



Producción de un anticuerpo monoclonal anti-tumoral y evaluación de su citotoxicidad *in vitro*

Diciembre de 2011

Tutora: Dra. Teresa Freire

Tesina de Grado correspondiente a la
Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Cecilia Carolina Chiale Ferreira

CI 4212134-1

Resumen

A diferencia de los anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales (AcMo) presentan mayor afinidad por un epítotope dado, y son producidos por un único clon de linfocitos B. Los mismos han tenido consecuencias revolucionarias en la investigación biomédica y han resultado en la generación de una industria con gran impacto económico, debido a que sus características los vuelven agentes terapéuticos potentes y prometedores.

Un campo de investigación en el cual los anticuerpos monoclonales son de gran importancia es el cáncer. Los mismos tienen un uso importante en el diagnóstico tumoral (diagnóstico por imagenología o por inmunohistoquímica), así como también en la terapia contra el cáncer, por ejemplo, conjugados a toxinas, o mejorados para aumentar la penetración tumoral o unir al antígeno con más avidéz.

Un antígeno tumoral de gran importancia es el antígeno sialil-Tn (sTn), normalmente asociado a un mal pronóstico en pacientes con cáncer. Dentro de los AcMos existentes capaces de reconocer este antígeno, se encuentra el AcMo B72.3, el cual representa una herramienta prometedora para el diagnóstico y terapias inmunológicas.

En este trabajo produjimos y purificamos el AcMo B72.3. Asimismo evaluamos la capacidad de dicho AcMo de reconocer proteínas tumorales y de mediar la citotoxicidad celular, en ensayos *in vitro*.

Nuestros resultados indican que el AcMo anti-sTn B72.3, puede mediar la citotoxicidad celular *in vitro*, lo que jerarquiza su utilidad como herramienta en inmunoterapia pasiva contra el cáncer.

Índice

<u>Resumen</u>	2
<u>Lista de abreviaturas</u>	4
<u>Introducción</u>	5
Anticuerpos en el sistema inmunológico	5
Anticuerpos monoclonales: Producción y aplicación	8
Cáncer: Generalidades	16
Glicosilación aberrante en cáncer: antígeno sialil-Tn	17
<u>Objetivo</u>	21
<u>Materiales y Métodos</u>	22
Cultivo celular del hibridoma B B72.3	22
Producción de ascitis ricas en B72.3	22
Preparación de OSM, aOSM, dOSM	22
Detección del AcMo B72.3 por ELISA	23
Cromatografía de afinidad	24
SDS-PAGE	25
Cuantificación de proteínas	25
Cultivo celular de la línea murina tumoral TA3/Ha y de macrófagos Raw 264.7 ,y preparación de extracto de TA3/Ha	26
Evaluación del reconocimiento de antígenos tumorales por parte del AcMo B72.3	27
Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos <i>In vitro</i> (ADCC)	27
Puesta a punto del modelo tumoral TA3/Ha en ratones	28
<u>Resultados</u>	29
Producción de ascitis ricas en B72.3	29
Purificación del anticuerpo monoclonal B72.3	31
Evaluación del reconocimiento de antígenos tumorales por parte del AcMo B72.3	36
Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos <i>In vitro</i> (ADCC)	37
Modelo tumoral TA3/Ha en ratones	38
<u>Discusión</u>	40
<u>Conclusiones</u>	45
<u>Bibliografía</u>	46
<u>Agradecimientos</u>	50

Lista de abreviaturas

AcMo	Anticuerpo Monoclonal
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
a-OSM	Mucina submaxilar ovina desialilada
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Seroalbúmina bovina
CDC	Citotoxicidad dependiente del complemento
d-OSM	Mucina submaxilar ovina deglicosilada
ELISA	Enzyme linked immune sorbent assay
GalNAc	N- acetil-Galactosamina
HGPRT	Hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa
HAMA	Human Anti-Murine Antibodies
IgG	Inmunoglobulina de tipo G
i.p.	Intra peritonealmente
MPT	Modificaciones post transcripcionales
OSM	Mucina submaxilar ovina
OPD	O-Phenylenediamine
PBS	Buffer fosfato salino
PA	Fracción de anticuerpos purificada obtenida, utilizando la proteína A
PG	Fracción de anticuerpos purificada obtenida, utilizando la proteína G
RPMI	Roswell Park Memorial institute 1640
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
sTn	Sialil-Tn
WST-8	2 - (2-metoxi-4-nitrofenil) -3 - (4-nitrofenil)-5 - (2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolio, sal monosódica

Introducción

ANTICUERPOS EN EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

Los anticuerpos son las proteínas de unión a antígenos presentes en la membrana de los linfocitos B y secretadas por las células plasmáticas. El anticuerpo unido a membrana le confiere la especificidad antigénica a los linfocitos B, cuya proliferación es inducida luego de la interacción del anticuerpo de membrana con el antígeno, en presencia de señales accesorias. Los anticuerpos secretados circulan por la sangre, donde sirven como efectores de la inmunidad humoral, uniéndose y neutralizando antígenos, o marcándolos para su eliminación. Todos los anticuerpos comparten ciertas características estructurales, se unen al antígeno y participan en varias funciones efectoras. Los anticuerpos que se producen en respuesta a un antígeno dado, son heterogéneos; esto se debe a que la mayoría de los antígenos son complejos y contienen varios determinantes antigénicos, lo que provoca que el sistema inmune responda usualmente produciendo anticuerpos contra varios epítopes en el antígeno. Ésta respuesta requiere el reclutamiento de varios clones de linfocitos B, cada uno de los cuales genera un anticuerpo monoclonal (AcMo). En conjunto, estos anticuerpos monoclonales forman el suero policlonal, producido en respuesta a la inmunización con un antígeno [1].

Las moléculas de anticuerpos tienen una estructura común de cuatro cadenas peptídicas. Esta estructura consiste en dos cadenas pesadas idénticas, de 50 kDa o más, y en dos cadenas livianas idénticas de aproximadamente 25 kDa. La unión entre una cadena pesada y una liviana está dada por un puente disulfuro y por interacciones no covalentes, como interacciones iónicas, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, para formar un heterodímero. La unión entre heterodímeros está dada del mismo modo, por interacciones no covalentes y puentes disulfuro, de esta manera se forma la estructura básica del anticuerpo (Figura 1A). Así, cuando están

completamente plegados y juntos, una molécula de anticuerpo comprende tres porciones del mismo tamaño unidas por una cadena polipeptídica flexible conocida como región bisagra [1].

Los primeros 110 aminoácidos de la región amino terminal de una cadena liviana o pesada, varían mucho entre anticuerpos de distinta especificidad. Estos segmentos de secuencia altamente variable se denominan regiones V: VL en las cadenas livianas y VH en las pesadas (Figura 1A). La diferencia de especificidad entre los distintos anticuerpos se debe a diferencias en la secuencia aminoacídica de las regiones V. De hecho, la mayoría de las diferencias entre anticuerpos se hallan en áreas de las regiones V denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), y estas regiones constituyen el sitio de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo. Las regiones de secuencia relativamente constante por fuera de las regiones variables se denominan regiones C, CL para la cadena liviana, y CH en la pesada.

Las cadenas livianas pueden ser de dos tipos: kappa o lambda. En ratones, el 95% de las cadenas livianas son kappa y solo el 5% son lambda, mientras que en humanos, aproximadamente el 60% de las cadenas son kappa y el 40% son lambda [1].

En el caso de las cadenas pesadas, existen 5 tipos: α , ϵ , γ , δ y μ . Las cadenas pesadas de un anticuerpo determinan la clase o isotipo del anticuerpo: IgM, IgG, IgA, IgD o IgE. Diferencias menores en las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas α y γ llevan a una clasificación más fina de las moléculas de anticuerpos que constituyen, en subtipos de cadenas alfa y de cadenas gama [1].

Con el fin de diseccionar la estructura de las moléculas de anticuerpo y determinar qué partes son responsables de sus distintas funciones, se han utilizado enzimas proteolíticas (proteasas), que clivan secuencias de polipéptidos. La digestión limitada con la proteasa papaína, cliva la molécula de anticuerpo en tres fragmentos (Figura 1B). Dos de ellos son idénticos, contienen la actividad de unión al antígeno y se denominan fragmentos Fab ("fragment antigen binding"). Los fragmentos Fab contienen la cadena ligera completa emparejada con los dominios VH y CH1 de la

cadena pesada. El otro fragmento no presenta actividad de unión al antígeno, pero se observó que cristaliza rápidamente, por lo cual se denomina fragmento Fc (fragmento cristalizante). Las diferencias funcionales entre los isotipos de cadena pesada residen principalmente en el fragmento Fc.

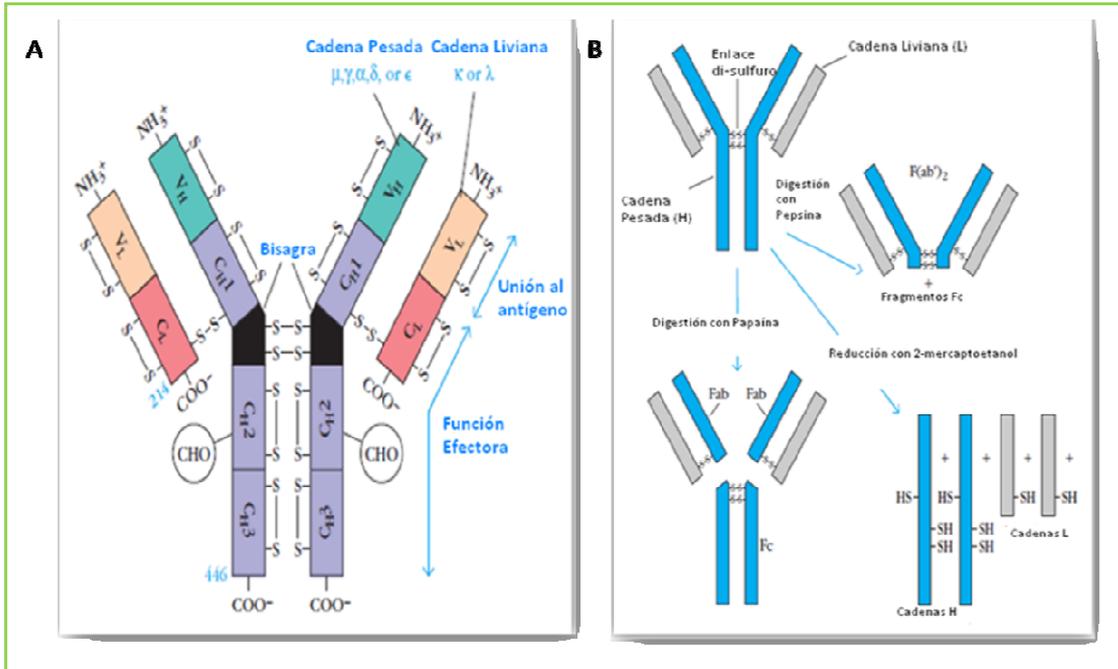


Figura 1- Estructura de los anticuerpos. (A) Pueden observarse las regiones variables, los puentes disulfuro que conectan las cadenas livianas y pesadas, así como también la región bisagra. (B) Estructura de una molécula de IgG, y el resultado de la misma bajo el tratamiento de proteasas, o condiciones reductoras. Figura extraída y adaptada de [1].

Otra proteasa, la pepsina corta en la misma región que la papaína, pero en el lado carboxi-terminal de los puentes disulfuro (Figura 1B), produciendo un fragmento $F(ab')_2$ en el que los dos brazos de unión del antígeno de la molécula de anticuerpo permanecen unidos. En este caso, la porción restante de la cadena pesada es cortada por la proteasa en diversos fragmentos pequeños [2].

El tratamiento con β -mercaptoetanol de una molécula de anticuerpo de tipo IgG, aportó información clave acerca de la estructura de la misma (Figura 1B). Al someterla a un tratamiento reductor, se rompen los puentes disulfuro que unen las cadenas pesadas y las livianas. Si se realiza una corrida electroforética de una molécula de anticuerpo, de 150 kDa de peso molecular, tratada con β -mercaptoetanol, se observa que contiene dos subunidades de 50 kDa (cadenas pesadas) y dos cadenas de 25 kDa (cadenas livianas) (Figura 1B).

ANTICUERPOS MONOCLONALES: PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN

La mayoría de los antígenos tienen epítopes diversos, y por ende inducen la proliferación y diferenciación de una variedad de clones de linfocitos B, cada uno de los cuales reconoce un epítope dado. Los anticuerpos séricos resultantes son heterogéneos, y comprenden una mezcla de anticuerpos, cada uno específico para un epítope. Este tipo de anticuerpos con diferente capacidad de reconocer y unirse al antígeno se denominan anticuerpos policlonales. Tales respuestas de anticuerpos policlonales facilitan la localización, fagocitosis y lisis mediada por anticuerpos y tienen, por ende, grandes ventajas para el organismo que las genera. Sin embargo los AcMos, presentan mayor afinidad por un epítope dado y están producidos por un único clon de linfocitos B. Mientras que la heterogeneidad de anticuerpos aumenta la protección *in vivo*, muchas veces reduce la eficacia de un anticuerpo para sus usos *in vitro*. Debido a esto, los AcMos han tenido consecuencias revolucionarias en la investigación biomédica y han resultado en la generación de una industria con gran impacto económico [3]. Esto se debe a que, como se mencionó, la mayoría de los antígenos consiste de una mezcla de epítopes, y la respuesta de anticuerpos será dirigida contra muchas regiones diferentes. Algunas regiones son más inmunogénicas que otras, y por tanto son capaces de provocar una respuesta inmune más pronunciada. Los AcMos son específicos de un único epítope, permitiendo especificidad extrema

Por décadas, los inmunólogos buscaron formas de producir anticuerpos homogéneos de una especificidad determinada. En 1975 Köhler y Milstein describieron una forma de producir AcMos de origen murino, empleando los anticuerpos que normalmente producen las células del bazo del ratón [3]. Su trabajo consistió en fusionar linfocitos B productores de anticuerpos, con una línea celular de mieloma no secretante (Figura 2). Como primer paso, comenzaron inmunizando ratones con un antígeno determinado (glóbulos rojos de oveja). Luego, colectaron las células del bazo (conteniendo células B activadas) y las fusionaron con una línea celular de mieloma, usando polietilenglicol. La línea celular de mieloma, es deficiente en HGPRT (hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa) y por lo tanto mueren en un medio que contenga hipoxantina, aminopterinina y timidina (medio HAT). Por lo cual el cultivo en este medio, implica que dichas células no vivan más que una semana aproximadamente. A su vez, las células inmunológicas, aunque no son sensibles a HGPRT, sobreviven sólo alrededor de una semana en cultivo. Las únicas células que pueden sobrevivir son las células del mieloma híbridas que obtuvieron un gen HGPRT normal de las células inmunes. Estos hibridomas pueden crecer continuamente *in vitro* y algunos secretan anticuerpos. Mediante el uso de la tecnología de detección adecuada, los clones de células que secretan anticuerpos de interés pueden ser identificados y expandidos *in vitro* o *in vivo* para obtener grandes cantidades de AcMos que posteriormente pueden ser purificados hasta la homogeneidad [4, 5].

El primer AcMo terapéutico comercial de origen murino producido mediante la técnica del hibridoma fue aprobado en 1986, el OKT3 cuyo nombre genérico es muromanab-CD3 indicado para el rechazo de injertos [6, 7]. Sin embargo, su uso clínico presenta importantes limitaciones derivadas de su origen no humano como por ejemplo una corta vida media en sangre, un ineficiente reclutamiento de funciones efectoras y problemas inmunológicos. En una proporción importante de los pacientes tratados con este tipo de anticuerpos se desarrolla una respuesta de anticuerpos humanos anti-inmunoglobulinas murinas (HAMA, del inglés *Human Anti-Murine Antibodies*), provocando en algunos casos la pérdida de eficacia, y en otros una reacción inmune generalizada. Esto dio lugar al desarrollo de nuevas tecnologías de producción de

AcMos en las que, mediante ingeniería genética, es posible construir anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos. Los anticuerpos quiméricos conservan únicamente secuencias génicas de ratón para las regiones variables del anticuerpo. Los anticuerpos humanizados poseen hasta un 90% de secuencia genética humana y, finalmente, los anticuerpos totalmente humanos derivan completamente de genes humanos (Figura 3) [6, 7].

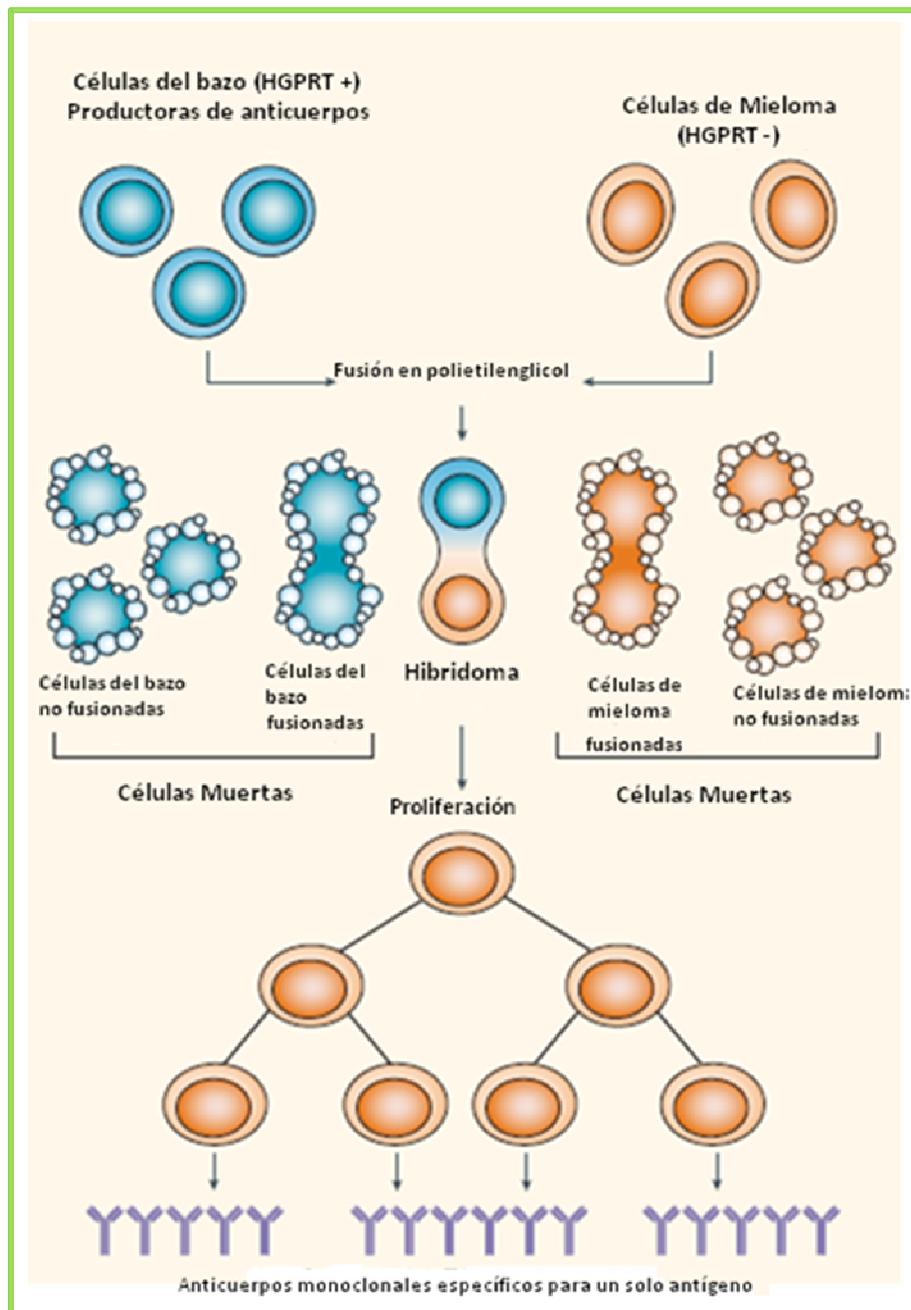


Figura 2- Fusión celular de las células de mieloma y las células plasmáticas (células B) y producción de anticuerpo monoclonal. Figura extraída y modificada de [5].

En la actualidad, el uso de hibridomas sigue siendo una técnica utilizada para la producción de AcMos. Existen hibridomas que se comercializan, y que a su vez pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos *in vivo*, es decir mediante la inyección de los hibridomas en ratones. Presentando éstos, la limitación para su uso en humanos. A su vez, es posible la producción de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos mediante técnicas de Ingeniería Genética que posibilitan la construcción de secuencias génicas híbridas de ratón y humanas. Tanto la generación de anticuerpos monoclonales quiméricos (proceso de quimerización) como el proceso de humanización son algunas de las estrategias utilizadas para disminuir la antigenicidad y mantener la afinidad y especificidad de unión de los anticuerpos [6]. Siendo un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal que fue generado en ratón, pero que presenta la región Fc de humano y conservando únicamente la región variable murina, por lo tanto presenta alta especificidad contra el antígeno deseado. Este anticuerpo, si bien es menos inmunogénico que el anticuerpo de ratón, sigue siendo capaz de generar una respuesta inmune no deseada, motivo por el cual se han desarrollado los anticuerpos humanizados. Dichos anticuerpos únicamente mantienen las regiones CDRs de los anticuerpos murinos, mientras que el resto de las regiones son humanas. Éste anticuerpo resultante presenta afinidad por el antígeno de interés, y a su vez resulta poco inmunogénico, pues apenas mantiene un 5% de ratón (Figura 3).

A mediados de los años 90, y gracias al desarrollo de las técnicas de Biología Molecular entre otras, se han obtenido distintos modelos de ratones transgénicos portadores de genes para las inmunoglobulinas humanas. Dichos genes (transgenes) que portan estos ratones posibilitan el desarrollo de una gran población de linfocitos B productores de un amplio repertorio de anticuerpos humanos. Los animales pueden ser inmunizados con cualquier antígeno y utilizar sus bazos para la obtención de hibridomas mediante el protocolo convencional. La producción de AcMos murinos mediante la tecnología de hibridoma es relativamente sencilla, en cambio la producción de anticuerpos humanos mediante la generación de hibridomas humanos es dificultosa debido a la baja productividad. Por todo esto, tiene lugar el desarrollo de otras tecnologías alternativas

a la generación de hibridomas para la producción de anticuerpos humanos. Estas tecnologías incluyen la producción de fragmentos de anticuerpos mediante la tecnología “Phage-Display” y su expresión en *E. coli* u otras células [6, 7].

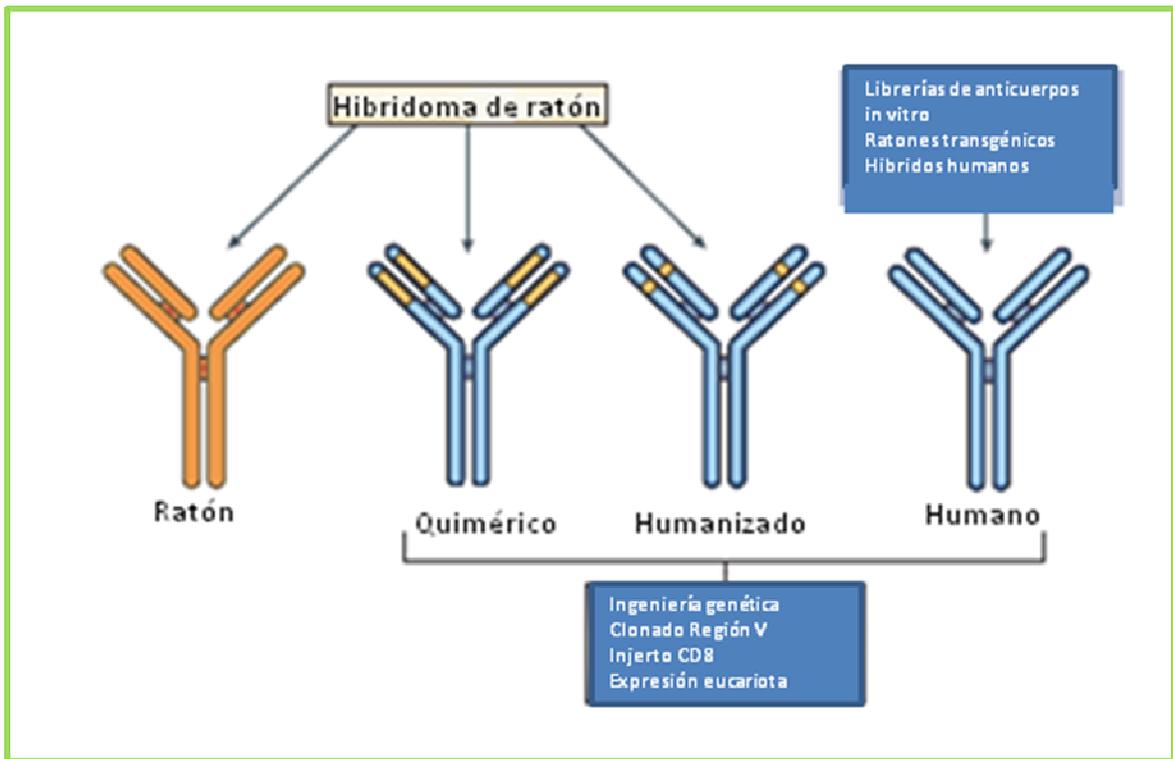


Figura 3 Esquema de un anticuerpo murino, y las variantes que es posible obtener gracias a diversas técnicas. Figura extraída y modificada de [8].

Los fagos, son virus que infectan bacterias. Mediante técnicas de ingeniería genética es posible manipular el contenido genético del fago, e insertar en su genoma la secuencia de ADN que se busca. Gracias a este proceso, cuando un fago recombinante portador de ADN codificante para un anticuerpo infecta una bacteria, se producen nuevos fagos que expresan en su superficie los anticuerpos de interés unidos a una de las proteínas del fago. Los fagos así producidos deben de ser seleccionados posteriormente al ponerse en contacto con el antígeno conocido. Los fagos portadores de anticuerpos en su cubierta capaces de unirse al antígeno, son seleccionados y empleados nuevamente

para infectar bacterias con el fin de producir nuevos virus portadores de anticuerpos [9].

Otra forma actual que existe para la producción de AcMos es la tecnología del “Ribosome Display”, la cual produce fragmentos de AcMos. Mediante este procedimiento también es posible generar bibliotecas de genes de anticuerpos, al igual que ocurre con la tecnología Phage-Display. Esta tecnología está basada en la síntesis de fragmentos de AcMos *in vitro* a través de los componentes celulares esenciales para ello como son los ribosomas, sin emplear células como factorías de producción de estas glicoproteínas [6, 10].

Una nueva aproximación pionera en fase de investigación es la alternativa que ofrecen las plantas para la producción de AcMos. La producción de anticuerpos tanto en cultivos de células vegetales como en plantas, ofrecería ciertas ventajas como el aumento de productividad y la reducción de costos. Un ejemplo de este tipo de producción, es la expresión de AcMos humanos en la pequeña planta acuática *Lemna minor*, que ofrece varias ventajas para la fabricación de proteínas terapéuticas libres de patógenos zoonóticos [10].

De la misma manera que existen en la actualidad nuevas formas de producción de estos anticuerpos, se han encontrado numerosas aplicaciones para los mismos. El uso de AcMos es de gran utilidad en inmunoensayos, donde puede utilizarse con el fin de monitorear drogas, citoquinas, factores tisulares así como también la identificación de distintas moléculas. Son importantes en la terapia, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades pulmonares y de prevención de isquemia cardíaca, entre otras [6]. Los AcMos, son a su vez de gran utilidad en el diagnóstico imagenológico. Los mismos pueden ser diseñados para cumplir con varios criterios de imagenología *in vivo*. En primer lugar, es necesario que se unan a sus antígenos diana con alta especificidad y afinidad. En segundo lugar, el “clearance” de la sangre debe ser optimizado para permitir imágenes de alto contraste en corto período de tiempo. En tercer lugar, es necesario tener una baja inmunogenicidad [11].

Uno de los usos quizás más importantes, es la utilización de los mismos en la terapia del cáncer. Terapias a base de anticuerpos se han convertido en componentes importantes de los tratamientos para un número creciente de cánceres humanos [12]. Algunos de los AcMos actualmente utilizados pueden verse en la tabla 1.

Los AcMos de utilidad clínica disponibles, suelen utilizar una combinación de mecanismos para dirigir los efectos citotóxicos a una célula tumoral. La mayoría interactúa con componentes del sistema inmune a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o a través de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y muchos alteran la transducción de señales dentro de la célula tumoral, o actúan para eliminar un antígeno crítico de la superficie celular. Los AcMos también se pueden utilizar para orientar las cargas útiles (por ejemplo, radioisótopos, drogas o toxinas), para matar directamente las células tumorales, para bloquear receptores, o la actividad biológica de proteínas, así como también neutralizar antígenos, o para activar profármacos específicamente en el tumor (anticuerpos de terapia dirigida profármaco enzima, ADEPT). Por último, los AcMos se pueden utilizar de forma sinérgica con agentes quimioterápicos tradicionales, atacar los tumores mediante mecanismos de acción complementarios que pueden incluir la respuesta inmune anti-tumoral, que puede haberse visto comprometida debido a la quimioterapia citotóxica y sus efectos secundarios en los linfocitos T [12].

La ADCC, ocurre cuando los anticuerpos se unen a antígenos en las células tumorales y los dominios Fc del anticuerpo, se unen a Receptores Fc (FcR) en la superficie de células efectoras inmunes. Varias familias de los receptores Fc han sido identificados, y poblaciones celulares específicas expresan característicamente receptores Fc [12]. En este tipo de proceso, luego de la unión del anticuerpo al receptor, la célula efectora se activa, produciendo la liberación de enzimas citotóxicas, como ser la perforina y la granzima, las cuales llevan al desencadenamiento de la muerte por apoptosis de la célula tumoral.

Tabla 1- AcMos aprobados para su uso en oncología. Extraída y modificada de [12].

Nombre Genérico	Origen	Isotipo y formato	Especificidad	Indicación	Año aprobado por FDA*
AcMos No conjugados					
Trastuzumb (Herceptin)	Humanizado	IgG1 Humana	HER2/neu	Cancer de mama	1998
Rituximab (Rituxan)	Quimera humana-murina	IgG1 Humana	CD20	Linfoma	1997
Cetuximab (Erbix)	Quimera humana-murina	IgG1 Humana	receptor EGF	Cancer colorectal	2004
Bevacizumab (Avastin)	Quimera humana-murina	IgG1 Humana	VEGF	Cancer colorectal, de pulmón	2004
Alemtuzumab (Campath -1H)	Humanizado	IgG1 Humana	CD52	Leucemia linfoide crónica	2001
Inmuno-conjugados					
Ibritumomab Tiuxetan (zevalin) junto con rituximab	Murino	IgG1 murina radio-marcada ⁹⁰ Y	CD20	Linfoma	2002
Tositumomab y ¹³¹I tositumomab (Bexxar)	Murino	IgG2a murina radio-marcada ¹³¹ I	CD20	Linfoma	2003
Gemtuzumab (Myelotarg)	Humano (droga derivada de Streptomyces)	IgG4 humana conjugada a caliqueamicina	CD33	Leucemia linfoide aguda	2000

*FDA -"Food and drug administration"

Asimismo, los AcMos pueden ser usados para Identificar un gran número de blancos asociados a cáncer, como ser: células tumorales en vasos sanguíneos (factores de crecimiento vascular como el VEGF); Linfocitos B o T como es el caso de leucemias o linfomas; células dentro de un tumor sólido o asociadas al estroma como fibroblastos [12]. A modo de ejemplo, actualmente se estudia una estrategia para el desarrollo de AcMos, cuyo blanco sea las células madre de la leucemia mieloide aguda (LMA). La misma implica identificar primero antígenos de superficie celular expresados

preferentemente en las células madre de LMA en comparación con las células madre hematopoyéticas normales [13].

CÁNCER: GENERALIDADES

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por un trastorno de la proliferación y el comportamiento celular que lleva al tumor a una conducta “asocial” con el huésped donde las células crecen sin seguir patrones morfológicos ni funcionales, invadiendo tejidos circundantes y distantes [14].

En la mayoría de los tejidos animales, existe un balance entre proliferación y muerte celular. Debido a este balance es que, las células envejecidas o dañadas son renovadas, y en condiciones normales, la cantidad de células de un mismo tipo suele permanecer constante [15]. No obstante, ocasionalmente algunas células pierden la capacidad de responder a mecanismos de control del crecimiento y pueden dar lugar a tumores. Los tumores así generados son incapaces de invadir el tejido sano adyacente, denominándose tumores benignos, o pueden persistir en ese crecimiento y adquirir características particulares que promuevan su capacidad de invasión. En este caso, el tumor, capaz de colonizar otros tejidos se denomina tumor maligno o cáncer [1].

La transformación maligna se asocia con cambios fenotípicos, que influyen en el comportamiento celular. De hecho, las células transformadas muestran diferencias notables en algunos procesos biológicos tales como la adhesión celular, la proliferación y la motilidad celular. Estas propiedades permiten que las células tumorales proliferen, invadan y formen metástasis en el organismo [16].

Existen más de 100 tipos diferentes de cáncer, así como una variedad de subtipos de tumores para cada órgano, lo que le confiere a la enfermedad complejidad y heterogeneidad. Esta heterogeneidad tiene efectos directos sobre el pronóstico y la respuesta a diversos tratamientos [17].

La importancia que presenta el estudio del cáncer, es que ésta enfermedad, es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo responsable de aproximadamente el 13% de las muertes totales. Según la Organización Mundial de la Salud, el 70% de las muertes por cáncer ocurren en países de bajos a medianos ingresos, y se pronostica que las muertes debido a esta enfermedad continuarán aumentando, llegando hasta 12 millones de muertes en el 2030 [18]. En Uruguay, los tumores malignos representan la segunda causa de muerte (luego de las enfermedades cardiovasculares), dando cuenta de cerca del 25% del total de los fallecimientos [19].

GLICOSILACIÓN ABERRANTE EN CÁNCER: ANTÍGENO SIALIL-TN

Las modificaciones post-traduccionales (MPTs) son el conjunto de modificaciones covalentes de los aminoácidos de una proteína, catalizadas típicamente por enzimas extremadamente específicas del sustrato, que a su vez están ellas mismas bajo un estricto control por MPTs. Luego de ser sintetizadas, las cadenas polipeptídicas están sujetas a diferentes tipos de procesamientos post-traduccionales en diferentes compartimentos celulares, incluyendo el núcleo, el citosol, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Estos procesos, ocurren durante o luego del plegamiento, e involucran un procesamiento enzimático que puede incluir la remoción de uno o más aminoácidos del extremo amino-terminal, un clivaje proteolítico, así como la adición de grupos acetilo, fosfatos, glicanos, grupos metilo u otros grupos a ciertos residuos de aminoácidos. Dichas modificaciones pueden conferir varias propiedades estructurales y funcionales a las proteínas afectadas [20].

Una de las modificaciones post-traduccionales más frecuentes es la glicosilación, la cual es de gran relevancia para varios procesos celulares como ser la secreción, el transporte de las moléculas a regiones sub-celulares específicas, la regulación de la actividad enzimática y conferir estabilidad y solubilidad a las proteínas secretadas [21].

Las moléculas involucradas en la transformación y los procesos de metástasis, expresadas en la superficie de las células cancerosas o secretadas por estas células, pueden ser detectadas por el sistema inmune, y por eso son generalmente llamados Antígenos Asociados a Tumores (AAT). Muchos de estos AAT están constituidos por estructuras carbohidratadas, y son la consecuencia de desajustes en las vías de glicosilación de las células cancerosas. Varios estudios han establecido la importancia funcional de la glicosilación aberrante en la progresión tumoral y la metástasis. De hecho, los glicanos son fundamentales para la biología de la célula, y en el cáncer, participan en la adhesión de células tumorales, la migración, la movilidad, invasión, la angiogénesis, la metástasis y la proliferación [22].

La glicosilación ocurre por la unión de una o más cadenas oligosacáridicas a la secuencia de aminoácidos. Las dos formas principales de glicosilación de proteínas en mamíferos son la *N*-glicosilación y la *O*-glicosilación, designadas así por el tipo de enlace glicosídico que se forma con el aminoácido [23]. De los varios tipos de *O*-glicosilación existentes, la más abundante es la de tipo mucina. La misma se encuentra determinada por la unión covalente de un residuo de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), a través de un enlace α a los grupos hidroxilo de las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos de serina o treonina [24]. Esta ocurre en el aparato de Golgi, y está catalizada por enzimas denominadas glicosiltransferasas, que emplean como precursores nucleótidos unidos a azúcares [25]. La estructura inicial de la *O*-glicosilación tipo mucina es el antígeno Tn [26].

Este antígeno, puede a su vez ser sialilado posteriormente, dando lugar a lo que se conoce como antígeno sialil-Tn (sTn). Dicho antígeno se encuentra asociado a un mal pronóstico de pacientes con cáncer [27]. Además se ha reportado que las células tumorales expresando el antígeno sTn, así como la enzima que lo sintetiza, α 6-sialiltransferasa (ST6GalNAc-I), presentan un aumento en la migración celular, así como una reducción en la adhesión celular, lo que podría estar relacionado con un aumento en las metástasis [28].

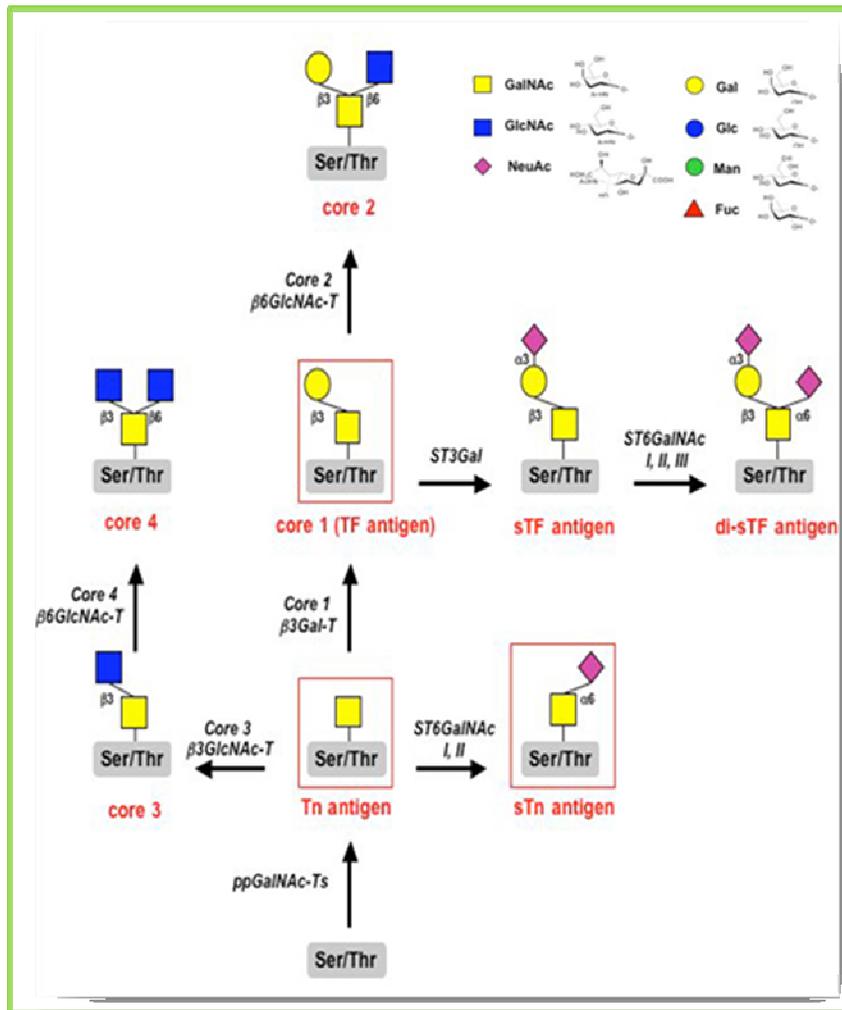


Figura 4 Biosíntesis de O-glicanos tipo mucina. La O-glicosilación comienza con la adición de GalNAc a una Ser o Thr de una proteína por parte de la enzima ppGalNAc-Ts (polypeptide-N-acetyl- α -galactosaminiltransferasas). Posteriormente diversos residuos pueden ser añadidos, como ser el ácido siálico, mediante la enzima α 6-sialiltransferasa (ST6GalNAc-I o II), o residuos de N-actilglucosamina (GlcNAc), galactosa (Gal), fucosa (Fuc) son añadidos de manera secuencial con diferentes tipos de enlaces, resultando por ello en diferentes O-glicanos. Figura extraída y adaptada de [22].

Este antígeno, puede encontrarse en numerosos tipos de cáncer, como ser cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de colon, de próstata, de ovario, de pulmón, de mama, de próstata y de páncreas [22].

Existen varios AcMos específicos del antígeno sTn, los cuales presentan diferencias en la forma en que lo reconocen [29]. Dentro de ellos, el primero en haber sido descrito

es el AcMo B72.3 [30, 31]. El mismo ha sido generado después de la inmunización de ratones con células de carcinoma de mama humano y posteriormente se encontró que reaccionaba con el epítoto sialil-Tn [32].

Este anticuerpo es del tipo IgG, subclase IgG1, y reacciona preferentemente con antígenos sTn en “clusters”, si bien de todas formas es capaz de reaccionar con monómeros de éste antígeno. Sin embargo puede reaccionar en forma cruzada con “clusters” del antígeno Tn, no pudiendo hacerlo con monómeros del mismo [32].

Por otro lado, el AcMo B72.3 se ha usado clínicamente para radioinmunoimagen de adenocarcinomas y podría tener aplicaciones en inmunoterapia [32].

Junto con otros AcMos contra sTn (TKH2 y CC49), existe un Kit de diagnóstico *in vitro*, usado para monitorear la presencia en la circulación de mucinas portando el antígeno sTn presente en pacientes con cáncer, sobretodo utilizado para diagnóstico de cáncer gástrico [33, 34].

Debido a sus características, presenta un atractivo especial, a la hora de investigación en terapia para el cáncer.

Objetivos

El objetivo de este trabajo fue la producción, purificación y evaluación del potencial citotóxico del AcMo anti-tumoral, B72.3.

Los objetivos específicos fueron:

- Producción de B72.3 a partir de la utilización de un modelo *in vivo*.
- Purificación del AcMo B72.3 por cromatografía de afinidad.
- Comparación del rendimiento de la purificación utilizando agarosa conjugada a proteína A o a proteína G.
- Evaluación del reconocimiento del anticuerpo por antígenos tumorales.
- Evaluación de la capacidad de B72.3 de mediar la citotoxicidad de células tumorales en ensayos *in vitro*.
- Puesta a punto de un modelo de crecimiento tumoral en ratones, utilizando la línea de cáncer de mama murino TA3/Ha.

Materiales y Métodos

CÉLULAS UTILIZADAS

Se utilizaron hibridomas B B72.3 que fueron gentilmente cedidos por el laboratorio de Glicobiología tumoral, del Instituto Pasteur, Uruguay.

También se utilizaron la línea celular RAW 264.7, disponible en forma comercial.

Del mismo modo se trabajó con células TA3/Ha, disponibles también en forma comercial.

CULTIVO CELULAR DEL HIBRIDOMA B B72.3

Para poder obtener el AcMo anti-sialil-Tn, B72.3 fue necesario cultivar el hibridoma B productor de dicho anticuerpo, que sería luego inyectado en los animales, de forma tal de provocar el desarrollo de ascitis.

El hibridoma B B72.3, fue cultivado en medio Roswell Park Memorial institute 1640 (RPMI), conteniendo L-glutamina (2.05 mM), y suplementado con suero fetal bovino concentración final 10%, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (0.1 mg/mL), a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.

PRODUCCIÓN DE ASCITIS RICAS EN B72.3

Ratones BALB/c hembras de 10 a 12 semanas de edad fueron pristinizados intra peritonealmente (i.p.) (0.5-0.8 ml pristano por ratón). Luego de 7 días, se administraron 5×10^6 células del hibridoma B, productoras de B72.3, por ratón.

La aparición de ascitis fue detectada a partir del quinto día luego de la administración de células, realizándose las recolecciones entre los días 10-20. Dicha ascitis fue centrifugada y el sobrenadante fue evaluado por ELISA para detectar la presencia de AcMo B72.3.

PREPARACIÓN DE OSM, AOSM Y DOSM

Como fuente del antígeno s-Tn se utilizó la mucina submaxilar ovina (OSM). Su variante de-sialilada (aOSM), expresa el antígeno Tn. La variante de-glicosilada (dOSM) se utilizó como control negativo pues la misma no posee ninguno de los dos antígenos.

La proteína OSM fue aislada de la glándula submaxilar de oveja según el procedimiento previamente descrito [35].

Para obtener la aOSM, se llevó a cabo el proceso de *Desialilación Química*. La liberación del ácido siálico de la OSM se realizó incubando con ácido clorhídrico 0,01 N durante 1 hora a 80 °C. Luego, se enfrió en baño de agua hasta temperatura ambiente, se neutralizó utilizando hidróxido de sodio 1 N y posteriormente, se dializó durante 24 horas contra solución de buffer fosfato salino (PBS) o buffer acetato de sodio 50 mM pH 4.5, según si iba a ser utilizado como estándar de contenido Tn o para la posterior deglicosilación química, respectivamente.

Con el fin de obtener dOSM, se efectuó una *Deglicosilación Química Total*. La misma se realizó a partir de aOSM dializada contra buffer acetato de sodio 50 mM pH 4.5, la cual se incubó con 10 mM de periodato de sodio durante 1 hora a temperatura ambiente, y luego se dializó durante 24 horas contra PBS.

DETECCIÓN DEL AcMo B72.3 POR ELISA

La detección del anticuerpo fue realizada mediante la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). La misma se basa en la interacción antígeno-anticuerpo, permitiendo identificar a uno u otro dependiendo del formato utilizado. En este caso se utilizó el método indirecto, variable del ensayo en la cual el antígeno se encuentra ligado a la placa, existe un anticuerpo primario que se une a este antígeno, el cual es reconocido por un segundo anticuerpo que se encuentra conjugado a una enzima, a la cual se le agrega luego su sustrato para generar de esta forma una reacción de color que permite detectar la presencia de anticuerpos.

En particular, para la detección del AcMo B72.3 se sensibilizaron placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca) con OSM, a una concentración de 125 ng/mL, toda la noche a

temperatura ambiente. Posteriormente, se efectuaron 3 lavados con buffer PBS con 0.1% Tween 20 (solución de lavado), seguido del bloqueo, el cual se realizó con gelatina 1% en PBS (PG) durante una hora a 37°C. Luego de 3 lavados en PBS-Tween 0.1%, se incubaron las muestras conteniendo el anticuerpo B72.3 (sobrenadantes de cultivo, ascitis o anticuerpo puro) diluido en PBS conteniendo 0.05% de gelatina y 0.05% de Tween (PTG) por una hora a 37°C. A continuación se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.1%, para luego incubar durante 1 hora a 37°C con el anticuerpo secundario. El anticuerpo utilizado en este ensayo fue el anti-ratón polivalente conjugado a la peroxidasa (SIGMA, EE.UU). Luego, se llevaron a cabo 3 lavados con PBS-Tween 0.1% para posteriormente incubar con la solución de revelado. El revelado consistió en O-Phenylenediamine (OPD) (Sigma-Aldrich, EE.UU) y peróxido de hidrógeno (4 µL/mL) en buffer citrato-fosfato 0.1 M pH 5, y el desarrollo de color fue cuantificado con un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS) midiendo absorbancia a 492 nm. Como controles negativos de la técnica se consideraron los valores de absorbancia sin antígeno, y/o sin anticuerpo secundario. El control positivo correspondió a anticuerpo B72.3 ya purificado a una concentración de ().

En determinadas ocasiones se utilizó una variante de la técnica descrita, en la cual se realizó la sensibilización con el antígeno durante 1 hora a 37°C, y se acortaron los tiempos restantes de incubación a 37° a 40 minutos (ELISA rápido).

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La purificación del AcMo B72.3 se realizó por cromatografía de afinidad. Esta es una técnica de purificación que se basa en una interacción reversible con la proteína de interés y un ligando unido a la matriz cromatográfica, como por ejemplo la unión de un anticuerpo a un antígeno [36].

En este caso, la purificación del AcMo B72.3 (isotipo IgG1) se realizó utilizando agarosa conjugada a proteína A (Sigma-EE.UU) o a Proteína G (Sigma-EE.UU).

Como primer paso fue necesario equilibrar la columna, para lo cual se realizó un lavado con el buffer de unión, buffer A o "binding buffer" (NaH₂ PO₄ 0.02 M, NaCl 0.15 M pH 8.0) utilizando 10 volúmenes de columna; considerando que el volumen de

columna para la proteína A fue de 5 mL y para la proteína G de 1 mL. Posteriormente, se re-circuló por la columna la ascitis diluida en “binding buffer”, al menos 5 veces. Luego se lavó con 5 a 10 volúmenes de columna en buffer de unión. Subsiguientemente, se procedió a eluir de la columna el anticuerpo unido mediante la circulación de 2 volúmenes de columna de buffer B, o buffer de elución (Na_2HPO_4 0.2 M, ácido cítrico 0.1 M, pH 3-5, para la proteína A, y Glicina 0.1 M con NaCl 0.15 M, pH 2.4 para la proteína G). Las fracciones de elución se colectaron en volúmenes de aproximadamente 0.5 mL. Las mismas fueron neutralizadas con buffer Tris 1 M y analizadas posteriormente por SDS-PAGE y por ELISA.

SDS PAGE

El análisis de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad, se realizó por SDS PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, sigla que viene del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). La misma es una técnica que se utiliza a fin de separar proteínas para su análisis. La muestra conteniendo las distintas proteínas se trató en nuestro caso, con agentes desnaturizantes (SDS, dodecilsulfato de sodio), reductores (beta-mercaptoetanol), y calor (1 min a 100°C). De esta forma las proteínas pierden su estructura tridimensional y pasan de su forma nativa a una desnaturizada. A su vez, el SDS se une en una relación constante masa/masa a las proteínas, otorgándoles una carga negativa proporcional al tamaño de cada proteína. Paralelamente, se realiza un gel de poliacrilamida con pocillos en los cuales se siembran las muestras conteniendo las proteínas desnaturizadas y cargadas negativamente. La poliacrilamida es una malla porosa por la cual las proteínas deben circular, a través de un campo eléctrico. Debido a la carga negativa otorgada por el SDS las mismas migran hacia el polo positivo del campo al cual se las somete, y ya que la relación carga/masa es constante, las proteínas migrarán acorde a su tamaño. Por lo cual las proteínas quedan separadas por su masa. En nuestro caso el porcentaje del gel de poliacrilamida utilizado fue del 10%. Para la ascitis, el material no unido en la cromatografía y los lavados de la misma se sembraron 2 μL por pocillo (+ 5 μL de buffer de muestra (25% beta-mercaptoetanol,

2.5% SDS, 50% glicerol, 0.125 M buffer Tris HCl pH 6.8, 0.1 mg/mL Azul de Bromofenol). En cuanto a las fracciones purificadas (los eluidos) fueron sembrados 20 μ L por pocillo (+5 μ L de buffer de muestra).

Luego de la corrida electroforética las proteínas fueron visualizadas con la utilización de un colorante, Coomassie brilliant Blue [24].

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de la concentración de proteínas fue realizada mediante la utilización de dos técnicas: el método del ácido bicinconínico (BCA), y la lectura de absorbancia a 280 nm. Para ambos métodos fue necesaria la construcción de una curva de calibración con una proteína estándar, la sero-albúmina bovina (BSA).

- ❖ El BCA [37] a diferencia de otros métodos comúnmente utilizados para cuantificar proteínas, se basa en que dicho compuesto es capaz de formar un complejo de color púrpura intenso con iones Cu^+ en medio alcalino. Este complejo absorbe la luz visible a 570 nm. El reactivo permite monitorear el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas y el ión cúprico. El método del ácido bicinconínico, posee la ventaja de presentar escasas interferencias con compuestos presentes en el buffer o que se encuentren en las muestras. La reacción se realizó agregándole a 10 μ L de la muestra, 200 μ L de la mezcla de reacción, siendo la composición de la misma el reactivo BCA (Sigma, EE.UU) y sulfato de cobre, en una relación de partes 50:1. Posteriormente se incubó a 37°C por 1 hora, para luego medir a 570 nm la formación del complejo.
- ❖ Otro método utilizado para determinar concentración de proteínas fue la medida de absorbancia a 280 nm. Siendo esta longitud de onda el pico de absorción de los grupos aromáticos presentes en algunos aminoácidos, como Fenilalanina, Tirosina y Triptófano. Realizando la cuantificación de esta manera la muestra quedaría intacta, pero se debe tener en cuenta que existen diferentes compuestos que absorben luz UV y son posibles interferentes. La medida de absorbancia de las muestras se realizó utilizando el equipo Cary 50 -

Varian, tomando como blanco buffer PBS, o buffer de elución según correspondiera.

CULTIVO CELULAR DE LA LÍNEA MURINA TUMORAL TA3/HA Y DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 Y PREPARACIÓN DE EXTRACTO DE TA3/HA

Al igual que los hibridomas B B72.3, la línea TA3/Ha de células derivadas de un carcinoma mamario murino, y línea celular de macrófagos derivados de monocitos de ratones con leucemia, Raw 264.7, se cultivaron en medio RPMI conteniendo L-glutamina (2.05 mM), y suplementado con suero fetal bovino concentración final 10%, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (0.1 mg/mL) (medio completo), a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.

Para la preparación de extracto proteico derivado de las células TA3/Ha, se recolectaron y centrifugaron las células, posteriormente se les agregó 0.5-0.8 mL de buffer de lisis (25% glicerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 20 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acido), 1% Triton x100). Se congeló a -80°C durante un día, luego se vortexeó y centrifugó dichas células 1 minuto a 10000 rpm, para posteriormente recuperar el sobrenadante, congelarlo a -20°C para su posterior cuantificación por BCA.

EVALUACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS TUMORALES POR PARTE DEL AcMo B72.3

Para determinar si el anticuerpo monoclonal B72.3 posee la capacidad de reconocer antígenos tumorales presentes en la línea tumoral TA3/Ha, se realizó un ensayo de ELISA indirecto. El procedimiento experimental fue similar al descrito para el ensayo de detección del AcMo B72.3 por ELISA, a diferencia de que en este caso se determinó el reconocimiento por parte del AcMo purificado, de antígenos presentes en células tumorales TA3/Ha. Para ello se sensibilizó las placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca) con extracto de TA3/Ha en diversas concentraciones (25-200 µg/mL), durante toda la noche a temperatura ambiente. En el momento de incubar con el anticuerpo primario, se procedió a incubar con una de las fracciones obtenidas de la purificación en una

concentración de 10 µg/mL a 37°C por una hora. El resto del ensayo se realizó como se describió previamente.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADCC) *IN VITRO*

Para la realización del ensayo de ADCC *in vitro*, fue necesario activar macrófagos Raw 264.7 utilizando medio suplementado con IFN- γ a 12.5 ng/mL, durante una noche a 37°C, en 5% de CO₂. Al día siguiente, se recolectaron las células, y las mismas fueron re-suspendidas en 10 mL de medio sin completar (“starving”) durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente las células fueron lavadas, en medio completo, y contadas. Se realizó un co-cultivo de células RAW 264.7 (células efectoras, E) y de células tumorales TA3/Ha, (células tumorales, T) en las siguientes relaciones E: T: 50:1, 25:1, 12:1, 6:1, o 10:1 según correspondiera. Luego se agregó el anticuerpo control positivo (ChiTn [38]) a una concentración de 25 µg/mL, y el anticuerpo B72.3 en concentraciones de 5-20 µg/mL. Como último paso se colectaron, contaron y añadieron 10000 células tumorales por pocillo. El control de lisis total consistió en células TA3/Ha cultivadas en presencia de 0.1% Triton -x100. Posteriormente se dejó incubar durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se agregó 10 µL del reactivo WST-8 (Sigma, EE.UU) (2 - (2-metoxi-4-nitrofenil) -3 - (4-nitrofenil) -5 - (2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolio, sal monosódica). Se midió absorbancia a 450 o 492 nm. El cálculo de citotoxicidad se llevó a cabo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Citotoxicidad} : [A(E+T)-A(E+T+Ac)]/[A(T)-A(T+Triton)]$$

Donde A(E+T) es la absorbancia a 450 o 492 nm, de las células efectoras y las células tumorales, A(E+T+Ac) es la absorbancia a 450 o 492 nm de las células efectoras, las células tumorales, y el anticuerpo en cuestión. A (T) es la absorbancia únicamente de las células tumorales, y A (T+Triton) es la absorbancia de las células tumorales en presencia de Triton -x100. Se tomó como 100 % de citotoxicidad la correspondiente a la calculada utilizando A(T+Triton) en lugar de A(E+T+Ac).

PUESTA A PUNTO DEL MODELO TUMORAL TA3/HA EN RATONES

Ratones BALB/c fueron inyectados i.p. con 10000 células tumorales TA3/Ha. Fueron evaluadas dos ampollas diferentes de células tumorales. El grupo control consistió en ratones inoculados únicamente con PBS. El número de animales por grupo fue 6. Se determinó la sobrevivencia de los ratones, los cuales murieron espontáneamente por el desarrollo de metástasis. Alternativamente los animales fueron sacrificados en el caso de presentar alguna de las siguientes características: dificultad para desplazarse, no ingesta de alimentos, pelaje alterado, aislamiento del grupo.

Resultados

PRODUCCIÓN DE ASCITIS RICAS EN EL ANTICUERPO B72.3

Con el objetivo de obtener ascitis altamente enriquecidas en el anticuerpo de interés, debimos previamente obtener altas cantidades de células productoras del anticuerpo, en este caso del hibridoma B, de B72.3.

Como paso previo a la inyección de los hibridomas en los ratones para la producción de ascitis, fue necesario verificar la correcta morfología de dichos hibridomas, y que los mismos fueran efectivamente productores de los anticuerpos buscados. Tal como se puede observar en la figura 5A, la morfología de estas células fue la característica de células saludables, siendo la confluencia de entre el 50 y 70%, y dichas células estaban libres de contaminación bacteriana y/o fúngica.

El paso posterior a obtener las células en cantidad y estado apropiados, consistió en verificar que efectivamente las células fueran productoras del anticuerpo buscado. Para esto se realizó un ensayo de ELISA, tal como se describió en Materiales y Métodos, utilizando como fuente de antígeno sTn, la mucina submaxilar ovina (OSM) debido a la fuerte expresión de este antígeno en dicha proteína.

Como se puede observar en la figura 5B, los sobrenadantes evaluados reaccionaron con la OSM, siendo comparables al valor del control positivo. Posteriormente se evaluó la reactividad de los sobrenadantes de B72.3 con otras variantes de la proteína OSM: aOSM, en este caso la mucina se encuentra desialilada, por lo tanto la misma presenta el antígeno Tn; y la variante deglicosilada dOSM, donde la mucina fue previamente deglicosilada químicamente. En esta figura se observa que los sobrenadantes de los hibridomas contenían el anticuerpo monoclonal B72.3 reactivo con OSM, mientras que los mismos no reaccionaron con muestras proteicas conteniendo el antígeno Tn o completamente deglicosilada.

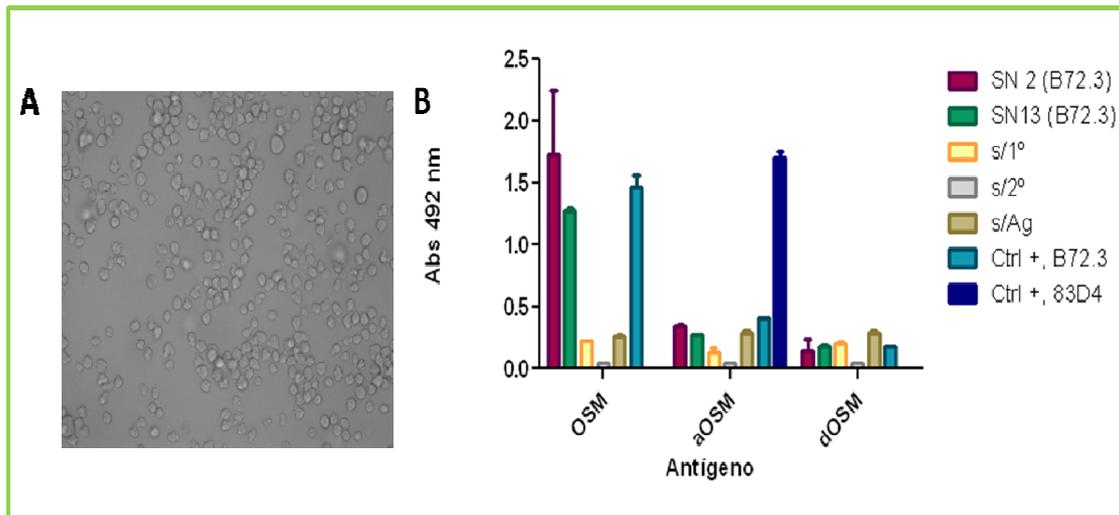


Figura 5- Producción de células de hibridomas B, productores del AcMo B72.3.

A- Foto de una microscopía de campo claro (a un aumento de 10X) de células del hibridoma productor del AcMo B72.3. B- Reactividad de sobrenadantes de B72.3 evaluados por ELISA, utilizando como control positivo para OSM un anticuerpo purificado anti-sTn, B72.3 (Ctrl+, B72.3), y como control positivo para aOSM un anticuerpo purificado anti-Tn, 83D4 (Ctrl +, 83D4). En esta figura se muestran dos ejemplos de sobrenadantes de cultivo de B72.3 evaluados (SN2 y SN13) y pueden observarse como controles negativos de reactividad en ausencia de anticuerpo primario (s/1º), así como también el control sin anticuerpo secundario anti-ratón polivalente (s/2º), o en ausencia de antígeno OSM, aOSM o dOSM (s/Ag).

Habiendo verificado la producción de anticuerpos por los hibridomas, se procedió a contar las células e inyectar a los ratones previamente pristinizados. El pristano es un irritante del peritoneo, el cual favorece el desarrollo de ascitis [39]. Luego, se controló el desarrollo de ascitis, determinado por hinchazón abdominal (Figura 6A), y se recolectó la misma hasta 3 veces por ratón.

Posteriormente, la ascitis fue centrifugada para eliminar restos celulares. Luego, para comprobar que los hibridomas no perdieron su capacidad de producir anticuerpos B72.3 *in vivo*, se procedió a evaluar la reactividad contra el antígeno sTn de la misma forma que se describió para los sobrenadantes. Para ello, se realizaron diluciones de la ascitis con el objetivo de determinar la mayor dilución a la cual la misma presenta una reactividad óptima para su utilización.

En la figura 6B observamos que la reactividad del anticuerpo contenido en la ascitis fue alta en concentraciones mayores a la dilución 1/1000. Además, en todos los casos las ascitis colectadas resultaron ser positivas para B72.3.

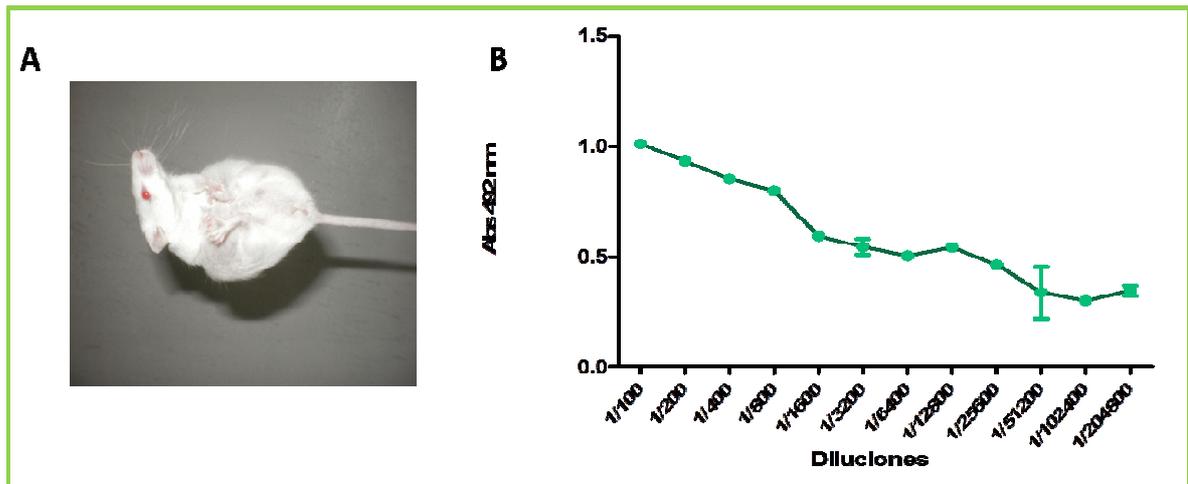


Figura 6- Producción de ascitis enriquecidas en anticuerpos B72.3.

(A) Ratón BALB/c que presenta hinchazón abdominal por la presencia de grandes volúmenes de ascitis. (B) Reactividad anti-sTn de la ascitis obtenida del ratón productor de ascitis. El valor del control negativo fue de 0.239 UA y el mismo corresponde a la reactividad en ausencia de OSM. La medida de la reactividad se llevó a cabo por un ensayo de ELISA.

PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL B72.3

Luego de obtener grandes cantidades (≈ 50 mL) de ascitis murina conteniendo el anticuerpo B72.3, procedimos a su purificación. La misma fue llevada a cabo por cromatografía de afinidad, utilizando agarosa acoplada a la proteína A de *Staphylococcus aureus* o acoplada a una variante recombinante derivada del grupo G de *Streptococcus* (Proteína G). Estas proteínas son componentes de la pared celular de dichas bacterias, y se unen a los anticuerpos por la región Fc participando por lo tanto en el proceso de infección y aumentando la sobrevivencia de la bacteria [40]. Además, dichas proteínas son utilizadas frecuentemente en métodos bioquímicos y principalmente en aquellos que involucran la purificación de anticuerpos. Las mismas reconocen distintos isotipos de inmunoglobulinas con afinidades diferentes [41].

Como se desprende de la tabla 2, y teniendo en cuenta que el AcMo B72.3 es de isotipo IgG1, la proteína G posee mayor afinidad por dicho anticuerpo que la proteína A. Por lo tanto, el uso de agarosa acoplada a la proteína G sería una mejor herramienta para purificar nuestro AcMo. Para confirmar esto en términos empíricos, se buscó

purificar anticuerpo a través de la utilización de ambas proteínas y comparar los rendimientos obtenidos.

Tabla 2- Se muestran las afinidades de los diferentes subtipos de inmunoglobulina G de ratón con la proteína A y G respectivamente. Tabla extraída y modificada de [41].

Subtipo de IgG murina	Proteína A	Proteína G
IgG 1	+	++++
IgG2a	++++	++++
IgG3	++	+++

Para ello, se re-circuló ascitis conteniendo el AcMo, diluida en “binding buffer”. Luego, se realizaron lavados y posteriormente se llevó a cabo la elución por pH ácido. Este cambio de pH desestabiliza la unión proteína-anticuerpo, de modo tal que los anticuerpos se separan de la proteína conjugada a la agarosa, y es posible obtenerlos en las fracciones a colectar [36].

Una vez obtenidas todas las fracciones, se determinó la presencia de proteína por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 280 nm. Los cromatogramas correspondientes a la cromatografía de afinidad con proteína A y con proteína G pueden observarse en la figura 7 A y B respectivamente. En estos gráficos es posible observar que en lo que respecta a la purificación utilizando proteína A, los eluidos conteniendo mayores cantidades de proteína fueron las fracciones E4, E5, E6 y E7; en cuanto a la proteína G, los eluidos E1, E2, E3 y E4 son aquellos en los cuales se observa mayor concentración proteica.

Posteriormente, las fracciones obtenidas fueron analizadas por electroforesis de acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y reductoras. Al realizar una electroforesis en estas condiciones se disocian los puentes disulfuros que unen a las cadenas de la molécula de anticuerpo, separándose la cadena pesada de la liviana.

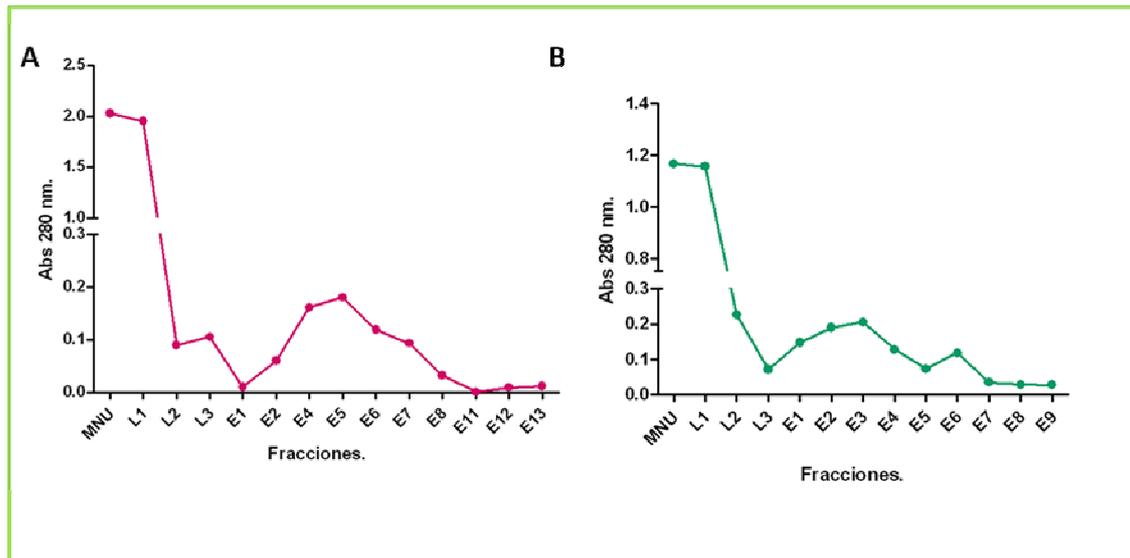


Figura 7- Purificación del AcMo B72.3 por cromatografía de afinidad utilizando agarosa acoplada a proteína A (A) o a proteína G (B). En la imagen pueden observarse los cromatogramas de elución obtenidos a partir de la medida de absorbancia a 280 nm de las fracciones de elución. MNU corresponde al material no unido, siendo L_n los lavados, y E_n los distintos eluidos.

Como puede observarse en la figura 8, las fracciones correspondientes a los eluidos presentan dos bandas de 25 kDa y 50 kDa que se corresponden con el peso molecular de una cadena liviana y una cadena pesada respectivamente de las inmunoglobulinas de tipo G (IgG). Estos resultados indican que, tanto a partir de la cromatografía con proteína A, como con proteína G, fue posible obtener fracciones purificadas de anticuerpo B72.3.

Una vez obtenidas e identificadas las fracciones de las cromatografías cuyo contenido de anticuerpos fue significativo, se procedió a agrupar todos los eluidos que contenían anticuerpo. De esta forma, en el caso de la purificación utilizando la proteína A se reunieron todos los eluidos, denominándoselos pool A. Por otro lado, en el caso de la proteína G se agruparon los eluidos 1 al 7, constituyendo estos el pool G.

Las fracciones de anticuerpos obtenidas fueron dializadas contra buffer PBS, con el fin de quitar el buffer de elución en el cual se encontraban los mismos. Posteriormente, se analizaron por electroforesis (Figura 9A) y su reactividad contra el antígeno sTn fue confirmada por ELISA (Figura 9B).

Luego, se midió la absorbancia a 280 nm de los dos pools, a efectos de determinar la concentración de los mismos. Para ello se construyó una curva de calibración utilizando como estándar BSA. (Figura 10),

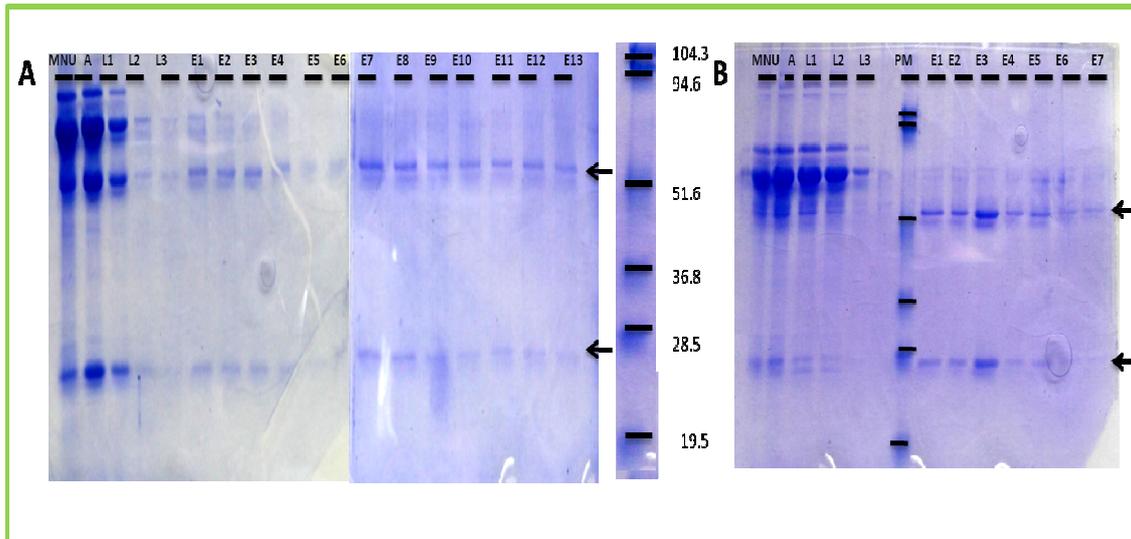


Figura 8- Fotografía de electroforesis en poliacrilamida de las fracciones obtenidas a partir de la purificación por cromatografía de afinidad con la columna de proteína A (A) o con la proteína G (B). Los pesos moleculares de marcador están expresados en kDa. Las flechas indican las bandas de 50 y 25 kDa correspondientes a la cadena pesada y liviana de IgG, respectivamente.

Las concentraciones obtenidas fueron de 0.9 mg/mL de B72.3 en el pool A y de 0.3 mg/mL en el pool G, (Tabla 3). A su vez se obtuvo 1.8 mg de B72.3 purificado con la proteína A, mientras que con la proteína G se obtuvieron 0.6 mg. La cantidad de AcMo B72.3 obtenida en función del volumen de columna utilizado fue 0.36 mg/Volumen de columna para la purificación con proteína A, y de 0.6 mg/Volumen de columna, con la proteína G (Tabla 3).

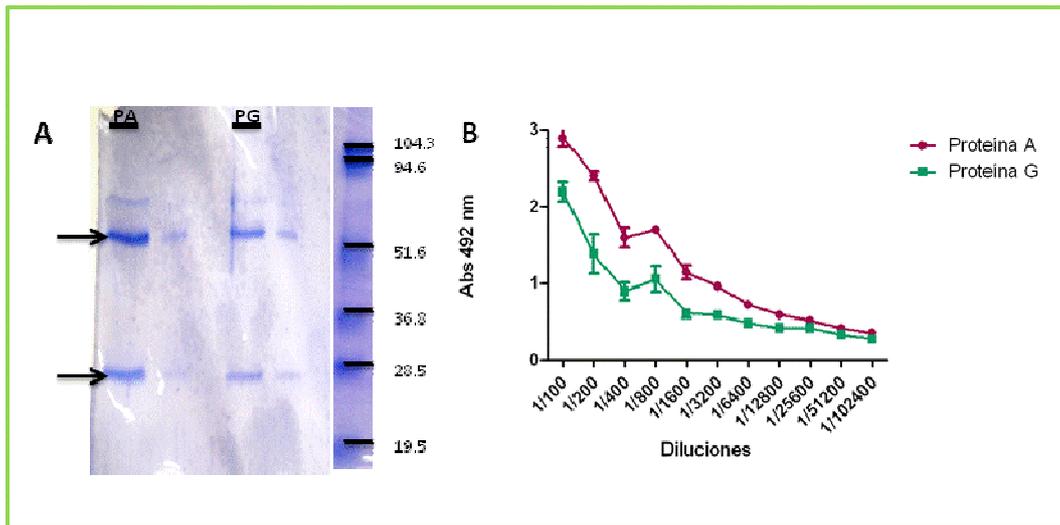


Figura 9- Análisis de fracciones de AcMo B72.3 purificado. (A) Electroforesis de los pools de proteína A (PA) y G (PG). Los pesos moleculares de la electroforesis están expresados en KDa. (B) Reactividad anti sTn de dichos pools. La misma fue determinada mediante un ensayo de ELISA como el que se describió para la figura 1B, sensibilizando las placas con OSM. El valor del control negativo para este ensayo fue de 0.369 UA y el mismo corresponde a la reactividad en ausencia de OSM.

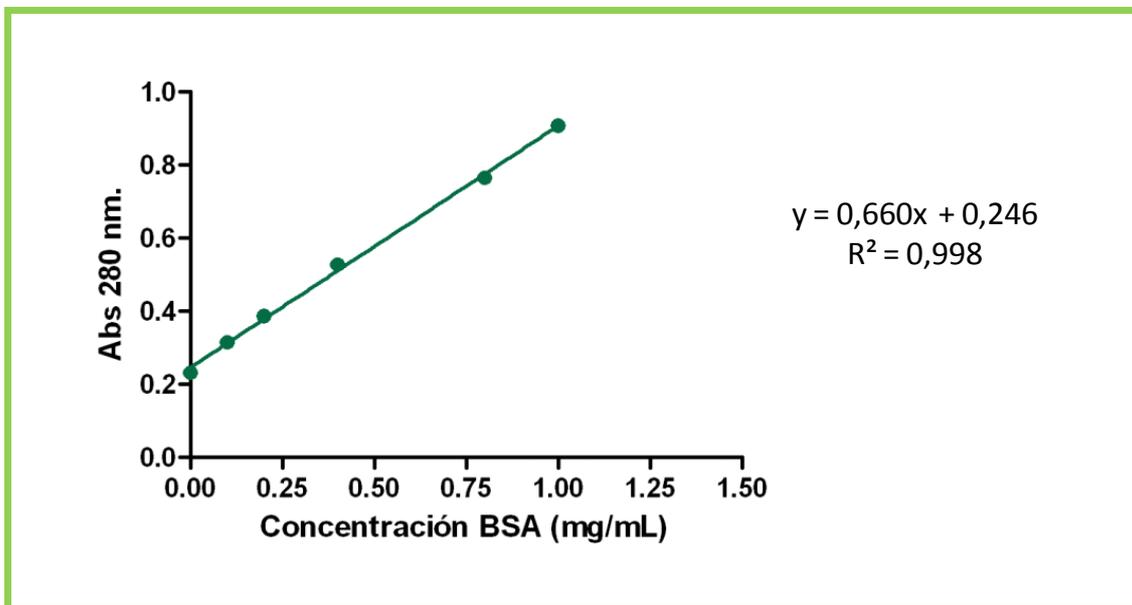


Figura 10- Curva de calibración construida con BSA a 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, hasta 1 mg/mL, en diluciones al medio. Se midió absorbancia a 280 nm. Siendo y: abs 280 nm, e x: Concentración proteína mg/mL.

Tabla 3. Tabla de rendimiento de la purificación utilizando agarosa acoplada a la proteína A (PA) o la G (PG).

Fracción	Concentración (mg/mL)	Volumen pools (mL)	Cantidad Total B72.3 (mg)	V. de matriz utilizado (mL)	mg AcMo/mL de matriz.
Pool G (PG)	0.3	2	0.6	1	0.6
Pool A (PA)	0.9	2	1.8	5	0.36

EVALUACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS TUMORALES POR PARTE DEL AcMo B72.3

Una vez purificado el AcMo B72.3, nos era de interés evaluar si dicho anticuerpo presentaba la capacidad de reconocer antígenos tumorales. Para ello se utilizó un extracto proteico tumoral de la línea celular TA3/Ha, con el cual se sensibilizó para realizar un ensayo de ELISA. Como puede observarse en la figura 11 A, el anticuerpo B72.3 fue capaz de reconocer antígenos presentes en la línea celular TA3/Ha, si bien lo hizo en menor medida que el AcMo 83D4 (AcMo que reconoce el antígeno Tn). A su vez, ambos pools de AcMo B72.3 obtenidos reconocieron el extracto proteico derivado de TA3/Ha y dicho reconocimiento fue dosis dependiente (Figura 11B).

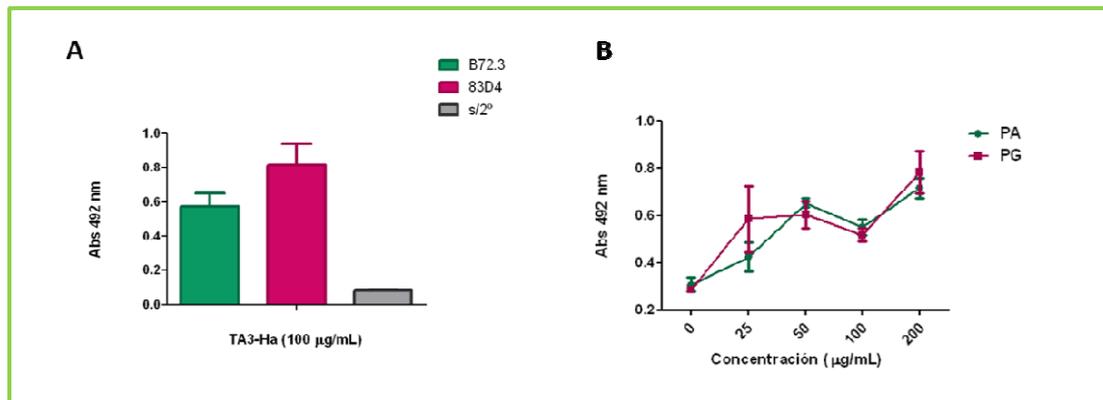


Figura 11- Reactividad del AcMo B72.3 con un lisado proteico derivado de células TA3/Ha. (A) Reactividad anti lisado proteico derivado de TA3/Ha a 100 µg/mL, de los AcMos 83D4 y B72.3, así como también del control negativo (s/2°). (B) Reactividad anti TA3/Ha de los dos pools purificados (PA y PG) a distintas concentraciones de TA3/Ha.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADCC) *IN VITRO*.

Para evaluar si el AcMo B72.3 es capaz de mediar la muerte celular en el proceso que se conoce como Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos (ADCC), realizamos un ensayo de citotoxicidad *in vitro*, utilizando células tumorales TA3/Ha. Como células efectoras seleccionamos macrófagos RAW 264.7 previamente activados con IFN γ . La medida de viabilidad se realizó mediante la utilización del reactivo WST-8, el cual produce un complejo formazán soluble en agua, en condiciones de bio-reducción en presencia de un portador de electrones, 1-metoxi PMS. Dicho reactivo es bio-reducido por deshidrogenasas celulares, dando lugar a un producto de formazán color naranja que es soluble en el medio de cultivo. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células vivas.

Como puede observarse en la figura 12 A, cuando se trabajó en una relación E:T de 6:1 o 12:1, se detectó muerte celular. Siendo la relación 6:1, en la que se detectó mayor citotoxicidad. El control positivo consistió de la quimera ChiTn, el cual media la ADCC [38]. Posteriormente se evaluó la citotoxicidad en función de la concentración del AcMo B72.3, a una relación E:T de 10:1. Observando la figura 12 B, es posible afirmar que a una concentración de AcMo B72.3 de 10 $\mu\text{g/mL}$, se detectó la mayor citotoxicidad.

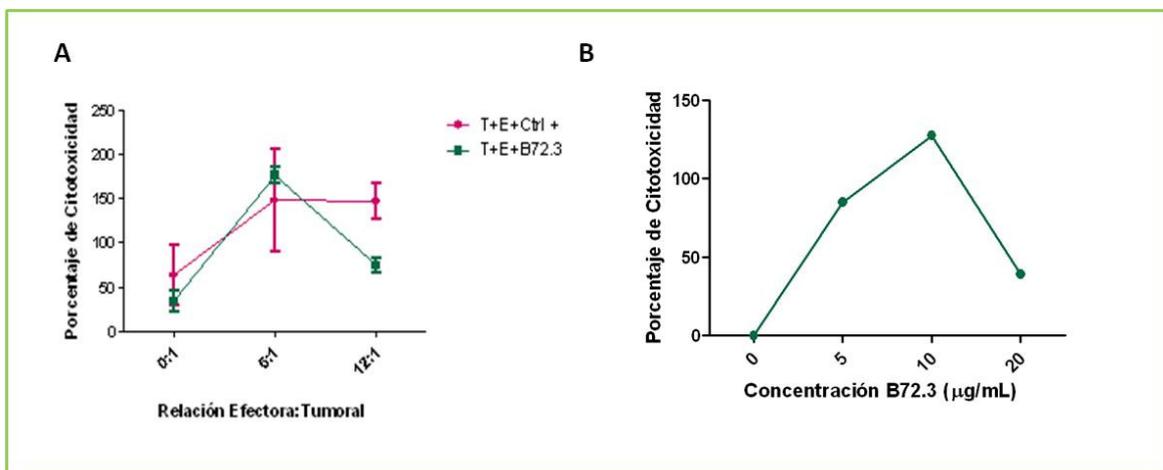


Figura 12- Evaluación de la ADCC inducida por B72.3 sobre células TA3/Ha, utilizando macrófagos RAW 264.7, activados con IFN γ , como célula efectora. (A) En el gráfico se observa el porcentaje de citotoxicidad mediado por el AcMo B72.3 (B72.3), y el anticuerpo utilizado como control positivo, el AcMo Chi-Tn [38]. (B) Se observa el porcentaje de citotoxicidad en función de la concentración de B72.3.

Para descartar un efecto directo de citotoxicidad del AcMo B72.3 sobre células efectoras, o tumorales, evaluamos la viabilidad de las mismas al ser cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de AcMo B72.3. Como se observa en la figura 13 el AcMo B72.3 no generó ningún efecto directo sobre la viabilidad de las células TA3/Ha (Figura 13A), así como tampoco sobre las células Efectoras (Figura 13B).

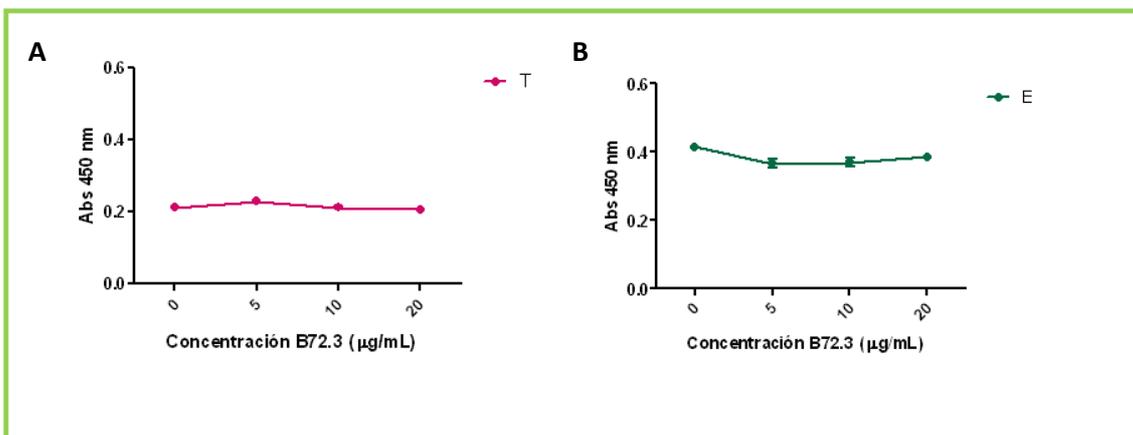


Figura 13- Evaluación de la citotoxicidad de B72.3 sobre células tumorales TA3/Ha (A) o de células Raw 264.7 (B) En ambos casos la medida de viabilidad se realizó mediante el uso del reactivo WST8, midiendo absorbancia a 450 nm.

MODELO TUMORAL TA3/HA EN RATONES

Con el objetivo de poner a punto el modelo de desarrollo tumoral utilizando las células tumorales TA3/Ha, se cultivaron diferentes ampollas de células TA3/Ha (adenocarcinoma murino mamario [42]). Una vez obtenidas las células, se inyectaron 10000 células por ratón, y se siguió la sobrevivencia de los animales. Fueron probadas dos ampollas de células de lotes diferentes (I y II). Como puede observarse en la figura 14, todos los ratones inoculados con las células TA3/Ha provenientes de la ampolla II, murieron al día 15. Por otro lado, 5 de 6 ratones (80%) de los ratones inoculados con las células de la ampolla I, murieron al día 21, mientras que un ratón permaneció con

vida hasta el día 46. Como esperado, el grupo control presentó una sobrevida del 100%.

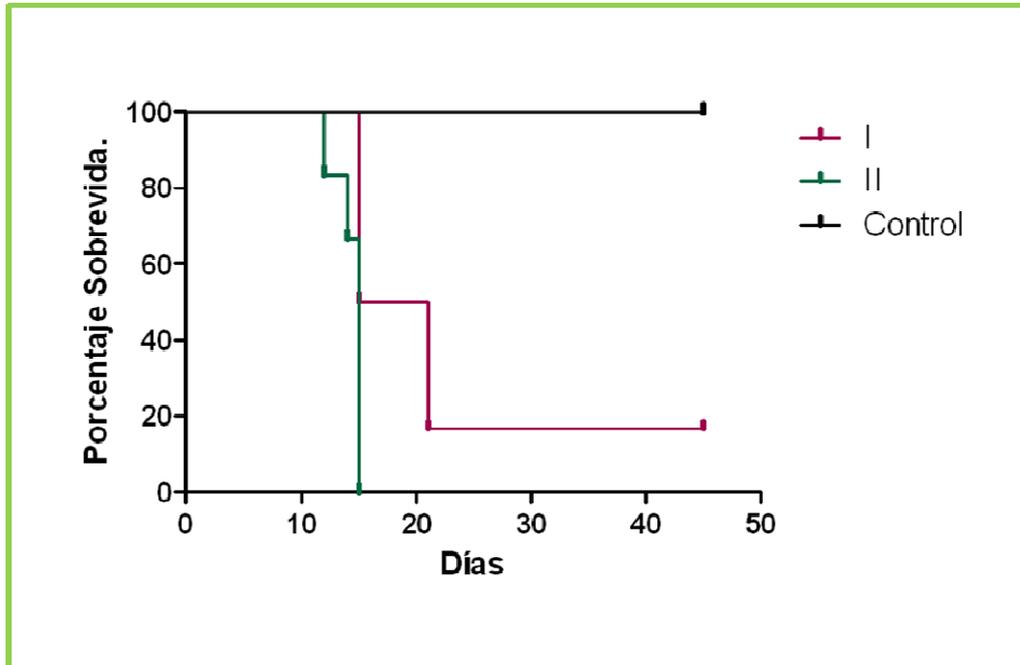


Figura 14- Gráfico de sobrevida de ratones inoculados i.p con las células TA3/Ha de diferentes lotes (I y II) de las diferentes ampollas (I y II). En negro se muestra el control. Los animales que sobrevivieron al día 45 fueron sacrificados.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que las células TA3/Ha derivadas de la ampolla II son más agresivas que aquellas derivadas de la ampolla I. En este momento nos encontramos planificando un ensayo de protección *in vivo* por inmunización pasiva, utilizando el AcMo B72.3 en ratones desafiados con las células tumorales.

Discusión

Para producir AcMos a partir de hibridomas es necesario primeramente verificar que dichos hibridomas mantengan aún la habilidad de producir estos anticuerpos, puesto que al tratarse de células tumorales las mismas presentan una tasa de mutación importante, y es posible que luego de mucho tiempo en cultivo, dichas células pierdan la capacidad de generar el anticuerpo de interés. En nuestro caso verificamos que los hibridomas fueron productores del AcMo B72.3. La inoculación i.p del hibridoma en ratones conduce a la generación de ascitis ricas en el AcMo, más concentradas que los sobrenadantes de cultivo, debido a que en el modelo *in vivo*, el ambiente rico en nutrientes y factores, favorece aún más la proliferación de las células y la consiguiente liberación del anticuerpo de interés. Sin embargo, algunas veces la generación de ascitis se vio desfavorecida por el desarrollo de tumores sólidos en la cavidad peritoneal de los animales. Esto puede deberse a posibles modificaciones en las características celulares o tumorales del hibridoma. En dichos casos, a pesar del desarrollo de tumor sólido, los animales producían, en menores volúmenes, ascitis. Esta ascitis fue inyectada en otros ratones a fin de propagar las células capaces de generar desarrollo de ascitis, y no de tumor sólido. A partir de los resultados obtenidos fue posible confirmar la producción de un lote de ascitis rica en el AcMo B72.3.

Dado que la ascitis obtenida, posee además del AcMo producido otras proteínas, fue necesario proceder a la purificación del mismo, a fin de obtener el AcMo puro. La estrategia de elección en nuestro caso, consistió en una cromatografía de afinidad. Existen comercialmente, entre otros, dos sistemas que permiten la purificación de muestras conteniendo anticuerpos del tipo IgG, dependiendo de qué subtipo se trate, el rendimiento de cada columna puede variar. Para el caso del AcMo B72.3, siendo el mismo un anticuerpo de isotipo IgG1, la columna con la variante recombinante de la proteína G presentaría una mayor afinidad, de acuerdo a la tabla 2. Si bien la proteína A parecería tener menor afinidad por este tipo de anticuerpo, a la hora de purificar,

fue un método efectivo que permitió obtener el objetivo buscado. Incluso al comparar los valores de concentración, es posible apreciar, que la concentración del pool de proteína A es mayor, que el de la proteína G. Sin embargo, es importante notar, que el volumen de matriz de la proteína G era de 1 mL, mientras que el volumen de la matriz de proteína A era de 5 mL; por lo cual si comparamos los mg de anticuerpo obtenidos por mL de matriz (0.6 mg y 0.36 mg para el AcMo B72.3 purificado usando proteína G y A respectivamente), efectivamente verificamos que la columna con proteína G conjugada a la agarosa, produce un rendimiento mayor de purificación de AcMo B72.3. Un punto importante a tener en cuenta, es que la cuantificación de estas muestras fue realizada por absorbancia a 280 nm, utilizando como estándar la proteína BSA. Esta técnica, depende de la composición aminoacídica, ya que se basa en la absorbancia de los anillos aromáticos de algunos aminoácidos. Lo ideal en este caso hubiera sido, utilizar una IgG1 como estándar. Es por ello, que los valores de concentración nos dan un estimativo. En cuanto a si constituye una mejor herramienta a la hora de purificar dicho anticuerpo, si bien la proteína G presenta mayor afinidad por los AcMos IgG1 como ya se comentó, a efectos prácticos, en el laboratorio no presenta una diferencia significativa, purificar utilizando la columna de agarosa conjugada a proteína A, de 5 mL; o utilizar la columna de 1 mL que tiene conjugada la proteína G.

Es importante considerar que en la purificación mediante este tipo de cromatografía, se están purificando todos los tipos de IgG que pueden estar presentes en el líquido ascítico. Por lo cual lo que se obtiene es una fracción de anticuerpos IgG, que es rica en el anticuerpo de interés. Sería necesario entonces incluir un control de ascitis generada con la línea de mieloma no secretante, a fin de purificar dicha ascitis, para poder comparar la misma con la fracción rica en B72.3 obtenida.

Otra estrategia alternativa o secuencial de obtención del AcMo B72.3 podría ser mediante cromatografía de afinidad, pero utilizando sefarosa unida a la OSM, la cual contiene el antígeno sTn.

Habiendo purificado el AcMo B72.3, y puesto a punto el modelo de desarrollo tumoral con TA3/Ha, se buscó evaluar si dicho anticuerpo era capaz de reconocer antígenos tumorales en dichas células. De este ensayo es posible afirmar que efectivamente el

anticuerpo B72.3, fue capaz de reconocer antígenos presentes en TA3/Ha, y que por lo tanto es posible la utilización de dicho anticuerpo para evaluar posibles mecanismos inmunes anti-tumorales. Es importante notar, que el reconocimiento en este caso fue medido mediante la técnica de ELISA, utilizando extracto tumoral, lo cual no nos indica localización del antígeno que reacciona con el anticuerpo. Esta información es importante, pues si lo que se busca es un reconocimiento que pueda llevar al desencadenamiento de una respuesta inmune, es fundamental que el antígeno en cuestión se encuentre accesible al anticuerpo. Una técnica que se podría utilizar a fines de evaluar si la unión es posible, es la citometría de flujo, inmunofluorescencia, o además mediante microscopía confocal, utilizando un marcado del anticuerpo por fluorescencia, con un marcador de membrana, y de núcleo, para de este modo visualizar si efectivamente el anticuerpo puede tener acceso al antígeno que es capaz de reconocer.

Es importante considerar a su vez, que el AcMo B72.3 si bien reacciona preferentemente con el antígeno sTn, presenta también reactividad cruzada con el antígeno Tn [32]. Si lo que se busca es verificar que el reconocimiento antígeno-anticuerpo se debe a la reacción B72.3- sTn y no a que dicho anticuerpo reaccione con Tn, podría realizarse un ELISA, incluyendo un paso de incubación, entre el bloqueo y la incubación con el AcMo B72.3, con anticuerpo específico para Tn. Bloqueando de este modo los posibles epítopes Tn, y permitiendo de esta forma cuantificar el reconocimiento del AcMo B72.3 únicamente por antígenos sTn.

Sin embargo, se ha reportado que la línea celular TA3/Ha secreta una mucina conteniendo principalmente el antígeno Tn [43], pero no hay información acerca de la posible expresión del antígeno sTn. Para verificar esto, podrían utilizarse lectinas específicas para el ácido siálico sobre células TA3/Ha.

Por otro lado, sería importante evaluar el reconocimiento por B72.3 de antígenos tumorales en otras líneas tumorales, a efectos de visualizar si es un efecto dado solo en esta línea celular, o puede aplicarse a otros tipos de cánceres.

De los resultados del ensayo de citotoxicidad celular es posible afirmar que el AcMo B72.3 fue capaz de mediar la ADCC *in vitro*. Al compararlo con el control positivo, se observó que tanto dicho control, como el B72.3, fueron capaces de mediar la muerte celular. Un punto importante es que el control positivo, consistió de un anticuerpo quimérico del AcMo anti Tn 83D4, por lo cual dicho control posee una región Fc humana, por lo cual puede llevar a una respuesta diferente, que el Fc murino. De todas formas se utilizó este control porque existe evidencia que muestra que ChiTn es capaz de ser reconocido por macrófagos murinos [38]. Cuando se realizó el experimento variando la concentración de anticuerpo, a fin de determinar la concentración a la cual el mismo era más citotóxico, se pudo observar que la mayor capacidad de inducir muerte estaba dada a la concentración de 10 µg/mL de dicho anticuerpo. Es importante notar que la viabilidad de las células no se vio modificada con la concentración del anticuerpo. Fue necesario realizar dicho control, pues existe evidencia que demuestra que un AcMo anti-Tn es capaz de inhibir el crecimiento de las células tumorales, mediante la inhibición del factor de crecimiento I tipo insulina [44]. Nuestros resultados sugieren que la citotoxicidad de AcMo B72.3 es debida a que dicho anticuerpo es capaz de mediar la ADCC.

Un punto trascendente en este ensayo, es que en el mismo se midió la citotoxicidad celular en función de la viabilidad celular, y no de la muerte específicamente de las células tumorales. Lo cual es importante pues, al calcular las células muertas como la diferencia de las células vivas, no es posible identificar cuáles son las células que están muriendo, pudiendo ser las mismas, los macrófagos. Una técnica que permitiría identificar las células muertas, y determinar si efectivamente el AcMo es capaz de mediar la citotoxicidad celular, es la citometría de flujo utilizando células tumorales previamente marcadas con un fluoróforo [38]. De todas formas, es importante notar que el experimento contó con controles de viabilidad, que correspondieron a células TA3/Ha solas junto al anticuerpo B72.3, y a células RAW 264.7 solas también con el AcMo B72.3. Así como también contó con un control positivo, siendo el mismo el AcMo ChiTn, quimera que reconoce el antígeno Tn, y que se ha demostrado es capaz de mediar la ADCC *in vivo* de células tumorales [38]. Otro punto del ensayo que puede llevar a la discusión, es la elección de macrófagos como células efectoras, en lugar de

natural killers, la célula capaz de mediar la ADCC por excelencia, sin embargo ya se ha reportado que los macrófagos son capaces también de mediar la ADCC [45]. Las vías por las cuales los macrófagos son capaces de mediar la citotoxicidad, son distintas a las que utilizan las células natural killers, y dependen de la célula blanco. Por lo general pueden liberar $TNF\alpha$, u óxido nítrico, como mediadores dominantes de la inducción de citotoxicidad por macrófagos, así como también mediante la apoptosis inducida por la vía de Fas/Fas L [45].

La puesta a punto de modelos tumorales fue necesaria para evaluar la capacidad de las células tumorales TA3/Ha de generar la producción de ascitis en ratón. En el laboratorio se cuenta con distintos lotes de células TA3/Ha, y en experimentos anteriores se observó que algunos de estos lotes contenían células que habían perdido la capacidad de desarrollar ascitis, motivo por el cual se evaluaron distintas ampollas de células. A partir de los resultados es posible decir que las células de ambos lotes probadas fueron capaces de provocar el desarrollo tumoral, siendo la ampolla II la más agresiva, pues todos los ratones murieron. La puesta a punta de este modelo tumoral pre-clínico nos permite evaluar la capacidad del AcMo en mediar la muerte de células tumorales *in vivo* y de aumentar la sobrevida de animales inoculados con dichas células.

La bibliografía muestra la existencia de un anticuerpo quimérico de B72.3, el cual se ha probado posee la habilidad de mediar la muerte celular de células de cáncer humanas [46]. A su vez, se han expresado receptores quiméricos en células T, las cuales pueden generar una respuesta T acotada al blanco del anticuerpo [47]. Debido a que nunca fue demostrado, sería interesante evaluar si este fenómeno de ADCC podría funcionar *in vivo* en modelos murinos, ya que existen evidencias de que anticuerpos de unión a antígenos de tipo carbohidratos pueden mediar la citotoxicidad *in vivo* [38].

También sería importante evaluar el reconocimiento y habilidad de mediar citotoxicidad del B72.3 en otras líneas tumorales, para de esta forma poder seguir evaluando dicho anticuerpo, planteando la posibilidad de su uso en inmunoterapia tumoral pasiva.

Conclusiones

En este trabajo fue posible obtener y purificar por cromatografía de afinidad el anticuerpo monoclonal anti-sTn B72.3, antígeno comúnmente expresado en células tumorales de origen epitelial.

Asimismo evaluamos el rendimiento de la purificación de dicho AcMo utilizando agarosa conjugada a proteína A o proteína G, siendo con esta última la que se obtuvieron mayor rendimiento. Sin embargo, cabe destacar que ambas estrategias permitieron la purificación del AcMo B72.3.

Por otro lado, determinamos que dicho anticuerpo reconoció un extracto proteico derivado de la línea tumoral murina TA3/Ha. Además, el AcMo B72.3 fue capaz de mediar *in vitro* la muerte de células TA3/Ha. Queda por determinar si dicho anticuerpo puede mediar la ADCC *in vivo*.

Nuestros resultados son relevantes en la búsqueda de estrategias inmunoterapéuticas contra el cáncer, y particularmente en la determinación de protocolos de inmunoterapias pasivas utilizando el AcMo B72.3.

Bibliografía

1. Goldsby, R.A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. & Kuby, J., *Immunology*. 5 th ed. 2003, Nueva York, Estados Unidos: W. H. Freeman and Company.
2. Charles A. Janeway, J., Paul Travers, Mark Walport, MarkJ. Schlomchik, *Inmunobiología, El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 2 ed. 2003: Masson.
3. Goding, J.W., *Monoclonal Antibodies: principles and practice*. 3 th. ed. 1993: Academic Press.
4. Köhler G and M. C, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975: p. 495-497.
5. Alkan, S.S., *Monoclonal antibodies: the story of a discover that revolutionized science and medicine*. Nature Reviews, 2004. **4**: p. 153-156.
6. FUAM, G.E., *Anticuerpos Monoclonales Terapéuticos- Informe de vigilancia tecnológica 2007*.
7. Kim SJ, P.Y., Hong HJ., *Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies*. Moll cells, 2005: p. 17-29.
8. Brekke, O.H. and I. Sandlie, *Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century*. Nature Reviews Drug Discovery, 2003. **2**(1): p. 52-62.
9. Smith, J.e.a., *Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis*. The FASEB Journal 2005. **19**: p. 331-341.
10. Cox KM, S.J., Regan JT, Gasdaska JR, Frantz KK, Peele CG, Black A, Passmore D, Moldovan-Loomis C, Srinivasan M, Cuison S, Cardarelli PM, Dickey LF., *Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant Lemna minor*. Nature Biotechnology, 2006: p. 1591-7.
11. Romer, T., H. Leonhardt, and U. Rothbauer, *Engineering antibodies and proteins for molecular in vivo imaging*. Current Opinion in Biotechnology, 2011.
12. Adams, G.P. and L.M. Weiner, *Monoclonal antibody therapy of cancer*. Nature Biotechnology, 2005. **23**(9): p. 1147-1157.

13. R., M., *Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells*. *Oncogene*, 2011. **30**(9): p. 1009-19.
14. Lodish, H., Berk, A. , Zipursky, SL., Matsudaira, P., Baltimore, D, Darnell, J.,, *Cancer, in Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman editor, 2000: p. 935-973.
15. Baehrecke, E.H., *How death shapes life during development*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002. **3**: p. 779-787.
16. Bogenrieder, T.H., M. , *Oncogene*. 2003. **22**: p. 6524.
17. Hanahan, D.W., R. A., *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**: p. 57-70.
18. OMS- Organización Mundial de la Salud. [cited 2011; <http://www.who.int/es/>].
19. *III Atlas de incidencia del cáncer en Uruguay, in cáncer, C.h.d.l.c.e.* 2006.
20. Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G.J. Jr., *Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications*. Vol. 44(45). 2005: *Angew Chem Int Ed Engl*.
21. Varki, A.P., et al, *Working group report: the roles of glycans in hemostasis, inflammation and vascular biology*. *Glycobiology*, 2008. **18**(10): p. 747-749.
22. Teresa Freire, S.B., Sophie Vichier-Guerre, Richard Lo-Man and Claude Leclerc, *Carbohydrate Antigens: Synthesis Aspects and Immunological Applications in Cancer*. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2006.
23. Bertozzi, C.R., Rabuka, D., , *Essentials of Glycobiology*. , in *Structural Basis of Glycan Diversity* e.a. A. Varki, Editor. 1999: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
24. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P, *Molecular biology of the cell*. 5ta ed. 2008, Nueva York, Estados Unidos: Editorial Garland Science.
25. Wopereis, S., Lefeber, D. J., Morava, E. & Wevers, R. A, *Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review*. *Clinical Chemistry*, 2006. **52**(4): p. 574-600.
26. Hagen, K.G., T.A. Fritz, and L.A. Tabak,, *All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases* *Glycobiology* 2003. **13**((1)): p. 1R-16R.

27. Brockhausen, I., *Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions*. EMBO reports, 2006. **7**(6): p. 599-604.
28. Bresalier R, H.S., Schoeppner H, Kim Y, Sleisenger M, Brodt P, Byrd J *Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis*. Gastroenterology, 1996. **110**: p. 1354–1367.
29. Aurélie Cazet, S.J., Marie Bobowski, Joy Burchell and Philippe Delannoy, *Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer*. Cazet et al. Breast Cancer Research, 2010. **12**(204).
30. Colcher D, H.H.P., Nuti M, Schlom J *Proc Natl Acad Sci* 1981. **78**: p. 3199-203.
31. Nuti M, T.Y., Mariani-Constantini R, Hand PH, and S.J. Colcher D, *J Inst Cancer*, 1982. **29**: p. 539-545.
32. M.A. Reddish, L.J., R. R. Koganty, D. Qiu, W. Hong and B. M. Longenecker, *Specificities of anti-sialyl-Tn and anti-Tn monoclonal antibodies generated using novel clustered synthetic glycopeptide epitopes*. Glycoconjugate Journal, 1997. **14**: p. 549-560.
33. Kobayashi H, T.T., Kawashima Y., *Serum sialyl Tn as an independent predictor of poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer*. J Clin Oncol, 1992. **10**(1): p. 95-101.
34. Gero EJ, C.D., Ferroni P, Melsheimer R, Giani S, Schlom J, Kaplan P., *CA 72-4 radioimmunoassay for the detection of the TAG-72 carcinoma-associated antigen in serum of patients*. J Clin Lab Anal, 1989. **3**(6): p. 360-369.
35. Horowitz MI, D.A., *Immunochemistry of ovine and bovine submaxillary mucins*. Immunochemistry, 1967. **4**(5).
36. *Strategies for protein purification handbook*, [http://www3.gehealthcare.com/en/Global Gateway](http://www3.gehealthcare.com/en/Global_Gateway), Editor, GE Healthcare.
37. Smith, P.K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry, 1985. **163**.

38. P. Hubert , A.H., S. Viel , A. Nicolas, X. Sastre-Garau , P. Oppezso, O. Pritsch, E. Osinaga and S. Amigorena, *Antibody-dependent cell cytotoxicity synapse formation in vivo during Tn-specific antibody tumour immunotherapy in mice*. Cancer Research, 2011. **71**: p. 5134-5143.
39. Boyce, P.a., *Induction of plasma-cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants*. Nature, 1962.
40. Patrick R. Murray, K.S.R., Michael A. Pfaüer, *Microbiología Médica*, Elsevier.
41. Harlow, E.a.L., D. eds, *Antibodies, A Laboratory Manual*. 1988: Cold Spring Harbor Laboratory,.
42. M. M. Lippman, J.M.V., I. Kline, and D. L. Elam, *Immunity to a TA3 Tumor Subline That Grows in Allogeneic Hosts Elicited by Strain-specific TA3 Tumor Cells*. Cancer Research, 1973. **33**: p. 679-684.
43. Sugihara, I., *Different Progression of Tumor Xenografts between Mucin-Producing and Mucin-Non-Producing Mammary Adenocarcinoma-Bearing Mice*. Cancer Research, 2006. **66**(12): p. 6175-6182.
44. Noriyuki Morita, Y.Y., Hideki Asanuma, Hiroshi Nakada, *Inhibition of cáncer cell growth by anti- Tn monoclonal antibody MLS128*. BioScience Trends, 2009. **3**(1): p. 32-37.
45. T. Joshi, L.P.G., C. Cheney, M. C. Ostrowski, N. Muthusamy, J. C. Byrd, and S. Tridandapani, *The PtdIns 3-Kinase/Akt Pathway Regulates Macrophage-Mediated ADCC against B Cell Lymphoma*. PLoS ONE, 2009. **4**(1): p. e4208.
46. Primus FJ, P.T., Hutzell P, Kashmiri S, Slavin DC, Callahan R, Schlom J., *Chimeric B72.3 mouse/human (IgG1) antibody directs the lysis of tumor cells by lymphokine-activated killer cells*. Cancer Immunol Immunother., 1990. **31**(6): p. 349-357.
47. Hombach A, H.C., Sircar R, Tillmann T, Diehl V, Kruis W, Pohl C, Abken H., *T cell targeting of TAG72+ tumor cells by a chimeric receptor with antibody-like specificity for a carbohydrate epitope*. Gastroenterology, 1997. **113**(4): p. 1163-1170.

Agradecimientos

A mis padres y mi hermana, por su apoyo incondicional su compañía, cariño y sobre todo esfuerzo diario.

A mi familia, por acompañarme en éste camino.

A mis amigos, por compartir conmigo los mejores momentos, pero también ser un apoyo en los momentos difíciles.

A Teresa, por su invaluable dedicación, por sobre todas las cosas siempre estar dispuesta a enseñarme y ayudarme, contribuyendo de forma muy importante en mi formación.

A mis compañeros de laboratorio, Verónica, Enrique y Ernesto, por siempre estar dispuestos a dar una mano cuando se la necesita y por hacer de las instancias de trabajo, momentos muy agradables.

A todos aquellos que me acompañaron en el día a día, ayudando de una forma u otra a hacer más fácil la tarea.