

**ANTICUERPO MONOCLONAL "cmc.gg7" ANTIANTÍGENO DE TEJIDO PROSTÁTICO.
RECONOCIMIENTO HISTOLÓGICO**

Lic. Blanca Rosa Santana Guerra; Dr. Heberto Bravo Hernández; Dra. Clara Febles Almeida; Dra. Zoraya Gómez Benítez

Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay. Camagüey, Cuba.

RESUMEN

El presente trabajo fue realizado durante los años 1994-96 y tiene como objetivo, exponer los resultados del reconocimiento de un anticuerpo monoclonal (AcM) anti antígeno de tejido prostático; secretado por el hibridoma CMC.GG7 frente a distintos tejidos normales y patológicos. Por motivo de obtener en el Centro de Inmunología y Biológicos del Instituto Superior de Ciencias Médicas de Camagüey, un Hibridoma secretor de anticuerpos monoclonales que reconocían antígenos de tejidos prostáticos incluidos en parafina, se realizó un diseño experimental para enfrentar el AcM obtenido a un panel de tejidos normales y patológicos de distintos orígenes todos incluidos en parafina. Las muestras de tejidos, tanto normales como patológicos; fueron suministradas por los hospitales "Manuel Ascunce Domenech" y "Amalia Simoni" de la Provincia. de Camagüey, el Hospital "Hermanos Ameijeiras" y el Instituto Nacional de Oncología y Radioterapia de ciudad Habana. Se utilizó la técnica de la inmunoperoxidasa que comúnmente se realiza en los laboratorios de inmunohistoquímica del país. A todos los tejidos se les realizó un examen previo con Hematoxina y Eosina para comprobar la calidad y origen del tejido. Los sobrenadantes de los cultivos del hibridoma CMC.GG7 se concentraron 10 veces para ser utilizados en los ensayos. La peroxidasa endógena fue inhibida con Peróxido de Hidrógeno 30 volúmenes al 3% en metanol absoluto durante 30 minutos a la temperatura del laboratorio. En tejidos prostáticos normales y tumorales se observó reconocimiento en todos los tejidos ensayados, específicamente en el citoplasma de las células epiteliales luminales y basales de los acini

secretorios y conductos de la glándula prostática, el marcaje fue más intenso en el caso de la hiperplasia benigna prostática. Se observó reactividad con algunos de los tejidos epiteliales utilizados como Pulmón, Hígado, Riñón, así como también reconoció cerebro y cerebelo, no manifestó reconocimiento ni con tejido linfático (Ganglio, Bazo) ni con muestras de tumores de origen glandular. Con tumores de origen epitelial sólo reconoció carcinomas epidermoide de piel fina y carcinoma epidermoide de paladar duro. Con tumores de origen mesenquimatoso solo marcó en micrometástasis de carcinoma indiferenciado de mama en ganglio linfático. El Acm CMC.GG7 presentó un patrón de reconocimiento más restringido al tejido prostático normal y tumoral (adenocarcinoma, hiperplasia benigna prostática e hiperplasia benigna prostática concomitando con carcinoma). No reconoció el tejido linfoide lo cual tiene importancia para el diagnóstico diferencial con tumores de origen incierto.

DeCS: PROSTATA, ANTICUERPOS MONOCLONALES, INMUNOHISTOQUIMICA.

ABSTRACT

Objectives: This study was carried out during 1994 to 1996 and its objective is to state the results of the monoclonal antibody assessment (MAb) antiantigen of the prostatic tissue; secreted by CMC.GG7 hybridome with different normal and pathological tissues. Design: Due to the fact of obtaining a hybridome secretor of monoclonal antibodies that recognize antigens of prostatic tissue with paraffine embedding in the Immunology and Biologic Center of the Medical University of Camaguey. An experimental design was performed for studying the MAb obtained in a panel of normal and pathological tissues with different origins, all in paraffine embedding. Tissue samples, either normal or pathological, embedded in paraffine were supplied by "Manuel Ascunce Domenech" and "Amalia Simoni" Provincial Hospitals and "Hermanos Ameijeiras Hospital, the National Institute of Oncology and Radiotherapy of Havana city. Immunoperoxidase technique was used. It is commonly carried out in the immunohistochemical laboratories of our country. All tissues had a previous exam with Hematoxylin and Eosin for proving quality and tissue origin. Culture supernatants of the CMC.GG7 hybridome were tenfold concentrated for being used in the trials. Endogen peroxidase was inhibited with 30% Hydrogen Peroxidase, 30 volumes in absolute methanol during 30 minutes at laboratory temperature. Results: In normal and tumoral prostatic tissues, examination was performed in all essayed tissues, specifically in the cytoplasm of

epithelial luminal and basal cells of the secretory acini and ducts of the prostatic gland, the higher score was that of the benign prostatic hyperplasia. Reactivity was observed with some of the epithelial tissues used such as lung, liver, kidney. Also, the brain and cerebellum were assessed, it did not show evidence neither with lymphatic tissue (ganglion, spleen) nor with tumour samples of glandular origin. It only recognized epidermoid carcinoma of smooth skin and epidermoid carcinoma of hard palate with tumours of mesenchymatous origin, it only marked in micrometastasis of undifferentiated breast carcinoma in lymphatic ganglion. Conclusions: The CMC.GG7 MAb had a pattern of recognition more limited to normal and tumoral prostatic tissue (adenocarcinoma, benign prostatic hyperplasia and benign prostatic hyperplasia concomitant with carcinoma). It did not recognize lymphoid tissue which is important for the differential diagnosis with tumours of unknown origin.

DeCS: PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN; MONOCLONAL ANTIBODIES; IMMUNOHISTOCHEMISTRY

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata es un serio problema de salud a escala mundial, y la segunda causa de malignidad en el hombre (1).

El diagnóstico puede establecerse por el tacto rectal, la ultrasonografía transrectal, la biopsia de la glándula y la ultrasonografía transrectal, la biopsia de la glándula y la cuantificación del Antígeno Específico Prostático (PSA) en el suero sanguíneo (2).

La técnica de obtención de anticuerpos monoclonales (ACM) descubierta por Kohler y Milstein, posibilitó la obtención de nuevos métodos para el diagnóstico inmunopatológico (3); pudiéndose establecer con ellos inmunodiagnósticos para cuantificar la Fosfatasa Ácida Prostática (PAP) y el PSA, siendo ambos Marcadores Biológicos del cáncer prostático, el primero descubierto por Gutman en 1930 y el segundo purificado del semen humano por Wang y Col en 1979 (4,5); se considera al PSA un marcador superior que el PAP (6) y actualmente se le concede mucho valor para el diagnóstico precoz de esta enfermedad (7).

La cuantificación de estos antígenos (Ag)-tumor asociados es de gran utilidad para el diagnóstico, el seguimiento, el pronóstico y el reconocimiento del tumor a partir de una metástasis, este último por técnicas inmunohistoquímicas en tejidos frescos y fijados e incluidos en parafina.

Aún los investigadores han seguido la búsqueda de nuevos AcM anti Ag del tejido prostático, entre los que se encuentran, 1A5, 2A4, 3F1, F5 y 3a12(8), TURP-27 (9), PD41(10), 7E11-C5 (11).

El presente trabajo tiene como objetivo exponer el reconocimiento del AcM CMC.GG7 frente a distintos tejidos normales y patológicos.

MÉTODOS

El Hibridoma CMC.GG7 fue obtenido en el Centro de Inmunología y Biológicos(CENIB) del Instituto Superior de Ciencias Médicas de Camagüey, como resultado de una fusión realizada con un mieloma Murino P3/x63.Ag8.653 y linfocitos B obtenidos por perfusión esplénica, de un ratón Balb/c inmunizado con tejidos de Adenocarcinoma prostático bien diferenciado incluidos en parafina, según la técnica que plantearon Pancino y Osinaga (12), con la variante que las dosis fueron administradas cada quince días.

Los clonajes se realizaron por la técnica de Dilución Limitante (13).

El tamizaje primario se realizó utilizando tres métodos secuenciales diferentes: Un sistema inmunoenzimático (ELISA) para seleccionar los clones productores de IgG, el cual fue suministrado por el Centro de Inmunología Molecular, la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar el reconocimiento en criocortes en tejidos frescos y por último, los clones francamente positivos con la IFI; fueron ensayados con la técnica de inmunoperoxidasa en tejidos prostáticos incluidos en parafina; para esta técnica se utilizó el sistema Avidina Biotina según el método convencional utilizado en los laboratorios de inmunohistoquímicos del país y así determinar el reconocimiento de los híbridos finalmente escogidos, en los tejidos ensayados.

En los dos últimos métodos mencionados se definió la intensidad de reconocimiento con cruces (+).

Las muestras de tejidos para el estudio fueron suministradas por los servicios de Anatomía Patológica de los Hospitales "Manuel Ascunce Domenech" de Camagüey, Instituto Nacional de Oncología y Radiología (INOR) y Hospital "Hermanos Ameijeiras" de Ciudad Habana.

Los fragmentos de tejidos normales fueron tomados de necropsias, dentro de la hora posterior al exitus letalis de sujeto fallecidos por accidentes, siendo conservados en nitrógeno líquido y transportados hasta el laboratorio de Inmunohistoquímica del Centro de Inmunología y Biológicos, se fijaron en formol al 10 % y fueron tratados posteriormente e incluidos en parafina calentada a 56-58 grados Centígrados.

Las muestras de tejidos patológicos incluidos en parafina fueron obtenidas de los archivos de Anatomía Patológica de los hospitales antes mencionados.

A todos los tejidos incluidos en parafina se les realizaron cortes seriados entre 4-6 micrómetros y fueron colocados posteriormente en portaobjetos. El proceso de desparafinado se realizó como comúnmente se hace en los laboratorios de Anatomía Patológica.

La peroxidasa endógena fue inhibida utilizando Peróxido de Hidrógeno 30 vol. al 3% en metanol absoluto durante 30 minutos a la temperatura del laboratorio.

A todos los tejidos se les examinó por la técnica de Hematoxilina-Eosina por un especialista en Anatomía Patológica, antes de realizar la técnica de inmunoperoxidasa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la fusión realizada, se obtuvo el Hibridoma CMC.GG7, secretor de un AcM que reconoció al tejido prostático, por tal motivo se enfrentó a distintos tejidos humanos normales y patológicos incluidos en parafina.

Según el patrón de reconocimiento de este AcM, en tejidos prostáticos normales y tumorales, observamos que el antígeno reconocido estaba presente en: tejidos prostáticos normales, hiperplasias fibroadenomatosas, adenocarcinomas, así como en el carcinoma (tabla 1), estando localizado en el citoplasma de las células epiteliales y basales de los acini secretorios y conductos de la glándula prostática; en el caso de las hiperplasias, se observó una reacción más intensa en las células luminales que en las basales, esto no concuerda con los hallazgos de Gallee (1989) donde el Ag que reconoció el AcM aislado por ellos estaba distribuido en las hiperplasias, tanto en las células basales como luminales (14).

Tabla 1. Patrón de reconocimiento con tejidos prostáticos acm cmc.gg7

Tejidos de prostatanormal	12/12
Hiperplasia fibroadenomatosa	9/15
Hiperplasia y carcinoma	21/21
Adernocarcinoma	14/15
Carcinoma	14/14

Fuente: CENIC. ISCM-C.

Aunque este AcM mantuvo un reconocimiento más restringido al tejido prostático, en tejidos normales pudimos observar reactividad con varios epitelios simples y estratificados (tabla 2), pues presentó reactividad cruzada con la sustancia blanca del cerebro (9/9) y el cerebelo (3/3) y un ligero reconocimiento con epitelios simples tales como: (pulmón, hígado, riñón) y fibra estriada cardíaca; resultados similares encontró Kin (1988)(15) con el AcM PR 92 que reconoció además del cáncer de próstata, cáncer de mama y en menor grado vejiga, hígado, carcinoma de esófago y melanomas.

Tabla 2. Patrón de reconocimiento con tejidos normales acm cmc.gg7.

Tejidos	CMC.GG7 CASOS +/TOTALES
Piel fina	0/4
Glandula tiroide	0/1
Corazón	1/7
Pulmón	4/9
Hígado	3/9
Páncreas	0/5
Bazo	0/5
Riñón	1/6
Glándula suprarrenal	0/4

Intestino delgado	0/5
Intestino grueso	0/2
Cerebro	9/9
Cerebelo	3/3
Ganglio linfático	0/4

Con los tumores de origen glandular el AcM CMC.GG7 no expresó reactividad, haciéndolo solo con los acini serosos de la glándula parótida en el adenolinfoma (tumor de Warthin) y la zona del tumor no fue reconocida (tabla 3).

Tabla 3. Patrón de reconocimiento con tumores de origen glandular

Localización	Histología	Casos +/totales
G. párotida	Adenolinfoma (t. warthin)	3/3
G. tiroide	Bocio nodular adenomatoso	0/2
	Adenoma folicular	0/2
Colon	Adenocarcinoma mod. diferenciado	0/2
	Adenoma vellosos	0/1
	Adenoma tubular	0/2
Recto	Adenocarcinoma mod. diferenciado	0/2
Ovario	Adenocarcinoma pob. diferenciado	0/2
Mama	Adenocarcinoma	0/1

Fuente: CENIC. ISCM-C.

Nota: MOD= Moderadamente

POB= Pobrementes

En los tumores de origen epitelial solo reconoció las perlas de queratina en los Carcinomas Epidermoides de las siguientes localizaciones: piel fina, paladar duro, lengua y fosas nasales: con el resto de los tumores epiteliales ensayados no mostró reactividad (tabla 4).

Tabla 4. Patrón de reconocimiento en tumores de origen epitelial

Localización	Histología	Casos +/totales
Piel fina	Carc. basocelular sólido	0/2
	Carc. epidermoide	1/7
G. tiroide	Carc. folicular	0/3
	Carc. papilar	0/1
Paladar duro	Carc. epidermoide	3/3
Pulmon	Carc. epidermoide	0/1
Vejiga	Carc. transicional	0/1
Cérvix	Carc. indiferenciado	0/1

Endocervix	Carc. epidermoide	0/1
Lengua	Carc. epidermoide	1/2
Fosa nasal	Carc. indiferenciado	1/1
Laringe	Carc. epidermoide	0/1
Vulva	Carc. epidermoide	0/1

CARC.= Carcinoma.

G. = Glándula.

Con tumores de origen mesenquimatoso observamos marcaje en un grupo de células metastásicas de un carcinoma indiferenciado de mama en un ganglio axilar (micrometástasis), sin mostrar reacción alguna con el resto de los tumores examinados (tabla 5).

Tabla 5. Patrón de reconocimiento en tumores de origen mesenquimatoso

Localización	Histología	casos +/totales
Piel fina	Melanoma maligno	0/1
	Queratosis solar	
	Tipo de atrofia	0/1
Ganglio	Hiperplasia folicular	0/3
LInfático	Reactiva	
	Linfoma de hodkingh	0/3
	Linfoadenitis cronica	0/2
	Micrometastasis de Carcinoma indiferenciado de mama	2/3

Fuente: CENIC. ISCM-C.

Se han reportado diferentes AcM que reconocen al tejido prostático, algunos de ellos además reconocieron en mayor o menor medida otros tejidos fundamentalmente de origen epitelial (9-15), tal es el caso de nuestro AcM.

También han sido reportados otros AcM que sólo reconocen el tejido prostático y según los autores reconocen antígenos diferentes del PSA (10).

El AcM CMC.GG7 presentó un reconocimiento intenso con la sustancia blanca del cerebro y cerebelo, lo que al parecer estaba relacionado con la presencia de neuroqueratina, que es una red de material proteínico que queda alrededor de las fibras nerviosas, una vez que la mielina se disuelve por el empleo de fijadores ordinarios (16).

El reconocimiento en las fibras estriadas cardíacas ha sido observado con relativa frecuencia con aquellos AcM que reconocen proteínas de filamentos intermedios, pues al utilizarse el AcM en concentraciones muy altas, pueden presentar reactividad cruzada con los diferentes grupos de filamentos intermedios (17).

El AcM secretado por el híbrido CMC.GG7, reconoce las perlas de queratina en el carcinoma epidermoide de piel fina, paladar duro y lengua, así como en un grupo de células tumorales en un carcinoma indiferenciado de mama metastatisada a ganglio axilar, pudiendo este antígeno estar relacionado con una citoqueratina de alto peso molecular; esta última comprende un grupo de 19 polipéptidos que presentan homología en sus secuencias aminoacídicas y se pueden diferenciar unas de otras por su peso molecular y punto isoeléctrico, son exclusivas de células epiteliales y altamente conservadas durante la transformación maligna de estas células, por lo que su localización en los tumores indica este origen.

El hecho que este AcM no reconozca tejido linfoide (bazo y ganglios linfáticos) posibilita que sea utilizado en el diagnóstico diferencial en tumores de origen incierto, ya que descartaría un posible tumor de origen linfoide.

CONCLUSIONES

1. El AcM secretado por el Hibridoma CMC.GG7 reconoció los tejidos prostáticos incluidos en parafina, tanto normales como patológicos.
2. El AcM CMC.GG7 presentó un patrón de reconocimiento más restringido al tejido prostático normal y tumoral (carcinoma y adenocarcinoma) y a la hiperplasia, concomitando con carcinoma.
3. No reconoció el tejido linfoide, por lo que puede ser de utilidad para el diagnóstico diferencial con tumores de origen incierto.

4. Presenta reacciones cruzadas con cerebro y cerebelo y en menor grado con corazón, pulmón, hígado y riñones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Takayama T, Vessella R. Newer applications of Serum Prostate specific-antigen in the management of Prostate cancer. *Seminars in Oncology* 1994; 21(5): 542-553.
- 2- Olson M, Hosnlak H, Fisher S, Flisak M, Salomon C, et al. Directed and Random Biopsies of the Prostate: Indication Based on Combined Results of Transrectal Sonography and Prostate-Specific Antigen Density determinations. *AJR* 1994; 163:1407-1411.
- 3- Gavilondo J. Aspectos básicos y avances recientes en la Tecnología de producción de AcM. *Interferón y Biotecnología* 1987; 4 (1): 1-16.
- 4- Gutiérrez M. Antígeno específico prostático; Aportación de los AcM a la determinación plasmática por radioinmunoanálisis. *Arch Esp Urol* 1988; 4 (3): 188-192.
- 5- Wong MC . A simplified purification procedure for human prostate antigen. *Oncology* 1992; 39: 1-5.
- 6- Leitenberger A, Altwein JE. Efficacy and discriminative ability of Prostate-Specific Antigen as a tumor Marker. *Eur Urol* 1990; 17:12-16.
- 7- Mettlin C. The status of Prostate Cancer. Early Detection. *Cancer* 1993; 72(3): 1050-1055.
- 8- Chun TM, Kawinski E, Hibin,. Prostate-specific antigenic domain of human prostate specific antigen identified with monoclonal antibodies. *J Urol* 1989; 141 (1): 152-156.
- 9- Wright G L A novel prostate carcinoma associated glycoprotein complex (PAC) reorganized by monoclonal antibody, turp 27. *Int J Cancer* 1991; 47 (5): 717-725.
- 10- Beckett ML, Lipford GB, Haley CL, Schellhammer Df, Wright GL. Monoclonal antibody PD 41 recognizes an antigen restricted to prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1991; 51 (4): 1326-33.
- 11- López AD, Davis WL, Rosenstraus M J, Ureges AJ, Gilman S.C. Inmunohistochemical and pharmacokinetic characterization of the specific immunoconjugate CYT-356 Derived from antiprostate monoclonal antibody 7 E11-C5. *Cancer Res* 1990; 50 (19): 6423-29.

12- Pancino GF and Osinaga E. Production of a monoclonal antibody as immunohistochemical marker on paraffin embedded tissue using a new immunization method. *Hibridoma* 1990; 9 (4): 389-393.

13- Gavilondo J.V. *Anticuerpos Monoclonales*. *Elfos Scientiae Cuba*, 1995.

14- Galles MP, Vissier-de Jong E, Tenkate F.J Schroeder FH, Van der Kwast T.H. Monoclonal antibody K C-67 defined growth fraction in benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *J. Urol* 1989; 142 (5): 1342-6.

15- Kim Y D, Robinson DY, Tomita JI. Monoclonal antibody PR 92 with Restricted Specificity for Tumor-associated Antigen of Prostate and Breast Carcinoma. *Cancer Res* 1988; 48: 4543-4548.

16- Roland Lesson C, Thoman Leesson S. *Idistologia 3er Ed. Española*.1977: 209.

17- Lobeck H. Generation and characterization of Monoclonal Antibodies to Cytokeratins No. 4 and 5 European Symposium on the biology of the cytoskeleton. Helsinki 18-21 Junio 1989.

AGRADECIMIENTOS

Le agradecemos a los siguientes compañeros, la dedicación, el entusiasmo y la científicidad con que realizaron las tareas técnicas de esta investigación. Así como la colaboración en general para el desarrollo exitoso de la misma. A todos "MUCHAS GRACIAS"

- Blanca Rosa Solo Serrano
- María del Carmen Galdos Sánchez
- Geydi Loyola
- Mayra Quesada Viñales
- Bertha Glean Sorís
- Rédulo Castañeda Arce
- María Dolores Camfuch

Un agradecimiento especial merece el Dr. Alberto Clavijo Portieles por su preocupación, ocupación y desvelos para el desarrollo de los laboratorios del CENIC y de esta investigación en particular.

Recibido: 30 de octubre de 1996

Aprobado: 12 de diciembre de 1996