

CIUDAD SANITARIA VIRGEN DE LAS NIEVES

GRANADA

**"CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES PRODUCIDOS FRENTE A LA LÍNEA
CELULAR PRE-B: KM3"**

Trabajo presentado por Dña. **MARÍA JOSÉ GARCÍA SÁNCHEZ,**
para optar al grado de Doctora en Medicina.

Granada 26 de Abril de 1994

D. FEDERICO GARRIDO TORRES-PUCHOL, CATEDRÁTICO DE INMUNOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, JEFE DE SERVICIO DE INMUNOLOGÍA Y ANÁLISIS CLÍNICOS DE LA CIUDAD SANITARIA VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: "CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PRODUCIDOS FRENTE A LA LÍNEA CELULAR PRE-B: KM3" ha sido realizado bajo mi dirección por Dña. MARÍA JOSÉ GARCÍA SÁNCHEZ, para optar al grado de Doctora en Medicina y Cirugía.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Granada, a veintiséis de abril de mil novecientos noventa y cuatro.



Fdo. Federico Garrido Torres-Puchol

D. MIGUEL ÁNGEL LÓPEZ NEVOT, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA, FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DE INMUNOLOGÍA, SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DE LA CIUDAD SANITARIA VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: "CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PRODUCIDOS FRENTE A LA LÍNEA CELULAR PRE-B: KM3" ha sido realizado bajo mi dirección por Dña. MARÍA JOSÉ GARCÍA SÁNCHEZ, para optar al grado de Doctora en Medicina y Cirugía.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Granada, a veintiseis de abril de mil novecientos noventa y cuatro.

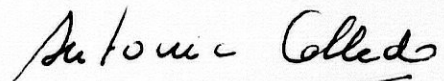


Fdo. Miguel Ángel López Nevot

Dña. ANTONIA COLLADO TORRES, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA, ADSCRITA A LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y CIRUGÍA EXPERIMENTAL DE LA CIUDAD SANITARIA VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: "CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PRODUCIDOS FRENTE A LA LÍNEA CELULAR PRE-B: KM3" ha sido realizado bajo mi dirección por Dña. MARÍA JOSÉ GARCÍA SÁNCHEZ, para optar al grado de Doctora en Medicina y Cirugía.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Granada, a veintiseis de abril de mil novecientos noventa y cuatro.



Fdo. Antonia Collado Torres

A Juan Ramón y a mis hijos Patricia y Álvaro

AGRADECIMIENTOS

La realización de la presente Tesis de Doctorado ha sido posible gracias a la inestimable colaboración desinteresada de un amplio grupo de personas, a las que deseo manifestar mi gratitud.

♣ En primer lugar, mi más sincero agradecimiento al Prof. Dr. Federico Garrido Torres-Puchol, Director de esta Tesis, por haberme ofrecido la posibilidad de introducirme en el terreno de la investigación realizando junto a él esta Tesis Doctoral.

♣ Al Dr Miguel Ángel López Nevot, Director de esta Tesis, por la dedicación, interés, paciencia e inestimable ayuda sin la cual no me hubiera sido posible realizar este trabajo.

♣ A la Dra. Antonia Collado Torres, Directora de esta Tesis, por su colaboración y excelente disposición en todo momento, de vital importancia para el desarrollo de este trabajo de investigación.

♣ Al Dr. Miguel Angel Palacio Rodriguez que de forma absolutamente desinteresada y como fruto de su amistad me ha prestado una buena parte de su tiempo para poder darle forma a esta Tesis, me ha aconsejado siempre juiciosamente y me ha animado a su finalización; motivos todos que me harán estarle siempre agradecida.

♣ A Consuelo Franco Nuñez, Técnico de Laboratorio, que en todo momento estuvo dispuesta a ofrecer su trabajo.

◆ A Berta Pérez Burckat, Licenciada en Biología, becada del FIS, por haber colaborado a la realización de buena parte de los estudios inmunohistológicos.

◆ Al Dr. Juan Ramón Galdo Abadín, gracias a su apoyo y colaboración he podido dedicar el tiempo necesario para el desarrollo y finalización de este trabajo.

◆ Al Dr. Manuel Molina Moreno, por la ayuda prestada, que considero de gran valor e importancia.

◆ Al Dr. Manuel Prieto Cuéllar, compañero de trabajo que, de forma altruista se ha brindado a realizar las correcciones finales.

◆ Y a todos los integrantes del Servicio de Inmunología y Análisis Clínicos que de alguna forma hayan podido colaborar en este trabajo de investigación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. Activación de los linfocitos B y vía de diferenciación.	5
II. Revisión histórica.	6
III. Antígenos restringidos a la superficie celular B.....	8
1. CD19: Regulador de función en células pre-B y B maduras.	8
2. CD20: Regulador de la activación celular B.	10
3. CD21: Receptor para C3d y virus Epstein-Barr.	12
4. CD22: Puente para las Ig de superficie.	15
IV. Antígenos asociados a la superficie celular B.....	16
1. CD10. Antígeno común leucocitario.....	17
2. CD23: Receptor para Ig E y Factor Soluble.	18
3. CD24.	20
4. CD37.	21
5. CD38.	23
6. CD39.	24
7. CD40: Receptor para los signos de progresión celular B.....	25
V. Otros antígenos celulares B.....	26
1. CD72.	26
2. CD73.	28

3. CD74.....	30
4. CDw75.....	31
5. CD76.....	33
6. CD77.....	35
7. CDw78.....	37
VI. Nuevos antígenos celulares B.....	38
VII. Otros marcadores celulares B.....	39
OBJETIVO.....	46
MATERIAL Y MÉTODO.....	48
1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	49
1.1. Inmunización.....	49
1.1.1. Células inmunizantes.....	49
1.1.2. Animales inmunizados.....	49
1.1.3. Protocolo de inmunización.....	49
1.2. Fusión.....	50
1.2.1. Preparación de las células para la fusión.....	53
1.2.1.1. Suspensión de esplenocitos del ratón inmunizado.....	53
1.2.1.2. La línea mielomatosa SP2.....	54
1.2.2. Técnica de hibridación con polietilenglicol.....	55

1.3. Selección de híbridos.....	56
1.4. Estudio de los sobrenadantes de los híbridos.....	57
1.5. Clonación.....	57
1.6. Congelación de hibridomas.....	59
1.7. Producción de anticuerpos monoclonales a gran escala.....	60
1.7.1. Crecimiento en frascos de cultivo.....	60
1.7.2. Obtención de ascitis.....	60
2. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	61
2.1. Titulación.....	61
2.2. Determinación del isotipo.....	61
3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MOLÉCULAS RECONOCIDAS POR LOS AcMo.....	64
3.1. Distribución celular.....	65
3.1.1. Técnica de Inmunofluorescencia indirecta.....	65
3.1.2. Análisis por citometría de flujo.....	67
3.1.3. Panel de células normales.....	67
3.1.4. Panel de células leucémicas.....	69
3.1.5. Panel de líneas celulares.....	69
3.1.6. Estudio con células transfectantes.....	70
3.2. Distribución tisular.....	70

3.3. Determinación del peso molecular de los antígenos reconocidos por los AcMo.....	74
3.3.1. Marcaje externo con ¹²⁵ I: Método de Lactoperoxidasa glucosa-oxidada.....	75
3.3.2. Lisis de células marcadas.....	75
3.3.3. Inmunoprecipitación.....	77
3.3.3.1. Inmunoprecipitación con Sefarosa-Proteína A.....	77
3.3.3.1.1. Preabsorción del lisado.....	77
3.3.3.1.2. Inmunoprecipitación.....	78
3.3.4. Electroforesis en gel de Poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE).....	78
3.3.5. Preparación del gel para la autorradiografía.....	82
3.3.5.1. Fijación del gel.....	82
3.3.5.2. Secado del gel.....	82
3.3.5.3. Autorradiografía.....	83
RESULTADOS.....	84
I. OBTENCIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	85
1.1. Resultados de la fusión.....	85
1.2. Estudio de los sobrenadantes.....	85
II. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	86
2.1. Titulación.....	86

2.2. Determinación del isotipo.....	86
III. CARACTERIZACIÓN DE LAS MOLÉCULAS RECONOCIDAS POR LOS AcMo.....	87
3.1. Distribución celular.....	87
3.1.1. Reactividad de los AcMo sobre un panel de células normales.....	88
3.1.2. Reactividad de los AcMo sobre un panel de células leucémicas.....	89
3.1.3. Reactividad de los AcMo sobre un panel de líneas celulares.....	89
3.1.4. Reactividad del AcMo GRE con células transfectantes.....	90
3.2. Distribución tisular.....	91
3.2.1. Patrón de reacción tisular del AcMo GRE.....	91
3.2.2. Patrón de reacción tisular del AcMo GRV1.....	92
IV. CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA.....	93
4.1. Patrón de inmunoprecipitación de los AcMo GRT5, GRT6, GRT7 y GRT8.....	94
4.2. Patrón de inmunoprecipitación de los anticuerpos monoclonales GRT23 y GRT24.....	94
4.3. AcMo GRE.....	95
4.4. AcMo GRV1.....	95
DISCUSIÓN.....	131
CONCLUSIONES.....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147

ABREVIATURAS

- AcMo: anticuerpo monoclonal.
- ALL: leucemia linfoblástica aguda.
- APAAP: fosfatasa antifosfatasa alcalina.
- BCGF: factor de crecimiento celular de alto peso molecular.
- BSA: albúmina humana.
- BSF-1: factor 1 estimulante de células B.
- cALLA: antígeno común de la leucemia linfode aguda.
- CD: grupo de diferenciación o *cluster* de diferenciación.
- cDNA: DNA complementario.
- CDw: grupo de diferenciación provisional.
- CLL: leucemia linfoide crónica.
- CR: receptor complementario.
- DMSO: dimetilsulfóxido.
- EBV: virus Epstein-Barr.
- EDTA: etilendiaminotetracetato.
- FACS: análisis citofluorográfico (*fluorescence, activated cell sorter*).
- Fc: fracción cristalizable.
- FCS: suero fetal de ternera.
- FITC: isocianato de fluoresceína.
- H-AZA: hipoxantina-azaserina.
- HGPRT: hipoxantina-guanidina-fosforibosil-transferasa.
- IFI: inmunofluorescencia indirecta.
- Ig: inmunoglobulina.
- Igs: inmunoglobulina de superficie.
- IL-2: interleuquina 2.
- IL-4: interleucina 4.

- IL-5: interleucina 5.
- IP: inmunoprecipitación.
- kd: kilodalton.
- LT: linfotoxina recombinante.
- MCH: medio completo de hibridoma.
- MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.
- PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida.
- PBL: linfocitos de sangre periférica.
- PBM: células mononucleares de sangre periférica.
- PBS: tampón salino de fosfatos.
- PEG: polietilenglicol.
- PHA: fitohemaglutinina A.
- PMSF: fenilmetilsulfonilfluoride.
- PWM: mitógeno *pokeweed*.
- SDS: sulfatododecil sódico.
- TBS: tampón Tris salino.
- TdT: deoxinucleotidil-transferasa-terminal.
- TEMED: N,N,N',N' tetrametilendiamino.
- TH₃: timidina tritiada.
- TNF: factor de necrosis tumoral.
- TPA: 12-O-tetradecanoil-forbol-13 acetato.

INTRODUCCIÓN

Existen una serie de moléculas presentes en la superficie celular de los linfocitos B que, a través de interacciones con otras células y con factores solubles, son capaces de regular la diferenciación y función de estos linfocitos. Dado que hemos empleado una línea de estirpe pre-B (KM3) como origen de este trabajo de investigación, seguidamente vamos a realizar una revisión sobre las moléculas de la superficie celular B.

Durante el proceso madurativo de un linfocito B, es decir, desde célula progenitora (pro B) hasta su diferenciación en célula plasmática, se producen una serie de interacciones con otras células linfoides y/o con varios tipos de células accesorias (Kincade, 1987). De tal forma que las células progenitoras del linfocito B reciben señales de las células del estroma presentes en los tejidos linfoides, lo que permite la migración hacia zonas centrales, posiblemente a través de interacción con determinados receptores específicos (Jalkanen et al., 1986).

La migración de las células maduras hasta regiones específicas de células B en los tejidos periféricos también requiere interacciones específicas (Woodruff et al., 1987; Springer et al., 1987). Finalmente, la activación de los linfocitos B en los tejidos linfoides periféricos precisa de una serie de interacciones con las células T y con otras células accesorias, como por ejemplo células dendríticas foliculares, que determinan una migración característica hacia el centro germinal y cordones medulares (Klaus y Humphrey, 1986).

Cada nueva interacción de los linfocitos B con otras células, durante su proceso de diferenciación, presumiblemente está mediado por moléculas de superficie expresadas en células B o subtipos de células B. Además, también presentan receptores específicos para varios factores solubles que regulan el proceso de diferenciación (Kishimoto, 1985; Hamoaka y Ono, 1986).

Por ello no debe sorprendernos la gran cantidad de polipéptidos de superficie que han sido identificados, exclusiva o principalmente, en la superficie de los linfocitos B humanos (Clark y Ledbeter, 1989).

La diferenciación de los linfocitos B humanos, desde su estadio de célula progenitora (*stem cell*) hasta el de célula plasmática productora de anticuerpos, atraviesa una serie de etapas bien definidas. Gracias a los AcMo es posible clasificar y definir con precisión las diferentes etapas que se suceden durante la activación, proliferación y diferenciación celular B. El conocimiento de los eventos celulares y moleculares que acontecen durante la diferenciación celular B, ofrece además la posibilidad de investigar el desarrollo de enfermedades neoplásicas con origen en las células B.

El descubrimiento de la tecnología de hibridomas para producción de anticuerpos monoclonales nos ha dotado de una de las herramientas más útiles en el campo de la investigación biológica y también de la clínica médica.

Estos anticuerpos, al ser muy específicos, son capaces de reconocer moléculas de la superficie celular y de fijarse a ellas, lo que ha hecho posible que

podamos identificar y caracterizar gran cantidad de estructuras presentes en la superficie de las células hematopoyéticas. Gracias a los anticuerpos monoclonales podemos conocer antígenos en la superficie de los leucocitos humanos, conocer sus aspectos estructurales, así como subdividirlos en diferentes poblaciones celulares, según la estructura que presenten en su superficie y, en algunos casos, también analizar la función de estas moléculas (Cabrera, 1991).

En un esfuerzo por clasificar los anticuerpos monoclonales y los antígenos que éstos definen, se han creado los talleres internacionales, el último y más reciente de los cuales fue celebrado en Boston en 1993. Gracias a este sistema se han podido clasificar diferentes grupos de diferenciación (CD) agrupando a todos aquellos anticuerpos monoclonales que poseen una reactividad similar. Cuando el grupo de diferenciación no está totalmente definido, es decir, se considera provisional, se le añade el sufijo "w" (CDw).

Las moléculas antigénicas se dividen en una serie de grandes grupos según el tipo celular al que pertenecen: antígenos celulares B, de células T, de activación, de células NK y líneas celulares no B no T, de células mieloides y de plaquetas.

Nos proponemos seguidamente realizar una descripción de la estructura y posible función de este grupo de moléculas asociado a la superficie de los linfocitos B.

I. ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS B Y VÍA DE DIFERENCIACIÓN.

Los mamíferos no poseen ningún órgano diferenciado específico para la linfopoyesis de las células B; en lugar de ello, estas células se desarrollan directamente de las células primordiales linfoides en el tejido hematopoyético del hígado fetal, lo que ocurre a partir de las 8-9 semanas de gestación en el hombre. Posteriormente se desvanece la función del hígado fetal como lugar de producción de células B, la cual se transfiere a la médula ósea, en donde continúa durante la vida adulta. El microambiente fetal es importante en la diferenciación de las células B. El marcador característico del linaje linfocitario B es la expresión de las inmunoglobulinas que actúan como receptor antigénico de la superficie celular (Lydyard y Grossi, 1991).

Las células primordiales linfoides proliferan, se diferencian y, tras los reordenamientos de los genes inmunoglobulínicos, surgen las células pre-B que expresan cadenas pesadas μ en el citoplasma (Cooper, 1981). Al sintetizar cadenas ligeras, que pueden ser bien de tipo κ ó λ , pero no de ambas, las células B pasan a expresar Ig M de superficie (célula B inmadura) y, en una siguiente etapa de la diferenciación, también pueden expresar Ig D (célula B madura). Toda esta progresión acontece sin estímulo antigénico (Alt et al., 1987). Tras la maduración de las células B, el estímulo antigénico puede conducir a que se transformen en células plasmáticas formadoras de anticuerpos. En este estadio suele desaparecer la Ig de superficie (Igs), ya que su función como receptor ha finalizado (Lydyard y Grossi, 1991).

En el Gráfico 1 y de forma esquemática quedan reflejadas las etapas en la diferenciación celular B desde su estadio de célula *stem* hasta el de célula plasmática.

Se requieren una serie de factores de crecimiento y diferenciación para impulsar a las células B a través de los estadios precoces de su desarrollo. Entre ellos se encuentra la interleucina 4 (IL-4), también llamado factor 1 estimulante de las células B (BSF-1; Paul y Ohara, 1987), que actúa conjuntamente con el antígeno permitiendo el paso de G_0 a G_1 en el ciclo celular del linfocito B maduro (O'Keefe y Pledger, 1983). Otras moléculas implicadas son la interleucina 2 y 5 (IL-2 y IL-5), factor de crecimiento celular de alto y bajo peso molecular (BCGF) (Kishimoto, 1985; Kishimoto y Hirano, 1988), linfotoxina recombinante (LT), factor de necrosis tumoral (TNF) (Kehrl et al., 1987), etc. Aunque hay algo escrito acerca del efector promotor o inhibidor de los factores solubles sobre la acción celular B (Kishimoto y Hirano, 1988), mucho menos se conoce de los signos reguladores de la diferenciación B que actúan a través de interacciones célula-célula.

II. REVISIÓN HISTÓRICA.

E.A. Boyse y L.D. Old (Boyse y Old, 1969) fueron los primeros en caracterizar lo que ellos denominaron "antígenos de diferenciación linfocitaria". En 1970 se demuestra que la presencia o ausencia de estos antígenos puede ser empleada para diferenciar subclases celulares. Takahashi et al. (1970) identifican

un aloantígeno, PC1, que es específico de las células formadoras de anticuerpos y tumores de células plasmáticas. Raff et al. (1970) demuestra en ratón que las células B expresan Igs. Posteriormente se identifica la presencia de receptores para la fracción Fc de la IgG (Dickler y Kunkel, 1972) y para la fracción C3 del complemento (Bianco et al., 1970) en las células B portadoras de Igs. Otros antígenos de diferenciación asociados a las células B son identificados mediante aloantisueros de ratón. Graves y Brown (1973) desarrollan un heteroantisero de rata frente a células humanas de leucemia linfocítica crónica (CLL). Algunos años después se define el antígeno común de la leucemia linfocítica aguda (cALLA, CD10). Simultáneamente Thomas y Phillips (1973) describen un heteroantisero frente a líneas celulares de linfoma de Burkitt. Estas aproximaciones son posteriormente empleadas por otros autores para el desarrollo de anticuerpos monoclonales (AcMo) frente a marcadores asociados con la célula B.

El primer AcMo que define un antígeno de la superficie celular fue descrito por Galfree et al. en 1977. A partir de entonces, y en un corto período de tiempo, se han definido una gran cantidad de moléculas de la superficie linfocitaria B permitiendo reconocer no sólo su estructura sino también su función.

III. ANTÍGENOS RESTRINGIDOS A LA SUPERFICIE CELULAR B.

Este grupo está definido por cuatro grupos de diferenciación (CD) que se expresan exclusivamente en células B normales y neoplásicas, con excepción de su expresión en células dendríticas foliculares.

CD19 y CD20 son antígenos celulares pan-B, es decir, aparecen a través de toda la ontogenia celular B, mientras que CD21 y CD22 se expresan en determinadas etapas.

1. CD19: Regulador de función en células pre-B y B maduras.

El antígeno CD19 definido por el anticuerpo monoclonal B4 es uno de los marcadores más ampliamente expresados en las células B (pan-B) (Sánchez-Madrid et al., 1987). Aparece ya en el precursor inmaduro del linfocito B y permanece hasta la fase de linfocito B activado. Las células progenitoras de médula ósea son CD19 negativas, por lo que este antígeno no se expresa antes del estadio pro-B de diferenciación celular (Uckun et al., 1988). Se puede distinguir su presencia en los linfocitos pre-pre B, poco después de que aparezca el antígeno MHC clase II, incluso antes de que existan cadenas μ intracitoplásmicas; permanece a lo largo de toda la ontogenia celular B y desaparece con la diferenciación en célula plasmática (Zola, 1987). Está presente en las células B aisladas de sangre periférica y órganos linfoides, en líneas celulares derivadas de células B normales y malignas, y en células

tumorales aisladas de pacientes con neoplasias de células B (Nadler et al., 1983).

El CD19 se expresa con mayor intensidad en células B activadas tanto *in vivo* (células B amigdalares) como *in vitro* con anti-Ig, proteína A, EBV ó TPA (Friedman et al., 1987). Las células pre-B en hígado fetal también expresan CD19 (Hokland et al., 1985; Uckun et al., 1988). De hecho una población de células B normales CD19 negativas no ha sido descrita todavía. Además el CD19 aparece en todas las células malignas de origen B, siendo un marcador de línea celular B más fidedigno que el CD10 (cALLA); de tal forma que la transcripción del gen μ establece el origen celular B de las ALL CD19 positivas (Nadler et al., 1983). El CD19 no está presente en células malignas de origen T, aunque en algunas leucemias monoblásticas y mieloblásticas agudas se ha podido demostrar la presencia de este antígeno, indicando probablemente que el CD19 pueda ser expresado en alguna etapa de la diferenciación monocítica.

El CD19 es una glicoproteína glicosilada con un peso molecular de 95 kDa. Sólo un epitopo o región de la molécula es reconocida por los anticuerpos monoclonales anti-CD19 (Nadler et al., 1983); esta región parece ser carbohidratada ya que el tratamiento con endoglicosidasa F elimina la reactividad para los AcMo.

Se ha aislado un DNA complementario (cDNA) que codifica una proteína de 60 kDa, miembro de la superfamilia Ig, su porción extracelular (de

273 aa) contiene dos dominios Ig, posee además, 242 aa en su región intracelular (Tedder et al., 1989).

Los AcMo para el CD19 actúan bloqueando la proliferación celular B (esta acción no depende de la fracción Fc los anticuerpos) e inhibiendo la fase precoz de activación de las células B provocada por anti-Ig (transición de G₀ a G₁ del ciclo celular) (Pezzutto et al., 1987). La actividad inhibitoria del anti-CD19 parece estar en relación con la capacidad para modular la concentración del calcio intracitoplásmico.

Aunque presenta un efecto inhibitorio sobre las células B normales, Ledbetter et al. (1988) han demostrado que el AcMo anti-CD19 B43 induce proliferación sobre progenitores de células pre-B malignas, sugiriendo que el antígeno definido por este AcMo actúa como un importante receptor que regula el crecimiento en etapas precoces del desarrollo celular B.

2. CD20: Regulador de la activación celular B.

El antígeno CD20 definido por los anticuerpos monoclonales (B1, Bp35, 1F5, etc.) es específico de los linfocitos B y fue identificado por primera vez por Stashenko et al. (1980). Se expresa en todos los linfocitos B de sangre periférica y tejidos linfoides, no apareciendo en linfocitos T maduros o activos, monocitos o células mieloides malignas.

Las células pre-B son las primeras en expresar este antígeno, de tal forma que las células pro-B expresan CD19 y CD22 antes que el antígeno que nos ocupa (Sánchez-Madrid et al., 1987). Permanece durante las fases de células B maduras y activas, siendo inaccesible durante el periodo de célula plasmática (Stashenko et al., 1981). Se ha podido demostrar la presencia de CD20 en las células B de los folículos linfoides secundarios. En algunos estudios el centro germinal de estos folículos expresa CD20 con mayor intensidad que la zona del manto (Bhan et al., 1981).

El CD20 es una fosfoproteína altamente hidrofóbica (Cettgen et al., 1983). Los linfocitos B expresan tres isoformas de esta molécula, con un predominio de la forma Mr 33.000 sobre las formas Mr 34.500 y Mr 36.000 (Tedder et al., 1987).

El CD20 tiene como función regular la activación de las células B. Clark et al (1985) demuestran que un anticuerpo monoclonal anti-CD20, el 1F5 (pero no otro AcMo anti-CD20 como es el 2H7) puede actuar como estimulante de la proliferación celular sobre las células B amígdalares. También se ha demostrado que el 1F5 provoca un incremento de la proliferación celular en la leucemia prolinfocítica (Golay et al., 1985). Este anticuerpo también origina un aumento en la expresión de receptores C3d, moléculas de la clase II del MHC y antígenos de activación tales como LB-2 (Clark et al., 1986). Todos estos resultados sugieren que la función del CD20 es la de regular etapas precoces en la activación de las células B, incluso antes de que se haya producido el estímulo antigénico (Clark y Shu, 1987). El anticuerpo monoclonal

anti-CD20 1F5 origina un aumento en la expresión del protooncogén *c-myc* detectable a las dos horas de la activación de células B (Smeland et al., 1985) y también induce el paso de G₀ a G₁ en las células B maduras, provocando un aumento en la expresión del MHC clase II (Golay et al., 1985). Otros estudios sugieren que el anticuerpo monoclonal anti-CD20 B1 inhibe la diferenciación celular B, bloqueando la proliferación inducida por anti-Ig y EBV (Golay et al., 1985; Tedder et al., 1985). Ambos AcMo (1F5 y B1) son IgG_{2a}, pero es posible que reconozcan epitopos diferentes del antígeno CD20.

Tedder et al (1988) aíslan el cDNA (DNA complementario) que codifica la molécula CD20 reconocida por el anticuerpo monoclonal B1 y la secuencia de aminoácidos correspondiente. El conocimiento de la estructura de CD20 sugiere que el antígeno que define puede generar señales transmembrana que permitan interacciones con estructuras citoplásmicas, es decir, la estructura de esta molécula es similar a la de otras proteínas que participan en los canales iónicos transmembrana. Recientemente se ha demostrado que el CD20 actúa como canal iónico para el calcio (Tedder et al., 1989).

3. CD21: Receptor para C3d y virus Epstein-Barr.

El antígeno CD21 fue identificado por primera vez gracias al AcMo B2 (Nadler et al., 1981a). Se trata de un antígeno restringido a líneas celulares B, presente en una alta proporción en células B maduras de tejido linfoide y en menor cantidad en células B de sangre periférica y médula ósea. (Nadler, 1986). Las células pre-B y células B inmaduras de médula ósea e hígado fetal no

expresan CD21, éste sólo aparece en una pequeña población de células B (25%) de bazo fetal. El 50% aproximadamente de células B de médula ósea adulta poseen CD21⁺; la mayoría de las células B de sangre periférica en recién nacido y adulto expresan CD21. No aparece en células plasmáticas, células T, células NK, eritrocitos ni mielomonocitos (Tedder et al., 1984).

Después de la activación *in vitro* de las células B con anti-Ig ó TPA, se produce la pérdida de CD21 junto con IgD (Stashenko et al., 1981; Freedman et al., 1986).

Es posible distinguir dos subpoblaciones celulares B según que expresen fenotipo CD20⁺ CD21⁺ ó CD20⁺ CD21⁻; estas subpoblaciones resultan ser funcionalmente diferentes (Anderson et al., 1985). Las células CD20⁺ CD21⁺ poseen Ig M y D en su superficie, mientras que las células CD20⁺ CD21⁻ no expresan Ig M o D pero tienen con gran frecuencia Ig G. Parece ser que CD20⁺ CD21⁻ son células B más activas y diferenciadas; la pérdida del CD21 ocurre durante la activación *in vivo*. No se detecta CD21 en células pre-B de leucemia linfóide aguda, por lo que es posible que esta molécula aparezca al mismo tiempo que las Igs.

CD21 es un receptor para el virus Epstein-Barr (EBV) y éste actúa transformando a células pro-B y pre-B (Hanson et al., 1983), por lo que el CD21 puede ser expresado en etapas precoces de la diferenciación celular B. En secciones de tejidos linfoides el CD21 aparece en la zona del manto y fuertemente en áreas del centro germinal y folículos secundarios (Bhan et al.,

1981). Esta molécula no se expresa en la mayoría de las células B malignas; aparece sólo en una pequeña subpoblación de ALL-no T, en la mayoría de las CLL y aproximadamente en la mitad de los linfomas de células B no Hodgkin (Nadler, 1986). Resulta interesante resaltar que los linfomas que expresan CD21 suelen ser pobremente diferenciados.

El Ag CD21 es una glicoproteína no fosforilada de 140 kDa (Oettgen et al., 1983). Este antígeno también ha sido identificado como receptor para la fracción C3d del complemento (Iida et al., 1983; Weis et al., 1984).

La función del CD21 ha despertado gran atención al descubrirse AcMo CD21 capaces de estimular la proliferación de las células B maduras normales (Frade et al., 1985b; Wilson et al., 1985). Pero no todos los anticuerpos monoclonales CD21 son activos; de hecho, algunos inhiben la proliferación celular B dependiente del BCGF (Perri et al., 1986). Parece que la unión cruzada con la fracción C3d del complemento sustituye la acción de los factores α dentro del ciclo celular B, permitiendo así la entrada en la fase S de dicho ciclo. Sin embargo, la fracción C3d soluble inhibe a los factores α (Melchers et al., 1985). Por todo ello, parece que el receptor específico para la fracción C3d del complemento es un receptor para los factores de crecimiento en las células B activas y, dependiendo del tipo de unión que se efectúa, funciona como factor estimulante o inhibidor del crecimiento celular B.

Parece claro que la molécula de la superficie celular B que actúa como receptor para la fracción C3d del complemento (también llamado CR2) y el

receptor para el EBV de los linfocitos B humanos , son una misma cosa (Fingerroth et al., 1984). Los distintos AcMo producidos frente a esta molécula reconocen epitopos diferentes de este receptor, que además está implicado en la división y diferenciación de las células B (Nemerow et al., 1985).

4. CD22: Puente para las Ig de superficie.

Se trata de un antígeno B específico de expresión limitada; aparece en el citoplasma desde los precursores más inmaduros (Mason et al., 1987) y en la membrana a partir de las células pre-B, es decir, es un marcador de superficie en el 60-80% de células B que son Ig⁺ (Pezzutto et al., 1987b).

Es posible diferenciar tres tipos de linfocitos B Ig M⁺ (Pezzutto et al., 1988) en sangre periférica y en amígdalas: Ig D⁺ CD22⁺, Ig D⁻ CD22⁺ e Ig D⁻ CD22⁻; después de la activación celular, la Ig D es la primera en desaparecer de la superficie celular; posteriormente lo hace el CD22 y por último la Ig M. Tras la activación *in vitro* aumenta la expresión de CD22 en la superficie celular, perdiéndose poco después cuando las células B comienzan a diferenciarse (Pezzutto et al., 1987).

El CD22 se expresa en los tejidos linfoides con la siguiente distribución: zona marginal y del manto folicular, no demostrándose su presencia en el centro germinal (Mason et al., 1986). Aparece débilmente en algunas células de LLA no-T y células B de CLL y en el 50% de linfomas de células B, siendo negativo en la macroglobulinemia de Waldenström y mieloma.

Sin embargo, se expresa fuertemente en la leucemia de células peludas y leucemia prolinfocítica (Dorkevic et al., 1986).

La molécula de CD22 es un heterodímero de 130 a 140 kDa bajo condiciones reducidas (Schwartz, 1986) y de 120 a 130 kDa en condiciones no reducidas (Bove' y Lebien, 1988). Recientemente se ha aislado el cDNA que codifica la molécula de CD22 (Stamenkovic y Seed, 1988).

En principio el CD22 parece tener como función la regulación de la proliferación celular B. Algunos AcMo CD22 promueven la síntesis de RNA y la proliferación de células B provocada por anti-Ig (Pezzutto et al., 1987 a). Determinados factores inducen a pensar que el CD22 actúa como puente para transferir una señal al citoplasma tras el entrecruzamiento de la Ig de superficie: primero, esta molécula sólo se expresa en la superficie de células B maduras; segundo, es una fosfoproteína de membrana con una cola citoplásmica que posee zonas potenciales de fosforilación; y tercero, parte de esta molécula posee gran similitud con los dominios Ig y se incluye como miembro de la superfamilia genética de las Igs (Clark y Ledbetter, 1989).

IV. ANTÍGENOS ASOCIADOS A LA SUPERFICIE CELULAR B.

En este apartado se incluyen seis grupos de diferenciación que reaccionan con células B, pero también presentan una reactividad cruzada con otras líneas celulares.

1. CD10. Antígeno común leucocitario.

Este antígeno presente en las células de la leucemia linfoblástica aguda, también denominado cALLA, fue definido por primera vez a partir de antisuero policlonal de rata (Greaves et al., 1975) y posteriormente por el AcMo J5 (Ritz et al., 1980).

Se trata de una glicoproteína de 95-100 kDa, que cuando es tratada con endoglicosidasa F/glicopeptidasa F se reduce su peso molecular a 76 kDa (Dörken et al., 1989).

Es un importante marcador de superficie para el diagnóstico de la leucemia linfoblástica aguda, y también se detecta en algunos pacientes con leucemia mielocítica crónica en crisis blástica (Ritz et al., 1980). Durante el desarrollo celular B sólo se expresa en el estadio pre-B (Loken et al., 1987).

Es posible demostrar su presencia en células del centro germinal (LeBien y McCormack, 1989), así como en sus análogos malignos (Bennett et al., 1989) y también en pacientes con mieloma de muy mal pronóstico (Durie y Grogan, 1985).

Aunque originalmente se trata de un antígeno tumoral específico, también ha sido detectado en la superficie de una amplia variedad de células normales y neoplásicas: epitelio renal, fibroblastos, granulocitos, linfomas, melanomas y líneas celulares de glioma (Hoffman-Fezer et al., 1982).

En cuanto a su función, se ha demostrado que AcMo anti-CD10 actúan inhibiendo la quimiotaxis de neutrófilos inducida por un péptido quimiotáctico producido por macrófagos, el fMLF (McCormack et al., 1986), por lo que podría tratarse de una molécula importante en la función neutrofílica.

Recientemente se ha codificado el cDNA para la proteína CD10 (Shipp et al., 1988), parece tratarse de una proteína integral de membrana tipo II; la secuencia aminoacídica deducida de este cDNA presenta una identidad del cien por cien con la endopeptidasa neutral asociada a la membrana humana, también denominada encefalinasa (Letarte et al., 1988).

2. CD23: Receptor para Ig E y Factor Soluble.

El CD23 es una proteína que regulada por IL-4 puede unirse tanto a Ig E como a un factor soluble, permitiendo así que las células B activas se dividan como parte de una respuesta inmune normal o tras la infección del EBV.

El CD23 es una glicoproteína de 45 kDa que actúa como un receptor de baja afinidad para la Ig E (Fc ϵ RII) (Yukawa et al., 1987; Bonnefoy et al., 1987). Es posible identificar dos Fc ϵ RII, a y b, que difieren en los aminoácidos terminales de la región citoplásmica. Fc ϵ RIIa se expresa en líneas celulares B y el Fc ϵ RIIb aparece en monocitos, eosinófilos y líneas celulares T. Esta última molécula puede ser inducida en células B y monocitos mediante IL-4 (Sánchez-Madrid et al., 1989).

Estudios con AcMo específicos-Fc ϵ R (Suemura et al., 1986) indican que éste es un marcador específico con expresión en determinadas etapas de la diferenciación celular B. Este antígeno aparece en células linfoblastoides y activadas. No es posible demostrar su presencia en células T o mieloides derivadas de sangre periférica, líneas celulares o neoplásicas. También aparece en células de LLC de origen B y en centros germinales de amígdalas y nódulos linfoides (Thorley-Lawön et al., 1985).

Es posible incrementar los niveles de CD23 mediante IL-4 ó Ig E (DeFrance et al., 1987). Por otra parte, también se ha podido demostrar que IL-4 aumenta el nivel de Ig E (Lee et al., 1986) con un papel fundamental en la inmunidad frente a las infecciones parasitarias. Estos resultados sugieren que la IL-4 regula la respuesta Ig E mediante su acción sobre la producción de Ig E y aumentando la producción de receptores de baja afinidad para esta Ig (Gordon y Guy, 1987).

Gordon et al. (1987) han demostrado que AcMo anti-CD23 poseen una acción BCGF y sugieren que la molécula CD23 puede ser un receptor para BCGF de bajo peso molecular. Más recientemente, Guy y Gordon (1987) encuentran que BCGF y anti-CD23 inducen una disminución en la expresión de CD23 en las células B activas. Estos estudios implican que el CD23 no sólo actúa como receptor para la Ig E y factor soluble, sino que también puede ser un receptor para BCGF.

Varios grupos investigadores han aislado y secuenciado el DNA complementario para la molécula CD23 (Kikutani et al., 1986 a; Ikuta et al., 1987). Se trata de una proteína de 321 aminoácidos con un peso molecular de 36 kDa. Presenta una gran analogía con el receptor humano para la asialoglicoproteína (Kikutani et al., 1986 b).

Recientemente Bonnefoy et al. (1988), han demostrado que el CD23 y las moléculas HLA-DR clase II se encuentran próximamente asociadas en la superficie de células B normales y líneas celulares B. Algunos AcMo específicos para HLA-DR bloquean parcialmente la unión de Ig E al CD23. Estos resultados son interesantes, ya que una molécula HLA clase II puede funcionar como un signo de transducción en células B.

3. CD24.

Se trata de una glicoproteína de 42 kDa con carácter pan-B, presente en etapas precoces del desarrollo celular B y en granulocitos. Igualmente, puede demostrarse en algunas células epiteliales amigdalares, células de neuroblastoma y nefrona fetal (Platt et al., 1983; Hsu y Jaffe, 1984). Esta molécula no aparece en células T ni en monocitos.

Células plasmáticas, de endotelio vascular y algunas leucemias mieloides y de células T expresan epitopos CD24 (Nadler 1986). Los AcMo anti-CD24 se emplean para la evaluación de células tumorales B, ya que el CD24 aparece en la mayoría de las líneas celulares B y células B malignas, con

excepción de la leucemia de células peludas (Melink y LeBien, 1983; Nadler, 1986).

Se ha sugerido que la molécula CD24 podría comportarse como un Fc y receptor; sin embargo, esta función no ha podido ser demostrada (Pirruccello y LeBien, 1986).

Parece ser que el CD24 posee varios epitopos con una expresión característica, de tal forma que el epitopo reconocido por el AcMo HB8 se expresa en mieloma, neuroblastoma y células de Sézary, el VIBE3 o epitopo b aparece en células de Sézary y neuroblastomas, y el epitopo c o VIBC5 se expresa en neuroblastomas. Tras la activación de las células B se produce la pérdida del epitopo c, con lo cual el AcMo para este epitopo no bloquea la diferenciación o coestimulación con TPA. Por el contrario, el epitopo b no desaparece tras la activación celular y el AcMo para este epitopo actúa inhibiendo la diferenciación y coestimulación con TPA (Rabinovitch et al., 1986). De cualquier forma, se necesitan más trabajos para definir exactamente la función de esta molécula.

4. CD37.

Glicoproteína de 40-52 kDa, después del tratamiento con endoglicosidasa F posee un peso molecular de 25 kDa. Este marcador se expresa fuertemente en células B maduras, líneas celulares B y células B malignas, estando ausente de los precursores celulares B y células plasmáticas.

En el tejido hematopoyético normal es posible demostrar su presencia en timocitos, neutrófilos, macrófagos, células de Langerhans y células de Kupffer. También se expresa en células de tejidos no hematopoyéticos tales como astrocitos, células de epitelio vesical y algunas neuronas.

La presencia relativamente tardía de este antígeno en la ontogenia celular B hace de él un buen marcador de célula B madura. No se encuentra en la mayoría de las ALL-no T, quizás porque las células B son más inmaduras en este tipo de leucemias. Su expresión comienza tras el estadio pre-B. Tanto las células B normales derivadas de sangre periférica, nódulos linfoideos, bazo y amígdalas, como las células B neoplásicas procedentes de leucemias B o linfomas con cadenas μ -positivas expresan CD37 (Schwartz-Albiez et al., 1988). Este antígeno desaparece en la fase terminal de la maduración celular B. Durante la estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica con PWM se produce una pérdida gradual de esta molécula; también disminuye su expresión en células de CLL mediante cultivo *in vitro* con TPA (Schwartz et al., 1986).

En los estudios con microscopía electrónica, el CD37 aparece asociado a vesículas intracelulares. Su peculiar estructura bioquímica y su distribución ultraestructural parecen relacionar esta molécula con el receptor para manosa-6-fosfato (Schwartz-Albiez et al., 1988). De cualquier forma son necesarios más estudios para comprender la función de esta molécula.

5. CD38.

Este grupo de diferenciación de anticuerpos monoclonales reconoce una glicoproteína de 45 kDa expresada en células plasmáticas y pre-B; está ausente de células B maduras. Este antígeno se expresa en timocitos y células T activadas.

Tedder et al. (1984) estudian la expresión de este antígeno en células fetales, de recién nacido y adulto, demostrando su presencia en todas las células pre-B y B fetales; en el 50% de las células B periféricas del recién nacido y de médula ósea del adulto; mientras que las células B de sangre periférica, bazo y amígdalas del adulto son positivas en escasa proporción (2-12%), reapareciendo posteriormente en el estadio de células plasmáticas. Parece ser que las células B procedentes de tejidos fetales, sangre periférica de recién nacido y médula ósea del adulto son más inmaduras que las células B del adulto (Gathings et al., 1981), lo que explica en cierto modo esta distribución antigénica.

Una posible justificación para la aparición de CD38 en fases precoces del desarrollo celular B, ausencia en células B maduras y reexpresión en células plasmáticas, podría ser que el AcMo frente a este antígeno reconozca epitopos de moléculas que aparecen en diferentes estadios de la diferenciación. El patrón discontinuo de expresión indica que este antígeno puede ser útil como marcador de diferenciación celular B, también para detectar la detención en el desarrollo celular B de enfermedades inmunodeficientes y caracterización de leucemias (Tedder et al., 1984).

Se ha aislado el cDNA para esta molécula que codifica una proteína de 301 aa, sin analogía alguna con otras secuencias proteicas (Stamenkovic y Seed, 1989).

6. CD39.

Este grupo de diferenciación fue definido en principio por tres anticuerpos monoclonales: G28-8, G28-10 y AC2. Posteriormente otros estudios han demostrado que G28-8 reconoce una glicoproteína de 90 kDa con diferente distribución celular. Por tanto los AcMo prototipos de este grupo de diferenciación son G28-10 y AC2. Estos anticuerpos reconocen una glicoproteína glicosilada de 70-100 kDa (Rowe et al., 1982), presente desde el estadio de célula B madura hasta el de célula plasmática. Expresan CD39 todas las células B de sangre periférica, algunas células B amigdalares y, débilmente, los monocitos. Las células B del manto folicular y zonas marginales de los tejidos linfoides son CD39⁺, mientras que las células B del centro germinal son CD39⁻ (Ling et al., 1987). Algunos clones de células T, células plasmáticas, macrófagos subepiteliales, células de músculo liso y endotelio también expresan CD39.

La función del CD39 se desconoce por el momento. El AcMo G28-10 anti-CD39 no estimula el flujo intracelular de calcio y tiene poco o ningún efecto sobre la inducción de proliferación o diferenciación de las células B (Clark y Ledbetter, 1989). Algunos autores (Rowe et al., 1987) sugieren que la

molécula CD39 puede ser regulada por el EBV y/o contribuir a la adhesión homotípica de células B.

7. CD40: Receptor para los signos de progresión celular B.

Los AcMo de este grupo definen una fosfoglicoproteína de 48 kDa expresada en células B maduras y células dendríticas. Este antígeno también aparece en algunas células malignas de origen no hematopoyético, melanomas y algunos carcinomas (mama, pulmón, colon), y líneas celulares carcinomatosas (Ledbetter et al., 1987d). Existen dos AcMo que reconocen el mismo epitopo (G28-5 y S2C6) y poseen una actividad similar (Gordon et al., 1987a) que parece afectar a la regulación de la proliferación celular B (Ledbetter et al., 1987 a). Los AcMo anti-CD40 actúan aumentando la proliferación de las células B activadas con anti-IgM, anti CD20 o TPA. Hay que resaltar, sin embargo, que son activos sobre células B maduras (Clark y Ledbetter, 1986a). La actividad de estos anticuerpos no depende del dominio Fc, ya que, los fragmentos F(ab')₂ del AcMo G28-5 son funcionalmente activos. Gordon et al. (1988) demuestran que la IL-4 y Ac CD40 provocan una pequeña pero significativa síntesis de DNA en células B amigdalares, que aumenta de forma importante cuando se añade BCGF.

La secuencia aminoácida de este antígeno posee una gran similitud con el receptor para el factor de crecimiento nervioso humano (Braesch-Andersen et al., 1989) y un débil pero significativo parecido con el receptor para la hormona de crecimiento humano, por lo cual se ha sugerido que la molécula CD40 actúa

como receptor para un factor soluble (Clark y Ledbetter, 1989). El antígeno CD40 y las moléculas del MHC clase II poseen muchas propiedades en común: en primer lugar, se expresan débilmente en células sanguíneas y amigdalares; en segundo lugar, la expresión de CD40 y MHC clase II aumenta en células B sanguíneas tras la activación con TPA o anti-Ig M; y por último, también aumenta su expresión en células de leucemia aguda no-B no-T después de la activación con BCGF (Ledbetter et al., 1987a).

Las propiedades de los AcMo anti-CD40 sugieren que esta molécula puede funcionar normalmente como receptor para interacciones célula-célula o como signo de crecimiento soluble. En definitiva, al tratarse de un receptor para un factor de crecimiento celular B, puede también actuar regulando el crecimiento de ciertos carcinomas humanos (Paulie et al., 1989).

V. OTROS ANTÍGENOS CELULARES B.

En este grupo se incluyen siete antígenos definidos en el penúltimo o IV Taller Internacional (Viena 1989): CD72, CD73, CD74, CDw75, CD76, CD77 y CDw78, de los que seguidamente haremos un breve resumen.

1. CD72.

Antígeno específico de la superficie celular B que presenta una estructura dimérica de 39 a 43 kDa (Moldenhauer y Schwartz, 1989). Esta

molécula ha sido definida por cuatro anticuerpos monoclonales: B6 (S-HLC2), B24 (J3-109), B64 (BV-40) y B81 (BV-41) que detectan el mismo epitopo molecular.

Se trata de un nuevo marcador pan-B que aparece en etapas precoces de la diferenciación celular, se expresa en progenitores B y leucemias pre-B (Schwartz y Stein, 1989; Campana et al., 1989), así como en células B normales inmaduras, con cadenas μ citoplásmicas negativas y en células pre-B de hígado fetal y médula ósea (Campana et al., 1989). Es frecuente su coexpresión con CD19 y antígenos mieloides (Ludwig et al., 1989). Aparece con diferente intensidad en todos los estadios de la diferenciación celular B, perdiéndose en la etapa de célula plasmática, aunque sí está presente en células pre-B y líneas celulares derivadas de linfoma de Burkitt. No reacciona con líneas celulares linfoblastoides-B y de mieloma (Möller et al., 1989).

Este antígeno se expresa fuertemente en la zona del manto folicular, centro germinal y células dendríticas reticulares y, débilmente, en células B extrafoliculares (Möller y Mielke, 1989). Los monocitos de sangre periférica, macrófagos tisulares y algunos tipos de células epiteliales también reaccionan con AcMo CD72.

AcMo CD72 inducen un moderado incremento de la incorporación de timidina-H₃ en cultivos de células B solas o en combinación con factor de crecimiento. También origina discretos cambios en la concentración intracelular de calcio. Aunque la función de esta molécula todavía no se conoce con

exactitud, parece que actúa sobre la regulación de la proliferación celular B, presumiblemente sólo en diferentes estadios de maduración (Móller et al., 1989).

2. CD73

Este grupo de diferenciación está formado por tres AcMo: B121 (1E9.28.1), B43 (AD2) y B124 (7G2.2.11) que reconocen a una proteína de 69 kDa anclada en la membrana celular: la ecto-5'-nucleotidasa (Móller et al., 1989b). Se trata de una enzima capaz de regular la captación extracelular de purinas convirtiendo los nucleótidos en moléculas transportables (Fleit et al., 1975), lo que supone una vía de escape celular cuando el metabolismo de purinas y pirimidinas está bloqueado, por ejemplo con aminopterina. La vía metabólica de las purinas parece ser importante para la maduración celular B, ya que una serie de inmunodeficiencias humanas carecen de esta enzima: agammaglobulinemia congénita o inmunodeficiencia variable común (Edwards et al., 1978; Johson et al., 1977; Thompson et al., 1979). También se detecta deficiencia en ecto-5'-nucleotidasa en otras enfermedades caracterizadas por una producción de Ig alterada: leucemia linfocítica crónica (Quagliata et al., 1974), mononucleosis infecciosa, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Salazar-González et al., 1985), y mieloma múltiple (Massaia et al., 1985).

La actividad ecto-5'-nucleotidasa muestra diferente expresión según la línea celular linfocitaria y su estadio de maduración: es mayor en linfocitos maduros que en inmaduros (Ma et al., 1982) y en sangre periférica sólo se

detecta en células B y T citotóxicas/supresoras (CD8) (Massaia et al., 1982). Aproximadamente el 80% de las células B son positivas a este antígeno y sólo el 30% de las células T. Las células B expresan mayor actividad ecto-5'-nucleotidasa que las células T, no sólo porque exista un mayor porcentaje de células positivas sino, además, porque tiene mayor actividad de enzima por célula (Thomson et al., 1987).

El enzima ecto-5'-nucleotidasa es un marcador de maduración, ya que las células B y T de sangre periférica en el adulto poseen una mayor cantidad de este enzima que timocitos y células cordonales B (Edwards et al., 1979; Bastian et al., 1984; Thompson et al., 1986). Massaia et al. (1988) demuestran que la actividad ecto-5'-nucleotidasa en células precursoras de CTL es muy alta y resulta ser un enzima importante en la activación funcional de estas células. Para definir la funcionalidad de esta molécula en los linfocitos B, Thompson y Ruedi (1988) dividen los linfocitos B de sangre periférica del adulto en dos poblaciones con actividad positiva o negativa para ecto-5'-nucleotidasa, comparando su capacidad para secretar Ig policlonal. Ambas subpoblaciones sintetizan cantidades equivalentes de Ig M en respuesta a PWM y estimulador EBV, pero la población positiva sintetiza de 8 a 26 veces más Ig G por molécula que la población negativa.

Muchos casos de leucemias de células progenitoras B y pre-B expresan antígeno CD73, mientras que todas las ALL-T son CD73 negativas. Las líneas celulares linfoblastoides transformadas por EBV y algunas de mieloma son CD73⁺, mientras que líneas celulares de linfoma de Burkitt y pre-B son CD73

negativas (Pezzutto et al., 1991); ocurre además que las líneas celulares T tampoco son activas frente a este antígeno. En el tejido linfoide los Ac CD73 se detectan en las células B del manto folicular y células reticulares dendríticas (Möller y Mielke, 1989). Fuera del tejido linfoide estos anticuerpos se unen a células mesenquimales y hepatocitos.

Los AcMo de este *grupo de diferenciación* son útiles para estudiar la extensión de ecto-5'-nucleotidasa en las poblaciones de linfocitos B y T, tanto de individuos normales como de pacientes con inmunodeficiencias. El anticuerpo B121 resulta de gran ayuda para dilucidar mecanismos en la activación celular T, permitiendo conocer el significado de la expresión reducida de este interesante antígeno de superficie celular en la funcionalidad de linfocitos inmaduros y de pacientes con patología inmunodeficiente (Ruedi et al., 1989).

3. CD74.

En este grupo de diferenciación han quedado incluidos tres anticuerpos monoclonales B73 (BU-43), B113 (BU-45) y B129 (LN2). Reconocen un antígeno de 41/35/33 kDa que corresponde a la cadena constante ("invariant") (Ii) de la molécula HLA clase II.

El antígeno CD74 se expresa de forma moderada en la superficie de células B maduras y activadas, aparece débilmente en monocitos, mientras que los granulocitos y células T son CD74 negativos (Pezzutto et al., 1989). Es

posible demostrar la presencia de esta molécula en células B neoplásicas en diferentes estadios de maduración (leucemias de células B progenitoras y células pre-B) (Dörken et al., 1989). Todas las leucemias de células T testadas carecen de este antígeno; sin embargo, algunos casos de leucemias mieloides son CD74⁺. En las secciones tisulares los anticuerpos CD74 ofrecen un patrón de unión similar a los AcMo MHC clase II, reaccionando con células B, histiocitos y células epiteliales (Epstein et al., 1984) pero, a diferencia de éstos, permanecen durante el estadio de célula plasmática (Möller y Mielke, 1989).

Intracelularmente la cadena constante está asociada a los antígenos HMC clase II y parece estar involucrada en el procesamiento y presentación antigénica (Stockinger et al., 1989).

4. CDw75.

Este grupo de AcMo es aún provisional y consta de cuatro anticuerpos: LN1 (B127), OKB4 (B139) y B118(EBV-141). El peso molecular de la proteína que reconocen no está todavía bien definido. AcMo OKB4 inmunoprecipita en una banda de 53 kDa, sin embargo Mittler et al. (1983) lo asocian a una proteína de la superficie celular de 87 kDa.

El antígeno que definen se expresa sólo en células B maduras portadoras de Igs, de tal forma que más del 95% de estos linfocitos se unen al AcMo OKB4 (Mittler et al., 1983). No se detecta en células pre-B ni en leucemias de células B con inmunoglobulina de superficie negativa, mientras

que todos los tipos de leucemias y linfomas de células B maduras expresan este antígeno (Smeland et al., 1985). La molécula CDw75 no se detecta en células B normales inmaduras ni en células pre-B de hígado fetal y médula ósea (Campana et al., 1989), indicando que su expresión durante la maduración celular B ocurre tan tarde como la Igs. Las líneas celulares derivadas del linfoma de Burkitt son fuertemente positivas para este antígeno, mientras que sólo lo expresan débilmente la mayoría de las líneas celulares linfoblastoides B transformadas por EBV (MacLennan et al., 1989). Las células neoplásicas procedentes de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple expresan fuertemente CDw75 (Gramatzki et al., 1989). Estos resultados indican que el antígeno CDw75 se pierde de la superficie celular durante el estadio terminal de la diferenciación celular.

Los Ac CDw75 reaccionan fundamentalmente con las células B del centro germinal (Knowles et al., 1984).

Algunos autores (Erikstein et al., 1989) demuestran que la expresión de CDw75 está asociada al ciclo celular : las células B estimuladas *in vitro* incrementan de forma importante la expresión de este antígeno cuando la célula se encuentra cerca de la fase G₁ del ciclo celular. También son positivos para este antígeno los precursores hemáticos de la médula ósea, células epiteliales ciliadas de los bronquios, células tubulares distales del riñón y células ductales de mama y próstata. La mayoría de las líneas celulares derivadas de epitelio, glioblastomas y astrocitomas son reactivos al CDw75 mientras que no lo son los

neuroblastomas, sarcomas y células del carcinoma pulmonar de células pequeñas (Epstein et al., 1989).

Las células T normales son positivas débilmente, mientras que todas las líneas celulares T, así como leucemias de células T y linfomas son CDw75 negativas (Dörken et al., 1989).

En definitiva, se ha demostrado que con el AcMo LN-1 se posee un valioso marcador de células B del centro germinal y sus correspondientes linfomas, siendo uno de los principales marcadores para las clasificaciones de linfomas (Lukes y Collins, 1975). Okon et al. (1985) demuestran que los linfocitos de la enfermedad de Hodgkin son positivos para este AcMo, lo que sugiere su origen en células B.

En cuanto a la función de esta molécula, parece poseer un efecto coestimulante con bajas dosis de anti- μ , ya que la captación de timidina se eleva en un 135% con Ac B41 (5 μ g/ml) y anti- μ (15 μ g/ml) comparado con anti- μ sola (Erikstein et al., 1989).

5. CD76.

Los AcMo que precipitan con esta molécula antigénica (B29 o HD66 y B74 o CRIS-4) reaccionan exclusivamente con células B del manto de folículos secundarios (Dörken et al., 1989b). Se trata de una proteína de 85/67 kDa.

El antígeno CD76 se expresa fundamentalmente en linfocitos B maduros y en algunos linfocitos T maduros. Los anticuerpos de este grupo se unen a las células B de sangre periférica y amigdalares (Pezzutto et al., 1989): el 70% de las células B periféricas CD20⁺ y el 56% de células B amigdalares CD20⁺ reaccionan con el AcMo HD66 (Möller et al., 1989c). Este antígeno no aparece en células B inmaduras, de tal forma que sólo 3 de los 26 casos testados por Pezzutto et al. (1989) sobre leucemias de células pre-B y progenitoras expresaban este antígeno. Campana et al. (1989) demuestran que la mayoría de las células B con Ig M⁺ presentan esta molécula. Las neoplasias de células B poseen una considerable heterogenicidad en cuanto a la expresión de este antígeno: todos los casos de leucemias de células peludas y promielocíticas son fuertemente positivas para CD76, mientras que sólo 9 de los 17 casos de CLL-B analizados por Möller et al. (1989) expresan débilmente este antígeno. La característica fundamental de los AcMo CD76 es su reactividad exclusiva con la zona del manto de folículos secundarios; el centro germinal es siempre negativo (MacLennan et al., 1989). Este dato apunta hacia la posibilidad de que el antígeno CD76 pueda ser expresado diferencialmente en células memoria y virginales de la zona del manto.

Es posible demostrar la presencia de este antígeno a nivel citoplásmico y, en algunos tipos celulares, el nucléolo también expresa CD76 (Möller et al., 1989c).

Los Ac CD76 reaccionan con una amplia variedad de células epiteliales glandulares (glándula salivar, pancreática, prostática, paratiroidea, sudorípara),

mucosa gastrointestinal y vesical, hepatocitos, células tubulares renales y melanocitos (Möller y Mielke, 1989).

Funcionalmente se desconoce aún que efecto originan los anticuerpos de este grupo.

6. CD77.

Se trata de una molécula antigénica presente en células B del linfoma de Burkitt pero no en células B activadas, líneas celulares linfoblastoides o linfomas de células B distintos al linfoma de Burkitt. Los AcMo CD77 (38.13 o BLA, 424/4A11 o B115, 424/3D9 o B117 y 5B5 o B120) reaccionan con una secuencia glicídica específica (globotriaosylceramide, Gb3) (Dörken et al., 1989c).

La expresión de la molécula Gb3 como marcador de superficie celular dentro del sistema hematopoyético sólo se demuestra en las células B y en determinados estadios de maduración. Esta sustancia era conocida previamente como un antígeno del grupo sanguíneo presente en los hematíes de individuos con un raro fenotipo: el p^k (Marcus et al., 1981). El AcMo 38.13 reacciona con eritrocitos, fibroblastos, linfocitos y células linfoblastoides de individuos p^k , pero no reacciona con células de personas con fenotipo P (Fellous et al., 1985).

Las líneas celulares procedentes del linfoma de Burkitt reaccionan de forma importante con los AcMo CD77, mientras que otras líneas celulares B, T

y mielomonocíticas son negativas para este antígeno. Las células B amigdalares del centro germinal son CD77⁺, no detectándose en células del manto o zona marginal (Fyte et al., 1987).

El anticuerpo 38.13 reacciona como antígeno específico en el linfoma de Burkitt y por ello se le ha denominado BLA o antígeno del linfoma de Burkitt (Wiels y Tursz, 1989). Gregory et al. (1987) han demostrado que las células procedentes de biopsias de pacientes con linfoma de Burkitt poseen un fenotipo específico: reaccionan con CD20 (marcador pan-B) y CD21 (receptor para C3d/EBV). También expresan Ig M de superficie y no Ig D y al antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda (CALLA/CD10); sin embargo, carecen de antígenos de activación celular (CD23 y CD39). Este mismo fenotipo ha sido aislado de células B situadas en el centro germinal. En algunos estudios con B115 y B117 se ha podido demostrar que una gran proporción de linfomas centroblásticos y centroblásticos/centrocíticos son positivos para el antígeno CD77 (Dörken et al., 1989), aunque con gran frecuencia se acompañan del antígeno CD23 que nunca está presente en el linfoma de Burkitt. Los linfomas centrocíticos siempre son negativos para los marcadores de superficie CALLA y BLA (Stein et al., 1984).

El AcMo B5 posee importantes implicaciones clínicas para el diagnóstico del linfoma de Burkitt y posiblemente también en el tratamiento en forma de inmunotoxina (Wiels et al., 1984).

7. CDw78.

En este *grupo* provisional se han incluido los siguientes AcMo: anti-Ba (B131) y FN4 (B123). Todavía no se ha caracterizado totalmente el peso molecular de la proteína que reconocen.

El CDw78 es un antígeno pan-B que se expresa en células B maduras e inmaduras (Dörken et al., 1989d). Uno de los anticuerpos de este *grupo*, el anti-Ba, actúa reconociendo a un antígeno de activación celular B (Kikutani et al., 1986a). Muchas células B maduras expresan Ig D e Ig M sobre su superficie celular; cuando se produce un cambio hacia otro isotipo o se transforman en células formadoras de anticuerpos, desaparece la Ig D de la superficie celular (Preud'homme, 1977). Por tanto la Ig D es un marcador de diferenciación celular B. De esta forma, las células B pueden ser divididas en tres grupos empleando anticuerpos anti-Ba y anti-Ig D: $Ba^{-}/Ig D^{+}$, $Ba^{+}/Ig D^{+}$ y $Ba^{+}/Ig D^{-}$ (Kikutani et al., 1986a); el análisis fenotípico y funcional de estas tres poblaciones demuestra que corresponden a células B maduras en reposo, células B inicialmente activadas y células B activadas, respectivamente (Kikutani y Kishimoto, 1989).

La mayoría de las células B de sangre periférica y amígdalas reaccionan con los anticuerpos CDw78; también lo hacen líneas celulares pre-B y una tercera parte de las leucemias linfoblásticas agudas (Pezzutto et al., 1989). No se ha demostrado una reactividad significativa en monocitos, granulocitos y líneas celulares mieloides. En el tejido linfóide los anticuerpos de este *grupo* se

unen preferentemente a las células B del manto folicular, mientras que la zona marginal suele ser negativa (Möller et al., 1989). Los estudios de distribución tisular demuestran que los AcMo CDw78 reaccionan con histiocitos y células epiteliales.

La función de este grupo de anticuerpos no está todavía bien definida. Para investigar la unión preferencial a células B activadas, se ha estudiado la reactividad del Ac anti-Ba *in vitro*; así, el PBL de individuos normales se cultiva con TPA o anti-Ig M más sobrenadante de cultivo de células T estimuladas con PHA. La expresión de anti-Ba ocurre en células B CD20⁺, indicando que *in vitro* el Ac anti-Ba reacciona especialmente con las células B activadas (Kikutani y Kishimoto, 1989). Este anticuerpo inhibe la proliferación celular B inducida por anti- μ y BCGF (Kikutani et al., 1989b).

Funderud et al. (1989) demuestran que el anticuerpo FN1 activa a células B en reposo y es coestimulante con anti- μ a baja concentración de anticuerpo, mientras que con concentraciones altas actúa como inhibidor.

VI. NUEVOS ANTÍGENOS CELULARES B.

Recientemente (Noviembre 1993) se ha celebrado el último Taller Internacional de Diferenciación Leucocitaria en Boston, de tal forma que, han sido definidos ocho nuevos antígenos de diferenciación en células B: CDw76, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84 y CD85 (Schlossman et

al., 1994). Seguidamente se realizará una breve descripción de estos nuevos grupos de diferenciación de células B: CDw76, previamente denominado CD76, con un peso molecular aún por determinar; CD79a, peso molecular reducido 33,40, anticuerpos monoclonales incluidos son mb-1 e Ig α ; CD79b, igual peso molecular que el anterior, reconocen esta molécula los AcMo B29 e Ig β ; CD80, peso molecular de 60, AcMo B7 y BB1; CD81, peso molecular 22, AcMo TAPA-1; CD82, peso molecular de 50-53, AcMo R2, IA4 y 4F9; CD83, 43 de peso molecular reducido y el AcMo incluido en este grupo de diferenciación es el HB15, CDw84, de 73 kD y por último el CD85, con un peso molecular de 120, 83 kD que es reconocido por los AcMo VMP-55 y GH1/75.

VII. OTROS MARCADORES CELULARES B.

Se han descrito también otros marcadores, fundamentalmente enzimas, útiles para el estudio de células B, de sus equivalentes neoplásicos y de los procesos de diferenciación. Entre éstos se incluye la deoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) (Bollum, 1979), adenosin-desaminidasa (ADA), 5'-nucleotidasa y lactato-deshidrogenasa entre otros (Blatt et al., 1980). También se expresa en células B el Fc receptor (FcR) y el receptor complementario (CR) (Kinet, 1989). La presencia de estos marcadores de superficie en las neoplasias de células B ayuda a comprender los diferentes estadios que acontecen en la diferenciación de células B normales.

Finalmente, procederemos a realizar de forma esquemática un breve resumen sobre todos los grupos de diferenciación relacionados con los linfocitos B.

En el Gráfico 2 se recoge la expresión de los diferentes grupos de diferenciación B, según el estadio madurativo en el que se encuentre la célula B.

En términos generales, el fenotipo de las células neoplásicas B es un fiel reflejo del patrón de marcadores de superficie en las células malignas, lo que permite su diagnóstico y clasificación, así como una serie de implicaciones clínicas específicas (Galton y MacLennan, 1982; Food y Todd, 1986).

Los Cuadros 1 y 2 muestran los marcadores monoclonales de leucemia linfoblástica aguda (ALL) y neoplasias linfoides de células B, respectivamente.

En el Cuadro 3 se recogen las características más importantes de los diferentes grupos de diferenciación relacionados con la superficie celular de los linfocitos B (tomada de Mulligan, 1990).

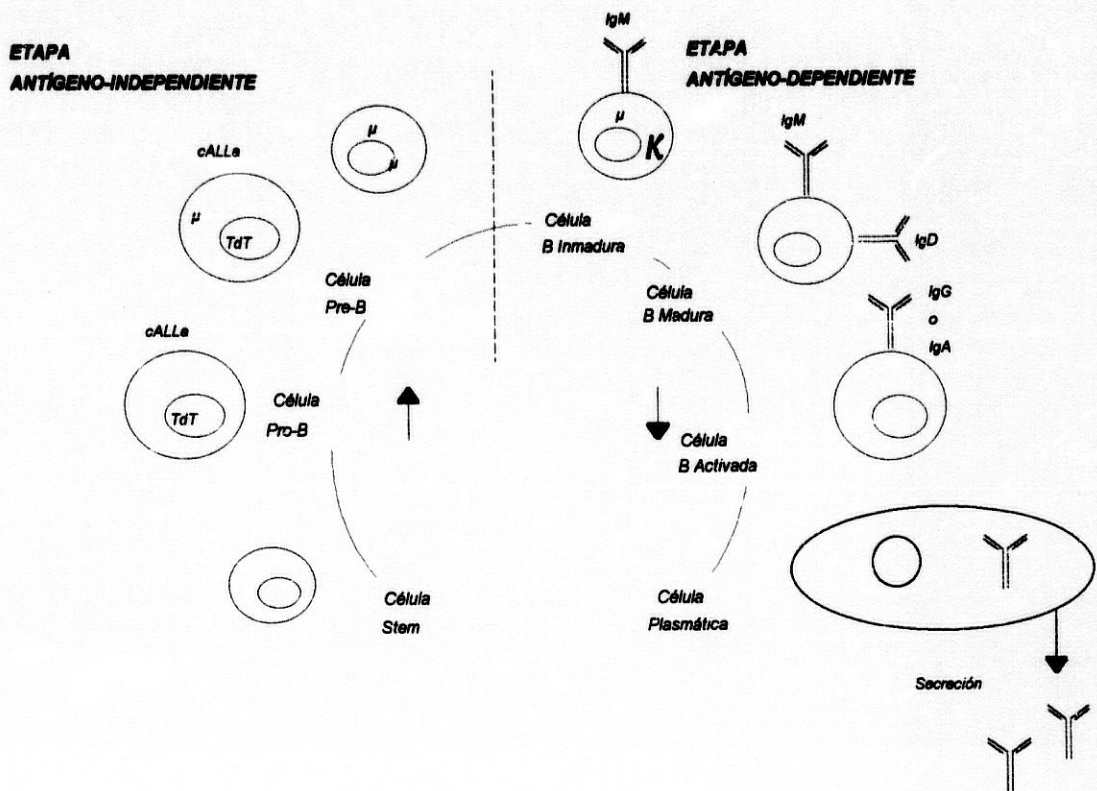


Gráfico 1.- Etapas en la diferenciación celular B hasta el período de célula plasmática, indicando la expresión de inmunoglobulina en las diferentes fases del desarrollo.

Pro-B Pre-B B-Inmadura B-Madura B-Activada Blasto-B Cél Plasmática

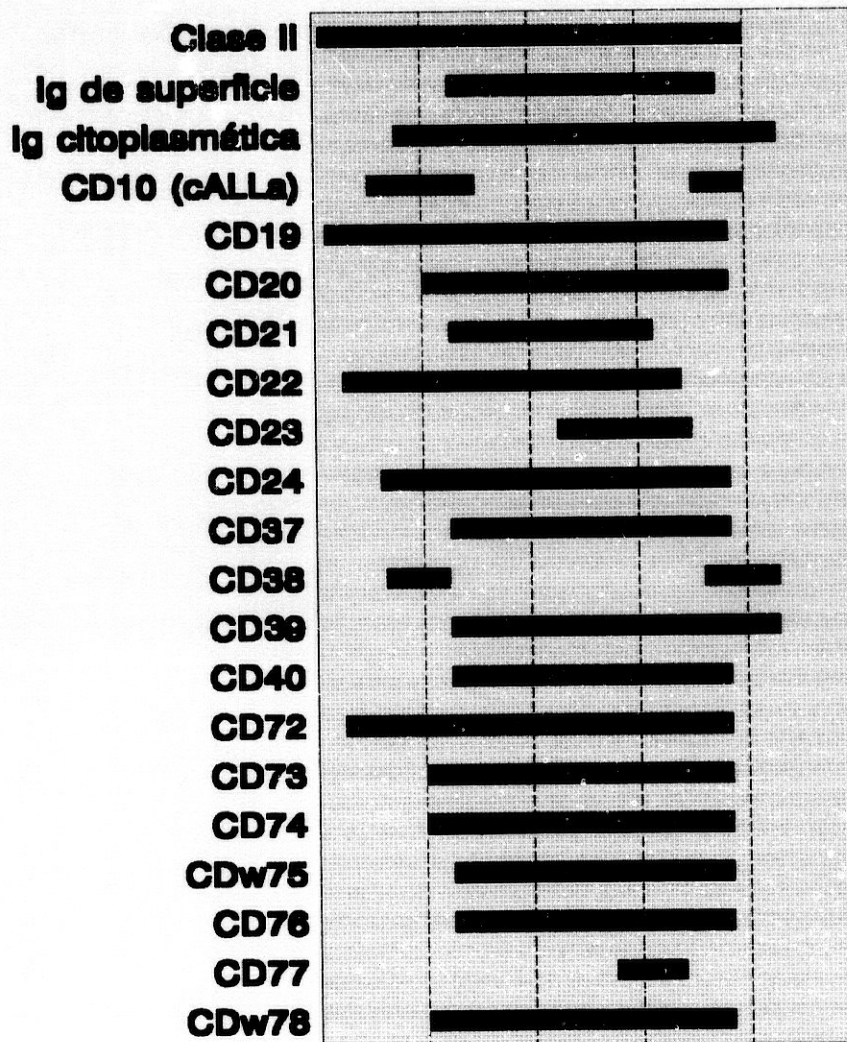


Gráfico 2.- Expresión de los antígenos de diferenciación B (4ª Conferencia Internacional sobre Antígenos de Diferenciación Leucocitaria. Viena, 1989).

CUADRO 1. Anticuerpos monoclonales marcadores en la leucemia linfoblástica aguda.

GRUPO	I	II	III	IV
SINÓNIMO	Pro-B	cALLa	Pre-B	B-ALL
HLA-DR	+	+	+	+
TdT	+	+	+	-/±
CD34	+	+	-/+	-
CD19	+	+	+	+
CD10	-	+	+	-/±
CD20	-	-	+	+
C μ	-	-	+	+
sIg	-	-	-	+

C μ : cadena pesada μ citoplásmica; sIg: inmunoglobulina de superficie; TdT: transferasa deoxinucleotidil terminal.

CUADRO 2. Anticuerpos monoclonales marcadores en la enfermedad linfoide maligna B.

MARCADOR	CLL	PLL	HCL-V	HCL	SLVL	FL	MIELOMA
sIg	±	+	+	+	+	+	-
HLA-DR	+	+	+	+	+	+	-
CD5	+	-(±)	-	-	-	-	-
CD10	-	-	-	-	-	+	-/+
CD19/20	+	+	+	+	+	+	-
CD21	+	-	-	-	-	-	-
CD22	-/+	+	+	+	+	+	-
CD23	+	-	-	-	-	-	-
CD24	+	+/-	+	-/+	+	+	-
FMC-7	-	+	+/-	+	+	-	-
CD25	-	-	-	+	-	-	-
CD11c	-	-	+/-	+	-	-	-
CD38	-	-	-	+/-	-	-	+
PCA-1	-	-	-	+(±)	-	-	+

CLL: leucemia linfocítica crónica; PLL: leucemia prolinfocítica; HCL: leucemia de células peludas; HCL-V: leucemia variante de células peludas; SLVL: linfoma esplénico con linfocitos villosos; FL: linfoma folicular; sIg: inmunoglobulina de superficie.

CUADRO 3. Grupos de diferenciación antigénica en células B.

	P	Ac seleccionados	Especificidad
CD10	100	J5,BA-3	Pre-B (cALLa)
CD19	95	B4, Leu-12	Pan-B específico
CD20	35	B1, Leu-16	Pan-B específico
CD21	140	B2	CR2 (C3dR)
CD22	135	HD-39, HD-6	Limitado B, específico
CD23	45	Blast-2, MHM6	Limitado B (FceRII)
CD24	41/38	HB8, BA-1	Pan-B, asociado
CD37	52/40	BL14, RFB7	Pan-B tardío
CD38	45	OKT10	Célula plasmática
CD39	100-70	AC-2	Activación cél. B
CD40	48/45	G28-5	Activación cél. B
CD72	43/39	SHCL2	Pan-B
CD73	69	AD2, 1E9, LN2	ecto-5'-NT
CD74	41/35/33	BU-43, LN2	sli (MHC cadena invariante)
CDw75	53?	HH2, OKB4	B madura
CD76	85/67	HD66, CRIS-4	B madura
CD77	-	BLA, 5B5	Gb3: B activada
CDw78	67?	FN1, Leu-21	Pan-B

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio consiste en caracterizar estructuras moleculares presentes en linfocitos B, con la producción de anticuerpos monoclonales específicos frente a la línea celular KM3.

MATERIAL Y MÉTODO

1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

La inmortalización de células productoras de anticuerpos monoclonales (AcMo) mediante su fusión con células de mieloma fue descrita por primera vez por Kohler y Milstein (1975). La hibridación de células esplénicas de ratón inmunizado con líneas celulares de mieloma no productor constituye un método excepcional para la producción de AcMo.

1.1. Inmunización.

1.1.1. Células inmunizantes.

Las células inmunizantes pertenecen a la línea celular KM3. Se trata de células Pre-B con el siguiente fenotipo inmunológico: Antígeno Clase II, Ig citoplasmática, CD10, CD19, CD22, CD24, CD38 y CD72.

1.1.2. Animales inmunizados.

Se utilizaron ratones de la cepa endogámica BALB/c de genotipo H-2d con dos meses de edad. Esta cepa se obtuvo del Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg (Alemania); posteriormente fueron criados y mantenidos en nuestro laboratorio.

1.1.3. Protocolo de inmunización.

Se administraron tres dosis intraperitoneales de $2 \cdot 10^7$ células inmunizantes, resuspendidas en 500 μ l de PBS, con intervalos de 2 semanas.

A los 21 días de la primera dosis se comprueba, por inmunofluorescencia indirecta (Apartado 3.1.1), la presencia en el suero de los ratones de anticuerpos dirigidos frente a las células inmunizantes (el título debe ser superior a 1:100).

1.2. Fusión.

Consiste en la fusión celular entre los esplenocitos de ratón inmunizado y la línea mielomatosa no secretora (SP2). Los linfocitos B del bazo del ratón inmunizado aportan al híbrido los genes para la producción de inmunoglobulina, y la línea mielomatosa la capacidad de crecimiento ilimitado propio de las células tumorales; de este modo, pueden desarrollarse tanto *in vivo* como *in vitro*.

Del proceso de fusión obtendremos tres tipos de células en cultivo: células mielomatosas, células esplénicas y células híbridas. Evidentemente, la célula que mejor crece *in vitro* es la célula mielomatosa; si cultivamos las células resultantes de la fusión, ocurrirá que las células de mieloma eliminarán por sobrecrecimiento a los híbridos. Por tanto, debemos utilizar un medio selectivo para eliminar las células de mieloma; esto se consigue con medio H-AZA (Hipoxantina-Azaserina).

Las células normales pueden sintetizar DNA por dos vías: síntesis *de novo* y síntesis exógena a partir de bases preformadas que se encuentran en el medio de cultivo. La azaserina inhibe la síntesis *de novo* de bases purínicas al

inhibir la enzima dihidrofolato-reductasa, por lo que las células se vuelven dependientes de la vía exógena, para lo cual necesitan la enzima HGPRT (Hipoxantina-Guanina-Fosforibosil-Transferasa). Las células SP2 carecen de la enzima HGPRT, por lo que no podrán sintetizar DNA y morirán en cultivo. Las células esplénicas normales poseen esta enzima, pero no son capaces de mantenerse vivas *in vitro*. Por último, los híbridos sobrevivirán, ya que pueden crecer indefinidamente gracias al genoma del componente mielomatoso y por poseer la enzima HGPRT obtenido del genoma de la célula esplénica normal.

MATERIALES

- * Placas de Petri (100 x 20 mm).
- * Pipetas estériles de plástico (10 ml y 5 ml).
- * Material de disección: tijeras, pinzas, bisturí.
- * Cámara de cristal con algodón empapado en éter.
- * Tubos de plástico estériles (30 y 15 ml).
- * Placa de cultivo de 96 pocillos (Costar nº 3596).
- * Placa de cultivo de 24 pocillos (Costar nº 3524).
- * Frascos de cultivo de 50 ml (Costar nº 3050).
- * Frascos de cultivo de 250 ml (Costar nº 3075).
- * Filtros Millex-SLHA (Milipore) de 0,45 µm.
- * Estufa de cultivo a 37°C con 5% CO₂ (Forma Sci).
- * Cámara de flujo laminar (Flow Lab. class 100).
- * Centrífuga (Jouan, J 1000).
- * Microscopio de contraste de fase invertido.
- * Cámara de Neubauer.
- * Contenedor de nitrógeno líquido.

REACTIVOS

* Solución bactericida de Armil al 1/1000.

* RPMI 1640 (Gibco, catálogo nº 047-1800).

* Antibióticos: Ampicilina 500 mg/l.
Gentamicina 40 mg/l.

* Hipoxantina (Sigma H-9377) y Azaserina (Sigma A-4142). Se prepara una disolución 100x H-AZA: se pesan 136 mg de Hipoxantina en 100 ml de agua destilada con una concentración final de 13,6 µg/ml y 17,3 mg de Azaserina en 100 ml de agua destilada (concentración: 1,73 µg/ml). Se disuelve en una solución 0,1 N de NaOH (calentar a 45-50°C para disolver la Hipoxantina). Ajustar con ClH 5 N hasta conseguir un pH de 9. Filtrar en Millipore 0,2 µm y almacenar a -20°C. Medio H-AZA: por cada 100 ml de RPMI 1640 se añade 1 ml de Hipoxantina 100x y 1 ml de Azaserina 100x.

* Hepes (Flow Lab. 168 34-49). Se prepara una solución 1 M a pH 7,2.

* Bicarbonato sódico 7,5%

* Suero fetal de ternera (FCS) (Gibco). Se utiliza inactivado, procediéndose a calentar durante 30 minutos a 56°C. Es importante la selección de un buen lote de suero fetal: comprobamos su capacidad para mantener clones de la línea mielomatososa (cultivo en placas de 96 pocillos, una célula por pocillo). Se observa a las 24-48 h, considerando un buen lote aquél que mantenga una eficacia de clonación del 10-25%. El lote escogido se conservará a -20°C.

* Polietilenglicol (PEG) (Serva-33136). Pesar 15 g en un frasco estéril, añadir 21,5 ml de RPMI 1640 y autoclavar (20 minutos a 121-132°C y una atmósfera). Emplear 0,1 ml por cada 10×10^6 células.

MEDIOS DE CULTIVO

* Medio completo de Híbrido (MCH): al medio RPMI se le añade:

- 15% FCS.

- Piruvato 1 ml.

- L-Glutamina 2 mM.
- Bicarbonato 7,5%, 200 ml.
- Ampicilina: 500 mg/l.
- Gentamicina: 40 mg/l.

Ajustar a pH de 7,4 y añadir Hepes 15 ml.

* Medio completo de Híbridoma más H-AZA: Por cada 100 ml se añade 1 ml de Hipoxantina 100 x y 1 ml de Azaserina 100 x.

1.2.1. Preparación de las células para la fusión.

1.2.1.1. Suspensión de esplenocitos del ratón inmunizado.

La técnica se realiza en condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar.

Se realiza a los 2-4 días de la última dosis de inmunización, ya que es cuando el número de blastos existentes en el bazo del ratón es mayor y esto aumentará el número de híbridos productores de anticuerpos.

Se sacrifica al ratón en cámara de cristal con algodón empapado en éter. Se coloca en una tabla de disección, limpiando el abdomen con una solución bactericida de armil al 1/1.000. Se abre pared abdominal por la línea media; se escinde el peritoneo parietal con extirpación del bazo empleando las pinzas; se coloca en una placa de Petri de 100 x 20 mm que contiene 10 ml de MCH sin suero fetal. Se corta por la mitad con un bisturí y, mediante una jeringa, se va inyectando lentamente medio de cultivo, al mismo tiempo que se presiona con unas pinzas en sentido transversal, liberándose así los esplenocitos

de la cápsula fibrosa del bazo. Esta operación se practica con los dos fragmentos esplénicos.

La suspensión celular se pasa a tubos de 50 ml, agitando suavemente para disolver los grumos y se deja en hielo (para que sedimenten aquellos que no hayamos podido disgregar); a los 10 minutos se recoge el sobrenadante en otro tubo.

El botón celular se lava dos veces con MCH sin FCS en una centrífuga refrigerada a 4°C, 10 minutos a 400 g.

Con microscopio de contraste de fases comprobamos la viabilidad celular y realizamos el conteo en una cámara de Neubauer.

Se obtienen $100-200 \times 10^4$ células esplénicas que son resuspendidas en 10 ml de MCH sin FCS.

1.2.1.2. La línea mielomatosa SP2.

Procede de mieloma inducido en la cepa BALB/c. Es un clon no secretor, no sintetiza ningún tipo de cadena inmunoglobulínica, lo cual representa una ventaja adicional para la obtención de AcMo.

La línea SP2 se conserva congelada en nitrógeno líquido, sacándola a cultivar dos semanas antes. En el momento de la fusión debe encontrarse en fase

logarítmica de crecimiento, es decir, a una concentración aproximada de 100.000 células /ml. Cambiamos el medio dos días antes de la fusión, comprobando su viabilidad en un microscopio de contraste de fase y lavamos dos veces con MCH sin FCS, resuspendiendo después $50-100 \times 10^6$ células en 10 ml de MCH sin FCS.

1.2.2. Técnica de hibridación con polietilenglicol.

(Galfré et al., 1977)

Aunque la eficacia de la fusión de membranas celulares aumenta al aumentar la concentración de PEG, el tiempo de exposición y la temperatura, la viabilidad de las células disminuye en gran medida cuando se emplean concentraciones superiores a 30 y 50% por más de 10 y 2 minutos respectivamente. Así, todo el protocolo de fusión debe realizarse entre estos márgenes.

Otros factores importantes son el pH ligeramente básico (7,8-8,2) en la solución de la fusión y la necesidad de diluir el PEG lentamente.

PROCEDIMIENTO

Una vez ajustadas las dos poblaciones celulares (células esplénicas y mielomatosas), se mezclan en un tubo universal en una relación desde 4:1 hasta 2:1 . Posteriormente, se centrifuga a 400 g durante 10 minutos y se rechaza el sobrenadante.

Todo el proceso de fusión se realiza con ambiente estéril, en baño maria de 37°C y con agitación suave.

- * Añadir 1 ml de PEG al 41% sobre el botón celular durante 1 minuto, agitando suavemente con la punta de la pipeta.
- * Agitar durante un minuto más.
- * Añadir 2 ml de MCH sin FCS durante 2 minutos.
- * Añadir 7 ml más de medio a un ritmo de 1 ml cada 20 segundos.
- * Añadir 10 ml de suero a un ritmo más rápido.
- * Centrifugar a 400 g durante 10 minutos.
- * Se elimina el sobrenadante, resuspendiendo el botón celular en la cantidad de medio MCH con 15% FCS necesario para llevar a placas de cultivo de 96 pocillos en las que se pone 100 µl/pocillo, conteniendo 200.000 células.
- * Incubar las placas en estufa de 37°C, en atmósfera húmeda y con 5% CO₂.

1.3. Selección de híbridos.

PROCEDIMIENTO

24 horas después de la fusión, se añade 100 µl de medio H-AZA con el 10% de FCS a cada uno de los pocillos.

Cambio de medio: dos veces por semana aspirar el contenido de cada placa dejando unos 50 µl y añadir 100 µl del medio de cultivo según el siguiente protocolo:

- . Día 0: Fusión y añadir 100 µl de medi H-AZA al 2%.
- . Día 4: cambiar medio con RPMI 10% FCS y 1% de H-AZA.
- . Día 8: cambiar medio con RPMI 10% FCS y 1% H.

- . Dia 12: cambiar con RPMI 10% FCS y 0,5% H.
- . Dia 16: cambiar medio con RPMI 10% FCS.
- . Cuando los clones se hayan estabilizado en su crecimiento cambiar a medio 5% FCS.

1.4. Estudio de los sobrenadantes de los híbridos.

El crecimiento de los híbridos se empieza a objetivar entre los días 14 y 18 después de la fusión. Para determinar si son productores de anticuerpos frente a la célula inmunizante, se realiza técnica de inmunofluorescencia indirecta (Apartado 3.1.1) con sus sobrenadantes.

Los híbridomas productores de anticuerpos se expanden en una placa de 24 pocillos y cuando están suficientemente crecidos se pasan a un frasco de 50 ml.

Cuando los cultivos se estabilizan, si siguen siendo positivos, se clonan.

1.5. Clonación.

Los híbridomas productores de anticuerpos pueden estar mezclados en cultivo con otros híbridomas que o bien no son productores, o bien son productores de anticuerpos que no nos interesan.

La clonación tiene por objeto aislar al híbridoma productor del anticuerpo deseado y que todas las células que lo constituyen procedan de la misma célula productora.

Clonación por dilución límite.

Un día antes de realizar la clonación se le cambia el medio al hibridoma productor.

El día de la clonación se pasan las células del cultivo a un tubo de 30 ml y se lava dos veces con MCH a temperatura ambiente.

Se ajustan a $1 \times 10^5/\text{ml}$, teniendo sólo en cuenta las células vivas, y se realizan dos diluciones seriadas 1:10 para conseguir una concentración final de 10^3 cél/ml.

En un tubo de 50 ml se colocan:

- 0,45 ml de la suspensión celular de hibridoma ajustada a $10^3/\text{ml}$.
- Medio de cultivo hasta alcanzar un volumen de 45 ml.

Se reparte la suspensión celular en placas de 96 pocillos a razón de 200 μl por pocillo.

Las placas se mantiene en la estufa de cultivo, humidificada, a 37°C y una atmósfera de aire con 5% de CO_2 .

A los 14 días se examina con el microscopio de objetivo invertido, señalándose aquellos pocillos donde se observa un solo clon. El medio se cambia una vez por semana; y cuando están suficientemente crecidos, se transfieren a los pocillos de una placa de 24. Una vez estabilizados se prueban por inmunofluorescencia indirecta con las células inmunizantes.

Los clones positivos se trasladan a frascos de cultivo y, una vez expandidos, parte se inyectan a un ratón para obtener ascitis y el resto se congela.

1.6. Congelación de híbridomas.

La congelación de los híbridomas es fundamental para su conservación. Se debe realizar tanto con los híbridomas sin clonar como con los que ya lo están, pues nos permite disponer siempre de una reserva.

MATERIALES

- * Tubos de plástico de 2 ml con tapón de rosca (NUNC nº 1078).
- * Solución congeladora: suero fetal de ternera, suplementado con 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO).
- * Congelador de -80°C.
- * Contenedores de nitrógeno líquido.

PROCEDIMIENTO

Un día antes de la congelación se cambia el medio de cultivo.

Centrifugar el híbrido a 300 g, 5 minutos a temperatura ambiente. Resuspender en la solución congeladora a una concentración de 5×10^4 células/ml.

Dispensar en tubos de 2 ml, a razón de 1 ml por cada tubo. Se coloca durante 24 horas en un congelador de -80°C, pasándose posteriormente al nitrógeno líquido.

La técnica se realiza lo más rápido posible; es conveniente que los tubos y la solución congeladora estén a 4°C.

Descongelación

El tubo con las células congeladas se coloca en el baño a 37°C; rápidamente se lava dos veces con MCH previamente calentado a 37°C y se centrifuga 5 minutos a 300 g.

1.7. Producción de anticuerpos monoclonales a gran escala.

El crecimiento del clon lo podemos obtener por cultivo *in vitro* en frascos, o *in vivo* por producción de tumores ascíticos en ratones.

1.7.1. Crecimiento en frascos de cultivo.

Se cultivan en frascos de 30 ml con MCH, a los tres días el sobrenadante contendrá aproximadamente 10-50 µg/ml de AcMo.

1.7.2. Obtención de ascitis.

Para que los híbridos produzcan una tumoración ascítica, dos semanas antes se inyectan ratones de la cepa BALB/c con 0,5 ml de Pristane (2, 6, 10, 14 tetrametil pentadecano, Aldrich Chemical) en cavidad peritoneal.

Se inyectan 5×10^6 células de hibridoma resuspendidas en 500 µl de PBS.

El hibridoma, por este método crece con facilidad y la ascitis tiene una alta concentración de AcMo (1-5 mg de AcMo por ml de ascitis).

La ascitis obtenida por punción peritoneal se centrifuga 5 minutos a 200 g. El botón celular se congela en nitrógeno líquido y la ascitis se purifica, titula y congela a - 80°C.

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

2.1. Titulación.

Se realiza mediante inmunofluorescencia indirecta, preparando diluciones seriadas de la ascitis. Se valora la intensidad de fluorescencia y el tanto por ciento de las células marcadas. La dilución óptima es la que se utiliza en todos los ensayos de inmunofluorescencia indirecta.

2.2. Determinación del isotipo.

Consiste en determinar la clase o subclase de cadenas pesadas y ligeras del AcMo.

Se ha utilizado la técnica de INMUNODIFUSIÓN DOBLE BIDIMENSIONAL (Ouchterlony y Nilson, 1978).

Antígenos y anticuerpos difunden desde pocillos distintos en un gel de agarosa al 1% en solución salina. Al ponerse en contacto, producirán una banda de precipitación cuando estén a concentración óptima.

MATERIALES Y REACTIVOS

* Agarosa tipo L (Behring Institut Ref. OREO 15).

* Tampón de inmunodifusión:

200 ml de agua destilada templada para disolver:

. 12,8 g de Na_2HPO_4 (Merck).

. 2,62 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Merck).

Se añade agua destilada hasta 1.000 ml

Concentración iónica 0,15; pH 7,4.

* Anticuerpos policlonales de cabra frente a los diferentes isotipos de cadenas pesadas y ligeras de ratón: anti M, anti A, anti IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, anti K, anti λ (Nordik).

* Negro de amido:

Negro de amido (Merck, art. N° 1.167) 0,5 g

Metanol 90 ml

Acido acético..... 10 ml

* Decolorante:

Metanol..... 90 ml

Acido acético..... 10 ml

* Fijador:

Solución acuosa de ácido acético al 2%.

* Transparentador:

Acido acético..... 5 ml

Glicerina..... 10 ml

Agua destilada..... 85 ml

* Placas de plástico.

* Cánula metálica.

* Matraces de vidrio (Simax).

* Capilares.

* Pipetas de 5 y 10 ml.

* Filtros MINICON-CS15 (Amicon).

PROCEDIMIENTO

1. Preparación del gel de agarosa al 1%.

Se funden a 90°C 1.3 g de agarosa en 100 ml de tampón de inmunodifusión, hasta que se disuelven perfectamente. Se deja enfriar hasta los 50°C y se colocan varios milímetros sobre la placa de plástico, de forma lenta, para que quede una capa fina de grosor uniforme.

En el centro de la placa del gel de agarosa se realiza un orificio mediante un capilar y, con la ayuda de una plantilla, se hacen otros seis en círculo alrededor del primero. El contenido de los orificios practicados en el gel se succiona mediante una bomba de agua.

2. Colocación del anticuerpo.

En el pocillo central se coloca una alícuota de sobrenadante de cultivo del anticuerpo monoclonal a estudiar (previamente concentradas a 20x en filtros Minicon) y en los seis pocillos periféricos se distribuyen los antisueros que reconocen las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de ratón. En otra placa, el anticuerpo monoclonal se enfrenta a los antisueros que reconocen las cadenas ligeras.

Se deja incubar 24 horas en cámara húmeda.

3. Lavados.

Se lavan las placas en la solución salina durante 24 horas en caja de Petri y posteriormente 2 horas en agua destilada. Se secan colocando sobre ellas papeles de filtro a temperatura ambiente. El papel de filtro en contacto con la agarosa se humedece antes de retirar, para evitar despegar la agarosa de la placa.

4. Tinción.

Las placas se tiñen con negro de amido durante 10 minutos. Se decoloran con baños sucesivos de decolorante, de 10 minutos cada uno. Se pasan por un baño fijador durante 5 minutos y, finalmente, por un baño transparentador, 30 minutos.

Se secan en estufa durante 24 horas.

3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MOLÉCULAS RECONOCIDAS POR LOS ACMO

Incluye el estudio de distribución celular, tisular y la determinación del peso molecular de los antígenos.

3.1. Distribución celular.

Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre células en suspensión y posterior estudio en microscopio y/o citometría de flujo, se ha estudiado la distribución de los antígenos reconocidos por los AcMo sobre:

- Panel de células normales.
- Panel de células leucémicas.
- Líneas celulares humanas.

3.1.1. Técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

Los antígenos de membrana celular son reconocidos mediante una reacción antígeno-anticuerpo y visualizados mediante el empleo de un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón marcado con fluorescencia.

Es fundamental una buena viabilidad celular para que los anticuerpos no atraviesen la membrana plasmática, produciéndose así una tinción citoplásmica.

Toda la técnica se realiza a 4°C para evitar que las células formen "capping".

REACTIVOS

- AcMo.
- Antiinmunoglobulina de ratón marcada con Isocianato de fluoresceína (FITC) (NORDIC).
- PBS frío.
- Suero humano AB.
- Solución de formol al 8% en solución salina 0,8%, pH 7,4.

PROCEDIMIENTO

* Ajustar las células a una concentración de 10×10^6 /ml. Alicuotar la suspensión en 25 μ l y distribuir en tubos de 3 ml.

* Añadir 50 μ l de AcMo a estudiar a la dilución adecuada (el sobrenadante se usa neto, y la ascitis a 1:50 ó 1:100).

* Incubar 30 minutos a 4°C.

* Lavar con PBS frío, centrifugar a 4°C durante 5 minutos a 300 g para eliminar el exceso de AcMo.

* Sobre el botón celular se añade 10-20 μ l de antiinmunoglobulina de ratón fluoresceinada diluida al 1:10.

* Incubar 30 minutos a 4°C.

* Lavar con PBS frío 5 minutos a 300 g.

Después del último lavado, la suspensión celular se puede analizar al microscopio de fluorescencia montando la preparación en un porta, o por citometría de flujo.

Si la lectura no va a ser inmediata, la suspensión celular se conserva en un ml de solución formol, en cámara oscura a 4°C.

3.1.2. Análisis por citometría de flujo.

Esta técnica permite cuantificar la fluorescencia de las células marcadas. Se empleó el citofluorómetro de flujo FACScan de Becton Dickinson.

Cada célula se analiza por su capacidad de dispersión de luz (relacionado con el tamaño y complejidad celular) y por la emisión de fluorescencia cuando es excitado por el láser.

Los resultados se representan en forma de diagrama, en abcisas la intensidad de fluorescencia y en ordenadas el número de células analizadas.

3.1.3. Panel de células normales.

El estudio se ha realizado sobre:

- Células mononucleadas.
- Células T.
- Células B.
- Granulocitos.
- Monocitos.

Se han obtenido de sangre periférica mediante heparinización (100 U/ml sangre) o defibrinación por agitación con holitas de cristal.

REACTIVOS

* Histopaque 1.077 (Sigma): contiene Ficoll (Tipo F 400), 57 g/dl y Diatrizoato sódico 9 g/dl en solución aséptica.

* Histopaque 1.119 (Sigma): contiene Ficoll (Tipo 400), 6 g/dl y Diatrizoato de sodio 16,7 g/dl en solución aséptica.

* Medio de cultivo RPMI 1.640.

* Suero fetal de ternera (Gibco).

* Solución salina tamponada con fosfato (PBS).

* Solución CIH 0.1 N.

* HEPES (Flow).

* Solución 10^{-4} M de etilendiaminotetracetato (EDTA).

* L-Glutamina a una concentración de 0,59 mg/ml.

* Ampicilina 500 mg/l.

* Gentamicina 40 mg/l.

PROCEDIMIENTO

Las células mononucleadas (PBM) se separan mediante gradiente de densidad en Histopaque-Ficoll 1.077. Una vez aisladas, utilizando la propiedad de las células B de adherirse a la fibra de nylon, se separan células T de B.

Los monocitos se obtienen incubando el PBM (10^7 células en 10 ml de RPMI 1.640 suplementando con 10% de FCS) en frascos de cultivo de 50 ml; se mantienen durante una o dos horas en estufa a 37°C. Las células no adherentes se eliminan con tres lavados de PBS; posteriormente, los monocitos se despegan incubando con una solución de EDTA y frotando con espátula.

Los granulocitos se obtienen por doble gradiente de densidad en Hypaque-Ficoll (Histopaque 1.119 y 1.077).

3.1.4. Panel de células leucémicas.

Las células leucémicas utilizadas procedían de sangre periférica y/o médula ósea de enfermos diagnosticados en el Servicio de Hematología del Hospital General de Especialidades, Ciudad Sanitaria "Virgen de las Nieves". El diagnóstico se realizó atendiendo a criterios clínicos, morfológicos y citoquímicos según la clasificación F.A.B., completándose con un estudio inmunológico realizado en el laboratorio de Análisis Clínicos, según el protocolo descrito por Foon y Told (1986).

3.1.5. Panel de líneas celulares.

Las líneas celulares son previamente cultivadas en estufa a 37°C con un 5% de CO₂.

Se utilizaron las siguientes líneas:

LÍNEA CELULAR	ESTIRPE CELULAR
NALM-6	Pre-Pre B
REH	Pre-B
RAJI	Linfoma Burkitt
DAUDI	Linfoma Burkitt
K562	Eritroleucemia
HL-60	Promielocítica
U-937	Mielomonoblástica
MOLT-4	LLA-T

3.1.6. Estudio con células transfectantes.

Las células L de ratón (fibroblastos L929) fueron transfectadas con un cDNA para endoglina, insertado en los puntos de corte para *EcoRI* del vector de expresión pcEXV (Ruoslahti, 1991), obtenidos en el Laboratorio del Dr. Carmelo Bernabeu con el método DEAE-dextrano-cloroquina (Hemler, 1990).

3.2. Distribución tisular.

Se ha estudiado la expresión de los antígenos reconocidos por los AcMo sobre secciones criostáticas de diversos tejidos normales: amígdala, timo, bazo, ganglios linfáticos, pulmón, placenta, cordón umbilical, riñón y cerebro.

Para ello se utilizó la técnica inmunohistoquímica de la FOSFATASA ALCALINA ANTIFOSFATASA ALCALINA (APAAP), por su gran sensibilidad y, conservación de la morfología, así como de los antígenos de membrana (Cordell et al., 1984; López-Nevot et al., 1989; Ruiz-Cabello et al., 1989).

Para comparar el grado de afinidad con las células macrofágicas, se han realizado estudios de distribución tisular con el AcMo HC11 (cedido por el Laboratorio de Dr. Carmelo Bernabeu). Se trata de un antiCD11c que reacciona específicamente con macrófagos.

MATERIALES

- Portas y cubreobjetos.
- Recipiente lavador y cestillas para portas.
- Pipetas.
- Papel secante.
- Cámara húmeda.
- Microtomo: BRIGHT. Criostato modelo OTF/AS.
- Congelador de -20°C.
- Papel de aluminio.
- Microscopio óptico.

REACTIVOS

- Acetona pura.
 - Suero humano AB.
 - Glicerol.
 - Rabbit-antimouse (DAKO).
 - APAAP. Complejo soluble de fosfatasa y anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfatasa alcalina (DAKO PATTS).
 - Naftol-AS-MX (SIGMA).
 - Levamisole (SIGMA).
 - Dimetilformamida (SIGMA).
 - Fast-red-TR (SIGMA).
 - Agua destilada.
 - Solución stock de TBS (5x).
Tris 0.5 M 60,55 g/l.
ClNa 1.5 M 87,66 g/l.
Agua destilada 800 ml.
- Se mezcla y se ajusta a pH 7,6 con ClH puro. Completar a 1.000 ml con agua destilada. Antes de usar, diluir a 1:5.
- Medio de montaje Apathy's.

PROCEDIMIENTO

1. Preparación de las secciones criostáticas.

La muestra, una vez obtenida, se corta en bloques de 2-4 mm y se congela en nitrógeno líquido.

Se realizan secciones criostáticas de 5-8 μm de grosor; para ello debemos equilibrar la temperatura del tejido con la del criostato que dependerá del tipo de tejido (entre -20°C y -35°C).

Las secciones se colocan sobre portas y se secan a temperatura ambiente.

Una vez secas, se fijan durante 10 minutos en acetona pura (con lo que los antígenos de membrana quedan conservados).

Se dejan secar y, si no van a ser utilizados inmediatamente se almacenan a -20°C envueltos en papel de aluminio.

2. Fosfatasa alcalina (APAAP).

* Se descongelan y se dejan secar los portas con las secciones criostáticas.

* Sobre éstas se añade el primer anticuerpo a la dilución óptima y en cantidad suficiente para cubrir todo el tejido, unos 30-50 μl .

* Se incuba 30-60 minutos en cámara húmeda a 37°C (para prevenir la desecación del tejido).

* Se lava en TBS 5-10 minutos y se seca el porta alrededor del corte.

* Se añade el segundo anticuerpo: Inmunoglobulina anti-ratón a una dilución de 1:20; ésta se realiza con 75% TBS y 25% de suero humano para disminuir el marcaje inespecífico bloqueando los receptores Fc.

* Se incuba 30-60 minutos en cámara húmeda a 37°C, se lava con TBS.

* Se añade el complejo APAAP a una dilución de 1/50, se incuba y se lava en iguales condiciones que los pasos anteriores.

* A continuación se añade el sustrato. Se disuelven 2 mg de naftol-AS-MX en 0,2 ml de dimetil-formamida en un tubo de cristal; se añaden 9,8 ml de tampón Tris-ClH 0,1 M pH 8,2. Esta solución se almacena a 4°C hasta que vaya a ser utilizada.

* Inmediatamente antes de usar, se añaden 15 µl de levamisol, que bloquea la fosfatasa alcalina endógena, y Fast-Red-TR a una concentración de 1 mg/ml.

* Se filtra directamente sobre los portas, se incuba 10-15 minutos a temperatura ambiente.

* Se lava 5-10 minutos en PBS y 2-3 minutos en agua corriente.

* Se contratiñe con hematoxilina 1 minuto. Se lava en agua y se monta con Apathy's.

3.3. Determinación del peso molecular de los antígenos reconocidos por los AcMo.

Los antígenos se aíslan de un lisado celular marcado radioactivamente con ¹²⁵I y se unen específicamente al AcMo. Posteriormente se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida seguido de una autorradiografía.

3.3.1. Marcaje externo con ^{125}I : Método de Lactoperoxidasa glucosa-oxidada.

Las proteínas de la superficie celular serán selectivamente marcadas con ^{125}I en una reacción catalizada por Lactoperoxidasa glucosa-oxidasa, ya que ésta no puede atravesar la membrana plasmática de las células vivas y, sólo las proteínas de membrana serán iodadas.

MATERIALES

- * PBS.
- * Lactoperoxidasa (Sigma) 20 U disueltas en 1 ml de PBS.
- * Glucosa-oxidasa (Sigma) 1 U/ml de PBS.
- * Glucosa 100 mM en una solución de PBS.
- * $^{125}\text{I Na}$: 100 mCi/ml (General Radioquímica).

PROCEDIMIENTO

- Lavar las células tres veces con PBS. Comprobar que hay una viabilidad superior al 90%. Ajustar a una concentración de 10^8 células/ml.
- A 100 μl de la suspensión celular añadir 10 μl de lactoperoxidasa, 20 μl de glucosa oxidasa, 10 μl de glucosa y 500 μCi de ^{125}I (5 μi).
- Incubar 10 minutos a 20°C agitando suavemente.
- Lavar las células 3 veces con PBS.

3.3.2. Lisis de células marcadas.

REACTIVOS

- * Tris-hidroximetil-aminometano (Merk, art. 8386).
- * Acido clorhídrico. HCL (Merk, art. 6404).

- * NP40. Nonidet-40 (Acetil fenil polietilenglicol) (Fucka, 74.385).
- * Cloruro sódico. NaCl (Merk, art. 6004).
- * Albúmina bovina (BSA) (Sigma nº A-4503).
- * PMSF (Fenil metil sulfonil fluoride) (Sigma nº 7626).
- * Acetona.
- * Inhibidor de tripsina (Sigma nº T-9003).

SOLUCIONES

- Tampón de lisis:
 - . 10 mM Tris CLH pH 7,4.
 - . 1% NP-40.
 - . 150 mM ClNa.
 - . 1 mM EDTA.
- Tampón de lisis suplementado con albúmina bovina (1 mg BSA/ml).
- Solución de ClNa 3,5 M.
- PMSF: 1 M disuelto en acetona.

PROCEDIMIENTO

- Lavar las células dos veces con PBS.
- Resuspender el botón celular en PBS a una concentración de 2×10^7 células/50 μ l.
- Añadir 1 ml de tampón de lisis suplementado con BSA, 1 μ l de PMSF y 10 μ g de inhibidor de tripsina.
- Mezclar suavemente y dejar en hielo 30 minutos.
- Centrifugar a 400 g, 5 minutos.
- Recoger el sobrenadante y centrifugar durante 1 hora a 100.000 g a 4°C.
- Coger 2 μ l y medir la radioactividad en contador gamma.
- El lisado se puede guardar a -80°C hasta su uso.

3.3.3. Inmunoprecipitación.

El lisado que contiene las proteínas de membrana marcadas con ^{125}I se enfrenta al AcMo.

3.3.3.1. Inmunoprecipitación con Sefarosa-Proteína A.

La hemos realizado de acuerdo con el protocolo descrito previamente (Esteban et al., 1988).

REACTIVOS

- Lisado celular marcado con ^{125}I .
- AcMo.
- Sefarosa Proteína A (Pharmacia).
- Rabbit antimouse (DAKO).
- Tampón de lisis:
 - . 10 ml Tris ClH.
 - . 1% NP-40.
 - . 150 mM ClNa.
 - . 1 mM EDTA.
- Tampón de lisis suplementado con BSA (1 mg/ml).
- Tampón de lavado 1= tampón de lisis más 0,5 M ClNa.
- Tampón de lavado 2= tampón de lisis más 0,1% SDS.
- Tampón de lavado 3= Tris ClH 0,1 M pH 7,4, 0,1% NP-40.
- ClNa 3,5 M.

3.3.3.1.1. PREABSORCIÓN DEL LISADO.

* Lavar la Sefarosa Proteína A dos veces con tampón de lisis. Resuspender en 10% de tampón de lisis suplementado con BSA. Ajustar la

concentración de ClNa a 0,5 M (añadir aproximadamente 0,1 ml de ClNa 3,5 M por cada ml de solución).

- * Añadir 100 µl de Sefarosa Proteína A lavada a 1 ml de lisado (2×10^7 cel) y rotar 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

- * Centrifugar a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C.

- * Recoger el sobrenadante y ajustar la concentración de ClNa a 0,5 M (0,1 ml de ClNa 3,5 M/ml de lisado).

3.3.3.1.2. INMUNOPRECIPITACIÓN.

- * Añadir 10 µg de AcMo purificado o 20 µl de AcMo en su forma ascítica a 0,5 ml de lisado preabsorbido (10^7 cel).

- * Incubar 1 hora a temperatura ambiente o 16 horas a 4°C.

- * Añadir la inmunoglobulina de conejo antiratón (2 µg de AcMo), incubar 45 minutos en hielo.

- * Añadir 100 µl de Sefarosa Proteína A lavada y resuspendida en tampón de lisis. Incubar, rotando, 1 hora a 4°C.

- * Centrifugar a 4°C durante 5 minutos a 10.000 g y retirar el sobrenadante (éste puede ser todavía utilizado para inmunoprecipitar otros AcMo).

- * Añadir 100 µl de tampón de lavado 1, agitar 5-10 veces con pipeta, centrifugar a 10.000 g durante 1 minuto y retirar el sobrenadante.

- * Repetir el paso anterior con los tampones de lavado 2 y 3.

3.3.4. Electroforesis en gel de Poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE)

El gel se forma por polimerización de la acrilamida y un reactivo bifuncional formador de puentes cruzados: N,N metilembisacrilamida. La polimerización ocurre rápidamente a temperatura ambiente en presencia de un iniciador, persulfato amónico y un catalizador N,N,N',N'-tetrametil etilendiamino (TEMED).

El porcentaje de gel empleado dependerá del peso molecular de las proteínas; un gel de 12,5% es adecuado para proteínas entre 12-45 kDa de peso molecular; un 7,5% nos distinguirá con precisión proteínas comprendidas entre 50-150 kDa.

REACTIVOS

- Acrilamida (Bio-Rad, catálogo 161-0 100).
- Bisacrilamida (Merck, art. 10.897) (MBA).
- Glicerol (C.I.D.).
- Glicina (Merck, art. 4.201).
- 2 β -Mercaptoetanol (Bio-Rad, catalogo 161-0710).
- 2 propanol (Merck, art. 9634).
- Azul de Bromofenol (Shandon Southern, 2560080).
- Persulfato amónico (Bio-Rad, catálogo 161-0700).
- SDS: Sulfatododecil-sódico (Bio-Rad catálogo 161-0301).
- Agarosa.
- Tris ClH (Merck, art. 8386).
- Controles de peso molecular (Amersham code RPN, 756). Mezclas de proteínas purificadas y coloreadas.

<u>Proteína</u>	<u>Peso molecular (kDa)</u>	<u>Color</u>
Miosina	200	Azul
Fosforilasa b	92,5	Marrón
Albúmina bovina	69	Rojo
Ovoalbúmina	46	Amarillo
Anhidrasa carbónica	30	Naranja
Inhibidor de Tripsina	21,5	Verde
Lisozima	14,4	Magenda



5.0

5.6

6.3

7.1

8.0

9.0

10

11.2

12.5

14

16

18

20

22.4

25

28

31.5

36

40

45

50

56

63

71

80

90

100

112

125

140

160

180



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

El porcentaje de gel empleado dependerá del peso molecular de las proteínas; un gel de 12,5% es adecuado para proteínas entre 12-45 kDa de peso molecular; un 7,5% nos distinguirá con precisión proteínas comprendidas entre 50-150 kDa.

REACTIVOS

- Acrilamida (Bio-Rad, catálogo 161-0 100).
- Bisacrilamida (Merck, art. 10.897) (MBA).
- Glicerol (C.I.D.).
- Glicina (Merck, art. 4.201).
- 2 β -Mercaptoetanol (Bio-Rad, catalogo 161-0710).
- 2 propanol (Merck, art. 9634).
- Azul de Bromofenol (Shandon Southern, 2560080).
- Persulfato amónico (Bio-Rad, catálogo 161-0700).
- SDS: Sulfatododecil-sódico (Bio-Rad catálogo 161-0301).
- Agarosa.
- Tris ClH (Merck, art. 8386).
- Controles de peso molecular (Amersham code RPN, 756). Mezclas de proteínas purificadas y coloreadas.

<u>Proteína</u>	<u>Peso molecular (kDa)</u>	<u>Color</u>
Miosina	200	Azul
Fosforilasa b	92,5	Marrón
Albúmina bovina	69	Rojo
Ovoalbúmina	46	Amarillo
Anhidrasa carbónica	30	Naranja
Inhibidor de Tripsina	21,5	Verde
Lisozima	14,4	Magenda

- Solución de acrilamida: 30 g de acrilamida y 0,8 g de bisacrilamida disuelto en 100 ml de agua y filtrado.

- Tampón de Tris superior: Tris-ClH 1 M pH 6,8.

- Tampón de Tris inferior: Tris-ClH 1 M pH 8,8.

- Tampón de muestra:

. 1 ml de SDS al 20% (concentración final 2%).

. 1 ml de glicerol (concentración final 10%).

. 0,8 ml tampón Tris superior.

. 7,2 ml de agua.

Conservar a temperatura ambiente. Para geles reductores añadir antes de su uso 10 μ l de β -mercaptoetanol por 100 μ l de tampón.

- Tampón de electroforesis pH 8,3 (10x).

. Tris 0,025 M.

. Glicina 0,192 M.

. SDS 0,1%.

Guardar a temperatura ambiente. Diluir al 1/10 antes de emplearlo.

MATERIALES

* Cubeta LKB.

* Fuente alimentadora LKB (Biochrom 2.103).

PROCEDIMIENTO

Después de los lavados, el complejo formado por el Ag-Ac acoplado se disgrega y reduce, agregando 40 μ l del tampón muestra y sometiéndolo a ebullición 5 minutos, después de los cuales, el antígeno está libre en el tampón y se somete a electroforesis al mismo tiempo que se realiza una electroforesis, de control de pesos moleculares.

Los geles se preparan en un molde de 2 cristales de 18 cm x 13 cm y, entre ellos, 3 separadores en sus lados que dejan un espacio de 1,5 mm. Se sellan con agarosa al 2%.

Porcentaje de Acrilamida del gel inferior:

	7,5%	10%	12,5%	15%
30% acrilamida 0,8% MBA	7,5ml	10ml	12,5ml	15ml
H ₂ O	11,2ml	8,7ml	6,2ml	3,7ml
Tampón Tris inferior	11,2ml	11,2ml	11,2ml	11,2ml

◆ Mezclar y desgasificar los reactivos anteriores para que la polimerización sea más homogénea.

◆ Añadir 150 µl de SDS 20%, 100 µl de persulfato amónico 10% y 30 µl de TEMED.

◆ Introducir en el molde y cubrir con propanol, para que el frente del gel sea recto. La polimerización se produce en unos 30 minutos.

◆ Retirar entonces el propanol y agregar el gel superior, preparando según la fórmula:

30% acrilamida 0,8%MBA	1,67ml
Tampón Tris superior	1,25ml
H ₂ O	7,03ml

◆ Desgasificar y añadir 50 µl de SDS 20%, 50 µl de persulfato amónico 10% y 10 µl de TEMED.

◆ Colocar el peine sobre el gel superior hasta que se produzca su polimerización.

◆ Retirar el peine y colocar en un pocillo el antígeno disuelto en 40 µl de tampón muestra y en otro pocillo 20 µl de control de peso molecular.

◆ Realizar la electroforesis durante 16 horas a 35V o 4 horas a 140V.

3.3.5. Preparación del gel para la autorradiografía.

3.3.5.1. Fijación del gel.

REACTIVOS

Solución fijadora: Metanol 25%, Ac. Acético 10%.

PROCEDIMIENTO

Una vez concluida la electroforesis desmontar el gel e introducir en una cubeta con solución fijadora durante 30 minutos.

Rehidratar el gel con agua durante 15 minutos.

3.3.5.2. Secado del gel

MATERIALES

- Secador de geles (LKB 2.3003).
- Bomba de vacío.
- Papel Whatman 3MM.

PROCEDIMIENTO

Después de hidratar el gel, cubrir la rejilla del secador con un papel Whatman húmedo, sobre éste colocar el gel.

Conectar el secador a la bomba de vacío durante 45 minutos.

3.3.5.3. Autorradiografía.

Una vez secado el gel las bandas coloreadas corresponden a los controles de peso molecular. Se coloca en un chasis con placa de radiografía. Al revelar la placa radiográfica se observan las proteínas inmunoprecipitadas.

Se calculan las distancias relativas de todas las bandas: relación entre la distancia recorrida por esta banda y la distancia alcanzada por el frente del gel.

Los valores de los pesos moleculares en Da de los controles, divididos por 10^4 , se llevan al eje de ordenadas de una gráfica semilogarítmica y en abcisas se sitúan los valores de sus distancias relativas. Con los puntos de intersección se traza una recta.

Los pesos moleculares de las proteínas inmunoprecipitadas se extrapolan en la gráfica a partir de sus distancias relativas.

RESULTADOS

I. OBTENCIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

1.1. Resultados de la fusión.

La inmunización se realizó administrando tres dosis ($2 \cdot 10^7$ célula/dosis) de la línea celular KM3 en el peritoneo de ratones de la cepa endogámica BALB/c. A los 21 días de la primera dosis se tituló el suero de los ratones inmunizados, comprobándose que en todos ellos era superior a 1:100.

El día de la fusión fueron extraídas $100 \cdot 10^6$ células esplénicas que se fusionaron con $50 \cdot 10^6$ células de la línea mielomatosa SP2. Tras la fusión, las células se resuspendieron en 75 ml de medio completo de hibridoma (MCH) y se dispensaron en placas de 96 pocillos.

1.2. Estudio de los sobrenadantes.

La selección de los híbridos se realizó en medio H-AZA como se describe en el material y método. Después de 4 semanas de cultivo se observó crecimiento de hibridomas en 29 pocillos, que fueron estudiados por IFI con células inmunizantes. De los 29 hibridomas obtenidos, 8 fueron positivos frente a la célula inmunizante. Es decir, se obtuvo un rendimiento aproximado de 27,5% de híbridos productores con respecto al número total de híbridos crecidos. Todos los hibridomas productores fueron expandidos en placas de 24 pocillos y una vez estabilizados, se clonaron rápidamente.

En la Tabla I quedan reflejados los híbridos positivos frente a KM3, el AcMo que produce cada uno de ellos y el número de clones obtenidos, así como el grado de reactividad que presentan frente a la célula inmunizante.

La reactividad de los AcMo frente a la célula inmunizante determinada por citofluorometría se representa en las figuras 1, 2, 3 y 4 que incluyen el control negativo.

II. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

2.1. Titulación.

En todas las experiencias se trabaja con ascitis, siendo la titulación siempre superior a 5.000.

2.2. Determinación del isotipo.

Los sobrenadantes de tres días de cultivo de los híbridomas productores de AcMo se concentraron 20 veces y se determinó el isotipo por inmunodifusión radial doble en gel de agarosa.

Se enfrentaron cada uno de los sobrenadantes concentrados a los anticuerpos dirigidos contra cadenas pesadas (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA) y ligeras (κ y λ) de ratón.

A las 48 horas se observaron las bandas de precipitación correspondientes; obteniéndose para todos los AcMo el isotipo IgG1 kappa, excepto para los AcMo GRT6 y GRT24 que demostraron ser IgG2a kappa.

III. CARACTERIZACIÓN DE LAS MOLÉCULAS RECONOCIDAS POR LOS ACMO.

3.1. Distribución celular.

El estudio fue realizado sobre células de distintos orígenes:

- * Panel de células normales.

- * Panel de células leucémicas.

- * Panel de líneas celulares.

3.1.1. Reactividad de los AcMo sobre un panel de células normales.

El panel de células normales de sangre periférica se configuró con 15 muestras de células mononucleares (PBL), monocitos; granulocitos y plaquetas respectivamente.

Los AcMo GRT5, GRT6, GRT7 y GRT8 reconocen a la mayoría de las células mononucleares de sangre periférica como lo demuestra la alta reactividad que presentan frente a PBL. Se obtienen resultados similares con granulocitos y monocitos, sin embargo las plaquetas no muestran unión con estos AcMo.

Para el GRT23 y GRT24 los resultados demuestran poca afinidad por las células normales de sangre periférica, reaccionan 10-15% de células mononucleares de sangre periférica.

La negatividad del AcMo GRE con células normales resulta manifiesta, mientras que el GRV1 es ligeramente positivo para granulocitos y monocitos (23% y 33%, respectivamente).

Todos estos resultados aparecen esquemáticamente en la Tabla II.

3.1.2. Reactividad de los AcMo sobre un panel de células leucémicas.

En la Tabla III se puede observar el patrón de reacción que poseen los AcMo con distintos tipos diferentes de leucemias agudas y crónicas.

El AcMo GRE reconoce en un bajo porcentaje las células de leucemia crónica B y es prácticamente negativo frente a células de leucemia aguda B. Del mismo modo actúa el AcMo GRV1 con leucemias crónicas, presentando una mayor reactividad frente a células de leucemia aguda.

3.1.3. Reactividad de los AcMo sobre un panel de líneas celulares.

La utilización de líneas celulares permite una mayor aproximación a la reactividad de los AcMo por cuanto es más factible la reproductibilidad en los resultados. Indudablemente, pese a que las leucemias representan una expansión clonal de una determinada célula, frecuentemente las células que se estudian son mezcla de células neoplásicas y normales. En este sentido, la utilización de líneas celulares ofrece evidentes ventajas debido a la gran homogeneidad de la población celular.

Se han estudiado un total de 10 líneas celulares cuyos nombres y orígenes ya han sido descritos en el apartado de material y método.

En las Tablas IV y V se recogen los resultados en tanto por ciento de células positivas.

El AcMo GRE reacciona con todas las líneas celulares ensayadas excepto con K562 y MOLT-4 con las que se obtuvo <10% de células positivas; sin embargo el AcMo GRV1 es ampliamente positivo con todas las líneas celulares empleadas.

Para hacer más comprensibles estos resultados en cuanto a los AcMo GRE y GRV1 hemos representado mediante diagrama de barras el porcentaje de células positivas que resultan de la inmunofluorescencia con células normales, células leucémicas y líneas celulares (Figuras 5,6 y 7).

3.1.4. Reactividad del AcMo GRE con células transfectantes.

Realizamos un estudio citofluorométrico de las células L de ratón (fibroblastos L929) enfrentadas a distintos AcMo antiendoglina (44G4, 8E11 y GRE). Como se puede observar en la figura 8, estas células carecen de la molécula endoglina, apareciendo resultados negativos con la inmunofluorescencia. Posteriormente, estas mismas células fueron inoculadas con el gen capaz de proporcionarles la capacidad para producir endoglina, de tal forma que estas células transfectantes presentan una reactividad fuertemente positiva cuando son incubadas de nuevo con los mismos anticuerpos monoclonales (Figura 9).

3.2. Distribución tisular.

Mediante la técnica de la fosfatasa alcalina, se ha estudiado la expresión de los antígenos reconocidos por las AcMo GRE y GRV1 sobre secciones criostáticas de diversos tejidos.

3.2.1. Patrón de reacción tisular del AcMo GRE.

•**PULMÓN:** se produce una intensa fijación al endotelio vascular y a algunas células macrofágicas de la superficie del alvéolo (Figura 10).

•**RIÑÓN:** aparece tinción a nivel del epitelio del túbulo contorneado proximal. También se puede observar en el glomérulo, donde la tinción se produce en los capilares (Figura 11).

•**HÍGADO:** tinción de los sinusoides hepáticos y de las células de Kupffer (Figura 12 a, b).

•**GANGLIO LINFÁTICO:** aparecen teñidos vasos de pequeño y mediano calibre. No aparece tinción a nivel de las células linfoides maduras (Figura 13 a, b).

•**AMÍGDALA:** no se demuestra su presencia a nivel de los tejidos linfoides, sólo tiñe los vasos sanguíneos (Figura 14 a, b).

•TIMO: tinción de vasos de pequeño y mediano calibre (Figura 15 a, b).

•BAZO: fijación a nivel de la zona de separación entre la pulpa roja y blanca (Figura 16).

3.2.2. Patrón de reacción tisular del AcMo GRV1.

•PULMÓN: aparecen teñidas fundamentalmente las células macrofágicas (Figura 17 a, b).

•RIÑÓN: tinción de las células endoteliales de los vasos y células epiteliales de los túbulos contorneados (Figura 18 a, b).

•HÍGADO: a nivel de células macrofágicas y células de Kupffer (Figura 19).

•GANGLIOS LINFÁTICOS: células foliculares dendríticas del centro del folículo y células dendríticas interfoliculares (Figura 20 a, b).

•AMÍGDALA: tinción intensa de pequeños vasos y algo más tenue en la zona clara del centro folicular, que puede corresponder a células foliculares dendríticas (Figura 21 a, b).

•TIMO: pequeños vasos y células macrofágicas (Figura 22 a, b).

•BAZO: tinción de los macrófagos del seno marginal (Figura 23).

Para comparar el grado de afinidad con células macrofágicas del AcMo GRV1 hemos realizado un estudio de distribución tisular sobre un corte criostático de amígdala con el AcMo HC11. Se trata de un antiCD11c que reacciona específicamente con macrófagos. En la figura 24 podemos observar que el AcMo HC11 (zona superior de la figura) produce una tinción específica de células macrofágicas, mientras que el AcMo GRV1 (zona inferior de la figura) produce una tinción intensa de pequeños vasos y algo más tenue en la zona clara del centro folicular, que puede corresponder a células foliculares dendríticas.

IV. CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA

Para conocer el peso molecular relativo de las moléculas reconocidas por los anticuerpos monoclonales se realizaron varias inmunoprecipitaciones frente a lisados marcados con I^{125} de la línea inmunizante KM3 y posteriores electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras y no reductoras. La detección de las bandas correspondientes a los antígenos precipitados se realizó mediante autoradiografía y el cálculo del peso molecular relativo por extrapolación en una gráfica obtenida con los controles de peso molecular.

4.1. Patrón de inmunoprecipitación de los AcMo GRT5, GRT6, GRT7 y GRT8.

La electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5% con SDS de los inmunoprecipitados obtenidos con los anticuerpos monoclonales GRT5, GRT6, GRT7 y GRT8 muestra un patrón similar para cada anticuerpo, constituido por dos bandas de peso molecular relativo de 220 y 190 kd, apareciendo esta segunda banda de 190 kd con mayor intensidad. Existen diferencias cuantitativas entre los inmunoprecipitados: las bandas más intensas corresponden al AcMo GRT5, mientras que las más débiles son del anticuerpo GRT6; los AcMo GRT7 y GRT8 ofrecen bandas de intensidad intermedia. Estas diferencias se deben a las distintas afinidades de los AcMo. Como control positivo se empleó el anticuerpo monoclonal GRT3, previamente caracterizado en Talleres Internacionales como CD45 (Figura 25).

4.2. Patrón de inmunoprecipitación de los anticuerpos monoclonales GRT23 y GRT24.

Los AcMo GRT23 y GRT24 presentan el mismo patrón de inmunoprecipitación: una banda de 220 kd (Figura 26).

4.3. AcMo GRE.

Presenta una banda de 90 kd en condiciones reductoras (Figura 27 y 28) y de 180 kd en condiciones no reductoras, lo que sugiere que el antígeno reconocido por el AcMo GRE es un homodímero de 90 kd.

4.4. AcMo GRV1.

Precipita dos bandas no bien definidas de 150 y 120 kd y otra de 20 kd en condiciones reductoras. Después de tratar en condiciones no reductoras aparecen dos bandas de 180 y 130 kd (Figura 27 y 28).

TABLA I. Híbridomas obtenidos frente a la línea KM3, AcMo que producen, número de clones resultantes y grado de reactividad frente a la célula inmunizante.

HIBRIDOMA	AcMo	CLONOS	%POSITIVIDAD CON KM3
5C9	GRT5	5	99,3±11
3F11	GRT6	29	95,1±2
17B10	GRT7	25	33,7±4
11F3	GRT8	9	99,9±1
3D10	GRT23	19	78,2±15
5E3	GRT24	11	76,1±2
6B11	GRE	4	99,9±13
7E8	GRV1	5	99,8±6

TABLA II. Reactividad de los anticuerpos monoclonales (AcMo) con células normales.

AcMo	PBL	GRANULOCITOS	MONOCITOS	PLAQUETAS
GRT5	98,5±10	87,5±6	89,7±12	<5
GRT6	99,7±12	96,9±1	91±15	<5
GRT7	95,5±11	97±6	96,5±17	<5
GRT8	97,6±12	82,7±19	96,4±21	<5
GRT23	14,5±2	<10	51±11	<5
GRT24	11,6±3	<10	45,2±17	<5
GRE	<5	<5	<5	10±2
GRV1	10,8±3	23,7±4	33,6±14	14±2

Valores expresados en media±DE del porcentaje de células positivas

TABLA III. Reactividad de los anticuerpos monoclonales (AcMo) frente a cuatro tipos diferentes de leucemias B.

AcMo	LLC-213	LLC-211	L-214	L-232
GRT5	56.2±12	90.8±18	79.7±11	67.6±2
GRT6	37.1±3	65.3±4	79.2±1	82.8±11
GRT7	64.5±2	70.1±15	31±16	33.9±10
GRT8	62±4	93.7±18	73.5±10	95.2±4
GRT23	41±10	37.2±10	66.8±9	33.9±9
GRT24	38.2±14	25±1	70±4	15.2±11
GRE	34±12	35.3±3	19.3±12	2.8±2
GRV1	33±3	31.4±6	68.1±9	39.3±14

LLC-213 y LLC-211: células de leucemia crónica B; L-214 y L-232: células de leucemia aguda B. Valores expresados en media±DE del porcentaje de células positivas.

TABLA IV. Reactividad de los anticuerpos monoclonales (AcMo) GRT5, GRT6, GRT7, GRT8, GRT23 y GRT24 con líneas celulares.

AcMo	NALM-6	RAJI	DAUDI	K562	U-937	MOLT-4
GRT5	86.3	61	90.8	91.2	97	99.9
GRT6	99.8	76	82	99.8	99.4	99.6
GRT7	84.3	82	93	71.3	94.9	99
GRT8	96.4	51	80.9	94.2	99	99.2
GRT23	35.2	39.2	31	93.6	66.2	39
GRT24	45	48.6	43.2	37	31.9	23.3

Valores expresados en porcentaje de células positivas.

TABLA V. Reactividad de los anticuerpos monoclonales (AcMo) GRE y GRV1 con líneas celulares.

	GRE	GRV1
NALM-6	96.7	99.8
RAJI	20.8	56
DAUDI	67	89.7
RAMOS	20.7	99.2
KY	72.3	92.7
HOM-2	44.2	90.7
K-562	2.7	95.1
HL-60	76.1	99.4
U-937	92.6	99.1
MOLT-4	9.4	99

Valores expresados en porcentaje de células positivas.

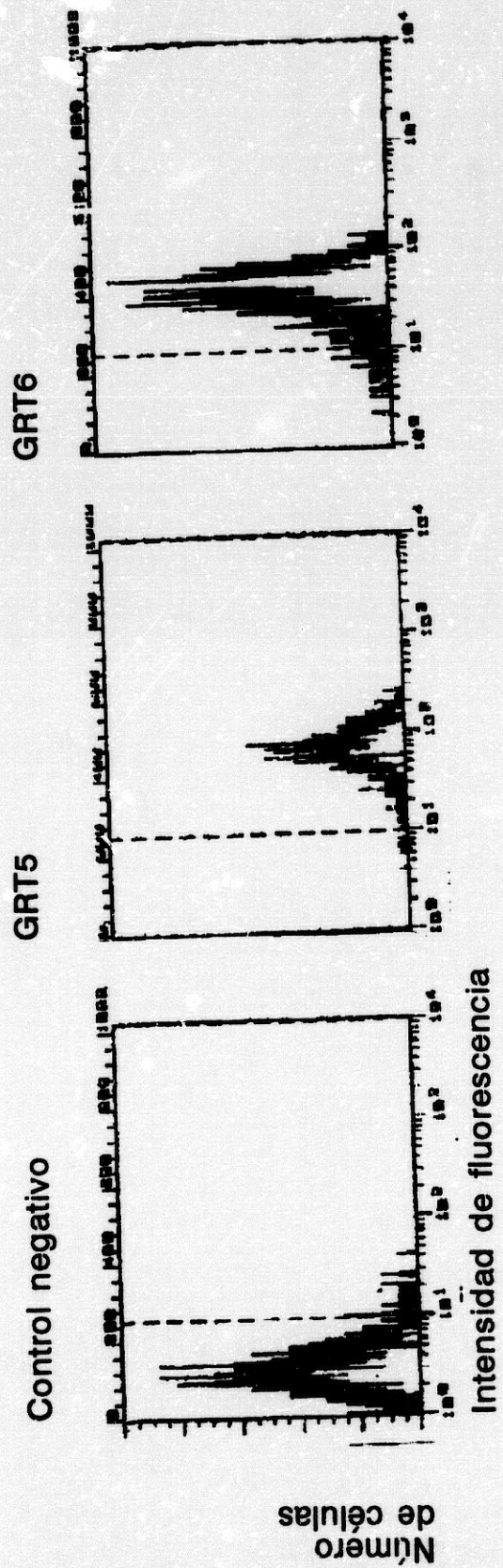


Figura 1.- Reactividad por citofluorometría de los AcMo GRT5 y GRT6 frente a la célula inmunizante (KM3). Control negativo: suero AB.

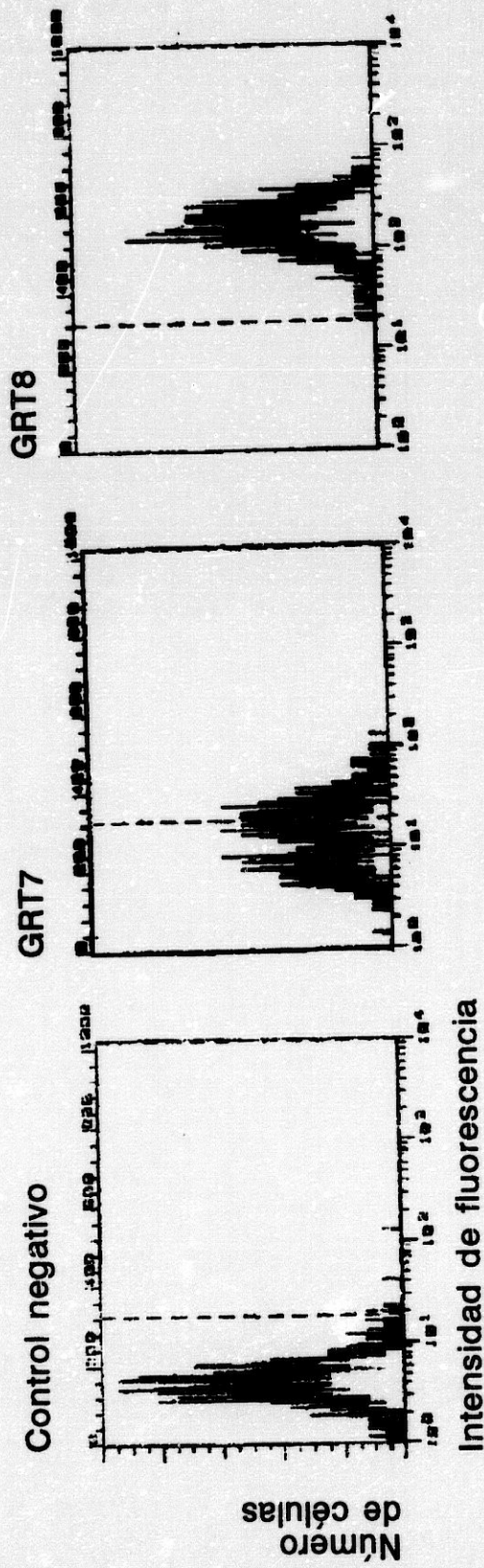


Figura 2.- Reactividad por citofluorometría de los AcMo GRT7 y GRT8 frente a la célula inmunizante KM3). Control negativo: suero AB.

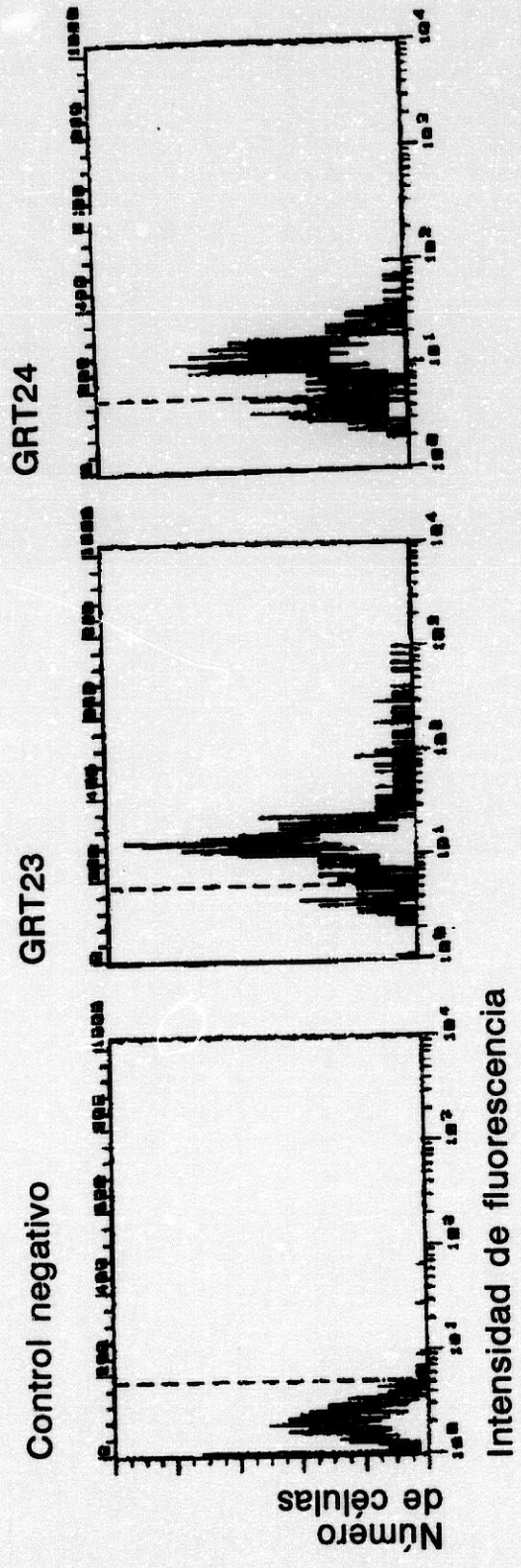


Figura 3.- Reactividad por citofluorometría de los AcMo GRT23 y GRT24 frente a la célula inmunizante (KM3). Control negativo: suero AB.

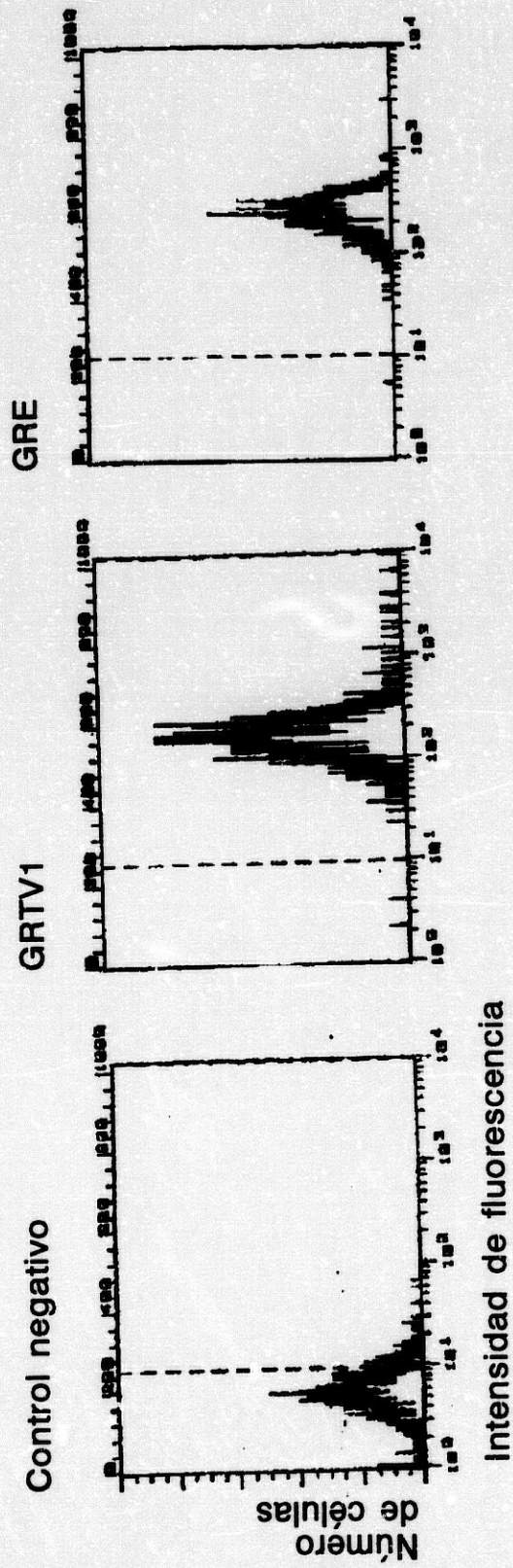


Figura 4.- Reactividad por citofluorometría de los AcMo GRV1 y GRE frente a la célula inmunizante (KM3). Control negativo: suero AB.

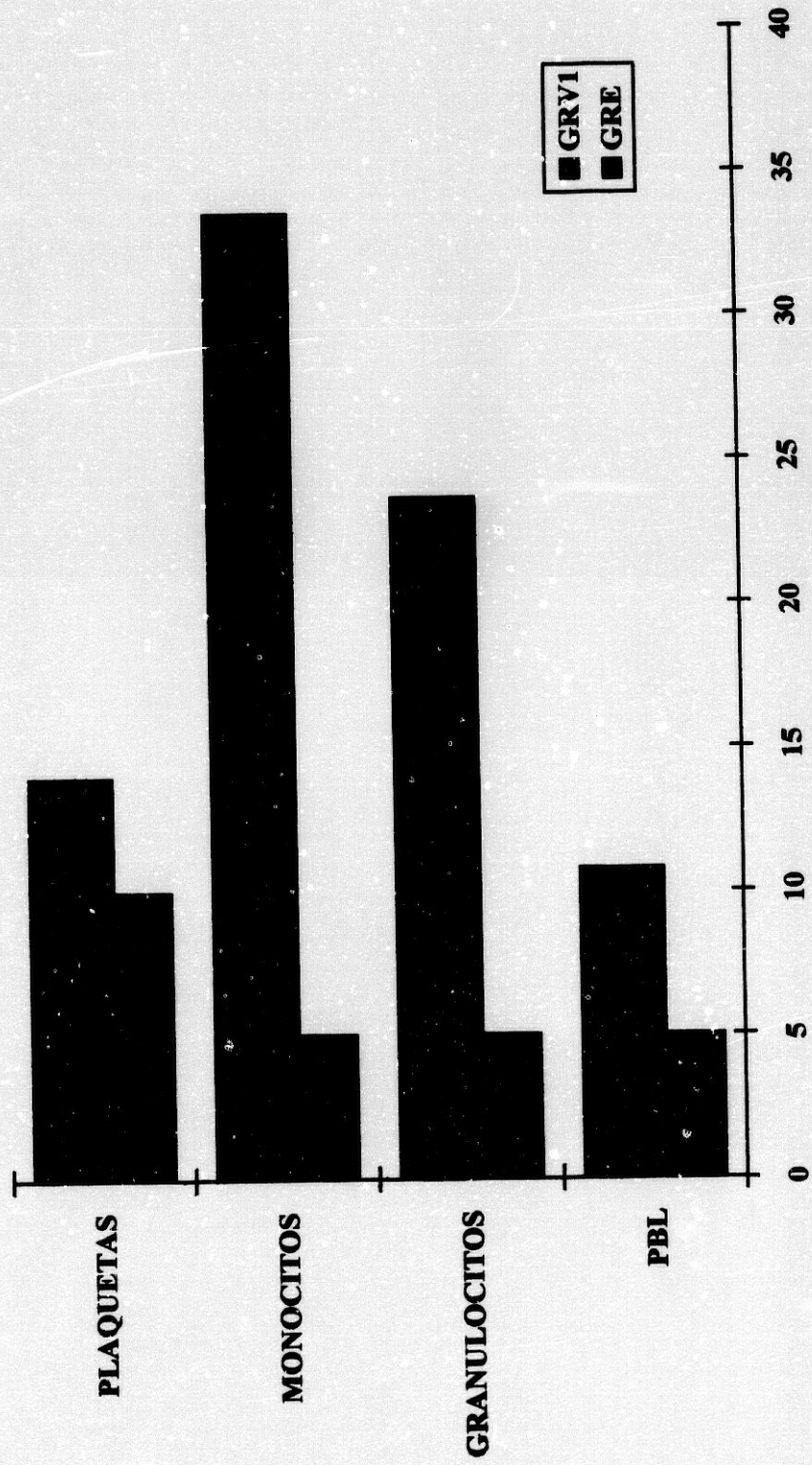


Figura 5.- Inmunofluorescencia de los AcMo GRE y GRV1 con células normales

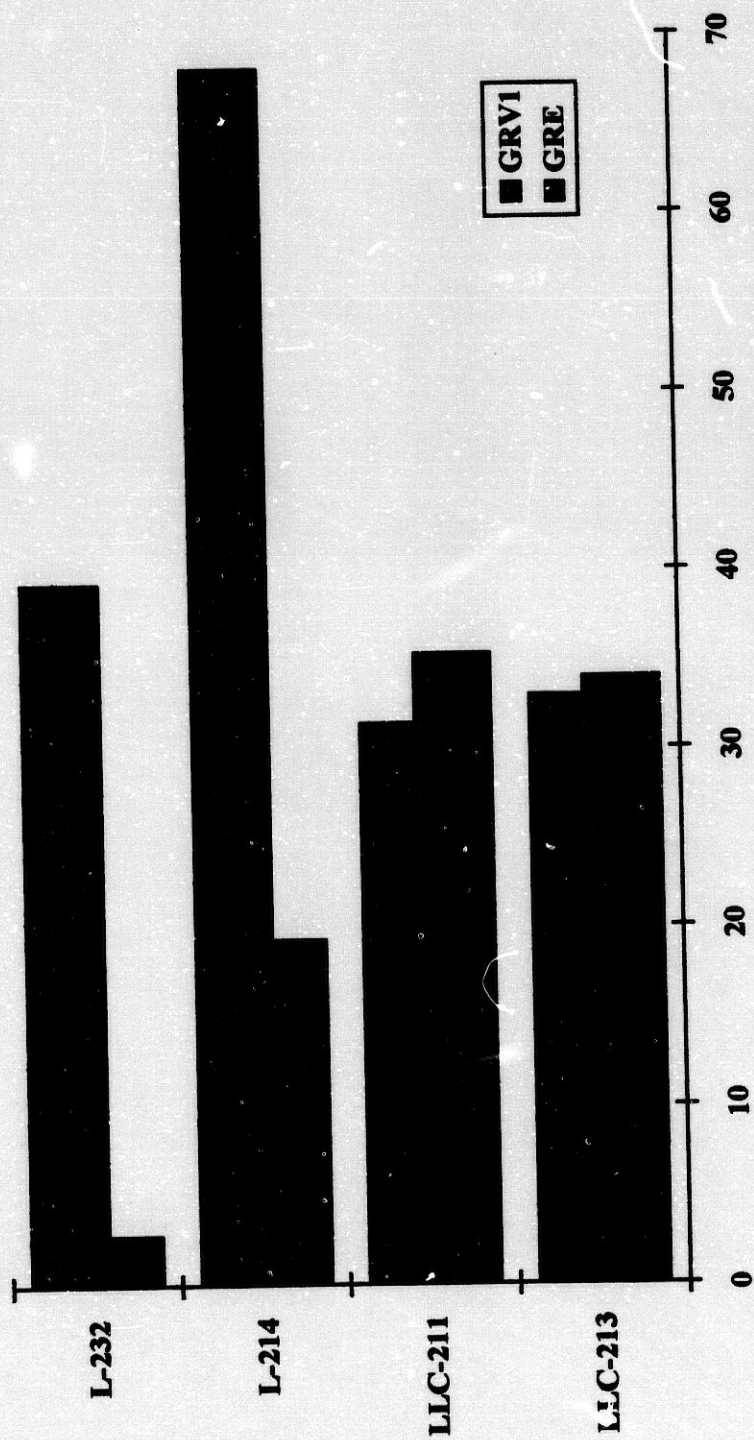


Figura 6:- Inmunofluorescencia de los AcMo GRE y GRV1 con células leucémicas. LLC-213 y LLC-211: células de leucemia crónica; L-214 y L-232: células de leucemia aguda

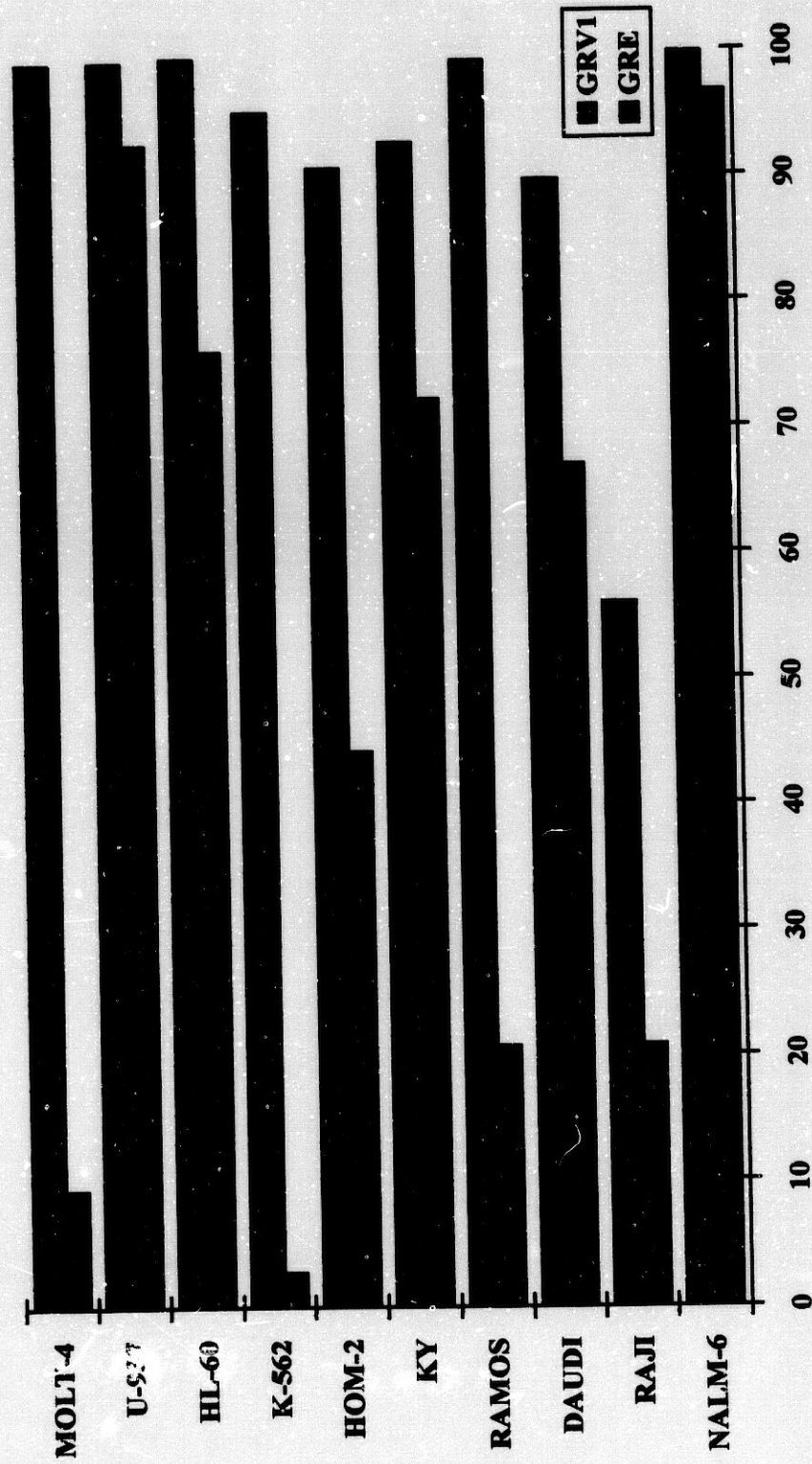


Figura 7.- Inmunofluorescencia de los Acmo GRE y GRV1 con líneas celulares

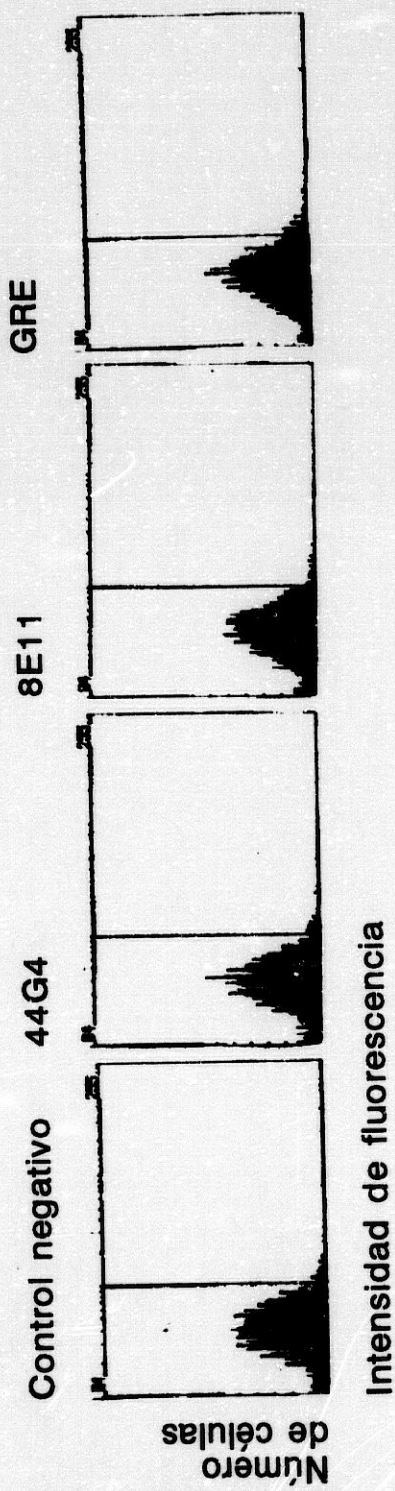


Figura 8.- Reactividad por citofluorometría de los AcMo antiendoglina (44G4, 8E11, GRE) frente a fibroblastos de ratón. Control negativo: CD11.

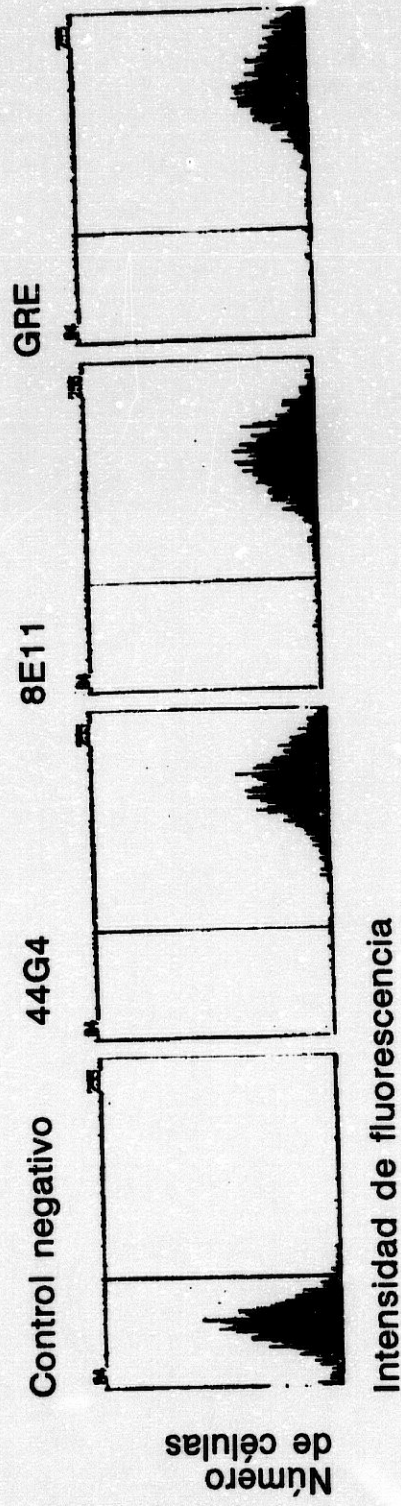


Figura 9.- Reactividad por citofluorometría de los AcMo antiendoglina (44G4, 8E11, GRE) frente a fibroblastos de ratón transfectados con el gen endoglina. Control negativo: CD11.

Patrón de reacción tisular del AcMo GRE

- Figura 10: Corte criostático de pulmón donde se observa fijación intensa a nivel del endotelio vascular y algunas células macrofágicas de la superficie del alvéolo.
- Figura 11: Riñón; tinción del epitelio del túbulo contorneado proximal y de los capilares glomerulares.
- Figura 12: Hígado; aparece tinción en los sinusoides hepáticos y células de Kupffer.
- Figura 13: Ganglio linfático; no hay tinción de células linfoides maduras; sólo hay tinción a nivel de los vasos de pequeño y mediano calibre.
- Figura 14: Amígdala; tinción vascular.
- Figura 15: Timo; tinción vascular.
- Figura 16: Bazo; fijación en la zona de separación entre la pulpa roja y la blanca.

Patrón de reacción tisular del AcMo GRV1

- Figura 17: Pulmón; aparecen teñidas fundamentalmente las células macrofágicas.
- Figura 18: Riñón; tinción de células endoteliales de los vasos y células epiteliales de los túbulos contorneados.
- Figura 19: Hígado; células macrofágicas y células de Kupffer.
- Figura 20: Ganglio linfático; tinción de las células dendríticas del centro del folículo e interfoliculares.
- Figura 21: Amígdala; tinción intensa de pequeños vasos y algo más difícil en la zona clara del centro folicular.
- Figura 22: Timo; vasos pequeños y células macrofágicas.
- Figura 23: Bazo; tinción de los macrófagos del seno marginal.
- Figura 24: Distribución tisular sobre corte criostático de amígdala con el AcMo HC11 (zona superior de la figura) y AcMo GRV1 (zona inferior de la figura). El AcMo HC11 produce tinción de células macrofágicas y el AcMo GRV1 de pequeños vasos y zona clara del centro folicular.

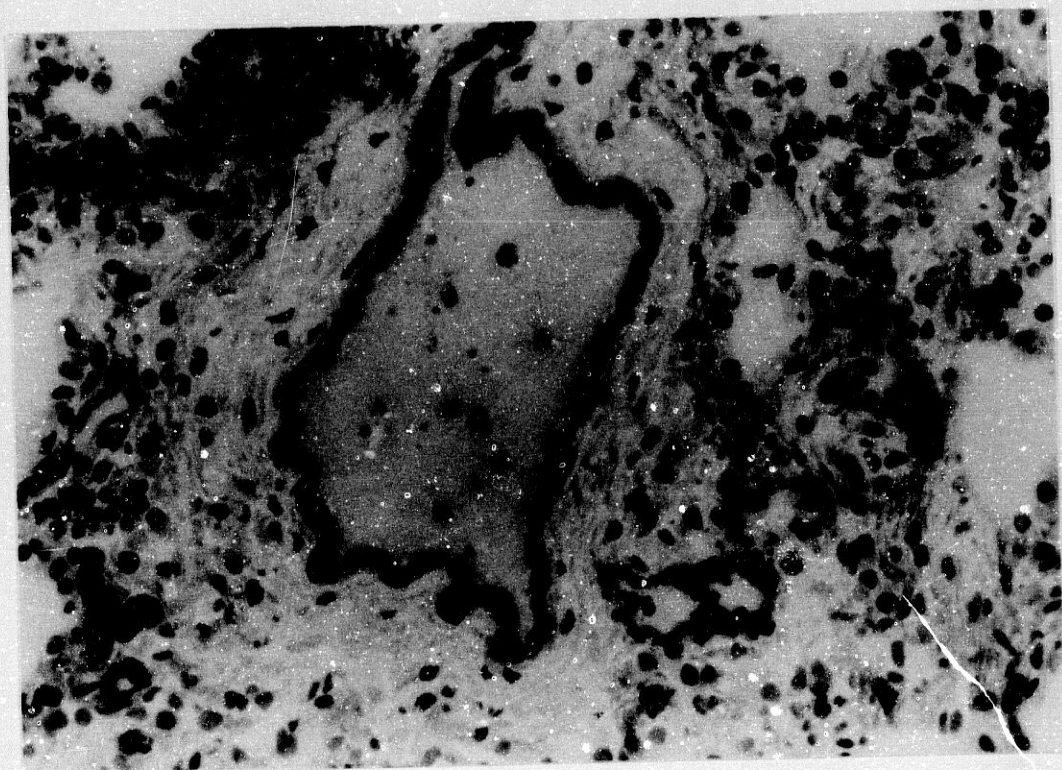


Figura 10: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de pulmón con el AcMo GPE.

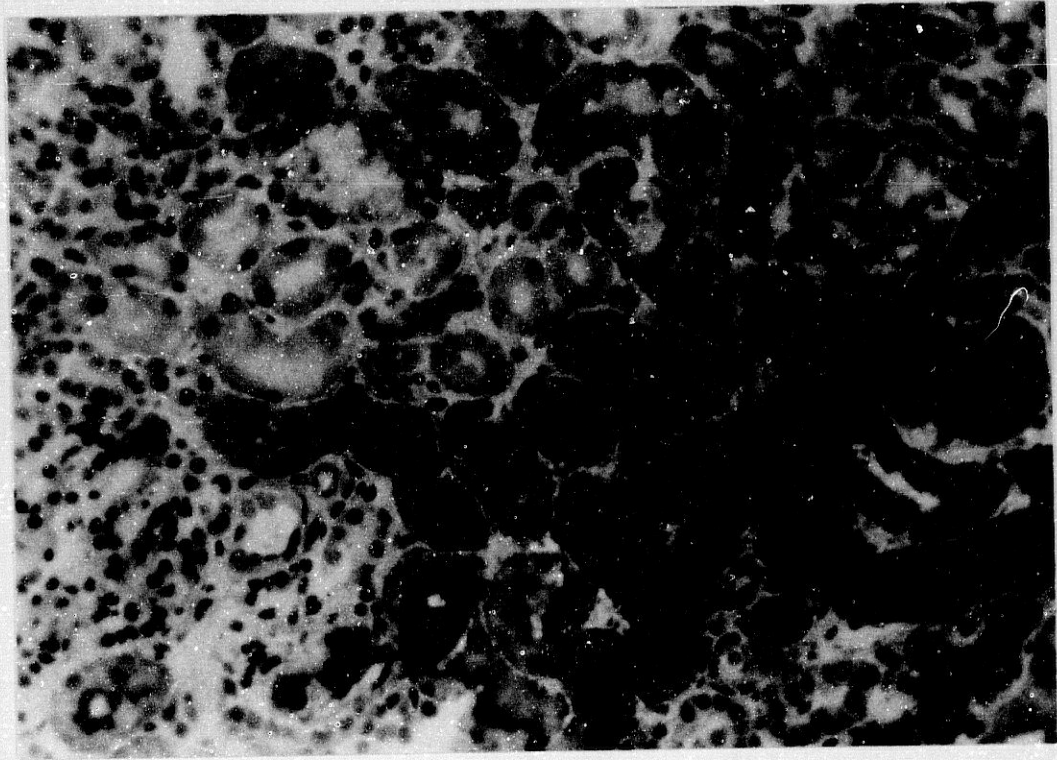


Figura 11: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de riñón con el AcMo GRE.

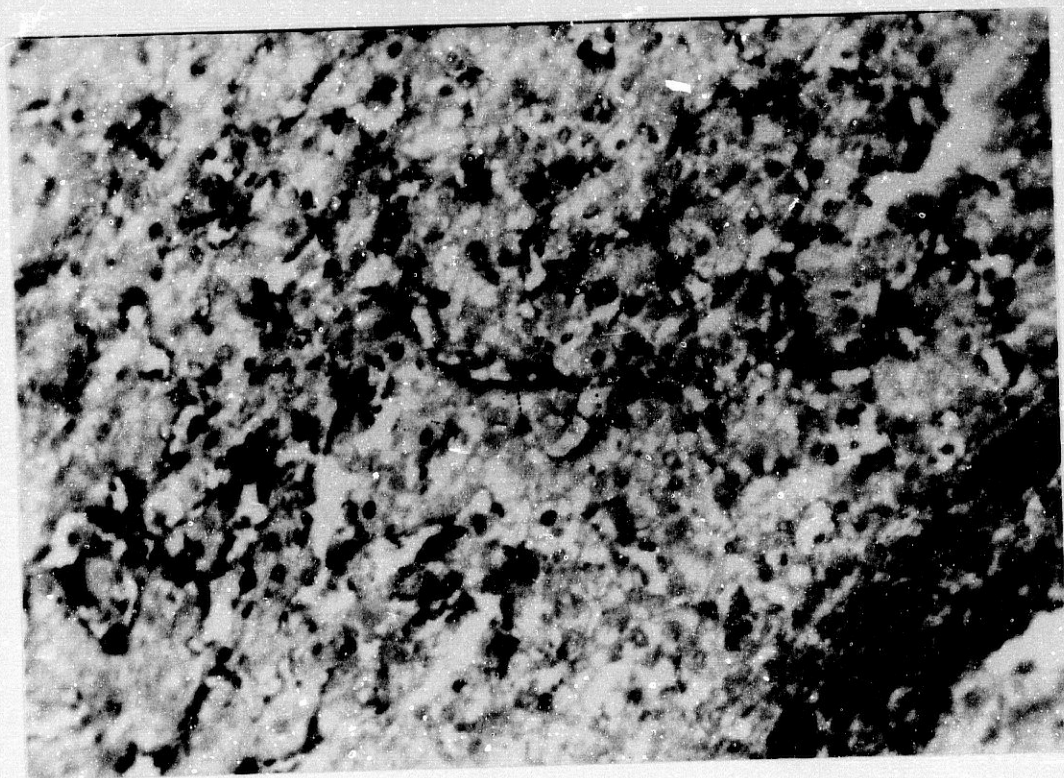
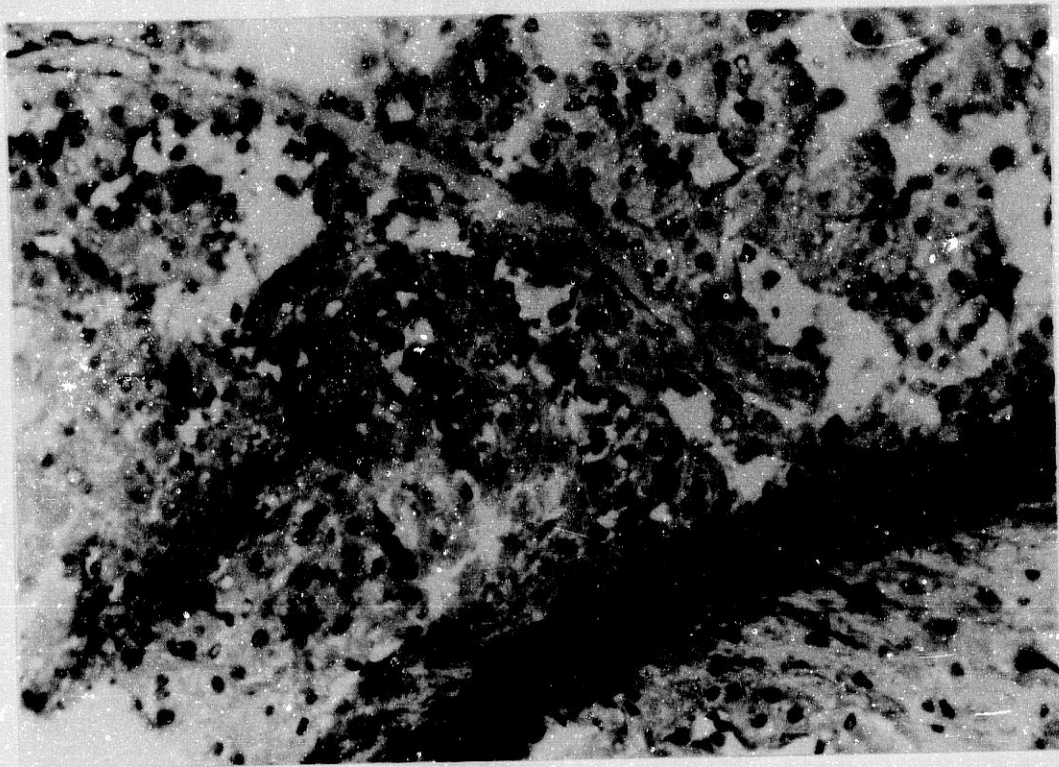


Figura 12 a y b: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de hígado con el AcMo GRE.

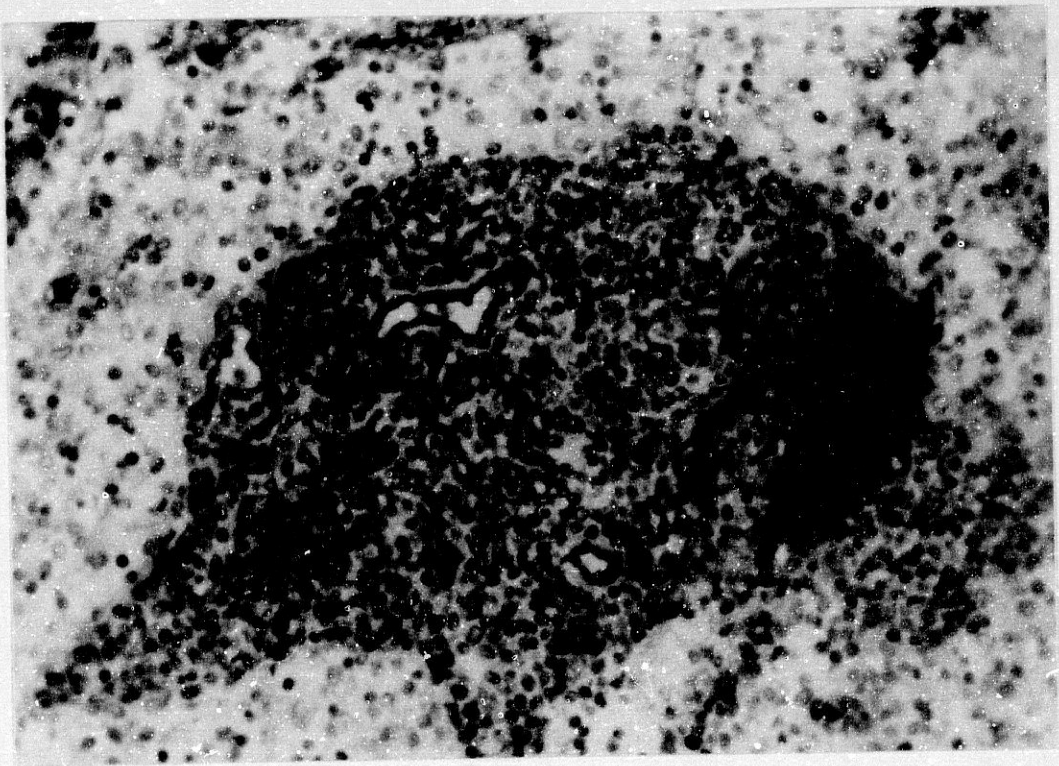
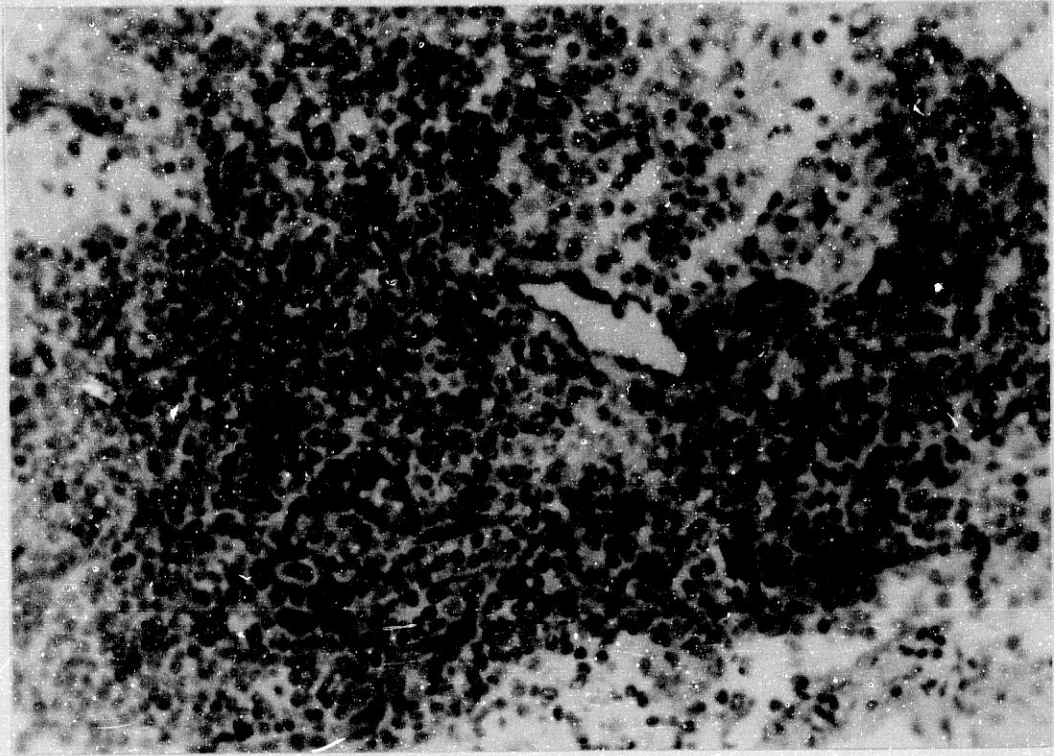


Figura 13 a y b: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de ganglio linfático con el AcMo GRE.

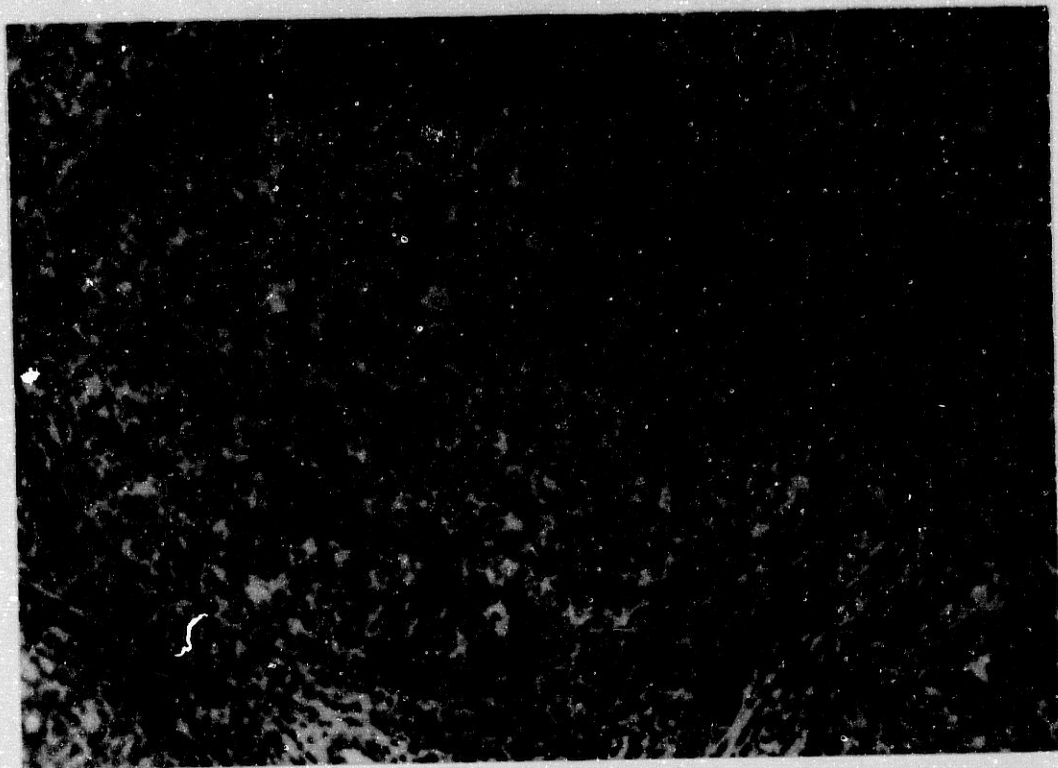


Figura 14 a y b: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de amígdala con el AcMo GRE.

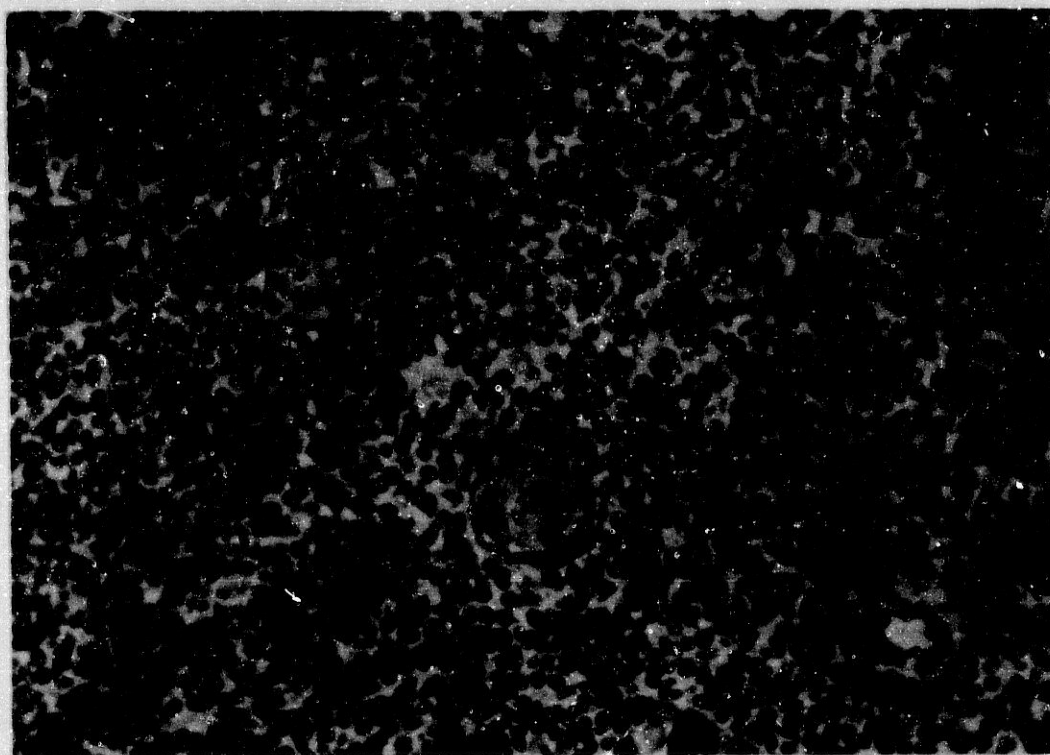


Figura 15 a y b: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de timo con el AcMo GRE.

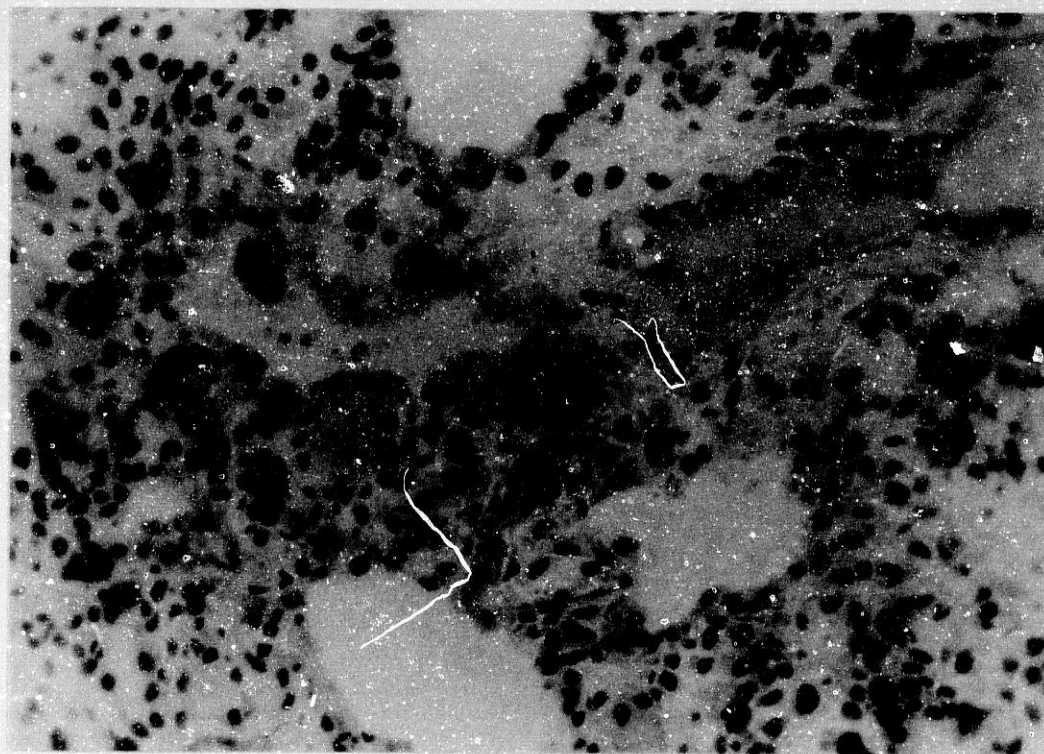
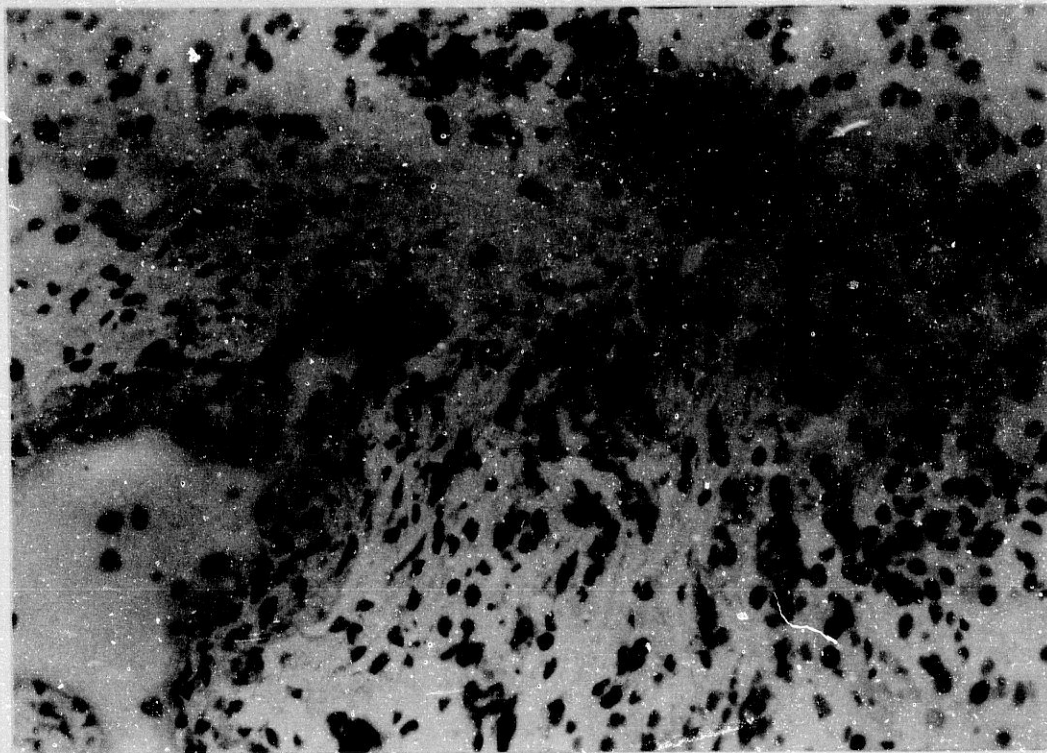


Figura 17 a y b: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de pulmón con el AcMo GRV1.



**Figura 16: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de bazo
con el AcMo GRE.**

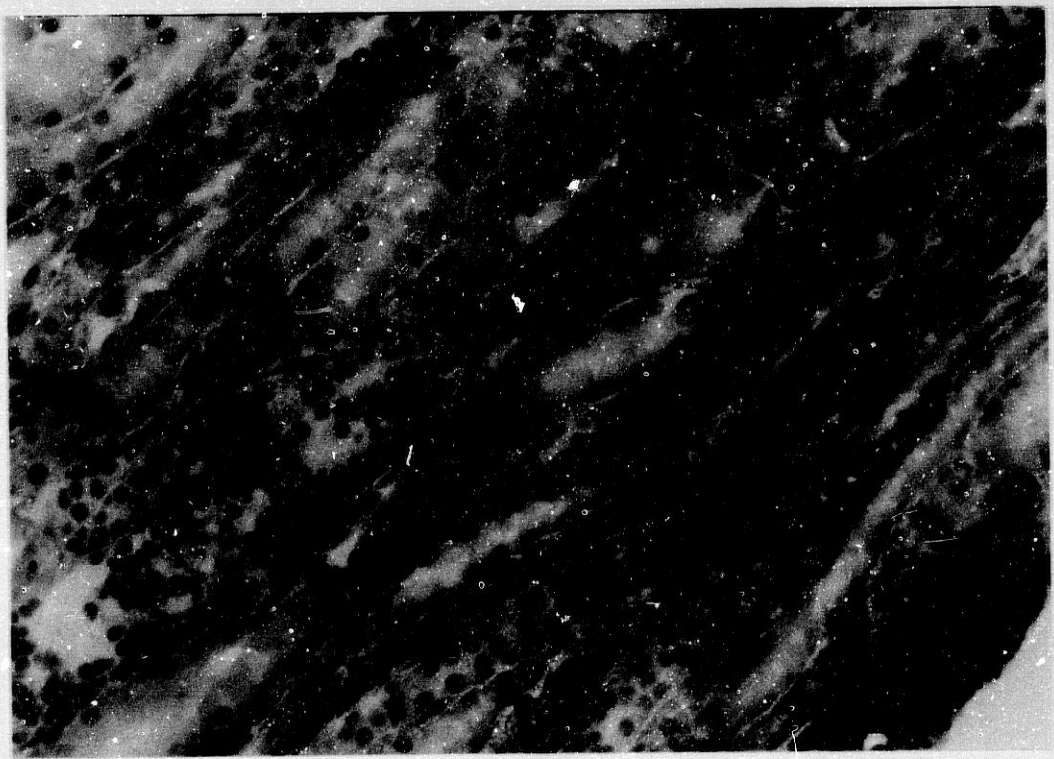


Figura 18 a y b: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de riñón con el AcMo GRV1.

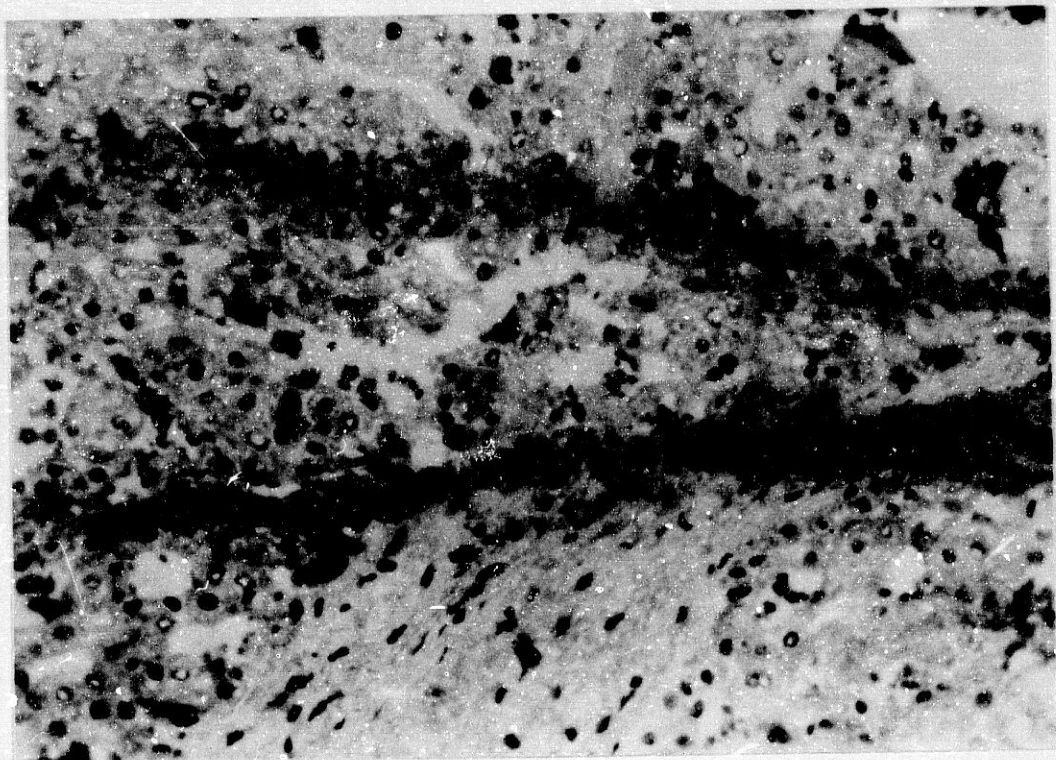


Figura 19: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de hígado con el AcMo GRV1.

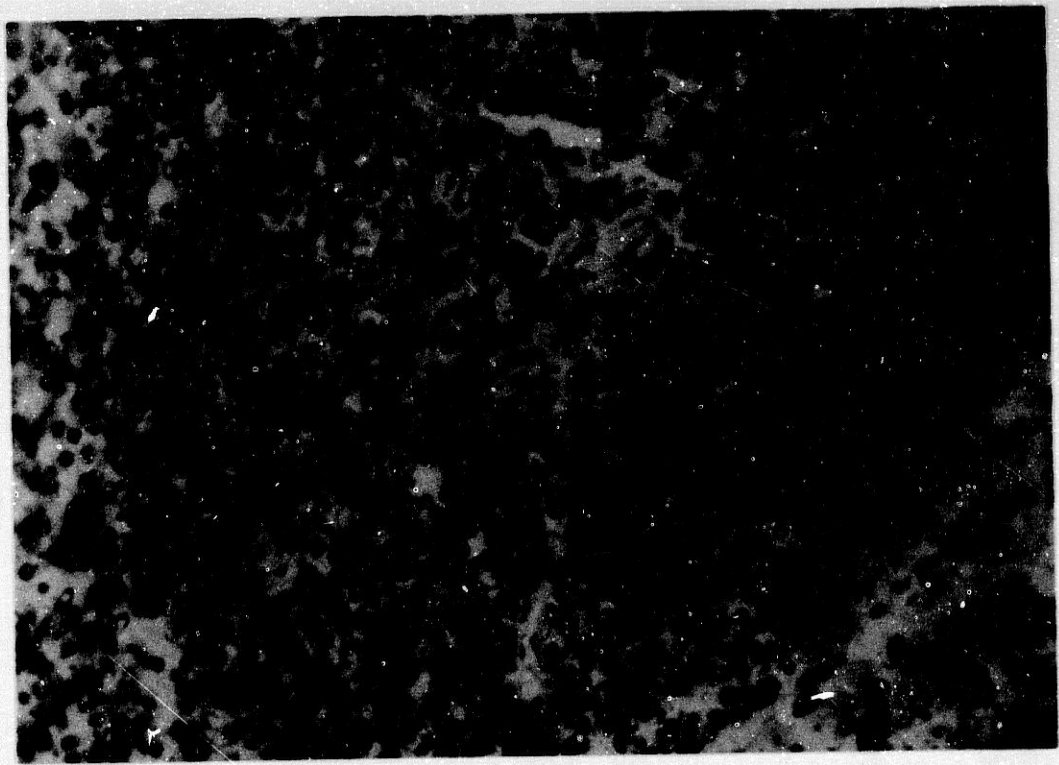
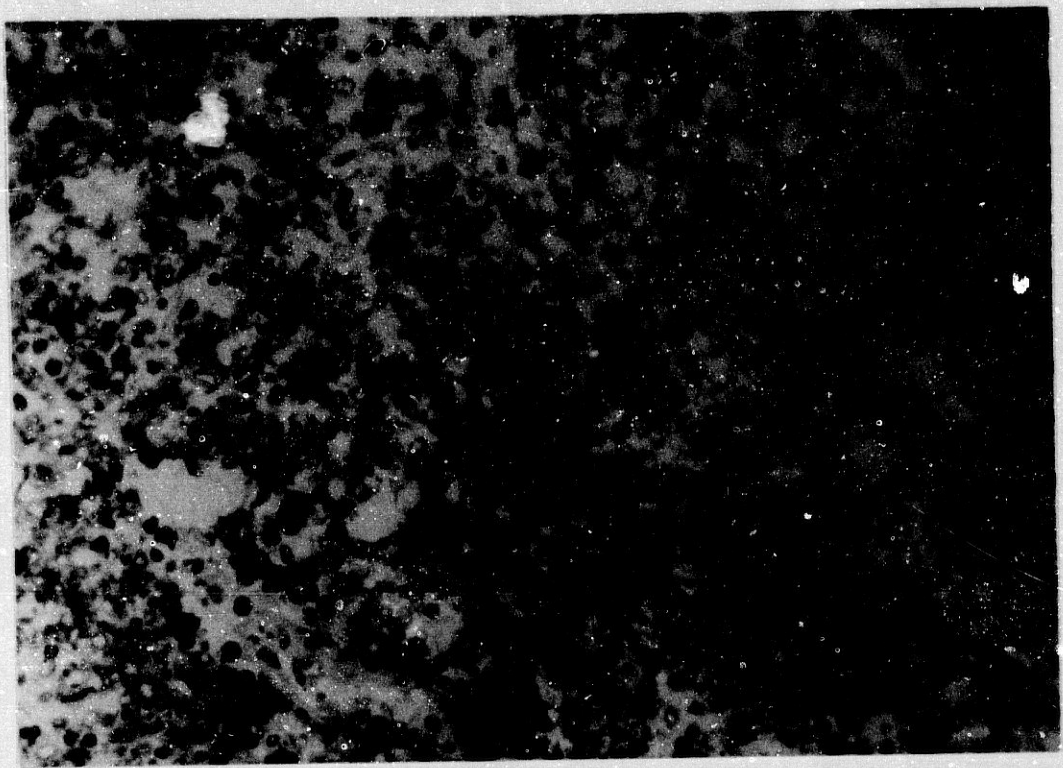


Figura 20 a y b: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de ganglio linfático con el AcMo GRV1.

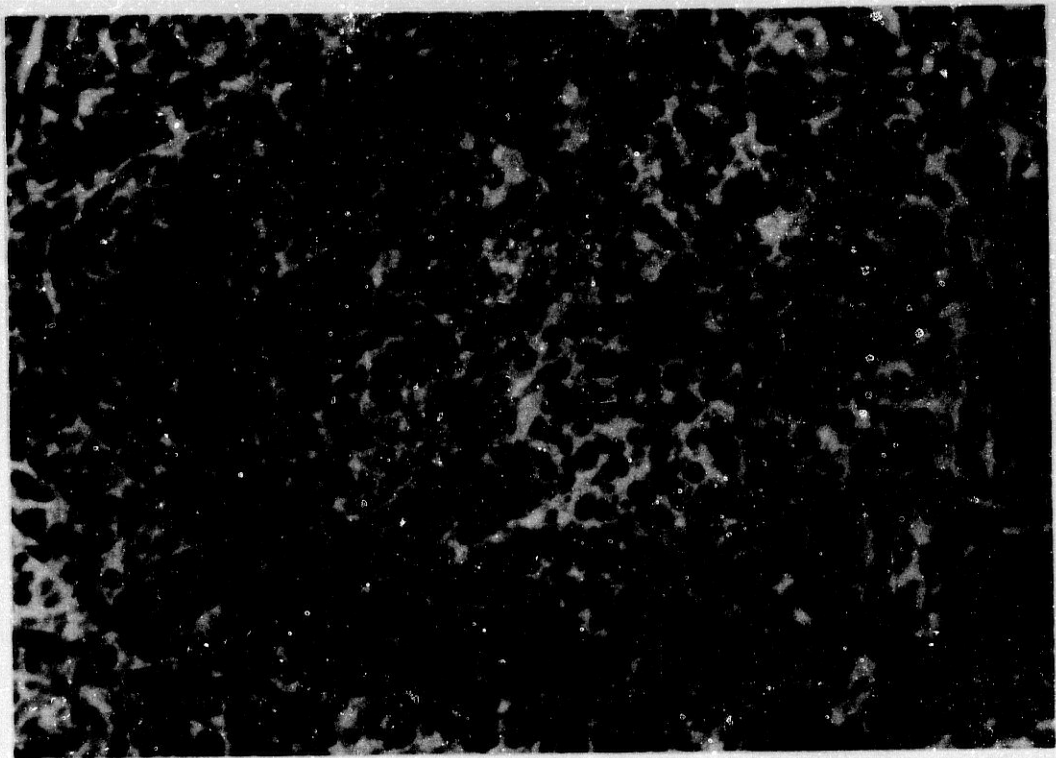
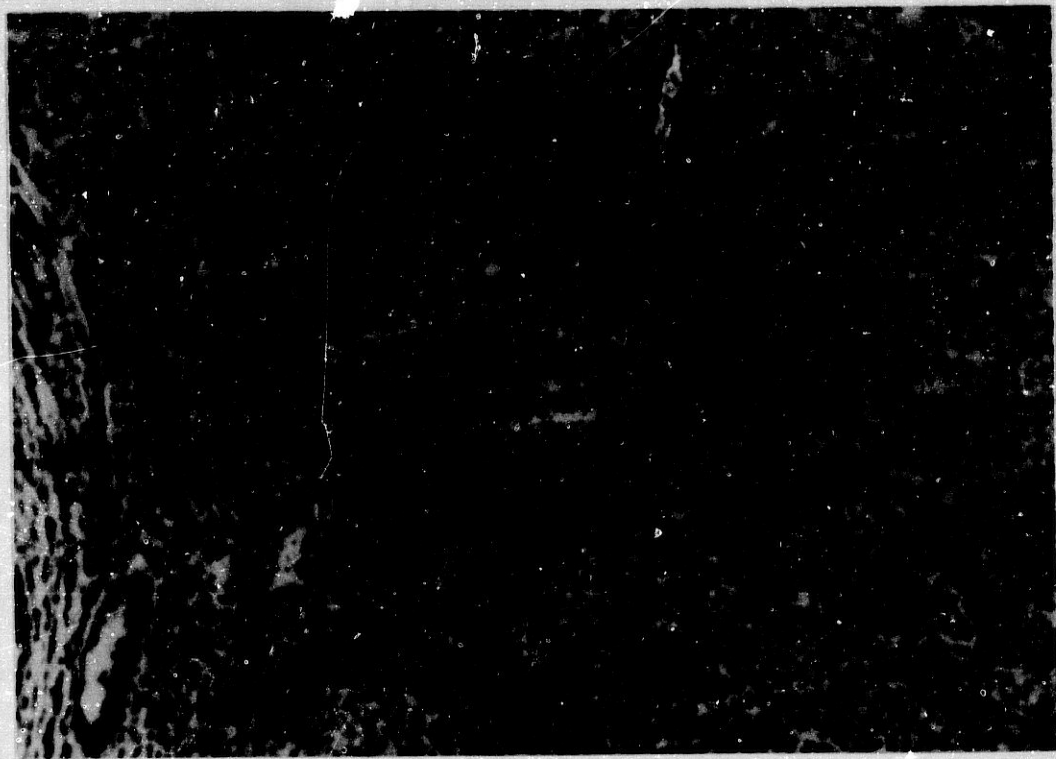


Figura 21 a y b: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de amígdala con el AcMo GRV1.

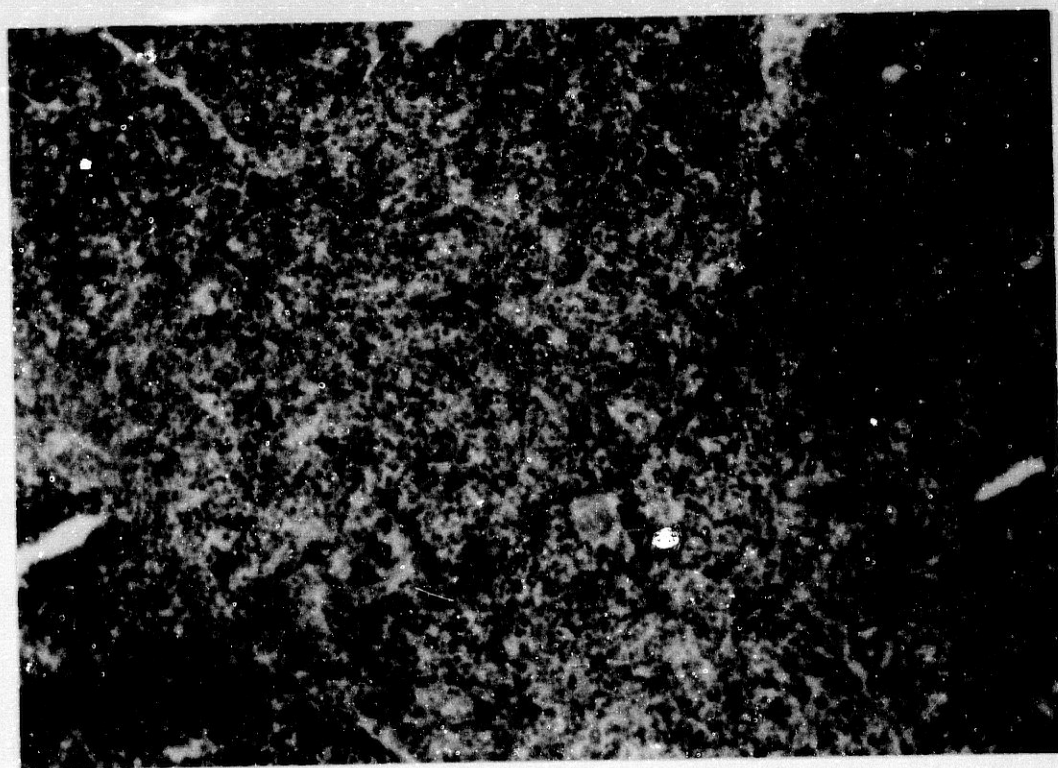
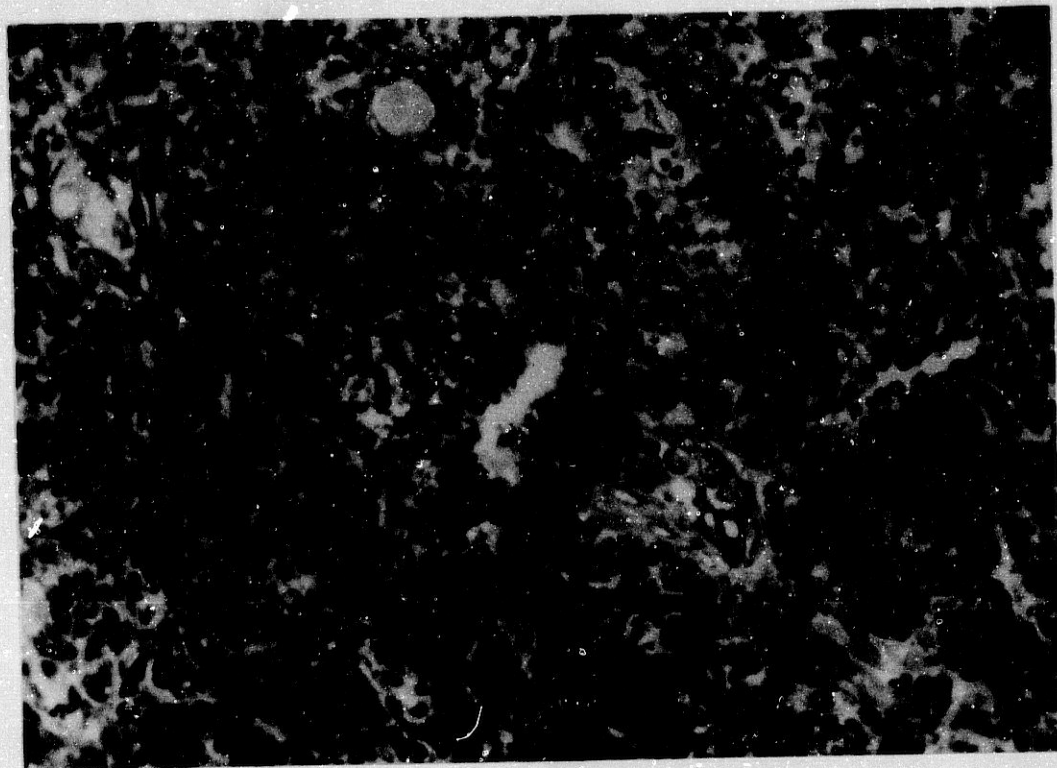


Figura 22 a y b: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de timo con el AcMo GRV1.

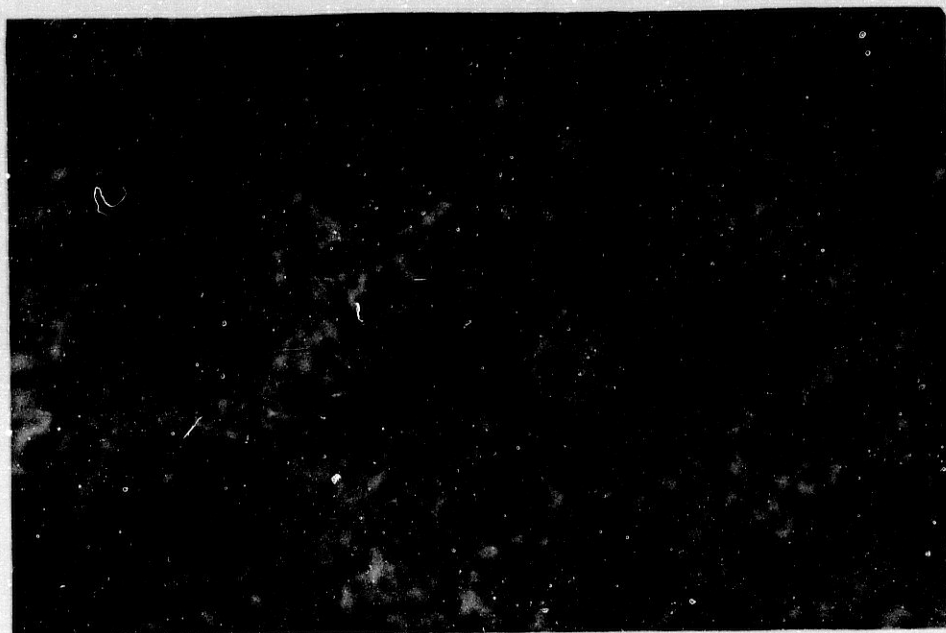


Figura 23: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de bazo con el AcMo GRV1.

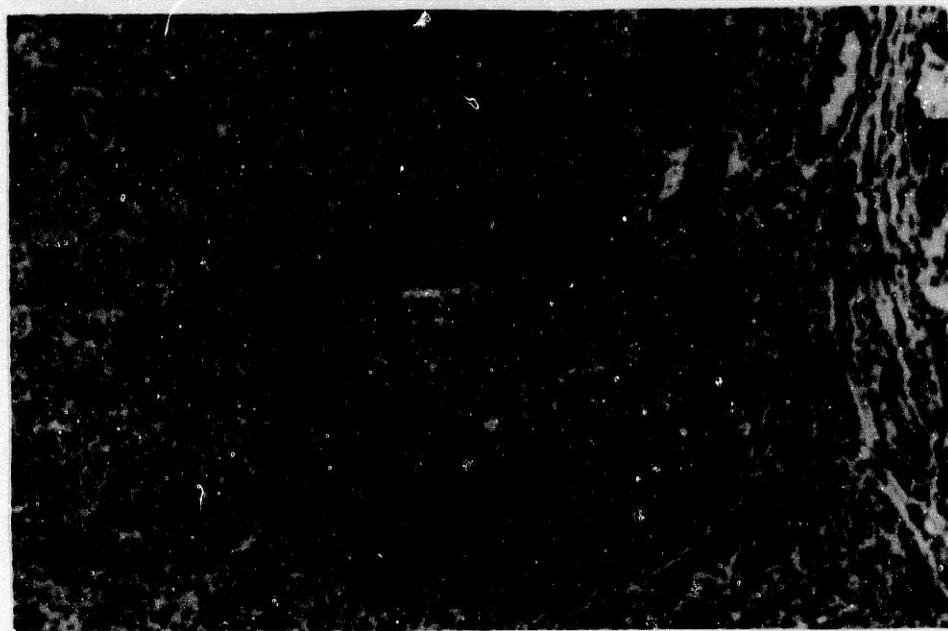
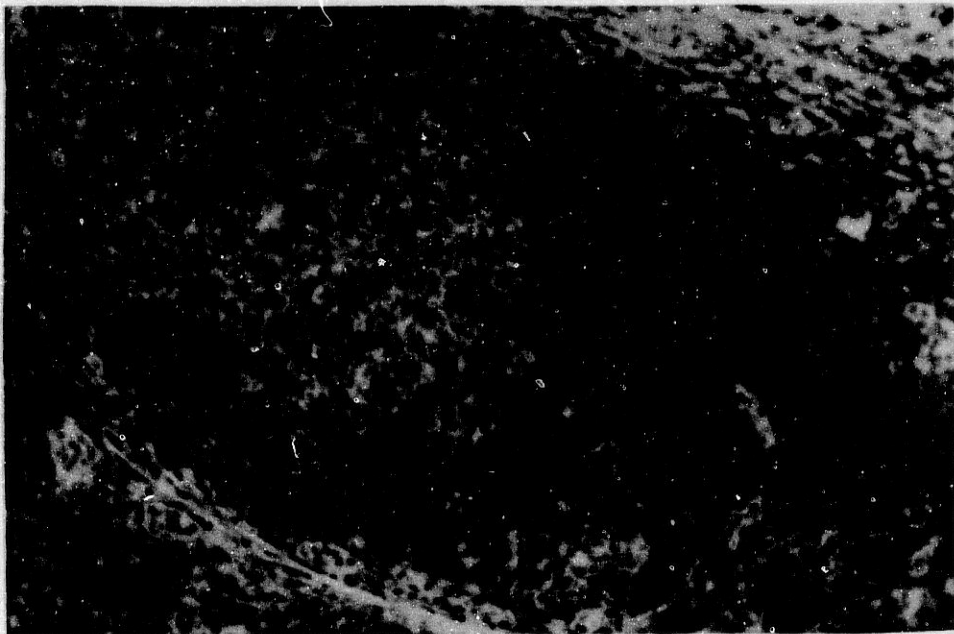


Figura 24: Fosfatasa alcalina sobre corte criostático de bazo con el AcMo HC11 (superior) y GRV1 (inferior).

Patrón de inmunoprecipitación

- **Figura 25:** Inmunoprecipitados correspondientes a los AcMo GRT5, GRT6, GRT7 y GRT8. Patrón constituido por dos bandas de peso molecular relativo de 220 y 190 kd.
- **Figura 26:** Inmunoprecipitación de los AcMo GRT23 y GRT24 donde se aprecia una banda de 220 kd.
- **Figura 27:** Inmunoprecipitación de los AcMo GRE y GRV1. El AcMo GRE presenta una banda de 90 kd en condiciones reductoras y de 180 kd en condiciones no reductoras. El AcMo GRV1 precipita dos bandas de 150 y 120 kd y otra de 20 kd en condiciones reductoras; después de tratar en condiciones no reductoras aparecen dos bandas de 180 y 130 kd.
- **Figura 28:** Inmunoprecipitación bajo condiciones reductoras de los AcMo GRE y GRV1, con sus bandas correspondientes de 90 kd y de 150, 120 y 20 kd, respectivamente.

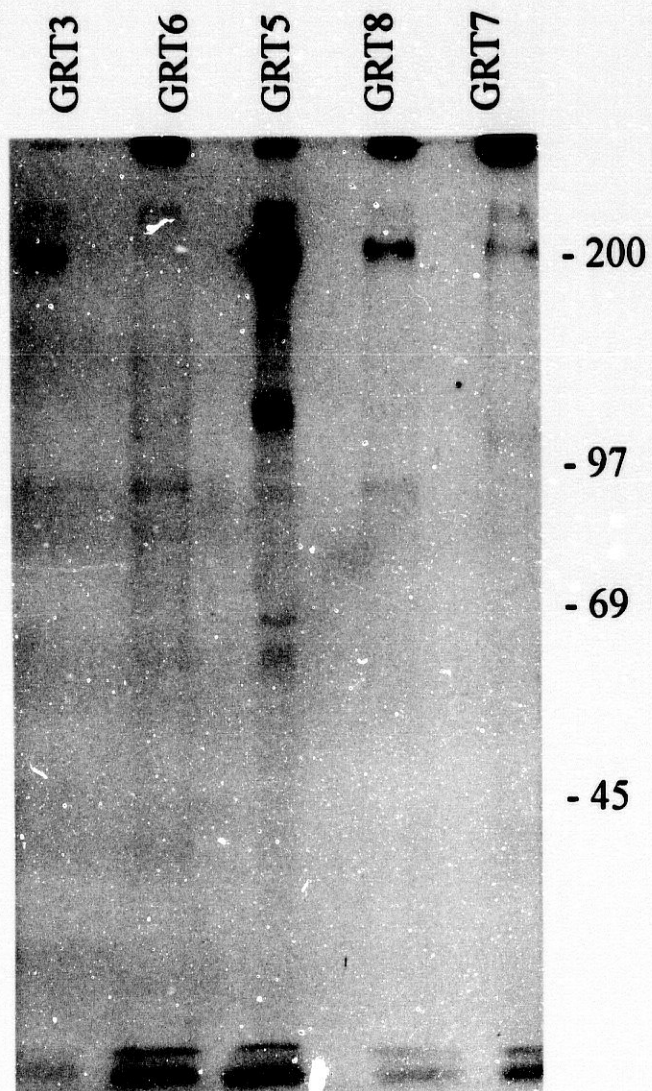


Figura 25: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5% con SDS de los inmunoprecipitados correspondientes a los AcMo GRT5, GRT6, GRT7 y GRT8. Control positivo GRT3 (CD45).

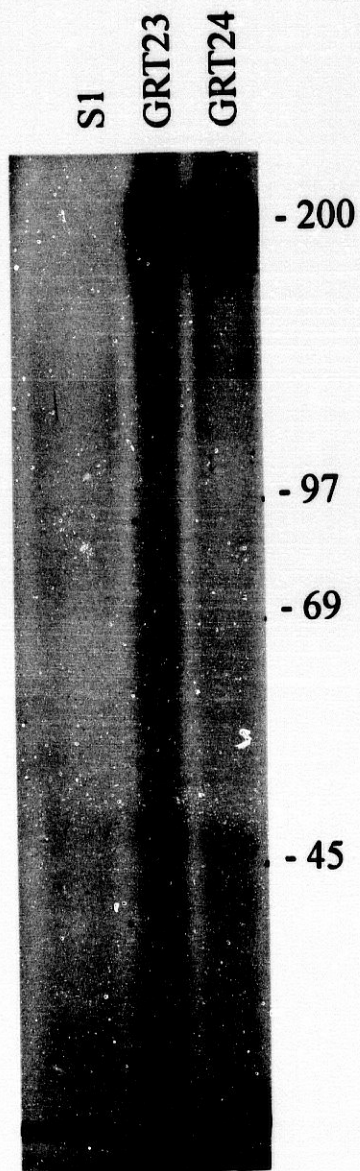


Figura 26: Inmunoprecipitación de los AcMo GRT23 y GRT24. Control negativo S1 (antiCD14).

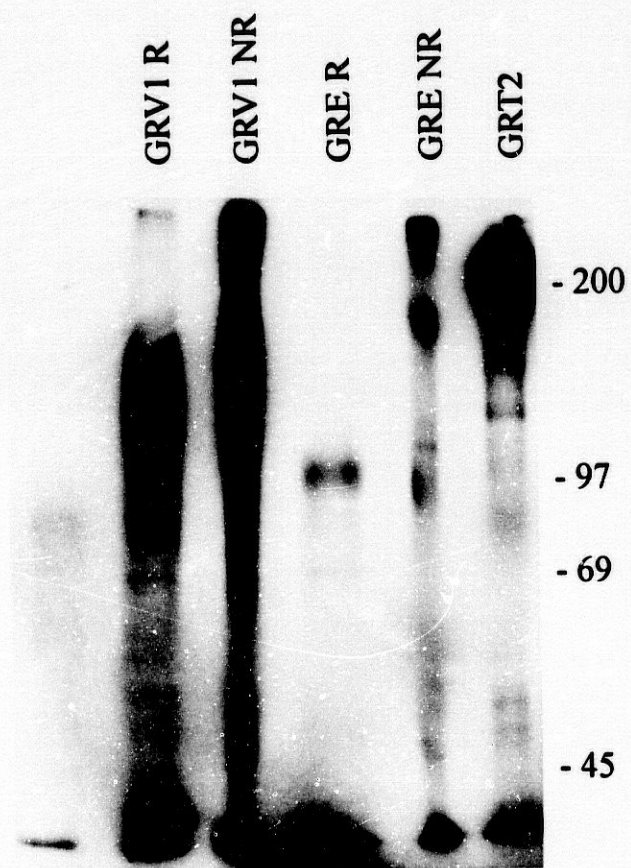


Figura 27: Inmunoprecipitación bajo condiciones reductoras y no reductoras de los AcMo GRE y GRV1. Control positivo GRT2 (antiCD45).

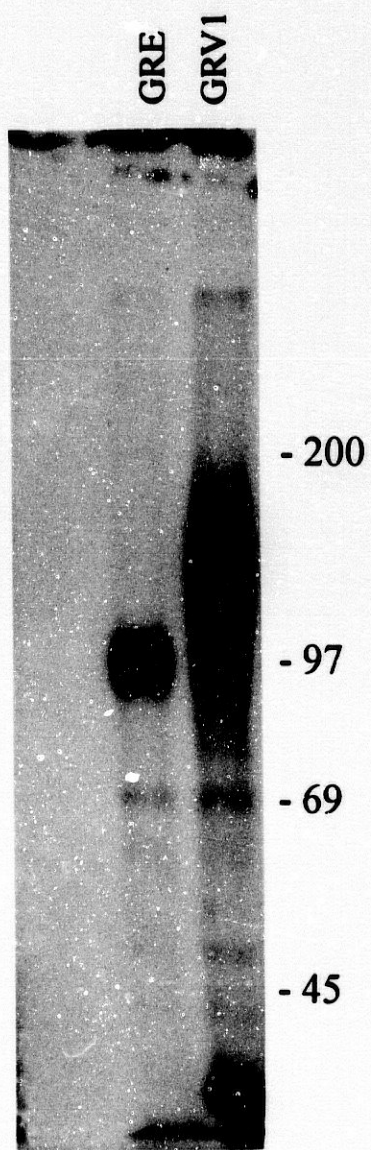


Figura 28: Inmunoprecipitación bajo condiciones reductoras de los AcMo GRE y GRV1.

DISCUSIÓN

Gracias a la investigación mediante anticuerpos monoclonales, es posible identificar y caracterizar gran cantidad de estructuras presentes en la superficie celular. El objetivo del presente estudio consiste en caracterizar estructuras moleculares presentes en linfocitos B con la producción de anticuerpos monoclonales específicos mediante la técnica, ampliamente desarrollada en la Introducción y en el Material y Método de este trabajo de investigación.

Para analizar detenidamente los resultados de este estudio hemos de dividirlo en tantos apartados como grupos de anticuerpos monoclonales se han obtenido. De este modo podemos diferenciar cuatro grupos:

1. AcMo GRT5, GRT6, GRT7 y GRT8.
2. GRT23 y GRT24.
3. GRV1.
4. GRE.

Seguidamente pasamos a relatar someramente las características obtenidas de estos AcMo para poder determinar en qué grupo de anticuerpos de diferenciación quedan englobados.

1 y 2. Los AcMo GRT5, GRT6, GRT7 y GRT8 reaccionan intensamente con un patrón de células normales, siendo negativos para las plaquetas; reconocen tanto células de leucemia crónica como aguda y son positivos frente a líneas celulares pre-pre B (NALM-6), igualmente con algunas líneas celulares derivadas del linfoma de Burkitt, serie eritroleucémica (K562), mielomonoblástica (U-937) y LLA-T (MOLT-4).

Desde el punto de vista inmunoquímico precipitan en dos bandas de 220 y 190 kd, esta última con mayor intensidad.

Los AcMo GRT23 y GRT24 reaccionan en un 11-15% con linfocitos de sangre periférica y con monocitos. Son también positivos con células de leucemia tanto aguda como crónica, aunque esta última con mayor intensidad; presentan moderada positividad frente a líneas celulares pre-pre B, linfoma de Burkitt y LLA-T, del mismo modo son positivos con la línea eritroleucémica y mielomonoblástica. La inmunoprecipitación denota una banda de 220 kd.

Todas estas características determinan que este grupo de anticuerpos sean englobados dentro de CD45 o antígeno común leucocitario (LCA). Se trata de una familia de cinco a más glicoproteínas de membrana con un alto peso molecular (180, 190, 205, 220 kd), que se encuentran de forma abundante en la mayoría de las células de origen hematopoyético (Ornary et al., 1980). En la literatura es posible encontrar otros nombres para este grupo de moléculas: T200, B220, Ly-5 ó CD45 (Thomas, 1989).

Las diferentes isoformas del grupo de anticuerpos reconocidos por este tipo de AcMo ofrecen una gran heterogenicidad, al parecer provocada por distintos RNAm, derivados de un simple gen estructural, que codifican glicoproteínas de un peso molecular aparentemente específico (Raschke, 1987) y un contenido carbohidratado diferente (Lefrancois et al., 1985). El empleo diferencial de tres exones denominados A, B y C que codifican 66, 47 y 48 aminoácidos respectivamente es, en definitiva, la causa de tal heterogenicidad (Streuli et al., 1988).

La estimulación de granulocitos aumenta rápidamente la expresión de LCA a partir de los almacenes intracelulares (Lacal et al., 1988). Ocurre además que la mayor expresión de LCA en estas células va acompañada de cambios en el miembro familiar expresado. Clásicamente, a este grupo de moléculas se le ha involucrado en el bloqueo de la actividad NK (Newman et al., 1983), participan en la diferenciación celular B (Yakura et al., 1983) y en la proliferación de células T (Clark y Ledbetter, 1986; Ruiz-Cabello et al., 1989). Todas las células B expresan formas de alto peso molecular desde etapas precoces de la diferenciación celular B, y preceden probablemente al reagrupamiento de los genes de inmunoglobulinas (Kinkade, 1987). No está claro que se produzcan cambios del miembro familiar LCA expresado cuando las células B son activadas para convertirse en células secretantes de anticuerpos. Las células B víralmente transformadas, plasmocitomas y líneas celulares leucémicas expresan formas de alto peso molecular (Raschke, 1980).

En el tercer Workshop Internacional, los anticuerpos dirigidos frente a este grupo de antígenos fueron englobados en dos grupos mayores de diferenciación: el CD45, que detecta epítomos característicos de todos los miembros de la familia LCA; y el CD45R, que reconoce sólo epítomos en algunos miembros (Schwinzer, 1989).

Como consecuencia de los estudios del cuarto Workshop Internacional, los AcMo de este grupo de diferenciación leucocitaria se dividen en tres subgrupos: CD45RA que reconocen un péptido de alto peso molecular (220 kd) presente en células B, monocitos, células T8 y algunos linfocitos T4; CD45RB que precipita con péptidos de 220, 205 y 190 kd y CD45RO, que reconocen el péptido más pequeño (180 kd), presente en subpoblaciones de células T y ausente de linfocitos B (Pulido et al., 1988).

La expresión de las distintas isoformas de LCA es también variable en líneas celulares. La línea celular T JURKAT, las líneas B (BALL 1 y DAUDI) presentan tres isoformas de 180, 195, 220 kd; la línea no T-no B NALL-1 expresa las isoformas de 180, 195 y 205 kd. El patrón de dos bandas de 205 y 220 kd surge en los inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CD45 de las líneas B JOK1, U9698 y JI (Chorváth et al., 1989).

En nuestro caso la línea KM3, presenta el patrón de dos bandas de 195, 220 kd que son precipitados conjuntamente con los AcMo GRT5, GRT6, GRT7, y GRT8. Las diferencias observadas en la intensidad de las bandas se deben probablemente a variaciones en el grado de afinidad. Por tanto, estos

AcMo se pueden incluir dentro del grupo CD45 ya que reconocen un epitopo común a las isoformas del LCA.

Los AcMo GRT23 y GRT24 precipitan en la línea KM3 sólo la banda de peso molecular mayor, de 220 kd lo que nos permite asignarlos al grupo CD45RA. Otro AcMo incluido dentro de este grupo de diferenciación, el PD7 inmunoprecipita péptidos de 220, 205 y 190 kd, reacciona con la mayoría de los linfocitos; sin embargo, no lo hace con las células T de los nódulos linfoides ni con macrófagos sinusoidales. En el timo este anticuerpo se deposita preferentemente en la zona medular. Otros dos AcMo CD45, el RP1/11 que inmunoprecipita formas de 220 kd y el UCHL1, reaccionan con un pequeño número de leucocitos. El primero de ellos se une a linfocitos T de la zona paracortical en el tejido amigdalario y nódulos linfoides y también a linfocitos B del centro germinal y zona del manto. Un pequeño número de timocitos medulares reaccionan con RP1/11; y el AcMo UCHL1 con algunas células T del centro germinal y región paracortical de nódulos linfoides (Thomas, 1989).

Las moléculas CD45 han sido implicadas en varias funciones inmunes: diferenciación celular B (Yakura et al., 1983); actividad de células accesorias (Maino et al., 1981), de células NK (Newman et al., 1983), y de células T citotóxicas (Lefrancois y Bevan, 1985); respuesta celular T a aloantígenos (Harp et al., 1984); proliferación de células T a mitógenos policlonales (Martorell et al., 1987); y en la respuesta proliferativa celular B (Mittler et al., 1987). Estudios estructurales con la molécula CD45 sugieren que ésta puede actuar como receptor con una función de transducción de señales intracelulares

y/o conexión con componentes intracelulares tales como elementos citoesqueléticos (Bourguignon et al., 1985).

Smeland et al., (1989) demuestran qué papel desempeña el LCA en la activación celular B, de tal forma que con anti-LCA es posible inhibir la inducción de *c-myc* RNAm en células B activadas con anti- μ y BCGF de forma dosis-dependiente. Del mismo modo, la activación con anti-Ig de las células B maduras se acompaña de un rápido incremento de la expresión de *c-myc* RNAm (Smeland et al., 1985), y la adición de anti-CD45 inhibe de forma importante este efecto.

La analogía entre el dominio citoplasmático del CD45 y la tirosinofosfatasa placentaria (Charbonneau et al., 1988) sugieren que la desfosforilación de los residuos tirosil de las moléculas involucradas en las señales de membrana puede ser importante en la acción inhibitoria producida por anticuerpos CD45.

En cuanto a las características inmunohistológicas del CD45, podemos resaltar la capacidad de muchos Ac CD45R para reaccionar con secciones de parafina, lo que resulta de gran utilidad para el diagnóstico fenotípico de los linfomas no Hodgkin (Warnke et al., 1983).

3. AcMo GRV1: Es negativo para células normales, débilmente positivo con granulocitos-monocitos con células de leucemia tanto aguda como crónica, reacciona con todo tipo de líneas celulares B (pre-pre B, linfoma de Burkitt, B transformada EBV), promielocítico eritroleucemia y

mielomonoblástica siendo negativa para LLA-T. En la inmunoprecipitación se producen dos bandas de 150-120 y 20 kd en condiciones no reducidas y una banda de 180-130 kd bajo condiciones reducidas. Su distribución inmunohistológica especialmente en vasos de pequeño calibre. En folículos linfoides se puede observar una distribución preferencial a nivel de células dendríticas foliculares y macrófagos.

Este AcMo no se puede incluir dentro de ninguno de los grupos de diferenciación leucocitaria definidos hasta el momento, ya que según el patrón de inmunoprecipitación podría tratarse del receptor para la vitronectina, CD51, pero nuestro AcMo a diferencia de otros AcMo CD51 reacciona sólo débilmente con plaquetas.

Recientemente se ha celebrado el quinto Workshop Internacional celebrado en Boston (Noviembre 1993) donde la molécula reconocida por el AcMo GRV1 es clasificado como un CD98. Es un marcador de células T y con un peso molecular bajo condiciones reductoras de 80, 40 kd. Esta diferencia en cuanto a los resultados de la inmunoprecipitación podría justificarse porque las condiciones reductoras empleadas no hayan sido adecuadas, a pesar de haber realizado la inmunoprecipitación en repetidas ocasiones. Dentro de este grupo de diferenciación leucocitaria se encuentra el AcMo 4F2 que reconoce un complejo glicoproteico de 125 kd compuesto por una subunidad pesada de 85 kd y otra subunidad ligera de 41 kd (Hemler y Strominger, 1982). Este AcMo se emplea para definir un antígeno presente en todos los cultivos tisulares humanos probados y en monocitos, no estando presente en células de sangre

periférica y células B. El AcMo 4F2 podría representar un importante eslabón en el estudio de la fisiología de los monocitos y en las circunstancias que coexisten durante la activación de los linfocitos humanos (Haynes et al., 1981).

4. AcMo GRE: No reacciona con células normales y lo hace débilmente con leucemia aguda y crónica; es positivo para líneas celulares prepre B, líneas B transformadas por EBV, líneas mielomonoblásticas y promielocíticas. No ofrece patrón de reacción con LLA-T ni eritroleucemico y lo hace débilmente para líneas celulares del linfoma de Burkitt. En la inmunoprecipitación se produce una banda de 180 kd en condiciones no reductoras y de 90 kd en presencia de mercaptoetanol, lo que sugiere que el antígeno reconocido es un homodímero de 90 kd. En cuanto a su distribución inmunohistológica, se expresa en vasos de pequeño y mediano calibre de órganos linfoides como timo, ganglios linfáticos y bazo. También se expresa débilmente en macrófagos de la zona marginal del bazo. Todos estos datos nos hacen pensar que el AcMo GRE reconoce a la endoglina. Para confirmar estos resultados se practica un estudio citofluorométrico con células de ratón transfectadas con el gen que codifica para la endoglina y se enfrentan con AcMo GRE y otros AcMo antiendoglina (44G4, 8E11), reflejando un resultado claramente positivo.

La endoglina es una glicoproteína expresada en gran cantidad de células humanas endoteliales de los capilares de arteriolas y vénulas en multitud de tejidos; se expresa fundamentalmente en la membrana plasmática de la célula endotelial. Cultivos celulares de vena umbilical parecen demostrar la presencia

de esta molécula a nivel citoplasmático, por lo que existe la posibilidad de que las células endoteliales *in vivo* posean una pequeña cantidad de este antígeno en su citoplasma (Gougos y Letarte, 1988a). Esta molécula fue identificada por primera vez con el AcMo 44G4 generado frente a una línea celular de leucemia pre-B (HOON) (Quackenbush y Letarte, 1985). Está presente débilmente en células de leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielocítica y en un pequeño porcentaje de células de médula ósea normal (3-7%), pero no se ha demostrado su presencia a nivel de la LLA-T. Se trata de un homodímero con peso molecular de 170-180 kd bajo condiciones no reductoras y de 90-95 kd en condiciones reductoras (Gougos y Letarte, 1988b). Mediante el método de la inmunoperoxidasa indirecta se ha podido comprobar que el AcMo 44G4 reacciona fuertemente con células endoteliales de diferentes secciones tisulares humanas (nódulo linfoide, amígdala, bazo, timo, riñón, pulmón e hígado). No expresan Ag 44G4 las células normales (granulocitos, monocitos, linfocitos B y T) y lo hacen débilmente las células de leucemia linfocítica aguda no-T, mielocítica aguda y linfocítica aguda. Las líneas celulares leucémicas de origen pre-B y mielomonocítica presentan una reactividad moderada (Gougos y Letarte, 1988a).

Es, por tanto, una molécula exclusiva de todas las células endoteliales de los tejidos, excepto de la médula ósea, lo que puede determinar su potencial empleo en purificar células endoteliales como, por ejemplo, en el sarcoma de Kaposi (Gougos y Letarte, 1990). Estos autores aíslan el cDNA de esta proteína integral de membrana que posee un peso molecular de 68 kd con una región extracelular de 561 aa, un campo o dominio hidrofóbico transmembrana

de 25 aa y una cola citoplasmática de 47 residuos aminoacídicos. Contiene un tripéptido RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), el primero identificado en una superficie proteica del endotelio (Gougos y Letarte, 1990). Esta secuencia aminoacídica es llave fundamental en el reconocimiento de proteínas estructurales de la matriz extracelular, tales como fibronectina, vitronectina, factor de von Willebrand, colágeno tipo I y fibrinógeno, que interaccionan con receptores específicos de la superficie celular denominados integrinas (Hynes, 1987).

La expresión prácticamente restrictiva de endoglina en el endotelio vascular puede sugerir que esta molécula posee un papel en los procesos de migración de las células sanguíneas (Gallatin et al., 1983), o en los procesos de migración de neutrófilos y monocitos (Lewinohn et al., 1987). Es posible demostrar la presencia de una pequeña subpoblación de células endoglina positivas en médula ósea, que resultan ser proeritroblastos (Bühning et al., 1991), sugiriendo que estas células pueden utilizar a la molécula de endoglina para interaccionar con las células estromales. Igualmente, la expresión de endoglina podría significar una *sobrerregulación* de las células leucémicas, incrementando sus propiedades adhesivas y, potencialmente, la diseminación de la leucemia.

Parece existir relación entre la molécula de endoglina y el sistema de receptores TGF- β (citoquina fundamental en el desarrollo embrional y en regular la reparación y regulación de los tejidos después de una agresión; Border y Ruoslahti, 1992). Determinadas regiones de la endoglina poseen

idénticas secuencias aminoacídicas que el β -glicano, una proteína mayor de unión para el TGF- β que coexiste con los receptores TGF- β I y II en una gran variedad de líneas celulares, aunque es escaso o no existe en las células endoteliales. Se ha podido demostrar que la proteína mayor de unión del TGF- β I que coexiste con los receptores I y II a nivel de las células endoteliales de vena umbilical humana es la endoglina (Cheifetz et al., 1992).

Recientemente se ha demostrado que diferentes AcMo antiendoglina (44G4, HEC-19, CMAC8, 8E11 y 1G2) reaccionan fuertemente con el sincitiotrofoblasto placentario, que juega un papel esencial en el intercambio de nutrientes y protección inmunológica del feto (Gougos et al., 1992).

En el último Taller de Antígenos de Diferenciación Leucocitaria, celebrado en Boston (Noviembre 1993), el antígeno reconocido por los AcMo antiendoglina ha sido caracterizado como un CD105.

CONCLUSIONES

Según la caracterización inmunoquímica y el patrón de distribución celular, los AcMo obtenidos frente a la línea pre-B KM3 pueden asignarse a los siguientes grupos de diferenciación linfocitaria:

1. GRT5, GRT6, GRT7 y GRT8 corresponden al grupo de diferenciación linfocitaria CD45 o Antígeno Común Leucocitario (LCA, T200).
2. GRT23 y GRT24, por sus características de reactividad celular así como, su patrón de inmunoprecipitación quedan incluidos dentro del CD45RA.
3. GRV1: la molécula reconocida por este AcMo ha sido asignada al grupo de diferenciación leucocitaria CD98.
4. GRVE: reconoce la molécula de la endoglina, presente en células humanas endoteliales, este AcMo ha sido asignado al CD105.

BIBLIOGRAFÍA

Alt FW, Blackwell TK, Vancopoulos GD. Development of the primary antibody repertoire. *Science* 1987; 238: 1079-1087.

Anderson KD, Boyd AW, Fisher DC, et al. Isolation and functional analysis of human B cell populations. I. Characterization of the B1+B2+ and B1+B2- subsets. *J Immunol* 1985; 134: 820-827.

Bastian JF, Ruedi JM, MacPherson GA, et al. Lymphocyte ecto-5'-nucleotidase activity in infancy: increasing activity in peripheral blood B cells precedes their ability to synthesize IgG in vitro. *J Immunol* 1984; 132: 1767-1772.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. *J Clin Pathol* 1989; 42: 567-584.

Bhan AK, Nadler LM, Stashenko P, et al. Stages of B cell differentiation in human lymphoid tissue. *J Exp Med* 1981; 154: 737-749.

Bianco C, Patrick R, Nussenzweig V. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes. I. Separation and characterization. *J Exp Med* 1970; 132: 707-720.

Blatt J, Reaman G, Poplack DG. Current concepts: Biochemical markers in the lymphoid malignancy. *New Engl J Med* 1980; 303: 918-922.

Bollum FJ. Terminal deoxynucleotidyl transferase as a hemopoietic cell marker. *Blood* 1979; 54: 1203-1215.

Bonnefoy JY, Aubry JP, Peronne C, et al. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for the human lymphocyte low affinity receptor for IgE: CD23 is a low affinity receptor for IgE. *J Immunol* 1987; 138: 2970-2978.

Bonnefoy JY, Guillot O, Spits H, et al. The low-affinity receptor for IgE (CD23) on B lymphocytes is spatially associated with HLA-DR antigens. *J Exp Med* 1988; 167: 57-72.

Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor- in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 1992; 90: 1-7.

Bou, DR, LeBien TW. Low molecular weight B cell growth factor induces proliferation of human B cell precursor acute lymphoblastic leukemias. *J Immunol* 1986; 140: 192-199.

Bourguignon LY, Suchard SJ, Nagpal ML, et al. A T-lymphoma transmembrane glycoprotein (gp 180) is linked to the cytoskeletal protein, fodrin. *J Cell Biol* 1985; 101: 477-487.

Boyse EA, Old LJ. An approach to the mapping of antigens on the cell surface. *Annu Rev Genet* 1969; 3: 269-290.

Braesch-Andersen S, Paulie S, Koho H, et al. Biochemical characteristics and partial aminoacid sequence of the receptor-like human B cell and carcinoma antigen CDw40. *J Immunol* 1989; 142: 562-567.

Bühning HJ, Müller CA, Letarte M, et al. Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. **Leukemia** 1991; 5: 841-847.

Cabrera MT. Los anticuerpos monoclonales en el laboratorio clínico. **Rev Diag Biol** 1991; 40: 61-72.

Campana D, Patel M, Coustan-Smith E, et al. The expression of B-cell-associated antigens during B-cell ontogeny. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 187-190.

Charbonneau H, Tonks NK, Walsh KA, et al. The leukocyte common antigen (CD45): A putative receptor linked protein tyrosine phosphatase. **Proc Natl Acad Sci USA** 19; 85: 7182-7186.

Cheifetz S, Bellón T, Calés C, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor- receptor system in human endothelial cells. **J Biol Chem** 1992; 267: 19027-19030.

Chorváth B, Duraj J, Sedlák J, et al. Alteration of leukocyte common antigen and myeloid antigen cell-surface expression induced by a phorbol ester (TPA): immunoblotting and immunocytometric studies. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 634-637.

Clark EA, Ledbetter JA, Holly RC, et al. Polypeptides on human B lymphocytes associated with cell activation. **Hum Immunol** 1986; 16: 100-113.

Clark EA, Ledbetter JA. Structure, function, and genetics of human B cell-associated surface molecules. *Adv Cancer Res* 1989; 52: 81-149.

Clark EA, Ledbetter JA. Amplification of the immune response by agonistic antibodies. *Immunol Today* 1986b; 7: 267-278.

Clark EA, Ledbetter JA. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986a; 83: 4494-4498.

Clark EA, Shu G, Ledbetter JA. Role of the Bp35 cell surface polypeptide in human B-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1766-1770.

Clark EA, Shu G. Activation of human B cell proliferation through surface Bp35 (CD20) polypeptides or immunoglobulin receptors. *J Immunol* 1987; 138: 720-725.

Cook RG, Laudolfi NF, Mehta V, et al. Interleukin-2 mediated an alteration in the T200 antigen expressed on activated B lymphocytes. *J Immunol* 1987; 139: 991-997.

Cooper MD. Pre-B cells; normal and abnormal development. *J Clin Immunol* 1981; 1: 81-89.

Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al. Immunogen enzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 219-232.

DeFrance T, Aubry JP, Rousset F, et al. Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165: 1459-1467.

Dickler HB, Kunkel HG. Interaction of aggregated globulin with B lymphocytes. *J Exp Med* 1972; 136: 191-196.

Dörken B, Moldenhauer G, Pezzutto H, et al. HD39(B3), a B lineage-restricted antigen whose cell surface expression is limited to resting and activated human B lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136: 4470-4479.

Dörken B, Möller P, Pezzutto A, et al. B-cell antigens: CD19. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 33-34.

Dörken B, Möller P, Pezzutto A, et al. B cell antigens: CD72. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 99.

Dörken B, Möller P, Pezzutto A, et al. B-cell antigens: CD73. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 101-102.

Dörken B, Moller P, Pezzutto A, et al. B-cell antigens: CDw75. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 107-109.

Dörken B, Möller P, Pezzutto A, et al. B-cell antigens: CD76. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989b, 112-115.

Dörken B, Möller P, Pezzutto A, et al. B-cell antigens: CD77. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989c, 117-118.

Dörken B, Möller P, Pezzutto A, et al. B-cell antigens: CDw78. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989d, 120-122.

Dörken B, Möller P, Pezzutto a, et al. B-cell antigens: CD74. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 103-104.

Durie BG, Grogan TM. cALLA-positive myeloma: an aggressive subtype with poor survival. *Blood* 1985; 66: 229-232.

Edwards NL, Gelfand EW, Burk L, et al. Distribution of 5'-nucleotidase in human lymphoid tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 3474-3476.

Edwards NL, Magilavi DB, Cassidy JT, et al. Lymphocyte ecto-5'-nucleotidase deficiency in agammaglobulinemia. *Science* 1978; 201: 628-630.

Epstein AL, Marder RJ, Winter JN, et al. Two new monoclonal antibodies (LN-1, LN-2) reactive in B5-formalin-fixed, paraffin-embedded tissues with follicular center and mantle zone human B lymphocytes and derived tumors. **J Immunol** 1984; 133: 1028-1036.

Erikstein BK, Beiske K, Smeland EB, et al. Characterization of mAb B41 (HH2) recognizing a cell-cycle regulated formalin-resistant antigen specific for human B-cells. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 110.

Fellous M, Cartron JP, Wiels J, et al. A monoclonal antibody against a Burkitt Lymphoma associated antigen has an anti-Pk red blood cell specificity. **Br J Haematol** 1985; 60: 559-565.

Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. **Proc Natl Acad Sci USA** 1984; 81: 4510-4514.

Fleit H, Conklyn M, Stebbins RD, et al. Function of 5'-nucleotidase in the uptake of adenosine from AMP by human lymphocytes. **J Biol Chem** 1975; 250: 8889-8892.

Foon KA, Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. **Blood** 1986; 68: 1-31.

Frade R, Crevon MC, Vazquez L, et al. Enhancement of human B cell proliferation by an antibody to the C3d receptor, the gp 140 molecule. **Eur J Immunol** 1985; 15: 73-76.

Freedman AS, Boyd AW, Fisher DC, et al. Antigenic changes of the B cell panel of the second international workshop on human leucocyte differentiation antigens with in vitro activation. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, et al. eds. *Leucocyte Typing II*. New York, Springer-Verlag, 1986; 443-454.

Freedman AS, Freedman G, Horowitz JC, et al. B7, a B-cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells. *J Immunol* 1987; 139: 3260-3267.

Funderud S, Asheim HC, Beiske K, et al. Characterization by mAb FN1 and FN4 of a new antigen (CDw78) preferentially expressed on B-cells. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 124-126.

Fyte G, Cebra-Thomas JA, Mustain E, et al. Subpopulations of B lymphocytes in germinal centers. *J Immunol* 1987; 139: 2187-2194.

Galfre G, Howe S, Milstein C, et al. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 1977; 266: 550-552.

Galfre G, Howe S, Milstein C, et al. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 1977; 266: 550-558.

Galfre G, Howe SC, Milstein C, et al. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell. *Nature* 1977; 266: 550-552.

Gallatin WM, Weirman IL, Butcher EC. A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 1983; 304: 30-34.

Galton DA, McLennan IC. Clinical patterns in B lymphoid malignancy. *Clin Haematol* 1982; 11: 561-587.

Gattings WE, Kubafawa H, Cooper MD. A distinctive pattern of B cell immaturity in perinatal humans. *Immunol Rev* 1981; 57: 107-126.

Golay JT, Clark EA, Beverly PCL. The CD20 (Bp35) antigen is involved in activation of B cell from the G0 to the G1 phase of the cell cycle. *J Immunol* 1985; 135: 3795-3801.

Gordon J, Millsum MJ, Guy GR, et al. Resting B lymphocytes can be triggered directly through the CDw40 (Bp50) antigen. *J Immunol* 1988; 140: 1425-1430.

Gordon J, Webb AJ, Guy FR, et al. Triggering of B lymphocytes through derivatives indicate an allosteric mechanism of signalling. *Immunology* 1987; 60: 517-521.

Gordon J, Webb AJ, Walker L, et al. Two surface antigens, CD23(p45) and a novel p50 molecule, deliver distinct progression signals to activated B-lymphocytes. In: McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III*. Oxford, Oxford University Press, 1987a, 426-430.

Gougos A, Jacques SS, Greaves A, et al. Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemia cells, and syncytiotrophoblasts. *J Int Immunol* 1992; 4: 83-92.

Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 8361-8364.

Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemia cell line. *J Immunol* 1988a; 141: 1925-1940.

Gougos A, Letarte M. Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 1988b; 141: 1934-1940.

Gramatzki M, Ulrich L, Burger R, et al. Two newly developed anti-B-cell antibodies with unusual staining characteristics. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 111-113.

Greaves MF, Brown G, Rapson NT, et al. Antisera to an antigen on acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1975; 4: 67-84.

Greaves MF, Brown G. A human B lymphocyte specific antigen. *Nature New Biol* 1973; 246: 116-119.

Gregory CD, Tursz T, Edwards CF, et al. Identification of a subset of normal B cells with a Burkitt's lymphoma (BL)-like phenotype. *J Immunol* 1987; 139: 313-318.

Guy GR, Gordon J. Coordinated action of IgE and a B-cell-stimulatory factor on the CD23 receptor molecule up-regulates B-lymphocyte growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6239-6243.

Hamoaka T, Ono S. Regulation of B-cell differentiation: interactions of factors and corresponding receptors. *Annu Rev Immunol* 1986; 4: 167-204.

Hansson M, Falk K, Ernberg I. Epstein-Barr virus transformation of human pre-B cells. *J Exp Med* 1983; 158: 616-622.

Haynes BF, Hemler ME, Mann DL, et al. Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J Immunol* 1981; 126: 1409-1414.

Hemler ME. VLA proteins in the integrins family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 365-400.

Hemler ME. Adhesive proteins on hemopoietic cells. *Immunol Today* 1988; 9: 109-113.

Hemler ME, Strominger JL. Characterization of the antigen recognized by the monoclonal antibody (4F2): different molecular forms on human T and B lymphoblastoid cell lines. *J Immunol* 1982; 129: 623-628.

Hoffman-Fezer G, Knapp W, Thierfelder S. Anatomical distribution of call antigen expressing cells in normal lymphatic tissue and in lymphomas. *Leuk Res* 1982; 6: 761-767.

Hokland P, Ritz J, Schlossman SF, et al. Orderly expression of cell B antigens during the in vitro differentiation of nonmalignant human pre-B cells. *J Immunol* 1985; 135: 1746-1751.

Hsu SM, Jaffe ES, Leu M1 and peanut agglutinin stain the neoplastic cells of Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol* 1984; 82: 29-32.

Huellin C, Gonzalez M, Pedrinaci S, et al. Distribution of the CD45R antigen in the maturation of lymphoid and myeloid series: the CD45R negative phenotype is a constant finding in T CD4 positive lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 1988; 69: 173-179.

Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48: 549-554.

Iida K, Nadler LM, Nussenzweig V. Identification of the membrane receptor for the complement fragment C3d by means of a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1983; 158: 1021-1033.

Ikuta K, Takami M, Kim CW, et al. Human lymphocyte Fc receptor for IgE: sequence homology of cloned cDNA with animal lectins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 819-823.

Jalkanen S, Reichert RA, Gallatin WM, et al. Homing receptors and the control of lymphocyte migration. *Immunol Rev* 1986; 91: 39-60.

Johson SM, North ME, Asherson GL, et al. Lymphocyte purine 5'-nucleotidase deficiency in primary hypogammaglobulinemia. *Lancet* 1977; 1: 168-170.

Kehrl JH, Alvarez-Mon M, Delsing GA, et al. Lymphotoxin is an important T cell-derived growth factor for human B cells. *Science* 1987; 238: 1144-1146.

Kikutani H, Inue S, Sato R, et al. Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. *Cell* 1986; 47: 655-657.

Kikutani H, Kimura R, Nakamura H, et al. Expression and function of an early activation marker restricted to, human B cells. *J Immunol* 1986; 136: 4019-4026.

Kikutani H, Kishimoto T. The expression of Ba antigen during B-cell activation. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 123.

Kikutani H, Nakamura H, Sato R, et al. Delineation and characterization of human B cell subpopulations at various stages of activation by using a B cell-specific monoclonal antibody. *J Immunol* 1986; 136: 4027-4034.

Kikutani H, Suemura M, Owaki H, et al. Fc epsilon receptor, a specific differentiation marker transiently expressed on mature B cells before isotype switching. *J Exp Med* 1986; 164: 1455-1469.

Kinet JP. Antibody-cell interaction: Fc receptors. *Cell* 1989; 57: 351-354.

Kinkade PW. Experimental models for understanding B lymphocyte formation. *Adv Immunol* 1987; 41: 181-287.

Kishimoto T, Hirano T. Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annu Rev Immunol* 1988; 6: 485-512.

Kishimoto T. Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Annu Rev Immunol* 1985; 3: 133-157.

Klaus GG, Humphrey JH. Interleukin 4 (B cell growth factor II/eosinophil differentiation factor for preactivated murine B lymphocytes. **Immunol Today** 1986; 7: 163-165.

Knowles DM, Tolidjian B, Marboe CC, et al. Distribution of antigens defined by OKB monoclonal antibodies on benign and malignant lymphoid cells and on non lymphoid tissues. **Blood** 1984; 63: 886-896.

Kohler B, Milstein G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** 1975; 256: 451-495.

Lacal P, Pullido R, Sánchez-Madrid F, et al. Intracellular localization of T200 and molecular glycoproteins in human neutrophils. **J Biol Chem** 1988; 90: 9946-9951.

Lebetter JA, Shu G, Gallagher M, et al. Augmentation of normal and malignant B cell proliferation by monoclonal antibody to the B cell-specific antigen BP50 (CDw40). **J Immunol** 1987; 138: 788-794.

LeBien TW, McCormack RT. The common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CD10)-emancipation from a functional enigma. **Blood** 1989; 73: 625-635.

Ledbetter JA, Clark NA, Norris G, et al. Expression of a functional B-cell receptor CDw40 (Bp50) on carcinomas. In: McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III*. Oxford, Oxford University Press, 1987b, 432-435.

Ledbetter JA, Robinovitch PS, June CH, et al. Antigen-independent regulation of cytoplasmic calcium in B cells with a 12-kDa B-cell growth factor and anti-CD19. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1988; 85: 1897-1901.

Lee F, Yokota T, Otsuka T, et al. Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell-and mast-cell-stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2061-2066.

Lefrancois L, Bevan MJ. Functional modifications of cytotoxic T-lymphocyte T200 glycoprotein recognized by monoclonal antibodies. *Nature* 1985; 314: 449-452.

Lefrancois L, Goodman T. Developmental sequence of T200 antigen modifications in murine T cells. *J Immunol* 1987; 139: 3718-3724.

Lefrancois L, Puddington L, Machancer CE, et al. Acquisition of cytotoxic T lymphocyte-specific carbohydrate differentiation antigens. *J Exp Med* 1985; 162: 1275-1293.

Letarte M, Vera S, Tran R, et al. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med* 1988; 168: 1247-1253.

Lewinsohn DM, Bargatze RF, Butcher EC. Leucocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and others leukocytes. *J Immunol* 1987; 138: 4313-4321.

Ling NR, MacLennan IC, Mason DY B-cell antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III*. Oxford, Oxford University Press, 1987, 302-335.

Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, et al. Flow cytometric analysis of human bone marrow II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987; 70: 1316-1324.

López-Nevot MA, Esteban F, Ferrón A, et al. HLA class I gene expression on human primary tumours and autologous metastasis: demonstration of selective losses of HLA antigens on colorectal, gastric and laryngeal carcinomas. *Br J Cancer* 1989; 59: 221-226.

Ludwig W, Teichmann J, Harbott J, et al. Reactivity of acute mixed-lineage leukaemias with the B-cell panel of mAb: correlation between immunophenotype and genotype. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 191-193.

Lukes RJ, Collins RD. New approaches to the classification of the lymphoma. *Br J Cancer* 1975; 31: 1-28.

Lydyard P, Grossi C. La respuesta inmune adquirida. En: Roitt I, ed. *Inmunología esencial*. Barcelona, Jims, 1988, 134-153.

Ma DD, Sylwestrowicz TA, Granger S, et al. Distribution terminal deoxynucleotidyl transferase and purine degradative and synthetic enzymes in subpopulations of human thymocytes. *J Immunol* 1982; 129: 1430-1435.

Maclennan IC, Johnson GD, Khan M, et al. Antibodies staining a markedly higher proportion of B-cells in follicular mantles than in marginal zones. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 214-215.

Maino VC, Norcross MA, Perkins MS, et al. Mechanism of Thy-1-mediated T cell activation: role of Fc receptors, T200, Ia, and H-2 glycoproteins in accessory cell function. *J Immunol* 1981; 126: 1829-1836.

Marcus DM, Kundu SK, Suzuki A. The P blood group system: recent progress in immunochemistry and genetics. *Semin Hematol* 1981; 18: 63-71.

Martorell J, Vilella R, Borche L, et al. A second signal for T cell mitogenesis provided by monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1987; 17: 1447-1451.

Mason DY, Ladyman H, Gatter KC. Immunohistochemical analysis of monoclonal anti-B cell antibodies. In: Reinherz EI, Haymes BF, Nadler LM, et al. eds. *Leucocyte Typing II*. New York, Springer-Verlag, 1986, 245-255.

Mason DY, Stein H, Gerdel J, et al. Value of monoclonal anti-CD22 (p135) antibodies for the detection of normal and neoplastic B lymphoid cells. *Blood* 1987; 69: 835-840.

Massia M, Ma DD, Boccadoro M, et al. Decreased ecto-5'-nucleotidase of peripheral blood lymphocytes in human monoclonal gammopathies correlation with tumor cell kinetics. *Blood* 1985; 65: 530-534.

Massia M, Ma DD, Sylwestrowicz TA, et al. Enzymes of purine metabolism in human peripheral lymphocyte subpopulations. *Clin Exp Immunol* 1982; 50: 148-154.

Massia M, Pileri A, Boccadoro M, et al. The generation of alloreactive cytotoxic T lymphocytes requires the expression of ecto-5'-nucleotidase activity. *J Immunol* 1988; 141: 3768-3775.

Matsuyama T, Anderson P, Daley JF, et al. CD4+CD45R+ cells are preferentially activated through the CD2 pathway. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1473-1476.

McCormack RT, Nelson RD, LeBien TW. Structure/function studies of the common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA/CD10) expressed on human neutrophils. *Immunol* 1986; 137: 1075-1082.

Melchers F, Erdei A, Schulz T, et al. Growth control of activated, synchronized murine B cells by the C3d fragment of human complement. *Nature* 1985; 317: 264-267.

Melink GB, LeBien TW. Construction of an antigenic map for human B-cell precursors. *J Clin Immunol* 1983; 3: 260-267.

Mittler RS, Greenfield RS, Schacter BZ, et al. Antibodies to the common leucocyte antigen (T200) inhibit an early phase in the activation of resting human B cells. *J Immunol* 1987; 138: 3159-3166.

Mittler RS, Talle MA, Carpenter K, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies reactive with human B lymphocytes. **J Immunol** 1983; 131: 1754-1761.

Moldenhauer G, Schwartz-Albiez R. Immunochemistry and epitope analysis using CD72, CD73, CD74, CDw75, CD76, CD77, CDw78, and unclustered mAb. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 142-154.

Möller P, Mielke B. Extensive analysis of tissue distribution of antigens defined by new clustered and unclustered B-cell antibodies. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 166-175.

Möller P, Moldenhauer G, Mielke B, et al. Workshop mAb HD66 and CRIS-4 define a new B-cell-associated antigen (CD76). In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989c, 116.

Morimoto CN, Letvin NL, Distaso JA, et al. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. **J Immunol** 1985; 134: 1508-1515.

Mulligan SP. Human B cells: differentiation and neoplasia. **Leukem Lymph** 1990; 1: 275-291.

Nadler LM, Anderson KC, Marti G, et al. **J Immunol** 1983; 131: 244-250.

Nadler LM, Korsmeyer SJ, Anderson KC, et al. B cell origin of non-T cell Acute Lymphoblastic Leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation. *J Clin Invest* 1984; 74: 332-340.

Nadler LM, Stashenko P, Hardy R, et al. Characterization of human B cell-specific antigen (B2) distinct from B1. *J Immunol* 1981; 1981: 1941-1947.

Nadler LM. B cell/leukemiapanel workshop: summary and comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, et al., eds. *Leucocyte Typing II*. New York, Springer-Verlag, 1986; 3-37.

Nemerow GR, McNaughton ME, Cooper NR. Binding of monoclonal antibody to the Epstein-Barr virus (EBV)/CR2 receptor induces activation and differentiation of human B lymphocytes. *J Immunol* 1985; 135: 3068-3973.

Nesbitt S, Hart I, Horton MA. Epitope analysis of the vitronectin receptor (CD51). In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 1036-1037.

Newman W, Fast LD, Rose LM. Blockade of NK lysis is a property of monoclonal antibodies that bind to distinct regions of T200. *J Immunol* 1983; 131: 1742-1747.

Newman WL, Fast LD, Rose LM. Blockade of NK cell lysis is a property of monoclonal antibodies that bind to distinct regions of T200. *J Immunol* 1983; 131: 1742-1747.

O'Keefe EJ, Pledger WJ. A model of cell cycle control: sequential events regulated by growth factors. **Mol Cell Endocrinol** 1983; 31: 167-186.

Oettgen HC, Bayard PJ, Van Ewijk W, et al. Further biochemical studies of the human B-cell differentiation antigens B1 and B2. **Hybridoma** 1983; 2: 17-28.

Okon E, Felder B, Epstein A, et al. Monoclonal antibodies reactive with B-lymphocytes and histiocytes in paraffin sections. **Cancer** 1985; 56: 95-104.

Omary MB, Trowbridge IS, Battifora HA. Human homologue of murine T200 glycoprotein. **J Exp Med** 1980; 152: 842-852.

Ouchterlony O, Nilson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir DM, ed. *Handbook of Experimental Immunology*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1978, 35-58.

Paul WE, Ohara J. B-cell stimulatory factor-1/interleukin 4. **Annu Rev Immunol** 1987; 5: 429-459.

Paulie S, Rosen A, Enlin-Henriksson B, et al. The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction. **J Immunol** 1989; 142: 590-595.

Perri RT, Wilson BS, Kay NE. Inhibition of B cell growth factor (BCGF) by monoclonal antibodies directed against the C3d receptor (CR2). **Eur J Immunol** 1986; 16: 350-355.

Pezzutto A, Behm F, Callard RE, et al. Flow cytometry of the B-cell blind panel: joint report. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. Leucocyte Typing IV. New York, University Press, 1989, 155-165.

Pezzutto A, Dörken B, Moldenhauer G, et al. Amplification of human B cell activation by a monoclonal antibody to the B cell-specific antigen CD22, Bp 130/140. *J Immunol* 1987b; 138: 98-103.

Pezzutto A, Dörken B, Rabinovitch PS, et al. CD19 monoclonal antibody HD37 inhibits anti-immunoglobulin-induced B cell activation and proliferation. *J Immunol* 1987a; 138: 2793-2799.

Pezzutto A, Rabinovich RS, Dörken B, et al. Role of the CD22 human B cell antigen in B cell triggering by anti-immunoglobulin. *J Immunol* 1988; 140: 1791-1795.

Pirruccello SJ, LeBien TW. The human B cell-associated antigen CD24 is a single chain sialoglycoprotein. *J Immunol* 1986; 136: 3779-3784.

Platt JL, LeBien TW, Michael AF. Stages of renal ontogenesis identified by monoclonal antibodies reactive with lymphohemopoietic differentiation antigens. *J Exp Med* 1983; 157: 155-172.

Preud'homme JL, Klein M, Labaume S, et al. Idiotipe-bearing and antigen-binding receptors produced by blood T lymphocytes in a case of human myeloma. *Eur J Immunol* 1977; 7: 840-846.

Pulido R, Cebrian M, Acevedo, et al. Comparative biochemical and tissue distribution study of four distinct CD45 antigen specificities. *J Immunol* 1988; 140: 3851-3857.

Quackenbush EJ, Letarte M. Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. *J Immunol* 1985; 134: 1276-1285.

Quagliata F, Faig D, Conklyn M, et al. Study the lymphocyte 5'-nucleotidase in chronic lymphocyte leukaemia, infections mononucleosis, normal subpopulations, and phytohemagglutinin-stimulated cells. *Cancer Res* 1974; 34: 3197-3202.

Rabinovitch PS, Torres RM, Engel D. Simultaneous cell cycle analysis and two-color surface immunofluorescence using 7-amino-actinomycin D and single laser excitation: applications to study of cell activation and the cell cycle of murine Ly-1 B cells. *J Immunol* 1986; 136: 2669-2775.

Raff MC, Sternberg M, Taylor RB. Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells. *Nature* 1970; 225: 553-554.

Raschke WC. Transformation by Abelson murine leukemia virus: properties of the transformed cells. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1980; 44: 1187-1194.

Raschke WC. Cloned murine T200 (Ly-5) cDNA reveals multiple transcripts within B- and T-Lymphocyte lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 161-165.

Reinhertz EL, Schlossman SF. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 1980; 19: 821-827.

Ritz J, Pesando JM, Notis-McConarty J, et al. A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukaemia antigen. *Nature* 1980; 283: 583-585.

Rowe M, Hildreth JE, Rickinson AB, et al. Monoclonal antibodies to Epstein-Barr virus-induced, transformation-associated cell surface antigens: binding patterns and effect upon virus-specific T-cell cytotoxicity. *Int J Cancer* 1982; 29: 373-381.

Rowe M, Rowe DT, Gregory CD, et al. Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J* 1987; 6: 2743-2751.

Ruiz-Cabello F, Huelin C, Pedrinaci S, et al. Different CD45 and CD45R epitopes involved in T cell proliferation and NK cytotoxicity. *Hybridoma* 1989; 8: 1-11.

Ruiz-Cabello F, López-Nevot MA, Gutierrez J, et al. Phenotypic expression of histocompatibility antigens in human primary tumors and metastases. *Clin Exp Metastasis* 1989; 7: 213-226.

Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987; 238: 491-497.

Ruoslahti E. Integrins. *J clin Invest* 1991; 87: 1-5.

Salazar-Gonzalez JF, Moody DJ, Giorgi JV, et al. Reduced ecto-5'-nucleotidase activity and enhanced OKT10 and HLA-DR expression on CD8 (suppressor/cytotoxic) lymphocytes in the acquired immunodeficiency syndrome: evidence of CD8 cell immaturity. **J Immunol** 1985; *135*: 1778-1785.

Sánchez Madrid F, Vives J, Garrido F. Informe sobre el III Taller Internacional de Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos. **Inmunologia** 1987; *6*: 22-29.

Sánchez-Madrid F, Cebrian M, de Laudazuri MO, et al. Report of the IV International Workshop on leukocyte differentiation antigens (Vienna, 1989). **Inmunologia** 1989; *8*: 35-46.

Schlossman S, Boumsell L, Gilks W, et al. CD antigens 1993. **J Immunol** 1994; *152*: 1-2.

Schraven B, Roux M, Hutmacher B, et al. Alternative pathway activation of human T-lymphocytes involves the CD45 glycoproteins. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. Leucocyte Typing IV. New York, University Press, 1989, 640.

Schwartz R, Moldenhauer G, Dörken B, et al. TPA-induced modulation of B cell differentiation antigens defined by monoclonal antibodies CHD6, HD28, HD37, HD39. In: Reinherz EL, Hynes BF, Nadler LM, et al., eds. Leucocyte Typing. New York, Springer-Verlag, 1986; 527-540.

Schwartz-Albiez R, Dörken B, Hoffmann W, et al. The B cell-associated CD37 antigen (gp 40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein. *J Immunol* 1988; 140: 905-914.

Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. S-HCL2: an mAb recognizing a new antigen of 43/39 kDa (CD72) on B-lymphocytes. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 99-100.

Schwinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 626-628.

Shan VO, Civin CI, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *J Immunol* 1988; 140: 1861-1867.

Shipp MA, Richardson NE, Sayre PH, et al. Molecular cloning of the common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA) identifies a type II integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4819-4823.

Smeland B, Blomhoff HK, Holte H, et al. Two Cd 45 mAb, EO-1 and FN-126, inhibit c-myc mRNA induction and G₀-G₁ transition in normal human B-cells. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 544-647.

Smeland E, Funderud S, Ruud E, et al. Characterization of two murine monoclonal antibodies reactive with human B cells. *Scand J Immunol* 1985; 21: 205-214.

Smeland E, Godal T, Ruud E, et al. The specific induction of myc protooncogen expression in normal human B cells is not a sufficient event for acquisition of competence to proliferate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6255-6259.

Smeland EB, Godal T, Rudd E, et al. The specific induction of myc protooncogene expression in normal human B cells is not a sufficient event for acquisition of competence to proliferate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6255-6259.

Spickett GP, Brandon MR, Mason DW, et al. MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T Lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen. *J Exp Med* 1983; 158: 795-810.

Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, et al. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1987; 5: 223-252.

Stamenkovic J, Seed B. Cd19, the earliest differentiation antigen of the B cell lineage, bears three extracellular immunoglobulin-like domains and an Epstein-Barr virus-related cytoplasmic tail. *J Exp Med* 1988; 167: 1975-1981.

Stamenkovic J, Seed B. Molecular cloning of CD38. **Tissue Antigens** 1989; 32: 139 a.

Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, et al. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. **J Immunol** 1980; 125: 1678-1685.

Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, et al. Expression of cell surface markers after human B lymphocyte activation. **Proc Natl Acad Sci USA** 1981; 78: 3848-3852.

Stein H, Lennert K, Feller AC, et al. Immunohistological analysis of human lymphoma: correlation of histological and immunological categories. **Adv Cancer Res** 1984; 42: 67-147.

Stockinger B, Pessara U, Lin RH, et al. A role of I_c-associated invariant chains in antigen processing and presentation. **Cell** 1989; 56: 683-689.

Streuli M, Hall LR, Saga Y, et al. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. **J Exp Med** 1981; 166: 1548-1566.

Streuli M, Marimoto C, Schrieber M, et al. Characterization of CD45 and CD45R monoclonal antibodies using transfected mouse cell lines that express individual human leucocyte common antigens. **J Immunol** 1988; 141: 3910-3914.

Suemura M, Kikutani H, Barsumian EL, et al. Monoclonal anti-Fce receptor antibodies with different specificities and studies on the expression of Fce receptors on human B and T cells. *J Immunol* 1986; 137: 1214-1220.

Takahashi T, Old LH, Boyse EA. Surface alloantigens of plasma cells. *J Exp Med* 1970; 131: 1325-1341.

Takeuchi T, Rudd CE, Schlossman SF, et al. Induction of suppression following autologous mixed lymphocyte reaction: role of a novel 2H4 antigen. *Eur J Immunol* 1987; 17: 97-103.

Tedder TF, Bell PD, Frizzell RA, et al. CD20 directly regulated ion flux in B lymphocytes. *Tissue Antigens* 1989; 33: 145 a.

Tedder TF, Boyd AW, Freedman AS, et al. The B cell surface molecule B1 is functionally linked with B cell activation and differentiation. *J Immunol* 1985; 135: 973-979.

Tedder TF, Clement LT, Cooper MD. Expression of c3d receptors during human B cell differentiation: Immunofluorescence analysis with the HB-5 monoclonal antibody. *J Immunol* 1984; 133: 678-683.

Tedder TF, Clement LT, Cooper MD. Discontinuous expression of a membrane antigen (HB-7) during B lymphocyte differentiation. *Tissue Antigens* 1984; 24: 140-149.

Tedder TF, Lambert JM, McIntyre G, et al. Novel type of proliferating lymphoplasmacytoid cell with a characteristic spotted immunofluorescence pattern. **Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol** 1987; 46: 1351.

Tedder TF, Penta A, Isaac C. Cloning of CD19, a family of immunoglobulin-like proteins, and use of transfected cell lines to examine the workshop panel of monoclonal antibodies. **Tissue Antigens** 1989; 33: 154-160.

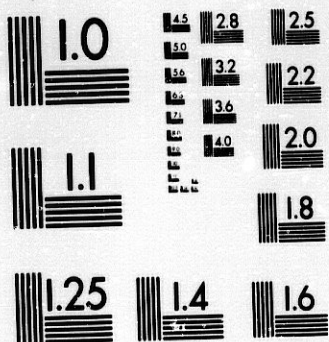
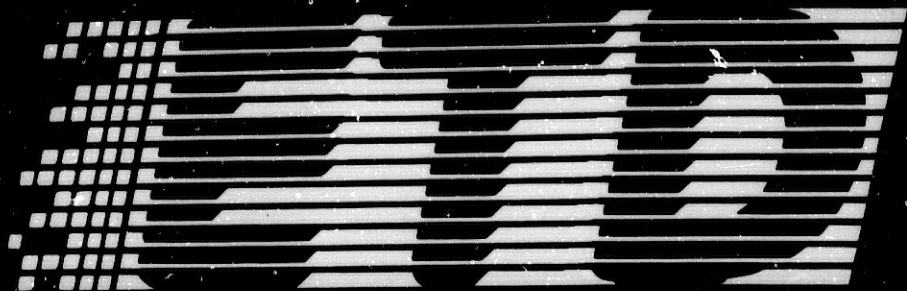
Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, et al. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1988; 85: 208-212.

Thomas ML. The leukocyte common antigen family. **Ann Rev Immunol** 1987; 7: 339-369.

Thompson LF, Ruedi JM, Glass A, et al. Production of mAb to ecto-5'-nucleotidase: a glycosyl phosphatidylinositol-anchored differentiation antigen expressed on human T- and B-lymphocytes. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York: University Press, 1989, 155-165.

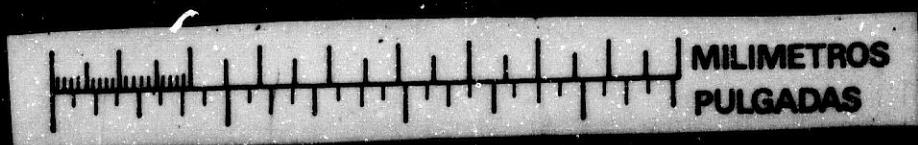
Thompson LF, Ruedi JM. Synthesis of immunoglobulin G by pokeweed mitogen-or Epstein-Barr-virus-stimulated human B cells. In vitro is restricted to the ecto-5'-nucleotidase positive subset. **J Clin Invest** 1988; 82: 902-905.

Thomson LF, Boss GR, Spiegelberg HL, et al. Ecto-5'-nucleotidase activity in T and B lymphocytes from normal subjects and patients with congenital X-linked agammaglobulinemia. **J Immunol** 1979; 123: 2475-2478.



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

1:24



- Tedder TF, Lambert JM, McIntyre G, et al. Novel type of proliferating lymphoplasmacytoid cell with a characteristic spotted immunofluorescence pattern. **Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol** 1987; 46: 1351.
- Tedder TF, Penta A, Isaac C. Cloning of CD19, a family of immunoglobulin-like proteins, and use of transfected cell lines to examine the workshop panel of monoclonal antibodies. **Tissue Antigens** 1989; 33: 154-160.
- Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, et al. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1988; 85: 208-212.
- Thomas ML. The leukocyte common antigen family. **Ann Rev Immunol** 1987; 7: 339-369.
- Thompson LF, Ruedi JM, Glass A, et al. Production of mAb to ecto-5'-nucleotidase: a glycosyl phosphatidylinositol-anchored differentiation antigen expressed on human T- and B-lymphocytes. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 155-165.
- Thompson LF, Ruedi JM. Synthesis of immunoglobulin G by pokeweed mitogen-or Epstein-Barr-virus-stimulated human B cells. In vitro is restricted to the ecto-5'-nucleotidase positive subset. **J Clin Invest** 1988; 82: 902-905.
- Thomson LF, Boss GR, Spiegelberg HL, et al. Ecto-5'-nucleotidase activity in T and B lymphocytes from normal subjects and patients with congenital X-linked agammaglobulinemia. **J Immunol** 1979; 123: 2475-2478.

Thomson LF, Ruedi JM, Low MG, et al. Distribution of ecto-5'-nucleotidase on subsets of human T and B lymphocytes as detected by indirect immunofluorescence using goat antibodies. **J Immunol** 1987; 139: 4042-4048.

Thomson LF, Ruedi JM, O'Connor RD, et al. Ecto-5'-nucleotidase expression during human B cell development. An explanation for the heterogeneity in B lymphocyte ecto-5'-nucleotidase activity in patients with hypogammablobulinemia. **J Immunol** 1986; 137: 2496-2500.

Thorley-Lawson DA, Nadler LM, Bhan AK, et al. Blast-2 (EBVCS), an early cell surface marker of human B cell activation, is superinduced by Epstein Barr virus. **J Immunol** 1985; 134: 3007-3012.

Uckun FM, Jaszcz W, Ambrus JL, et al. Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. **Blood** 1988; 71: 13-29.

Warnke RA, Gatter KC, Phil D, et al. Diagnosis of human lymphoma with monoclonal antileukocyte antibodies. **New Engl J Med** 1983; 309: 1275-1281.

Weis JJ, Tedder TF, Fearon DT. Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1984; 81: 881-885.

Wiels J, Fellous M, Tursz T. Monoclonal antibody against a Burkitt lymphoma-associated antigen. **Proc Natl Acad Sci USA** 1981; 78: 6485-6488.

Wiels J, Tursz T. BLA: a glycolipid marker of Burkitt's lymphoma and a subset of germinal-centre B-cells. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. New York, University Press, 1989, 119.

Wilson BS, Platt JT, Kay NE. Monoclonal antibodies to the 140,000 mol wt glycoprotein of the lymphocyte membranes (CR2 receptor) initiates proliferation of B cells in vitro. *Blood* 1985; 66: 824-829.

Woodruff JJ, Clarke LM, Chin YH. Specific cell-adhesion mechanisms determining migration pathways of recirculating lymphocytes. *Annu Rev Immunol J* 1987; 5: 201-222.

Yakura H, Shen FW, Bourcet E, et al. On the function of Ly-5 in the regulation of antigen-driven B cell differentiation. *J Exp Med* 1983; 157: 1077-1088.

Yakura H, Shen FW, Bourcet E, et al. On the function of Ly-5 in the regulation of antigen driven B cell differentiation. *J Exp Med* 1983; 157: 1077-1088.

Yukawa K, Kikutani H, Owaki H, et al. A B cell-specific differentiation antigen, CD23, is a receptor for IgE (FceR) on lymphocytes. *J Immunol* 1987; 138: 2576-2580.

Zola H. The surface antigens of human B lymphocytes. *Immunol Today* 1987; 8: 308-315.