión molecular (Protein pack 300 SW, Waters) y buffer fosfato 10 mM, EDTA 0.2 mM, pH 7.2 como fase móvil (flujo=1 ml/min).

iii) Conservación de la immunoreactivdad: En primer lugar se testeó si el proceso de reducción con 2-ME había modificado la reactividad de AMC FC-5.01 con células IIB-BR-G por medio de un ELISA, realizado como ya se describiera, comparando diluciones de AMC FC-5.01 nativo y reducido (por triplicado).
La fracción inmunoractiva de [^{99m}Tc]-FC-5.01 se investigó por adaptación del método de Lindmo et al [1984]. Resumidamente, se prepararon diluciones

seriadas de células IIB-BR-G en PBS/BSA 1% y se incubaron con 50 ng/ml [^{99m}Tc]- FC-5.01 por 2 hr a 4°C, con agitación. Al final de la incubación las células se centrifugaron, se lavaron con PBS/BSA 1% y los pellets se contaron por 60 sec en un contador γ (BOUND). Se incluyeron tubos incubados en presencia de un exceso de AMC no-marcado (200μg), como control de unión inespecífica (NSB). Todos los puntos (BOUND, NSB, TOTAL) se determinaron por triplicado. Se graficó la inversa de la fracción [TOTAL / (BOUND-NSB)] vs. la inversa de la concentración de células (trazándose la recta por regresión lineal) y la fracción inmunoreactiva de [^{99m}Tc]-FC-5.01 se calculó como la inversa de la intercección de y con la ordenada.

iv) Estabilidad de [^{99m}Tc]-FC-5.01: La estabilidad del AMC radiomarcado se determinó por ITLC en solución salina, realizada a temperatura ambiente hasta 4 hrs post marcación. La estabilidad en suero se investigó incubando [^{99m}Tc]-FC-5.01 (5 μg/ml) con suero humano fresco a 37°C durante 24 hs, con agitación, analizando muestras a distintos tiempos por ITLC. La estabilidad luego del almacenamiento (4°C) se examinó realizando marcaciones a los 15 días y 1,2,3,4,6 meses luego de la liofilización.

c) *Análisis de Scatchard - Determinación de la constante de avidez*

Células IIB-BR-G fueron utilizadas como blanco. Se incubaron 10^5 células en 100 μl de PBS conteniendo cantidades crecientes de ^{125}I-FC-5.01(0.1 a 40 μg/ml) durante 3 hrs a 4°C. Para determinar la captación inespecífica se realizaron incubaciones en presencia de un exceso de anticuerpo FC-5.01 frío (100 veces). Al final de la incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS y la radioactividad unida a las células se cuantificó en un contador γ . La constante de afinidad del AMC FC- 5.01 y el número de sitios antigénicos en las células se determinaron con los datos de unión, a través del análisis de un gráfico de Scatchard [Scatchard G.,1949].

I-5.- OTROS AMCs UTILIZADOS

Para el presente trabajo de Tesis se utilizaron además los AMCs ME491 [Atkinson B., 1985] y LS62 [Sikora L.K., 1987], anti-CD63 humano, provistos generosamente por el Dr. P. Hersey (University of Newcastle, Newcastle Melanoma Unit, Australia); el AMC FC-2.15 anti-Le^x [Mordoh J, 1995], el AMC MBr1 contra el Ag CaMBr1 [Menard S., 1983] provisto por el Dr. J. Schlom (National Cancer Institute, USA) y el AMC 3F8 anti-ganglíosido GD2, provisto por el Dr. Houghton (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York). Como controles inespecíficos, se utilizaron Ig murinas purificadas (Sigma) IgG1 (MOPC21) e IgG2a (UPC10).

SECCIÓN II: EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO RECONOCIDO POR EL AMC FC-5.01

II-1.- EXPRESIÓN DEL Ag 5.01

a) *Inmunocitoquímica*

Células de las distintas líneas celulares se crecieron sobre portaobjetos con pocillos de teflon (FLOW), por dos días y se fijaron con formol 1% y 0.1% Tritón X-100, 0.1M glicina, por 20 min. a temperatura ambiente, o bien con acetona fria por 10 min, aprox. La expresión del Ag 5.01 se determinó incubando las células fijadas con 50 ug/ml de FC-5.01. La visualización de la reactividad se realizó con el conjugado Avidina-Biotina-Peroxidasa, ABC - Vectastain kit (Vector). La peroxidasa endógena se bloqueó con metanol-0.6% H_2O_2. En algunos tumores, se realizaron comparaciones de intensidad de la reacción de inmunoperoxidasa, por cuantificación con un analizador de imágenes KS300 (Kontron).

b) *Reactividad en cortes de tejidos humanos normales y tumorales por inmunohistoquímica.*

La reactividad del AMC FC-5.01 con tejidos normales y tumorales se determinó sobre muestras de carcinomas de mama, melanomas, patologías benignas y otras neoplasias obtenidas inmediatamente después de la cirugía. Los tejidos normales se obtuvieron de necropsias antes de las 6 hs de la muerte. Los ejidos fueron fijados en formol 3.7%, envueltos en intestino de conejo como se describe [Battifora H., 1986] y embebidos en parafina. La reactividad del AMC se determinó como se describió previamente [Battifora H., 1986] y embebidos en parafina. Se utilizó Hematoxilina de Harris como colorante de contraste.

c) *Inmunofluorescencia indirecta*

La inmunofluorescencia (IF) indirecta se realizó sobre células vivas ya sea crecidas en placas de Petri de 35 mm de diámetro o sobre células en suspensión; en este caso las células en crecimiento exponencial se despegaron de las cajas de cultivo con una solución conteniendo citrato de sodio 15 mM KCl 135 mM y se lavaron dos veces con PBS. Luego del bloqueo con suero de cabra al 10 % por 15 min las células se incubaron en tubos eppendorf (5-10 $x10^5$ células) con los AMCs correspondientes en las diluciones apropiadas por 1 hr; luego de los lavados se reveló incubando con un antisuero de cabra anti-Igs de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluído 1/50 (Sigma) por 30-45 min. Se lavaron con PBS y se montaron en N-propil-galato al 5%, Permafluor (Immunon). Todas las diluciones se realizaron en PBS y las incubaciones se realizaron siempre a 0 - 4°C (en estas condiciones de temperatura se minimiza la internalización de los AMCs en caso de que se produjera, observándose IF en la superficie celular). Para observar IF en sitios intracitoplasmáticos, las células se fijan con formaldehído al 4 % + saponina (0.1-0.25%) (Sigma). Los preparados se observaron en un

fotomicroscopio Zeiss equipado con un dispositivo de epifluorescencia con filtro para fluoresceína. En los controles las células son incubadas con PBS o IgG2a murina inespecífica (Sigma), en lugar de los AMCs.

d) *Co-localización de FC-5.01 con naranja de acridina:*

Células IIB-BR-G crecidas en placas de Petri de 35 mm se incubaron con 2μg/ml de naranja de acridina (Sigma) en Dulbecco/MEM por 10 min. a 37°C, se lavaron con solución balanceada de Hank's con 0.1% BSA (HBSS/BSA) a 4°C para remover el exceso de colorante, y se fotografiaron usando epifluorescencia para rodamina (los campos fotografiados se marcaron para poder ubicar exactamente las mismas células posteriormente). Las células fueron luego fijadas con formol 1%, incubadas con 30 ug/ml de FC-5.01 en presencia de 0.25% saponina (Sigma) por 1.5 hs a temperatura ambiente, y luego lavadas con HBSS/BSA. Posteriormente se bloquearon con 10% suero de cabra y se continuó la inmunofluorescencia indirecta como se describió anteriormente, en presencia de saponina 0.25%. Las mismas células se re-fotografiaron con epifluorescencia para fluoresceína. Células control, incubadas con naranja de acridina o FC-5.01 o antisuero anti-Ig de ratón conjugado a FITC solamente no mostraron fluorescencia cruzada respectivamente. Los controles incluyeron PBS o IgG2a inespecífica en lugar de FC-5.01.

II-2.- BIOQUÍMICA DEL Ag 5.01

a) *Preparación de extractos de membranas y citoplasma a partir de células en cultivo o muestras de tumores humanos*

Los extractos de membranas totales se prepararon a partir de suspensiones de 5-10 $x10^7$ células (líneas celulares), obtenidas mediante incubación con una solución de citrato de sodio 15 mM - KCl 135 mM y lavadas dos veces con PBS o bien a partir de tumores humanos (1-2 gr) obtenidos de intervenciones quirúrgicas o biopsias, conservadas a -70°C. Luego de congelarlas y pulverizarlas bajo N_2 líquido, la fracción de membranas se purificó por ultracentrifugación y se extrajeron con detergentes (NP-40 o SDS al 1%) como se describe en Lamoyi ,[1986]. Las muestras también fueron solubilizadas con Triton X-114 y particionadas en las fases acuosa y orgánica [Bordier C., 1981]. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry .
Estos extractos se utilizaron para ELISA, Western-blot y radioinmunoensayo en fase sólida.

b) *Western-blot*

Muestras de extractos de membranas o citoplasma se corrieron en geles de poliacrilamida, tanto en presencia de SDS o en condiciones nativas y en condiciones reductoras y no reductoras, [Press O., 1988]. Posteriomente se transfirió el gel a membrana de nitrocelulosa (0.45 μm, Sigma), se bloquearon

los sitios de unión inespecíficos con leche descremada al 3 % en PBS (1 hr a temperatura ambiente) y se incubó durante toda la noche con 5-40 μg/ml de AMC FC-5.01 o de IgG2a inespecífica (UPC10) como control. Posteriormente se lavó la membrana con PBS Tween-20 0.05% y se incubó por 3 hrs. con un antisuero de cabra anti-Igs de ratón conjugado con Fosfatasa Alcalina diluído 1/10000 (Jackson). La reacción se reveló en presencia de NBT+BCIP como sustrato de la enzima (Gibco BRL). La reacción se detuvo con agua bidestilada. Paralelamente se corrieron muestras que fueron teñidas con Amido-Black para ver el patrón total de proteínas.

c) *Tratamientos enzimáticos y químicos de extractos de membrana*

i) Tratamientos enzimáticos: Muestras de extractos de membrana (de líneas celulares o tumores) se sembraron en placas de polivinilo de 96 pocillos y se dejaron adsorber toda la noche, a 37 °C (5 μg por pocillo). Luego se incubaron separadamente con las siguientes enzimas por 1 hr a 37°C:

*Tripsina (2.5 mg/ml) - buffer Tris-HCl 10 mM pH=8, 2 mM $CaCl_2$
*Proteinasa K (2 mg/ml) - buffer Tris-HCl 10 mM pH=8, 2 mM $CaCl_2$
*Pronasa E (50 U/ml) - buffer Tris-HCl 100 mM pH=8
*Neuraminidasa (0.04 U/ml) - buffer fosfato 10 mM pH=7.2

Luego de los lavados con PBS, los pocillos se bloquearon con 100 μl PBS-BSA 1% por otra hr. La persistencia de reactividad con el epitope se determinó por ELISA, como ya se describió. Los controles para este experimento incluyeron pocillos sólo tratados con PBS y IgG2a inespecífica (UPC10), así como controles positivos para las distintas digestiones enzimáticas que se describirán en Resultados. 30 μg de extracto M1 (melanoma, tumor de colon) se digirieron con N-glicosidasa F (PNGase F, Biolabs) por 1 hr a 37°C y 20 μg con 3U de Neuraminidasa (Biolabs) y los productos se analizaron por western-blot como ya se describió.

ii) Otros tratamientos:

***Calor:** previo al sembrado, el extracto de membrana se calentó a 100°C por 30 min y se centrifugó a 1000 x g por 5 min para descartar las proteínas desnaturalizadas.

***Metanol:** el extracto de membrana sembrado fue tratado con 100 μl de metanol absoluto por 30 min. a 0°C.

***Oxidación con periodato de sodio:** una muestra de extracto de membrana se incubó por 1 hr con periodato de sodio 50 mM a temperatura ambiente en buffer fosfato 10 mM, pH 7.2.

***Tratamiento con NaH_4B:** una muestra de extracto de membrana se incubó primero con buffer acetato de sodio, 50 mM a pH 5.5 por 30 min. a temperatura ambiente y por otros 30 min. con el agregado de el mismo buffer + 0.2 mg/ml NaH_4B.

Luego de los tratamientos, los lavados, el bloqueo y la determinación de ELISA

se realizaron como antes. Los controles positivos para los tratamientos incluyeron extractos de membrana de células MCF-7 tratados en forma similar e incubados con AMC MBr1 (50 μg/ml) y AMC FC-2.15 (20 μg/ml).

II-3.- COMPARACIÓN DEL Ag 5.01 CON EL Ag CD63

a) Análisis de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

La citometría de flujo se realizó usando un citómetro Facscan (Beckton-Dickinson, Mountain View, CA). Las células se incubaron con diluciones apropiadas de AMCs en 50 μl de PBS por 30 min a 4°C. Luego de dos lavados con PBS se incubaron con inmunoglobulina (purificada por afinidad) de oveja anti Ig de ratón conjugada a FITC (Silenus, Dandenong, Australia, Code DAF) en presencia de 20 μl de suero humano AB 100% (para bloquear receptores FC), por otros 30 min a 4°C. Se analizaron 3,000-10,000 células en el citómetro por punto incubado. Se utilizó AMC LS62 anti-CD63 como control positivo.

b) *Inmunodepleción cruzada*

Se realizó un ensayo de inmunodepleción del Ag 5.01 adsorbiendo a 4°C (toda la noche), 4 μg de extracto de membrana de melanoma #1 diluído en buffer de extracción conteniendo 0.5% NP-40, con 2 μg de AMC FC-5.01, AMC ME491 o anticuerpos inespecíficos de igual isotipo (Sigma). Luego de adicionar un exceso de proteína G Sepharosa (adsorbida con BSA al 1%) a cada tubo e incubación por 3 hr a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm y los sobrenadantes se separaron cuidadosamente de los pellets. Ambas fracciones se analizaron por Western-blot usando [^{125}I]-FC-5.01 (5 x10^6 cpm/ml) y autoradiografía. Los controles incluyeron muestras adsorbidas solo con PBS en lugar de AMCs y muestras que no se incubaron con proteína G Sepharosa.

c) Ensayo de inhibición de binding de FC-5.01 con ME491 (anti-CD63). Análisis del epitope reactivo

Primero se utilizó un radioimmunoensayo para detectar la unión de AMCs al Ag 5.01. Se recubrieron placas de 96 pocillos con 5 μg /pocillo de extracto de membrana de melanoma #1 (toda la noche a 37°C) como fuente de Ag 5.01; alternativamente, se sembró BSA en PBS. Luego de un bloqueo con BSA al 1% en PBS por 2 hr, se agregaron varias concentraciones de [^{125}I]-FC5.01 o [^{125}I]-ME491 y se incubaron por 4 hrs a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron y la radioactividad (cpm) unida a los pocillos se determinó en un contador gamma. La cantidad de AMC unida se calculó a partir de la pendiente de una curva de calibración (μg AMC vs cpm).
Para testear si ambos anticuerpos compiten entre sí por la unión al Ag 5.01 realizamos un ensayo de inhibición de la unión. Los pocillos se recubrieron con extracto de melanoma como antes, se bloquearon con BSA al 1% y varias

concentraciones (0.1-50 μg/ml) de AMC FC-5.01 o UPC10 (control IgG2a) se agregaron e incubaron por 4 hrs a temperatura ambiente. AMCs marcados (trazadores) con [^{125}I] (FC-5.01= 0.5 μg/well; ME491= 0.5 y 3.1 μg/well) se agregaron a cada pocillo conteniendo anticuerpo no marcado y se incubaron toda la noche a 4°C. Se calculó el porcentaje de inhibición de la unión de los AMCs radiomarcados al extracto de melanoma preincubado, respecto de la unión al extracto incubado en presencia de PBS.

SECCIÓN III: PROPIEDADES FUNCIONALES DEL AMC FC-5.01

III-1.- INTERNALIZACIÓN DEL COMPLEJO AMC FC-5.01- AG 5.01

a) ***Inmunofluorescencia indirecta:*** La capacidad de internalización del AMC FC-5.01 se evaluó por medio de inmunofluorescencia en un ensayo que permitió la visualización del anticuerpo internalizado sin interferencia con el anticuerpo unido a la superficie celular [Chang K, 1992]. Se crecieron células IIB-BR-G e IIB-MEL-J en placas de Petri de 35 mm por 24 hrs, se lavaron con PBS/BSA frio por 10 min., seguidos de la incubación con 5 ug/ml de FC-5.01 a 2-4°C por 1 hr. Luego de lavar con PBS/BSA frío, las placas se incubaron a 37°C por 0, 30, 60 y 120 min. para permitir la internalización del anticuerpo unido a la superficie.
Después de la incubación, las placas se lavaron y se incubaron por 20 min. con un buffer ácido (0.5M NaCl - 0.2M ácido acético, pH:3), que elimina el anticuerpo unido a la membrana celular. Posteriormente, las células se fijaron con 3.7% formol, se lavaron tres veces con PBS/BSA y se incubaron con suero de cabra al 10% y 0.1% saponina (Sigma) a fin de permeabilizar las células y luego incubarlas con antisuero de cabra anti-Igs de ratón conjugado con FITC, diluído 1/50 en PBS/0.1% saponina. Luego de lavados con PBS, las células se fijaron nuevamente con formaldehído al 3.7%, seguido de lavados con PBS. Los controles para este experimento incluyeron placas que no se incubaron a 37°C, y/o placas que no se lavaron con buffer ácido. Las muestras se observaron con microscopio de epifluorescencia para fluoresceína.

b) ***Radioinmunoensayo celular*** La cinética de internalización y catabolismo de FC-5.01 se estudió utilizando un radioinmunoensayo celular según fue descripto previamente [Shih L.B., 1995], con algunas modificaciones. Células IIB-BR-G, plaqueadas en microplacas de 96 pocillos (25 000 células / pocillo) un día antes del ensayo, fueron incubadas 2 horas a 37°C con 100 μl de medio de cultivo conteniendo [^{25}I]-FC-5.01 (15 ng/ml, 4 x 10^5 cpm/well). Posteriormente se lavaron tres veces con medio fresco y se determinó la radioactividad (cpm) total unida a las células (tiempo cero) por tratamiento con NaOH 2N. En general ~ 2.5 - 3.5 % de la radioactividad incubada fue incorporada por las células. Para determinar la unión no específica, se agregaron 50 μg/ml de AMC FC-5.01 no-marcado a pocillos control, 30 min antes de la adición del AMC marcado y durante las incubaciones. La unión no-específica fue generalmente < 15 % de la unión total a las células. El resto de las células se incubaron luego a 37°C en 200μl de medio fresco para analizar el

procesado celular. A las 2, 4, 18 y 44 hrs, se separaron 100 µl del sobrenadante y se contaron en un contador γ para determinar el porcentaje (%) de cpm liberadas. Luego de contar, el mismo sobrenadante se trató con 1 ml TCA 10% frío a fin de precipitar el anticuerpo "intacto", en presencia de 1 mg de BSA como proteína carrier. Se calculó el % de AMC intacto comparando la cpm precipitable con la total en el sobrenadante. La fracción celular se lavó dos veces, se disolvió como antes y se contó. Así, a cada tiempo, se cuantificó el % de cpm retenidas por las células y las liberadas al sobrenadante. Las cpm liberadas se dividieron en el componente degradado (TCA-soluble) e intacto (TCA-precipitable). De este modo, la presencia de cpm TCA-solubles en el sobrenadante de cultivo, implica que el [^{125}I]-FC-5.01 tuvo que ser internalizado y procesado por las células para liberar posteriormente los productos de bajo peso molecular TCA-solubles. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

c) *Velocidad de internalización del complejo Ag-AMC y re-expresión del Ag 5.01 en la superficie celular*

La velocidad de internalización del anticuerpo en células IIB-BR-G se determinó usando [^{125}I] como trazador [Opresko y Wiley, 1987]. Brevemente, células IIB-BR-G, plaqueadas en microplacas de 96 pocillos ($3x10^4$ células / pocillo) un día antes del ensayo, se incubaron con [^{125}I]-FC-5.01 ($5 x10^5$ cpm) por 2hrs a 4°C, se lavaron e incubaron en medio fresco a 37°C, para producir la internalización. A distintos tiempos, grupos de células (cuadruplicados para cada punto de tiempo) se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo para evitar una posterior internalización. El sobrenadante se separó y el AMC radiomarcado unido en la superficie se extrajo por medio de una solución ácida (Glicina /HCl 50 mM, pH=2.8, 20 min, temperatura ambiente). Cuando la radioactividad de superficie no pudo ser removida totalmente, las cuentas totales se corrigieron por el % de CPM que no pudieron ser removidas de las células a tiempo 0. La radioactividad removida en la solución ácida y la que permaneció asociada a las células (luego de lisar la monocapa con NaOH 2 N por 20 min) se contó en un contador γ. El cociente CPM intracelular/CPM superficie se graficó en función del tiempo para determinar la velocidad de internalización a partir de la pendiente de la recta de regresión.

Un experimento similar se realizó para establecer si el Ag 5.01 es re-expresado en la superficie celular luego de la internalización [Shih L B, 1994]. En este caso, células IIB-BR-G, plaqueadas en microplacas de 96 pocillos ($1x10^5$ células / pocillo) 48 hs antes del ensayo, se incubaron con un exceso de FC-5.01 no marcado (100 µg/ml) durante 1 h a 4°C en medio fresco, a fin de saturar la superficie de las células. Luego de tres lavados, las células se incubaron por distintos tiempos a 37°C para producir la internalización. A los tiempos indicados, grupos de células (cuadruplicados) se enfriaron en hielo y se incubaron con [^{125}I]-FC-5.01 ($5 x10^5$ cpm) por 2hs, a 4°C. Luego de lavar extensamente con medio frio, las células se lisaron y contaron como ya se describió antes. A cada tiempoindicado, se realizó un control (sin pre-

tratamiento con FC-5.01 no-marcado) en paralelo para cuantificar la máxima densidad antigénica. El % de Ag re-expresado se calculó comparando la radioactividad unida respecto de la radioactividad unida en el control correspondiente.

III-2.- CURVAS DE CRECIMIENTO

Para estudiar el posible efecto de FC-5.01 sobre el crecimiento de células tumorales en cultivo, se plaquearon 2 $x10^4$ células de las líneas celulares IIB-BR-G, MCF-7 e IIB-MEL-J en placas de 24 pocillos (Corning). A las 24 hrs, las células se incubaron en presencia de AMC FC-5.01 (50 µg/ml) o de PBS (Control) en medio completo. El medio de cultivo se cambió dos veces por día (intervalo de 8 hrs) todos los días, para asegurar una concentración elevada de anticuerpo, a pesar de la internalización en las células. La curva de crecimiento se evaluó por 1 semana y a distintos tiempos se por tripsinizaron y contaron las células por triplicado. Las curvas de crecimiento (Control y FC-5.01) se compararon entre sí por medio del Test *t* de student (muestras pareadas).

III-3.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

a) *Complemento*

Se utilizó complemento de conejo (Gibco) diluído 1/5 a 1/20. Como fuente de complemento humano se utilizó suero humano obtenido de dadores de sangre normales del Servicio de Hemoterapia del Hospital Naval Pedro Mallo.

b) *Citotoxicidad mediada por complemento (CMC) anticuerpo-dependiente*

Un ensayo de liberación de [^{51}Cr] fue utilizado para testear la capacidad del AMC FC-5.01 de mediar lisis por complemento. Como células blanco se utilizaron células IIB-BR-G y células IIB-MEL-J. Para el ensayo, las células blanco (2,5 x 10^6 /ml) fueron marcadas con [^{51}Cr] (150 µCi/ml) (Na_2 $^{51}CrO_4$, actividad específica 550 mCi/mg, New England Nuclear) por 2 hs a 37°C, y lavadas tres veces con medio de cultivo. Células marcadas con [^{51}Cr] (10^5 cél.) fueron incubadas en 100 µl DMEM más 100 µl de suero humano como fuente de complemento o 100 µl de complemento de conejo diluído (Gibco). AMC FC-5.01 purificado fue agregado a 50 µg/ml y las incubaciones se realizaron a 37°C por 90 min. Paralelamente se efectuaron incubaciones de células blanco resuspendidas en medio sólo, o con 0,1 M HCl para evaluar la liberación espontánea y máxima de [^{51}Cr], respectivamente. Cada ensayo fue llevado a cabo por triplicado. Al final del período de incubación, las células fueron centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos y se cuantificó la radioactividad en los sobrenadantes en un contador γ. El porcentaje de citólisis específica fue

calculado de acuerdo a la fórmula:

$$\textbf{lisis específica} = \frac{\text{liberación experimental (cpm) - liberación espontánea (cpm)}}{\text{liberación máxima (cpm) - liberación espontánea (cpm)}} \times 100$$

Se realizaron experimentos control utilizando AMC 4.36 (ascitis 1/50), IgG2a murina (UPC10)(50 µg/ml) o PBS en lugar de FC-5.01.

c) ***Citotoxicidad celular anticuerpo dependiente (ADCC)***

Se realizó un ensayo de liberación de [^{51}Cr] sobre células IIB-BR-G similar al descripto anteriormente, excepto que en lugar de suero humano se utilizaron diferentes células efectoras: leucocitos mononucleares totales, linfocitos aislados o PMN humanos. Las relaciones célula blanco : célula efectora ensayadas fueron 1:5, 1:10, 1:50, 1:75 y 1:100. Las incubaciones se realizaron durante 4 hs a 37°C y se utilizaron 50 µg/ml FC-5.01. En algunos experimentos los linfocitos fueron previamente estimulados 16 ó 48 hs con interleuquina 2 recombinante humana (rIL-2) a 1200 U/ml [Morgan A, 1989; Munn D, 1987].

III-4.- ENSAYOS DE INVASIVIDAD Y MIGRACIÓN

El estudio de la migración e invasividad de las células tumorales en presencia de AMCs se realizaró utilizando cámaras de Boyden [Albini A., 1987; Imamura H., 1994] preparadas con filtros de policarbonato (poro de 8 µm, Costar). En el caso del ensayo de invasión los filtros se recubrieron con 5 µg de Matrigel (matriz extracelular reconstituída) en 100 µl de agua bidestilada estéril y se dejaron secar toda la noche en esterilidad.
En la cámara superior se sembraron 10^5 células (cosechadas con la solución de citrato de sodio) en 10 µl de medio de cultivo sin FBS, conteniendo 50 µg/ml FC-5.01 o UPC10 (control de isotipo). Luego de 30 min, en que las células se adhieren al filtro o la matriz, se agregaron en el compartimiento inferior 600 µl de medio condicionado de fibroblastos humanos (HFL-1) (quimioatractante) obtenido luego de 24 hrs de cultivo confluente en ausencia de FBS. En algunos casos se adicionó péptido RGD (50 µM) (Sigma) al medio quimioatractante. Luego, las cámaras se incubaron por los tiempos indicados a 37 °C, en estufa gaseada. Posteriormente se eliminaron las células presentes en la cara superior del filtro por medio de un hisopo de algodón, los filtros se fijaron en metanol frío durante 10 min y se tiñeron con hematoxilina de Harris, para visualizar las células que atravesaron los poros y se fijaron a la cara inferior de los mismos. Las células se contaron bajo microscopio (10 campos al azar/filtro, aumento=200X). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Como control del medio quimioatractante se sembró medio de cultivo sin FBS + 0.2% BSA.

SECCIÓN IV: ESTUDIOS *IN VIVO* EN EL MODELO DE CÁNCER DE MAMA HUMANO IIB-BR-G_{nude}

IV-1.- TUMORES IIB-BR-G EN RATONES *NUDE*

Al establecer la línea celular IIB-BR-G se obtuvo una línea tumoral *in vivo,* IIB-BR-$G_{NUDE,}$ inoculando células provenientes del tumor original en forma subcutánea en la almohadilla mamaria de ratones *nude* hembra, sin el agregado de estrógenos [Bover L, 1991]. El crecimiento de los tumores se produjo al cabo de unos 20 días, alcanzando un diámetro de 0.5-1.0 cm para ese momento. Posteriormente trozos de tumor se pasaron sucesivamente en forma subcutánea en ratones recipientes utilizando un trócar. La línea tumoral in vivo IIB-BR-G_{NUDE} MT se generó por pasaje subcutáneo de metástasis espontáneas, aparecidas en ganglios axilares a partir del pasaje #40 en los ratones xenotransplantados. Los tumores IIB-BR-G_{NUDE} se fijaron en formaldehído 3.7% para su posterior análisis histológico e inmunohistoquímico.

IV-2.- RADIOINMUNOLOCALIZACIÓN Y BIODISTRIBUCIÓN DE TUMORES DE MAMA HUMANOS EN RATONES *NUDE*

a) ***Con anticuerpo FC-5.01 marcado con [^{125}I]:*** Se utilizaron ratones atímicos portadores de dos tumores IIB-BR-G_{NUDE} de 0.4-1 cm de diámetro creciendo en ambos flancos, aproximadamente a las 3 semanas de transplantados. Se inocularon intraperitonealmente con 25-60 μCi (aprox 10 μg) de anticuerpo [^{125}I]-FC-5.01. Los ratones se sacrificaron a distintos tiempos por punción cardíaca, bajo anestesia con penthobarbital sódico 0.5%, se extirparon los órganos y se lavaron con PBS a fin de eliminar residuos de sangre y se secaron sobre un papel absorbente. Luego, los tumores y órganos se pesaron y la radioactividad se midió en un contador γ. Se calcularon las cpm/gr de tejido o sangre y se comparon con las cpm encontradas en el tumor (índice de radiolocalización). Los resultados se expresaron también como el % de la dosis inyectada (%DI) / gr de tejido.
Para las imágenes los ratones se inocularon con 300 μCi de [^{125}I]-FC-5.01 y, a distintos tiempos, se analizaron en cámara γ utilizando un colimador pin-hole (Htal. Naval Dr. Pedro Mallo).

b) ***Con anticuerpo FC-5.01 marcado con ^{99m}Tc:*** 1 kit de AMC FC-5.01 (1 mg) se marcó con 3 mCi de ^{99m}Tc (CNEA), en un volumen de 1 ml según se detalló anteriormente. Ratones portadores de tumor IIB-BR-G_{nude} se inocularon en forma endovenosa (por vena de la cola) con 0.3 mCi y se obtuvieron centellogramas de cuerpo entero a las 6 y 24 hrs post-inoculación en cámara γ (Sigma 438) equipada con un colimador de baja energía. La adquisición de imágenes se realizó con un factor de zoom de 2.5.
Para la biodistribución (n= 5) se inyectaron 400μCi de [^{99m}Tc]-FC-5.01 en forma endovenosa (actividad específica 4μCi/μg), en ratones portadores de tumor IIB-BR-G_{NUDE} (0.6-0.8 cm de diámetro). Los animales se sacrificaron a las 24 hs

post-injección y la biodistribución de [^{99m}Tc]-FC-5.01 se realizó en forma similar a la descripta para el anticuerpo marcado con [^{125} I]. La radioactividad se contó en un contador de centelleo γ (Alfanuclear). Se preparó una solución standard para determinar la dosis inyectada (DI) y se realizaron las correcciones por decaimiento del [^{99m}Tc]. Los resultados se expresaron como % de la DI/gr de órgano y como cocientes Tumor/Organo (% DI/g tumor : % DI/g órgano).

IV-4.- RADIOINMUNOTERAPIA DE TUMORES IIB-BR-G_{NUDE} CON FC-5.01 MARCADO CON [^{131}I].

a) *Esquema de tratamiento*

Se transplantaron ratones nude con tumores IIB-BR-G_{NUDE} en forma subcutánea, 15 días antes de comenzar los tratamientos, de modo que los tumores establecidos tuvieran un volumen de 25-100 mm^3. Para reducir la captación de [^{131}I] libre, se proporcionó a los ratones KI al 0.1% en el agua de bebida, comenzando 1 día antes del tratamiento y a lo largo de todo el experimento. Según se indica, los animales fueron divididos al azar en grupos de 6-10 animales e inyectados con la dosis correspondiente de [^{131}I]-FC-5.01, fraccionada en 3 administraciones ip.(150-250 µl), con un intervalo de una semana. El anticuerpo fue marcado con [^{131}I], como se describió anteriormente para [^{125}I], pero la columna de Sephadex se equilibró y eluyó con PBS-BSA 1%. El AMC radiomarcado se filtró por 0.22 µm antes de las inyecciones. En los días posteriores a cada inyección, los lechos de las jaulas se cambiaron día por medio a fin de reducir la exposición de los ratones y tumores a la radiación externa proveniente del [^{131}I] excretado. Los animales se mantuvieron en condiciones asépticas con alimento irradiado y agua estéril.
Los tumores se midieron con un calibre dos veces por semana y el volumen tumoral se calculó por medio de la fórmula [Lee Y-S, 1988]:

$$volumen = \frac{A^2 \times B}{2} \qquad A = \text{diámetro menor} \qquad B = \text{diámetro mayor}$$

El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% IC) se calculó como:

$$\%IC = \left(1 - \frac{Tn/T_0}{Cn/C_0}\right) \times 100$$

donde T_0 y Tn son los volúmenes tumorales promedio al día *0* y *n* del grupo tratado respectivamente, y C_0 y Cn son los volúmenes tumorales promedio al día *0* y *n* del grupo Control respectivemente.
Los animales Control incluyeron tanto ratones que no fueron inyectados, como ratones inyectados con FC-5.01 no-marcado (40-60 µg). A fin de disminuir la toxicidad hematológica se incluyó un experimento en el cual los ratones tratados con [^{131}I]-FC-5.01 se inyectaron ip. con G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor, Neutromax, Filgrastim, Sidus) (0.5 µg/ratón/día), administrado durante 10 días consecutivos, a partir del primer día después de

la segunda inyección de AMC radiomarcado.

b) Análisis de la toxicidad hematológica y en órganos

Para evaluar la toxicidad del tratamiento los animales tratados y controles se pesaron 2 veces por semana en una balanza digital y se calculó el % de cambio de peso. A los tiempos que se indican, luego de anestesiar los ratones con pentobarbital sódico, se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca con heparina y se contaron los leucocitos totales, luego de lisar los glóbulos rojos con ácido acético 2% y se realizaron frotis. Los ratones sacrificados se fijaron en formaldehído 3.4% en PBS y los principales órganos se incluyeron en parafina y se prepararon cortes histológicos, que fueron teñidos con Hematoxilina /Eosina. Para analizar la médula ósea el esternón se fijó de igual manera y posteriormente se descalcificó con ácido nítrico al 7% durante una noche antes de preparar los cortes. La reactividad con FC-5.01 en los tumores tratados se determinó en los cortes por IHQ, como se describiera anteriormente.

SECCION V: CLONADO Y SECUENCIACION DE LAS REGIONES VARIABLES DE AMC FC-5.01

a) Extracción de ARN total del hibridoma VA3P1

Para la preparación de ARN total, se realizó la extracción por el método de isotiocianato de guanidinio [Chomszynsky P, 1987]. Se partió de 15 x 10^6 células VA3P1 (hibridoma productor de FC-5.01) congeladas a -70°C. El ARN obtenido se cuantificó por Absorbancia a 280/260 nm y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %, en presencia de formaldehído. El gel se tiñó con bromuro de etidio (BrEt) para verificar la integridad del ARN obtenido, observando los ARN ribosomales. Alícuotas del ARN se almacenaron precipitadas en etanol a -70°C hasta su utilización.

b) Amplificación y clonado de las regiones variables del AMC FC-5.01

Para amplificar las secuencias variables de ambas cadenas del AMC FC-5.01 (liviana y pesada) se utilizó la técnica de RT-PCR. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos [Bestagno M., 1993]:

CH γ : 5' GGCCAGTGGATAGAC 3'

Cκ2 : 5' TGGATACAGTTGGTGCAGC 3'

VHB : 5' AGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGG 3'
C A A C A

VκB-2 : 5' GATATTGTGATGACCCAGTCTCCA 3'

Primero se preparó el ADN complementario (cADN) para lo cual 2 µg de ARN se diluyeron a un volumen final de 20 µl conteniendo: buffer para la enzima (M-MLV-RT, BRL) mezcla de dNTPs (0.5 mM, c/u), 375 ng del oligonucleótido correspondiente (**CH γ** para la cadena pesada y **Cκ2** para la cadena liviana), 20 U de RNAsin y 200 U de M-MLV-RT (BRL). Se incubó la mezcla a 42°C por 1 hr para que la reacción proceda. Con éstos oligonucleótidos se inicia la síntesis de la cadena complementaria en una región constante conservada de la Ig (en ambas cadenas) en el límite con la porción variable.
Para la amplificación de las porciones variables de la cadena pesada y liviana de FC-5.01 por PCR, se emplearon 2 µl de cADN, dNTPs 0.5 mM c/u, $MgCl_2$ 2 mM y 300 ng de cada uno de los oligonucleótidos correspondientes : cadena pesada = par **CH γ** y **VHB**; cadena liviana = par **Cκ2** y **VκB-2.** Finalmente se agregó 1 unidad de Taq polimerasa (Promega) y agua hasta un volumen de 50 µ l. La amplificación se realizó por medio de un ciclador térmico Perkin Elmer Cetus 480, repitiendo 35 ciclos de :

1'30" a 94 °C (desnaturalización)

1'30" a 52 °C (hibridización)

2' a 72 °C (elongación)

Una vez finalizada la reacción, alícuotas de los productos de amplificación obtenidos se analizaron en gel de agarosa 1.5 % y se tiñeron con BrEt. Se utilizaron marcadores de tamaño de ADN para establecer la longitud de los productos obtenidos.
Los fragmentos amplificados para cada cadena de AMC se ligaron a un plásmido pGEM-T, usando T4 ADN ligasa (pGEM-T Easy vector System I, Promega). Este sistema permite una óptima eficiencia de ligación para fragmentos amplificados por PCR y permite la secuenciación de los insertos en ambos sentido, con el uso de primers adecuados. También posee un gen de resistencia a Ampicilina (para su selección) y la inserción de los insertos interrumpe el gen de β-galactosidasa, por lo que las bacterias transformadas no pueden metabolizar el X-gal (sustrato de la enzima) dando lugar a colonias blancas. Con los plásmidos conteniendo los insertos se transformaron bacterias competentes JM109 por electoporación (Gene Pulser, BioRad, 200 M ohms, 2.5 kVolts) y se plaquearon en Luria Bertani -agar conteniendo ampicilina 100 µg/ml, IPTG (0.5 mM) (inductor) y X-gal (80 µg/ml). Al cabo de 24 hs se aislaron colonias blancas de las placas provenientes de cada cadena de AMC FC-5.01, se cultivaron en medio líquido + Ampicilina y se purificaron los plásmidos correspondientes (miniprep). Los plásmidos se diluyeron a g/ml y se enviaron a secuenciar. Se realizó secuenciación automática de los productos de ligación en un secuenciador AlfExpress (Pharmacia, Fundación Campomar) usando los primers adecuados para el vector pGEM-T (Promega). Se secuenciaron varios clones para cada cadena, en ambas direcciones.

c) Análisis de las secuencias en base de datos. identificación de CDRs

A partir de las secuencias de nucleótidos se obtuvieron los marcos de lectura abiertos y las secuencias aminoacídicas por medio del programa (completar). Las secuencias obtenidas se analizaron en la base de datos BLASTP (KABAT) a fin de determinar regiones de alta homológía con otras secuencias de regiones variables de Ig e identificar los CDRs (complementary determinant regions).

d) Northern Blot

10 μg de ARN total se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % en presencia de formaldehido en buffer MOPS, se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond N, Amersham) en 20X SSC. Después del cross-linking (UV Stratalinker 2400, Stratagene) la integridad del ARN y la cantidad cargada en el gel fue corroborada por tinción con azul de metileno y la membrana se conservó a -20°C (formamida 50%, SDS 0.4%, Tris-HCl 50 mM pH=8) hasta su utilización.
La membrana se prehibridizó por 4-5 hrs a 42 °C en una solución conteniendo 50% de formamida, 5 X SSC, 0.2 % SDS, 0.1% PVP (polivinilpirrolidona), 0.1% Ficoll , Tris 20 mM pH= 7.5 y 200 μg/ml ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Como sonda se utilizó el fragmento de cadena variable pesada, amplificado por PCR y purificado por medio de un kit (Wizard PCR preps DNA purification System, Promega). La sonda se cuantificó por absorbancia a 260/280 nm y 25 ng se marcaron por "random priming" (BIO-LAB) con ^{32}P-dCTP (NEN). La membrana se hibridizó toda la noche a 42 °C con 10^7 cpm/3 ml de solución de prehibridización con el agregado de 10% dextrán sulfato. Posteriormente, se realizaron lavados por 30 min a temperatura ambiente con 2X SSC, 0.1% SDS y luego por 30 min con 0.1X SSC, 0.1% SDS a 65 °C. La membrana se expuso a una placa radiográfica por 3-4 días para revelar las bandas de ARN mensajero específicas.

REFERENCIAS

Aas M., Fjeld J.G. Animal models for radiolabeled monoclonal antibodies in cancer research. Acta Oncol. **32:** 819; 1993.

Abbas A.K., Lichtan A.L., Pober J.S. (Editores). Effector mechanism of immune responses. In: Cellular and Molecular Immunology; 1994.

Adams J.M., Cory S. Transgenic models of tumor development. Science **254:** 1161; 1991.

Albini A., Allavena G., Melchiori A. y col. Chemotaxis of 3T3 and SV3T3 cells to fibronectin is mediated through the cell-attachment site in fibronectin and a fibronectin cell surface receptor. J. Cell Biol. **105:** 1867; 1987.

Alderson M.R., Hamlin I., Staunton M.D. The relative significance of prognostic factors in breast carcinoma. Br. J. Cancer **25:** 646; 1971.

Allred D.C. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. J. Natl. Cancer Inst. **85:** 200; 1993.

Antoniw P., Farnsworth A.P., Turner A. Y col. Radioimmunotherapy of colorectal carcinoma xenografts in nude mice with yttrium-90 A33 IgG and Tri-Fab (TFM). Br J Cancer **74**:513, 1996.

Atkinson B., Ernst C.S., Ghrist B.F. y col. Identification of melanoma-associated antigens using fixed tissue screening of antibodies. Cancer Res. **44:** 2577; 1984.

Atkinson B., Ernst C.S, Ghrist B.F. y col. Monoclonal antibody to a highly glycosilated protein that reacts in fixed tissue with melanoma and other tumors. Hybridoma **4:** 243; 1985.

Azorsa D.O., Hyman J.A., Hildreth J.E.K. CD63/Ptlgp40: a platelet activation antigen identical to the stage-specific, melanoma associated antigen ME491. Blood **78:** 280; 1991.

Azumi N., Battifora H. The distribution of vimentin and keratin in epithelial and non epithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin and alcohol fixed tumors. Am. J. Clin. Pathol **88:** 286; 1987.

Azzopardi J.G. Classification of primary breast carcinoma. En: Problems in Breast Pathology (J.L. Bennington, ed.), pp. 240-257. W.B. Saunders Company Ltd, London; 1979.

Bal Y., Durbin H. y Hogg N. Monoclonal antibodies specific for platelet glycoprotein react with human monocytes. Blood **64:** 139; 1984.

Balch C.M., Soong S-J., Murad T.M., y col. A multifactorial analysis of melanoma. III. Prognostic factors in melanoma patient with lymph node metastases (Stage II). Ann. Surg. **193:** 377; 1981.

Balch C.M[(1)] ., Houghton A.N., Milton G.W.y col. Lippincott Company. Philadelphia.capítulo II, pag 16 y 101; 1992.

Balch C.M [(2)] ., Soong S-J., Shaw H.M. y col. An analysis of prognostic factors in 8500 patients with cutaneous melanoma. En: Balch C.M., Houghton A.N., Milton G.W., Sober A., Soong S-J., eds. Cutaneous melanoma . II edición. Philadelphia: JB Lippincott. pag. 165; 1992.

Ballare C., Bravo A.I., Turchi V. y col. Marker expression and differentiation in human breast cancer. En: *Breast Cancer: From Biology to Therapy: Pisa Symposia on Oncology*, Annals NY Acad. Sci. US **698:** 143; 1993.

Ballare C., Barrio M.M., Portela P. y col. Functional properties of FC-2.15, a monoclonal antibody that mediates human complement cytotoxicity against breast cancer cells. Cancer Immunol. Immunother. 41: 15; 1995.

Bargmann C.I., Hung M.C., Weinberg R.A. The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor related protein. Nature **316:** 226; 1986.

Baselga J., Mendelsohn J. The epidermal growth factor as a target for therapy in breast carcinoma. Breast Cancer. Res. Treat. **29:** 127; 1994.

Battifora H. Clinical applications of the immunohistochemistry of filamentous proteins. Am. J. Surg. Pathol. **12:** 24; 1988.

Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block; novell method for inmuno histochemical antibody testing. Lab. Invest. **55:** 244, 1986.

Baum R.P., Hertel A., Baew-Christow T. y col. Initial clinical results with Tc-99m-labeled anti-AFP monoclonal antibody fragment in germ line cell and liver tumors 9abstract 613). J. Nucl. Med. **32:** 1053; 1991.

Beatty J.D., Hyams D.M., Morton B.A. y col. Impact of radiolabeled antibody imaging on management of colon cancer. Am. J. Surg. **157:** 13; 1989.

Behr T.M., Sharkey R.M., Juweid M.E. y col. Phse I/II clinical radioimmunotherapy with iodine-131-labeled anti-carcinoembrionic antigen murinr monoclonal antibody IgG. J. Nucl. Med. **38:** 858; 1996.

Berditchevsky F., Zutter M.M., Hemler E. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). Mol. Biol. Cell. **7:** 193, 1996.

Bergh J., Norberg T., Sjogren S. y col. Complete sequencing of the *p53* gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. Nature Med. **1:** 1029; 1995.

Bishop J.M. Molecular themes in oncogenesis. Cell **64:** 235; 1991.

Biend M.J., Hyun H., Kozloff M. y col. Improved staging of B-cell non-Hodgkin's lymphoma patients with 99mTc-labeled LL2 monoclonal antibody fragment. Cancer Res. **55** (suppl)**:** 5764; 1995.

Bloom H.J.G., Richardson W.W. Histological grading and prognosis in breast cancer. Br. J. Cancer **11:** 359; 1957.

Blumental R.D., Sharkey R.M., Haywood L. y col. Targeted therapy of athymic mice bearing GW-39 human colonic cancer micrometastases with 131I-labeled monoclonal antibodies. Cancer Res. **52:** 6036; 1992.

Blumental R.D[(1)] ,Sharkey R.M., Kashi R. y col. Changes in tumor vascular permeability in response to experimental radioimmunotherapy: a comparative study of 11 xenografts. Tumor Biol. **18:** 367; 1997.

Blumental R.D. [(2)] , Sharkey R.M., Haywood L. y col. Application of cyrokine intervention for improved radio-antibody dose delivery. Int. J. Cancer **72:** 166; 1997.

Borden E.C. Augmented tumor-associated antigen expression by interferons. completar **80:** 148; 1988.

Bordler C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton-X114 solution. J. Biol. Chem. **256:** 1604, 1981.

Bover L., Barrio M.M., Slavutsky Y. y col. Description of a new human breast cancer cell line, IIB-BR-G, established from a primary undifferentiated tumor. Breast Cancer Res. Treat. **19:** 47; 1991.

Bover L., Bravo A.I., Kairiyama C.B. y col. Experiencia clínica sobre el tratamiento con ciclofosfamida y células tumorales autólogas en melanoma maligno. completar **5:** 13, 1992.

Bover L., Barrio M.M., Bravo A.I. y col. The human breast cancer cell line IIB-BR-G has amplified c-muc and c-fos oncogenes *in vitro* and is spontaneously metastatic *in vivo*. Cell Mol. Biol. **44:** 493;1998.

Boyd A.L., Samid D. Review: Molecular biology of transgenic animals. J. Anim. Sci. **71** (S3)**:** 1; 1993.

Buchegger F., Vacca A., Carrel S. y col. Radioimmunotherapy of human colon carcinoma by 131-I-labelled monoclonal anti-CEA antibodies in a nude mouse model. Int. J. Cancer **41:** 127; 1990.

Buchsbaum D.J., Brubaker P.G., Hanna D.E. y col. Comparative binding and preclinical localization and therapy studies with radiolabeled human chimeric and murine 17-1A monoclonal antibodies. Cancer Res. **50** (Suppl.): 993; 1990.

Buchsbaum D.J., Langmuir V.K. y Wessels B.W. Experimental radioimmunotherapy. Med Phys. **20:** 551; 1993.

Buchsbaum D.J. [(1)], Khazaeli M.B., Liu T. y col. Fractionated radioimmunotherapy of human colon carcinoma xenografts with ^{131}I-labeled monoclonal antibody CC49 . Cancer Res. **55** (Suppl.): 5881; 1995.

Buchsbaum D.J. [(2)]. Experimental radioimmunotherapy and methods to increase therapeutic efficacy. In: DM Goldemberg (de), Cancer Therapy with Radiolabeled Antibodies 115; 1995.

Buick R.N. [(1)] The cellular basis of cancer chemotherapy. En: Antineoplastic Agents (W.A. Remers, ed.), pp. 1-39. John Wiley & Sons, Inc., NY; 1984.

Buick R.N. [(2)], Pollak M.N. Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells and oncogenes. Cancer Res. **44:** 4909; 1984.

Burnet F.M. The concept of immunological surveillance. Progress Exp. Tumor Res. **13:** 1; 1970.

Bystryn, J-C., Henn M., Li J. y Shroba S. Identification of immunogenic human melanoma antigens in a polyvalent melanoma vaccine. Cancer Res. **52:** 5948; 1992.

Capurro M., Bover L., Portela P. y col. FC-2.15, a monoclonal antibody active against human breast cancer, specifically recognizes Lewis^x hapten. Cancer Immunol. Immunother. **45:** 334; 1997.

Carter C.L., Allen C., Henson D.E. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cases. Cancer **63:** 181-187; 1989.

Castiglia, S.G. de, Durán A., Fiszman G. y col. A. ^{99m}Tc direct labeling of anti-CEA monoclonal antibodies: quality control and preclinical studies. Nucl. Med. Biol. **22:** 367; 1995.

Chang K., Pai L., Batra J. y col. Characterization of the antigen (CAK1) recognized by monoclonal antibody K1 present on ovarian cancers and normal mesothelium. Cancer Res. **52:** 181; 1992.

Chen Y.H., Li C.D., Yap E.P. y col. Detection of loss of heterozygosity of p53 gene in paraffin-embedded breast cancers by non-isotopic PCR-SSCP. J. Pathol. **177:** 129; 1995.

Chomczynsky, P., and Sechi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform. Analytical Biochemistry 162: 156; 1987.

Christiaansen J.E., Burnside S.S., Sears D. Apparent sensitivity of human K lymphocytes to the spatial orientation and organization of target cell-bound antibodies as measured by the efficiency of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). J. Immunol. **138:** 2236; 1987.

Clark W.H. Jr. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis anb biological behaviour. En: Advances in biology of the skin. Montagna W, Hu F eds. Pergamon Press, Oxford. Vol VIII, pag 621; 1967.

Clark W.H. Jr, Mihm M.C. Jr. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. Am J. Pathol. **55:** 39; 1969.

Clark W.H. Jr., Elder D.E., Guerry D., y col. A study of tumor progression: the precursor lesions of supeficial spreading and nodular melanoma. Hum. Pathol. **15:** 1147; 1984.

Clark W.H. Jr, Elder D.E., Van Horn M. 1987. The biologic forms of malignant melanoma. Hum. Pathol. **17:** 443.

Cochet O., Keningsberg M., Delumeau Y. y col. Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. Cancer Res. **58:** 1170; 1998.

Colcher D., Esteban J., Carrasquillo J.A. y col. Complementation of intracavitary and intravenous administration of a monoclonal antibody (B72.3) in patients with carcinoma. Cancer Res **47**: 4218; 1987.

Coller B.S. Activation - specific platelet antigens, in Kunicki TJ, George JN (eds): Platelet Immunobiology. Molecular and Clinical Aspects. Philadelphia, PA, Lippincott, p166.; 1989.

Collet B., Pellen P., Martin A. y col. Scintigraphic detection in mice of inflamatory lessions and tumors by an indium labeled monoclonal antibody directed against Mac-1 antigen. Cancer Immunol. Immunother. **26:** 237; 1988.

Cox L.A., Chen G., Lee E.Y. Tumor suppressor genes and their roles in breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. **32:** 19; 1994.

Cox P.H., Verweij J., Stoter G. y col. Indium-111 antimyosin for the detection of leiomyosarcoma and rhabdomyosarcoma. Eur. J. Nucl. Med. **14:** 50; 1988.

Craig W.S., Cheng S., Mullen D.G. y col. Concept and progress in the development of RGD-containing peptide pharmaceuticals. Biopplymers **37:** 157; 1995.

Dalgleish AG. The role of IL-2 in gene therapy. Gene Therapy **1:** 83; 1984.

Dawson M., Moore M. Tumour immunology. En: Immunology. Roitt I., Brostoff J., y Male D. eds. II edic. Gower Medical Publishing. London; 1989.

de Kroon JF, de Paus RA, Kluin-Nelemans HC. y col. Anti-CD45 and anti-CD52 (Campath) monoclonal antibodies effectively eliminate systematically disseminated human non-Hodgkin's lymphoma B cells in Scid mice. Exp Hematol **24**:919; 1996.

De Santes K., Slamon D., Anderson S.K. y col. Radiolabeled antibody targeting of the HER-2/*neu* oncoprotein. Cancer Res. **52:** 1916; 1992.

Delmónico F.L., Cosimi A.B. Anti-CD4 monoclonal antibody therapy. Clin Transplant. **10:** 397; 1996.

Demetrick D.J., Herlyn D., Tretiak M. y col. ME491 melanoma-associated Glycoprotein Family: Antigenic identity of ME491, NKI/C-3, neuroglandular antigen (NGA), and CD63 proteins. J Natl Cancer Inst. **84:** 422; 1992.

Doerr R.J., Abdel-Nabi H., Krag D. y col. Radiolabeled antibody imaging in the management of colorectal cancer. Ann. Surg. **214:** 118; 1991.

Donehower L.A., Bradley A. The tumor suppressor p53. Biochim. Biophys. Acta **1155:** 181; 1993.

Edward M. Integrins and other adhesion molecules involved in melanocytic tumor progression. Curr. Opin. Oncol. **7:** 185; 1995.

Elder D.E. Acquired melanocytic nevi and melanoma: The dysplastic nevus syndrome. En: Pathology of malignant melanoma. Ackerman B ed. Karger, New York. Pag 185, 1987.

Elder D.E., Ainsworth A.M., Clark W.H. Jr. The surgical pathology of primary cutaneous malignant melanoma. En: Human malignant melanoma. Clark WH Jr, Goldman LI, Mastrangelo MJ eds. Grune & Stratton, New York. Pag 108; 1979.

Elder D.E., Guerry D., Epstein M.N. y col. Invasisve malignant melanoma lacking competence for metastasis. Am. J. Dermatopathol. **6:** 55; 1984.

Ellis G., Ferguson M., Yamanaka E. y col.. Monoclonal antibodies for detection of occult carcinoma cells in bone marrow of breast cancer patients. Cancer **63:** 2509; 1989.

Epstein A.L., Chen F-M, Taylor C.R. A novel method for the detection of necrotic lesions in human cancers. Cancer Res. **48:** 5842; 1988.

Eshhar Z. Tumor-specific T-bodies: towards clinical application. Cancer Immunol Immunother **45**:131; 1997.

Esteban J.M., Colcher D., Sugarbaker P. y col. Quantitative and qualitative aspects of radiolocalization in colon cancer patients of intravenously administered MAb B72.3. Int. J. Cancer **39:** 50; 1987.

Fanidi A., Harrington E.A., Evan G.I. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. Nature **359:** 554; 1992.

Fearon E.R., Hamilton S.R., Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. Science **238:** 193; 1987.

Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell **61:** 759; 1990.

Fidler I.J., Hart I.R. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. Science **217:** 998; 1982.

Finlay C.A., Hinds P.W., Tan T.H. y col. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with altered half life. Mol. Cell. Biol. **8:** 531; 1988.

Fishel R. Genomic instability, mutators, and the development of cancer: is there a role por p53. J.Natl.Cancer Inst. **88:** 1608; 1996.

Fogh J, Fogh J.M., Orfeo T. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. J. Natl. Cancer Inst. **59:** 221; 1977.

Ford C.H.J., Casson A.G. Antibody-mediated targeting in the treatment and diagnosis of cancer: an overview. Cancer Chemother. Pharmacol. **17:** 197; 1986.

Franker P.J., Speck J.C. Protein and cell membrane iodination with sparingly soluble chloramide 1,3,4,6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycouril. Biochem. Biophys. Res. Commun. **80:** 849; 1978.

Friess H., Gassmann M., Buchler M.W. Adjuvant therapy of pancreatic cancer using monoclonal antibodies and immune response modifiers. Int. J Pancreatol. **21:** 43;1997.

Frixen U.H., Behrens J., Sachs M. y col. E-Cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. J. Cell Biol. **113:** 173; 1991.

Fujii H., Szumel R., Marsh C. y col. Genetic progression, histological grade, and allelic loss in ductal carcinoma *in situ* of the breast. Cancer Res. **56:** 5260; 1996.

Gaffar S.A., Pant K.D., Shochat D. y col. Experimental studies of tumor radioimmunodetection using antibody mixtures against carcinoembrionic antigen (CEA) and colon-specific antigen-p (CSAp) antibodies. N. Engl. J. Med. 308; 1981.

Gallinger S., Reilly R.M., Kirsh J.C. y col. Comparative dual label study of first and second generation antitumor-associated glycoprotein-72 monoclonal antibodies in colorectal cancer patients. Cancer Res. **53:** 271; 1993.

Galfre G., Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. Meth. Enzimol. **73:** 3; 1981.

Gilboa E, Nair SK, Lyerly HK. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines.Cancer Immunol Immunother **46**:82; 1998.

Goding J.W. Production of monoclonal antibodies. En: Monoclonal antibodies: principles and practice, Capítulo 3. JW Goding ed. Academic Press London; 1983.

Gold P. [1], Freedman S.O. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. J. Exp. Med. **121:** 439 1965.

Gold P. [2], Freedman S.O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. J. Exp. Med. **122:** 467; 1965.

Goldemberg D.M., Preston D.F., Primus F.J. y col. Photoscan localisation of GW-39 tumors in hamsters using radiolabelled anticarcinoembryonic antigen immunoglobulin G. Cancer Res. **34:** 1; 1974.

Goldemberg D.M., Leland F., Kim E. y col. Use of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localisation of diverse cancers by external photoscanning. N. Engl. J. Med. **298:** 1384; 1978.

Goldemberg D.M [1] ., Goldemberg H., Sharkey R.M. y col. Clinical studies of cancer radioimmuno-detection with carcinoembryonic antigen monoclonal antibody fragments labeled with 123-I or 99mTc. Cancer Res. **50:** 909; 1990.

Goldemberg D.M [2] . Monoclonal antibodies in cancer imaging and therapy. Cancer Magazine, 12; 1990.

Goldemberg D.M. [3], Goldemberg H., Sharkey R.M. y col. In-vivo imaging for the detection of human tumors. Cap 4: 273-292 en Cancer imaging with radiolabeled antibodies, editado por Goldember D.M., Kluwer Academic Publishers; 1990.

Goldemberg D.M., Larson S.M. Radioimmunodetection in cancer identification. J. Nucl. Med. **33:** 803; 1992.

Goldemberg D.M. Monoclonal antibodies in cancer detection and therapy. The American Journal of Medicine **94:** 297; 1993.

Greene M.H., Clark W.H. Jr, Tucker M.A. y col. Acquired precursors of cutaneous malignant melanoma. The familial dysplastic nevus syndrome. N. Engl. J. Med. **312:** 91; 1985.

Griffin T.W., Bodgen A.E., Reich S.D. y col. Initial clinical trials of the subrenal capsule assay as a predictor of tumor response to chemotherapy. Cancer **52:** 2185; 1983.

Gruber S.B., Barnhill R.L., Stenn K.S. y col. Nevomelanocytic proliferations in association with cutaneous melanoma : A multivariate analysis. J. Am. Acad. Dermatol. **21:** 773;1989.

Gruters R.A., Calafat J., Claus J.G.M. y col. Structural heterogeneity of human melanoma-associated antigen. Cancer Res. **49:** 459; 1989.

Guadagni F., Schlom J., Pothen S. y col. Parameters involved in the enhancement of monoclonal antibody targeting in vivo with recombinant interferon. Cancer Immunol Immunother **26:** 222; 1988.

Guerra L., Mordoh J., Slavutsky Y. y col. Characterization of IIB-MEL-J. A new and highly heterogeneous human melanoma cell line. Pigment Cell Res. **2:** 504; 1989.

Hammert L.C., Ball E.D. Purging autologous bone marrow with monoclonal antibodies for transplantation in acute myelogenous leukemia. Blood Rev. **11:** 80; 1997.

Harlow E., Lane D. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Editions; 1993.

Harris J.R., Morrow M., Banadonna G. Cancer of the breast. En: Principles and Practice of Oncology (V.T. De Vita, S. Hellman, S.A. Rosenberg, eds.) - Capítulo 40. J.B. Lippincott Co., Philadelphia; 1993.

Hartmann F., Renner C., Jung W. y col. Treatment of Hodgkin's disease with bispecific antibodies. Arin. Oncol. **7 (suppl. 4):** 143; 1996.

Hartwell L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. Cell **71:** 543; 1992.

Hellström I., Garrigues H.J, Garrigues U. y col. Highly tumor-reactive, internalizing mouse monoclonal antibodies to Le^y-related cell surface antigen. Cancer Res. **50:** 2183; 1990.

Hemler M.E., Mannion B.A. and Berditchevsky F. Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. Biochem. Biophys. Acta **1287:** 67; 1996.

Hertel A., Baum R.P., Lorenz M. y col. Immunoscintigraphy using a technetium-99m labelled monoclonal anti-CEA antibody in the follow-up of colorectal cancer and other tumours producing CEA. Br. J. Cancer **62** (Suppl. X): 34; 1990.

Hinds P.W., Weinberg R.A. Tumor suppressor genes. Curr. Opin. Genet. Dev. **4:** 135; 1994.

Hnatowich DJ, Mardirossian G., Rusckowski M. y col. Directly and indirectly technetium 99m labeled antibodies - a comparison of in vitro and animal in vivo properties.J. Nucl. Med. **34:** 109; 1993.

Ho S.B., Kim Y.S. Carbohydrate antigens on cancer-associated mucin-like molecules. Semin.Cancer Biol. **2:** 389; 1991.

Hock H., Dorsch M., Kunzendorf U. y col. Mechanism of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon γ. Proc. Natl. Acad. Sci. **90:** 2774; 1993.

Hopkins K., Chandler C, Eatough Jy col. Direct injection of 90Y MoAbs into glioma tumor resection cavities leads to limited diffusion of the radioimmunoconjugates into normal brain parenchyma: a model to estimate absorbed radiation dose. Int J Radiat Oncol Biol Phys **40**:835; 1998.

Horejsl V., Vlcek C. Novel structurally distinct family of leucocyte surface glycoproteins including CD9, CD37, CD53 and CD63. FEBS Lett **288**(1-2):1; 1991.

Hotta H., Hara Y., Miyamoto H. y col. Overexpression of the human melanoma associated antigen ME491 partially supresses *in vivo* malignant phenotypes of H-ras-transformed NIH-3T3 cells in athymic nude mice. Melanoma Res **1:** 125; 1991.

Houghton A.N., Mintzer D., Cordon-Cardo. y col. Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: A phase I trial in patients with malignant melanoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82:** 1242; 1985.

Hung M-C., Matin A., Zhang Y. y col. HER-2/*neu*-targeting gene therapy - A review. Gene **159:** 65; 1995.

Hunter T. Cooperation between oncogenes. Cell **64:** 249; 1991.

Hunter T. Oncogenes and cell cycle. Cur. Opin. Genet. Devel. **3:** 1; 1993.

Hynes N.E., Stern D.F. The biology of *erbB-2 / neu / HER-2* and its role in cancer. Biochim. Biophys. Acta **1198:** 165; 1994.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. Cell **69:** 11; 1992.

Imai K., Makiguchi Y. Functions of mucin molecules in gastrointestinal cancer. Nippon Geka Gakkai Zasshi **97:** 152; 1996.

Imamura H., Takao S., Aikou T. a modified Invasion-3(4,5- dymethylthiazole-2-yl) diphenyltetrazolium bromide assay for quantitating tumor cell invasion. Cancer Res. **54:** 3620; 1994.

Ishii Y., Mavligit G.M. Immunodiagnosis of human melanoma: characterization of human melanoma antigens and their detection in sera of melanoma patients by radioimmunoassay. Oncology **39**: 23, 1982.

Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G. y col. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. J. Clin. Invest. **52:** 2745; 1973.

Jannot C.B., Hynes N.E. Characterization of scFv-421, a single-chain antibody targeted to p53. Biochem. Biophys. Res. Commun. **230:** 242; 1997.

Jullano R.L., Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. J. Cell. Biol. **120:** 577; 1993.

Kabbat E.A. Kabat's Database of Sequences of immunological Interest. Us department of Health and Human Services. Public Health Service, NIH; 1998.

Kahlenberg M.S., Stoler D.L., Basik M. y col. p53 tumor suppressor gene status and the degree of genomic instability in sporadic colorectal cancers. J. Natl. Cancer Inst. **88:** 1665; 1996.

Kairiyama C., Slavutsky I., Morvillo V. y col. Biologic, immunocytochemical and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN. Pigment Cell Res. **8:** 121; 1995.

Kasprzyk P.G., Song S.U., Di Flore P.P. y col. Therapy of an animal model of human gastric cancer using a combination of anti-*erb*B-2 monoclonal antibodies. Cancer Res. **52:** 2771; 1992.

Kearney J.F., Radbruch A., Liesegang B. y col. A newmouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin espression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. J. Immunol. **123:** 1548; 1979.

Kelsey J.L., Bernstein L. Epidemiology and prevention of breast cancer. Annu. Rev. Public. Health **17:** 47; 1996.

Kemshead J.T., Jones D.H., Lashford L. 131I-coupled to monoclonal antibodies as therapeutic agents for neuroectodermically derived tumors. Fact or fiction?. Cancer Drug deliv **3**:25, 1986.

Kerr DE, Schreiber GJ, Vrudhula VM. y col. Regressions and cures of melanoma xenografts following treatment with monoclonal antibody beta-lactamase conjugates in combination with anticancer prodrugs. Cancer Res **55**:3558; 1995.

Ketcham A.S., Balch C.M. Classification and staging system. En: Balch CM, Milton GW, eds. Cutaneous melanoma: Clinical management and treatment results worldwide. Philadelphia: JB Lippincott, pg. 55; 1985.

Khaw B.A., Fallon J.T., Strauss H.W. y col. Myocardial infarct imaging of antibodies to canine cardiac myosin with indium-111-diethylenetriamine pentaacetic acid. Science **209:** 295; 1980.

Kholer G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. Nature **256:** 495; 1975.

Kim Y.S. Altered glycosylation of mucin glycoproteins in colonic neoplasia. J. Cell Biochem. (Suppl) **16G:** 91; 1992.

Kim Y.S. Carbohydrate antigen expression in colorectal cancer. Semin. Cancer Biol. **1:** 189; 1990.

King D.P., Jones P.P. Induction of IA and H-2 antigens on a macrophage cell line by immune interferon. J. Immunol. **131:** 315; 1983.

Klein G., Klein E. Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. Nature **315:** 190; 1985.

Kovach J.S., Hartmann A., Blaszyk H. y col. Mutation detection by highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93:** 1093; 1996.

Kufer P., Mack M., Gruber R. y col. Construction and biological activity of a recombinant bispecific single chain antibody designed for therapy of minimal residual colorectal cancer. Cancer Immunol. Immunother. **45:** 193; 1997.

Laemmli U.K.. Cleavage of structural proteins during assembly of a head bacteriophage T4. Nature **227:** 680; 1971.

Lamoyi E. Preparation of F(ab')2 fragments from mouse Igg of various subclasses. Methods in Enzymology **121:** 652; 1986.

Lane D.P. p53, guardian of the genome. Nature **358:** 15; 1992.

Larson S.M. Clinical radioimmunodetection, 1978-1988: overview and suggestions for standarization of clinical trials. Cancer Res. **50:** 892; 1990.

Larson S.M., Leibel S.A., Cheung N-K.V. Radioisotope conjugates. In: De Vita VT Jr. Hellman S., Rosemberg S.A., editors. Biologic therapy of cancer. Philadelphia JB Lippincott: 496; 1991.

Lederman J.A., Begent R.H.J., Massof C. y col. A phase- I study of repeated therapy with radiolabeled antibody to carcinoembrionic antigen using intermitent or continuous administration of cyclosporin A to suppress the immune response. Int. J. Cancer **47:** 659; 1991.

Lee Y-S., Bulliard D.E., Zalutsky M.R. y col. therapeutic efficacy of antiglioma mesenchymal extracellular matrix 131I-radiolabeled murine monoclonal antibody in a human glioma xenograft model. Cancer Res. **48:** 559; 1988.

Lewis V., Green S.A., Marsh M. y col. Glycoproteins of the lysosomal membrane. J. Cell Biol. **100:** 1839; 1985.

Lindmo T., Boven E., Cuttitta F. y col. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J. Immunol. Methods **72:** 77; 1984.

Lippman M.E. The development of biological therapies for breast cancer. Science **259:** 631; 1993.

Lipton A. y col. *Corynebacerium parvum* versus BCG adjuvant immunotherapy in human malignant melanoma. Cancer. **51:** 57; 1983.

Livingstone L.R., White A., Sprouse J. y col. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. Cell **70:** 923; 1992.

LoBuglio A., Saleh M., Lee J. y col. Phase I trial of multiple large doses of murine monoclonal antibody CO17-1A. I. Clinical Aspect. J. Natl. Cancer Inst. **80:** 932; 1988.

Lohmann D., Ruhri C., Schmitt M. y col. Accumulation of p53 protein as an indicator for p53 gene mutation in breast cancer. Occurrence of false-positives and false-negatives. Diagn. Mol. Pathol. **2:** 36; 1993.

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. y col. Protein mesurement with the Folin reagent. J. Biol. Chem. **193:** 265; 1951.

Mach J.P., Carrel S., Merenda C. y col. In vivo localisation of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma grafted into nude mice. Nature **248:** 704; 1974.

Mach J.P., Carrel S., Forni M. y col. Tumor localization of radiolabelled antibodies against carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma. N. Engl. J. Med. **303:** 5; 1980.

Mackiliop W.J., Ciampi A, Till J.E. y col. A stem cell model of human tumor growth: Implications for tumor cell clonogenic assays. J. Natl. Cancer Inst. **70:** 9; 1983.

Maecker H.T.,Todd S.C., Levy S. The Tetraspanin superfamily: molecular facilitators. FASEB J. **11:** 4282, 1997.

Malkin D. *p53* and the Li-Fraumeni syndrome. Biochim. Biophys. Acta **1198:** 197; 1994.

Marshall E. Search for a killer: focus shifts from fat to hormons. Science **259:** 618; 1993.

Mather S.J., Ellison D. Reduction-mediated technetium-99m labeling of murine monoclonal antibodies. J. Nucl. Med. **31:** 692; 1990.

Mehta J., Powles R., Treleaven J. y col. Autologous transplantation with CD52 monoclonal antibody-purged marrow for acute lymphoblastic leukemia: long term follow up. Leuk Lymphoma **25**: 479, 1997.

Melchiori A., Montarini R., Carlone S. y col. The α3β1 integrin is involved in melanoma cell migration and invasion. Exp. Cell Res. **219:** 233; 1995.

Ménard S., Tagliabue E., Canevari S. y col. Generation of monoclonal antibodies reacting with normal and cancer cells of human breast. Cancer Res. **43:** 1295; 1983.

Mensing H., Albini A., Krieg T. y col. Enhanced chemotaxis of tumor-derived and virus-transformed cells to fibronectin and fibroblast-conditioned medium. Int. J. Cancer **33:** 43;1984.

Metzelaar M.J., Sixma J.J., Nieuwenhuis H.K. Deteccion of platelet activation using activation specific monoclonal antibodies. Blood Cells **16:** 85; 1990.

Metzelaar M.J., Winjgaard P.L.J., Peters P.J. y col. CD63 Antigen. J. Biol. Chem. **266:** 3239; 1991.

Meyer D., Birchmeier C. Multiple essential functions of neuregulin in development. Nature **378:** 386; 1995.

Mönsson-Brahme E., Cartensen J., Ehrardt K., Lagenlöf B., Ringborg U. Prognostic factor in thin cutaneuos malignant melanoma. Cancer **73**: 2324, 1994.

Mordoh J., Chacon R., Filmus J. Isolation of tumor cells from patients with osteosarcoma and analysis of their sensitivity to Methotrexate. Cancer Res. **41:** 3621; 1981.

Mordoh J., Leis S., Bravo A.I. y col. Description of a new monoclonal antibody, FC-2.15, reactive with human breast cancer and other human neoplasias. Int. J. Biol. Markers **9:** 125; 1994.

Mordoh J., Silva C., Albarellos M. y col. A phase I clinical trial in cancer patients of a new monoclonal antibody, FC-2.15, reacting with tumor proliferating cells. J. Immunother. **17:** 151; 1995.

Morgan A., Sullivan W., Graves S. y col. Murine monoclonal IgG3 to human colorectal tumor associated antigens: enhancement of antibody-dependent cell mediated cytotoxicity by interleukin 2. Cancer Res. **49:** 2773; 1989.

Morton D.L., Foshag L.J., Hoony D.S.B. y col. Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. Ann. Surg. **216:** 463; 1992.

Moskowitz CH . Conventional treatments for non-Hodgkin's lymphoma: the need for new therapies . J Nucl Med **39**(Suppl):2S; 1998.

Msirikale J.S., Klein JL, Schroeder J, Order SE . Radiation enhancement of radiolabelled antibody deposition in tumors . Int J Radiat Oncol Biol Phys **13**:1839; 1987.

Munn D., Cheung N. Interleukine-2 enhancement of monoclonal antibody- mediated cellular cytotoxicity against melanoma. Cancer Res. **47:** 6600; 1987.

Nagata S. in Cytokine Handbook, 2nd edition, Academic Press A. Thomson editors, New York, p 371, ano.

Nambisan R.N., Alexiou G., Reese P.A. y col. Early metastatic patterns and survival in malignant melanoma. J. Srg. Oncol. **34:** 248; 1987.

Nieuwenhuis H.K., van Oosterhout J.J.G., Rozemuller E. y col. Studies with monoclonal antibody against activated platelets: Evidence that a secreted 53,000- molecular weight

lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. Blood **70:** 838; 1987.

Nishimura T., Uchiyama Y., Yagi H. y col. Administration of slowly released recombinant interleukin-2: Augmentation of the efficacy of adoptive immunotherapy with lymphokine-activated killer (LAK) cells. J. Immunol. Meth. **91:** 21; 1986.

Noguchi H. Application of chimeric and humanized antibodies to autoimmune diseases therapy. Nippon Rinsho **55:** 1549; 1997.

Nordlund J.J. The lives of pigment cells. Dermatol. Clin. **4:** 407; 1986.

Oilert M.W., Kadlec J.V., David K. y col. Antibody-mediated complement activation on nucleated cells. A quantitative analysis of the individual reaction step. J Immunol **153**: 2213; 1994.

Opresko L.K., Wiley H.S. Receptor-mediated endocytosis in *Xenopus* oocytes II. Evidence for two novel mechanism of hormonal regulation. J. Biol. Chem. **262:** 4116; 1987.

Orlandi R., Figini M., Tomassetti A. y col. Characterization of a mouse-human chimeric antibody to a cancer-associated antigen. Int. J. Cancer **52:** 588; 1992.

Paganelli G, Chinol M, Maggiolo M y col. The three-step pretargeting approach reduces the human anti-mouse antibody response in patients submitted to radioimmunoscintigraphy and radioimmunotherapy. J Nucl Med **24**:350; 1997.

Paganelli, G., Orecchia R., Jereczek-Fossa B. y col. Combined treatment of advanced oropharyngeal cancer with external radiotherapy and three-step radioimmunotherapy. Eur. J. Nucl. Med. **25:** 1336; 1998.

Pagliaro L.C., Liu B., Munker R. y col. Humanized M195 monoclonal antibody conjugated to recombinant gelonin: an anti-CD33 immunotoxin with antileukemic activity. Clin. Cancer Res. **4:** 1971; 1998.

Palmiter R.D. Germ line transformation of mice. Annu. Rev. Genet. **20:** 465; 1986.

Pardoll D.M. Cancer vaccines. Immunology Today **14:** 310; 1993.

Parham P. On the fragmentation of monoclonal IgG1, IG2a, and IgG2b from balb-c mice. J. Immunol. **131:** 2895, 1983.

Patel D.D., Bhatavdekar J.M., Chikhlikar P.R. y col. Node negative breast carcinoma: hyperprolactinemia and/or overexpression of p53 as an independent predictor of poor prognosis compared to newer and established prognosticators. J. Surg. Oncol. **62:** 86; 1996.

Pawelek J. Melanoma cells. Methods in enzymology **LVII:** 564; 1979.

Pegram M.D., Lipton A., Hayes D.F. y col. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. J. Clin. Oncol. **16:** 2659; 1998.

Perkins A.C., Pimm M.V. Immunoscintigraphy Practical aspects and clinical applications. Editado por Perkins A.C. y Pimm M.V., Wiley-Liss cap. **7:** 179, 1991.

Podhajcer O.L., Bravo A.I., Sorín I. y col. Determination of DNA synthesis, estrogen receptors, and carcinoembryonic antigen in isolated cellular subpopulations of human breast cancer. Cancer **58:** 720; 1986.

Poste G., Fidler I.J. The pathogenesis of cancer metastasis. Nature **283:** 139, 1980.

Potten C.J., Schofield R., Lajtha L.G. A comparison of cell replacement in bone marrow, testis and three regions of surface epithelium. Biochim. Biophys. Acta **560:** 281; 1979.

Press O., Hansen J., Farr A. y col. Endocytosis and degradation of murine anti-human CD3 monoclonal antibodies by normal and malignant T-lymphocytes. Cancer Res. **48:** 2249; 1988.

Pukel C.S., Lloyd K.O., Travassos I.R. y col. GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and characterization by mouse monoclonal antibodies. J. Exp. Med. **155:** 1133; 1982.

Radford KJ, Mallesch J. and Hersey P. Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma -associated antigen CD63 (ME491). Int. J. Cancer **62:** 631; 1995.

Radford K.J., Thorne R.F., Hersey P. CD63 associates with transmembrane 4 superfamily members, CD9 and CD 81, and β1 integrins in human melanoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. **222:** 13, 1996.

Radford K.J., Thorne R.F., Hersey P. Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in human melanoma cell line. J. Immunol. **158:** 3353, 1997.

Rawles M. Origin of pigment cell from the neural crest in the mouse embrio. Physil. Zool. **20:** 248; 1947.

Reed RJ. The histologic variance of malignant melanoma: The interrelationship of histological subtype, neoplastic progression, and biological behabiour. Pathology **17:** 301: 1985.

Reichmann L., Clark M.R., Waldmann H. y col. Reshaping antibodies for therapy. Nature **332:** 323; 1988.

Reimer R.R., Clark W.H., Green M.H. y col. Precursor lesions in familial melanoma. A new genetic preneoplastic syndrome. JAMA **239:** 774; 1978.

Rhodes B.A., Zamora P.O., Newell K.D. y col. Technetium-99m labeling of murine monoclonal antibody fragments. J. Nucl. Med. **27:** 685; 1986.

Riva P., Marangolo M., Tison V. y col. Treatment of metastatic cancer by means of specific monoclonal antibodies conjugated with iodine-131: a phase II study. Nucl. Med. Biol. Int. J. Appl. Radiat Instrum Part B **18:** 109; 1991.

Robbins P.F., Eggensperger D., Qi C.F. y col. Definition of the expression of the human carcinoembryonic antigen and non-specific cross-reacting antigen in human breast and lung carcinomas. Int. J. Cancer **53:** 892; 1993.

Rosemberg S.A., Packard B.S., Aebersold P.M. y col. Use of TIL and IL-2 in the management of malignant melanoma: a preliminary report. N. Engl. J. Med. **319:** 1676; 1988.

Ross A.H., Damsky C., Phillips P.D., Hwang F., Vance P. Inhibition of epidermal growth factor-induced phosphorylation by trifluoperazine. J Cell Physiol **124**: 499, 1985.

Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. **51:** 660; 1949.

Schibler U., Marcu K.B., Perry R.P. The synthesis and processing of the messenger RNAs specifying heavy and light chain immunoglobulins in MPC-11 cells. Cell **15:** 1495; 1978.

Schlimok G., Funke I., Bock B. y col. Epithelial cells in bone marrow of patiens with colorectal cancer: Immunocytochemical detection, phenotypic characterization and prognostic significance. J. Clin. Oncol. **8:** 831; 1990.

Schlom J., Milenic D.E., Roselli M. y col. New concepts in monoclonal antibody based radioimmunodiagnosis and radioimmunotherapy of carcinoma. Int. J. Rad. Appl. Instrum. Part B, **18:** 425; 1991.

Schwarz A., Steinstrasser A. A novel approach to ^{99m}Tc-labeled monoclonal antibodies. J. Nucl. Med. **28:** Abs 721; 1987.

Shan D., Ledbetter J.A., Press O.W. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. Blood **91**:1644; 1998.

Sharkey R.M., Primus F.J., Shochat D., Goldemberg D.M. Comparison of tumor targeting of mouse monoclonal antibody and goat polyclonal antibodies to carciniembrionic antigen in the GW-39 human tumor-hamster host model. Cancer Res **48:** 1823, 1988.

Sharkey R.M., Blumental R.D., Hansen H.J. y col. Biological considerations for radioimmunotherapy. Cancer Res. **50** (suppl): 964; 1990.

Shin S.I. Use of nude mice for tumorigenicity testing and mass propagation. Meth. Enzimol. **58:** 370; 1979.

Shih L.B., Lu H.H.Z., Xuan H. y col. Internalization and intracellular processing of an anti-B-cell lymphoma monoclonal antibody LL2. Int. J. Cancer **56:** 538; 1994.

Shih L.B., Xuan H., Aminipot R. y col. In vitro and in vivo reactivity of internalizing antibody RS7 with human breast cancer. Cancer Res. **55** (Suppl.): 5857s; 1995.

Sikora L.K., Pinto A., Demetrick D.J. Characterization of a novel neuroglandular antigen (NGA) expressed on abnormal human melanocytes. Int. J. Cancer **39:**138; 1987.

Silvestrini R., Benini E., Daidone M.G. y col. p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. J. Natl. Cancer. Inst. **85:** 965; 1993.

Sjogren S., Inganas M., Norberg T. y col. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. J. Natl. Cancer Inst. **88:** 173; 1996.

Smith H.S., Wolman S.R., Hackett A.J. The biology of breast cancer at the cellular level. Biochim. Biophys. Acta **738:** 103; 1984.

Smith K.A. Interleukin-2: Inception, impact, and implications. Science **240:** 1169, 1988.

Smith M., Bleijs R., Radford K., Hersey P. Immunogenicity of CD63 in a patient with melanoma. Melanoma Res. **7** (Suppl.2): 163; 1997.

Solomon E., Borrow J., Goddart A.D. Chromosome aberrations and cancer. Science **254:** 1153; 1991.

Soule H.D., Vazquez J., Long A. y col. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J. Natl. Cancer Inst. **51:** 1409; 1973.

Stein R., Chen S., Sharkey R.M., Goldenberg D.M. Murine monoclonal antibodies raised against human non-small cell carcinoma of the lung: specificity and tumor targeting. Cancer Res **50**:1330; 1990.

Stenkvist B., Bengtsson E., Dahlqvist B. y col. Predicting breast cancer recurrence. Cancer **50:** 2884; 1982.

Taki T.,Cancer-associated alterations of glycoconjugates--special reference to glycosphingolipids]. Nippon Geka Gakkai Zasshi **97:**123; 1997.

Thakur M.L., De Fulvio J., Richards M.D. y col. Technetium-99m labeled monoclonal antibodies : evaluation of reducing agents. Nucl. Med. Biol. **18:** 227; 1991.

Tedder T.F., Zhou L.J., Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. Immunol. Today **15:** 437, 1994.

Thompson J.A. Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. Tumour Biol. **16:**·10; 1995.

Thompson J.A., Grunert F., Zimmermann W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. J. Clin. Lab. Anal. **5:** 344; 1991.

Thörn M., Ponten F., Bergström R. y col. Clinical an hispatological predictors of survival in patients with malignant melanoma: a population-based study in Sweden. J. Natl. Cancer Inst. **86:** 761; 1994.

Tlsty T.D., Margolin B.H., Lum K. Differences in the rates of gene amplification in nontumorigenic and tumorigenic cell lines as measured by Luria-Delbrück fluctuation analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86:** 9441; 1989.

Trall P.A., Willner D., Lasch S.J. y col. Cure of xenografted human carcinomas by BR96-Doxorubucin immunoconjugates. Science **261:** 212; 1993.

van Bogaert L.J., Maldague P. Histologic classification of pure primary epithelial breast cancer. Hum. Pathol. **9:** 175; 1978.

Van der Bruggen, P.C., Traversari, P. Chomez y col. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science **254:** 1643; 1991.

Vennegoor C., Calafat J., Hageman Ph. y col. Biochemical characterization and cellular localization of a formalin-ressistant melanoma-associated antigen reacting with monoclonal antibody NKI/C-3. Int. J. Cancer **35:** 287; 1985.

Vogelstein B., Kinzler K.W. The multistep nature of cancer. Trends Genet. **9:** 138; 1993.

Vischer U.M., Wagner D.D. CD63 is a component of Weibel - Palade bodies of human endothelial cells. Blood **82:** 1184; 1993.

Vitteta E.S., Stone M., Amlot P. y col. Phase Y immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma. Cancer Res. **51:** 4052; 1991.

Wahl R.L. Experimental Radioimmunotherapy: a brief overview. Cancer (Phila) **73** (suppl): 989;1994.

Wargalla U.C., Reisfeld R.A. Rate of internalization of an immunotoxin correlates with cytotoxic activity against human tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. **86:** 5146; 1989.

Weinberg R.A. Oncogenes and tumor suppressor genes. CA Cancer J. Clin. **44:** 160; 1994.

Welt S., Mattes M.J., Grando R., y col. Monoclonal antibody to an intracellular antigen images human melanoma transplants in *nu/nu* mice. Proc. Natl. Acad. Sci. **84:** 4200; 1987.

Weston J.A. The migration and differentiation of neural crest cells. Adv. Morphol. **8:** 41; 1970.

Wright J.A., Smith E.S., Watt F.M. y col. DNA amplication is rare in normal human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87:** 1791; 1990.

Wright M.D., Tomlinson M.G. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. Immunol. Today **15:** 588; 1994.

Yamamoto T., Ikawa S., Akiyama T. y col. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature **319:** 230; 1986.

Ychow M., Pelegrin A., Faurous P. y col. Phase I/II radio-immunotherapy with Iodine-131-labeled anti-CEA monoclonal antibody F6 F(ab')2 in patients with non-resectable liver metastases from colorectal cancer. Int. J. Cancer **75:** 615; 1998.

Yin Y., Tainsky M.A., Bischoff F.Z. y col. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. Cell **70:** 737; 1992.

Young R.K., Cailleau R.M., Mackay B. y col. Establishment of epithelial cell line MDA-MB-157 from metastatic pleural effusion of human breast carcinoma. In Vitro **9:** 239; 1974.

Zakut, R.S., Topalian, Y. Kawakami y col. Differential expression of MAGE-1, -2 and -3 messenger RNA in transformed and normal human cell lines. Cancer Res. **52:** 5; 1993.

Zamora P.O., Eshima D., Shattuck L.A. y col. Can blood retention of ^{99m}Tc and ^{186}Re labeled antibodies be predicted in vitro by challenge with cysteine?". J. Nucl. Med. **34:** 246; 1993.

Zhang S., Graeber L.A., Helling F. y col. Augmenting the immunogenicity of synthetic MUC1 peptide vaccines in mice. Cancer Res. **56:** 3315; 1996.

Zhang S., Zhang, H.S., Cordon-Cardo, C. y col. Selection of carbohydrate tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry.II. Blood-group related antigens. Int. J. Cancer **73**: 50; 1997.

ABREVIATURAS

AAT	antígeno asociado a tumor
AC	anticuerpo
ADCC	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
ADN	ácido desoxirribonucleico
cADN	ADN complementario
Ag	antígeno
AFP	Alfa-fetoproteína
AMC	anticuerpo monoclonal
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BSA	seroalbúmina bovina
BPB	Azul de bromo fenol
C_c	Complemento de conejo
C_h	Complemento humano
CDR	complementary determinant region
CEA	antígeno carcinoembrionario
CMC	citotoxicidad mediada por complemento
cpm	cuentas por minuto
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DC	células dendríticas (dendritic cells)
% DI	% de la dosis inyectada
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
ECM	Matriz extracelular (extracellular matrix)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción acoplado a enzima (enzyme linked immunosorbent assay)
F-12	Mezcla nutriente de Hank
FBS	suero fetal bovino
FITC	isotiocianato de fluoresceina

G-CSF	factor estimulador de progenitores granulocíticos (granulocyte-colony stimulating factor)
GM-CSF	factor estimulador de progenitores de granulocíticos y macrófagos (granulocyte macrophage -colony stimulating factor)
GD_2	Disialo ganglиósido
GD_3	Trisialo ganglиósido
HACA	respuesta humana anti-quimera (human anti-chimeric antibody)
HAHA	respuesta humana anti-anticuerpo humanizado (human anti-humanized antibody)
HLA	Antígeno leucocitario humano (human leucocyte antigen)
HAMA	respuesta humana anti-anticuerpo murino (human anti-murine antibody)
HAHA	respuesta humana anti-anticuerpo humanizado (human anti - humanized antibody)
HACA	respuesta humana anti-anticuerpo quimérico (human anti - chimeric antibody)
% IC	% inhibición del crecimiento
ICQ	inmunocitoquímica
IF	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	inmunoglobulina
IHQ	inmunohistoquímica
IL-2	Interleuquina-2
IFN	Interferón
ITLC	"instant thin layer chromatography'
Ka	constante de afinidad
LAK	Célula asesina activada por linfoquinas (lymphokine activated killer cell)
MAGE	Melanoma antigen
MDP	metilen difosfonato
MDR	resistencia múltiple a drogas (múltiple drug resistance)
2-ME	2- mercaptoetanol
MEM	medio mínimo esencial Eagle

MO	médula ósea
MTD	dosis máxima tolerada (maximal tolerated dosis)
NOS	carcinomas ductales infiltrantes sin rasgos histológicos especiales (not otherwise specified)
NK	célula asesina natural (natural killer cell)
NRGs	neuregulinas
PBS	buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PEM	mucina epitelial polimórfica
Pg	progesterona
PMN	leucocitos polimorfonucleares
RE	receptor estrogénico
RIA	Radioinmunoensayo
RID	Radioinmunodetección
RIT	Radioinmunoterapia
rpm	Revoluciones por minuto
RPg	receptor de progesterona
SDS	Sodio dodecil sulfato
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
SPECT	"Single photon emission computer tomography"
SSC	Buffer de cloruro y citrato de sodio 20X (175,3 y 88,2 g/l resp., pH 7)
TAG-72	glicoproteína asociada a tumor
TCA	ácido tricloroacético
TIL	Linfocito infiltrante de tumor (tumor infiltrating lymphocyte)
TNF	Factor de necrosis tumoral (tumor necrosis factor)

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Mordoh, por brindarme la posibilidad de integrar su grupo de investigación, por la dirección y supervisión de este trabajo de Tesis y por haberme enseñado muchos de los conocimientos adquiridos en estos años.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" por permitirme desarrollar esta Tesis en el Instituto y por brindarme apoyo económico para finalizar dicho trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme las becas que posibilitaron la realización de la carrera del Doctorado.

A la Fundación Sales, por haberme otorgado una beca que permitió la conclusión esta Tesis y por el importante apoyo económico brindado a nuestro grupo de investigación durante todos estos años.

A la Dra. Laura Bover, para quien no me alcanzan las palabras para agradecerle su apoyo incondicional, su dedicación generosa y paciencia, su amistad y el haberme enseñado a trabajar en el laboratorio. Muchas gracias!!

A la Dra. Inés Bravo, por haber colaborado en varios de los experimentos reportados en esta Tesis, por sus enseñanzas de patología y por su constante entusiasmo.

A todas mis compañeras del Laboratorio 101, Mariana Capurro, Paula Portela, Claudia Kairiyama, Verónica Morvillo, Cecilia Ballaré, Fernanda Ledda, Licia Battaglia y Soraya Adris, con quienes compartí los mejores años de mi vida y por haberme ayudado y acompañado en los buenos y malos momentos.

A la Lic. Silvia Gómez de Castiglia, del Centro Atómico de Ezeiza (CNEA), por haberme permitido realizar parte de este trabajo en su laboratorio y por el apoyo recibido.

A la Dra. Mabel Viaggi por haber colaborado en algunos de los experimentos reportados en esta Tesis, por su amistad, compañerismo y buen humor. A los chicos del laboratorio de Radiofármacos, Juan, Miguel, Ernesto, Irma, Nilda, José, Esteban y Oscar, por brindarme su ayuda cada vez que la necesité y por los buenos momentos compartidos.

A la Dra. Dora Cymberknop y Jorge Arashiro, del departamento de Medicina Nuclear de los hospitales Naval y Angel Roffo, respectivamente, por su generosa colaboración.

A Liliana, Georgina y el personal de la Biblioteca, a Hilda y Rita, a Aída, a la gente de administración y secretaría, al personal de mantenimiento, por su cotidiana contribución y por la ayuda recibida.

A mucha gente de otros Laboratorios del Instituto, en especial al Dr. Luis Quesada Allué y la Dra. Estela Medrano, gracias a quienes pude dar mis primeros pasos en la investigación.

A mis amigos Carlos y Fernanda, Andrés y Mariel, por su cariño, apoyo y estímulo.

A mis padres, por su amor, por instarme siempre a estudiar y mejorar y por su permanente ejemplo en la vida.

A Néstor y Paula, por su comprensión, su apoyo y todo su amor.