

ANTICUERPOS MONOCLONALES: TRASCENDENCIA Y APLICACION

Dr. Félix J. Tapia *
Dra. Imelda Campo-Asen *

INTRODUCCION.

La historia de la producción de anticuerpos monoclonales por la técnica de hibridoma de Köhler y Milstein tiene mucho de las características anecdóticas que han distinguido a los grandes acontecimientos científicos de nuestros días. La dedicación y esfuerzos individuales y combinados de varios grupos de investigadores, la historia de experimentos exitosos y muchos fracasos, son la demostración de cómo hallazgos productos de la ciencia básica, consiguen una gran aplicación en la solución de muchos de los problemas que nosotros, gente de la biomedicina queremos resolver. Para nosotros los latinoamericanos es un gran orgullo que en el centro de estos hallazgos esté el investigador argentino César Milstein.

Muchos de los conocimientos obtenidos sobre la estructura de las inmunoglobulinas y su organización genética se lograron mediante el estudio de proteínas provenientes de mielomas. Los mielomas, como es bien sabido, son tumores malignos del sistema inmune cuyas células producen grandes cantidades de proteínas las cuales son anticuerpos monoclonales, ya que por definición un tumor es un clon inmortal de células descendientes de una sola célula progenitora. Sin embargo, la principal desventaja de estos tumores como fuente de inmunoglobulinas,

es que las proteínas, por ellos producidas, son muy difíciles de caracterizar debido a que se desconocen los antígenos que las inducen.

En 1975, Georges Köhler y César Milstein trabajando en el Laboratorio de Biología Molecular del Medical Research Center en Cambridge producen la primera fusión entre células de mieloma de ratón y linfocitos del bazo de ratones previamente inmunizados con antígenos conocidos. Como resultado se obtuvo una célula híbrida o hibridoma con dos de las propiedades más sobresalientes de sus progenitores, el carácter inmortal de las células de mieloma y la capacidad de producción de anticuerpos específicos de los linfocitos.

Producción de anticuerpos monoclonales.

Brevemente, la técnica consiste en inmunizar un ratón con el antígeno de interés, revisándose periódicamente hasta obtener altos títulos de anticuerpos, luego de un refuerzo se esperan 3-4 días y se remueven las células esplénicas. Estas células son cultivadas junto a células de mieloma en presencia de polietilenglicol, el cual actúa como agente promotor de la fusión celular. Debido a que sólo un pequeño porcentaje de células se fusionan para formar hibridomas, es esencial eliminar las células esplénicas y las células de mieloma no fusionadas, y los híbridos formados entre dos células esplénicas o entre dos células de mieloma. Las células esplénicas por ser células

normales mueren al no poder sobrevivir en el medio de cultivo. Las células de mieloma, por su parte, han sido previamente manipuladas genéticamente para que posean un defecto enzimático que las hace susceptibles a la aminopterina. Por lo tanto, las células de mieloma mueren en un medio de cultivo que contiene aminopterina, sobreviviendo sólo los hibridomas por poseer la enzima de las células esplénicas progenitoras.

En diferentes etapas del procedimiento se debe revisar la actividad específica de los anticuerpos producidos por los hibridomas con sus inmunógenos respectivos. A tal efecto, existe controversia sobre la metodología a elegir, ya sea métodos bioquímicos como el radioinmunoensayo o la ELISA (inmunoensayo enzimático), métodos inmunocitoquímicos como la inmunofluorescencia y la inmunoperoxidasa, o ensayos de citotoxicidad u inmunoprecipitación. Los procedimientos bioquímicos detectan anticuerpos unidos al antígeno en suspensión, requiriendo estos inmunoensayos, de anticuerpos de gran avidéz, los cuales no son necesariamente los mejores para la detección de antígenos *in situ*. Por lo tanto, como método de selección se deben utilizar los mismos que van a ser usados en la identificación final de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales en producción.

Cuando un hibridoma ya ha sido caracterizado y seleccionado, una parte puede ser congelada para uso futuro,

* Secciones de Biología Molecular e Histología, Instituto Nacional de Dermatología.

y la otra para producción amplificada, inyectándola nuevamente en ratones para producir tumores ascíticos con grandes cantidades del anticuerpo monoclonal.

Ventajas y desventajas de los anticuerpos monoclonales.

La utilización de anticuerpos y sus antígenos homólogos como reactivos en varios procedimientos inmunológicos, ha contribuido en forma eminente a muchos hallazgos importantes en los campos de la medicina y la biología. Estos procedimientos además de tener un gran valor diagnóstico sirven en la localización subcelular de componentes intra y extracelulares de diferentes microorganismos.

Los anticuerpos monoclonales producidos por la técnica de hibridoma ofrecen muchas de las ventajas y pocas de las desventajas de los anticuerpos policlonales producidos en la forma convencional. Primero, por permitir la obtención de anticuerpos en forma masiva y permanente, hecho que permite la reproductibilidad de experimentos por diferentes laboratorios; y segundo, por su alta homogeneidad en lo que respecta a tipo de inmunoglobulina, especificidad y avidéz.

La técnica de hibridoma nos permite plantearnos protocolos de inmunización diferentes, al no exigir inmunógenos altamente purificados. La alta especificidad de los anticuerpos monoclonales permite su uso en diagnósticos diferenciales, purificación de macromoléculas, tipificación celular y en inmunoterapia.

Algunos problemas deben todavía ser resueltos, entre ellos, el desarrollo de mielomas humanos que produzcan fusiones eficaces, para sustituir a los mielomas de murinos. Paso esencial para la utilización de anticuerpos monoclonales en inmunoterapia en forma segura, pues se conoce que los hibridomas murinos contienen retrovirus infecciosos al hombre. Otras

de las desventajas de los anticuerpos monoclonales es su sensibilidad a condiciones ambientales, como cambios de temperatura, pH, transporte, etc.

Quizás una de las razones que hacen tan difícil la localización de antígenos con métodos inmunocitoquímicos en bloques de parafina o resina epoxy, limitando su localización a cortes congelados obtenidos por criostato. Este problema existe principalmente en los anticuerpos monoclonales comerciales, los cuales son en su mayoría seleccionados por métodos bioquímicos más rápidos pero no necesariamente los más adecuados.

Aplicaciones en ciencia básica

El uso de anticuerpos monoclonales como inmunoabsorbentes nos permite caracterizar y seleccionar de una manera relativamente fácil, un sinnúmero de macromoléculas y células. Entre las moléculas que ya han sido separadas por esta metodología están el interferón humano, factor V de coagulación, receptor de inmunoglobulina de ratón, antígeno de histocompatibilidad H-2K de ratón, etc. De la misma manera, se han podido aislar linfocitos de otras células usando anticuerpos monoclonales contra HLA-DR, y células de Langerhans de cultivo de epidermis usando el anticuerpo OKT6.

Aplicaciones en Patología

El uso de anticuerpos monoespecíficos para detectar antígenos en patología ha contribuido enormemente al diagnóstico diferencial de enfermedades que son clínicamente o morfológicamente similares. Métodos inmunocitoquímicos para marcadores celulares han transformado a la histología convencional en una disciplina más dinámica, en donde no solamente se caracterizan células sino que también se observan cambios metabólicos, algunos asociados con procesos de diferenciación y otros con malignidad.

Hoy en día existen muchas sustancias producidas por células normales o anormales, que pueden ser usadas como marcadores bioquímicos y citoquímicos de tumores y otras enfermedades. Los anticuerpos monoclonales con todas sus ventajas indudablemente están y seguirán contribuyendo al refinamiento técnico y por consiguiente a mejores y reproducibles diagnósticos. Es evidente, por ejemplo, el aporte en la interpretación de tumores ectópicos en donde constantemente hablamos de "sustancias parecidas a" para no comprometernos y en conocimiento de que los anticuerpos policlonales por su heterogeneidad pueden reconocer sustancias químicamente o estereológicamente similares. La disponibilidad de anticuerpos monoclonales que distinguen diferentes subpoblaciones leucocitarias, como linfocitos B y T a diferentes estadios de diferenciación ha sido muy útil en la clasificación de linfomas y leucemias. En otras condiciones, la relación de linfocitos cooperadores con respecto a linfocitos supresores en sangre periférica es un buen indicador de la condición inmunológica del individuo. En forma similar, estos anticuerpos han permitido obtener información sobre la distribución topográfica de las diferentes subclases de linfocitos, en tejido sano o enfermo.

Por último debemos mencionar el uso de anticuerpos monoclonales conjugados con radionúclidos para detectar tumores y sus metástasis ocultas, un hecho que está revolucionando la radioinmunotomografía.

Aplicaciones clínicas

No hay duda que el mayor impacto causado por los anticuerpos monoclonales es en el campo de la inmunoterapia. La posibilidad de dirigir sustancias hacia órganos o tejidos para aniquilar algo indeseable, la llamada "bala mágica", ha sido el sueño de muchos investigadores durante años.

Los anticuerpos monoclonales para inmunoterapia pueden ser utili-

zados de dos formas: directamente como sustancias citotóxicas contra los órganos blancos o conjugados a drogas, toxinas o radionúclidos. La aplicación de anticuerpos monoclonales directamente ha tenido cierto éxito en animales y en experimentos *in vitro*, sin embargo, su aplicación en humanos ha sido muy poca y no del todo exitosa. Un ejemplo de uso de anticuerpos monoclonales conjugados a radionúclidos, son los trabajos inyectando anti-*Cysticercus* marcado con Iodo-131 en más de 400 pacientes con cisticercosis con excelentes resultados. Recientemente, Martinis y colaboradores han podido fusionar dos células hibridomas diferentes, logrando así un nuevo híbrido que secreta anticuerpos monoclonales de doble especificidad. En un futuro, esta modificación a la técnica de hibridoma permitirá producir un solo anticuerpo con una especificidad dirigida a un antígeno característico de enfermedad y la otra a una droga, toxina o radionúclido.

Los anticuerpos monoclonales producidos contra diferentes agentes infecciosos no solamente serán útiles en

el diagnóstico rápido y estudios epidemiológicos, sino que podrán ser utilizados para inmunizaciones pasivas, de importancia en enfermedades donde no existen vacunas o quimioterapias efectivas.

Conclusión

Es evidente que los anticuerpos monoclonales están revolucionando la biomedicina. Köhler y Milstein, tal como lo dejaron ver en su ya trabajo clásico de la revista "Nature", nunca imaginaron que el desarrollo de una tecnología iba a tener tanta importancia y tantas aplicaciones.

Nosotros en Latinoamérica debemos unir esfuerzos para la producción de anticuerpos monoclonales contra los agentes causantes de tantas enfermedades en nuestros países. Intercambiar, evitando la repetición de esfuerzos, y quizás hasta comercializar reinvirtiendo lo obtenido en nuevos proyectos de investigación. Quién sabe si nuevos Milsteins saldrán de este Continente para aportar soluciones a los tantos males que nos afligen.

Referencias Importantes:

Trabajo clásico

Köhler, G., Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 496-497, 1975

Revisiones

Milstein, C. Monoclonal Antibodies. *Scientific American* 243: 66-74, 1980

Dale Sevier, E., David, G.S., Martinis, J., Desmond, W.J., Bartholomew, R.M., Wang, R. Monoclonal Antibodies in Clinical Immunology. *Clinical Chemistry* 27: 1797-1806, 1981.

Diamond, B., Scharff, M.D. Monoclonal Antibodies. *JAMA* 248: 3165-3169, 1982

Damjanov, I., Knowles, B.B. Monoclonal Antibodies and Tumor-associated antigens.

Laboratory Investigation 48: 510-525, 1983

Otras mencionadas en el texto

Skromne-Kadlubik, G., Celis, C. Cysticercosis of The Nervous System. Treatment by means of specific internal radiation. *Archives of Neurology* 38: 288, 1981

Martinis, J., David, G.S., Bartholomew, R.M., Wang, R. Novel Applications of Monoclonal Antibodies. En: *Basic Biology of New Developments in Biotechnology*. A. Hollander, A.I. Laskin, P. Rogers (editores). Plenum Publishing Co., New York, pp 129-154, 1983.