

FAWZI A. M. DAWOOD

ANTICORPOS MONOCLONAIS DE HIBRIDOMA NA
DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS
DE TUMORES HUMANOS

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como um dos requisitos para a obtenção do Título de Livre-Docente , em Imunologia.

U N I C A M P
BIBLIOTECA CENTRAL
Campinas - São Paulo

1985

À Liana minha esposa; e ao
Tamer e à Samira, nossos
filhos.

AGRADECIMENTOS

Ao assumir a responsabilidade de formalizar meus agradecimentos, reconheço a possibilidade de manter no anonimato pessoas que nem por isso tenham deixado de contribuir para a concretização desta tese. Este não é um trabalho individual, mas coletivo, trata-se do esforço conjunto de inúmeras pessoas.

Ao Dr. Robert William Baldwin, que dispondo seu laboratório ensinou-me, com todo seu rigor metódico na direção de "Cancer Research Campaign Laboratories" , as trilhas a serem palmeadas no estudo de Imunologia de Tumores.

Aos Drs. J. Embleton, M. Price e M. Pimm de "Cancer Research Campaign Laboratories, Nottingham", pela colaboração na interpretação dos resultados experimentais e pela doação do anticorpo monoclonal anti-carcinoma de cólon (HRT18/2/33b).

Ao Dr. V. S. Byers de "San Francisco" , pela doação de algumas linhagens celulares de osteossarcoma, inclusive a linhagem 791T.

Ao Dr. S. Ferrone de "La Jolla", pelo fornecimento das preparações de anticorpo monoclonal anti-melanoma (SC 3982).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq, pela bolsa de estudos de Pós-Doutorado (1979-1981).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, pelo auxílio financeiro à pesquisa em Imunologia de Tumores.

À Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, que possibilitou a minha ida para a Inglaterra para realizar estes estudos.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia que substituíram-me nas atividades didáticas do Departamento durante a minha ausência.

Algumas pessoas decifraram meus manuscritos, outras datilografaram os originais e organizaram as referências bibliográficas. Embora no anonimato, agradeço a todas elas.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
INTRODUÇÃO.....	01
1. TUMORES INDUZIDOS POR SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS.	02
1.1. Hidrocarbonetos policíclicos.....	02
1.2. Corantes aminoazóicos.....	07
1.3. Aminas aromáticas.....	09
1.4. Alkil nitrosaminas.....	10
1.5. Hidrazinas.....	10
2. TUMORES INDUZIDOS POR VÍRUS ONCOGÊNICOS....	12
2.1. Antígenos de neoplasias induzidas por vírus DNA.....	13
2.2. Antígenos de neoplasias induzidas por vírus RNA.....	15
3. TUMORES OCORRIDOS NATURALMENTE EM ANIMAIS..	17
4. TUMORES HUMANOS.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
1. ANIMAIS.....	29
2. MANUTENÇÃO DOS TUMORES POR TRANSPLANTE....	29
3. PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES DE CÉLULAS.....	30
4. CULTURA DE TECIDO.....	31
5. CÉLULAS.....	32
6. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	33
7. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	33
8. RADIOIODINAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ¹²⁵ I E ¹³¹ I	33
8.1. Método de McConahey e Dixon (1966) modi ficado por Brown et al. (1977).....	33

	8.2.Método de Jensenius e Williams (1974)...	34
	8.3.Método de Fraker e Speck (1978).....	37
9.	PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI- OSTEOSSARCOMA 791T.....	38
	9.1.Imunização.....	38
	9.2.Fusão Celular.....	38
	9.3.Clonagem.....	40
10.	SOROS.....	40
11.	ABSORÇÃO DE ANTICORPOS.....	41
12.	ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTROLES.....	41
13.	ENSAIO DE RADIOLIGAÇÃO A CÉLULAS COM ¹²⁵ I - PROTEÍNA A.....	41
14.	PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	43
15.	DETERMINAÇÃO DA SUBCLASSE DE IgG DOS ANTI - CORPOS MONOCLONAIS.....	43
16.	ENSAIO DE RADIOLIGAÇÃO IMUNE A CÉLULAS COM ¹²⁵ I-ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	44
17.	CITOTOXIDADE COMPLEMENTO-DEPENDENTE.....	46
18.	XENOENXERTOS DE OSTEOSSARCOMA 791T EM CAMUN- DONGOS CBA.....	47
19.	DISTRIBUIÇÃO DE ANTICORPO RADIOIODINADO <i>IN</i> <i>VIVO</i>	48
	RESULTADOS.....	49
1.	REAÇÕES ANTI-TUMORES.....	49
	1.1.Especificidade dos sobrenadantes de hi - bridomas anti-791T.....	49
	1.2.Especificidade dos clones de hibridomas 791T/36.....	51

	1.3. Testes de absorção.....	56
	1.4. Hibridoma 791T/48 clone 15.....	59
2.	DIFERENCIAÇÃO ENTRE DOIS ANTÍGENOS EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA 791T.....	59
	2.1. Ligação de anticorpos monoclonais às células.....	60
	2.1.1. Reatividade indireta dos anticorpos monoclonais.....	60
	2.1.2. Reatividade direta dos anticorpos monoclonais.....	63
	2.2. Inibição de ligação radioimune dos anticorpos às células.....	66
	2.2.1. Inibição da reatividade com anti-791T / 36 e anti-791T/48.....	66
	2.2.2. Inibição com soro do paciente doador de 791T.....	68
3.	CARACTERÍSTICAS DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS E SEU POTENCIAL EM DEPÓSITOS TUMORAIS.....	73
	3.1. Titulação dos anticorpos anti-791T.....	73
	3.2. Determinação de subclasse de IgG dos anticorpos monoclonais.....	75
	3.3. Citotoxicidade complemento-dependente de anticorpos monoclonais.....	77
	3.4. Quantificação de radioligação imune dos anticorpos às células de tumores humanos..	79
	3.5. Distribuição do anticorpo monoclonal anti 791T/36 em depósitos de osteossarcoma <i>in vivo</i>	83

DISCUSSÃO.....	87
RESUMO E CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

INTRODUÇÃO

Durante a transformação neoplásica de células , aparecem novos antígenos na membrana, que são geralmente de nominados de "antígenos tumor-associados". Esses antígenos, podem ser expressos na membrana de células normais em circunstâncias especiais, como por exemplo os antígenos embriônicos. A especificidade imunológica desses antígenos é uma característica única e individual para cada tumor, o que justifica a sua denominação como "antígenos tumor-associados individualmente distintos". A denominação "antígenos tumor-específicos" tem sido evitada, baseando-se em trabalhos recentes (Embleton e Baldwin, 1979) que tem mostrado que esses antígenos podem ser encontrados em células sem transformação neoplásica e assim, não devem ser considerados como marcadores específicos de células malignas.

Nesse ítem, faremos uma análise crítica dos estudos realizados sobre a expressão de neoantígenos em tumores e sua imunogenicidade.

1. TUMORES INDUZIDOS POR SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS.

1.1. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS.

Em estudos pioneiros realizados por Foley (1953), Baldwin (1955), Prehn e Main (1957), tumores induzidos por 3-metilcolantreno (MCA) em ratos ou camundongos e mantidos por transplantes, foram testados com relação à sua imunogenicidade após manipulação adequada na sua fase progressiva (excisão cirúrgica ou bloqueio do suprimento sanguíneo). Os animais assim tratados mostraram-se resistentes a um inóculo de células viáveis do mesmo tumor utilizado no transplante. Paralelamente, animais imunizados com células tumorais inativadas por irradiação (Révész, 1960 ; Klein et al., 1960) ou por drogas citotóxicas (Apffel et al., 1966), desenvolveram a capacidade de rejeitar células de sarcoma MCA-induzidos da mesma linhagem utilizada na imunização. Neste modelo de sarcomas altamente imunogênicos , induzidos por hidrocarbonetos policíclicos, a imunidade exibe regularmente um alto grau de especificidade e a imunoproteção induzida é evidenciada apenas contra o tumor que deu origem ao estado imunitário do animal e não contra outros tumores, inclusive os induzidos pelo mesmo carcinógeno (revisado por Baldwin, 1973; Baldwin e Price, 1975; Moore , 1978). Uma exceção desta regra é a declaração de Basombrío , (1970) que revelou apenas um caso de reação cruzada entre 25 sarcomas murinos que foram examinados de modo " criss - cross" ou por imunizações múltiplas. A especificidade des-

As respostas tem sido contestada particularmente em experimentos onde se usa doses crescentes de sarcomas MCA-induzidos como desafio em camundongos imunizados e consequentemente reações contra antígenos tumor-associados individualmente distintos e outros antígenos comuns foram detectados (Leffell e Coggin, 1977; Hellstrom et al., 1978). A expressão de antígenos comuns tumor-associados não se restringe apenas aos sarcomas MCA-induzidos, mas também foram detectados através de testes de imunoproteção em carcinomas de células escamosas da pele MCA-induzidos (Economou et al., 1977) e do pulmão (Jamasbi e Nettesheim, 1977).

Contudo, uma resposta celular bem desenvolvida contra antígenos de rejeição tumor-associados, é considerada como necessária para que as respostas de rejeição sejam efetivas. Isto foi estabelecido em estudos, demonstrando que as células linfocitárias sensibilizadas possuem a capacidade de transferir imunidade adotiva em recipientes normais (Hellstrom e Helstrom, 1969). Entretanto, através de testes de neutralização foi observada inibição específica de crescimento tumoral em camundongos inoculados com uma mistura de células malignas e células sensibilizadas de linfonodo (Klein et al., 1960; Borberg et al., 1972) ou células de exsudato peritoneal (Old et al., 1962). Além dessas investigações *in vivo*, outros ensaios realizados *in vitro*, como por exemplo, inibição da migração de macrófagos (Halliday e Webb, 1969; Halliday, 1971; Suter et al., 1972) inibição da aderência de leucócitos (Halliday e Miller ,

1972) e a mobilidade eletroforética do macrófago (Bubeník et al., 1978), foram usados afim de demonstrar e avaliar respostas celulares específicas aos sarcomas MCA-induzidos em camundongos e cobaias.

A demonstração direta de atividade citotóxica específica de células linfóides de doadores imunes para células alvo em cultura, tem sido relatada em vários estudos, utilizando ensaios de inibição de colônia e de microcitotoxicidade (Hellstrom et al., 1968 a; 1970; Baldwin e Moore, 1971; Zoller et al., 1976). Entretanto, nessas investigações, a contribuição de células assassinas (NK), que são também citotóxicas para células tumorais não foi avaliada (Herberman e Holden, 1978).

A ocorrência e a confirmação da especificidade dos antígenos associados à superfície celular de sarcomas MCA-induzidos, foram mais evidenciadas pela análise dos anticorpos humorais. Assim, soro de camundongos imunizados pela excisão cirúrgica de seus tumores (Hellstrom et al., 1968 a) ou soro de ratos transplantados com enxertos tumorais irradiados (Baldwin e Moore, 1971), tem inibido a capacidade das células de sarcoma de formar colônias, em cultura, enquanto que soro normal ou soro de doadores imunizados com outros tumores, não produzem este efeito. Dados semelhantes tem sido também obtidos com testes de microcitotoxicidade (Takasugi e Klein, 1970) para detectar anticorpos citotóxicos complemento-dependente em soro de camundon-

ros imunizados com sarcomas MCA-induzidos (Bloom, 1971 ; Bloom e Hildemann, 1970; Deleo et al., 1977 e 1978). Na maioria das análises deste tipo, realizadas por Deleo et al. (1977 e 1978), a especificidade de antígenos associados aos sarcomas MCA-induzidos (Meth A), foi estudada. Embora esse tipo de aproximação sorológica para tipagem dos antígenos associados aos tumores seja aparentemente promissor, com tumores murinos induzidos por produtos químicos ou por vírus (MuLV) da leucemia (Old e Boyse, 1965; Whitmore et al. , 1971; Garnt et al., 1974), o soro normal de camundongos contém frequentemente anticorpos contra antígenos de MuLV (Old e Stockert, 1977). Todavia, Deleo et al. (1977, 1978) confirmaram a reatividade específica individualmente distinta do soro singênico anti-Meth A. Em testes diretos com este soro e ensaios de sua absorção, foi eliminada a possibilidade que a reatividade do soro esteja dirigida contra antígenos do vírus (MuLV). Curiosamente, o soro especificamente citotóxico neste sistema, contém anticorpos, que precipitam uma proteína comum tumor-associada (P53) quando se utiliza uma variedade de tumores metabolicamente marcados com ³⁵S-metionina e solubilizados com detergente (Deleo et al., 1979). O significado deste achado permanece desconhecido, embora a detecção de um antígeno comum relacionado com a transformação maligna seja extremamente importante.

Os antígenos da superfície celular, tumor-associados individualmente distintos, tem sido detectados utilizando método de imunofluorescência indireta para identificar anticorpos em imunossoros singênicos, capazes de reagir com células de sarcoma MCA-induzido em camundongos (Lejneva et al., 1965) e em ratos (Baldwin et al., 1971 a, c e 1972). Nos últimos estudos deste tipo, foram testados, um total de 122 combinações de soros de animais com 26 sarcomas induzidos e 8 transplantados e a reatividade cruzada ocorreu, com evidências conclusivas, apenas com um par de tumores. Para introduzir um aspecto quantitativo dos ensaios de ligação de anticorpos a células, tem sido empregados reagentes tais como antiglobulina radioisotópica (Harder e Mckhann, 1968; Burdick et al., 1973 a e b) e proteína A radioiodinada (uma proteína reativa com Fc de IgG, extraída de *Staphylococcus aureus*, Brown et al., 1977 e 1978; Cleveland et al., 1979) para demonstrar anticorpos reativos com antígenos de superfície celular tumor-associados. Assim, e mais uma vez, a maioria dos antígenos demonstrados eram individualmente distintos, embora em apenas uma investigação, antígenos comuns tumor-associados foram detectados (Cleveland et al., 1979). Estes antígenos comuns foram detectados em células de culturas que passaram por vários cultivos, o que levou diferentes autores a concluir que somente células de tumores primários ou secundários devem ser empregadas em testes de definição do perfil antigênico dos tumores.

1.2. CORANTES AMINOAZÓICOS.

Os antígenos tumor-associados expressos em células de hepatomas de camundongos (Muler, 1968) e ratos (Gordon, 1965; Baldwin e Barker, 1967 a), foram inicialmente demonstrados pela indução da imunidade contra células de tumores transplantados em animais singênicos. Hepatomas de ratos, induzidos com 4-dimetil aminoazobenzeno (DAB) possuem 2 características: a) são constantemente imunogênicos, de modo que animais imunizados são capazes de rejeitar $5 \times 10^5 - 10^6$ células tumorais viáveis; b) cada tumor possui antígenos de rejeição individualmente distintos (revisado por Baldwin, 1973). Ao contrário de vários sarcomas MCA-induzidos, particularmente em camundongos e cobaias, onde foi possível isolar atividade indutora da rejeição em frações da membrana celular ou em extratos solúveis de tumor (revisão de Baldwin e Price, 1975; Law et al., 1975; Bubeník et al., 1978; Sikora et al., 1979), não foi possível realizar o mesmo com hepatomas do rato (Price e Baldwin, 1974 a e b; Price et al., 1978 e 1979 a).

A presença de antígenos tumor-associados individualmente distintos em hepatomas de rato DAB-induzidos, foi confirmada por muitos autores, demonstrando que soros de doadores imunes reagem em testes de imunofluorescência com antígenos de superfície de células derivadas apenas do tumor imunizante (Baldwin e Barker, 1967 b; Baldwin et al., 1971 a, b e c, 1972). Paralelamente, ensaios

de citotoxicidade complemento-dependente (liberação de ^{51}Cr) não demonstraram a presença de anticorpos tumor específicos em soros singênicos hiperimunes contra antígenos tumor-associados individualmente distintos (Price, 1978; Price e Baldwin, 1977; Price et al., 1979 b).

A especificidade desses antígenos em células de hepatomas DAB-induzidos em ratos, também foi demonstrada através de ensaios de antiglobulina radioisotópica (AL-Sheikly et al., 1980). A questão central neste modelo experimental (hepatomas DAB-induzidos em rato), é verificar se os alvos antigênicos das reações sorológicas anteriormente mencionadas podem ser definidas também como antígenos de rejeição tumor-associados. Os antígenos definidos sorologicamente tem sido isolados em frações da membrana ou como glicoproteínas solubilizadas. Embora, esses antígenos possuam a capacidade de induzir a formação de anticorpos específicos em ratos, não foram capazes de proteger animais transplantados com células viáveis (Price e Baldwin, 1974b; Price et al., 1978, 1979 a). Por outro lado, Price et al. (1980), demonstraram que os antígenos solubilizados de hepatomas podem induzir resistência contra transplantes de tumor em ratos pré-tratados com ciclofosfamida. A interpretação desses dados é que a imunização por antígenos, provavelmente, leva à indução preferencial de populações linfóides supressoras e que o pré-tratamento com ciclofosfamida inibe a proliferação de ~~precursores~~ dessas populações. Embora, observações semelhantes tenham sido feitas com sarcomas MCA-

induzidos (Minami et al., 1979), há necessidade de mais evidências para estabelecer definitivamente que os determinantes antigênicos que induzem rejeição tumoral são aqueles reconhecíveis por anticorpos ou imunossoros singênicos. De qualquer modo, esta questão pode ser solucionada, empregando antígenos purificados pela imuno-absorção (i.e. preparações antigênicas sorologicamente definidas), na imunização de animais pré-tratados com ciclofosfamida.

1.3. AMINAS AROMÁTICAS.

Embora as aminas aromáticas constituam a maior classe de carcinógenos químicos, as propriedades imunológicas de tumores induzidos somente por N-2-fluorenilacetamida (FAA) foram analisadas em detalhes. Esta classe de tumores parece fracamente imunogênica ou não imunogênica em testes de transplante-rejeição de tumores (Baldwin e Embleton 1969 a, 1971 a; Wepsic et al., 1976; Tracey et al., 1978). Por exemplo, através de excisão cirúrgica do tumor em crescimento ou implante de enxertos irradiados de tumor em ratos, apenas dois, de 11 carcinomas mamários FAA-induzidos demonstraram resistência dos animais assim imunizados, contra células tumorais viáveis (Baldwin e Embleton, 1969). Contudo, anticorpos tumor-específicos foram detectados, *in vitro*, empregando imunofluorescência da membrana, em soros de ratos imunizados contra hepatomas FAA-induzidos e pouco imunogênicos (Baldwin e Embleton, 1971 a). Estes imunossoros que reagem somente com células do tumor imunizante, mos

traram a estrita correlação com a imunogenicidade do tumor.

1.4. ALQUIL NITROSAMINAS.

Hepatomas induzidos com dietilnitrosamina (DENA) em linhagem 2 de cobaia, são significativamente imunogênicos e a imunidade de células de tumores singênicos transplantados, é induzida pela excisão cirúrgica do tumor ou pela injeção intradérmica ou intramuscular de determinadas doses de células, de modo a se evitar o crescimento progressivo (Zbar et al., 1969). Hepatomas DENA-induzidos são também imunogênicos em ratos. Animais inoculados com células tumorais γ -irradiadas, são resistentes a inoculação de células viáveis do tumor imunizante (Baldwin e Embleton, 1971 a). Estes estudos demonstraram que soros de ratos imunizados contra um hepatoma contêm anticorpos fracamente reativos em testes de imunofluorescência, com células do tumor homólogo.

1.5. HIDRAZINAS.

A importância de tumores induzidos com dimetil-hidrazina (DMH), como um modelo apropriado para câncer de cólon no homem tem sido relatada (Haase et al., 1973) e realmente a semelhança de antígenos tumorais de rato e antígenos carcinoembriônicos (CEA) do homem tem sido descrita (Abeyounis e Milgrom, 1976). Adenocarcinomas primários de cólon e intestino delgado, induzidos em ratos por DMH ou ni

trosoguanidina tem sido diagnosticados e acompanhados durante seu crescimento por Steele et al. (1975). Neste trabalho, respostas imunes (anti-tumor DMH-induzido) foram estudadas e correlacionadas com o desenvolvimento tumoral, mostrando a relevância desses tumores ao câncer humano. Vários ensaios de imunogenicidade e imunosensibilidade tem identificado antígenos de superfície celular, associados especificamente a estes adenocarcinomas do intestino. Esses antígenos incluem os descritos como individualmente distintos (privados), os antígenos comuns (tecido-específicos) e os chamados de ampla distribuição, como também os antígenos específicos do trato digestivo onco-desenvolvidos (Steele e Sjogren, 1974 e 1977).

Carcinomas de cólon DMH-induzidos em camundongos tem sido examinados com relação a presença de antígenos de rejeição e antígenos comuns, através de testes de rejeição de transplante, e ao contrário de tumores induzidos em ratos, não foi demonstrada proteção cruzada significativa entre esses tumores (Belnap et al., 1979). Contudo, Cleveland et al. (1979) identificaram um antígeno tumor-associado utilizando o ensaio de reatividade de ^{125}I -proteína A, para detectar anticorpos contra a superfície celular. O antígeno assim identificado, não está relacionado com antígenos de vírus da leucemia que pode ser expresso em murinos por eventual contaminação pelo vírus, e o mesmo não está relacionado também com determinantes embriônicos.

2. TUMORES INDUZIDOS POR VÍRUS ONCOGÊNICOS.

A oncogenicidade de vírus (DNA e RNA) em animais experimentais é um fenômeno bem documentado. Estudos de antígenos associados aos tumores induzidos por vírus tem sido amplamente revisado (Lamon, 1974; Rapp e Westmoreland, 1976; Weil, 1978). Geralmente, os tumores induzidos por vírus, tem a característica de apresentar antígenos comunis em diferentes tumores induzidos pelo mesmo vírus, em diferentes espécies (Hellstrom e Sjogren, 1967). A presença de antígenos comuns entre tumores induzidos por vírus, não significa necessariamente, a exclusão de antígenos individualmente específicos (Heppner e Pierce, 1969), ou de antígenos embriônicos (Pearson e Freeman, 1968; Coggin e Anderson, 1974). Este fenômeno contraria o que ocorre em tumores induzidos com carcinógenos químicos, onde os antígenos tumor associados individualmente específicos são mais frequentes, e onde existem, evidências da presença de antígenos comuns de reatividade cruzada entre diferentes tumores, geralmente de origem embrionária (Cleveland et al., 1974; Baldwin et al., 1974).

Os antígenos associados aos tumores induzidos por vírus, podem ser classificados como segue:

2.1. ANTÍGENOS DE NEOPLASIAS INDUZIDAS POR VÍRUS DNA.

A primeira evidência da presença dos antígenos tumorais na superfície celular em tumores induzidos por vírus, vem de estudos realizados por Sjogren et al. (1961) e Habel (1961), nos quais camundongos e hamsters infectados com vírus de polioma, demonstraram resistência a um desafio com células tumorais viáveis de polioma. Antígenos semelhantes foram demonstrados pelo método de transplantação-rejeição no sistema de SV40 (Simian virus 40) (Khera et al., 1963). Estes antígenos de rejeição não tem relação com antígenos do vírus ou com seu capsídeo desde que anticorpos (anti-vírus) não tem efeito algum sobre enxertos do tumor correspondente. Antígenos tumor-associados de rejeição, podem ser demonstrados em células transformadas pelo vírus SV40 através da sua capacidade de imunizar hamsters contra células de tumores SV40 induzidos ou através da prevenção do desenvolvimento de tumores em animais previamente inoculados com o vírus durante a infância (Girardi, 1966 ; Lausch et al., 1968). Os antígenos de rejeição tumor-associados em células humanas transformadas pelo SV40 e em células de hamsters, parecem semelhantes (Jensen e Deffendi, 1968). A demonstração de (antígenos-S) em superfície de células transformadas pelo SV40, foi realizada *in vitro* pelo uso de imunofluorescência direta (Tevethia et al., 1965) e uso de antissoros citotóxicos (Tevethia et al., 1970; Wright e Law, 1971). Embora os antígenos de rejeição tumor-associados e antígenos-S estejam presentes na superfície celular,

há evidências de que ambos representam 2 entidades diferentes. Em estudos realizados por Ting e Herberman (1971) e Ting et al., (1974), através do método de imunofluorescência, a presença de antígenos da superfície tumor-associado (antígenos-S) foi correlacionada com a presença de antígenos-T (intra-nuclear). Nesses estudos a presença de antígenos de rejeição SV40-associados foi também confirmada através de testes de transplante-rejeição *in vivo*. Os mesmos autores, testaram também algumas linhagens de células de hamster transformadas pelo SV40 junto com outras linhagens celulares não infectadas, derivadas do mesmo lote de embriões de hamster (Dimandopoulos et al., 1968; Levine et al., 1970). Tais linhagens foram definidas como: Linhagem (T⁺S⁺): portadora de SV40 integrado a DNA, sintetizadora de pequenas quantidades de RNA SV40-específico, contém antígenos-T (T⁺) intranuclear e possui antígenos-S (S⁺) na superfície celular. Linhagem (T⁻S⁺): que não contém antígenos-T, DNA, RNA do vírus e possui antígenos-S; Linhagem (T⁻S⁻): derivada de culturas controle não infectadas e não contém estruturas virais. As 3 linhagens de células são altamente tumorigênicas de acordo com sua capacidade de induzir tumores de crescimento progressivo em hamsters adultos. Conforme foi determinado através de método de transplante *in vivo* e método de antiglobulina isotópica, os antígenos de rejeição SV40-associados e antígenos da superfície celular do tumor, estão presentes apenas na linhagem de células (T⁺S⁺). Desses estudos foi concluído que:

a. os antígenos da superfície celular do tumor, determina -

dos *in vitro* se correlacionam com a presença de antígenos de rejeição SV40-associados e detectados *in vivo*.

- b. a expressão de ambos os antígenos, requer a presença contínua de DNA do vírus integrado ao DNA da célula.
- c. os 2 tipos de antígenos são diferentes do antígeno-S e de antígenos fetais da superfície.

Resultados semelhantes foram obtidos com células transformadas de polioma (Ting e Herberman, 1970; Ting et al., 1972).

2.2. ANTÍGENOS DE NEOPLASIAS INDUZIDAS POR VÍRUS RNA.

É conhecido que os vírus RNA são responsáveis pelos carcinomas mamários de camundongo e uma ampla variedade de leucemias, linfomas e sarcomas em animais experimentais. São também implicados em carcinomas mamários humanos, leucemia mielocítica aguda, carcinoma de células transitórias do trato urogenital e sarcomas (revisado por Ristow e Mckhann, 1977). O tipo C de vírus RNA oncogênico é o maior grupo dos vírus oncogênicos e o melhor estudado. Um complexo sistema de antígenos comuns repartidos por vírus e células foi encontrado em tumores induzidos por esses vírus, mesmo em diferentes espécies, o que indica a prevalência de informações genéticas em diferentes vírus do grupo. Os antígenos que foram estudados formam duas classes principais:

- (1) proteínas estruturais das partículas virais e
- (2) substâncias celulares antigênicas induzidas pela informação genética do vírus.

As partículas virais possuem antígenos no seu envoltório e também antígenos internos. Semelhante - mente, as células tumorais expressam antígenos induzidos pe lo vírus na sua superfície e no interior da célula (Revisão de Ristow e McKhann, 1977). Entre esses vários tipos de an - tígenos são os da superfície celular induzidos pelo vírus , considerados, do ponto de vista imunológico, os mais impor - tantes antígenos expressos em células de tumores induzidos pelo vírus RNA em animais experimentais. Superfícies de cê - lulas transformadas com vírus RNA tipo C, apresentam uma di versidade de material antigênico. Além de novos antígenos tumor-associados induzidos pelo vírus, as partículas virais em si, expressam seus próprios antígenos de envoltório, na superfície de células transformadas. Antígenos tumor-asso - ciados, responsáveis pela rejeição de enxertos, foram ini - cialmente demonstrados em tumores induzidos pelo vírus DNA de polioma por Sjogren et al. (1961), conforme descrito an - teriormente, e estudos do modelo SV40 demonstraram que es - ses antígenos de rejeição tumor-associados, não são proteí - nas estruturais do vírion. Os antígenos correspondentes de tumores induzidos por vírus RNA, foram inicialmente demons - trados por Klein et al. (1962) em leucemia murina e por Sjogren e Jonsson (1963) em sarcoma de Rous. Devido à pre - sença constante do vírus na célula, não ficou esclarecido, se esses antígenos são realmente novos antígenos celulares ou antígenos do próprio envoltório viral, presentes na su - perfície celular e atuando como antígenos de transplante , responsáveis pela rejeição do enxerto. Estudos subsequentes

demonstraram que antígenos de superfície dessas células, podem ser demonstrados *in vitro* com anticorpos citotóxicos ou fluorescentes. Embora, os antígenos de superfície celular tumor-associados (TASA), sejam teoricamente os mesmos antígenos da rejeição tumor-associados (TARA) responsáveis pela rejeição do enxerto, isto não foi ainda confirmado.

3. TUMORES OCORRIDOS NATURALMENTE EM ANIMAIS.

Modelos de tumores induzidos por substâncias químicas ou por vírus são amplamente aceitos como possuidores de antígenos capazes de induzir a resposta de rejeição do tumor em animais singênicos adequadamente imunizados, conforme anteriormente descrito. Estes modelos são criticados frequentemente por possuírem algo irreal (artefato) na sua imunidade, a qual foi descrita como sendo diferente da imunidade de tumores originados naturalmente em populações criadas ao acaso (Hewitt et al., 1976; Hewitt, 1979). Procedimentos convencionais de imunização de animais singênicos com células de tumores espontâneos, demonstraram que esses tumores não possuem imunogenicidade ou a possuem com potencial mínimo. Neste contexto, se fossem retiradas as informações sobre tumores que aparecem em raças de alta incidência tumoral e outras de etiologia viral conhecida, restaria uma literatura escassa e sem nexos com relação de imunologia de tumores espontâneos, possivelmente devido à sua ocorrência não frequente em animais normais de laboratório. Prehn (1957), demonstrou que a resistência do hospedeiro pode ser induzida contra sarcomas MCA - induzidos em camundongos.

Paralelamente, fibrossarcomas espontâneos demonstraram pouca ou nenhuma capacidade imunogênica. Semelhantemente, não foi possível para Révész (1960) induzir qualquer imunidade contra adenocarcinomas ou linfomas espontâneos de camundongos, após imunização de hospedeiros singênicos com células tumorais γ -irradiadas, um procedimento que foi efetivo com sarcomas induzidos por metilcolantreno (Klein et al., 1960). Hammond et al. (1967), demonstraram imunidade fraca contra fibrosarcomas e mioepiteliomas espontâneos em murinos, após a amputação do membro portador do tumor. Hewitt et al. (1976) estudaram a resposta de rejeição em 27 tumores murinos espontâneos de diferentes tipos histológicos e não foi possível obter evidências da sua imunogenicidade, o que levou esses autores, a concluir que os tumores estudados não possuem antígenos capazes de desencadear imunidade de transplante. Tumores espontâneos de outros laboratórios se comportaram dentro do mesmo padrão; leucemia espontânea de rato (Wrathmell e Alexander, 1976) e linfoma espontâneo de hamster (Vasa-Thomas et al., 1977), tem sido demonstrados como fracamente imunogênicos em animais singênicos que originaram tais tumores.

Estudos realizados em "Cancer Research Campaign Laboratories, Nottingham" tem demonstrado que a imunidade pode ser induzida contra alguns tumores espontâneos, embora em nível bem mais baixo do que foi observado com tumores induzidos por carcinógenos. Baldwin (1966) demonstrou imunidade significativa contra carcinoma escamoso

espontâneo do rato, mas não foi possível detectar respostas contra sarcoma de células reticulares em animais imunizados. Semelhantemente, em 9 adenocarcinomas mamários espontâneos de rato, apenas um (Sp4) foi significativamente antigênico e sua imunogenicidade mostrou-se baixa quando mensurada pelo inóculo máximo de células rejeitadas. Por outro lado, foi demonstrado que apenas o carcinoma mamário espontâneo (Sp4) possui antígenos de superfície tumor-associados individualmente distintos, demonstráveis pela imunofluorescência (Baldwin e Embleton, 1970). Em estudos realizados a fim de investigar a imunogenicidade de 28 tumores espontâneos, incluindo: nefroblastomas, tumores mamários histologicamente malignos e benígnos, tumores da pele, um tumor linfóide e duas lesões gastrointestinais, não foram encontradas evidências de imunogenicidade após diferentes métodos de imunização (Middle e Embleton, 1981). Em outros estudos, dois de cinco carcinomas espontâneos de rato foram capazes de induzir um nível baixo de imunidade específica em hospedeiros singênicos (Embleton e Middle, 1981). A incapacidade do hospedeiro de demonstrar uma resposta efetiva de rejeição contra tumores espontâneos, foi também demonstrada através de experimentos de imunoterapia ativa (Baldwin e Pimm, 1977 ; Pimm et al., 1978). Nestes trabalhos, imunoterapia específica ativa de tumores aplicada num local distante do tumor, utilizando como adjuvante bacteriano o bacilo Calmette e Guerin (BCG), não foi bem sucedida, exceto em casos de carcinoma mamário (Sp4), que demonstrou anteriormente imunogenicidade modesta (Baldwin e Embleton, 1969 b). Resultados semelhan -

tes foram obtidos através de experimentos de imunoterapia a tiva utilizando *Corynebacterium Parvum* em substituição ao BCG (Willmott et al., 1979).

Embora a maioria dos tumores espontâneos sejam incapazes de induzir resposta de rejeição do tumor em ratos imunizados, a linfocitotoxicidade *in vitro*, tem demonstrado que esses tumores aparentemente não imunogênicos, possuem antígenos que são reconhecidos pelo hospedeiro (Baldwin e Embleton, 1974; Baldwin et al., 1974). Os resultados obtidos nesses trabalhos, sugerem que os antígenos que demonstraram reações cruzadas, detectados nesses tumores, são componentes embriônicos, que foram imunogênicos no hospedeiro portador de tumor, mas não foram capazes de induzir resistência ao transplante de tumor. Entretanto, devemos salientar que o papel exercido por células assassinas (natural killer) nessas respostas citotóxicas não foi avaliado, de modo que o envolvimento de antígenos embrionários nessas reações requer maior avaliação.

Finalmente, tecnologias recentes usando anticorpos monoclonais, tem estabelecido que carcinomas mamários espontâneos Sp4 (Gunn et al., 1980) e Sp22 (Dawood e Silva, 1985) possuem antígenos individualmente distintos. Os hibridomas produtores de anticorpos específicos anti-Sp4 e anti-Sp22, foram obtidos pela fusão de células de ratos imunizados com Sp4 ou camundongos imunizados com Sp22, e células de mieloma de camundongo (P3NS1). Embora todas as evi -

dências sugeriram que estes anticorpos monoclonais são especificamente reativos com células de carcinomas mamários espontâneos Sp4 e Sp22 respectivamente, a sua identidade com antígenos que induzem a rejeição específica do tumor ou com antígenos específicos definidos sorologicamente nesse tumor não foi comprovada.

4. TUMORES HUMANOS.

A expressão de antígenos tumor-associados em células de tumores humanos, tornou-se centro de muitas investigações, desde de que esses antígenos foram demonstrados em tumores experimentais. Muitos dados em animais foram obtidos através da resistência ao transplante tumoral e da transferência adotiva de imunidade tumoral específica com células linfóides. Embora este tipo de estudo seja de fácil realização em tumores experimentais, é impossível aplicar esta aproximação em estudos de tumores humanos. Por outro lado há evidências que sugerem a existência de antígenos em alguns tumores humanos, que podem ser considerados como marcadores de doença maligna. Isto inclui um número razoável de antígenos oncogênicos que foram inicialmente definidos pelo uso de heteroantissoros preparados contra células ou extratos tumorais e absorvidos adequadamente. Os antígenos mais importantes são os carcinoembriônicos (CEA), originalmente encontrados em associação ao carcinoma de cólon (Gold e Freedman, 1965) e α -fetoproteína descoberta inicialmente em associação de carcinomas hepatocelulares murinos

(Abelev et al., 1963). Esses produtos são detectados na circulação de pacientes com câncer e assim foram empregados em muitos estudos como monitores da eficiência do tratamento e evolução da doença. Entretanto o efeito desses antígenos na relação tumor-hospedeiro é questionável, porquanto, não se sabe com clareza se os pacientes com câncer desenvolvem uma resposta imune contra estes produtos.

A procura de antígenos associados aos tumores humanos contra os quais o hospedeiro produz uma resposta imune, tem sido centro de muitas investigações. Algumas evidências podem ser concluídas de observações e estudos realizados *in vivo*. Primeiro, o uso de imunoterapia ativa em tratamento de câncer humano, tem como premissa básica a suposição de que os tumores humanos são imunogênicos e que o hospedeiro é capaz de reagir de modo imunologicamente específico contra seu próprio tumor. Infelizmente, apesar de uma vasta experimentação clínica, tais tentativas de imunoterapia demonstraram pouco sucesso. Geralmente, as tentativas de imunoterapia tem sido mal controladas ou com resultados sem ênfase (Czajkowski et al., 1968; Nadler e Moore, 1970; Grant et al., 1974; McIlmurray et al., 1977). Uma outra aproximação *in vivo*, eticamente duvidosa, tem envolvido o auto-transplante de células tumorais viáveis em pacientes (Southam et al., 1962). Entretanto, Powles et al. (1971) observaram que a inoculação de células blásticas autólogas irradiadas em pacientes com leucemia aguda, produz um aumento transitório da resposta linfoprolif

ferativa contra células tumorais *in vitro*. Além disso, foram realizados trabalhos que demonstraram respostas de pacientes a extratos brutos de carcinomas autólogos através de testes de hipersensibilidade cutânea (exemplos: Hughes e Lytton, 1964; Stewart e Orizaga, 1971). Nesses estudos, reações positivas foram observadas em 25% dos pacientes examinados. Curiosamente, esse tipo de reatividade não se correlaciona bem com o estado clínico do paciente, ou seja, as reações verdadeiramente positivas foram associadas ao decréscimo de sobrevivência. Por outro lado, a especificidade das reações observadas nesses estudos não foi bem caracterizada. Alguns extratos de tecido normal usados como controle, também mostraram reações positivas e contaminação bacteriana em algumas preparações poderia ter contribuído também, para a positividade das reações. Embora todos esses estudos produziram algumas evidências sugestivas a favor de reações imunológicas mediadas por células contra antígenos tumorais, a sua confirmação necessita provas conclusivas.

Outras observações clínicas apontam reações imunes contra tumores humanos, pela infiltração de linfócitos e macrófagos em tumores primários; tal infiltração, tem sido altamente estudada em carcinoma mamário e correlacionada estritamente com um bom prognóstico (Black e Leis, 1971; McCluskey e Bhan, 1977).

Desde longa data, muitos investigadores tem pesquisado a existência de anticorpos reativos contra

antígenos tumor-associados em soros de pacientes de câncer. Uma variedade de anticorpos que reagem com células de linfoma de Burkitt ou com linhagens de células em cultura, derivadas do tumor, tem sido descrita. A maioria desses anticorpos são associados ao vírus Epstein-Barr (EBV), um vírus estritamente ligado a linfoma de Burkitt (revisado por Henle e Henle, 1974). Anticorpos em soros de pacientes com melanoma maligno, tem sido detectados através de ensaios de citotoxicidade complemento-dependente e de imunofluorescência. Anticorpos citotóxicos contra células de melanoma, foram inicialmente detectados por Lewis e seus colaboradores (Lewis, 1967; Lewis et al., 1969), em soros de 35% dos pacientes com melanoma. Pelo uso de imunofluorescência, anticorpos contra antígenos de membrana e também contra antígenos de citoplasma tem sido descritos (Morton et al., 1968; Lewis e Phillips, 1972; Lewis e Sheikh, 1975). A maioria desses estudos demonstraram que os antígenos citoplasmáticos eram comuns na maioria das células de melanomas e parecem associados apenas a esse tumor, porquanto não foram encontrados numa variedade de linhagens de células derivadas de outros tipos de câncer, ou de pele normal. Recentemente, tem-se acumulado informações sobre antígenos associados à superfície de células de melanoma. Para isso, diferentes métodos imunológicos tem sido usados, como por exemplo a imunofluorescência (Embleton et al., 1980), imunoaderência (Carey et al., 1976; Shiku et al., 1976), ensaios de reatividade com proteína A (Shiku et al., 1978) e outras reações sorológicas da mais estrita especificidade. Também foram

detectados anticorpos em soros de pacientes com sarcoma através de imunofluorescência indireta (Morton e Malmgren , 1968; Byers et al., 1975), ativação de complemento (Eilber e Morton, 1970) e ensaios de citotoxicidade (Wood e Morton , 1971). Entretanto, grandes discrepâncias foram encontradas entre esses diferentes ensaios, e o assunto necessita estudos detalhados para determinar se alguma dessas reações de anticorpos, representa uma verdadeira reatividade, apenas contra antígenos tumor-associados. Por outro lado, foram detectados em soros de pacientes com carcinoma mamário, anticorpos dirigidos contra antígenos de superfície e/ou antígenos intracelulares de células tumorais autólogas, através de testes de imunofluorescência indireta (Sheikh et al. , 1979). Contudo, esses autores admitem que a avaliação do significado real desses resultados deve aguardar, obviamente, a caracterização desses antígenos e mais estudos sobre o seu significado clínico.

Estudos da imunidade mediada por célula - las contra tumores humanos tem sido realizados com maior intensidade pelos ensaios de citotoxicidade. Alguns estudos (Hellstrom et al., 1968 b, 1971; Fossati et al., 1971; Levy et al., 1972) indicaram que pacientes com câncer desenvolvem reatividade citotóxica maior que indivíduos normais , contra culturas de células derivadas de tumores do mesmo tipo histológico e não contra culturas derivadas de células normais ou de tumores de outro tipo histológico. Entretanto, poucos controles normais tem demonstrado reatividade ci

totóxica significativa. Nos últimos poucos anos, a especificidade das reações observadas e a falta relativa de reatividade normal nesses ensaios tem sido frequentemente questionadas (Herberman e Oldham, 1975; Baldwin e Embleton, 1977). Experimentos rigorosamente controlados, tem demonstrado considerável grau de reatividade normal e falta de reatividade histologicamente tipo-específica, pelos pacientes de câncer (Takasugi et al., 1974; Oldham et al., 1975; Canevari et al., 1976). Reatividade contra antígenos associados aos tumores humanos, também tem sido detectada por uma variedade de outras técnicas. Linfócitos de alguns pacientes, demonstraram a capacidade de expressar respostas proliferativas, contra células tumorais autólogas (Vánky et al., 1971) e contra extratos de tumores (Mavligit et al., 1973; Vánky et al., 1974). Através de ensaios de inibição de migração de leucócitos, foi possível detectar respostas em pacientes com carcinoma mamário (Cochran et al., 1972, 1974), melanoma maligno (MacCoy et al., 1975), carcinoma do pulmão (Boddie et al., 1975) e muitas outras neoplasias. Na maioria desses estudos, tem ocorrido reações de antígenos comuns apenas entre tumores do mesmo tipo histológico. A especificidade do ensaio de inibição de migração de leucócitos, tem sido estudada em mais detalhes e raramente os pacientes demonstram reações positivas contra extratos de outros tipos de tumores benígnos ou tecido normal (Zoller et al., 1979; Matzku et al., 1980).

Finalmente, a pesquisa de antígenos uni

cos de superfície que caracterizam funcionalmente células distintas de tumores humanos, tem sido impedida pela dificuldade de obter reagentes específicos adequados, mesmo porque a absorção intensa de antissoros e anticorpos presentes em soros de pacientes, não fornece material adequado para obter evidências nítidas da presença de tais antígenos (Shiku et al., 1978; McCabe et al., 1979; Pratt et al., 1980). Evidências animadoras surgiram após o desenvolvimento de técnicas de preparação de anticorpos monoespecíficos, dirigidos apenas contra epítomos individuais e que representam a aproximação ideal para a detecção de marcadores únicos de superfície celular. Para utilização dessa nova tecnologia, temos provas nítidas de que tumores humanos possuem antígenos associados à superfície celular expressos em células de melanoma (Kaprowski et al., 1978; Brown et al., 1980), carcinoma de cólon (Herlyn et al., 1979) e sarcoma osteogênico (Dawood et al., 1981 e 1985).

No presente trabalho, anticorpos monoclonais foram preparados contra sarcoma osteogênico humano, linhagem 791T, utilizando técnicas de hibridização de células somáticas (Kohler e Milstein, 1975; Galfre et al., 1977). A reatividade dos anticorpos monoclonais produzidos (anti-791T/36 e anti-791T/48), foi estudada com ampla variedade de linhagens tumorais. A diferenciação entre os dois antígenos detectáveis em células de sarcomas osteogênicos, foi realizada. O potencial do anticorpo 791T/36 marcado com iodo radioativo para localização de depósitos tumorais cres

idos em camundongos imunodeprimidos, foi determinado.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS.

Sublinhagens WAB e KX de ratos singênicos WAB/Not e xenogênicos KX/Not respectivamente, originários de "Cancer Research Campaign Laboratories, Nottingham, England", foram usados nesses estudos para manter tumores a n i m a i s. Camundongos Balb/c e CBA também foram usados na pre pa ra ç ã o de anticorpos monoclonais e no estudo de sua distri bui ç ã o *in vivo*. Os animais singênicos usados, foram criados por acasalamento "*inbred*" por 48 gerações. Esses animais fo ra m ma nti d o s em gaiolas de polistireno forradas com serra g e m al i m e n t a d o s com dieta 41B (Oxoid) e água de torneira "ad libitum",

2. MANUTENÇÃO DOS TUMORES POR TRANSPLANTE.

Os animais portadores de tumor foram a n e s t e s i a d o s com éter e sacrificados por deslocamento cervi ca l. O local do tumor foi depilado e desinfetado com Savlon (Imperial Chemical Industries Ltda., Macclesfield, Cheshire, England) a 1% e o tumor removido assépticamente. Pequenos fragmentos do tecido tumoral foram transplantados subcuta neamente através de uma pequena incisão na pele, com auxí l i o de um trocarte em ratos singênicos do mesmo sexo do do a d o r. A área de incisão em animais recipientes de enxerto ,

foi depilada e desinfetada com álcool a 70% antes da transplantação e a ferida fechada com o auxílio de grampos de sutura de Michel. Amostras de tecido tumoral macerado, foram conservadas em ampolas plásticas estéreis em nitrogênio líquido, até o momento de uso.

3. PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES DE CÉLULAS.

Suspensões de células tumorais foram preparadas por digestão com tripsina, através da técnica descrita por Boyse (1960) e levemente modificada. O tecido tumoral foi dissecado em placa de Petri para se tornar livre do tecido necrótico e conjuntivo, macerado com bisturi e lavado 3 vezes em tubo universal de 30ml com meio de Hanks contendo 100 U.I./ml de penicilina e 200 µg/ml de estreptomina. O tecido tumoral lavado, foi incubado com 10ml de tripsina a 0,25% (P/V) para se tornar livre de produtos tóxicos. A suspensão foi decantada e o tecido lavado novamente com meio de Hanks. Solução de tripsina e 2 gotas de 0,02% de deoxiribonuclease (DNase, Sigma Chemical Co., Kingston - Upon-Thames, Surrey) em meio de Hanks foram adicionadas. Esta suspensão foi incubada a 37°C durante 20 minutos com agitação magnética constante. Após incubação, a mistura foi deixada em repouso para depositar-se o tecido tumoral e coletou-se o sobrenadante contendo as células. Mais tripsina e DNase foram adicionadas ao tecido tumoral e a tripsinização continuou por mais 2 a 4 vezes afim de coletar mais so-

brenadantes contendo células tumorais. As células separadas por centrifugação a 30g, durante 5 minutos, foram suspensas em meio de Hanks e lavadas 4 vezes. Quando as células eram utilizadas em experimentos *in vivo* ou em cultura, procedimentos assépticos eram seguidos. Agregações celulares foram removidas por filtração através de tela de aço inoxidável (120 mesh). A viabilidade celular foi determinada usando-se V/V da suspensão celular e azul de tripan (lv. de salina a 4,25% + 4v. de corante a 0,2%). O número de células viáveis (não coradas), foi contado em hemocitômetro e a sua concentração calculada na suspensão inicial.

4. CULTURA DE TECIDO.

Células de tumores animais foram obtidas em suspensão através da tripsinização de tumores conforme descrito anteriormente. Essas células foram semeadas e mantidas em cultura para crescerem em monocamada, usando meio mínimo essencial de Eagle (MME) com 10% de soro fetal bovino (SFB) "Flow Laboratories, Irvine, Scotland", Penicilina (200 U.I/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). As culturas foram crescidas em frascos de 25cm² (Sterilin, Ltda., Teddington, Middlesex, England) e as células rotineiramente coletadas com 0,25% de tripsina em meio de Hanks e subcultivadas em frascos de 25cm² com meio de Eagle contendo 10% de SFB.

Diferentes linhagens celulares de tumores humanos usados nesse trabalho foram cultivadas e crescidas como monocamadas em meio de Eagle contendo 10% de SFB . As células em cultura foram coletadas com 0,25% de tripsina em meio de Hanks, lavadas 2 vezes e suspensas em meio de Eagle.

5. CÉLULAS.

As linhagens celulares de origem animal usadas neste trabalho foram: hepatoma D23, hepatoma KXD2 e carcinoma mamário Sp4. Linhagens de tumores humanos como sarcomas, carcinomas, melanomas e linfomas também foram usadas. A linhagem P3-NS1-Ag-4 (P3NS1) de mieloma de camundongo, foi originada no Departamento de "Molecular Biology, University of Cambridge" e obtida com permissão do professor C. Milstein.

Diferentes linhagens celulares, incluindo fibroblastos humanos derivados da pele e do pulmão, foram cultivadas e crescidas como monocamadas em meio de Eagle contendo 10% SFB. Essas células foram usadas como alvos , junto com eritrócitos e células mononucleares preparadas no mesmo dia do experimento, a partir de sangue fresco heparinizado de doadores voluntários.

6. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.

Soluções de proteínas foram concentra - das usando dois métodos. Volumes grandes foram colocados em tubos de diálise (Visking) e concentrados por diálise con - tra Aquaside II (Calbiochem - Behring Co., La Jolla, CA. 92307). Pequenos volumes (menor que 10ml), foram concentra - dos com Minicon (Amicon Carp., Lexington, Mass., U.S.A.).

7. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.

Concentrações de proteína foram determi - nadas pelo método de Lowry et al. (1951) usando soro albumi - na bovina (BSA) como padrão.

8. RADIOIODINAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ^{125}I e ^{131}I .

Tres métodos de radioiodinação foram u - tilizados para marcação de proteína A de *Staphylococcus au - reus*, anticorpos monoclonais anti-osteossarcoma purificados (anti-791T/36/P e anti-791T/48P) e IgG normal de camundongo utilizando ^{125}I ou ^{131}I como segue:

8.1. MÉTODO DE MCCONAHEY E DIXON (1966) MODIFICADO POR BROWN ET AL. (1977).

Aliquotas de 10 μ l da solução proteica, numa concentração de 1mg/ml em PBS foram misturadas com 150 a 500 μ Ci de Na^{125}I (The Radiochemical Centre, Amersham, Bucks) a 0°C. Uma quantidade de 0,5ml de cloramina T preparada no momento de uso (20 μ g/ml em PBS) foi adicionada na mistura gota a gota. A mistura foi incubada a 0°C durante 20 minutos e a reação terminada pela adição de 20 μ l de metabisulfito de sódio (0,5mg/ml) e 25 μ l de SFB como carreador de proteína. A separação de ^{125}I -proteína da mistura, foi realizada por filtração em gel de Sephadex G25 equilibrada com PBS + 5% de SFB.

Preparações com atividade específica de 1 a 25 μ Ci foram obtidas com este método. Mais de 80% dessa atividade era precipitável com TCA a 5%.

8.2. MÉTODO DE JENSENIUS E WILLIAMS (1974).

Nesta técnica, a reação não foi terminada pelo uso de metabisulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) à semelhança do método anterior. Aliquota de 25 μ l de tirosina saturada em tampão fosfato 0,3M, pH 7,5 foi adicionada para terminar a reação de Na^{125}I com o anticorpo. Resumidamente: aliquotas de 10 a 20 μ l de anticorpo (a 1mg/ml em PBS) e 15 μ l de tampão fosfato 0,3M pH 7,5 foram adicionados a 150 a 500 μ Ci de Na^{125}I à temperatura ambiente. Em seguida, uma aliquota de 5 μ l de cloramina T preparada no momento de uso

(2mg/ml em PBS) foi adicionada e a mistura incubada à temperatura ambiente durante 2 minutos. Uma quantidade de 25 µl de uma solução saturada de tirosina em tampão fosfato 0,3 M (preparada a 37°C em excesso de tirosina, com agitação durante 1 h.), foi adicionada para interromper a reação de iodinação. Uma quantidade de 50 µl de soro albumina bovina (BSA, 1mg/ml) em PBS foi adicionada na mistura e em seguida 200 µl de PBS. O volume da mistura foi ajustado a 2,5ml com uma solução de BSA (1mg/ml) em PBS. Com o objetivo de separar ^{125}I -anticorpo de ^{125}I -tirosina, a mistura foi filtrada em coluna PD-10 (Sephadex G25; Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrada com 4ml de SFB e 25ml de BSA (1mg/ml em PBS). BSA a 1mg/ml foi usada como eluente para obter 20 frações de 0,5ml cada. A contagem e a localização da radioatividade foram feitas em contador-γ LKB-Wallac com aliquotas de 5 µl de cada fração. Um perfil típico deste fracionamento está apresentado na figura 1.

Em todos experimentos de radioiodinação de proteínas a eficiência da reação foi avaliada pela determinação de quantidade de ^{125}I ou ^{131}I incorporada numa amostra de 0,1ml da proteína marcada e expressa como percentagem de radioatividade total usada inicialmente.

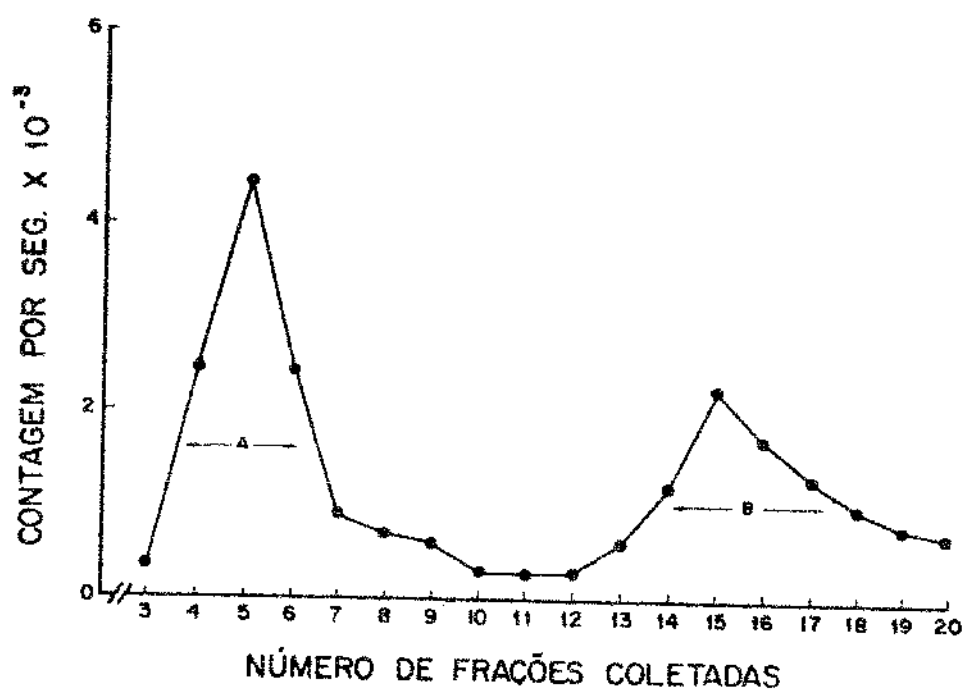


Fig.1. Cromatografia dos produtos de reação de radioiodinação de anti-79IT/36 em coluna PD-10 (Método de Jensenius e Williams, 1974). Radioatividade de aliquotas de 5 μ l de cada fração foi determinada em contador- γ . A fração A representa o anticorpo ^{125}I -anti-79IT/36 e a fração B representa a atividade residual de ^{125}I -tirosina.

8.3. MÉTODO DE FRAKER E SPECK (1978).

Este método é conhecido também como iodogênio. O iodogênio (1,3,4,6-tetracloro-3a,6a difenilglicoluril, Pierce Chemical Co., Chester, Cheshire, England) foi usado para marcação de anticorpos e IgG normal de camundongo com ^{125}I ou ^{131}I . Aliquotas de 300 μl de iodogênio 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em cloreto de metileno, foram distribuídas em tubos cônicos de polipropileno (Sarstedt, Leicester, Leics. England) e evaporados pelo uso de nitrogênio. O iodo radioativo (Na^{125}I ou Na^{131}I obtido de Radiochemical Centre Amersham, Bucks, England) e a proteína a ser marcada a 1mg/ml foram colocados em tubos forrados com iodogênio conforme anteriormente descrito e incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela simples remoção da mistura dos tubos forrados com iodogênio. O iodo radioativo livre, foi separado da mistura pela filtração em Sephadex G25 em PBS (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Em estudos de radioimunoligação a células ou distribuição do anticorpo *in vivo*, o anticorpo foi marcado para atingir atividade específica de 0,25 a 1,0 μCi de ^{125}I ou ^{131}I / μg proteína). A radioatividade precipitável nessas preparações com TCA a 5% era 95 a 100%.

9. PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-OSTEOSSARCOMA 791T.

Camundongos Balb/c foram imunizados com células de osteossarcoma humano 791T. As células do baço desses animais fusionadas com células de mieloma P3NS1 com polietilenoglicol foram crescidas em meio de HAT (Hipoxantina, Aminoptrina, Timidina), para selecionar hibridomas produtores de anticorpos. A clonagem de hibridomas foi realizada em agar a 0,3%.

9.1. IMUNIZAÇÃO.

Camundongos machos Balb/c foram inoculados por via intraperitonal com 10^7 células de osteossarcoma 791T. Uma semana após a dose de 10^7 células foi inoculada pela mesma via. A reinoculação foi realizada 5 dias antes do uso do baço na fusão celular, com 2×10^6 células de osteossarcoma 791T por via intracardíaca.

9.2. FUSÃO CELULAR.

Baços de camundongos Balb/c imunizados com células de osteossarcoma 791T foram removidos assepticamente. A suspensão de células foi preparada pela maceração cuidadosa de baços em meio de RPMI 1640 com auxílio de uma pinça. Células de baço (10^8) foram fusionadas com 10^7 células

de mieloma P3NS1, utilizando polietilenoglicol (P.M.1500) a 50% conforme descrito anteriormente por Gunn et al. (1980), baseando-se no método de Galfre et al. (1977).

Resumidamente, uma mistura de 10^8 células de baço e 10^7 células de mieloma P3NS1, foi preparada. Uma aliquota de 0,8ml de polietilenoglicol a 50% (British drug houses, P.M.1500) em RPMI 1640 foi adicionada na mistura celular gota a gota, durante 1 minuto. Um ml do meio foi adicionado vagorosamente durante 1 minuto e em seguida 20ml do meio durante 5 minutos. As células foram centrifugadas e ressuspensas em RPMI 1640 contendo 10% de SFB. Essas células foram distribuídas em 48 pocinhos de 2 placas (Costar nº 3524) utilizando células de exsudato peritoneal de rato como "Feeders" em placas de fusão celular 24 horas antes do início do experimento. No dia seguinte, metade do meio das culturas foi substituído com meio de HAT (Littlefield, 1964) em RPMI contendo 10% de SFB e esta etapa foi repetida diariamente.

Colônias de células se desenvolveram ocupando os pocinhos dentro de 2-3 semanas da sua semeadura. Nesta altura, os sobrenadantes foram testados contra células de osteossarcoma 791T, utilizando o ensaio de radioligação a células com proteína A- 125 I.

9.3. CLONAGEM.

A seleção de hibridomas foi realizada a través da sua reatividade com células de 791T e outros alvos, testando seus sobrenadantes pela radioligação com proteína A radioiodinada. Hibridomas positivos, ou seja, produtores de anticorpos anti-791T foram clonados em agar a 0,3% (Gunn et al., 1980).

Resumidamente, células de hibridoma anticorpo-positivos de cultura em massa foram suspensas em agar a 0,3% em RPMI contendo 10% de SFB. Essas células foram semeadas sobre uma camada fina de agar a 0,5% contendo células de exsudato peritoneal de rato "Feeders" em frascos de cultura de 25cm² (Sterilin). Colônias desenvolvidas a partir de células únicas foram isoladas e crescidas separadamente. Os sobrenadantes de cada clone foram testados em relação aos anticorpos anti-791T. Os clones de reações negativas foram eliminados.

10. SOROS.

Amostras de soro do paciente (MU), cujo sarcoma osteogênico foi estabelecido em cultura para obtenção da linhagem 791T, foram obtidos antes e após operação cirúrgica e guardados a -70°C. Soros controles foram obtidos de indivíduos normais sadios adultos e guardados a -70°C.

11. ABSORÇÃO DE ANTICORPOS.

Sobrenadante de hibridoma diluído 1/10, foi absorvido em alguns experimentos, com células de cultura do tumor numa concentração de 10^8 células/ml de sobrenadante, durante 2 horas à temperatura ambiente. As células foram separadas por centrifugação e o sobrenadante absorvido, testado em relação à sua reatividade contra determinadas células, conforme descrito nos resultados.

12. ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTROLES.

Sobrenadante de cultura de hibridomas (HRT/18/2/33b/clone 16) preparado contra carcinoma de cólon HRT/18 foi doado pelo Dr. J. Embleton (Resultados não publicados). O anticorpo monoclonal anti-melanoma foi doado pelo Dr. S. Ferrone e identificado nesses estudos pelo seu número de remessa marítima SC 3892. Um controle adicional foi obtido de sobrenadantes de cultura de mieloma P3NS1.

13. ENSAIO DE RADIOLIGAÇÃO A CÉLULAS COM 125 I-PROTEÍNA A.

Este ensaio foi baseado em teste de antiglobulina isotópica descrito anteriormente por Al-Sheikly et al. (1980).

Resumidamente, células tumorais alvos, foram distribuídas em placas com pocinhos de fundo arredondado (Sterilin M24A microtest plate) a 10^5 células por pocinho e sedimentadas por centrifugação a 280g. Os sobrenadantes foram removidos e substituídos por aliquotas de 100 μ l/pocinho de diferentes preparações de anticorpos ou de controles diluídos em meio de Hanks contendo 0,1% de BSA (HBSS+BSA).

Após incubação a 0°C durante 1 hora, as células foram lavadas 4 vezes com meio de Hanks, incubadas a 0°C durante 1 hora com 125 I-proteína A (5×10^4 cpm/pocinho) e lavadas novamente 5 vezes. A papa final de células foi seca em estufa a 37°C, selada com uma solução plástica Nobe cutane (Astra Chemicals Ltda., Watford, England). Os pocinhos foram cortados individualmente com serra elétrica e a radioligação a células foi determinada em contador- γ LKB - Wallac.

Cada amostra foi testada em quadriplicata em todas as concentrações de anticorpo. A relação de radioligação foi determinada como segue: relação de radioligação = (média de CPM com células expostas ao anticorpo monoclonal) / (média de CPM com células expostas ao meio de cultura).

14. PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS.

Aliquotas de 100ml a 2 l. de sobrenadantes de hibridomas 791T/36 clone 3 e 791T/48 clone 15 foram cromatografadas em coluna de 5ml de Sepharose ligada à proteína A (Pharmácia, Uppsala) em fluxo de 50ml/h. A fração que não se liga à proteína A-Sepharose foi dispensada e a coluna bem lavada com PBS contendo 0,02% de NaN_3 . Esta coluna foi conectada a uma outra coluna de Sephadex G25 (Pharmácia, Uppsala) e o anticorpo ligado à proteína A eluido com NaSCN 3M. A fração proteica foi separada de NaSCN por mais filtração em Sephadex G25 e concentrada por ultrafiltração, sob pressão positiva em membrana PM10 de Amicon (Amicon, High Wycombe). Colunas de proteína A-Sepharose foram usadas separadamente na purificação de anticorpos anti-791T/36 e anti-791T/48 a fim de evitar contaminação cruzada dos anticorpos. A recuperação de anticorpos anti-791T/36 e anti-791T/48 purificados foi $16,8 \pm 8,0 \mu\text{g/ml}$ e $4,3 \pm 2,9 \mu\text{g/ml}$ de sobrenadante original do hibridoma, respectivamente. Concentrações de anticorpos foram determinadas pelo método de dosagem de proteína de Lowry et al. (1951) ou espectrofotometricamente pelo valor de $E_{280}^{1\%} = 14,3$ (Hudson & Hay, 1980).

15. DETERMINAÇÃO DA SUBCLASSE DE IgG DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS.

A determinação da subclasse de IgG dos

anticorpos purificados foi realizada pela radioligação com ^{125}I -proteína A. Aliquotas de 100 μl dos anticorpos purificados e diluídos em PBS a uma concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, foram distribuídos em pocinhos de fundo achatado de placas de plástico (Sterilin M24 A, microtest plate). A adsorção de anticorpos às placas de plástico foi feita a 5°C durante 1 hora. As placas lavadas 3 vezes em PBS contendo 0,1% de BSA receberam aliquotas de 100 μl /pocinho de antissoro de coelho anti-subclasses de IgG de camundongo (Miles Laboratories, Stoke Poges, Bucks, England) ou de soro normal de coelho, diluídos 1/50 em PBS contendo 0,1% de BSA. As placas incubadas a 5°C durante 30 minutos foram lavadas 4 vezes. ^{125}I -proteína A foi adicionada a todos os pocinhos (5×10^4 cpm / 100 μl /pocinho). As placas foram incubadas novamente a 5°C durante 30 minutos e então lavadas 6 vezes com PBS contendo 0,1% de BSA, secas e seladas com uma solução plástica Nobecutane (Astra Chemicals Ltda, Watford, England). Os pocinhos cortados individualmente por uma serra elétrica foram colocados em contador- γ LKB-Wallac para determinar sua radioatividade.

16. ENSAIO DE RADIOLIGAÇÃO IMUNE A CÉLULAS COM ^{125}I -ANTICORPOS MONOCLONAIS.

Em testes de radioligação, os anticorpos anti-791T/36 e anti-791T/48 foram marcados com ^{125}I seguindo o método de cloramina T descrito por Jensinius e Wil

liams (1974) ou método de iodogênio descrito por Fraker e Speck (1978), a fim de obter preparações com atividade específica de aproximadamente $10 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ proteína. As placas de microtitulação M24 A de "Sterilin" com pocinhos de fundo arredondado foram inicialmente tratadas com meio de Hanks contendo 5% de SFB, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Aliquotas de células tumorais foram distribuídas nas placas (10^5 células/pocinho) e misturadas com anticorpo radioiodinado numa concentração de $5 \mu\text{g}/\text{pocinho}$ (5×10^4 a 10^5cpm) de acordo com a partida de anticorpo marcado. Após 1 hora de incubação a 0°C , as células foram lavadas 5 vezes por centrifugação a 280g durante 10 minutos. As placas após serem secas em estufa, foram nebulizadas com uma solução plástica (Nobecutane), seus pocinhos separados com serra elétrica e a radioatividade determinada.

Em testes de inibição de radioligação imune, o ensaio direto foi realizado conforme descrito acima com células tratadas com anticorpo não marcado ($4 \mu\text{g}$ de proteína/pocinho), antes do tratamento com anticorpo radioiodinado.

Em testes de radioligação quantitativa de anticorpos à células, os anticorpos monoclonais foram marcados com ^{125}I , utilizando método de iodogênio conforme descrito por Fraker & Speck (1978). A quantidade de anticorpo ligado em termos de moléculas/célula foi calculada utilizando os seguintes parâmetros: quantidade de ^{125}I ligado ,

atividade específica de anticorpo marcado, número de células, peso molecular do anticorpo (150.000) e número de Avogadro, conforme descrito por Price et al. (1982).

17. CITOTOXIDADE COMPLEMENTO-DEPENDENTE.

Citotoxicidade complemento-dependente de anticorpos monoclonais anti-791T foi determinada utilizando o teste de liberação de ^{51}Cr durante 2 horas (Price, 1978).

Resumidamente, células tumorais alvo (5×10^6 células) foram marcadas com 125 μCi de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, (Radiochemical Centre, Amersham) durante 60 minutos a 37°C , num volume de 0,5 a 1,0 ml de meio de Eagle's HEPES contendo 5% de soro de vitelo. Após a lavagem, as células foram distribuídas em placas de microtitulação M24 A com pocinhos de fundo arredondado (Sterilin), contendo meio de cultura, ou preparações de anticorpos monoclonais a 100 μl /pocinho. Soro normal de coelho, como fonte de complemento (100 μl / pocinho) foi adicionado numa concentração pré-determinada, como a quantidade máxima de soro que não causa lise de células sem anticorpos.

Após a incubação à temperatura ambiente, durante 2 horas, as placas foram centrifugadas a 280g por 10 minutos e aliquotas de 10 μl de sobrenadante coletadas e sua radioatividade contada. A percentagem de libera -

ção do ^{51}Cr foi calculada em cada amostra e em amostras controles do meio de cultura. A percentagem máxima de liberação do ^{51}Cr (>90% com todas as linhagens celulares usadas) foi determinada pela incubação de células radioisotópicas, com 1% de SDS e a percentagem de liberação do ^{51}Cr em amostras controles (com apenas meio) não ultrapassa 15%. A percentagem de citotoxicidade foi assim calculada: $\{(\% \text{ de } ^{51}\text{Cr} \text{ liberado em amostras testadas com anticorpo} - \% \text{ de } ^{51}\text{Cr} \text{ liberado com meio de cultura controle}) / \% \text{ máxima de } ^{51}\text{Cr} \text{ liberado} - \% \text{ de } ^{51}\text{Cr} \text{ liberado com meio de cultura controle}\} \times 100$.

18. XENOENXERTOS DE OSTEOSSARCOMA 791T EM CAMUNDONGOS CBA.

Camundongos CBA de 3 a 4 semanas de idade foram timectomizados, e 3 a 6 semanas após receberam 9 Gray de irradiação- γ de uma fonte de ^{60}Co . O efeito letal de irradiação foi prevenido pela injeção intraperitoneal de 200mg/kg de citosina arabinosidosa (Cytosar, Upjohn, Crawley, W. Sussex, England), 2 dias antes da irradiação (Steel et al., 1978). Crescimento de xenoenxertos foi iniciado pela injeção de 10^6 a 10^7 células tumorais coletadas com tripsina a partir de culturas de osteossarcoma 791T e lavadas em meio livre de soro. Os camundongos assim tratados, foram mantidos em condições estéreis com água e ração esterilizadas, em cabines especiais (Vickers Pathoflex Isolator, Basingstoke, Hants, England).

19. DISTRIBUIÇÃO DE ANTICORPO RADIOIODINADO *IN VIVO*.

Camundongos com xenoenxertos de 10 a 22 dias foram inoculados pela via intraperitoneal com anticorpo monoclonal anti-791T/36 ou IgG normal de camundongo, radioiodinados pelo método de iodogênio e com atividade específica de 1 a 4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de proteína. NaI a 0,1% foi adicionado à água de beber dos animais durante o experimento. 1 a 6 dias após, os camundongos foram sacrificados e dissecados. O peso dos tumores, órgãos internos, amostras de sangue e carcaças, foi determinado e sua radioatividade avaliada. Os resultados foram expressos em termos de percentagem de radioatividade injetada/g de tecido, ou em termos de relação de radioatividade injetada/g de tecido: a radioatividade/g de sangue (i.e. relação tecido:sangue).

RESULTADOS.

Os anticorpos monoclonais foram preparados conforme indicado em Material e Métodos pela fusão de 10^8 células de baços de camundongos imunizados e 10^7 células de mieloma P3NS1 em presença de polietilenoglicol (P.M. 1500) a 50%.

1. REAÇÕES ANTI-TUMORES.

1.1. ESPECIFICIDADE DOS SOBRENADANTES DE HIBRIDOMA ANTI-791T.

De uma das fusões bem sucedidas, desenvolveram-se 48 culturas de hibridomas cujos sobrenadantes foram testados pelo ensaio de radioligação com células de sarcoma osteogênico 791T, utilizando ^{125}I -proteína A. Inicialmente, 5 hibridomas demonstraram reações positivas acima dos controles feitos com sobrenadante de cultura de mieloma P3NS1. Em repetições de ensaio com ^{125}I -proteína A, apenas 2 hibridomas designados 791T/36 e 791T/48 foram constantemente positivos.

Os resultados obtidos com os dois sobrenadantes de hibridomas 791T/36 e 791T/48, pelo ensaio de radioligação com diferentes alvos e apresentados na figura 2,

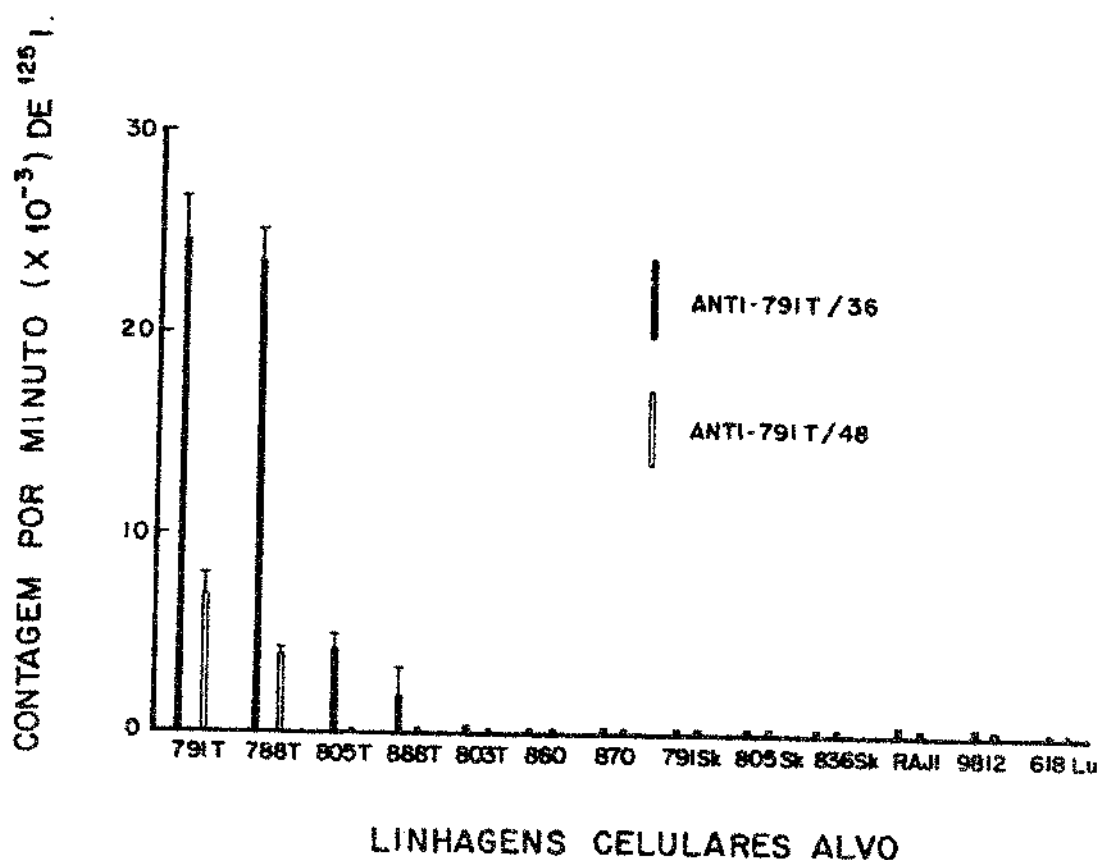


Fig.2. Especificidade dos sobrenadantes de hibridomas anti-791T: Os sobrenadantes das culturas 791T/36 e 791T/48, foram testados contra diferentes linhagens de células alvo, a fim de determinar suas especificidades antes de serem clonadas. O "background" da reação de radioligação (cpm com meio coletado das culturas P3NS1) era 295 ± 35 e que foi convertido a zero na figura, i.e. os histogramas são corrigidos pela subtração do "background" dos valores obtidos.

demonstraram que o sobrenadante 791T/36 possui reações fortemente positivas com células de osteossarcoma linhagens 791T, 788T e reações fracas com linhagens 805T e 888T e que o segundo sobrenadante 791T/48 possui reações positivas apenas com células de 791T e 788T. Desses dados, pode-se observar também que os outros testes com outros alvos foram negativos, inclusive com 3 linhagens de fibroblastos designados como 860, 870 e 791 respectivamente, derivados do mesmo doador de osteossarcoma 791T, que foi utilizado na preparação dos hibridomas 791T/36 e 791T/48.

1.2. ESPECIFICIDADE DE CLONES DE HIBRIDOMAS 791T/36.

Após clonagem do hibridoma 791T/36 em agar semi-sólido, conforme descrito em material e métodos, 12 clones foram isolados, crescidos e seus sobrenadantes foram testados com células de osteossarcoma 791T, fibroblastos de pele da linhagem 791SK e duas outras linhagens de células (pulmão normal 618 Lu e linfoma de RAG1), utilizando o ensaio de radioligação com 125 I-proteína A. Os resultados obtidos e apresentados na Tabela 1 indicaram 9 clones com reações altamente positivas com células 791T e 3 clones com reações fracas. Entretanto, os 12 clones demonstraram reações negativas com os outros alvos usados.

Dos clones fortemente positivos, foram escolhidos apenas 3 para serem testados com uma ampla variedade

Tab.1. Reatividade dos clones obtidos do hibridoma 791T/36 com a linha gem 791T de osteossarcoma e outras linhagens controle.

Sobrenadante testado	cpm de ^{125}I (+ D.P.) ¹ ligadas a células alvo: -			
	Sarcoma osteogênico 791T	Fibroblastos da pele 791SK ²	Fibroblastos do pulmão 618 Lu	Linfoma de Burkitt (Raji)
HBSS + BSA ³	278 ± 4	689 ± 15	396 ± 36	694 ± 31
Meio de P3NS1	279 ± 50	410 ± 55	366 ± 6	485 ± 96
791T/36 clone 1	12082 ± 402	326 ± 30	575 ± 52	791 ± 29
791T/36 clone 2	14932 ± 598	380 ± 21	549 ± 22	522 ± 114
791T/36 clone 3	16905 ± 261	404 ± 34	447 ± 6	444 ± 71
791T/36 clone 4	16311 ± 322	316 ± 40	433 ± 33	473 ± 164
791T//6 clone 5	10700 ± 388	339 ± 29	318 ± 8	591 ± 41
791T/36 clone 6	13981 ± 371	361 ± 11	471 ± 9	632 ± 132
791T/36 clone 7	921 ± 77	292 ± 14	307 ± 63	259 ± 36
791T/36 clone 8	1174 ± 44	501 ± 51	369 ± 44	329 ± 36
791T/36 clone 9	1858 ± 173	316 ± 16	455 ± 43	226 ± 24
791T/36 clone 10	18383 ± 1236	334 ± 24	488 ± 19	229 ± 20
791T/36 clone 11	18018 ± 63	657 ± 57	608 ± 118	276 ± 25
791T/36 clone 12	11189 ± 497	425 ± 25	435 ± 57	323 ± 97

¹ Contagem por minuto ± Desvio Padrão.

² 791T e 791SK foram derivados do mesmo paciente.

³ Meio usado em lavagem de células: Meio de Hanks (solução salina balanceada) + 0,1% soro albumina bovina (BSA).

dade de células alvo, conforme demonstrado na Tabela 2.

Os resultados obtidos e apresentados nessa Tabela, demonstraram que os 3 clones testados possuíam reatividades semelhantes com os alvos usados, o que indica que a cultura de hibridoma 791T/36 continha apenas um clone positivo. Estes resultados expressos como relação da radioligação (cpm da reação do sobrenadante do clone 791T/36 dividido pela cpm com meio de cultura de P3NS1) revelam reações positivas de anticorpos contra 4 de 10 osteossarcomas de pacientes diferentes e reações completamente negativas, com fibroblastos derivados do mesmo doador do tumor 791T ou de outros pacientes.

Tab.2. Reatividade dos clones 3, 4 e 10 do hibridoma 791T/36 com várias células alvo.

Linhagens de células	Tipos de células	Relação ¹ de radioligação de 791T/36:		
		Clone 3	Clone 4	Clone 5
791T ²	osteossarcoma	22,84***	25,60***	22,84***
788T ³	osteossarcoma	46,82***	53,13***	52,74***
845T	osteossarcoma	3,19*	5,58**	NT ⁵
805T ⁴	osteossarcoma	2,63	3,41*	2,99*
803T	osteossarcoma	1,45	1,45	NT
836T	osteossarcoma	0,78	0,73	0,82
706T	osteossarcoma	1,89	2,49	NT
781T	osteossarcoma	1,83	2,06	1,92
888T	osteossarcoma	1,08	1,13	1,12
792T	osteossarcoma	1,12	1,23	NT
791SK ²	fibroblastos de pele	0,99	0,77	0,84
788SK ³	fibroblastos de pele	0,90	NT	0,99
805SK ⁴	fibroblastos de pele	1,41	2,05	1,46
181SK	fibroblastos de pele	2,14	2,18	2,10
836SK	fibroblastos de pele	1,31	1,29	NT
860 ²	fibroblastos derivados de tumor	1,39	NT	1,48
870 ²	fibroblastos derivados de tumor	1,09	1,04	0,95
618Lu	fibroblastos de pulmão	1,68	1,63	1,83
74BM	medula óssea de feto	1,50	1,69	NT
-	eritrócitos humanos	0,61-0,91	0,61-1,35	NT
-	células mononucleares	0,61-1,24	0,70-2,00	0,63-1,28
HT29	carcinoma de cólon	6,66**	7,10**	6,85**
HTC8	carcinoma de cólon	1,61	2,52	1,89
HRT18	carcinoma de cólon	1,21	1,02	1,10
734B	carcinoma mamário	2,18	1,87	1,81
SKBr3	carcinoma mamário	1,54	1,38	1,47
HS578T	carcinoma mamário	1,22	1,76	1,32
MeWo	melanoma	0,98	0,72	0,88
Me1 57	melanoma	1,19	1,25	1,22
Me1 2a	melanoma	1,36	2,17	2,07
NK1-4	melanoma	1,25	0,47	0,56
RPMI 5966	melanoma	1,36	1,48	1,66

A549	carcinoma de pulmão	4,54**	5,93**	4,76**
A427	carcinoma de pulmão	1,09	1,31	1,10
9812	carcinoma de pulmão	1,39	1,22	0,94
HeLa	carcinoma de cêrvix	55,52***	53,95***	53,58***
EB33	carcinoma de próstata	28,3***	26,11***	26,22***
T24	carcinoma de bexiga	1,50	1,76	1,48
PA-i	carcinoma de ovário	1,61	1,50	1,43
RAJ1	linfoma de Burkitt	1,26	1,06	0,60
-	eritrócitos de carneiro	1,00	0,56	0,57
73-2295	osteossarcoma canino	1,10	1,43	1,34
D23	hepatoma de rato	0,78	0,98	0,88
KXD2	hepatoma de rato	1,01	1,12	1,10
Sp4	carcinoma mamário de rato	1,25	1,15	1,27

¹ Relação de radioligação = média de cpm da reação de sobrenadante do clone 791T/36 ÷ média de cpm com meio de cultura P3NS1. Análise estatística, da diferença entre cpm com o clone de 791T/36 e cpm do meio P3NS1 feita pelo teste t é indicada como: ***p < 0,001 **p < 0,01 *p < 0,05.

² 791T, 791SK, 860 e 870 foram derivadas do mesmo paciente (M.U.)

³ 788T e 788SK foram derivadas do mesmo paciente (P.R.)

⁴ 805T e 805SK foram derivadas do mesmo paciente (L.)

⁵ NT = não testada.

As duas linhagens controles de fibro - blastos alogênicos 788SK e 805SK que deram reações negati - vas, foram derivadas de doadores cujos sarcomas 788T e 805T respectivamente, revelaram reações positivas. Pode-se observar que uma ampla variedade de linhagens celulares fo - ram usadas como controle. Pode-se observar também, que tan - to eritrócitos de 9 doadores incluindo a maioria dos grupos sanguíneos e suas células mononucleares periféricas, como eritrócitos de carneiro, osteossarcoma canino (73-2295) e tumores de rato, demonstraram reações negativas.

Entretanto, testes feitos com 19 linha - gens celulares de diferentes tipos de tumores humanos, reve - laram reações cruzadas contra células Hela, carcinomas de próstata EB33, de cólon HT29 e de pulmão A459. Essas rea - ções cruzadas e todas as outras reações negativas foram sem - pre reproduzíveis em repetições do ensaio de radioligação com 125 I-proteína A.

1.3. TESTES DE ABSORÇÃO.

O sobrenadante de hibridoma 791T/36 clone 3 diluído 1/10, foi absorvido durante 2 horas com cé - lulas de diferentes linhagens tumorais numa concentração fi - nal de 10^8 células por ml de sobrenadante. Os experimentos de absorção foram realizados baseando-se em trabalho feito

Tab.3. Absorção de anticorpos de sobrenadante do clone 3 de hibridoma 791T/36.

Células alvo	Células absorventes ¹	Média de cpm - "Background" ²		
		não absorvido	absorvido ³	%de redução em cpm
791T	791T	3771 ⁴	107	97,2
791T	788T	3771 ⁴	296	92,1
791T	EB33	3771 ⁴	182	95,2
791T	Mel 2a*	20622 ⁴	15652	24,1
791T	Mel 57*	20622 ⁴	17499	15,1
791T	PA-1*	20622 ⁴	18339	11,1
791T	A549	20622 ⁴	-798	100
788T	788T	4271	366	91,4
788T	791T	4271	296	93,1
A549	A549	6053	1481	75,5
A549	791T	6053	235	96,1
HT29	HT29	1697	512	69,8
HT29	791T	1697	412	75,7
EB33	EB33	5846	322	94,5
	791T	5846	323	94,5
HeLa	HeLa	2330	180	92,3
	791T	2330	240	89,7

¹ As células assinaladas com (*) não foram reativas com o anticorpo em testes diretos, as outras células nesta tabela foram reativas (conforme tabela 2).

² Média de cpm com 791T/36/3 menos a média de cpm do meio de P3NS1 "background".

³ O sobrenadante 791T/36/3 foi diluído 1/10 e absorvido com 10^8 células/ml à temperatura ambiente durante 2 horas.

⁴ Os dois valores de cpm foram obtidos em experimentos separados usando fontes diferentes de 125 I-proteína A, com níveis diferentes de radioatividade.

com êxito para determinar a especificidade de um anticorpo monoclonal contra carcinoma mamário espontâneo (Sp22) de rato (Dawood e Silva, 1985). Este anticorpo revelou um título de 1/1000 com células do tumor Sp22, título semelhante ao do anticorpo 791T/36/clone 3 determinado empiricamente.

O anticorpo foi absorvido e testado como segue:

- a. absorvido com células 791T e testado com células alvo de outras linhagens que possuem reações cruzadas.
- b. absorvido e testado com outras células que não sejam 791T e testado com 791T.
- c. absorvido e testado com outras células que não sejam 791T.

Os resultados obtidos pelo teste de anticorpo absorvido pelo ensaio de radioligação com a proteína A radioativa, estão apresentados na Tabela 3. Pode-se observar que quando as células usadas na absorção ou em testes de radioligação eram reativas ou cruzadamente reativas (Tabela 2), ocorreu reduções de cpm entre 70 a 97% após absorção. Entretanto quando o anticorpo foi absorvido com células não reativas (Mel 2a, Mel 57, PA-1), a redução da sua atividade contra células de 791T foi apenas de 11 a 24%.

Estes dados estão de acordo com a especificidade de anticorpos demonstrada anteriormente em testes diretos com ¹²⁵I-Proteína A.

1.4. HIBRIDOMA 791T/48 CLONE 15.

Experimentos iniciais cujos resultados são resumidos na figura 2, indicaram a obtenção de um segundo hibridoma designado como 791T/48 cujo sobrenadante possui reatividade positiva com apenas 2 linhagens de osteosarcoma 791T e 788T. Este hibridoma foi também clonado em agar semi-sólido à semelhança do hibridoma 791T/36. O clone 15 após comprovada sua especificidade, foi escolhido para ser estudado junto com o clone 3, do hibridoma 791T/36, utilizando testes diretos de ligação radioimune com os anticorpos monoclonais purificados e marcados com ^{125}I , ou testes indiretos com sobrenadantes (791T/36/3 e 791T/48/15) e ^{125}I proteína A. Estes estudos foram realizados com o objetivo de definir e diferenciar os antígenos detectados pelos anticorpos monoclonais 791T/36/3 e 791T/48/15, conforme descrito a seguir.

2. DIFERENCIAÇÃO ENTRE DOIS ANTÍGENOS EM CÉLULAS DE OSTEOSARCOMA 791T.

Este estudo foi realizado com o objetivo de comparar a eficiência de ligação radioimune dos anticorpos monoclonais em diferentes células, definir quais são as linhagens tumorais que possuem antígenos comuns de osteosarcoma 791T, pesquisar amplamente a especificidade dos anticorpos monoclonais, e determinar se os anticorpos mono-

clonais reconhecem o mesmo antígeno ou antígenos diferentes.

2.1. LIGAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ÀS CÉLULAS.

Numa primeira etapa, a ligação de anticorpos monoclonais (anti-791T) às células, foi estudada pelo teste de radioimunoensaio indireto com a proteína A-¹²⁵I e uso de dois anticorpos monoclonais controles: SC 3982 (anti-melanoma humano) e HRT 18/2/33b (anti-carcinoma de cólon humano). Numa segunda etapa e após a purificação dos anticorpos monoclonais (anti-791T) a radioligação às células foi estudada pelo teste de radioimunoensaio direto com anticorpos marcados com ¹²⁵I.

2.1.1. REATIVIDADE INDIRETA DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS:

Os resultados de ligação radioimune de anticorpos monoclonais anti-791T/36 e anti-791T/48 a uma série selecionada de células alvo, utilizando o ensaio de proteína A-¹²⁵I, estão apresentadas na Tabela 4. Pode-se observar que o anticorpo 791T/36, demonstrou reações fortes com células de osteossarcomas 791T e 788T, carcinoma de próstata EB33 e células Hela; reações fracas com carcinoma de pulmão A549 e de cólon HT29 e reações negativas com todas as outras linhagens usadas como alvo. O anticorpo 791T/48, de-

Tab.4. Reatividade cruzada dos anticorpos monoclonais, contra linhagens celulares derivadas de diferentes tumores.

Alvos	Células	Relação ¹ de radioligação com anticorpo monoclonal ²			
		Anti-791T/36	Anti-791T/48	SC3982	HRT18/2/33b
791T	osteossarcoma	26,49*** ³	13,76***	0,61	5,97**
788T	osteossarcoma	51,07***	10,08**	0,95	4,43**
888T	osteossarcoma	1,08	1,31	1,49	NT
HT29	carcinoma de cólon	6,66**	0,99	NT ⁴	0,74
HRT18	carcinoma de cólon	1,21	0,81	1,21	5,05*
A549	carcinoma de pulmão	5,39**	1,14	1,25	0,36
A427	carcinoma de pulmão	1,09	1,64	NT	0,75
EB33	carcinoma de próstata	28,3***	1,40	1,66	1,26
HeLa	carcinoma de cérvix	55,52***	1,17	NT	2,54*
SkBr3	carcinoma mamário	1,65	10,94***	NT	NT
74BM	medula óssea de feto	1,69	2,75*	1,33	2,58*
PA-1	carcinoma de ovário	1,61	0,90	0,94	0,27
T24	carcinoma de bexiga	1,50	0,84	0,90	0,26
HCT8	carcinoma de cólon	1,61	1,02	NT	3,88*
RPML 5966	melanoma	1,16	0,95	0,95	2,58*

¹ Ligação de anticorpo é detectada pelo consumo de proteína A-¹²⁵I com células. Relação de radioligação = média de cpm ligada a células tratadas com anticorpo monoclonal ÷ pela média de cpm ligada a células tratadas com meio de cultura de P3NS1.

² Anti-791T/36 e anti-791T/48 foram preparados contra células de 791T. SC3982 é o código do anticorpo monoclonal anti-melanoma fornecido pelo Dr. S. Ferrone.

³ HRT 18/2/33b foi preparado contra células de HRT 18.

⁴ *** p < 0,001 ** p < 0,05 (teste t).

⁴ NT = não testada.

monstrou também reações positivas com células de osteossarcomas 791T e 788T com um potencial menor que o anticorpo 791T/36. Este mesmo anticorpo (791T/48) revelou reações positivas com carcinoma mamário SKBr3, reações fracas com a linhagem 74BM (fibroblastos derivados da medula óssea) e reações negativas com os demais alvos, incluindo linhagens reativas com o anticorpo 791T/36.

Este padrão de reatividade sugere que os dois anticorpos se ligam com dois diferentes antígenos e que ambos os antígenos estão presentes em células de 791T e 788T e não em outras células testadas.

A tabela 4 apresenta também resultados obtidos com outros dois anticorpos monoclonais anti-melanoma (SC3982) e anti-carcinoma de cólon (HRT 18/2/33b), que foram escolhidos para serem testados, devido à sua reação cruzada, com células de 791T e 788T. Devido à não reação de anti-melanoma com a proteína-A, este anticorpo foi testado pelo uso de anti-IgG de camundongo-¹²⁵I. Embora o anticorpo anti-melanoma demonstrou reações negativas com todas as células testadas, o anticorpo HRT/18/2/33b reagiu com algumas linhagens - alvos. Entretanto, essas reações não coincidem com as reações de anti-791T/36 ou de anti-791T/48, o que sugere que HRT/18/2/33b reconhece um terceiro antígeno comum entre as duas linhagens 791T e 788T.

2.1.2. REATIVIDADE DIRETA DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS.

Resultados da ligação radioimune direta de anti-791T/36-¹²⁵I e anti-791T/48-¹²⁵I às células de diferentes linhagens tumorais estão demonstrados na Tabela 5 . Pode-se observar claramente que o anticorpo monoclonal 791T/36 se ligou preferencialmente a células de 791T, 788T, EB33 e HeLa e não a outras células incluindo linhagens A549 e HT29. Assim sendo, a ligação direta de anticorpo a células, foi menos sensível que a ligação indireta pelo uso da proteína A, porquanto o teste direto não detectou reações fracas que foram reveladas pelo teste indireto. Entretanto as reações positivas dos dois testes se correlacionam exatamente entre si.

Nessas experiências, o anticorpo 791T / 48-¹²⁵I se revelou menos eficiente que o anticorpo 791T/36-¹²⁵I com linhagens 791T e 788T, conforme demonstrado na Tabela 5 em termos de porcentagem de radioatividade ligada a células, o que indica uma reatividade fraca do anticorpo 791T/48. Entretanto a radioatividade ligada em células 791T e 788T, foi significativamente maior que a mesma em outras células. Um baixo nível de radioatividade ligada a células de SKBr3 com o anti-791T/48-¹²⁵I também foi observada o que indica que os resultados dos testes diretos com anti-791T / 48-¹²⁵I se correlacionam com os resultados dos testes indiretos com proteína-A-¹²⁵I.

Tab.5. Reatividade de anticorpos monoclonais anti-sarcoma osteogênico 791T contra linhagens celulares derivadas de diferentes tumores:

Teste Nº	Células alvo ¹	Anticorpo ²	Ligação de ¹²⁵ I-anticorpo	
			cpm: média + D.P.	% da quantidade ligada
1.	-	anti-791T/36	413+ 189	0,39
	791T		6.301+ 605* ³	5,94
	HeLa		4.023+ 207*	3,79
	SkBr3		772+ 61	0,72
	HCT8		532+ 157	0,50
	A427		741+ 152	0,70
2.	-	anti-791T/36	160+ 44	0,31
	791T		3.265+ 424*	6,41
	788T		3.356+ 163*	6,59
	888T		452+ 25	0,89
	T24		506+ 40	0,99
	HRT18		571+ 60	1,12
	PA-1		164+ 48	0,32
3.	-	anti-791T/36	119+ 32	0,23
	791T		4.008+ 295*	7,87
	A549		560+ 94	1,10
4.	-	anti-791T/36	110+ 47	0,27
	791T		4.635+ 95*	11,27
	788T		4.586+ 202*	11,08
	HeLa		5.117+ 346*	12,36
	RPMI 5966		840+ 62	2,02
5.	A549	anti-791T/36	295+ 63	0,63
	HT29		452+ 45	0,98
6.	-	anti-791T/36	125+ 9	0,23
	791T		4.201+ 122*	7,74
	RPMI 5966		525+ 57	0,97
	A427		791+ 14	1,46
	HCT8		609+ 51	1,12
	A549		610+ 94	1,12

7.	-	anti-791T/36	175+	13	0,41
	SkBr3		287+	33	0,67
	HCT8		263+	43	0,61
	HT29		224+	20	0,52
8.	-	anti-791T/48	262+	3	0,09
	791T		1.960+	113*	0,68
	788T		1.498+	53*	0,52
	HeLa		790+	58	0,27
	T24		519+	39	0,18
	HRT18		416+	31	0,14
9.	-	anti-791T/48	231+	19	0,12
	791T		1.682+	49*	0,88
	RPMI 5966		411+	22	0,22
	A427		482+	37	0,25
	HCT8		552+	14	0,29
	A549		612+	58	0,32
	EB33		680+	14	0,36
10.	-	anti-791T/48	186+	12	0,10
	SkBr3		717+	15*	0,38
	HCT8		410+	83	0,22
	HT29		450+	48	0,24

¹As células alvo são designadas na tabela 4.

²Células alvo (1×10^5) foram tratadas durante 1 hora com anticorpo purificado (50 ng de proteína) marcado com ^{125}I utilizando o método de cloramina T. Após a lavagem e secagem das células, a radioatividade foi avaliada em contador- γ .

³cpm indicada com * foi significativamente maior que cpm obtida com outras linhagens no mesmo experimento, conforme foi aplicado o teste de (Wilcoxon rank).

Desses resultados, pode-se estabelecer, que os anticorpos monoclonais purificados e radioiodinados, reagiram com a mesma especificidade, conforme definido por anticorpos não marcados, cuja ligação foi revelada com proteína A- ^{125}I em diferentes alvos, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.

.2. INIBIÇÃO DE LIGAÇÃO RADIOIMUNE DOS ANTICORPOS AS CÉLULAS.

.2.1. INIBIÇÃO DA REATIVIDADE COM ANTI-791T/36 E ANTI-791T/48.

A inibição de ligação do anticorpo monoclonal 791T/36 radioiodinado a células 791T, 788T e HeLa, foi realizada através de pré-tratamento dessas células com anticorpo não marcado "frio", conforme indicado em Material e Métodos. Resultados dessas experiências estão apresentados na Tabela 6. A análise desses resultados permite observar que o pré-tratamento de células com anti-791T/36 em forma de sobrenadante de hibridoma ou em forma de anticorpo purificado, inibiu acentuadamente a ligação subsequente de anti-791T/36- ^{125}I . Entretanto o pré-tratamento das células com os anticorpos monoclonais (anti-791T/48 ou HRT 18/2/33b), ambos foram reativos com células 791T e 788T, conforme resultados anteriormente descritos, não inibiu a ligação de anti-791T/36- ^{125}I . Do mesmo modo, o anticorpo HRT/18/2/33b, não foi capaz de inibir a ligação de anti-791T/36- ^{125}I a células HeLa, embora os 2 anticorpos se liguem a estas células.

Tab.6. Inibição de ligação de anticorpo monoclonal ^{125}I -anti-791T/36 após o pré-tratamento das células com anticorpos não marcados.

Células alvo	Anticorpo ¹ (bloqueador) não marcado	Ligação de ^{125}I -anti-791T/36 ² Média de cpm (+ D.P.)	% de inibição de ligação
osteossarcoma	-	4008 + 295	
791T	meio de P3NS1	3721 + 274	
	SC3982	4152 + 265	-11,6
	Anti-791T/36	829 + 69	77,7*
	Anti-791T/48	4185 + 551	-12,5
	Anti-791T/36P	548 + 83	85,3*
osteossarcoma			
791T	meio de P3NS1	4413 + 221	
	SC3982	4588 + 109	- 4,0
	HRT18/2/33b	4471 + 203	- 1,3
	Anti-791T/36	1176 + 143	73,3*
	Anti-791T/48	4769 + 127	- 8,1
	Anti-791T/36P	713 + 85	88,8*
osteossarcoma			
788T	meio de P3NS1	3619 + 82	
	SC3982	3284 + 78	9,2
	HRT18/2/33b	3398 + 303	6,1
	Anti-791T/36	1138 + 326	68,5*
	Anti-791T/48	3964 + 526	- 9,5
	Anti-791T/36P	943 + 92	73,9*
ela			
	meio de P3NS1	5717 + 260	
	SC3982	5116 + 129	10,5
	HRT18/2/33b	6059 + 445	- 6,0
	Anti-791T/36	2341 + 230	59,0*
	Anti-791T/48	5377 + 308	5,9
	Anti-791T/36P	1274 + 25	77,7*

Os anticorpos monoclonais usados na inibição de radioligação são definidos na Tabela 4. 1×10^5 células alvo, foram incubadas durante 1 hora com 4 μg de anticorpo bloqueador. Após a lavagem, as células foram tratadas com 5 μg de ^{125}I -anti-791T/36.

Inibição de ligação de ^{125}I -anticorpo comparada com a inibição pelo meio de cultura de P3NS1 (controle). *p < 0,001 pelo teste t.

las conforme resultados anteriormente obtidos. Estes resultados demonstraram também que o anticorpo SC3982 (anti-melanoma), não afetou a ligação de anti-791T/36-¹²⁵I às células.

Dos resultados da inibição recíproca da ligação radioimune anti-791T/48-¹²⁵I, apresentados na tabela 7, pode ser observado que a ligação de anti-791T/48-¹²⁵I foi claramente inibida através de pré-incubação das células 791T ou 788T com o anticorpo 791T/48 "frio", seja em forma de sobrenadante de hibridoma seja em forma de anticorpo purificado, mas não através de pré-incubação com os anticorpos monoclonais: 791T/36, HRT/18/2/33b ou SC3892.

Estes resultados (item 2.2.1.) demonstraram claramente que os anticorpos monoclonais 791T/36, 791T/48 e HRT18/2/33b reconhecem antígenos diferentes em células de osteossarcoma de linhagens 791T e 788T.

2.2.2. INIBIÇÃO COM SORO DO PACIENTE DOADOR DE 791T.

Essas experiências foram realizadas, com objetivo de verificar a presença de anticorpos no soro do paciente doador de osteossarcoma 791T, que reagem com o mesmo determinante antigênico na linhagem 791T, reconhecido pelo anticorpo monoclonal (anti-791T/36). Após incubação das

Tab.7. Inibição de ligação de anticorpos monoclonais ^{125}I -anti-791T/48 após o pré-tratamento das células com anticorpo não marcado.

Células alvo	Anticorpo ¹ (bloqueador) não marcado	Ligação de ^{125}I -anti-791T/48 Média de cpm (+ D.P.)	% de inibição ² de Ligação
Osteossarcoma			
791T	-	1960 + 113	
	Meio de P3NS1	1894 + 108	
	Anti-791T/36	1913 + 23	1,5
	Anti-791T/48	718 + 35	62,1*
	HRT18/2/33b	1974 + 92	5,3
	Anti-791T/36P	2198 + 267	-16,0
	Anti-791T/48P	698 + 81	63,1*
Osteossarcoma			
788T	-	1498 + 53	
	Meio de P3NS1	1461 + 69	
	Anti-791T/36	1450 + 71	0,2
	Anti-791T/48	502 + 42	65,7*
	HRT18/2/33b	NT	
	Anti-791T/36P	1508 + 59	- 3,2
	Anti-791T/48P	452 + 30	68,3*

¹ Os anticorpos monoclonais usados na inibição de radioligação são definidos na Tabela 4. 1×10^5 células alvo, foram incubadas durante 1 hora com 4 μg de anticorpo bloqueador. Após a lavagem, as células foram tratadas com 5 μg de ^{125}I -anti-791T/48.

² Inibição de ligação de ^{125}I -anticorpo comparada com a inibição pelo meio de cultura de P3NS1 (controle). *p < 0,001 pelo teste t.

células 791T com soros normais ou do paciente, a ligação radioimune de anti-791T-¹²⁵I a essas células foi determinada, conforme descrito em Material e Métodos.

Os resultados obtidos acham-se exemplificados na Tabela 8. Pode-se observar em um teste, que com certos soros ocorreu aparentemente uma redução parcial em radioligação de anticorpo 791T/36 a células da linhagem 791T de osteossarcoma. Entretanto no segundo teste ocorreu redução significativa.

Resultados obtidos com o mesmo objetivo utilizando proteína-A-¹²⁵I para substituir o anti-791T/36 - ¹²⁵I acham-se exemplificados na Tabela 9. A comparação dos resultados apresentados nas duas Tabelas (8 e 9) demonstra, que a inibição parcial ocorrida no teste 1 não se correlaciona com detecção de anticorpo no soro. Assim, um soro normal e 3 soros do paciente que demonstraram reações positivas com células 791T (Tabela 9) não tiveram efeito inibitório na ligação do anticorpo 791T/36 às células (Tabela 8). Portanto, foi concluído que os anticorpos no soro de hospedeiro podem ser dirigidos contra antígenos diferentes daqueles reconhecidos pelo anticorpo monoclonal anti-791T/36.

ab.8. Efeito de pré-tratamento de células de osteossarcoma 791T com soros do doador (MU) sobre a radioligação imune do anticorpo ^{125}I -anti-791T/36.

Soros de doador ¹	Soros bloqueadores ²	Radioligação de ^{125}I -anti-791T/36	
		Teste 1 (cpm±D.P.)	Teste 2 (cpm±D.P.)
	-	4008 ± 295	4635 ± 95
Adultos normais	S9419	2654 ± 152** ³	4369 ± 607
	A1242	2535 ± 596	NT
	A6374	NT	4304 ± 220
	A6376	2500 ± 410*	4514 ± 311
Doador de 791T	MU-164	4411 ± 905	4243 ± 467
	MU-192	3281 ± 251	4532 ± 181
	MU-304	2662 ± 92**	NT
	MU-318	3024 ± 228*	5104 ± 465
	MU-339	4017 ± 479	4225 ± 38
	MU-1685	3686 ± 938	4561 ± 192
	MU-1713	3448 ± 283	4780 ± 300

Soros normais obtidos de adultos sadios. Soro do paciente MU, são identificados pelo tempo em dias a partir de remoção de metastase do pulmão, da qual a linhagem celular 791T foi estabelecida.

O soro foi incubado com 1×10^5 células alvo durante 1 hora. Após a lavagem, as células alvo foram tratadas com ^{125}I -anti-791T/36.

** p < 0,05; * p < 0,05 pelo teste t para cálculo da redução de cpm ligadas a células alvo comparada com cpm ligada a células tratadas apenas com ^{125}I -anticorpo.

NT - não testado.

Tab.9. Radioligação de ^{125}I -proteína A às células de osteossarcoma 791T tratadas com soro do doador desse tumor.

Soros e seus números ¹		Relação de ligação com células 791T ^{2,3}
Adultos normais	S9419	1,15
	A1242	0,92
	A6374	1,52
	A6776	8,27**
Doador de 791T	MU- 164	2,80*
	MU- 192	3,30**
	MU- 304	1,19
	MU- 318	1,00
	MU- 339	2,82*
	MU-1685	1,80
	MU-1713	1,40

¹ Soros normais obtidos de adultos sadios. Soros do paciente MU são identificados pelo tempo em dias a partir de remoção de metástase do pulmão, da qual a linhagem celular 791T foi estabelecida.

² Relação de ligação = $\frac{\text{média de cpm com células tratadas com soro } 1/10}{\text{média de cpm com células tratadas com meio Hanks}}$

³ ** p < 0,01; * p < 0,05 pelo teste t. Os soros com reações negativas ou insignificamente positivas não são reativos quando testados não diluídos (resultados não demonstrados).

NI- não testado.

3. CARACTERÍSTICAS DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS E SEU POTENCIAL EM DEPÓSITOS TUMORAIS.

De acordo com os resultados anteriormente apresentados, os dois anticorpos monoclonais (anti-791T/36 e anti-791T/48), preparados contra a linhagem 791T de osteossarcoma humano são reativos com proteína A de *Staphylococcus aureus*, portanto foram purificados pelo uso de Proteína A ligada a Sepharose conforme descrito em Material e Métodos. Ambos os anticorpos monoclonais purificados, através de cromatografia de afinidade (Dawood et al., 1981) e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS usando amostras não reduzidas, demonstraram apenas uma linha de precipitação proteica, imigrando na mesma região de IgG padrão. Entretanto cadeias leves e pesadas foram detectadas pela mesma análise de amostras reduzidas dos anticorpos monoclonais purificados.

O estudo das propriedades dos anticorpos monoclonais purificados e a determinação do seu potencial de localizar depósitos tumorais "in vivo" foi realizado conforme descrito em Material e Métodos.

3.1. TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-791T.

Os 2 anticorpos foram titulados contra células de osteossarcoma 791T pelo ensaio de radioligação imune às células, utilizando o reagente de proteína A-¹²⁵I .

Os resultados obtidos e apresentados na Figura 3 demonstraram que os dois anticorpos monoclonais exibem reações positivas com as células alvo de 791T, em concentrações maiores a 10ng/ml. Entretanto o nível de radioligação observado com anti-791T/36 foi consideravelmente maior do que o mesmo observado com anti-791T/48.

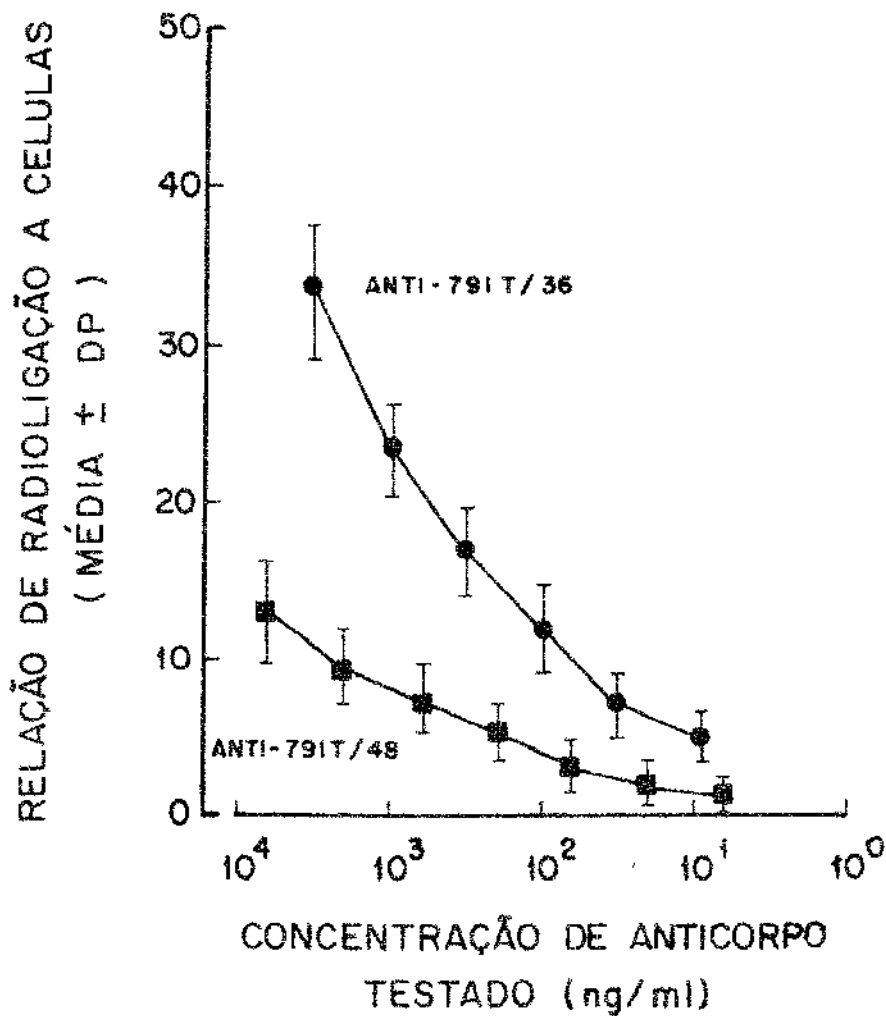


Figura 3. Titulação de anti-791T/36 e anti-791T/48 pelo ensaio de radioligação a células de 791T.

3.2. DETERMINAÇÃO DA SUBCLASSE DE IgG DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS.

Com o objetivo de identificar a subclasse de anti-791T/36 e anti-791T/48, preparações purificadas, dos mesmos foram adsorvidas a plástico, conforme descrito em Materiais e Métodos (radioimunoensaio em fase sólida), incubadas com soro de coelho anti-subclasses de IgG de camundongo e misturadas com proteína A-¹²⁵I após a lavagem.

De acordo com resultados apresentados na figura 4, a reação predominante em ambos os casos (anti-791T/36 e anti-791T/48) foi detectada com o antissoro de coelho anti-IgG2b de camundongo. A fraca reação observada com antissoro anti-IgG2a provavelmente reflete a absorção incompleta deste antissoro cuja especificidade para IgG2a de camundongo foi definida por um teste menos sensível (imunodifusão em gel). Estes resultados demonstraram também que ambos os anticorpos monoclonais possuem cadeia leve tipo Kappa (K).

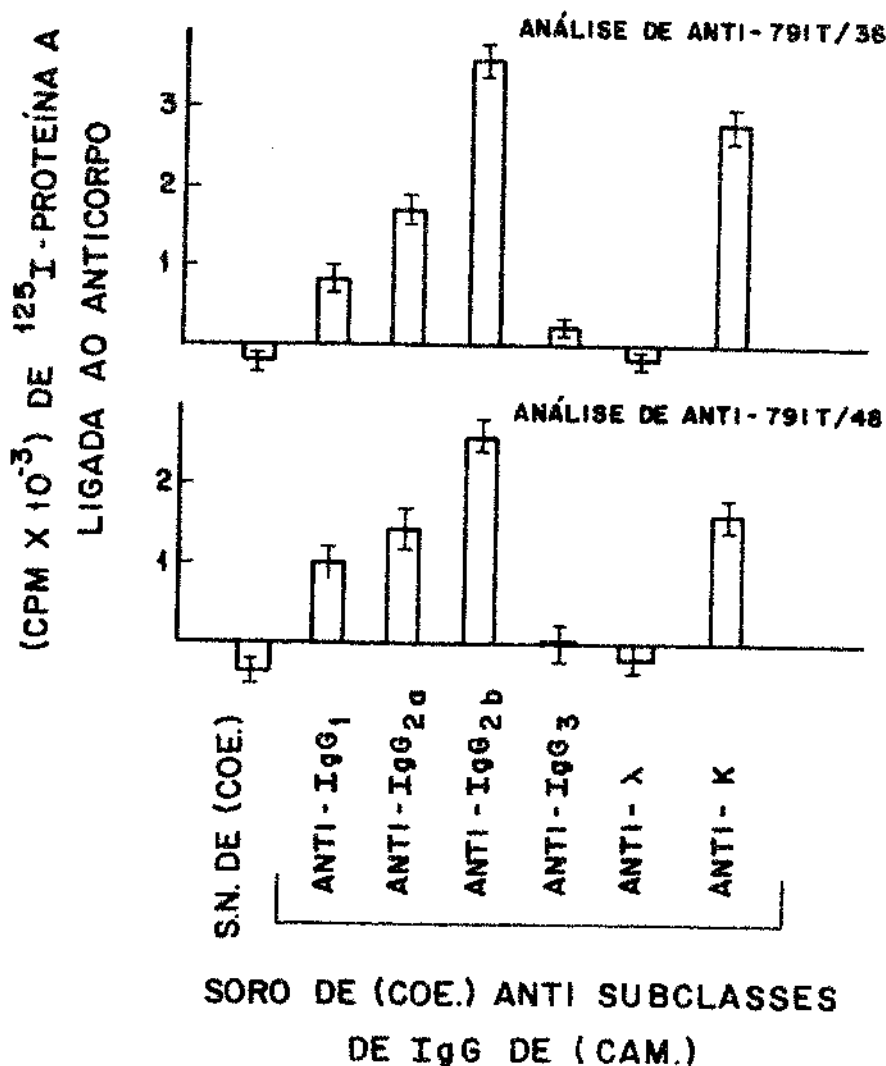


Figura 4. Determinação da subclasse de IgG de camundongo e especificidade da cadeia leve dos anticorpos monoclonais usando a proteína A-¹²⁵I em teste de ligação radioimune em fase sólida. Anticorpos monoclonais adsorvidos a plástico, foram tratados com soro normal de coelho (S.N.COE) ou soro de coelho (COE) anti-subclasses de IgG de camundongo (CAM) e soros anti-cadeias leves (diluídos 1/50). Os anticorpos de coelho foram detectados adicionando proteína A-¹²⁵I. O "background"; cpm dos anticorpos monoclonais adsorvidos + meio de cultura (sem antissoro de coelho) + proteína A-¹²⁵I, foi subtraído dos valores obtidos.

3.3. CITOTOXIDADE COMPLEMENTO DEPENDENTE DE ANTICORPOS MONO-CLONAIS.

Resultados anteriores demonstraram que a subclasse dos anticorpos é de IgG2b de camundongo. A subclasse IgG2b de camundongo é fixadora de complemento (Stanworth & Turner, 1978).

Baseando-se nessas informações a citotoxicidade complemento-dependente dos anticorpos foi estudada, com o objetivo de diferenciar entre antígenos detectados em algumas linhagens de tumores humanos, utilizando o teste de liberação de ^{51}Cr e medir o potencial dos anticorpos em termos de porcentagem de lise das células. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

Pode-se observar que a citotoxicidade em células alvo de 791T foi mediada pelos dois anticorpos (anti-791T/36 e anti-791T/48). Reações citotóxicas foram também observadas em outros alvos, que demonstraram anteriormente uma forte reatividade com esses anticorpos em testes de radiolição. Por exemplo, o anti-791T/36 foi citotóxico para todas as linhagens testadas de osteossarcoma, EB33 e HeLa, mas não para A549 e PA1. Entretanto, o nível de reatividade de anti-791T/36 foi maior que o mesmo obtido com anti-791T/48, que mostrou apenas citotoxicidade fraca mesmo na mais alta concentração testada (125 $\mu\text{g/ml}$).

Tab.10. Citotoxicidade complemento-dependente de anticorpos monoclonais anti-791T.

Células alvo		Percentagem de citotoxicidade (média + D.P.) de anticorpos monoclonais numa concentração de : ($\mu\text{g/ml}$):					
Linhagem	Tipo	791T/36			791T/48		
		125	25	5	125	25	5
791T	osteossarcoma	62 \pm 2 (1 \pm 1)	41 \pm 2	12 \pm 2	30 \pm 1 (1 \pm 0)	3 \pm 0	1 \pm 0
788T	osteossarcoma	43 \pm 1 (1 \pm 1)	25 \pm 1	20 \pm 2	27 \pm 2 (0 \pm 1)	8 \pm 0	2 \pm 1
278T	osteossarcoma	50 \pm 3 (1 \pm 1)	12 \pm 1	4 \pm 1	6 \pm 2 (0 \pm 2)	3 \pm 1	0 \pm 1
20S	osteossarcoma	32 \pm 2 (1 \pm 1)	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1 (1 \pm 0)	1 \pm 1	1 \pm 0
EB33	carcinoma de próstata	41 \pm 6 (1 \pm 1)	4 \pm 1	3 \pm 1	8 \pm 1 (1 \pm 1)	2 \pm 1	1 \pm 0
A549	carcinoma de pulmão	0 \pm 1 (0 \pm 0)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0 (0 \pm 1)	0 \pm 0	0 \pm 0
HeLa	carcinoma de cervice	45 \pm 4 (1 \pm 1)	28 \pm 2	21 \pm 2	24 \pm 6 (0 \pm 1)	8 \pm 1	1 \pm 1
PA1	carcinoma de ovário	0 \pm 1 (1 \pm 1)	0 \pm 0	0 \pm 1	0 \pm 0 (0 \pm 1)	1 \pm 1	1 \pm 1

*Os números entre parenteses representam valores de citotoxicidade determinada na presença de complemento inativado pelo calor (56 $^{\circ}$ durante 1 hora). Soro normal de coelho foi usado como fonte de complemento numa concentração máxima que não causa lise de apenas células.

3.4. QUANTIFICAÇÃO DE RADIOLIGAÇÃO IMUNE DOS ANTICORPOS A CÉLULAS DE TUMORES HUMANOS.

Preparações purificadas dos anticorpos monoclonais foram radioiodinadas com ^{125}I pelo método da clo^oramina T conforme descrito por McConahey & Dixon (1966). Anticorpos assim marcados, foram testados pela sua ligação a vários alvos de células tumorais através de teste de radioimunoensaio direto.

Resultados obtidos e exemplificados na Tabela 11 mostram que a radioligação de anti-791T/36 a células de 791T, 788T e HeLa, ocorreu com a mesma intensidade. Entretanto, as reações predominantes com anti-791T/48 foram observadas apenas em células de 791T e 788T.

Conforme demonstrado na Tabela 12, foi também observado que o pré-tratamento de células alvo da linhagem 791T com anticorpo anti-791T/36 inibiu significativamente a radioligação de anti-791T/36- ^{125}I . Semelhantemente, o pré-tratamento de células com anti-791T/48 inibiu a ligação de anticorpo anti-791T/48- ^{125}I . Entretanto pode-se observar que o pré-tratamento de células com anticorpos não marcados, anti-791T/36 ou anti-791T/48, não causou inibição cruzada entre os dois anticorpos marcados, anti-791T/48- ^{125}I ou anti-791T/36- ^{125}I respectivamente, o que indica que a radioatividade dos dois anticorpos é dirigida contra epítopos separados e distintos na superfície de células de linhagem 791T.

Tab.11. Radioimunoligação direta dos anticorpos monoclonais anti-osteossarcoma 791T.

Células alvo		Percentagem de ligação ¹ radioimune de anticorpos monoclonais- ¹²⁵ I de hibridoma:	
Linhagem Celular	Tipo de células	791T/36	791T/48
791T	osteossarcoma	100	100
788T	osteossarcoma	103	73
888T	osteossarcoma	9	
HRT 18	carcinoma de cólon	13	9
HCT 8	carcinoma de cólon	7	22
SKBr 3	carcinoma mamário	6	
A 427	carcinoma de pulmão	11	17
A 549	carcinoma de pulmão	12	26
HeLa	carcinoma de cérvix	86	31
PA1	carcinoma de ovário	0	
T24	carcinoma de bexiga	11	15
RPMI 5966	melanoma	13	12

¹Ligação de anticorpos monoclonais e várias células alvo, foi expressa como percentagem de radioligação de anticorpo anti-791T a células 791T de acordo com Loop et al. (1981).

Tab.12. Inibição de radioligação dos anticorpos monoclonais anti-791T-¹²⁵I a células 791T após o pré-tratamento das células com anticorpos não marcados.

Células alvo 791T pré-tratadas com:	Percentagem de ligação ¹ radioimune de (anticorpos monoclonais- ¹²⁵ I) de hibridoma:	
	791T/36	791T/48
Meio de cultura	100	100
P3NS1 ²	93 ± 7	97 ± 5
Anti-791T/36 ³	18 ± 2*	97 ± 4
Anti-791T/48 ³	105 ± 14	28 ± 3*
Anti-791T/36P ⁴	11 ± 2*	101 ± 4
Anti-791T/48P ⁴	NT	25 ± 2*
SC3982 ^{3,5}	104 ± 7	NT
HRT18/2/33b ^{3,6}	101 ± 5	91 ± 5

¹Ligação de anticorpos monoclonais a células 791T pré-tratadas com os mesmos, foi expressa em termos de percentagem de radioligação de anti-791T a células 791T pré-tratadas com apenas meio de cultura.

²P3NS1 - sobrenadante de cultura de tecido de mieloma de camundongo, linhagem P3NS1.

³Sobrenadante de cultura de hibridoma como foi testado sem diluição como fonte de anticorpos monoclonais.

⁴Anticorpo monoclonal purificado (P) por cromatografia de afinidade foi testado a 4 µg/10⁵ células.

⁵SC 3982 - sobrenadante de hibridoma anti-melanoma humano.

⁶HRT18/2/33b - sobrenadante de hibridoma anti-carcinoma de cólon humano.

*p < 0,01; significância de inibição da radioligação dos anticorpos monoclonais conforme realizada pelo teste t.

Em estudos de radioligação quantitativa dos anticorpos a células, concentrações crescentes de anticorpo anti-791T radioiodinado foram adicionadas a alíquotas de diferentes células tumorais (10^5 células) conforme descrito em Material e Métodos. Após incubação e lavagem, em condições pré-estabelecidas para saturação dos antígenos da superfície celular, a radioligação de anticorpos a células, foi determinada. Desses dados, o número de moléculas de anticorpo ligado a uma célula foi calculado, conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 13. Pode ser observado que houve um aumento de 10 vezes nas moléculas de anti-791T/36 ligadas/célula de 791T (22×10^5) quando comparadas com as moléculas de anticorpo anti-791T/48 (2×10^5). O número de moléculas anti-791T/48 ligadas a cada célula de outras linhagens foi também menor, que o mesmo obtido com anti-791T/36. Estes resultados estão de acordo com a reatividade dos anticorpos monoclonais descrita anteriormente no item 2.

Tab. 13. Radioligação quantitativa de anticorpos monoclonais anti-791T-125 I a células de tumores humanos.

Células alvo		Moléculas ligadas/célula ($\times 10^{-4}$) de anticorpos de hibridoma:	
Linhagens	Tipo	791T/36	791T/48
791T	osteossarcoma	220	20
788T	osteossarcoma	160	11
278T	osteossarcoma	51	4
20S	osteossarcoma	53	4
393T	osteossarcoma	4	2
HeLa	carcinoma de cervice	190	7
EB33	carcinoma de próstata	35	4

3.5. DISTRIBUIÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-791T EM DEPÓSITOS DE OSTEOSSARCOMA *IN VIVO*.

Análise da reatividade do anticorpo monoclonal anti-791T/36, mostrou que 22×10^5 moléculas se ligam a cada célula de 791T e ao longo desta investigação o anti-791T/36 revelou fortes reações com a linhagem 791T de osteossarcoma. Estes fatos sugerem que o anticorpo anti-791T/36 poderia ter um grande potencial de localização de xenoinxertos de osteossarcoma 791T em camundongos imunodeprimidos.

Para investigar esta possível localização *in vivo*, foram realizados experimentos preliminares conforme descrito em Material e Métodos. Seis camundongos com xenoinxertos subcutâneos de osteossarcoma de 10 dias foram injetados com $2 \mu\text{g}$ de anticorpo anti-791T/36 radioiodinado. O nível de radioatividade em tumores, órgãos internos e sangue desses camundongos foi determinado no 1º, 4º e 6º dia após

inoculação de anticorpo marcado. Os resultados obtidos estão resumidos na figura 5. Pode-se observar que a porcentagem de radioatividade/g do tecido tumoral determinada no 1º, 4º e 6º dia foi bem maior que a mesma determinada no sangue e em todos os outros órgãos examinados.

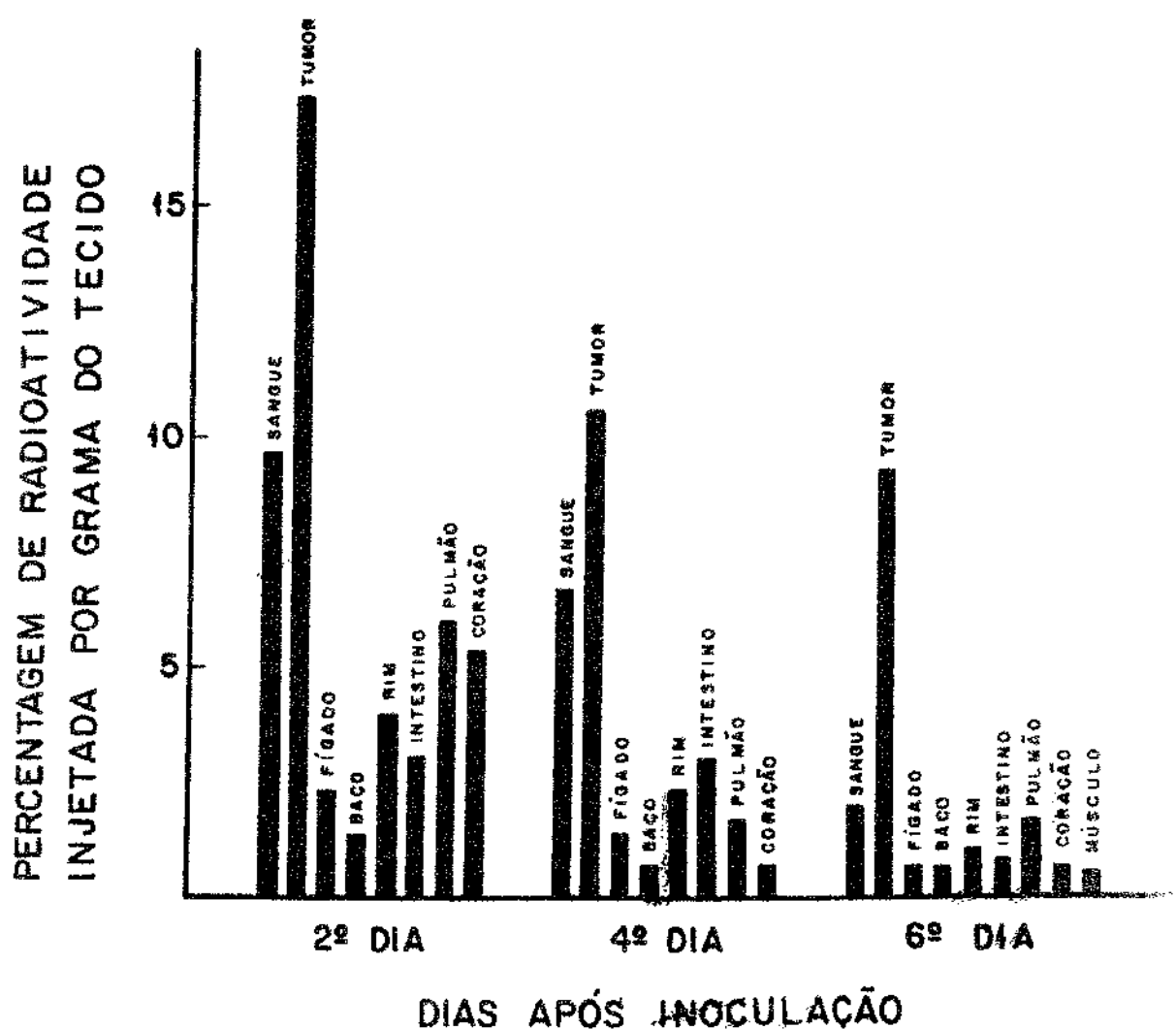


Figura 5. Distribuição de anticorpo monoclonal anti-791T/36-¹²⁵I em camundongos imunodeprimidos, com xenograftos de osteossarcoma humano 791T. Uma alíquota de 2µg de anticorpo anti-791T/36-¹²⁵I (> 91% precipitável, com 5% de ácido tricloroacético, TCA) foi injetada por via intraperitoneal em cada camundongo. Os animais foram sacrificados após 1, 4 e 6 dias e a radioatividade determinada.

Em outros experimentos, misturas de IgG normal de camundongo marcada com ^{125}I foram inoculadas em camundongos com xenoxertos de osteossarcoma 791T. A radioatividade dos 2 marcadores (^{125}I e ^{131}I) foi determinada em tumores, sangue, órgãos internos e carcaças desses animais no 39 dia de inoculação. A relação de radioatividade (tecido: sangue) foi calculada para os 2 marcadores pela simples divisão matemática de cpm de tecido sobre cpm do sangue. Os resultados obtidos estão resumidos na figura 6. Pode-se verificar que a relação tecido:sangue para os dois marcadores (^{125}I e ^{131}I) em todos os órgãos internos examinados e as carcaças são praticamente idênticas. Ao contrário, a relação tumor:sangue foi 4 vezes maior para o anticorpo monoclonal do que para IgG normal- ^{131}I , o que indica a localização preferencial do anticorpo anti-791T em osteossarcoma 791T.

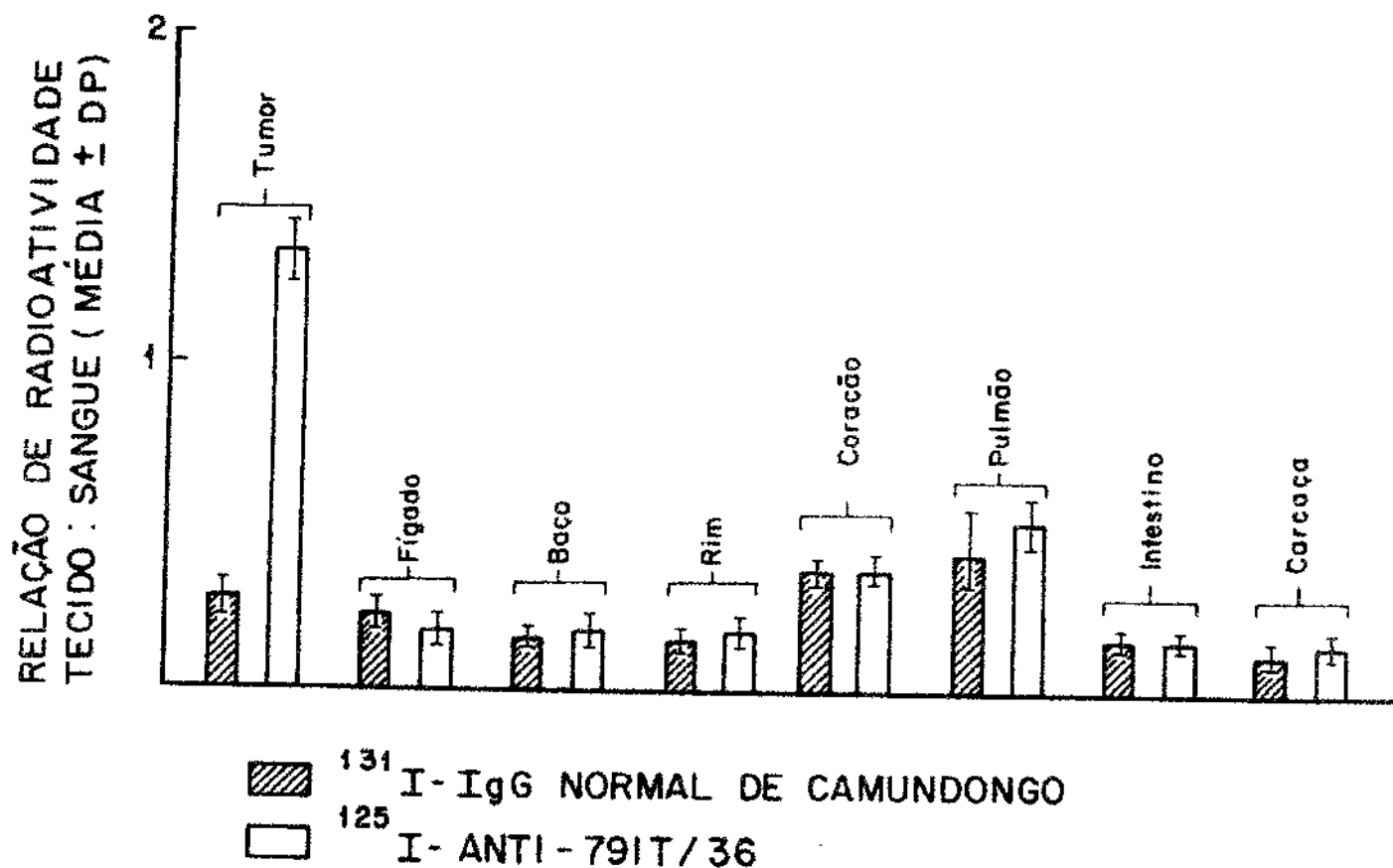


Figura 6. Distribuição de ^{131}I -IgG normal de camundongo e anticorpo monoclonal ^{125}I -anti-791T/36 (> 86 e 91% precipitáveis com 5% TCA respectivamente) em camundongos com xenoenxertos de 791T. Uma mistura de 6 μg de cada preparação foi injetada por via intraperitoneal em cada camundongo. Os animais foram sacrificados após 3 dias e a radioatividade determinada.

DISCUSSÃO.

Com o desenvolvimento da tecnologia de anticorpos monoclonais (Galfre et al., 1977), ocorre atualmente um interesse substancial na preparação de hibridomas secretores de anticorpos contra antígenos de superfície celular, associados aos tumores humanos. Já existem trabalhos sobre anticorpos monoclonais com atividades dirigidas contra: melanoma (Carrel et al., 1980; Dippold et al., 1980 ; Herlyn et al., 1980; Yeh et al., 1979), carcinoma de cólon (Herlyn et al., 1979) carcinoma mamário (Scholom et al. , 1980), neuroblastoma (Kennet e Gilbert, 1979) e leiomiossarcoma (Deng et al., 1981).

No presente trabalho, foi realizada a preparação de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (anti-791T/36/clone 3 e anti-791T/48/clone 15). Dois anticorpos monoclonais denominados como anti-791T/36 e anti-791T/48 foram obtidos contra osteossarcoma humano, linhagem 791T, através de fusão de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados e células P3NS1 de mieloma de camundongo BALB/c. Esses anticorpos tendo reações preferenciais com células de tumores e não com células de tecido normal, demonstraram radioligação fortemente positiva com células 791T de osteossarcoma, a mesma linhagem utilizada na imunização para obtenção de hibridomas (figura 2). Entretanto, reações com fibroblastos (791SK, 860 e 870), derivados do mesmo paciente doador de osteossarcoma 791T, foram negativas. Os an

ticorpos anti-791T/36 mostraram-se altamente reativos com uma segunda linhagem de osteossarcoma 788T, fracamente reativos, com a linhagem 805T e negativos com fibroblastos da pele 788SK e 805SK, derivados dos mesmos pacientes doadores dos osteossarcomas 788T e 805T, respectivamente (Tabela 2).

Este padrão de reatividade demonstrou claramente que os anticorpos monoclonais anti-791T não são reativos contra antígenos da espécie humana (aloantígenos) tumor-associados ou antígenos de histocompatibilidade (HLA) em células de sarcoma. Contudo, não ocorreu reatividade com as outras 25 linhagens de tumores humanos crescidos em culturas (Tabela 2, 4 e 5), o que elimina qualquer hipótese destes anticorpos estarem dirigidos contra componentes do soro fetal bovino que às vezes se incorpora em membrana de células crescidas em meio de cultura contendo SFB como suprimento, conforme demonstrado por Embleton e Iype (1978) e Irie e Morton (1974).

Conforme podemos verificar na Tabela 2, hemácias obtidas de voluntários humanos, incluindo a maioria dos grupos sanguíneos, não demonstraram radioligação com anticorpos monoclonais reveláveis com ^{125}I -proteína A, o que elimina a possibilidade desses anticorpos estarem dirigidos contra antígenos do sistema ABO que eventualmente se expressam em células tumorais. Do mesmo modo, pode-se argumentar também sobre antígenos DR e de Forssman, mas a possibilidade dos anticorpos monoclonais estarem dirigidos contra

esses antígenos foi excluída pelas reações negativas obtidas com células mononucleares, tanto linfócitos quanto monócitos do sangue periférico humano de 9 doadores diferentes, e com hemácias de carneiro respectivamente. Assim, foi possível verificar a falta de reatividade dos anticorpos monoclonais anti-791T com antígenos espécie-específicos (aloantígenos), de histocompatibilidade (HLA), componentes de SFB antígenos ABO dos grupos sanguíneos, DR e Forssman. Portanto, parece certo que esses anticorpos monoclonais são dirigidos contra antígenos tumor-associados.

Contudo, os antígenos detectados por anticorpos monoclonais não são comuns entre todos os sarcomas osteogênicos testados, pelo fato de apenas 4 osteossarcomas de um grande grupo, demonstrarem reações positivas (Tab. 2, 4 e 5). Esses antígenos, também não são exclusivos da linhagem 791T de osteossarcoma, utilizada na preparação dos anticorpos monoclonais. Reações cruzadas foram verificadas em repetidos testes com algumas linhagens de células derivadas de carcinoma de cólon, pulmão, próstata e cervix. Estas reações não representam reatividade cruzada atribuída ao tecido normal desses órgãos, pelo fato das reações negativas observadas com outras 2 linhagens de carcinoma do cólon e outras 2 linhagens de carcinoma do pulmão (Tabela 2 e 4). Assim, o padrão de reatividade dos anticorpos monoclonais, sugere que os antígenos detectados, tumor-associados se expressam ao acaso na superfície das células e que não são restritos a um tipo histológico particular de tumores.

Este conceito contraria a visão dogmática de que os tumores humanos, de um certo tecido, expressam antígenos comuns (discutido por Baldwin e Embleton, 1977). Tal visão de antígenos comuns em determinado tipo histológico tumoral foi apoiada por alguns estudos iniciais com anticorpos monoclonais contra tumores humanos, relatando uma especificidade associada ao tecido que deu origem ao tumor (Koprowski et al., 1978; Steplewski et al., 1979; Yeh et al., 1979; Koprowski et al., 1979; Carrel et al., 1980). Entretanto, os resultados obtidos com os anticorpos (anti-791T / 48) confirmam os dados da expressão antigênica ao acaso (Tabela 4 e 5) e mais evidências a favor deste ponto de vista, foram obtidas das reações cruzadas com anticorpos monoclonais anti-melanoma e anti-carcinoma de cólon (Tabela 4).

De qualquer modo, percebe-se que os anticorpos monoclonais representam uma aproximação ideal para analisar o perfil antigênico de tumores sólidos humanos e o presente estudo sugere que o antígeno reconhecível por anticorpos monoclonais, poderia ser apenas um entre um grande grupo de antígenos do qual, um ou alguns podem ser expressos em qualquer tumor, independentemente do seu tipo histológico, além dos prováveis antígenos de diferenciação que poderiam ser relacionados com o próprio tipo histológico. Se isso for eventualmente provado como regra geral, tentativas de usar anticorpos monoclonais em diagnóstico e terapia de tumores humanos poderiam depender de uso de painéis de anticorpos monoclonais capazes de reconhecer uma grande variedade

de de antígenos diferentes.

O padrão diferencial de reatividade dos anticorpos monoclonais anti-791T/36 e anti-791T/48, com células derivadas de diferentes tumores (Tabela 4), demonstrou reconhecimento de epítomos diferentes em células alvo. A confirmação desse achado foi evidenciada com dados de radioligação direta de anticorpos marcados com ^{125}I (Tabela 5) demonstrando novamente padrões diferentes de reatividade de ^{125}I -anti-791T/36 e ^{125}I -anti-791T/48.

Por exemplo: de acordo com os dados obtidos com o teste indireto com ^{125}I -proteína A, o anti-791T/36 se ligou a células alvo de 2 linhagens de osteossarcoma 791T e 788T e células HeLa, mas não a células de outros alvos, inclusive de carcinoma mamário SKBr3. Por outro lado, o anti-791T/48 se ligou a células de 2 linhagens de osteossarcoma e carcinoma mamário SKBr3, mas não a células HeLa. A prova conclusiva que os anticorpos anti-791T/36 e anti-791T/48 reconhecem epítomos diferentes em células de osteossarcoma 791T e 788T, foi evidenciada pelos dados de bloqueio da reatividade de ^{125}I -anticorpos com preparação não marcadas (frios). Estes dados estabeleceram que a radioligação de ^{125}I -anti-791T/36 com células alvo, poderia ser bloqueada quando as células tumorais 791T e 788T fossem pré-incubadas com este mesmo anticorpo (anti-791T/36) mas não com 791T/48, conforme mostrado na Tabela 6. A inibição da radioligação do anticorpo (anti-791T/36) a células HeLa foi

também evidenciada, o que indica que anti-791T/36 reconhece um antígeno expresso tanto em células HeLa quanto em células de osteossarcoma 791T e 788T. Testes de inibição recíproca usando ^{125}I -anti-791T/48 (Tabela 7) demonstraram mais uma vez que a radioligação deste anticorpo poderia ser inibida pelo uso de anti-791T/48 (frio) e não pelo uso de anti-791T/36. Estes dados estabelecem, conclusivamente, que os dois anticorpos monoclonais preparados contra células de osteossarcoma 791T reconhecem 2 antígenos diferentes associados a este tumor.

Estudos anteriores de imunofluorescência da membrana celular (Byers e Johnston, 1977) utilizando soro de paciente MU e células do seu próprio tumor, do qual a linhagem 791T foi derivada, sugerem que diferentes regiões da membrana celular exibem reatividade variável. Com base nesses estudos, pode-se argumentar que este tumor é policlonal e mesmo após cultivo prolongado pode consistir de várias populações de células tumorais, o que sugere que a existência dos 2 antígenos reconhecíveis pelos 2 anticorpos monoclonais (anti-791T/36 e anti-791T/48) em células diferentes é mais provável que em uma só célula. Entretanto, não foi possível confirmar esta hipótese através de estudos recentes de análise da imunofluorescência em células 791T e 788T com anti-791T/36-fluorocromo, utilizando o aparelho FACS (fluorescence activating cell sorter), e que demonstraram reatividade uniforme da membrana celular (Robins et al., dados não publicados).

De acordo com dados detalhados obtidos no presente trabalho, o padrão da reatividade dos anticorpos monoclonais (anti-791T/36 e anti-791T/48) com células tumorais, e a falta de reatividade dos mesmos com fibroblastos da pele, derivados de doadores de osteossarcomas, sugere que esses anticorpos reconhecem antígenos tumor-associados. Uma questão relevante é se esses antígenos são também reconhecíveis imunologicamente em pacientes com osteossarcoma; i.e são capazes ou não de iniciar uma resposta imune no hospedeiro?. A solução dessa questão permanece difícil a ser determinada. No presente trabalho, foi realizada uma avaliação limitada do soro do paciente (MU), doador de osteossarcoma do qual a linhagem 791T foi derivada. Amostras deste mesmo soro tinham sido analisadas anteriormente por Eiras et al. (1980), para determinar a presença de complexos imunes circulantes através de radioligação imune de Clq, e que esses autores observaram níveis elevados de complexos imunes, no soro do paciente, obtido no 200º a 300º dia, a partir de desenvolvimento da doença. Em nosso trabalho, de acordo com dados apresentados na Tabela 9, três de cinco amostras de soro do paciente (MU) obtidas durante o primeiro ano após a remoção cirúrgica de metástase do pulmão, do qual a linhagem 791T foi derivada, demonstraram reações positivas, embora fracas, com células alvo de 791T. Entretanto, nenhum desses soros foi capaz de bloquear a radioligação de anticorpo ¹²⁵I-anti-791T/36 com células alvo de 791T e assim não houve provas conclusivas de que o paciente reconheceu imunologicamente o antígeno definido pelo anticorpo monoclonal an

ti-791T/36.

Os dados do presente trabalho, obtidos, com osteossarcoma 791T, são semelhantes aos dados obtidos com: melanoma maligno (Carrel et al., 1980; Dippold et al., 1980; Herlyn et al., 1980; Yeh et al., 1979) e carcinoma de cólon (Herlyn et al., 1979), nos quais antígenos definidos por anticorpos monoclonais derivados de hibridomas (camundongo-camundongo) se mostram tumor-relacionados e não necessariamente tumor-específicos. Além disso, mesmo que os anticorpos monoclonais tenham identificado antígenos com alto grau de especificidade para o tumor, ainda não foi estabelecido que esses antígenos são imunogênicos em pacientes de câncer. Mesmo com essas limitações, é evidente que hibridomas (camundongo-camundongo) produtores de anticorpos monoclonais são sondas de investigação de grande valor para caracterização de componentes de superfície celular de tumores.

Contudo, os antígenos tumor-associados definidos por anticorpos monoclonais são sondas valiosas, para estudar a imunobiologia de tumores e de modo pragmático os anticorpos monoclonais fornecem uma nova aproximação para direcionar agentes anti-tumor, onde ocorre depósitos tumorais. Isto já foi demonstrado em alguns estudos utilizando substâncias tóxicas (toxina diftérica e ricina) acopladas a anticorpos monoclonais reativos com antígenos tumor-associados (Gilliland et al., 1980). O potencial do u-

so de anticorpos monoclonais para depositar drogas anti-tumor foi também demonstrado pelo uso de adriamicina ligada ao anticorpo monoclonal reativo com antígenos associados a um carcinoma mamário espontâneo de rato. Este anticorpo (Gunn et al., 1980) acoplado a adriamicina pode suprimir efetivamente o crescimento tumoral em ratos (Jones et al., 1981). Neste sentido, a disponibilidade de anticorpos monoclonais, que reconhecem 2 epítomos separados em osteossarcoma 791T, fornecem oportunidade para um ataque terapêutico duplo sobre este tumor o que está sendo realizado atualmente (Embleton et al., dados não publicados).

No decorrer desta investigação, diferentes ensaios para medir o potencial de ligação dos anticorpos monoclonais anti-791T/36 e anti-791T/48 a células de diferentes linhagens tumorais, demonstraram resultados constantes. Entretanto a titulação dos 2 anticorpos purificados por cromatografia de afinidade, demonstrou que anti-791T/36 possui um potencial de ligação a células 791T bem maior que o de anti-791T/48 (figura 3), embora os 2 anticorpos são da subclasse IgG2b (figura 4). Ao contrário do ensaio de citotoxicidade complemento dependente, mediada por anticorpos monoclonais (Tabela 10), ensaios de radioligação direta ou indiretamente a células foram mais sensíveis para medir o potencial dos 2 anticorpos. De fato, com ensaio de citotoxicidade complemento-dependente, não foi possível detectar lise de células 791T em teste de anti-791T/48, em forma de sobrenadante de cultura de hibridoma ou mesmo em concentrações bai

zas de anticorpo purificado (5µg/ml).

Com o uso de ensaios de radioligação dos anticorpos marcados com ^{125}I (Tabela 11) e testes de inibição com anticorpos "frios" (Tabela 12), foi possível estabelecer que anti-791T/36 e anti-791T/48 interagem com diferentes epítomos em superfície de células 791T. Estudos recentes realizados através de citotoxicidade complemento-dependente mediada por anticorpos contra células 791T, tem demonstrado que os 2 anticorpos agem sinergicamente para produzir lise das células. Esses dados evidenciam mais uma vez que os 2 anticorpos interagem com diferentes epítomos presentes nas mesmas células e não em sub-populações separadas. Dados semelhantes foram relatados por Hellstrom et al. (1981) com anticorpos murinos anti-melanoma humano que reconhecem dois determinantes antigênicos diferentes em uma glicoproteína, p97 presente na maioria das linhagens de melanoma humano.

Na Tabela 12 podemos verificar que o anticorpo monoclonal anti-carcinoma (anti-HRT/18/33b) de cólon, reativo também com células alvo de 791T, não foi capaz de inibir a radioligação de anti-791T/36 ou anti-791T/48 a esses alvos, o que sugere que este anticorpo (anti-HRT18/2/33b) reconhece um terceiro determinante em células de osteossarcoma 791T.

Em vista do que o anticorpo anti-791T/36 possui maior reatividade com células 791T, quando comparado

com anti-791T/48 (figura 3) e um número maior de suas moléculas, em condições de saturação, se ligam por célula (Tabela 13), este anticorpo mostra um candidato melhor para ser usado em estudos de localização *in vivo* de xenoenxertos de osteossarcoma 791T em camundongos imunodeprimidos. Dados iniciais relatados nas figuras 5 e 6, demonstram que anticorpos ^{125}I -anti-791T/36 podem localizar *in vivo* o tumor correspondente. Estudos recentes (Pimm et al., dados não publicados) tem estabelecido que esta localização pode ser visualizada com cintilografia- γ do corpo inteiro. Os dados obtidos no presente trabalho são comparáveis com dados relatados por Hurwitz et al. (1979) utilizando anticorpo sintético para localizar crescimento de carcinoma do pulmão de Lewis e com dados relatados por Moshakis et al. (1981) utilizando anticorpos monoclonais contra teratocarcinoma humano, crescido em camundongos imunodeprimidos.

Contudo, as qualidades dos anticorpos monoclonais anti-791T estudados, particularmente anti-791T/36 descritas no presente trabalho poderia recomendá-los como portadores de agentes terapêuticos. Assim, mais estudos devem ser realizados para avaliar seu potencial em transporte de drogas citotóxicas e toxinas bacterianas e de plantas visando que esses procedimentos podem ter como perspectiva um início de terapia seletivamente direcionada ao tumor.

RESUMO E CONCLUSÕES

1. Dois anticorpos monoclonais (anti-791T/36 e anti-791T/48) foram preparados através de produção e clonagem de hibridomas de células somáticas de mieloma P3-NS1 de camundongo e células esplênicas de camundongos imunizados com a linhagem 791T de osteossarcoma humano.

Os clones de hibridoma produtores de anticorpos (anti-791T), conforme detectados por radioligação com ^{125}I -proteína A, foram testados a fim de verificar o modo de expressão dos antígenos detectados. Os anticorpos obtidos mostraram reações fortemente positivas com as linhagens 791T, 788T de osteossarcoma, reações fracas com algumas linhagens de outros tumores humanos e reações negativas com fibroblastos do doador da linhagem 791T e fibroblastos de outros doadores; hemácias humanas e de carneiro; e células mononucleares do sangue periférico humano.

2. A reatividade dos anticorpos monoclonais (anti-791T/36 e anti-791T/48) com antígenos de linhagens celulares de diferentes tumores humanos, e a não reatividade desses anticorpos com antígenos da espécie humana (aloantígenos), de histocompatibilidade (HLA), componentes de SFB, antígenos ABO dos grupos sanguíneos, DR e Forssman sugere que os antígenos detectados por anticorpos monoclonais são tumor-associados que se expressam ao acaso em tumores humanos independentemente do seu tipo histológico.

3. Os anticorpos monoclonais (anti-791T/36 e anti-791T/48) foram purificados a partir de sobrenadantes dos hibridomas 791T/36/3 e 791T/48/15 através de cromatografia de afinidade com proteína A-Sepharose. A subclasse dos anticorpos purificados determinada pela radioligação da fase sólida foi identificada como IgG2b com cadeia leve tipo K. Os anticorpos purificados mostraram reatividade com células da linhagem 791T em concentrações crescentes de anticorpos a partir de 10 ng/ml. Entretanto, o anticorpo 791T/36 possui potencial de ligação a células maior que o anticorpo 791T/48.

4. A reatividade dos anticorpos monoclonais, incluindo outros dois anticorpos (anti-melanoma e anti-carcinoma de cólon) foi estudada através de ensaios de radioligação direta e indireta a diferentes linhagens de células de tumores humanos. O padrão da reatividade cruzada desses anticorpos e a inibição recíproca da radioligação, mostra claramente que os anticorpos (791T/36, 791T/48 e HRT/18/2/33b) reconhecem 3 epítomos diferentes em células de osteossarcoma das linhagens 791T e 788T. A inibição da radioligação com soro do paciente doador da linhagem 791T, indica que pelo menos um desses antígenos definidos por anticorpos monoclonais não é reconhecível pelo eixo humoral do sistema imunitário do paciente.

5. A determinação quantitativa de número de moléculas de anticorpo que se ligam aos determinantes antigênicos expressos na superfície de uma célula de osteossarcoma 791T, indi

cam que o número das moléculas do antígeno definido pelo anticorpo 791T/36 está em torno de 10 vezes maior do que o mesmo definido pelo anticorpo 791T/48.

6. O estudo da distribuição do anticorpo (^{125}I -anti-791T/36) em depósitos de osteossarcoma humano, linhagem 791T, em camundongos imunossuprimidos, mostrou que este anticorpo possui a capacidade de se localizar em enxertos de tumor com um potencial bem maior do que em tecidos normais. Características deste tipo de anticorpos monoclonais poderiam recomendá-los como carreadores de agentes terapêuticos anticâncer.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELEV, G. I.; PEROVA, S. D.; KHRAMKOVA, N. I.; POSTNIKOVA, Z. A. & IRLIN, I. S. Embryonic serum alpha-globulin and its synthesis by transplantable mouse hepatomas. Transplantation, 1: 174, 1963.
- ABEYOUNIS, C. J. & MILGROM, F. A thermostable antigen characteristic for carcinogen-induced rat intestinal tumours. J. Immunol., 116: 30, 1976.
- AL-SHEIKLY, A. W.; EMBLETON, M. J. & PRICE, M. R. Detection of tumour specific antigens and alloantigens using a radioisotopic antiglobulin assay. In: Biology of the cancer cell. Amsterdam, Kugler, 1980. p. 121.
- APFFEL, C. A.; ARNASON, B. G. & PETERS, J. H. Induction of tumour immunity with tumour cells treated with iodoacetate. Nature (London), 209: 694, 1966.
- BALDWIN, R. W. Immunity to methylcholanthrene-induced tumours in inbred rats following atrophy and regression of the implanted tumours. Brit J. Cancer, 9: 652, 1955.
- BALDWIN, R. W. Tumour-specific immunity against spontaneous rat tumours. Int. J. Cancer, 1: 257, 1966.
- BALDWIN, R. W. Immunological aspects of chemical carcinogenesis. Adv. Cancer Res., 18: 1, 1973.
- BALDWIN, R. W. & BARKER, C. R. Demonstration of tumour-specific humoral antibody against aminoazo dye-induced rat hepatoma. Brit. J. Cancer, 21: 793, 1967 a.
- BALDWIN, R. W. & BARKER, C. R. Tumour-specific antigenicity of aminoazo dye-induced rat hepatomas. Int. J. Cancer, 2: 355,

1967 b.

- BALDWIN, R. W. & EMBLETON, M. J. Immunology of 2-acetylaminofluorene -induced rat mammary adenocarcinomas. Int. J. Cancer, 4: 47, 1969 a.
- BALDWIN, R. W. & EMBLETON, M. J. Immunology of spontaneously arising rat mammary adenocarcinoma. Int. J. Cancer, 4: 430, 1969 b.
- BALDWIN, R. W. & EMBLETON, M. J. Detection and isolation of tumour-specific antigen associated with a spontaneously arising rat mammary carcinoma. Int. J. Cancer, 6: 372, 1970.
- BALDWIN, R. W. & EMBLETON, M. J. Tumour-specific antigens in 2-acetylaminofluorene-induced rat hepatomas and related tumours. Israel J. Med. Sci., 7: 144, 1971 a.
- BALDWIN, R. W. & EMBLETON, M. J. Demonstration by colony inhibition methods of cellular and humoral immune reactions to tumours-specific antigens associated with aminoazo dye-induced rat hepatomas. Int. J. Cancer, 7: 17, 1971 b.
- BALDWIN, R. W. & EMBLETON, M. J. Neoantigens on spontaneous and carcinogen-induced rat tumors defined by in vitro lymphocytotoxicity assays. Int. J. Cancer, 13: 433, 1974.
- BALDWIN, R. W. & EMBLETON, M. J. Assessment of cell mediated immunity to human tumour-associated antigens. Int. Rev. Exp. Pathol., 17: 49, 1977.
- BALDWIN, R. W. & MOORE, M. Immunological tolerance to tissue antigens. Orthopaedic Hospital, Oswestry, England, 1971. p. 101.
- BALDWIN, R. W. & PIMM, M. V. Immunological adjuvants in experimental tumour immunotherapy. In: Immunopathology 7th International Symposium, Basel, Schwabe, 1977. p, 397.

- BALDWIN, R. W. & PRICE, M. R. Neoantigen expression in chemical carcinogenesis. In: Cancer: A comprehensive treatise, vol.1, Plenum Press, New York, 1975. p. 353.
- BALDWIN, R. W.; BARKER, C. R.; EMBLETON, M. J.; GLAVES, D.; MOORE, M. & PIMM, M. V. Demonstration of cell-surface antigens on chemically-induced tumours. Ann. N. Y. Acad. Sci., 177: 268, 1971 a.
- BALDWIN, R. W.; GLAVES, D.; HARRIS, J. R. & PRICE, M. R. Tumour specific antigens associated with aminoazo dye induced rat hepatomas / rate-dependent centrifugation DEAE cellulose chromatography. Transplantation Proc., 3: 1189, 1971 b.
- BALDWIN, R. W.; GLAVES, D. & PIMM, M. V. Tumour associated antigens as expressions of chemically induced neoplasia and their involvement in tumour-host interactions. In: Progress in Immunology. New York, Academic Press, 1971c. p. 907.
- BALDWIN, R. W.; GLAVES, D.; PIMM, M. V. & VOSE, B. M. Tumour specific and embryonic antigen expression of chemically induced rat tumours. Ann. Ins. Pasteur (Paris), 122: 715, 1972.
- BALDWIN, R. W.; EMBLETON, M. J.; PRICE, M. R. & VOSE, B. M. Embryonic antigen expression on experimental rat tumours. Transplantation Rev., 20: 77, 1974.
- BASOMBRÍO, M. A. Search for common antigenicities among twenty-five sarcomas induced by methylcholanthrene. Cancer Res., 30: 2458, 1970.
- BELNAP, L. P.; CLEVELAND, P. H.; COLMERAUER, M. E. M.; BARONE, R. M. & PILCH Y. H. Immunogenicity of chemically-induced murine colon cancers. Cancer Res., 39: 1174, 1979.

- BLACK, M. M. & LEIS, H. P. Cellular response to autologous breast cancer tissue. Correlation with stage and lymphoreticuloendothelial reactive. Cancer, 28: 263, 1971.
- BLOOM, E. T. Quantitative detection of cytotoxic antibodies against tumour-specific antigens of murine sarcomas induced by 3-methylcholanthrene. J. Nat. Cancer Inst., 45: 443, 1971.
- BLOOM, E. T. and HILDEMANN, W. H. Mechanisms of tumour-specific enhancement versus resistance toward a methylcholanthrene-induced murine sarcoma. Transplantation, 10: 321, 1970.
- BODDIE, A. W.; HOLMES, E. C.; ROTH, J. A. & MORTON, D. L. Inhibition of human leucocyte migration in agarose by KCl extracts of carcinoma of the lung. Int. J. Cancer, 15: 823, 1975.
- BORBERG, H.; OETTGEN, H. F.; CHOUDRY, K. & BEATTIE, E. J. Inhibition of established transplants of chemically-induced sarcomas in syngeneic mice by lymphocytes from immunized donors. Int. J. Cancer, 10: 539, 1972.
- BOYSE, E. A. A method for the production of viable cell suspensions from solid tumours. Transplantation Bull., 7: 100, 1960.
- BROWN, J. P.; KLITZMAN, J. M. & HELLSTRÖM, K. E. A microassay for antibody binding to tumour cell surface antigens using ¹²⁵I-labeled protein A from Staphylococcus aureus. J. Immunol. Meth., 15: 57, 1977.
- BROWN, J. P.; KLITZMAN, J. M.; HELLSTRÖM, I.; NOWINSKI, R. C. & HELLSTRÖM, K. E. Antibody response of mice to chemically

- induced tumours. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash), 75: 955, 1978.
- BROWN, J. P.; WRIGHT, P. W.; HART, C. E.; WOODBURY, R. G.; HELLSTRÖM, K. E. & HELLSTRÖM, I. Protein antigens of normal and malignant human cells identified by immunoprecipitation with monoclonal antibodies. J. Biol. Chem., 255: 4980, 1980.
- BUBENÍK, J.; INDROVÁ, M.; NEMCKOVÁ, S.; MALKOVSKY, M.; VON BROEN, B.; BÁLEK, V. & ANDERLIKOVA, J. Solubilized tumour associated antigens of methylcholanthrene-induced mouse sarcomas. Comparative studies by in vitro sensitization of lymph node cells, macrophage electrophoretic mobility assay and transplantation tests. Int. J. Cancer, 21: 348, 1978.
- BURDIK, J. F. & WELLS, S. A. Jr. Cross-reactivity between cell-surface antigens of different murine carcinogen-induced tumours, demonstrated by a modified isotopic antiglobulin test. J. Nat. Cancer Inst., 51: 1149, 1973 a.
- BURDIK, J. F.; COHEN, A. M. & WELLS, S. A. Jr. A simplified isotopic antiglobulin assay: detection of tumour-cell antigens. J. Nat. Cancer Inst., 14: 200, 1973 b.
- BYERS, V. S. & JOHNSTON, J. O. Antigenic differences among osteogenic sarcoma tumor cells taken from various locations in human tumors. Cancer Res., 37: 3173, 1977.
- BYERS, V. S.; LEVIN, A. S.; JOHNSTON, J. O. & HACKETT, A. J. Quantitative immunofluorescence studies of the tumor antigen-bearing cells in giant cell tumor of bone and osteogenic sarcoma. Cancer Res., 35: 2520, 1975.
- CANIVARI, S.; FOSSATI, G. & DELLA PORTA, G. Cellular immune reaction by human malignant melanoma and breast carcinoma

- cells. J. Nat. Cancer Inst., 56: 705, 1976.
- CAREY, T. E.; TAKAHASHI, T.; RESNICK, L. A.; OETTGEN, H. F. & OLD, L. J. Cell surface antigens of human malignant melanoma: Mixed hemoadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 13: 3278, 1976.
- CARREL, S.; ACOLLIA, R. S.; CARMAGNOLA, A. L. & MACH, J. P. Common human melanoma-associated antigen(s) detected by monoclonal antibodies. Cancer Res., 40: 2523, 1980.
- CLEVELAND, P. H.; MCKHANN, C. F.; JOHNSON, K. & NELSON, S. A. A microassay for humoral cytotoxicity demonstrating sublethal effects of antibody. Int. J. Cancer, 16: 417, 1974.
- CLEVELAND, P. H.; BELNAP, L. P.; KNOTTS, F. B.; NAYAK, S. K.; BAIRD, S. M. & PILCH, Y. H. Tumor-associated antigens of chemically-induced murine tumor; the emergence of MuLV and fetal antigens after serial passage in culture. Int. J. Cancer, 23: 380, 1979.
- COCHRAN, A. J.; GRANT, R. M.; SPILIG, W. G.; MACKIE, R. M.; ROSS, C. E.; HOYLE, D. E. & RUSSELL, J. M. Sensitization to tumor-associated antigens in human breast carcinoma. Int. J. Cancer, 14: 19, 1974.
- COCHRAN, A. J.; SPILIG, W. G. S.; MACKIE, R. M. & THOMAS, C. E. Postoperative depression of tumor-directed cell-mediated immunity in patients with malignant disease. Brit. Med. J., 4: 67, 1972.
- COGGIN, J. H. & ANDERSON, N. G. Cancer differentiation and embryonic antigens: Some central problems. Adv. Cancer Res., 19: 105, 1974.

- CZAJKOWSKI, N. P.; ROSENBLATT, M.; WOLF, P. L. & VASQUEZ, J.
A new method of active immunisation to autologous human
tumour tissue. Lancet, 2: 905, 1968.
- DAWOOD, F. A. M. & SILVA, A. C. Anticorpos monoclonais con-
tra carcinoma mamário espontâneo do rato. Ciência e Cul-
tura (submetido a publicação).
- DAWOOD, F. A. M.; PRICE, M. R.; EMBLETON, M. J. & BALDWIN, R. W.
Detection of human osteogenic sarcoma cell surface antigens
using radiolabelled anti-tumour monoclonal antibodies.
Brit. J. Cancer, 44: 310, 1981.
- DAWOOD, F.; EMBLETON, M. J.; PRICE, M. R.; BYERS, V. S. & BALDWIN,
R. W. Differentiation between monoclonal antibody-defined
antigens on a human osteogenic sarcoma cell line (791T).,
Bras. J. Med. Sci. (submitted).
- DELEO, A. B.; SHIKU, H.; TAKAHASHI, T.; JOHN, M. & OLD, L. J.
Cell surface antigens of chemically induced sarcomas of the
mouse. I. Murine leukemia virus-related antigens and
alloantigens on cultured fibroblasts and sarcoma cells:
Description of a unique antigen on BALB/c METH A sarcoma.
J. Exp. Med., 146: 720, 1977.
- DELEO, A. B.; SHIKU, H.; TAKAHASHI, T. & OLD, L. J. Biological
markers of neoplasia, basic and applied aspects. Elsevier,
New York, 1978. P. 25.
- DELEO, A. B.; JAY, G.; APPELLA, E.; DUBOIS, G. C.; LAW, L. W. &
OLD, L. J. Detection of a transformation-related antigen in
chemically induced sarcomas and other transformed cells of the
mouse. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 76: 2420, 1979.
- DENG, C.; EL-AWAR, N.; CICCARELLI, J.; TERASAKI, P. I.; BILLING,

- R. & LAGASSE, M. D. Cytotoxic antibody to a human leiomyosarcoma. Lancet, 1: 403, 1981.
- DIAMANDOPOULOS, G. T.; TEVETHIA, S. S.; RAPP, F. & ENDERS, J. F. Development of S and T antigens and oncogenicity in hamster embryonic cell lines exposed to SV40 (Simian Virus 40). Virology, 34: 331, 1968.
- DIPPOLD, W. G.; LLOYD, K. O.; LI, L. T. C.; IKEDA, H.; OETTGEN, H. F. & OLD, L. J. Cell surface antigens of human malignant melanoma: Definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. Proc. Nat. Acad. Sci., Washington, 77: 6114, 1980.
- ECONOMOU, G.; TAKEIKI, N. & BOONE, C. Common tumor rejection antigens in methyl-cholanthrene-induced squamous cell carcinomas of mice detected by tumor protection and a radioisotopic footpad assay. Cancer Res., 37: 37, 1977.
- EILBER, F. R. & MORTON, D. L. Sarcoma-specific antigens: Detection of complement-fixation with serum from sarcoma patients. J. Nat. Cancer Inst., 44: 651, 1970.
- EIRAS, A. S.; ROBINS, R. A.; BALDWIN, R. W. & BYERS, V. S. Circulating immune complexes in patients with bone tumours. Int. J. Cancer, 25: 735, 1980.
- EMBLETON, M. J. & BALDWIN, R. W. Tumour-related antigen specificities associated with 3-methylcholanthrene-treated rat embryo cells. Int. J. Cancer, 23: 840, 1979.
- EMBLETON, M. J. & IYPE, P. T. Surface antigens of rat liver epithelial cells grown in medium containing foetal bovine serum. Brit. J. Cancer, 38: 456, 1978.
- EMBLETON, M. J. & MIDDLE, J. G. Immune responses to naturally

- occurring rat sarcomas. Brit. J. Cancer, 43: 44, 1981.
- EMBLETON, M. J.; PRICE, M. R. & BALDWIN, R. W. Demonstration and partial purification of common melanoma-associated antigen(s). Eur. J. Cancer, 16: 575, 1980.
- FOLEY, E. J. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. Cancer Res., 13: 835 1953.
- FOSSATI, G.; COLNAGHI, M. I.; DELLA PORTA, G.; CASCINELLI, W. & VERONESI, U. Cellular and humoral immunity against human malignant melanoma. Int. J. Cancer, 8: 344, 1971.
- FRAKER, P. J. & SPECK, J. C. Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro -3a,6a-diphenylglycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun., 80: 849, 1978.
- GALFRE, G.; HOWE, S. S.; MILSTEIN, C.; BUTCHER, G. W. & HOWARD, J. C. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature (London), 266: 550, 1977.
- GILLILAND, D. G.; STEPLEWSKI, Z.; COLLIER, R. J.; MITCHELL, K. F. & KOPROWSKI, H. Antibody-directed cytotoxic agents: use of monoclonal antibody to direct the action of toxin A chains to colorectal carcinoma cells. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 77: 4539, 1980.
- GIRARDI, A. J. Prevention of SV40 virus oncogenesis in hamsters. I. Tumor resistance induced by human cells transformed by SV40. Proc. Nat. Acad. Sci., 54: 445, 1966.
- GOLD, P. & FREEDMAN, S. O. Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. J. Exp. Med., 121: 439,

1965.

- GORDON, J. Isoantigenicity of liver tumours induced by an azo dye. Brit. J. Cancer, 19: 387, 1965.
- GRANT, J. P.; BIGNER, D.D.; FISCHINGER, P. J. & BOLOGNESI, D. P. Expression of murine leukemia virus structural antigens on the surface of chemically induced murine sarcomas. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 71: 5037, 1974.
- GUNN, B.; EMBLETON, M. J.; MIDDLE, J. & BALDWIN, R. W. Monoclonal antibody against a naturally arising rat mammary carcinoma. Int. J. Cancer, 26: 325, 1980.
- HAASE, P.; COWEN, D. M.; KNOWLES, J. C. & COOPER, E. H. Evolution of dimethylhydrazine induced tumours in mice as a model system for colorectal cancer. Brit. J. Cancer, 28: 530, 1973.
- HABEL, K. Resistance of polyoma-virus immune animals to transplanted polyoma tumors. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 106: 722, 1961.
- HALLIDAY, W. J. Blocking effect of serum from tumor-bearing animals on macrophage migration inhibition with tumor antigens. J. Immunol., 106: 855, 1971.
- HALLIDAY, W. J. & MILLER, S. Leukocyte adherence inhibition: A simple test for cell-mediated tumor immunity and serum blocking factors. Int. J. Cancer, 9: 477, 1972.
- HALLIDAY, W. J. & WEBB, M. Delayed hypersensitivity to chemically induced tumors in mice and correlation with an in vitro test. J. Nat. Cancer. Inst., 43: 141, 1969.
- HAMMOND, W. J.; FISHER, J. D. & ROLLEY, R. J. Tumor-specific transplantation immunity to spontaneous mouse tumors. Surgery, 62: 124, 1967.

- HARDER, F. H. & MCKHANN, C. F. Demonstration of cellular antigens on sarcoma cells by an indirect ^{125}I -labeled technique. J. Nat. Cancer Inst., 40: 231, 1968.
- HELLSTRÖM, K. E. & HELLSTRÖM, I. Cellular immunity against tumor antigens. Adv. Cancer Res., 12: 167, 1969.
- HELLSTRÖM, I.; HELLSTRÖM, K. E.; PIERCE, G. E. & FEFER, A. Studies on immunity to autochthonous mouse tumors. Transplantation Proc., 1: 90, 1969.
- HELLSTRÖM, I. & SJÖGREN, H. O. In vitro technique demonstration of humoral and cell-bound immunity against common specific transplantation antigen(s) of adenovirus 12-induced mouse and hamster tumors. J. Exp. Med., 125: 1105, 1967.
- HELLSTRÖM, I.; HELLSTRÖM, K. E. & PIERCE, G. E. In vitro studies of immune reactions against autochthonous and syngeneic mouse tumors induced by methylcholanthrene and plastic discs. Int. J. Cancer, 3: 467, 1968 a.
- HELLSTRÖM, I.; HELLSTRÖM, K. E.; PIERCE, G. E. & BILL, A. H. Demonstration of cell-bound and humoral immunity against neuroblastoma cells. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 60: 1231, 1968 b.
- HELLSTRÖM, I.; HELLSTRÖM, K. E.; SJÖGREN, H. O. & WARNER, G. A. Serum factors in tumor-free patient cancelling the blocking of cell mediated tumor immunity. Int. J. Cancer, 11: 191, 1971.
- HELLSTRÖM, I.; HELLSTRÖM, K. E. & SJÖGREN, H. O. Serum-mediated inhibition of cellular immunity to methylcholanthrene-induced murine sarcomas. Cell. Immunol., 1: 18,

1970.

- HELLSTRÖM, K. E.; HELLSTRÖM, I. & BROWN, J. P. Unique and common tumor-specific transplantation antigen of chemically induced mouse sarcomas. Int. J. Cancer, 21: 317, 1978.
- HELLSTRÖM, I.; BROWN, J. P. & HELLSTRÖM, K. E. Monoclonal antibodies to two determinants of melanoma-antigen p97 act synergistically in complement-dependent cytotoxicity. J. Immunol., 127: 157, 1981.
- HENLE, W. & HENLE, G. Epstein Barr Virus and human malignancies. Cancer, 34: (suppl.), 1368, 1974.
- HEPPNER, G. H. & PIERCE, G. In vitro demonstration of tumor-specific antigens in spontaneous mammary tumors of mice. Int. J. Cancer, 4: 212, 1969.
- HERBERMAN, R. B. & HOLDEN, H. T. Natural cell mediated immunity. Adv. Cancer Res., 27: 305, 1978.
- HERBERMAN, R. B. & OLDHAM, R. K. Problems associated with study of cell-mediated immunity to human tumors by microcytotoxicity assays. J. Nat. Cancer Inst., 55: 749, 1975.
- HERLYN, M.; STEPLEWSKI, Z.; HERLYN, D. & KOPROWSKI, H. Colorectal carcinoma-specific antigen: Detection by means of monoclonal antibodies. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 76: 1438, 1979.
- HERLYN, M.; CLARK, W. H.; MASTRANGLO, M. J.; GUERRY, D. P.; ELDER, D. E.; LAROSSA, D.; HAMILTON, R.; BONDI, E.; TUTHILL, R.; STEPLEWSKI, Z. & KOPROWSKI, H. Specific immunoreactivity of hybridoma-secreted monoclonal anti-

melanoma antibodies to cultured cells and freshly derived human cells. Cancer Res., 40: 3602, 1980.

HEWITT, H. B. The choice of animal tumors for experimental studies of cancer therapy. Adv. Cancer Res., 27: 149, 1979.

HEWITT, H. B.; BLAKE, E. R. & WALTER, A. S. A. Critique of the evidence for active host defense against cancer based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. Brit. J. Cancer, 33: 241, 1976.

HUDSON, L. & HAY, F. C. Practical Immunology, 2nd edition, Blackwell, Oxford, 1980.

HUGHES, L. E. & LYTTON, B. Antigenic properties of human tumours: Delayed cutaneous hypersensitivity reactions. Brit. Med. J., 1: 209, 1964.

HURWITZ, E.; MARON, R.; BERNSTEIN, A.; WILCHEK, M.; SELA, M. & ARNON, R. The effect in vivo of chemotherapeutic drug-antibody conjugates in two murine experimental tumor systems. Int. J. Cancer, 21: 747, 1978.

IRIE, R. F.; IRIE, K. & MORTON, D. L. Natural antibody in human serum to a neoantigen in human cultured cells growing in foetal bovine serum: J. Nat. Cancer Inst., 52: 1051, 1974.

JAMASBI, R. J. & NETTESHEIM, P. Demonstration of cross-reacting tumor rejection antigens in chemically induced respiratory tract carcinomas in rats. Cancer Res., 37: 4059, 1977.

JENSEN, F. & DEFFENDI, V. Transplantation of African green monkey kidney cells by inoculated adenovirus 7-Simian

- Virus 40 hybrid. J. Virology, 2: 173, 1968.
- JENSENIUS, J. C. & WILLIAMS, A. F. The binding of anti-globulin antibodies to rat thymocytes and thoracic duct lymphocytes. Eur. J. Immunol., 4: 91, 1974.
- JONES; J. A. BALDWIN, R. W. Immune directed therapy of a transplanted rat mammary carcinoma of spontaneous origin (Sp4). Brit. J. Cancer, 44: 297, 1981.
- KENNET, R. H. & GILBERT, F. Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain. Science, 203: 1120, 1979.
- KHERA, K. S.; ASHKENAZI, Y.; RAPP, F. & MELNICK, J. L. Immunity in hamster to cells transformed in vitro and in vivo by SV40. Tests for antigenic relationship among the papovaviruses. J. Immunol., 91: 604, 1963.
- KLEIN, G.; SJÖGREN, H. O.; KLEIN, E. & HELLSTRÖM, K. E. Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. Cancer Res., 20: 1561, 1960.
- KLEIN, G.; SJÖGREN, H. O. & KLEIN, E. Demonstration of host resistance against isograft transplantation of lymphomas induced by the gross agent. Cancer Res., 22: 955, 1962.
- KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature (London), 256: 495, 1975.
- KOPROWSKI, H.; STEPLEWSKI, Z.; HERLYN, D. & HERLYN, M. Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids. Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., 75: 3405, 1978.

- KOPROWSKI, H.; STEPLEWSKI, Z.; MITCHELL, K.; HERLYN, D.;
HERLYN, M. & FUHRER, P. Colorectal-carcinoma antigens
detected by hybridoma antibodies. Somatic Cell. Gen., 5:
957, 1979.
- LAMON, E. W. The immune response to virally determined
tumor associated antigens. Biochem. Biophys. Acta., 355:
149, 1974.
- LAUSCH, R. N.; TEVETHIA, S. S. & RAPP, F. Evidence of SV40
specific transplantation and surface antigens in cells
transformed by papa-adenovirus 12. J. Immunol., 101:
645, 1968.
- LAW, L. W.; APELLA, E. & DUBOIS, G. C. Studies of soluble
transplantation and tumour antigens. In: Cancer: A Com-
prehensive Treatise, Plenum Press, New York, 1975, p.135.
- LEFFELL, M. S. & COGGIN, J. H. & COGGIN, J. H. Jr. Common
transplantation antigens of methycolanthrene-induced
murine sarcomas detected by three assays of tumor rejection.
Cancer Res., 37: 4112, 1977.
- LEJNEVA, O. M.; ZILBER, L. A. & LEVLEVA, E. S. Humoral
antibodies to methycolanthrene sarcomata detected by
fluorescence technique. Nature (London), 206: 1163, 1965.
- LEVINE, A. S.; OXMAN, M. W.; HENRY, P. H.; LEVINE, M. J.;
DIAMANDOPOULOS, G. T. & ENDERS, J. F. Virus-specific
deoxyribonucleic acid in Simian Virus 40-exposed hamster
cells: correlation with S and T antigens. J. Virol., 6:
199, 1970.
- LEVY, N. L.; MAHALEY, M. S. & DAY, E. D. In vitro demonstra-
tion of cell-mediated immunity to human brain tumors.

Cancer Res., 32: 477, 1972.

- LEWIS, M. G. Possible immunological factors in human malignant melanoma in Uganda. Lancet, 2: 921, 1967.
- LEWIS, M. G. & PHILLIPS, T. M. Separation of two distinct tumor-associated antigens in the serum of melanoma patients. J. Nat. Cancer Inst., 49: 916, 1972.
- LEWIS, M. G. & SHEIKH, K. M. A. Evidence for tumor specific antigens in human malignant melanoma. Behring Inst.Mitt. 56: 78, 1975.
- LEWIS, M. G.; IKONOPISOV, R. L.; NAIRN, R. C.; PHILLIPS, T. M.; HAMILTON-FAIRLEY, G.; BODENHAM, D. C. & ALEXANDER, P. Tumour-specific antibodies in human malignant melanoma and their relationship to the extent of disease. Brit. Med. J. 3: 547, 1969.
- LITTLEFIELD, J. W. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science, 145: 709, 1974.
- LOOP, S. M.; NISHIYAMA, K. HELLSTROM, I.; WOODBURY, R. G.; BROWN, J. P. & HELLSTROM, K. E. Two human tumor-associated antigens, p155 and p210, detected by monoclonal antibodies. Int. J. Cancer, 27: 775, 1981.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. L.; FARR, A. L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol. Chem., 193: 265, 1951.
- MATZKU, S.; ZÖLLER, M.; SCHULZ, U.; DIETZE, W.; BARTH, H. O.; SAEGAR, H. D. & PRICE, M. R. Lack of correlation between carcinoembryonic antigen content of tumor extracts and leukocyte migration reactivity of tumor patients.

- J. Nat. Cancer Inst., 64: 1345, 1980.
- MAVLIGIT, G. M.; AMBUS, U.; GUTTERMAN, J. U. & HERSH, E. M.
Antigen solubilized from human solid tumors; lymphocyte stimulation and cutaneous delayed hypersensitivity.
Nature (New Biol.), 243: 188, 1973.
- MCCABE, R. P.; QUARANTA, U.; FRUGIY, L.; FERRONE, S. & REISFELD, R.A. A radiometric antibody-binding assay for evolution of xenoantiserum to melanoma associated antigens. J. Nat. Cancer Inst., 62: 455, 1979.
- MCCLUSKEY, R. T. & BHAN, A. K. Mechanisms of tumour immunity New York, John Wiley & Sons, 1977, P. 1.
- MCCONAHEY, P. J. & DIXON, F. J. A method of trace iodination of proteins for immunological studies. Int. Arch. Allergy, 29: 185, 1966.
- MCCOY, J. L.; JEROME, L. F.; DEAN, J. H.; PERLIN, E.; OLDHAM, R. K.; CHAR, D. H.; COHEN, M. H.; FELIX, E. & HERBERMAN, R. B. Inhibition of leukocyte migration by tumor-associated antigens in soluble extracts of human malignant melanoma. J. Nat. Cancer Inst., 55: 19, 1975.
- MCILLMURRAY, M. B.; EMBLETON, M. J.; REEVES, W. G.; LANGMAN, M. J. S. & DEANE, M. Controlled trial of active immunotherapy in management of stage II B malignant melanoma. Brit. Med. J., 1: 540, 1977.
- MIDDLE, J. G. & EMBLETON, M. J. Naturally arising tumors of the inbred WAB/Not rat strain. II. Immunogenicity of transplanted tumours. J. Nat. Cancer Inst., 67: 637, 1981.
- MINAMI, A.; MIZUSHIMA, Y.; TAKEICHI, N.; HOSOKAWA, M. & KOBAYASHI, H. Dissociation of anti-tumor responses in

- rats immunized with solubilized tumor-associated antigens from a methycolanthrene-induced fibrosarcoma. Int. J. Cancer, 23: 358, 1979.
- MOORE, M. Antigens of experimentally-induced neoplasms: A conspectus. In: Immunological aspects of cancer. Lancaster, England, MTP Press, 1978, Chapter 2, 15.
- MORTON, D. L. & MALMGREN, R. A. Human osteosarcomas: immunologic evidence suggesting an associated infectious agent. Science, 162: 1279, 1968.
- MORTON, D. L.; MALMGREN, R. A.; HOLMES, E. C. & KETCHAM, A. S. Demonstration of antibodies against human malignant melanoma by immunofluorescence. Surgery, 64: 233, 1968.
- MOSHAKIS, V.; MCILHINNEY, R. A. J.; RAGHAVAN, D. & NEVILLE, A. M. Monoclonal antibodies to detect human tumours: An experimental approach. J. Clin. Path., 34: 314, 1981.
- MÜLLER, M. Attempts to induce transplantation immunity against O-aminoazotoluene-hepatomas in syngeneic and F1 hybrid mice. Arch. Geschwulstforsch, 31: 235, 1968.
- NADLER, S. H. & MOORE, G. E. Response to injection of cultured human tumor cells. Clinical studies. Arch. Surgery (Chicago), 100: 244, 1970.
- OLD, L. J. & BOYSE, E. A. Antigens of tumors and leukemias induced by viruses. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 24: 1009, 1965.
- OLD, L. J. & STOCKERT, E. Immunogenetics of cell surface antigens of mouse leukemia. Ann. Rev. Genet., 11: 127, 1977.
- OLD, L. J.; BOYSE, E. A.; CLARKE, D. A. & CARSWELL, E.A.

- Antigenic properties of chemically induced tumours. In: Tumor immunity. Ann. N. Y. Acad. Sci., 101: 80, 1962.
- OLDHAM, R. K.; DJEU, J. Y.; CANNON, G. B.; SIWARSKI, D. & HERBERMAN, R. B. Cellular microcytotoxicity in human tumor systems: analysis of results. J. Nat. Cancer Inst. 55: 1305, 1975.
- PEARSON, G. & FREEMAN, G. Evidence suggesting a relationship between virus-induced transplantation antigens and normal embryonic antigens. Cancer Res., 28: 1665, 1968.
- PIMM, M. V.; COOK, A. J.; HOPPER, D. B.; DICKINSON, A. M. & BALDWIN, R. W. BCG treatment of transplanted rat tumours of spontaneous origin. Int. J. Cancer, 22: 426, 1978.
- POWLES, R. L.; BALCHIN, L. A.; HAMILTON-FAIRLEY, G. & ALEXANDER, P. Recognition of leukaemia cells as foreign before and after autoimmunisation. Brit. Med. J., 1: 486, 1971.
- PRATT, D. M.; SCHLOSSMAN, S. F. & STROMINGER, J. L. Human T lymphocyte surface antigens; Partial purification and characterization utilizing a high-titer heteroantiserum. J. Immunol., 124: 1449, 1980.
- PREHN, R. T. & MAIN, J. M. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. J. Nat. Cancer Inst., 18: 769, 1957.
- PRICE, M. R. A microassay for the detection of tumour specific complement dependent serum cytotoxicity against a chemically induced rat hepatoma. Transplantation, 25: 224, 1978.
- PRICE, M. R. & BALDWIN, R. W. Preparation of aminoazo dye-induced rat hepatoma membrane fractions retaining tumour specific antigen. Brit. J. Cancer, 30: 382, 1974 a.

- PRICE, M. R. & BALDWIN, R. W. Immunogenic properties of rat hepatoma subcellular fractions. Brit. J. Cancer, 30: 394, 1974 b.
- PRICE, M. R. & BALDWIN, R. W. Tumour-specific complement-dependent serum cytotoxicity against a chemically-induced rat hepatoma. Int. J. Cancer, 20: 284, 1977.
- PRICE, M. R.; PRESTON, V. E.; ROBINS, R. A.; ZÖLER, M. & BALDWIN, R. W. Induction of immunity to chemically-induced rat tumours by cellular or soluble antigens. Cancer Immunol. Immunotherapy, 3: 247, 1978.
- PRICE, M. R.; MOORE, V.E. & BALDWIN, R. W. Current trends in Tumour Immunology. New York, Garland STPM Press, 1979a. P. 187.
- PRICE, M. R.; HÖFFKEN, K. & BALDWIN, R. W. Activity of syngeneic complement for revealing antibody-induced cytotoxicity against a rat hepatoma. Transplantation, 28: 140, 1979 b.
- PRICE, M. R.; HANNANT, D.; BOWEN, J. G. & BALDWIN, R. W. Suppressor cells in rats immunized against solubilized hepatoma specific antigens. Brit. J. Cancer, 1980.
- PRICE, M. R.; PIMM, M. V.; DAWOOD; F. A. M.; EMBLETON, M. J. & BALDWIN, R. W. Characteristics and tumour localizing properties of anti-human osteogenic sarcoma monoclonal antibodies. In: Tumour Progression and Markers. Amsterdam, Kugler Press, 427, 1982.
- RAPP, F. & WESTMORLAND, D. Cell transformation by DNA-containing viruses. Biochem. Biophys. Acta., 458: 167, 1976.

- REVÉSZ, L. Detection of antigenic differences in isologous host-tumor systems by pretreatment with heavily irradiated tumor cells. Cancer Res., 20: 443, 1960.
- RISTOW, S. & MCCCKHANN, C. F. Mechanisms of tumour immunity. New York, John Wiley & Sons, 1977. P. 109.
- SCHLOM, J.; WUNDERLICH, D. & TERAMOTO, Y. A. Generation of human monoclonal antibodies reactive with human mammary carcinoma cells. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 77: 6841, 1980.
- SHEIKH, K. M.; QUISMORIO, F. P.; FRIOU, G. J. & LEE, Y. T. Ductular carcinoma of the breast: Serum antibodies to tumor-associated antigens. Cancer, 44: 2083, 1979.
- SHIKU, H. Y.; TAKAHASHI, T.; OETTGEN, H. F. & OLD, L. J. Cell surface antigens of human malignant melanoma. II. Serological typing with immune adherence assays and definition of two new surface antigens. J. Exp. Med., 144: 873, 1976.
- SHIKU, H. ; TAKAHASHI, T.; CAREY, T. E.; RESNIK, L. A.; OETTGEN, H. & OLD, L. J. Biological markers of neoplasia. Amsterdam, Elsevier North Holland Inc., 1978. P. 73.
- SIKORA, K.; KOCH, G.; BRENNER, S. & LENNOY, E. Partial purification of tumor-specific transplantation antigens from methylcholanthrene-induced murine sarcomas by immunobilized lectins. Brit. J. Cancer, 40: 831, 1979.
- SJÖGREN, H. O. & JONSSON, N. Resistance against isotransplantation of mouse tumors induced by Rous sarcoma virus. Exp. Cell Res., 32: 618, 1963.
- SJÖGREN, H. O.; HELLSTRÖM, I. & KLEIN, G. Transplantation of polyoma virus-induced tumors in mice. Cancer Res., 21: 329

1961.

- SOUTHAM, C. M.; BRUNSCHWEIG, A. & DIXON, Q. Biological interactions in normal neoplastic growth. Boston, Little Brown, 1962. P. 52.
- STANWORTH, D. R. & TURNER, M. W. Immunochemical analysis of immunoglobulins and their subunits. In: Hand book of experimental immunology. Oxford, Blackwell, 2nd ed., 1978. P. 6.
- STEELE, G. & SJÖGREN, H. O. Cross-reacting tumor-specific transplantation antigens in chemically-induced rat colon carcinomas. Cancer Res., 34: 1801, 1974.
- STEELE, G. Jr. & SJÖGREN, H. O. Cell surface antigens in a rat colon cancer model: correlation with inhibition of tumor growth. Surgery, 82: 164, 1977.
- STEELE, G.; SJÖGREN, H. O.; ROSENGREN, J. E.; LINDSTROM, G.; LARSON, A. & LEANDOER, L. Sequential studies of serum blocking activity in rats bearing chemically induced primary bowel tumors. J. Nat. Cancer Inst., 54: 959, 1975.
- STEEL, G. G.; COURTNEY, V. D. and ROSTOM, A. Y. Improved immune suppression techniques for xenografting of human tumours. Brit. J. Cancer, 37: 224, 1978.
- STEPLEWSKI, Z.; HERLYN, D; CLARK, W. H. & KOPROWSKI, H. Reactivity of monoclonal antibodies with melanoma cells freshly isolated from primary and metastatic melanoma. Eur. J. Immunol., 9: 94, 1979.
- STEWART, T. H. M. & ORIZAGA, M. The presence of delayed hypersensitivity in patients toward cellular extracts of their malignant tumors. Cancer, 28: 1472, 1971.

SUTER, L.; BLOOM, B. R.; WADSWORTH, E. M. & OETTGEN, H. F.

Use of the macrophage migration inhibition test to monitor fractionation of soluble antigens of chemically induced sarcomas of inbred guinea pigs. J. Immunol., 109: 766, 1972.

TAKASUGI, M. & KLEIN, E. A microassay for cell-mediated immunity. Transplantation, 9: 219, 1970.

TAKASUGI, M.; MICKEY, M. R. & TERASAKI, P. I. Studies of specificity of cell-mediated immunity to human tumors. J. Nat. Cancer Inst., 53: 1527, 1974.

TEVETHIA, S. S.; KATZ, M. & RAPP, F. New surface antigens in cells transformed by Simian papovavirus SV40. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119: 896, 1965.

TEVETHIA, S. S.; CROUCH, N. A.; MELNICK, J. L. & RAPP, F. Detection of specific surface antigens by colony inhibition in cells transformed by papovavirus SV40. Int. J. Cancer, 5: 176, 1970.

TING, C. C. & HERBERMAN, R. B. Detection of human antibody response to polyoma-tumor-specific cell-surface antigen. J. Nat. Cancer Inst., 44: 729, 1970.

TING, C. C. & HERBERMAN, R. B. Detection of tumor-specific cell surface antigen of Simian virus 40-induced tumors by the isotopic antiglobulin technique. Int. J. Cancer, 7: 499, 1971.

TING, C. C.; LARVIN, D. H.; TAKEMOTO, K. K.; TING, R. C. & HERBERMAN, R. B. Expression of various tumor-specific antigens in polyoma virus-induced tumors. Cancer Res., 32: 1, 1972.

TING, C. C.; ORTALDO, J. R. & HERBERMAN, R. B. Serological analysis of the antigenic specificities of Simian virus 40 transformed cells and their relationship to tumor associated transplantation antigen. J. Nat. Cancer Inst., 52: 812, 1974.

TRACEY, R. S.; WEPSIC, H. T.; ALAIMO, J. & MORRIS, H. P. Growth of transplanted rat tumors following administration of cell free tumor antigen. Cancer Res., 38: 1208, 1978.

VÁNKY, F.; STJERNSWÅRD, J. & NILSONNE, U. Cellular immunity to human sarcoma. J. Nat. Cancer Inst., 46: 1145, 1971.

VÁNKY, F.; KLEIN, E.; STJERNSWÅRD, J. & NILSONNE, U. Cellular immunity against tumor-associated antigens in humans: Lymphocyte stimulation and skin reaction. Int. J. Cancer, 14: 277, 1974.

VASA-THOMAS, K. A.; AMBROSE, K. R.; BELLOMY, B. B. & COGGIN, J. H. Characterization of immune response to spontaneous hamster lymphoma. J. Nat. Cancer Inst., 58: 1287, 1977.

WEIL, R. Viral "Tumor antigens" A novel type of mammalian regulator protein. Biochim. Biophys. Acta., 516: 301, 1978.

WEPSIC, H. T.; NICKEL, R. & ALAIMO, J. Characterization of growth properties and demonstration of the tumor-specific transplantation antigens of Morris hepatomas. Cancer Res., 36: 246, 1976.

WHITMORE, C. E.; SALERNO, R. A.; RABSTEIN, L. S.; HUEBNER, R. J. & TURNER, H. C. Tumor-virus antigen expression in chemically-induced tumor. Virus-genome-specified common antigens detected by complement fixation in mouse tumors

- induced by 3-methylcholanthrene. J. Nat. Cancer Inst., 47: 1255, 1971.
- WILLMOTT, J. N.; PIMM, M. V. & BALDWIN, R. W. C. parvum treatment of transplanted rat tumours of spontaneous origin. Int. J. Cancer, 24: 323, 1979.
- WRATHMELL, A. B. & ALEXANDER, P. Immunogenicity of a rat leukaemia of spontaneous origin. Brit. J. Cancer, 33: 181, 1976.
- WOOD, W. C. & MORTON, D. L. Host immune response to a common cell surface antigen in human sarcomas. New Engl. J. Med., 284: 569, 1971.
- WRIGTH, P. W. & LAW, L. W. Quantitative in vitro measurement of Simian virus 40 tumor-specific antigens. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 68: 973, 1971.
- YEH, M. Y.; HELLSTROM, I.; BROWN, J. P.; WARNER, G. A.; HANSEN, J. A. & HELLSTROM, K. E. Cell surface antigens of human melanoma identified by monoclonal antibody. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 76: 2927, 1979.
- ZBAR, B.; WEPSIC, H. T.; RAPP, H. J.; BORSOS, T.; KRONMAN, B. S. & CHURCHILL, W. H. Antigenic specificity of hepatomas induced in strain-2 guinea pigs by diethylnitrosamine. J. Nat. Cancer Inst., 43: 833, 1969.
- ZÖLLER, M.; PRICE, M. R. & BALDWIN, R. W. Inhibition of cell mediated cytotoxicity to chemically induced rat tumors by soluble tumour and embryo cell extracts. Int. J. Cancer, 17: 129, 1976.
- ZÖLLER, M.; MATZKU, S.; SCHULZ, U. & PRICE, M. R. Sensitization of leukocytes of cancer patients against fetal antigens:

leucocyte migration studies. J. Nat. Cancer Inst., 63:
285, 1979.