

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL
GR 2110, QUE REACCIONA CON LEUCEMIAS AGUDAS LINFOBLASTI
CAS NO T Y PLAGUETAS.

TESIS PRESENTADA POR DOÑA MARGARITA GOMEZ MORALES, PARA
OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA.

D. CARLOS OSORIO PELAEZ, CATEDRATICO DE FISIOLOGIA GENERAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y D. FEDERICO GARRIDO TORRES-PUCHOL, CATEDRATICO DE FISIOLOGIA GENERAL Y ESPECIAL Y JEFE DEL SERVICIO DE ANALISIS CLINICOS DE LA C.S. VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del tribunal que designe la Facultad de Medicina de Granada, Dña. MARGARITA GOMEZ MORALES, sobre el tema: "OBTENCION Y CARACTERIZACION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL - GR2110, QUE REACCIONA CON LEUCEMIAS AGUDAS LINFOBLASTICAS NO T Y PLAQUETAS", ha sido realizada bajo nuestra dirección durante los cursos académicos 1982-83 y 84, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones tan aventajadas que la hacen acreedora al grado de Doctora en Medicina, siempre que así lo considere el citado tribunal.

Granada, 29 de junio de 1985.

Prof. Dr. C. Carlos Osorio. Prof. Dr. D. Federico Garrido.

A mis padres

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a la realización de este trabajo.

A los Profesores Dres. D. Carlos Osorio Peláez y D. Federico Garrido Torres-Puchol, Directores de esta Tesis, por su eficaz y acertada labor de dirección.

A mis compañeros: Matias Perez, por su contribución en la fase de obtención del anticuerpo monoclonal y asesoramiento en las técnicas de cultivos celulares; Antonio Garrido, Francisco Ruiz Cabello y M^lLuisa Garrido, por su colaboración en la técnica de inmunoprecipitación; Marian de Andrés, Miguel Angel López Nevot, Eduardo Pareja, M^lJosé Romero, Encarnación Cañadas y Fernando Pazmiño, por su colaboración en la fase de caracterización del anticuerpo monoclonal.

Al Servicio de Hematología del Hospital Clínico-Universitario de Salamanca y de la C.S. "Virgen de las Nie-

ves" de Granada por su colaboracion e interés prestado durante todo el desarrollo de este trabajo.

Quiero extender mi reconocimiento a todas las personas que trabajan en el Servicio de Análisis Clínicos de la C.S. "Virgen de las Nieves" y que de alguna manera me han ayudado en la realizacion de esta Tesis.

INDICE

	Pag.
I.- INTRODUCCION.....	2
1.- MARCADORES CELULARES EN EL ESTUDIO DE LA LEUCEMIA. 4	
1.1.- MARCADORES DE SUPERFICIE CONVENCIONALES... 4	4
1.1.1.- Inmunoglobulinas 4	4
a).- Inmunoglobulinas de superficie..... 4	4
b).- Inmunoglobulinas citoplasmáticas..... 5	5
c).- Inmunoglobulinas y monoclonalidad.... 7	7
1.1.2.- Receptores para hematíes de carnero.... 9	9
1.1.3.- Receptores para hematíes de ratón..... 11	11
1.1.4.- Receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas y para el complemento. 12	12
1.2.- MARCADORES HORMONALES Y BIOQUIMICOS..... 14	14
1.3.- MARCADORES ENZIMATICOS..... 15	15
1.3.1.- Deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) 16	16
1.3.2.- 5 Nucleotidasa (5'N), Adenosina deaminasa (ADA) y purina nucleosido fosforilasa.. 18	18
1.3.3.- Enzimas lisosomiales y fosfatasa ácida. 20	20
1.4.- ANTIGENOS DE DIFERENCIACION DEFINIDOS POR HETEROCANTISUEROS..... 21	21

	Pag.
1.4.1.- Antígenos de células T	22
1.4.2.- Antígenos de células B y antígenos Ia like (HLA DR).....	24
1.4.3.- Antígeno asociado a la leucemia linfoblástica aguda común (CALLA).....	26
1.5.- ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A ANTIGENOS DE DIFERENCIACION LINFOCITARIA.....	27
1.5.1.- Diferenciación de las células T	28
1.5.2.- Caracterización fenotípica comparativa de las células T malignas.....	32
1.5.3.- Fenotipo de las leucemias/linfomas de células B en relación con la diferenciación B normal.....	36
1.6.- ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A GRANULOCITOS, MONOCITOS, ERITROCITOS Y PLAQUETAS.....	43
1.6.1.- Antígenos de diferenciación mieloide y de leucemias mieloides.....	43
1.6.2.- Antígenos de la membrana eritroide y leuce- mias eritroides.....	45
1.6.3.- Antígenos plaquetarios y leucemias megaca- rioblásticas.....	45

	Pag.
2.- VALOR DE LOS MARCADORES INMUNOLOGICOS EN EL DIAG	
NOSTICO DE LA LEUCEMIA HUMANA.....	46
2.1.- ANTIGENOS ASOCIADOS A LEUCEMIA.....	46
2.1.1.- Molécula p100.....	47
2.1.2.- Molécula p24.....	47
2.2.- DETECCION DE MARCADORES DE DIFERENCIACION EN	
LEUCEMIAS INDIFERENCIADAS.....	49
2.3.1.- Clasificación inmunológica de la Leucemia	
aguda linfoblástica.(LAL).....	51
- Leucemia aguda linfoblástica común (LAL común)	52
- Leucemia aguda linfoblástica pre B.....	52
- Leucemia aguda linfoblástica B.....	52
- Leucemia aguda linfoblástica nula.....	53
- Leucemia aguda linfoblástica T y pre T.....	53
2.3.2.- Relación entre los subgrupos de la LAL con la	
morfología y la citoquímica.....	54
2.3.2.1.- Morfología.....	54
2.3.2.2.- Citoquímica.....	55
2.3.3.- Significación pronóstica de los subgrupos in	
munológicos de la LAL.....	56

3.- UTILIZACION TERAPEUTICA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	57
4.- CELULA DIANA DE LA TRANSFORMACION MALIGNA.....	58
5.- INDUCCION DE LA MADURACION DE CELULAS LEUCEMICAS IN VIVO.....	61
II.- OBJETO.....	62
III.- MATERIAL Y METODOS.....	63
1.- OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	63
1.1.- INMUNIZACION.....	63
1.1.1.- Células inmunizantes.....	63
1.1.2.- Ratones inmunizados.....	63
1.1.3.- Protocolo de inmunizacion.....	63
1.2.- HIBRIDACION.....	64
1.2.1.- Preparacion de la suspension de esplenoci- tos del ratón inmunizado.....	64
1.2.2.- La línea mielomatosa, NSI/Ag4.....	66
1.2.3.- Técnica de hibridacion.....	67
1.3.- SELECCION DE LOS HIBRIDOS.....	73
1.4.- ESTUDIO DE LOS SOBRENADANTES DE LOS HIBRIDOS	74
1.5.- CLONACION.....	75
1.5.1.- Obtencion de las celulas cebadoras.....	75
1.5.1.1.- Timocitos.....	75
1.5.1.2.- Macrofagos peritoneales.....	77

1.5.2.- Procedimiento de clonación por dilución	
límite.....	77
1.6.- CONGELACION DE HIBRIDOMAS.....	79
1.7.- OBTENCION DE ASCITIS.....	80
1.8.- PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.	81
2.- CARACTERIZACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL.....	84
2.1.- TITULACION.....	84
2.2.- DETERMINACION DEL ISOTOPO DE LOS ANTICUERPOS	
MONOCLONALES.....	84
2.2.1.- Inmunodifusión simple en agar.....	84
3.- CARACTERIZACION DE LA MOLECULA RECONOCIDA POR EL	
ANTICUERPO MONOCLONAL GR2110.....	87
3.1.- DISTRIBUCION CELULAR.....	87
3.1.1.- Panel de células normales.....	87
3.1.1.1.- Separación de células mononucleares de	
sangre periférica.....	87
3.1.1.2.- Separación de células mononucleares de	
médula ósea.....	89
3.1.1.3.- Separación de linfocitos T y B.....	89
3.1.1.4.- Separación de granulocitos.....	92

3.1.1.5.- Separación de monocitos.....	93
3.1.1.6.- Separación de plaquetas.....	95
3.1.1.7.- Separación de células de amígdala.....	95
3.1.1.8.- Separación de células de bazo.....	95
3.1.2.- Estimulación blastogénica con lectinas de lin focitos de sangre periférica.....	96
3.1.3.- Panel de células leucémicas.....	97
3.1.4.- Protocolo de estudio para las células leucé- micas.....	98
3.1.4.1.- Marcadores inmunológicos de linfocitos T.	98
3.1.4.2.- Marcadores Inmunológicos de linfocitos B.	99
3.1.4.3.- Antígenos asociados a leucemia.....	99
3.1.5.- Técnicas para la aplicación del protocolo del diagnóstico inmunológico de las leucemias humanas.....	100
3.1.5.1.- Formación de rosetas con hematíes de car- nero.....	100
3.1.5.2.- Formación de rosetas con hematíes de ratón.	101
3.1.5.3.- Técnica de inmunofluorescencia directa (ID).....	101
3.1.5.4.- Técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	102

3.1.6.- Panel de líneas celulares.....	103
3.2.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL ANTIGENO RE- CONOCIDO POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL.....	104
3.2.1.- Acoplamiento del anticuerpo monoclonal GR2110 a gel de sefarosa activada 4B-CN Br.....	104
3.2.2.- Marcaje externo de las células inmunizantes con I^{125}	106
3.2.3.- Lisado de las células marcadas.....	107
3.2.4.- Inmunoprecipitación.....	110
3.2.5.- Electroforesis del inmunoprecipitado en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	111
3.2.6.- Preparación del gel para la autoradiografía...	115
3.2.6.1.- Fluorografía.....	115
3.2.7.- Autorradiografía.....	117
3.2.8.- Cálculo del peso molecular de las proteínas in- munoprecipitadas.....	117
4.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES GR2110 Y FMC8.....	118
4.1.- DISTRIBUCION CELULAR.....	118
4.1.1.- Reactividad comparativa de los anticuerpos mo- noclonales GR2110 y FMC8 con células de leuce- mia aguda linfoblástica.....	118

4.1.2.- Reactividad comparativa de los anticuerpos monoclonales GR2110 y FMC8 con líneas celulares....	118
4.2.- TECNICA DE CAPPING PARA EL ESTUDIO DE LA REDISTRIBUCION DE LAS MOLECULAS RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS GR2110 Y FMC8.....	119
IV.- RESULTADOS.....	122
1.- RESULTADOS DE LA FUSION ENTRE LOS ESPLENOCITOS INMUNIZADOS CON LAS CELULAS DE LA LEUCEMIA BSF Y LA LINEA MIELOMATOSA MURINA NS1.....	122
2.- CARACTERIZACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL GR2110.....	123
2.1.- TITULACION DEL ANTICUERPO GR2110.....	123
2.2.- DETERMINACION DEL ISOTOPO DE INMUNOGLOBULINA.....	125
3.- CARACTERIZACION DEL ANTIGENO RECONOCIDO POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL GR2110.....	127
3.1.- DISTRIBUCION CELULAR.....	127
3.1.1.- Reactividad del GR2110 con un panel de células normales.....	127
3.1.2.- Reactividad del anticuerpo monoclonal GR2110 con linfocitos transformados con lectinas.....	129
3.1.3.- Reactividad del anticuerpo monoclonal GR2110 con células leucémicas.....	131

3.1.3.1.- Reactividad del GR2110 con síndromes linfoproliferativos crónicos.....	131
3.1.3.2.- Reactividad del GR2110 con leucemias agudas linfoblásticas.....	134
3.1.3.3.- Porcentaje de leucemias agudas linfoblásticas reactivas con el GR2110.....	140
3.1.3.4.- Relación entre la expresión de la molécula GR2110 y otros marcadores asociados a leucemia (p100 (CALLA) e Ia/DR) en la LAL.....	142
3.1.3.5.- Reactividad del GR2110 con leucemias agudas no linfoblásticas.....	145
3.1.4.- Reactividad del GR2110 con líneas celulares...	147
3.2.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL ANTIGENO RECONOCIDO POR EL GR2110.....	149
4.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES GR2110 Y FMC8.....	153
4.1.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DISTRIBUCION CELULAR DE LAS MOLECULAS RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES GR2110 Y FMC8.....	153
4.1.1.- Reactividad del GR2110 y FMC8 con líneas celulares.....	153

4.1.2.- Reactividad del GR2110 y FMC8 con células de la leucemia aguda linfoblástica.....	155
4.2.- ESTUDIO DE LA REDISTRIBUCION CELULAR DE LAS MOLE CULAS RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONA- LES GR2110 Y FMC8.....	158
V.- DISCUSION.....	162
VI.- CONCLUSIONES.....	174
VII.- BIBLIOGRAFIA.....	175

I.- INTRODUCCION

En 1845 Rudolf Virchow describió una enfermedad, que denominó leucemia, sugiriendo que el mecanismo fisiopatológico subyacente era un trastorno en la regulación de la maduración celular. El progreso continuo, a lo largo de más de un siglo, en la búsqueda de criterios morfológicos cada vez más objetivos, y en el desarrollo de técnicas de tinción específicas que permitan una mayor precisión en la identificación celular, no ha hecho sino corroborar la teoría de Virchow; sin embargo el mayor impulso dado a esta teoría ha sido la introducción de técnicas inmunológicas capaces de identificar poblaciones celulares en base a su constitución antigénica. La aplicación de estas técnicas en el estudio de los marcadores de la superficie celular ha hecho evidente la dicotomía T/B del sistema inmune y ha permitido definir varios niveles de la diferenciación celular. La utilización de ensayos funcionales junto al estudio fenotípico celular ha hecho posible la definición de subgrupos funcionalmente heterogéneos dentro de poblaciones celulares homogéneas en su morfología. El análisis comparativo del perfil fenotípico de células normales y malignas ha llevado a un mejor conocimiento de la diferenciación celular y del origen celular de la leucemia.

Basándose en sus marcadores inmunológicos las leucemias y linfomas se han podido subdividir en subgrupos de interés clínico.

En este campo de la diferenciación celular el mayor avance se ha conseguido en los últimos años gracias a la tecnología de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales introducida por Kohler y Milstein (1975).

La posibilidad de disponer de una cantidad ilimitada de anticuerpos altamente específicos y reactivos ha hecho su uso extendido en el estudio de distintos sistemas biológicos.

Además de definir tipos celulares específicos, estadios específicos de la diferenciación celular y estadios específicos de la activación celular, los anticuerpos monoclonales permiten el aislamiento de moléculas de la superficie celular, el estudio de la función de estas moléculas y modificar tanto in vivo como in vitro la función inmune. Su aplicación al estudio del fenotipo de células leucémicas ha llevado a la definición de nuevos subgrupos de leucemias, y en la actualidad gran parte del conocimiento de la fisiología y patología del sistema hemopoyético, especialmente de las leucemias linfáticas, se deriva de la investigación basada en la tecnología de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

1.- MARCADORES CELULARES EN EL ESTUDIO DE LA LEUCEMIA

1.1.- MARCADORES DE SUPERFICIE CONVENCIONALES

La separación de subpoblaciones linfocitarias es consecuencia de la observación de que distintos tipos de linfocitos podían ser identificados en base a estructuras de membrana diferenciales. Estas estructuras denominadas marcadores pueden dividirse de forma general en dos categorías: receptores y antígenos.

Los receptores son estructuras responsables de la unión a partículas como hematíes, y se detectan por técnicas de rosetas. Los antígenos de superficie, como las inmunoglobulinas de superficie, los antígenos de células T, y otros antígenos de diferenciación, se detectan como xenoantígenos por anticuerpos heterólogos específicos dirigidos frente a ellos.

1.1.1.- INMUNOGLOBULINAS

a).- Inmunoglobulinas de superficie

Los linfocitos B poseen moléculas de inmunoglobulinas en su superficie. Estas son un marcador específico para las células de la línea B. Estas moléculas son unidades de reconocimiento del antígeno, y son componentes integrales de la membrana sintetizadas por la célula, en oposición a las inmunoglobulinas que puede

adsorber la célula en virtud de sus receptores Fc.

La mayor parte de las células B poseen IgM ó IgM e IgD.- Una proporción mucho menor de linfocitos B pueden expresar tanto IgG como IgA. Sin embargo la mayor parte de los linfocitos con IgG de membrana la han adquirido pasivamente por adsorción a través de receptores para la fracción Fc de la IgG. Esta IgG adsorbida puede ser separada por incubación a 37° y no es resintetizada por la célula (Kumagai et al. 1975).

Existen métodos para cuantificar la densidad de inmunoglobulinas como la inmunoperoxidasa (Dighiero et al 1980), la autorradiografía con Ac. marcados con Iodo radioactivo (Thiel et al 1977) y principalmente el citofluorógrafo y el separador de células activas fluorescentes FACS (Herzenberg y Herzenberg 1978).

La densidad de inmunoglobulinas en células de la leucemia linfática crónica es menor que en los linfocitos B normales, - sin embargo las células de la leucemia prolinfocítica tienen una mayor densidad de inmunoglobulinas.

b).- Inmunoglobulinas Citoplásmáticas.

El primer paso de la formación de inmunoglobulinas en la

diferenciación B es la aparición en el citoplasma de cadenas pesadas de tipo μ . La célula en este estadio de diferenciación - denominada célula preB posee cadenas μ intracitoplasmáticas pero carece de inmunoglobulinas detectables. Estas células se han encontrado en médula ósea normal del adulto y es por esto por lo que la médula ósea se considera el equivalente de la bursa de Fabricio de las aves (Pearl et al 1978). Los últimos pasos en la ontogenia B lo constituyen las células linfoplasmocitoides y células plasmáticas; en ellas el contenido citoplasmático de inmunoglobulinas incluye tanto cadenas pesadas como ligeras.

La detección de inmunoglobulinas intracitoplasmáticas es indicador del origen B de la célula ya que las inmunoglobulinas continúan siendo el mejor y más específico marcador de línea B.- Sin embargo hay que tener en cuenta que en el citoplasma de una célula pueden existir inmunoglobulinas por mecanismo diferentes al de la síntesis: las células del sistema mononuclear fagocítico pueden contener inmunoglobulinas por fagocitosis de inmunocomplejos. Estas mismas células poseen receptores Fc y son capaces de adsorber e interiorizar inmunoglobulinas por este mecanismo. La detección de más de un tipo de cadena ligera o de cadena pesada en el interior de una misma célula sugiere que la célula con-

tiene inmunoglobulinas por un mecanismo distinto de la síntesis, ya que cada célula B sintetiza un único tipo de cadena ligera y pesada (aunque es conocido que pueden ocurrir cambios en el tipo de cadenas pesadas, el tipo de cadena ligera permanece constante).

c).- Inmunoglobulinas y Monoclonalidad.

La monoclonalidad refleja la expansión proliferativa de un clon de células. El proceso inicial puede afectar a una o varias células, pero el resultado final es un clon dominante con características idénticas a las de la célula progenitora. Las leucemias y linfomas B son el mejor ejemplo de la proliferación celular monoclonal. Las proliferaciones malignas de células B expresan uno o dos tipos de cadena pesada y solo un tipo de cadena ligera, mientras que las poblaciones linfocitarias no neoplásicas o reactivas expresan todo el espectro de cadenas pesadas y ligeras (policloneales). La monoclonalidad puede afirmarse en un sentido absoluto por la utilización de un suero anti-idiotipo. Así la identificación de linfocitos B que poseen idiotipos comunes a los producidos por células plasmáticas en el mieloma múltiple, sostiene la idea de que el mieloma múltiple es una neoplasia de células B con células en diferentes estadios de diferenciación

(Holm et al 1977). La célula diana de la transformación maligna sería menos madura que el tipo celular del clon dominante.

La observación de que en una proliferación clonal se pueden expresar dos cadenas pesadas en una misma célula es compatible con los estudios que han demostrado la existencia, en la diferenciación B normal, de un desvío secuencial en la producción de cadenas pesadas, controlado a nivel genético (genes de la región C). El lugar de combinación antigénica o idiotipo (secuencia hipervariable de la región V de la molécula de inmunoglobulina) es constante.

Es esta constancia del idiotipo expresado por las células neoplásicas (Fu et al 1974), la que permite la identificación de células B malignas, que al carecer de identidad morfológica, pueden pasar desapercibidas en una población policlonal mixta. Así el uso de suero antiidiotipo puede detectar un marcador asociado a tumor. Sin embargo en la práctica este antisuero es difícil de conseguir y es el patrón monoclonal de las inmunoglobulinas de γ superficie (una sola cadena ligera) el más usado como indicador de la naturaleza neoplásica de un proceso proliferativo. La restricción monoclonal a un solo tipo de cadena ligera es de gran valor diagnóstico. Así es posible distinguir el mieloma múltiple

de una plasmocitosis reactiva antes de que existan todos los criterios clínicos y morfológicos necesarios para el diagnóstico - convencional de mieloma (Canale y Collins 1974). Del mismo modo el reconocimiento del patrón monoclonal puede distinguir una linfocitosis reactiva de una leucemia linfática crónica incipiente.

1.1.2.- RECEPTORES PARA HEMATIES DE CARNERO

Después de la primera observación de la formación espontánea de rosetas con hemáties de carnero por linfocitos humanos - (Bach et al 1969), se publicaron numerosos trabajos referentes a este primer marcador de los linfocitos T humanos (Coombs et al 1970; Brain et al 1970; Lay et al 1971; Fröland 1972; Yondal et al 1972; Silveira et al 1972).

El fenómeno de la formación de rosetas espontáneas no se inhibía con la adición de suero anti-inmunoglobulina (Coombs et al 1970) y se demostró que los linfocitos formadores de rosetas eran diferentes de aquellos que poseían inmunoglobulinas de superficie o receptores para el complemento (Fröland 1972, Yondal et al 1972, Silveira et al 1972). Las células formadoras de rosetas se situaban en el timo y en áreas timodependientes de los tejidos linfáticos (Lay et al 1971, Silveira et al 1972). El suero

anti T inhibía el fenómeno de rosetas a varias diluciones (Aiuti y Wigzell 1973, Wick y Gattringer 1977). Los antígenos de células T y el receptor para hematíes de carnero estaban en las mismas células pero se redistribuían en diferentes áreas de la membrana celular.

El porcentaje de linfocitos formadores de rosetas en sangre periférica varía entre un 50 y un 80%, según los laboratorios, ya que la formación de rosetas E es el patrón frente al que se prueban nuevas técnicas, hay que tener en cuenta que el test de rosetas E no es específico de células T ya que los fibroblastos, células parenquimatosas de hígado y pulmón también forman rosetas con hematíes de carnero (Woda et al 1977). Además cuando se examinan poblaciones celulares leucémicas de sangre periférica o médula ósea, hay que considerar que la población formadora de rosetas puede ser heterogénea por la presencia de linfocitos T residuales, linfocitos T activados y cualquier célula neoplásica formadora de rosetas. En estas circunstancias el porcentaje de rosetas E puede ser desorientador. Por otra parte no todos los linfocitos T poseen el receptor E como puede comprobarse con la utilización de suero específico anti T (Radt et al 1975) y existen leucemias T que carecen de este marcador por lo que nunca debe usarse solo sino asociado a otros marcadores T.

1.1.3.- RECEPTORES PARA HEMATIES DE RATON

La primera observación de la formación de rosetas con hematies de ratón se realizó con células de la leucemia linfática crónica (Stethopoulos y Elliot 1974)

El origen B de las células que poseían receptores para hematies de ratón (receptor M) se demostró por experiencias de doble marcaje en las que se observaba que los linfocitos formadores de rosetas con hematies de ratón expresaban IgM, IgD o ambas en su superficie (Dobozy et al 1976, Forbes y Zalewski 1976, Bertoglio et al 1977). En estas mismas experiencias se demostró que solo una subpoblación de aproximadamente el 5% de linfocitos B - periféricos normales era capaz de formar rosetas con hematies de ratón, ya que el receptor, r^M aparece durante la ontogenia, al menos tan precozmente como la IgM de superficie (Gupta et al 1976) el receptor M debe caracterizar un estadio de linfocito B inmaduro. Así los altos porcentajes de rosetas M obtenidas con células de la leucemia linfática crónica B deben correlacionarse con un fenotipo menos maduro que el de los linfocitos B normales de sangre periférica. Este marcador es por tanto de gran importancia - en el diagnóstico de las leucemias linfáticas crónicas. Es interesante señalar que en las células de la leucemia linfoblástica

preß, se puede inducir la expresión de receptores M por cultivo en cámaras de difusión implantadas en ratones irradiados (Thiel et al 1981).

1.1.4.- RECEPTORES PARA LA FRACCIÓN Fc DE LAS INMUNOGLOBULINAS Y PARA EL COMPLEMENTO.

Los receptores para la fracción Fc de la molécula de IgG están presentes en la mayor parte de las células hemopoyéticas, incluyendo granulocitos, monocitos, macrófagos y linfocitos - (Boyden y Sorkin 1964, Uhr y Philipps 1966). Este marcador por tanto, no es específico de línea celular y tiene un valor limitado en el diagnóstico inmunológico. En un principio la mayor expresión de este receptor en linfocitos B se consideró de utilidad para distinguirlos de los linfocitos T (Dickler y Kunkel 1972).

En 1970 se demostró la existencia de receptores para el complemento en linfocitos de distintas especies (Bianco et al - 1970).

Esta población tenía idéntica distribución tisular que los linfocitos B humanos (Silveira et al 1972). Se han identificado receptores para los distintos productos de la fracción C3

(C3b, C3d) y para C4 (Ross et al 1973, Bokisch y Sobel 1974).

Aunque los receptores para el complemento se consideraban típicamente ausentes de los linfocitos T, ensayos de doble marcaje han demostrado su existencia en una pequeña subpoblación de células T (Chiao y Good 1976, Rabellino et al 1978). Los receptores para el complemento son expresados también por monocitos, macrófagos y granulocitos.

Al igual que los receptores Fc, los receptores para el complemento no son específicos de línea celular, sino que están en relación con el grado de maduración celular (Rabellino et al 1978, Gelfand et al 1974, Fröland y Natvig 1973). Sin embargo - estudios posteriores demostraron que los receptores para la fracción Fc de la inmunoglobulina G van expresados en los linfocitos T activados y que existían receptores Fc para la IgM en la mayor parte de células T. La presencia de receptores Fc para la IgM o IgG está en relación con la actividad funcional de los linfocitos T: las células con receptores para la IgM intervienen como cooperadoras en la diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas, mientras que las que poseen receptores Fc para la IgG actúan como células supresoras (Moretta et al 1976).

Además la expresión de receptores Fc proporciona información acerca del nivel de maduración dentro de una línea celular. Los precursores granulocíticos adquieren los receptores Fc durante su maduración, de la misma forma, solo los linfocitos que han adquirido su maduración funcional expresan los receptores Fc (Yodoi et al 1978).

1.2.- MARCADORES HORMONALES Y BIOQUIMICOS

A pesar de que es conocido desde hace tiempo el efecto supresor de los glucocorticoides sobre células linfoides, los receptores hormonales en linfocitos sólo se han comenzado a estudiar recientemente. Los receptores para glucocorticoides son proteínas citoplasmáticas específicas, necesarias para la acción hormonal en tejidos sensibles. La unión al receptor va seguida de una inhibición de diversas funciones de síntesis y de transporte (Blackstock y Humphrey 1982). Algunos autores encuentran que la respuesta a la terapéutica con glucocorticoides en los síndromes linfoproliferativos está en relación con los niveles de receptores para glucocorticoides (Lippman et al 1978, Nakao et al 1981, Yabro et al 1977). Así, los receptores para glucocorticoides tienen significación pronóstica entre ciertos grupos in

munológicos de la leucemia aguda linfoblástica (LAL) infantil - (Lipman et al 1978).

La LAL CALLA + tiene niveles mayores de receptores que la LAL nula o T (Bloomfield et al 1980).

Se han descrito algunos marcadores bioquímicos en células leucémicas. El glicolípido esialo GM1 se encuentra en células de la LAL T y LAL no T no B, pero no en otras células leucémicas - (Nakahara et al 1980). También se han descrito alteraciones en los carbohidratos de membrana de células leucémicas, como disminución de los gangliósidos (Hildebrand et al 1972), de los antígenos que contienen carbohidratos (Geisen et al 1977) y de los receptores para la toxina del cólera (Revesz et al 1976).

1.3.- MARCADORES ENZIMATICOS

La determinación de la presencia de ciertos enzimas, como la mieloperoxidasa o las esterasas inespecíficas por métodos citotóxicos, se ha demostrado extraordinariamente útil para la diferenciación de la leucemia aguda no linfoblástica (LANL) de la LAL. Sin embargo el análisis de marcadores enzimáticos no se ha demostrado tan útil como el análisis de los marcadores inmunológicos en la subclasificación de las leucemias. Los estudios cito

químicos de distintas células hematopoyéticas han demostrado que la distribución de determinadas enzimas difiere de un tipo celular a otro pero no es exclusiva de ninguno. Estudios realizados utilizando técnicas bioquímicas sugieren que la actividad específica total de las enzimas también difiere entre los distintos subtipos inmunológicos celulares.

Las enzimas más estudiadas en la actualidad son la deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), 5' nucleotidasa (5'N), adenosina deaminasa (ADA) y Purina nucleosido fosforilasa (PNP).

1.3.1.- DEOXINUCLEOTIDYL TRANSFERASA TERMINAL (TdT)

La enzima intracelular más extensamente estudiada es la TdT. Es una DNA polimerasa que a diferencia de otras DNA polimerasas es capaz de catalizar la unión de moléculas de deoxirribonucleótido trifosfato al 3'OH terminal de una cadena de DNA sin necesidad de otra cadena de DNA que le sirva de molde.

La actividad TdT puede ser medida en una población de células por análisis enzimático cuantitativo o de forma individualizada utilizando anticuerpos específicos mediante la técnica de inmunofluorescencia. La TdT se encuentra en timocitos y en una

pequeño porcentaje de células de médula ósea, pero no en linfocitos maduros. Se ha demostrado aumento de la actividad TdT en la mayor parte de los blastos de la LAL, en linfomas de fenotipo inmaduro y en la crisis blástica (CB) de la leucemia mieloide crónica (LMC). Ya que las células de la LAL común, LAL preB y las de la crisis blástica de la leucemia mieloide crónica (CB-LMC) poseen actividad TdT se ha sugerido la existencia de una vía de diferenciación común (Bollum 1979).

En la CB-LMC la TdT tiene un valor predictivo de la respuesta a la quimioterapia (Marks et al 1978). Sin embargo las medidas repetidas de la actividad TdT en células de sangre o médula ósea no han probado su utilidad en la LAL infantil (Hutton et al 1982). La TdT es de utilidad para distinguir las leucemias agudas linfoblásticas de las mieloblásticas (Bollum 1979). Sin embargo la demostración de células TdT positivas en un 10-20% de enfermos con leucemia aguda no linfoblástica sin cromosoma Filadelfia (Bradstock et al 1981) limita la interpretación de la positividad para la TdT como indicativa de filiación a una línea celular concreta, cuando otros marcadores, morfológicos, citoquímicos o inmunológicos, están ausentes. La actividad TdT decreciente a lo largo de la diferenciación de la línea T hace que es

te marcador sea de valor para la determinación del grado de madurez celular.

Así, los timocitos y los linfoblastos T tienen la mayor actividad TdT mientras que los linfocitos T periféricos o las células del Síndrome de Sezary tienen muy escasa actividad TdT (Bollum 1979). Los linfocitos B no poseen normalmente la enzima y la TdT está ausente o presente en muy bajas concentraciones en el linfoma de Burkitt, leucemia linfática crónica B, tricoleucemia y mieloma múltiple.

1.3.2.- 5'NUCLEOTIDASA (5'N), ADENOSINA DEAMINASA (ADA) y PURINA NUCLEOSIDO FOSFORILASA (PNP).

5'N es una enzima del metabolismo de las purinas. Se le considera una ectoenzima ya que está ligada a la membrana celular con su centro activo hacia el espacio extracelular. Esta ectoenzima cataliza la defosforilación de los 5'nucleótidos para producir los nucleósidos correspondientes (Gutensohn et al 1983). Se expresa en muchos tejidos humanos pero sólo en algunos linfocitos (Silber et al 1975). Los linfocitos B periféricos tienen mayor actividad que los linfocitos T (Thompson et al 1979). Una disminución de la actividad 5'N se observa en la leucemia linfá-

tica crónica (Kauter et al 1979) en la LALT (Reaman et al 1979) en la leucemia aguda mieloblástica y en la crisis blástica CALLA negativa de la leucemia mieloide crónica. En la leucemia aguda linfoblástica común y en la crisis linfoblástica de la LMC se observa una alta actividad 5'N (Gutensohn y Thiel 1981). Así la utilidad fundamental de este marcador radica en la capacidad para distinguir leucemias agudas linfoblásticas de las no linfoblásticas.

La enzima adenosina deaminasa (ADA) convierte la adenosina en inosina y la deoxiadenosina en deoxinosina, es esencial para la diferenciación de células linfoides particularmente linfocitos T. La actividad ADA refleja tanto el origen T ó B de una población celular, como su grado de maduración. Los timocitos tienen mayor nivel de ADA que los linfocitos T maduros, que a su vez poseen niveles superiores de actividad que los linfocitos B periféricos (Tung et al 1976). Niveles normales o bajos de esta enzima se encuentran en la LAL-B (Coleman et al 1978), leucemia linfática crónica (Tung et al 1976), tricoleucemia y mieloma múltiple (Meier et al 1976) mientras que en la leucemia linfoblástica aguda no T no B se encuentran niveles relativamente elevados.

La Purina nucleósido fosforilasa (PNP) actúa secuencialmente con la ADA en el metabolismo de las purinas. Está presente en linfocitos T periféricos, descendiendo sus niveles en las células T inmaduras. Aunque los linfocitos B periféricos, y las células de la leucemia linfática crónica no son positivas para la tinción histoquímica para PNP (Borgers et al 1978), se ha demostrado que líneas linfoblástoides de origen B y linfoblásticas no T no B tienen unos niveles de actividad PNP comparables a los de linfocitos T periféricos (Blatt et al 1980).

1.3.3.- ENZIMAS LISOSOMIALES Y FOSFATASA ACIDA

Las enzimas lisosomiales son útiles en la identificación de células hemopoyéticas, fundamentalmente células del sistema fagocítico.

La Hexosaminidasa es una hidrolasa ácida de la que existen tres isoenzimas (A,I,B) que tienen perfiles característicos en granulocitos normales, linfocitos y timocitos. El patrón isoenzimático es útil en la distinción de subgrupos inmunológicos de la LAL (Ellis et al 1978, Besley et al 1978). Los niveles de este enzima son elevados en la LAL común y en algunos casos de LAL nula pero no en la LAL-T o LAL-B.

La reacción a la fosfatasa ácida puede ser positiva en células T, incluyendo linfoblastos, linfocitos normales transformados con fitohemaglutinina, células del Síndrome de Sézary, y linfocitos atípicos de la mononucleosis infecciosa (Yam 1974, Catovsky et al 1978). La fosfatasa ácida está ausente en la mayor parte de los casos de leucemia linfática crónica, aunque existe una forma resistente al tartrato que se encuentra en células de algunos enfermos con leucemia linfática crónica B y en la tricoleucemia (Yam 1974). La fuerte positividad focal de distribución paranuclear es característico de la LAL-T (Catovsky et al 1978).

1.4.- ANTIGENOS DE DIFERENCIACION DEFINIDOS POR HETEROANSUEROS

En 1963 se descubrió la existencia de un sistema antigénico en el ratón, expresado en células tímicas, en algunas leucemias y en tejido nervioso, y controlado genéticamente por dos alelos (Reif y Allen 1963). Este antígeno Theta es específico para las células T del ratón (Ralf 1969). No se ha descrito un sistema aloantigénico similar en el hombre. En los últimos años se han obtenido xenoantisueros con especificidad para linfocitos T y B humanos mediante inyección de timocitos humanos, líneas celu

lares, cerebro o fragmentos celulares en especies xenogénicas. El antisuero así obtenido requiere absorciones repetidas para asegurar su especificidad. La mayor parte de estos antisueros se dirigen frente a antígenos estables de la superficie celular de naturaleza glicoproteica. Estas estructuras de superficie están relacionadas con la diferenciación celular por lo que se denominan antígenos de diferenciación. Estos antígenos de diferenciación son diferentes de los antígenos específicos de especie y de los antígenos de histocompatibilidad.

1.4.1.- ANTIGENOS DE CELULAS T

En 1973, se obtuvieron los primeros antisueros anti células T humanos (Aiuti y Wigzell 1973, Williams et al 1973, Smith et al 1973), producidos en conejos por la inyección de timocitos o linfocitos T humanos. Estos antisueros precisaban absorciones reiteradas para asegurar su especificidad, siendo la reactividad residual solo débil. Con este antisuero se identificaban aproximadamente el 80% de los linfocitos de sangre periférica, el 90% de células tímicas, 50% de células de amígdala y 20% de los linfocitos de médula ósea. Mediante hiperinmunizaciones con timocitos se preparó otro antisuero específico de células T y que no -

reaccionaba con otras células de sangre periférica o médula ósea (Rodt et al 1975).

Los estudios de inmunoprecipitación para la identificación de los antígenos específicos de células T, revelaba que el antisuero reaccionaba con seis glicoproteínas diferentes de timocitos y células T periféricas (Anderson et al 1980). Esto confirma el hecho conocido de que los antisueros clásicos reaccionan con varios determinantes antigénicos, a diferencia del patrón de reacción unifocal de los anticuerpos monoclonales. Métodos similares se usaron para preparar antisueros que definieran subpoblaciones de células T. Uno de los mejor caracterizados, anti TH2, reaccionaba con el 90% de los timocitos pero sólo con algunas células T de sangre periférica (Evans et al 1978). El subgrupo T-reactivo tenía actividad citotóxica, mientras que las células TH2 negativas proliferaban en el cultivo mixto linfocitario y actuaban como amplificadoras del subgrupo TH2 citotóxico. Se produjeron antisueros frente a antígenos de la primera fase de la diferenciación de células T (timocitos corticales), mediante inmunización con células de la leucemia aguda linfoblástica de tipo pre-T y frente a antígenos de células T maduras (sangre periférica y médula tímica) inmunizando con células de la leucemia linfá

tica crónica de tipo T (Rodt et al 1980).

1.4.2.- ANTIGENOS DE CELULAS B Y ANTIGENOS Ia-LIKE

(HLA-DR)

Se han producido heteroantisueros que identifican antígenos de células B no relacionados con las moléculas Ia y distintos de las inmunoglobulinas de superficie y de los receptores para C3 y Fc (Goodfellow et al 1976, Balch et al 1978, Wang et al 1979, Berntrou et al 1979). Estos antisueros presentaban sin embargo reacciones cruzadas con monocitos y células nulas.

Los linfocitos B humanos tienen antígenos Ia en su superficie. En el ratón la respuesta inmune está controlada por una parte del segmento central del complejo de histocompatibilidad denominada región Ir (Benacerraff y McDevitt 1972, Dachs y Cone 1973). Los antígenos Ia son los productos genéticos de la región Ir y se expresan fuertemente en células B. Se definieron en cepas murinas congénicas y se detectan por aloantisueros (Shreffler y David 1972) y también por antisueros heterólogos (Götze et al 1977). De forma análoga se han detectado antígenos similares a los Ia en el hombre (Werniet 1978, Billing et al 1976, Schlossman

1976). La demostración de su relación con el locus D del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) en el hombre hace pensar en la existencia de un sistema análogo al Ia en el hombre (Siphardt 1977).

En vista de la estrecha relación entre los antígenos Ia y los productos genéticos del locus D del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-D), se utiliza el término HLA-DR (HLA-D related) para denominar a los antígenos Ia de células humanas.

Los antígenos Ia son glicoproteínas compuestas de una cadena pesada de 35000 daltons y una cadena ligera de 27000 daltons (Foon y Gale 1982). Aunque los primeros resultados parecían sugerir que los antígenos Ia eran exclusivos de linfocitos B, en la actualidad está demostrado que también están presentes en monocitos (Billing et al 1976) células progenitoras mieloides y eritroides (Winchester et al 1977, Cline y Billing 1977, Winchester et al 1978, Belzer et al 1981), linfocitos T activados (Evans et al 1978), una subpoblación de linfocitos T de sangre periférica (Fu et al 1978) y algunos tejidos no hemopoyéticos como esperma y células epidermoides.

1.4.3.- ANTIGENO ASOCIADO A LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA
AGUDA COMUN (CALLA).

En 1975 Greaves obtuvo un heteroantisuero con una alta es
pecificidad para la mayor parte de las leucemias linfoblásticas
agudas. Este antisuero fue producido inmunizando conejos con cé-
lulas de leucemia linfoblástica aguda no T no B. Este heteroanti-
suero reaccionaba con blastos del 80-85% de las LAL infantiles,
con el 80-70% de las LAL del adulto y con la crisis blástica lin-
foide de la leucemia mieloide crónica, pero no con otras formas
de leucemia ni con células de sangre periférica. (Radt et al -
1977, Borella et al 1977, Billing et al 1978).

En un principio se pensó que el antígeno definido por es-
te heteroantisuero, denominado antígeno de la leucemia aguda lin-
foblástica común (CALLA) era específico de leucemia humana (Brown
et al 1975). Sin embargo estudios posteriores demostraron que es
taba expresado débilmente en células de médula ósea fetal y de -
médula ósea en regeneración, indicando que debía tratarse de un
antígeno normal de diferenciación de precursores linfoides (Grea-
ves y Janossy, 1978). Sin embargo ya que el antígeno CALLA no es
generalmente detectable en sangre ni en una gran proporción de -
células de médula ósea, sí puede ser considerado como antígeno -

asociado a la leucemia humana y por tanto de gran valor diagnóstico. El CALLA es una glicoproteína de aproximadamente 100.000 - daltons de peso molecular (Sutherland et al 1978). En la actualidad existen anticuerpos monoclonales que identifican este antígeno (Ritz et al 1980, Le Bien et al 1982, Ueda et al 1982, Knapp et al 1982). Recientemente se ha demostrado la expresión del CALLA sobre granulocitos, fibroblastos de piel (Braun et al 1983) y parénquima renal (Metzgar et al 1981, Platt et al 1982).

1.5.- ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A ANTIGENOS DE DIFERENCIACION LINFOCITARIA

Los antisueros preparados tradicionalmente necesitan de procesos de absorción para hacerse específicos. Dada la diversidad de la respuesta inmune y la complejidad del procedimiento de absorción, es difícil reproducir la obtención de estos antisueros con idéntica especificidad. La introducción de la tecnología de hibridomas productores de anticuerpos por Köhler y Milstein (1977) ha resuelto los problemas asociados a los heteroantisueros clásicos. Con esta técnica se consigue la fusión de linfocitos B murinos sensibilizados con células mielomatosas; las células híbridas resultantes mantienen tanto la capacidad de produ-

cir anticuerpos del linfocito B, como la capacidad de crecimiento ilimitado de la línea mielomatosa de tal forma que, después de clonar, se obtiene una línea celular inmortal productora de altas concentraciones de anticuerpos de especie molecular y especificidad única. Además de las ventajas de uniformidad, precisión y cantidad ilimitada de anticuerpo, esta técnica proporciona la posibilidad de obtener, en forma purificada, anticuerpos frente a determinantes antigénicos menores, que permanecerían ocultos en antisueros policlonales convencionales, incluso cuando se utilizan antígenos no purificados para la inmunización. - Las posibilidades que brinda la tecnología de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales ha renovado el interés en el estudio y caracterización de los antígenos de diferenciación en la linfopoyesis humana y en los procesos linfoproliferativos malignos.

1.5.1.- DIFERENCIACION DE LAS CELULAS T

Los antígenos de diferenciación de las células T se designan con la letra T seguida de un número que va del 1 al 11.- En la Tabla 1 se agrupan los anticuerpos monoclonales ant-T más ampliamente utilizados de acuerdo con su patrón de reactividad.

Tabla 1

Antígeno	Peso Molecular (daltons)	Anticuerpo monocl.	Patrón de reacción
T11	55.000	OKT11	PaOT, asociado
	55.000	Leu 5	al receptor para rosetas E
T10	37.000	OKT10	Pan Timocito, linfocitos T activados, precursores hematopoyéticos
T9	190.000	OKT9	Timocitos corticales preco ces y cel. T activadas aso ciado a receptor para Trans ferrina
T8	33.000	OKT8	Células T citotóxicas/ Supresoras
	33.000	OKT5	
	32.000	Leu 2a	
	32.000	Leu 2b	
T6	49.000	OKT6	Timocitos corticales
		Leu 6	
T4	62.000	r T4	Células T helper/inductores
	55.000	Leu 3	
T3	20.000	OKT3	Pan T (periféricos)
	23.000	Leu 4	
T1	66.000	OKT1	Pan T y LLC-B
	67.000	Leu 1	

STOBO (1984) Y THIEL (1984)

Las células T se desarrollan primero en el microambiente - del timo. Las células precursoras de médula ósea emigran a la corteza tímica (Stutman 1977) desde donde se desplazan a la médula - tímica bajo una serie de pasos de diferenciación inducidos por el estroma tímico. Esta diferenciación se correlaciona con la expresión diferencial de algunas de las moléculas T tanto como con la adquisición de ciertas funciones diferenciales.

El 90% de los timocitos se encuentran en la corteza mientras que el 10% restante se encuentran en la médula. Los timocitos corticales están constituidos por dos poblaciones celulares: una más numerosa de células pequeñas rosetas E positivas y otra población menor de células grandes con gran capacidad de división y que carecen de receptor para hematies de carnero. Se considera que estas últimas son precursoras de las células tímicas por lo que se las denomina protimocitos (Galili et al 1982). Estas células están en relación con el estadio I de los timocitos descrito por Reinherz et al (1980) y expresan los marcadores T10 y T9. Los timocitos comunes o de estadio II, que se encuentran en la corteza tímica expresan el receptor E y por tanto reaccionan con el anticuerpo monoclonal OKT11, además adquieren la molécula T6 y T1 y pierden la molécula T9. Algunos timocitos comunes expresan si-

multáneamente las moléculas T4, T5 y T8. Los timocitos corticales no han demostrado poseer ninguna de las funciones que caracterizan a las células T periféricas. Conforme los timocitos se desplazan desde la corteza a la médula, se desarrollan en dos líneas distintas, ambas poseen los marcadores T11, T10, T3 y T1. Una población posee también la molécula T4 mientras que la otra es T5/T8 positiva. En este estadio (estadio III o de timocito maduro) se adquieren los antígenos HLA-ABC (Bhan et al 1980) y se pierde la molécula T6.

Concomitantemente con la expresión de T3, las células T adquieren algunas propiedades y funciones diferenciales. Por ejemplo, pueden proliferar por estimulación con mitógenos y pueden responder a aloantígenos de la reacción mixta de linfocitos (Stobo 1982).

En la periferia extratímica las células $T4^+$, $T5/T8^-$, que tienen una función helper/inductora, predominan en sangre periférica, amígdala, paracortex de ganglios linfáticos y lámina propia intestinal. Las células $T5/T8^+$, $T4^-$ predominan en médula ósea y en epitelio del tracto digestivo (Janossy 1980) y constituyen la población citotóxica/supresora.

1.5.2.- CARACTERIZACION FENOTIPICA COMPARATIVA DE LAS CELULAS T MALIGNAS.

La utilización de una batería de anticuerpos monoclonales anti-T permite la caracterización fenotípica del clon dominante en los procesos malignos de células T tanto agudo como crónico.- Es de señalar la heterogeneidad encontrada en ciertos tipos de leucemias.

Si los fenotipos de las células leucémicas de enfermos con leucemia T se ordenan según la secuencia de la diferenciación T, la primera célula en el esquema sería aquella que poseyera el fenotipo del protimocito, que no expresa el receptor para hematies de carnero pero sí antígenos de diferenciación T. Este fenotipo incompleto de célula T se ha observado en algunas leucemias agudas linfoblásticas con la ayuda de sueros anti-T convencionales, denominándolas como LAL-preT. La distinción del fenotipo pre T - en la leucemia aguda linfoblástica (LAL) puede realizarse con los anticuerpos monoclonales que reconocen las moléculas T10 y T1, presentes en las leucemias pre T, y por la ausencia del receptor E y de reactividad con los anticuerpos monoclonales anti B (Thiel et al 1980, Foon et al 1982). Los anticuerpos monoclonales WT1 y 3A1 son de gran utilidad en el diagnóstico de las leucemias T - (Haynes et al 1981, Janossy et al 1982, Tax et al 1981). Reaccio

nan con el 100% de las leucemias linfoblásticas T y pre T y con - la leucemia prolinfocítica T y débilmente con un porcentaje de leu- cemia linfática crónica T (LLC-T) y síndrome de Sézary.

La mayor parte de las leucemias linfoblásticas T (LAL T) se corresponden fenotípicamente con los timocitos comunes o ti- mocitos de estadio II (Reinherz et al 1979, Bernard et al 1981, Greaves et al 1981). Dentro de las LAL T se distinguen algunas de fenotipo más inmaduro que además de poseer el receptor E y - la molécula T11, expresan los antígenos T10 y T6, y en ocasio- nes, también expresan simultáneamente los marcadores T4 y T8. - Otras LAL T se corresponden con timocitos más maduros que expre- san el antígeno T3 pero no la molécula T6.

En la Tabla 2 se resumen los fenotipos de los procesos - malignos T, sin embargo hay que tener en cuenta que los hallaz- gos fenotípicos sobre enfermos concretos no coinciden muchas ve- ces con las características esperadas. La heterogeneidad fenotí- pica de los síndromes linfoproliferativos T hace difícil encuad- rarlos en un esquema rígido.

Entre los casos más interesantes que se salen de este es- quema se pueden citar aquellos de LAL tímicas que carecen de la enzima TdT, algunas leucemias de células T maduras que sin em-

Tabla 2

Tipo Celular	Tejido	Marcadores										Diagnostico clínico			
		T10	T6	T3	T8	T4	T1	T11	RE						
Cell. T precursoras															
1. Pretimocito	zona subcapsular del timo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LAL Pre T
2. Timocito común inmaduro	corteza tímica	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LAL-T
3. Timocito común	corteza tímica	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	LAL-T, Li-T
4. Timocito maduro	médula tímica	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Li-T
Ca. T maduras.															
5. Cel. T helper/inductores	Compartimento periférico	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	S. Sezary LLC-T
6. Cel. T supresoras	Compartimento periférico	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	LLC-T
LAL Leucemia aguda linfoblástica															
LL Linfoma linfoblástico															
LLC Leucemia linfática crónica															

FENOTIPO DE LAS LEUCEMIAS DE CELULAS T EN RELACION CON LA DIFERENCIACION
CELULAR. THIEL (1984)

bargo expresan el antígeno T10 y LAL-T con fuerte expresión de moléculas HLA-ABC (Greaves et al 1981, Brandstock et al 1980).

En contraste con las leucemias agudas, en todas las leucemias crónicas de células T como el síndrome de Sézary, la leucemia linfática crónica T (LLC-T) y el linfoma linfoblástico de células T, las células tienen el fenotipo de linfocitos T maduros (Greaves et al 1981, Boumsell et al 1981). Prácticamente todos los casos estudiados de linfoma cutáneo de células T (micosis fungoide, S. de Sézary) tienen el fenotipo de células helper $T4^+$ / $T8, T8^-$ (Greaves et al 1981, Boumsell et al 1981, Kung et al 1981). Este fenotipo está de acuerdo con estudios que demuestran que las células de Sézary actúan como células helper (Broder et al 1976). Por el contrario, la mayor parte de las leucemias linfáticas crónicas T (LLC-T) tienen un fenotipo supresor ($T4/T8^+$) y solo rara vez son de fenotipo helper (Foon et al 1982, Boumsell et al 1981).

Recientemente se ha descrito una forma de leucemia T denominada leucemia de células T del adulto, que representa una proliferación de células T post tímicas

Esta forma de leucemia se reconoce fundamentalmente en áreas endémicas del Japón, Caribe y Sudeste de Estados Unidos y está 11

gada etiológicamente al virus HTLV (Uchiyama et al 1977).

Las células de esta leucemia expresan el receptor E y el antígeno T4 pero no los marcadores T6 y T8. Tampoco poseen la enzima TdT.

1.5.3.- FENOTIPO DE LAS LEUCEMIAS/LINFOMAS DE CELULAS B EN RELACION CON LA DIFERENCIACION B NORMAL.

Se han producido anticuerpos monoclonales reactivos con células B humanas. En la Tabla 3 se recogen algunos de los más usados. Algunos de ellos no son específicos de células B pero - sin embargo muestran una reactividad selectiva para estadios - concretos de la diferenciación B. Los antígenos Ia están presentes a lo largo de toda la diferenciación B salvo en el estadio de célula plasmática. Existen anticuerpos monoclonales frente a antígenos Ia/DR, la mayor parte de ellos reconocen determinantes monomórficos y se usan para el estudio fenotípico celular, - algunos reaccionan con antígenos polimorfos asociados con el locus HLA-DR y se utilizan en el tipeaje celular. Los anticuerpos monoclonales B1 y B2 muestran un patrón de reactividad diferente con células B sanguíneas y de ganglio linfático (Stashenko - et al 1980, Nadler et al 1981).

Tabla 3

Designación del clon	Reactividad
BA-1	Todas las células B
B1, FMC1	Todas las células B de sangre periférica
B2	Células B tisulares
FMC7	Subpoblacion. de células B
T0-1	Células B del centro germinal
J5, VIL-A1, BA-3	p100/CALLA
OKIa 1	Ia/DR monomórfico

ANTICUERPOS MONOCLONALES REACTIVOS CON LINFOCITOS B HUMANOS,
 ANTIGENO ASOCIADO A LA LAL COMUN Y CON ANTIGENOS Ia/DR.

TOMADO DE THIEL (1984)

El marcador FMC1 es generalmente paralelo a la expresión de inmunoglobulinas de superficie por lo que es útil como marcador B (Brooks et al 1981a) mientras que el anticuerpo monoclonal FMC7 reacciona con una subpoblación de células B y es de gran utilidad en la distinción de la leucemia prolinfocítica (LPL) de la LLC (Brooks et al 1981b, Catovsky 1981). El marcador T0-1 muestra una distribución aún más restringida ya que se encuentra exclusivamente en células B del centro germinal y en algunos procesos malignos B (Ziegler et al 1981). El anticuerpo BA-1 reacciona con todas las células B incluyendo células de la LAL pre-B aunque también reacciona con granulocitos maduros (Abramson et al 1981).

En la Tabla 4 se muestra un esquema simplificado de la diferenciación B, en el que se compara la reactividad de estos anticuerpos monoclonales anti B, con la expresión de inmunoglobulinas de superficie y citoplásmicas.

La señal más precoz de la diferenciación B, es el reordenamiento de los genes inmunoglobulínicos. (Korsmeyer et al 1981). Este reordenamiento genético se detecta en la mayoría de las LAL CALLA positivas, pero no en la LAL-T. Así la célula CALLA +, que aún no expresa cadenas pesadas μ intracitoplásmicas, se consi

Tabla 4

Tipo celular	Tejido	CALLA	Ig. Citopl.	IgS	BA-1	B1	B2	FMC1	FMC7	T01	Diagnóstico clínico
1.- Pre-PreB	M.O.	+	-(a)	-	+	+	-	-	-	-	LAL común
2.- Pre B	M.O.	+	+ μ	-	+	+	+	-	-	-	LAL preB
3.- B virgen/precoz	M.O.	(+)	-	+ μ	+	+	NT	NT	NT	-	LAL preB
4.- Blasto B	Periferia	-	-	+ μ K λ	+	+	NT	+	NT	-	LAL ? linf Burkitt
5.- Cel. B1	gang. linf.	-	-	+ μ δ K λ	+	+	+	+	-	+	LLC-B
6.- Cel. B2	gang. linf.	-	-	+ μ δ K λ	+	+	+	+	-	+	linf. folic. B
7.- Prolinfocito	gang. linf.	-	-	+ μ δ K λ	+	+	NT	-	+	-	LPL-B, Tricol
8.- Linfoplasmoscitoide	gang. linf.	-	+ μ K	+ μ K λ	+	+	-	NT	NT	NT	Macrogli Waldenström
9.- Cel. plasmática	M.O./perif.	-	+ δ K λ	-	-	-	-	NT	NT	NT	Mieloma Múlt.

(a) Reordenamiento genético para cadenas

LAL: Leucemia aguda linfoblástica

LPL: Leucemia prolinfocítica

Tricol.: Tricoleucemia.

LLC: Leucemia linfática crónica.

FENOTIPOS DE LEUCEMIAS DE CELULAS B EN RELACION A LA DIFERENCIACION B NORMAL

(TOMADO DE THIEL 1984)

dera una célula en estadio pre-pre B, la cual expresa además los antígenos reconocidos por BA-1 y B1 (Nadler et al 1982). El siguiente estadio de diferenciación sería la célula pre B verdadera, con expresión de cadenas μ intracitoplasmática.

El estadio de linfocito B virgen caracterizado por el antígeno CALLA, débil expresión de cadenas μ intracitoplasmáticas y presencia de cadenas pesadas de IgM en la superficie sin expresión de cadenas ligeras, representa un estado de transición entre las células pre B y las células B. Un paso más en la diferenciación B lo constituyen células que ya expresan tanto cadenas pesadas como ligeras de IgM en su superficie, a este estadio pertenece el clon dominante de las LAL B.

En un estadio posterior se situarán las células de la LLC-B, caracterizadas por la expresión de IgM e IgD de superficie, formación de rosetas con hematíes de ratón y escasa reactividad con el anticuerpo monoclonal FMC7. Por el contrario en la leucemia prolinfocítica (LP) se encuentra una fuerte positividad para el FMC7, escaso porcentaje de formación de rosetas con hematíes de ratón y una mayor densidad de inmunoglobulinas de superficie. En la tricoleucemia existe igualmente positividad para el FMC7 y escaso porcentaje de formación de rosetas pero sólo el

20% reacciona con BA-1.

Los linfomas nodulares o foliculares, representan probablemente una proliferación neoplásica de los linfocitos B del centro folicular de los ganglios linfáticos. Este tipo celular se caracteriza por su alta densidad de inmunoglobulinas de superficie monoclonales y, a diferencia de la LLC, por un escaso porcentaje de formación de rosetas con hematíes de ratón. Además expresan los antígenos BA1, B1 y B2 y fundamentalmente T0-1 que es exclusivo de las células B del centro germinal.

El último estadio de la diferenciación B lo constituyen las células plasmáticas. Las células B malignas de la macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de las cadenas pesadas y mieloma múltiple pueden representar los estadios últimos de la maduración de células B de los cordones medulares. Las células de enfermos con macroglobulinemia de Waldenström, como las células de la LLC-8, expresan inmunoglobulinas de superficie monoclonales, antígenos Ia/DR y B1, pero a diferencia de ellas no expresan el antígeno B2 ni forman rosetas con hematíes de ratón. A veces, como en el mieloma múltiple, tienen moléculas completas de inmunoglobulinas en el citoplasma. Por último las células del mieloma se caracterizan por la presencia de inmunoglobulinas intracito--

plasmáticas y la ausencia de inmunoglobulinas de superficie y -
antígenos B1, B2, Ia/DR y BA1. Es interesante señalar que las -
células del mieloma expresan el antígeno T10; también expresan
el antígeno PCA-1. Estos dos antígenos son los únicos detecta--
bles en este estadio de la diferenciación B(Nadler et al 1984).

1.6.- ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A GRANULOCITOS, MONOCITOS, ERITROCITOS Y PLAQUETAS.

Las células hematopoyéticas no linfoides, se clasifican fundamentalmente por criterios morfológicos y citoquímicos. La clasificación FAB de leucemias agudas está basada en estos mismos criterios (Bennett et al 1976). Esta clasificación distingue subgrupos de leucemia aguda mieloide (LMA) que parecen correlacionarse con estadios específicos de la maduración y diferenciación de contrapartidas celulares normales. Aunque los estadios más avanzados de la diferenciación mieloide son identificables por rasgos morfológicos y técnicas citoquímicas, el estudio de los estadios más precoces de la diferenciación mieloide y el diagnóstico de las leucemias mieloides pobremente diferenciadas es difícil por la ausencia de características morfológicas o bioquímicas diferenciales. La identificación de marcadores inmunológicos específicos de serie mieloide puede ser de utilidad en esta situación.

1.6.1.- ANTIGENOS DE DIFERENCIACION MIELOIDE Y DE LEUCEMIAS MIELOIDES.

Existen anticuerpos monoclonales que reaccionan con células mieloides. Algunos de ellos presentan una reactividad restringida

a granulocitos o a monocitos mientras que otros reaccionan con am bos. El anticuerpo monoclonal OKM1 (Breard et al 1980) reacciona con ambos pero además también lo hace con plaquetas y un subgrupo de células T. Aunque la mayor parte de los anticuerpos monoclonales frente a serie mieloide distinguen entre leucemias mieloides y linfoides, algunos pueden distinguir entre las variantes granulocíticas de la leucemia aguda mieloide (subgrupos M1, M2 y M3 de la clasificación FAB) de las variantes monocíticas (M4 y M5). Así del panel de anticuerpos monoclonales obtenidos por Griffin y col (1981), los anticuerpos My4 y My8 presentan una mayor reactividad con las variantes monocíticas. Los anticuerpos My-1 y VIM5 reaccionan fundamentalmente con los subgrupos M1, M2 y M3 (Civin et al 1981, Majdic et al 1981).

A pesar de todo existen LMA, especialmente algunas del subgrupo M1 de la clasificación FAB que no son reconocidas por estos anticuerpos monoclonales. Solo el anticuerpo My7 (Griffin et al 1981) parece ser algo más específico de mieloblasto.

Hasta el momento, la determinación de la peroxidasa ultraestructural parece ser la técnica más sensible para el diagnóstico de estos casos (Marie et al 1982)

1.6.2.- ANTIGENOS DE LA MEMBRANA ERITROIDE Y LEUCEMIAS ERITROIDES.

Se han producido anticuerpos monoclonales que reconocen la glicoforina A, una sialoglicoproteína de la membrana eritroide (Greaves et al 1983). Estos monoclonales reaccionan con los normoblastos de médula ósea pero no con precursores eritroides (BFU-E y CFU-E). De la misma forma serán incapaces de reconocer eritroleucemias en las que el stop madurativo del clon dominante, se sitúe a niveles equivalentes de la diferenciación eritroide.

1.6.3.- ANTIGENOS PLAQUETARIOS Y LEUCEMIAS MEGACARIOBLÁSTICAS.

La leucemia megacarioblástica es una transformación maligna de los precursores plaquetarios. Esta entidad es de rara aparición y no se ha establecido para ella una categoría especial en la clasificación FAB. Sin embargo, en una proporción considerable de casos de leucemia mieloide crónica (LMC) Ph¹ positivo en crisis blástica, se ha podido demostrar la existencia de un clon dominante de megacarioblasto, mediante tinción de peroxidasa y microscopía electrónica (Breton-Gorius et al 1978). Se ha descrito un anticuerpo monoclonal (AN51) cuyo patrón de reactividad queda restringido a plaquetas (McMichael et al 1981). En los

estudios iniciales 4 de 16 enfermos de LMC en crisis blástica presentaban una población de células blásticas AN51 positivas y sólo 1 de 60 enfermos con leucemia aguda indiferenciada (Greaves 1981).

2.- VALOR DE LOS MARCADORES INMUNOLOGICOS EN EL DIAGNOSTICO DE LA LEUCEMIA HUMANA

La aplicación de los marcadores inmunológicos en el diagnóstico de las leucemias humanas se dirige fundamentalmente a tres objetivos:

1º.- Tratar de identificar marcadores asociados exclusivamente a la leucemia.

2º.- Detectar señales, de diferenciación, de otra forma inadvertidas en células leucémicas, particularmente para la decisión entre diferenciación linfoide y mieloide.

3º.- Proporcionar nuevas subclasificaciones de las leucemias intentando relacionarlas con los signos clínicos y el pronóstico.

2.1.- ANTIGENOS ASOCIADOS A LEUCEMIA

El primer objetivo está relacionado con la cuestión aún no resuelta de si existen o no antígenos específicos de leucemia. -

Hasta el momento actual no se ha detectado ningún marcador exclusivo de célula leucémica y es por ello que se prefiere utilizar el término de antígenos asociados a leucemia. De ellos los más importantes son:

2.1.1.- MOLECULA p100:

Es una glicoproteína de 100.000 daltons de peso molecular detectada por primera vez mediante un heteroantisuero (Greaves - et al 1975). Se denomina también antígeno asociado a la leucemia linfoblástica común (CALLA) ya que está presente en la mayor parte de las LAL no T no B. Este antígeno permite la identificación de un subgrupo de leucemias linfoblásticas (LAL de tipo común).

En un principio se consideró al antígeno p100 como específico de leucemia (Brown et al 1975), sin embargo posteriormente se comprobó que estaba presente también en células precursoras - normales (Greaves y Janossy 1978). En la actualidad existen anticuerpos monoclonales que reconocen la molécula p100: J-5 (Ritz - et al 1980) BA3 (Le Bien et al 1982), NL-1 (Ueda et al 1982) VIL -A1 (Knapp et al 1982) 24-1 (Braun et al 1983)

2.1.2.- MOLECULA p24

Los anticuerpos monoclonales BA2 (Kersey et al 1981) J2 -

(Harcend et al 1981) FMC8 (Brooks et al 1982) DUALL1 (Jones et al 1982) SJ-9A4 (Komada et al 1983a,b; Melvin et al 1984) CALL1 (Deng et al 1983) ALB6 (Boucheix et al 1983) 3A9, 3A8, 2E7 (Clark y Yokochi 1984) reconocen una molécula de peso molecular aproximado entre 24.000 y 26.000 daltons presente fundamentalmente en células de la leucemia aguda linfoblástica no T y en plaquetas. En la actualidad se considera a la molécula p24 como un antígeno de diferenciación normal anterior en su aparición a la molécula CALLA (Royston et al 1984).

La demostración de que estos antígenos están presentes en células precursoras normales ha hecho plantear la hipótesis de que no hay ningún antígeno en células leucémicas que no pueda ser explicado como el producto genético de contrapartidas celulares normales. Hasta el momento actual ninguno de los marcadores detectados en células leucémicas puede ser considerado como específico de leucemia. A pesar de no ser específicos estos marcadores asociados a leucemia tienen un gran valor diagnóstico, así el hecho de que exista un escaso porcentaje de células CALLA + en médula ósea normal, no hace dudar del diagnóstico de LAL común cuando se encuentra una gran proporción de células CALLA + en una muestra de médula ósea. Además, la diferenciación celular está asociada a

la distribución topográfica de las células, y la detección de de terminados marcadores fuera de su lugar habitual es también de - gran valor diagnóstico, por ejemplo la demostración de células - CALLA o TdT positivas en líquido cefalorraquídeo o biopsia testiti cular y la detección de células de fenotipo tímico en la médula ósea de enfermos con LAL-T. En estos casos el diagnóstico puede establecerse sin información clínica o morfológica.

2.2.- DETECCIÓN DE MARCADORES DE DIFERENCIACION EN LEUCE- MIAS INDIFERENCIADAS

El segundo objetivo está en relación con la existencia de leucemias agudas indiferenciadas (LAI), es decir leucemias sin - rasgos morfológicos o citoquímicos diferenciales. Este grupo se ha reducido considerablementa con la aplicación de marcadores inin munológicos en el estudio de la leucemia.

La proporción de leucemias indiferenciadas es de aproximada damente el 5-15% (Greaves et al 1981), sin embargo cuando se utili zan métodos inmunológicos en su análisis, la diferenciación - linfóide se detecta en aproximadamente dos tercios de los casos (Thiel et al 1980, Greaves et al 1981, Marie et al 1982). Esto - es especialmente importante en los adultos, en los que la proporti on

ción de LAI es relativamente elevada (Thiel et al 1980, Hoelzer - et al 1983, Sen y Borella 1975).

Cuando, además de los métodos inmunológicos se determina - ultraestructuralmente la peroxidasa, el tercio restante de los ca- sos puede revelarse como leucemias agudas mieloides (LMA) pobre- mente diferenciadas (Marie et al 1982). El diagnóstico exacto de este grupo de leucemias pobremente diferenciadas es de gran impor- tancia tanto en la elección de la terapéutica como en la valora- ción de los resultados en los ensayos terapéuticos.

De gran importancia terapéutica y pronóstica es también el diagnóstico inmunológico de la crisis blástica de la leucemia mie- loide crónica (CB-LMC). Los blastos de la LMC en transformación - suelen ser morfológica y citoquímicamente indiferenciados. Sin em- bargo el estudio con marcadores inmunológicos ha puesto de mani- fiesto que en aproximadamente dos tercios de los casos de CB-LMC los blastos son de estirpe mieloide (Rosenthal et al 1977) y en - el tercio restante muestran marcadores de diferenciación linfoide, expresando idéntico fenotipo que las células de la LAL común (Ja- nossy et al 1976). En este último caso es posible conseguir a ve- ces la remisión hematológica y la vuelta a la fase crónica de la enfermedad durante periodos superiores al año, con la aplicación

de drogas, vincristina y prednisona, habituales para LAL (Canellos et al 1971). Sin embargo la crisis mieloblástica de la LMC no responde en general a la quimioterapia y la supervivencia media es inferior a seis meses (Rosenthal et al 1977).

2.3.1.- CLASIFICACION INMUNOLOGICA DE LA LAL

El tercer objetivo mencionado anteriormente, se ha cumplido en el caso de las leucemias agudas linfoblásticas. Estas se clasificaron en un principio atendiendo a la presencia o no de Ig de superficie (IgS) y receptores para hematies de carnero (E) en tres grupos: LAL-T ($E^+ IgS^-$) LAL-B ($IgS^+ E^-$) y LAL no T no B ($E^- IgS^-$). La introducción del antisuero anti CALLA dividió el grupo de las LAL no T no B en dos subgrupos: LAL comunes o CALLA+ y LAL nulas ($IgS^- E^- CALLA^-$). Un grupo de LAL comunes expresaba cadenas μ intracitoplasmáticas denominándose a este subgrupo como LAL-preB (Vogler et al 1978).

La utilización de sueros anti T específicos puso de manifiesto que existen LAL nulas que expresaban marcadores T aunque no receptores E, a este subgrupo se le denominó LAL preT (Thiel et al 1978). Este subgrupo fue posteriormente confirmado por la utilización de anticuerpos monoclonales anti T (Janossy et al 1980, Greaves et al 1981, Kersey et al 1982).

Así existe una clasificación de la LAL que la divide en seis subgrupos bien definidos:

- Leucemia aguda linfoblástica común (LAL común).

Es la forma más frecuente en niños abarcando el 70% de los casos de leucemia entre los 3-5 años de edad (Villegas et al 1981).

Los blastos de esta leucemia se caracterizan fundamentalmente por expresar el antígeno CALLA; también expresan antígenos Ia/DR, B1 y son TdT positivas. A pesar de la ausencia de inmunoglobulinas tanto de superficie como citoplasmáticas, está demostrado que las células CALLA positivas presentan un reordenamiento de los genes que codifican la síntesis de inmunoglobulinas por lo que se las considera de origen B (Kossmeyer et al 1961).

- Leucemia aguda linfoblástica pre B.

Representar el 20% de las LAL no T no B (Bronet et al 1979) y se caracterizan por la presencia de cadenas pesadas de inmunoglobulina en el citoplasma. Carecen de cadenas ligeras K ó λ . Expresan los antígenos Ia/DR, CALLA, BA1, B1 y son TdT positivas.

- Leucemia aguda linfoblástica B

Solo representa el 2% del total de LAL (Villegas et al -

1981). Se caracterizan por la expresión de IgM de superficie. Expresan los antígenos Ia/DR, B1 y BA-1 (Bronet et al 1976). Son -negativas para la TdT. Algunas leucemias B muestran una escasa -reactividad con anticuerpos monoclonales anti CALLA, pero cuando existe este es siempre inferior al 10% del total de células.

- Leucemia aguda linfoblástica nula (LAL nula)

Suelen ser Ia/DR +, TdT +. No expresan el antígeno CALLA. Un porcentaje de ellas expresa la molécula p24.

- Leucemia aguda linfoblástica T y pre T (LAL T y LAL -pre T).

Los hallazgos clínicos asociados con la LALT incluyen un porcentaje de blastos elevados, predominancia masculina y existencia de masa mediastínica. La mayoría de los enfermos con LALT expresan en sus blastos fenotipos de los dos primeros estadios -de la diferenciación tímica y se identifican por la presencia de receptores E y reactividad con antisueros T (OKT1, OKT11, WT1, -OKT6, OKT10, OKT9). Solo un escaso porcentaje de LALT reacciona con antisueros anti T3, antígeno PanT que se encuentra en timocitos más maduros y en linfocitos T de sangre periférica. (Foon et al 1981).

Las LAL pre T se caracterizan por su ausencia de receptores E pero al igual que las LAL T son TdT positivas y reaccionan con anticuerpos monoclonales anti T (WT1, 3A1) (Bronet et al 1978). Un escaso porcentaje puede expresar el antígeno CALLA (Gatovsky et al 1983).

2.3.2.- RELACION ENTRE LOS SUBGRUPOS DE LAL CON LA MORFOLOGIA Y CITOQUIMICA.

2.3.2.1.- Morfología

La clasificación morfológica de la LA más ampliamente adoptada en los últimos años es la realizada por el grupo cooperativo franco americano británico (FAB) (Bennett et al 1976). Esta clasificación establece tres grupos morfológicos de LAL: L1, L2 y L3. La LAL nula, común, preB y T pueden pertenecer tanto al tipo morfológico L1 como L2. La mayoría de los casos de LAL común en el niño son L1 (Greaves 1981), mientras que en el adulto la mayor parte de las LAL comunes pertenecen al grupo L2 (Brearley et al 1975). Solo el grupo L3 parece ser prácticamente exclusivo de LAL-B aunque se han señalado algunas excepciones (Thiel et al 1980, Koziner et al 1980). En definitiva y salvo la LAL-B que normalmente pertenece al subgrupo morfológico L3 no hay una relación clara entre tipo inmunológico y morfología.

2.3.2.2.- Citoquímica.

Entre las tinciones citoquímicas la más ampliamente estudiada en la LAL es la tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS). El grado de PAS positividad a mazacotes está en relación con la supervivencia (Palmer et al 1980). El 55-77% de los casos de LAL común son PAS positivos, el porcentaje disminuye progresivamente en los otros grupos inmunológicos: 50% en la LAL nula, 25% en la LAL pre B, 10-20% en la LAL pre T, 9-25% en la LAL T. La LAL B - suele ser PAS negativa (Thiel et al 1980).

La fosfatasa ácida es positiva en la mayor parte de los - casos de LAL T y pre T (Catovsky et al 1978, Thiel et al 1980) - aunque también existen casos de positividad en la LAL común y - pre B (Thiel et al 1980).

La α -naftil esterasa ácida (ANAE) en un principio se con sideró una tinción capaz de distinguir entre LAL T de LAL no T

Sin embargo en estudios más amplios se ha de mostrado que aunque ANAE es positiva en el 80% de los casos de - LAL T y 70% de LAL pre T también existen un 25% de casos de LAL común positivos para ANAE (Huhn et al 1980, Huhn et al 1981).

2.3.3.- SIGNIFICACION PRONOSTICA DE LOS SUBGRUPOS INMUNOLOGICOS DE LA LAL.

Aunque la inducción de la remisión tiene efecto en un alto porcentaje de casos de LAL, es evidente que hay diferencias entre los distintos subgrupos inmunológicos. La LAL remite en menor proporción en la LAL T que en la LAL común, y en los raros casos de LAL B la inducción de la remisión suele fracasar (Zuker-Franklin et al 1981).

Algunos autores han encontrado que la LAL T tiene un pronóstico considerablemente inferior que la LAL no T no B, tanto en lo que concierne a la duración de la primera remisión como a la expectativa de vida. Sin embargo, es importante señalar que la LAL T se acompaña de otros hallazgos clínicos considerados clásicamente como de pronóstico desfavorable y que dentro de cada grupo inmunológico de LAL existen respuestas diferentes en relación al conteo inicial de blastos. Esto es particularmente evidente en el caso de la LAL común.

Los adultos con LAL tienen en general un pronóstico menos favorable que los niños. Sin olvidar las indicaciones anteriormente expuestas, se puede establecer para ambos grupos de edad un orden de pronóstico favorable como sigue: LAL común > LAL -

pre B > LAL nula > LAL T > LAL B (Foon et al 1982).

3.- UTILIZACION TERAPEUTICA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales tienen potencialmente una gran utilidad terapéutica por sí solos o asociados a proteínas tóxicas o drogas citostáticas (Ghose y Blair 1978). Sin embargo existen obstáculos que limitan su utilización terapéutica como la existencia de antígenos circulantes, la modulación antigénica y la reactividad de estos anticuerpos con células normales.

En la actualidad la investigación sobre la terapéutica con anticuerpos monoclonales está centrada en el tratamiento de médula ósea previo al trasplante autólogo para eliminar blastos residuales (Wells et al 1979, Netzel et al 1980, Ritz et al 1981) y en el tratamiento de médula ósea previo al trasplante alogénico para eliminar los linfocitos T.

Otras experiencias son esperanzadoras; así Miller et al (1982) consiguieron la remisión completa de un enfermo con linfoma nodular leucemizado, resistente a la quimioterapia, por la utilización de un anticuerpo monoclonal antiidiotipo.

4.- CELULA DIANA DE LA TRANSFORMACION MALIGNA

La célula diana es la responsable del proceso maligno y - en última instancia es su susceptibilidad a la quimioterapia la que determina el curso de la enfermedad. Por ejemplo, mientras - que el fenotipo de los blastos de la LAL común y de la crisis - linfoblástica de la LMC son idénticos, las células diana de am- - bos procesos son claramente diferentes. En la crisis blástica de la LMC la célula diana debe ser una célula primitiva pluripoten- te muy difícil de erradicar, mientras que en la LAL común puede ser fácilmente erradicada con quimioterapia convencional en la - mayoría de los enfermos.

La célula diana de la transformación maligna en las leuce- mias linfoblásticas es desconocida. Existe la teoría de que la - transformación maligna debe ocurrir en una célula mucho más pri- mitiva que las células que predominan en médula ósea y sangre pe- riférica. Estas células malignas conservan la capacidad de dife- renciación. Algunas observaciones sostienen esta teoría:

1ª.- Las células leucémicas son frecuentemente heterogéneas; las células de enfermos con una LAL pre B tienen un número varia- ble de linfoblastos con cadenas μ intracitoplasmáticas y sin ca- denas μ ($C\mu$) (Greaves et al 1980). Las células $C\mu$ negativas -

podrían ser precursoras (pre-pre B) e incluso, las células diana de la transformación maligna, mientras que las células C μ -positivas resultarían de una diferenciación parcial de la célula precursora.

2^o.- El fenotipo de la LAL puede cambiar después de la quimioterapia debido posiblemente a un estímulo positivo o negativo de la diferenciación celular (Borella et al 1979).

3^o.- El fenotipo de células leucémicas puede ser modificado "in vitro" después de estimulación con agentes tales como el dimetilsulfoxido (DMSO) o ésteres del forbol (Greaves et al 1981, Nagasawa et al 1980).

4^o.- Por último, se han encontrado determinantes idiotípicos monoclonales idénticos en células de mieloma y en los linfocitos T y B de enfermos con mieloma múltiple (Mellstedt et al 1976, Salmon y Seligmann 1974, Preud'homme et al 1977). Así las células del mieloma representan las células más diferenciadas de un proceso clonal en el que están implicados linfocitos B maduros y posiblemente linfocitos T. Esto sugiere que la transformación maligna ocurriría en una célula precursora linfoide aun no comprometida en una vía (T ó B) de la diferenciación linfocitaria.

La célula diana de la transformación maligna en la leucemia mieloide aguda (LMA) es también desconocida. Estudios cromosómicos y de los isoenzimas de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) indican que la mayor parte de los casos de LMA derivan de una célula precursora mieloide muy inmadura (Jensen y Killmen 1971, Blackstock y Garson 1974, Fialkow et al 1979) sugiriendo que la transformación maligna ocurre a este nivel. Sin embargo otros hallazgos indican la existencia de una heterogeneidad considerable. Fialkow et al (1981) estudiaron los isoenzimas de la G6PD en cuatro enfermos de LMA. En los mieloblastos de los cuatro enfermos existía un único tipo de isoenzima, sin embargo, dos de ellos tenían los dos tipos de isoenzima en sus hematíes, indicando que debían persistir algunas células precursoras normales.

En la LMA igual que en la LAL, el tipo celular dominante puede reflejar el nivel en el que se produjo el stop madurativo, pero no necesariamente un stop en el mismo nivel en el que ocurrió la transformación maligna. Este concepto viene avalado por la observación de que los blastos de la LMA pueden ser inducidos a diferenciarse después de su incubación "in vitro" con ésteres del forbol (Rovera et al 1979, Koeffler et al 1980) y ácido retí

noico (Breitman et al 1981).

En la leucemia mieloida crónica la célula diana es una célula stem pluripotencial. Los estudios sobre el cromosoma Filadelfia (Ph^1) y los isoenzimas de la G6PD han demostrado claramente que los granulocitos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos y posiblemente los linfocitos son parte del clon maligno (Fialkow et al 1977, Fialkow et al 1978, Janossy et al 1976). En la mayor parte de los casos de LMC la fase crónica termina en una fase aguda en la que predomina una población celular inmadura. Por razones desconocidas la célula maligna pluripotencial pierde su capacidad de diferenciarse durante la crisis blástica.

5.- INDUCCION DE LA MADURACION DE CELULAS LEUCEMICAS

"IN VIVO"

Las experiencias reseñadas anteriormente sugieren la posibilidad de "reprogramar" las células leucémicas hacia su diferenciación normal bajo la influencia de ciertas sustancias. El potencial que esto ofrece podría ser utilizado en un tratamiento continuado capaz de mantener la diferenciación normal en células leucémicas. Se han realizado ensayos terapéuticos pilotos consis

tentes en la administración prolongada de citostáticos (arabinósido de citosina) a muy bajas dosis, consiguiéndose la remisión de los enfermos tratados (Baccarini y Tura 1979, Housset et al 1982). La dosis administrada era inferior a la necesaria para conseguir un efecto antimitótico, pero caía en el rango en el que se produce interferencia con el proceso de diferenciación celular. De la misma forma la administración diaria de ácido 13-cis retinoico - consiguió la desaparición de los infiltrados cutáneos de enfermos con linfoma cutáneo T (Kessler et al 1983).

II.- OBJETO

El objeto de este trabajo es la caracterización de un anticuerpo monoclonal, GR2110, obtenido mediante inmunización con una leucemia linfoblástica humana.

Esta tesis es el inicio de una línea de investigación centrada en la identificación y estudio de antígenos de diferenciación de células hemopoyéticas humanas normales y malignas mediante el empleo de la tecnología de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

III.- MATERIAL Y METODOS

1.- OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

1.1.- INMUNIZACION

1.1.1.- CELULAS INMUNIZANTES.

Las células inmunizantes procedían de un enfermo diagnosticado de leucemia aguda linfoblástica común, de fenotipo TdT⁺, CALLA⁺, Ia⁺, IgS⁻, E⁻. La leucemia fue designada con las siglas BSF. Se emplearon las células mononucleares que se aislaron de los hematíes por centrifugación en Ficoll-Hipaque.

1.1.2.- RATONES INMUNIZADOS.

Los ratones utilizados fueron de la cepa endogámica BALB/C, de genotipo H2d.

1.1.3.- PROTOCOLO DE INMUNIZACION.

Tres dosis de 2×10^6 células de la leucemia BSF en 500 microlitros de PBS, se administraron intraperitonealmente, con intervalos de dos semanas, a un ratón de la cepa BALB/C.

A los veintiun días de la primera dosis, se comprobó por inmunofluorescencia, la presencia de anticuerpos dirigidos frente a las células inmunizantes, en el suero del ratón.

Las técnicas de separación en Ficoll-Hipaque, congelación de células y la de inmunofluorescencia indirecta se detallarán en el apartado de la caracterización de los anticuerpos monoclo-

nales. En este lugar también se hará referencia al protocolo para estudio fenotípico de las leucemias.

1.2.- HIBRIDACION

Células parentales: esplenocitos inmunizados y la línea -
NSI.

1.2.1.- PREPARACION DE LA SUSPENSION DE ESPLENOCITOS DEL RA
TON INMUNIZADO.

1.2.1.1.- MATERIALES.

- Placas de Petri (100 x 20 mm)
- Pipetas de plástico estériles (10ml)
- Tubos de plástico estériles (50ml)
- Material de disección: tijeras, pinzas y bisturí.
- Solución bactericida de ARMIL al 1/1000
- Medio de cultivo RPMI 1.640 con 15mM de HEPES
- Cámara de cristal con algodón empapado en éter
- Cámara de flujo laminar (Flow lab. class 100).
- Centrífuga (Johan, CR 1.000)

1.2.1.2.- PROCEDIMIENTO.

- a).- Se realiza la técnica en condiciones de asepsia.
- b).- El ratón a los cuatro días de la última dosis de -
inmunización se sacrificó en la cámara de cristal, con éter.

c).- Se inmoviliza en una tabla de disección y el abdomen se limpia con solución bactericida. Se corta la piel y los músculos abdominales, a nivel de la línea media y se practica una tracción suave, hacia ambos lados para dejar expuesta la membrana peritoneal. Esta zona se humedece con una torunda empapada en alcohol. Posteriormente se escinde el peritoneo parietal y con las pinzas se extirpa el bazo.

d).- El bazo se coloca en una placa de Petri de (100 x 20 mm) que contiene 10ml de RPMI con 15 mM de HEPES (RPMI-HEPES). A partir de este momento todas las manipulaciones se realizan en una cabina de flujo laminar.

e).- El bazo se corta por la mitad con el bisturí y mediante una jeringa de 12 ml, con la aguja clavada en uno de los polos de un fragmento se va inyectando, lentamente, medio de cultivo, al mismo tiempo que se aprieta con las pinzas en sentido transversal. La misma operación se realiza con el segundo fragmento. De esta manera se liberan los esplenocitos de la cápsula fibrosa del bazo.

f).- Las células en el medio de cultivo se pasan con una pipeta a tubos de 50ml.

g).- La suspensión celular se agita suavemente para disolver los grumos y se deja en hielo.

h).- Pasados diez minutos, el contenido de los tubos se - cambia de recipiente para descartar los grumos que han sedimentado y que no se pueden disgregar.

i).- Las células se lavan con 50ml de RPMI-HEPES frío, - centrifugándose a 4°C durante diez minutos a 300 g.

j).- Después del segundo lavado, las células se resuspenden en 2ml de RPMI-HEPES frío, teniendo cuidado de agitar bien - para hacer desaparecer los grumos. La viabilidad celular se comprueba en contraste de fases. El contaje se realiza en cámara de ^uNewbauer.

1.2.2.- LA LINEA MIELOMATOSA NSI/Ag4.

Se trata de una línea, procedente de un mieloma inducido en la cepa BALB/C que ha perdido la capacidad de secretar inmunglobulinas por lo que no interferirá en la producción de antiu cuerpos por los hibridomas que se obtengan. Mientras los linfoci tos B, sensibilizados frente a las células inmunizantes, aportan al híbrido los genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas, la línea mielomatosa dota al híbrido de la capacidad de crecimiento ilimitado propia de las células tumorales y por tanto de la posibilidad de desarrollarse tanto in vitro como in vivo.

Esta línea mielomatosa se ha hecho resistente a la 8-aza-guanina porque carece de la enzima HGPRT (hipoxantín-guanidín-fosforibosil transferasa). La síntesis de su DNA la tiene que - realizar a través de la vía "de novo" que obtiene nucleótidos a partir de aminoácidos y azúcares. La aminopterina bloquea la síntesis de novo de nucleótidos por lo que las células de la línea NSI serán sensibles a este fármaco. Esta característica permitirá seleccionar los híbridos de las células NSI que no se han podido fusionar en un medio que contenga aminopterina. Las células NSI no fusionadas morirán mientras que los híbridos podrán seguir creciendo porque poseen la enzima HGPRT, aportada por los esplenocitos, que interviene en la otra vía de síntesis de nucleótidos.

La línea NSI se conserva congelada, sacándose a cultivar dos semanas antes de proceder a la fusión, utilizando medio de cultivo RPMI con 10% de suero fetal de ternera más 8-azaguanina.

1.2.3.- TECNICA DE HIBRIDACION

Fusión celular entre los esplenocitos del ratón inmunizado y la línea mielomatosa NSI.(Reuben et al 1983)

1.2.3.1.- MATERIALES Y REACTIVOS.

- RPMI I, 640 (GIBCO, catálogo MO 074-1800) con la adición de 2.5 grs de glucosa por litro.
- L-glutamina (200mM, GIBCO). Nº 503L
- Mezcla de antibióticos: Ampicilina 500mgr/l y Gentamicina 40mgr/l.
- MEM Eagle Solución de aminoácidos no esenciales (10mM de cada aminoácido, M.A. Bioproducts). Nº 13-114A.
- Piruvato sódico (100 mM, M.A. Bioproducts) (13-115A).
- 2-Mercaptoetanol (Sigma nº 1511). Se prepara una solución 0,1 M, añadiendo 0,1 ml a 14,1 ml de RPMI.
- Insulina: (100 u, Normal Iletin, Lilly)
- 8-Azaguanina (Sigma A-8526). Se prepara una solución 1.000 x disolviendo 30mg en 2ml de dimetil sulfóxido (Merck Av - Nº 2931).
- Aminopterina (Sigma A-1784). Se prepara una solución 100 x (4×10^{-5} M) disolviendo 1,76 mgrs en una solución 0,1 N de NaOH. El ph se ajusta a 7,2 con ClH y se lleva a un volumen de 100 ml con agua destilada. Se dispensa en tubos de 10 ml y se guarda en el congelador de -20°C.
- Hipoxantina (H9377) y Timidina (T9250)(Sigma). Se pre

para una disolución 100 x (Hipoxantina $1 \times 10^{-2}M$, Timidina $1,6 \times 10^{-3}M$) disolviendo 136 mgr de hipoxantina y 38,7 mgr de timidina en una solución 0,1N de NaOH. El pH se ajusta a 9 con ClH y el volumen final se lleva a 100ml con agua destilada. Se dispensa en tubos de 10ml y se guarda en el congelador de -20° .

- HEPES (Flow Lab. 16884-49). Se prepara una solución 1,0 M a pH 7,2 y se guarda a -20° .

- Suero fetal de ternera (Flow nº 29-101-49). Los lotes de suero fetal se prueban antes de su utilización, para comprobar su capacidad de mantener clones de la línea NSI sin el apoyo de las células cebadoras. Se puede considerar como bueno aquel lote que mantenga una eficiencia de clonación del diez al veinticinco por ciento.

- Polietilen Glicol (PEG, Merck 807491). El PEG se prepara en el autoclave en frascos estériles durante 15 minutos y se mantienen en un baño a $56^{\circ}C$. Se prepara una disolución al 50% (v/v) en RPMI-HEPES precalentado y se mantiene esta disolución a 37° .

- Tubos de plástico de 15 ml.

- Placas de cultivo de: 24 pocillos, Costar Nº 3,524

6 pocillos, Costar Nº 3,506

- Frascos de cultivo de 75 ml, Corning N° 25,116.

- Estufa de cultivo.

1.2.3.2.- MEDIOS DE CULTIVO

- Medio completo de hibridomas (MCH): al medio RPMI - 1640 se le añaden (concentraciones finales) 2,5 gr/l de glucosa, suero fetal de ternera al 20%, piruvato 1,0mM, 2 mM de L-glutamina, 0,1 mM de una mezcla de aminoácidos no esenciales, 4×10^{-5} de 2-mercaptoetanol, 0,2 unidades de insulina bovina por ml, 500 mgr de ampicilina y 40 mgr de gentamicina.

Este medio se filtra, mediante filtros de 0,45mm, de tamaño de poro.

- Medio completo de hibridomas más HAT (Hipoxantina-aminoptericina-timidina). Al medio completo de hibridomas se le añade:

Hipoxantina (1×10^{-4} M)

Aminoptericina (4×10^{-7} M)

Timidina ($1,6 \times 10^{-5}$ M)

- MCH 2x-HAT: es el medio completo de hibridomas con doble concentración de hipoxantina, aminoptericina y timidina.

- RPMI con HEPES (RPMI-HEPES): al RPMI sin L-glutamina

ni piruvato sódico, se le añade HEPES hasta una concentración final de 15 mM y antibióticos en la misma cantidad antes mencionada.

1.2.3.3.- Procedimiento

a).- Las células del plasmocitoma NSI/Ag4 se mantienen en MCH con suero fetal de ternera al 10% más 8-azaguanina. Las células se subcultivan a una concentración de 4×10^5 /ml, en medio fresco cuatro días antes de la fusión y de nuevo, dos días antes.

b).- Las células del plasmocitoma NSI/Ag4 se lavan dos veces y se resuspenden en RPMI-HEPES, el día de la fusión, ajustándose a una concentración de 5×10^6 /ml. Se preparan 5 tubos con 5ml cada uno, de esta suspensión celular.

c).- Las células del bazo del ratón inmunizado se ajustan a la misma concentración de 5×10^6 /ml y se reparten de la misma forma. Cada tubo de esplenocitos se mezcla con el correspondiente del plasmocitoma NSI/Ag4 a temperatura ambiente.

d).- Los cinco tubos resultantes de la mezcla se centrifugan durante ocho minutos a 300 g y se decanta todo el sobrenadante.

e).- Con suavidad se agita para deshacer el sedimento celular y se añaden 0,2 ml, a cada tubo de la solución al 50% de PEG, gota a gota mientras se continua moviendo los tubos.

f).- Inmediatamente, se centrifugan durante seis minutos a 200g.

g).- Se añaden 5 ml de RPMI-HEPES, gota a gota y se dejan en reposo durante dos minutos.

h).- Se añaden otros 5ml de RPMI-HEPES de la misma forma y se mezcla suavemente el contenido de los tubos.

i).- Se vuelven a centrifugar durante 5 minutos a 300g, - decantandose todo el sobrenadante.

j).- Se añaden a cada tubo 5ml de MCH y se dejan en reposo durante 20-30 minutos.

k).- Se mezclan bien las células y se añade MCH hasta alcanzar una concentración de esplenocitos de $0,5 \times 10^6$ /ml. Como células cebadoras se utilizan timocitos procedentes de otro ratón de la misma cepa, añadiéndose la cantidad necesaria para alcanzar una concentración de 1×10^6 timocitos/ml. La técnica de obtención de timocitos se detallará en el apartado dedicado a la clonación.

l).- La suspensión celular se mezcla repetidas veces para homogeneizarla y se reparte a razón de 1ml por pocillo en placas de 24.

m).- Las placas se colocan en la estufa de cultivo a 37°C humidificada y con un 5% de CO₂.

1.3.- SELECCION DE LOS HIBRIDOS

- 24 horas después de la fusión, se añade 1ml de MCH 2x HAT a cada uno de los pocillos de las placas.

- En los días cinco, ocho, diez y doce, después de la fusión, se cambia el medio de cultivo, aspirando un ml con una pipeta Pasteur estéril de cada uno de los pocillos, para añadir posteriormente otro ml de MCH-HAT. Este medio hace inviables a las células NSI que no se han fusionado, porque contiene aminopterina. Sobreviven, en cambio, los híbridos porque los esplenocitos les aportan la enzima HGPRT necesaria para la síntesis de DNA cuando la aminopterina bloquea la vía de novo.

- Durante la tercera semana, los cultivos se cambian de -

medio dos veces, utilizando en este caso medio HT (hipoxantina - timidina) sin aminopterina.

- Durante la cuarta semana, el medio se cambia cada tres días, empleando MCH.

1.4.- ESTUDIO DE LOS SOBRENADANTES DE LOS HIBRIDOS.

Entre el día 14 y el 16 después de la fusión se empiezan a observar híbridos en crecimiento. Para determinar si producen anticuerpos frente a las células inmunizantes, se testan sus sobrenadantes mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

50 microlitros de cada uno de los sobrenadantes a estudiar, se incuban durante veinte minutos a 4°C con 300-500.000 células de la leucemia inmunizante. Después de dos lavados con PBS (solución salina tamponada con fosfato), se añaden 20 microlitros de antiinmunoglobulina de ratón marcada con fluoresceína, incubándose durante otros 20 minutos a 4°C. Posteriormente se realizan otros dos lavados con PBS. Las células se observan en el microscopio de fluorescencia.

Los hibridomas productores de anticuerpos se expanden en una placa de seis pocillos y si siguen siendo positivos se clo-

nan cuando se estabilizan en cultivo.

1.5.- CLONACION

De forma habitual, los hibridomas productores de anticuerpos frente a las células inmunizantes se encuentran mezclados en cultivo con otros hibridomas que o bien no son productores o sintetizan anticuerpos que no interesan.

La clonación tiene como objetivo aislar el hibridoma productor del anticuerpo deseado y que todas las células que lo constituyan procedan de la misma célula progenitora.

A continuación se describe el método para obtener las células cebadoras que serán fundamentales para el desarrollo de los clones, y la técnica de clonación por dilución límite.

1.5.1.- OBTENCION DE LAS CELULAS CEBADORAS.

1.5.1.1.- TIMOCITOS

A.- MATERIALES:

- Colador y asa estériles
- Placa de Petri (100 x 20 mm)
- Pipetas de plástico (10 ml)
- Tubos de plástico de 50 ml

- Instrumental de disección estéril
- Placas de cultivo de 96 pocillos (Costar Nº 3,596)
- Cámara de cristal con algodón empapado en éter
- Medio completo de hibridoma MCH

B.- PROCEDIMIENTO:

- a).- Se realiza en condiciones de asepsia.
- b).- Un ratón de la cepa BALB/C se sacrifica con éter, se le practica una incisión amplia ventro-medial, desde el cuello hasta el hipogastrio.
- c).- Se abre el peritoneo y después de seccionar el diafragma, se corta la parrilla costal por sus caras laterales, para poderla evertir.
- d).- El timo se extirpa del mediastino y se coloca en un colador estéril, dentro de una cabina de flujo laminar y sobre una placa de Petri con 10 ml de MCH. Con unas pinzas curvas se presiona el timo contra el colador para obtener sus células.
- e).- El colador se lava con 10 ml de MCH. El medio con las células se pesa a un tubo de plástico de 50 ml.
- f).- El tubo se centrifuga a temperatura ambiente durante 10 minutos a 200 g.

g).- Se decanta el sobrenadante y las células se resuspenden en 20 ml de MCH.

h).- Se realiza el conteo en cámara de Neubauer. La viabilidad celular se aprecia por contraste de fase.

1.5.1.2.- MACROFAGOS PERITONEALES.

Los macrófagos se obtienen por lavados peritoneales en un ratón de la cepa BALB/C, inyectando 10 ml de PBS en la cavidad peritoneal, dejándolos dentro durante uno o dos minutos mientras se presiona con suavidad el abdomen y finalmente se aspiran. Después se centrifuga la suspensión celular durante cinco minutos a 300 g y se realiza el conteo.

1.5.2.- PROCEDIMIENTO DE CLONACION POR DILUCION LIMITE.

a).- Al pocillo de la placa de 24 donde se encuentra el híbrido productor se le cambia el medio un día antes de iniciar la clonación.

b).- El día de la clonación se aspira casi todo el sobrenadante del pocillo y con medio fresco se despegan las células del fondo y se pasan a un tubo de 50 ml.

c).- Se lavan dos veces con MCH a temperatura ambiente.

d).- Después del conteo, se ajustan a 1×10^5 /ml, teniendo solo en cuenta las células vivas.

e).- Se realizan dos diluciones seriadas 1:10 para conseguir una concentración final de 10^3 células/ml.

f).- En un tubo de 50 ml se colocan 0,45 ml de la suspensión celular del hibridoma ajustada a 10^3 células/ml, 68×10^6 timocitos, 675,000 macrófagos peritoneales y medio de cultivo hasta alcanzar un volumen de 45 ml.

g).- Se añaden 0,2 ml de la suspensión celular en cada uno de los pocillos de dos placas de 96. Las concentraciones finales por pocillo fueron 2 células de hibridoma, 3×10^5 timocitos y 3×10^3 macrófagos. Las placas se mantienen en la estufa de cultivo, humidificada, a 37°C y en atmósfera de aire con 5% de CO_2 .

h).- A los catorce días, las placas se examinan con el microscopio de objetivo invertido, señalándose aquellos pocillos donde se observa solo un clon. Se les cambia el medio una vez por semana, y cuando han crecido lo suficiente, se pasan a pocillos de la placa de 24 y una vez estabilizados se testan por in-

munofluorescencia indirecta con las células inmunizantes.

Los clones positivos se expanden en frascos de cultivo para congelar la mayor parte de las células y el resto se inyectan en un ratón para obtener ascitis.

1.6.- CONGELACION DE HIBRIDOMAS

La congelación de los hibridomas es fundamental para su conservación. Se debe realizar tanto con los hibridomas sin clonar como con los que ya lo están. Permite disponer siempre de una reserva que puede utilizarse en cualquier momento si el proceso diseñado para un hibridoma fracasa en alguno de sus puntos clave.

A.- MATERIALES:

- Tubos de plástico estériles de 2 ml con tapón de rosca (NUNC).
- Suero fetal de ternera, con un 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO).
- Congelador de -80°
- Contenedores de nitrógeno líquido.

B.- PROCEDIMIENTO:

a).- Un día antes de la congelación, se cambia el medio de cultivo.

b).- El hibridoma se centrifuga 5'a 300 g. a temperatura ambiente, se resuspende y se ajusta a una concentración de 5×10^6 células/ml con suero fetal más un 10% de DMSO a 4°C.

c).- RÁpidamente se dispensa en tubos de 2 ml. con tapón de rosca a razón de 1 ml. en cada tubo.

d).- Los tubos se cierran y se colocan durante 24 horas en el congelador de -80°C.

e).- Del congelador de -80°C se pasan al contenedor de nitrógeno líquido.

Descongelación: El tubo que contiene las células congeladas se coloca en el baño a 37°C hasta que se descongele. Después se pasa a un tubo con MCH a 37°C y se lava dos veces, centrifugando cinco minutos a 300 g.

1.7.- OBTENCION DE ASCITIS

Los hibridomas productores, una vez clonados, pueden ser inyectados en la cavidad peritoneal de ratones BALB/C, donde crecen con facilidad, produciendo ascitis con un alto título de anti

cuerpo monoclonal.

PROCEDIMIENTO:

a).- Para que el hibridoma crezca en su forma ascítica, - los ratones se inyectan con 0,5 ml de Pristene a nivel de la cavidad abdominal.

b).- A las dos semanas, se les inyectan 5×10^6 células - del hibridoma en 0,5 ml de medio de cultivo.

c).- Una vez desarrollada la ascitis, se inician las punciones de drenaje que se continúan cada 48 horas. Por cada punción no se debe aspirar más de dos ml.

d).- El líquido ascítico se centrifuga cinco minutos a - 300 g, para separar las células de la ascitis. Las células se congelan y la ascitis, después de ser titulada, se dispensa en tubos Beckman a razón de 20 l por tubo y se congela a -80°C .

1.8.- PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

La purificación de los anticuerpos monoclonales se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad con gel de Seferosa-- Proteína A. (según técnica descrita por el laboratorio).

A.- MATERIALES Y REACTIVOS.

- Gel de sefarosa-proteína A (Pharmacia Fine Chemicals)
- Tampón A: PBS a pH 8
- Tampón B: Acetato sódico 0,1 M pH 3,5
- Tampón C: Tris-ClH 1M pH 9.
- Columna de 10 cm (LKB).
- Filtros AMICON
- Colector de fracciones (LKB)
- Bomba peristáltica. Espectrofotómetro.

B.- PROCEDIMIENTO

a).- 6 gr de sefarosa-proteína A se lavan con agua durante treinta minutos y posteriormente se colocan en una columna de 10 cm. El gel de sefarosa-proteína A alcanza dentro de la columna una altura de 5,25 cm.

b).- Se lava la columna con el tampón A, hasta conseguir el pH óptimo de 8. Para realizar el lavado la columna se conecta con la bomba peristáltica.

c).- El líquido ascítico que contiene el anticuerpo monoclonal, diluido en el tampón A en la proporción 1/10, se coloca en la columna y esta se conecta al colector de fracciones que se

gradua de forma que recoja 15 gotas por tubo.

d).- Se mide en el espectrofotómetro la DO del contenido de cada uno de los tubos, a 280 nm. En primer lugar aparece el pico de elución de la albúmina.

e).- Cuando se alcanzan los niveles basales de absorción óptica, se lava la columna con el tampón B de pH 3,5.

f).- Entre los tubos 26 y 50 aparece el segundo pico de absorción que corresponde a la inmunoglobulina IgG del anticuerpo monoclonal. A cada uno de estos tubos se le añaden previamente 200 microlitros de Tampón C, para evitar la desnaturalización proteica.

g).- Los tubos que contienen el anticuerpo monoclonal se mezclan y se dializan con el tampón de acoplamiento, para la inmunoprecipitación (ver el apartado correspondiente).

h).- Cuando la purificación no va seguida de acoplamiento a gel, los tubos con el anticuerpo monoclonal se dializan frente a PBS 7,4.

i).- Después de la dialis los anticuerpos monoclonales se concentran 20 veces en filtros AMICON.

j).- Se dispensan en alícuotas de 10 microlitros y se congelan a -80°C.

2.- CARACTERIZACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL

2.1.- TITULACION

Se preparan varias diluciones, dobles y progresivas con - la ascitis que contiene el anticuerpo monoclonal y se ensaya mediante inmunofluorescencia indirecta.

2.2.- DETERMINACION DEL ISOTIPO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES. (Crowle 1977).

2.2.1.- INMUNODIFUSION SIMPLE EN AGAR.

A.- MATERIALES:

- Agar (Behring Institut)

- Tampón de inmunodifusión:

Agua destilada templada 200 ml para disolver:

12,8 gr de Na_2HPO_4 (Merck)

2,62 gr de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck)

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 del ratón:

anti M, anti α , anti γ 1, γ 2a, γ 2b, γ 3

anti K y anti λ (Nordik)

Placas de plástico

Cánula metálica

Matraces de vidrio (Simax) de 1 litro

Capilares

Pipetas de 5 y 10 ml.

B.- PROCEDIMIENTO:

a).- Preparación del gel de agarosa al 1%

Se pesan 1,3 gr de agarosa que se funden en 100 ml del tam-
pón de inmunodifusión a 90°C, hasta que se disuelven perfectamene-
te. Se deja enfriar hasta los 50°C y entonces se colocan varios -
mililitros, con una pipeta, sobre la placa de plástico, de forma
lenta para dejar una fina capa 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 -
trompa de agua.

b).- En el pocillo central se coloca una slicaota del so-
brenadante de cultivo con el anticuerpo monoclonal a estudiar y -
en los seis pocillos periféricos se distribuyen los antisueros -
que reconocen las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de ra-
tón. En otra placa el anticuerpo monoclonal se enfrenta a los an-
tisueros que reconocen las cadenas ligeras.

Se deja incubar 24 horas en cámara húmeda.

c).- Lavados.

Las placas se lavan en solución salina durante 24 horas -
en una caja de Petri y posteriormente 2 horas en agua destilada.
Se secan colocando sobre ellas papeles de filtro a temperatura -
ambiente.

Los papeles se quitan humedeciéndolos con agua.

d).- Tinción.

Materiales:

Negro de amido:

Negro amido (Merck Art. N°1167).....	0,5 gr
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	95 ml

Se tiñen las placas 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, treinta minutos. Se secan en la estufa durante 24 horas.

3.- CARACTERIZACION DE LA MOLECULA RECONOCIDA POR EL ANTI-CUERPO MONOCLONAL ER2110

3.1.- DISTRIBUCION CELULAR

3.1.1.- PANEL DE CELULAS NORMALES.

3.1.1.1.- Separación de células mononucleares de sangre - periférica (Boyum 1968).

A.- MATERIALES

- Tubos de 15 ml cónicos de plástico
- Pipetas de 10 ml
- Jeringas
- Portas y cubreobjetos
- Reactivos:

Histopaque 1,077 (sigma): contiene Ficoll (Tipo F 400) 57 gr/dl y diatrizoato sódico 9 gr/dl en solución aséptica.

Solución salina tamponada con fosfato (PBS)

Solución de cloruro amónico al 0,87%

B.- PROCEDIMIENTO.

a).- A cada 10 ml de sangre desfibrinada, se añaden 14 ml de PBS mezclando bien.

b).- Se añaden 3 ml de Histopaque 1.077 a tres tubos de 15 ml.

c).- Sobre el histopaque 1,077, se colocan 8 ml de la mezcla de la sangre con el PBS. Se centrifugan los tubos a 400g durante 30 minutos, a temperatura ambiente.

d).- Después de centrifugar, se aspira el sobrenadante - hasta llegar a medio centímetro de la interfase opaca que contiene las células mononucleares. Se recoge esta fase con una pipeta Pasteur.

e).- La interfase se reparte en tres tubos y a cada tubo se le añaden 10 ml de PBS. Se centrifugan a 250g durante 10 minutos.

f).- Se realizan dos lavados más con PBS.

g).- La viabilidad de las células se comprueba por contraste de fase con 10 ml de la solución al 0,87% de cloruro amónico durante 5 minutos a temperatura ambiente.

h).- Las células se ajustan a 5×10^6 /ml en PBS.

3.1.1.2.- Separación de células mononucleares de médula ósea.

La médula ósea obtenida por punción y aspirado en mango esternal o cresta iliaca se recoge sobre tubos conteniendo EDTA. Se realiza una dilución 1:5 de la muestra en PBS procediéndose a continuación como en el apartado anterior.

3.1.1.3.- Separación de linfocitos T y B (Eisen et al - 1972).

A.- MATERIALES.

- Fibra de nylon
- Jeringa de 5 cc
- Tubos cónicos de 15 ml
- Parafilm
- Baño de agua a 37°C
- Estufa
- Colador

B.- REACTIVOS

- Medio RPMI I, 640
- Solución de ClH 0,1 N

- Suero fetal de ternera (GIBCO)

- HEPES/(Flow)

C.- PROCEDIMIENTO.

a).- Preparación de la fibra de Nylon:

- Se pesan 200 mgr de fibra de nylon por cada muestra

- Se abre la fibra, evitando los grumos y se coloca en una jeringa de 5 cc.

- Se lava con 50 cc de agua destilada y 50 cc de ClH 0,1 N. Pasando por la jeringa 10 cc de ClH, seguidos de otros 10 de agua y repitiendo el lavado de forma alternativa, hasta completar los 50 cc de cada uno de los elementos.

- Después se pasan 50 cc de medio RPMI sin suero fetal y - otros 50 de medio caliente (atemperado al baño maria) con el 10% de suero fetal de ternera.

- La jeringa se tapa por ambos extremos con parafilm, dejándola llena de medio enriquecido con suero fetal, evitando las burbujas de aire, para tenerla bien impregnada.

- Se incuba a 37°C durante media hora.

b).- Preparación del medio de cultivo

- Por cada muestra se preparan 200 cc de medio.

- Se pesan 2,08 gr de RPMI para 200 cc de agua destilada.

Después de diluir bien, se determina el pH que se ajusta entre 7,2 y 7,4. Se estabiliza con HEPES al 1%.

- Se separan 50 cc de medio para lavar la jeringa. Los 150 cc restantes se enriquecen con fetal inactivado al 10%. 50 cc de este medio se atemperan al baño maría y se utilizan como se ha mencionado anteriormente, para lavar por última vez la jeringa antes de ponerla a incubar.

c).- Obtención de los linfocitos T.

- Después de la separación por Ficoll y de los lavados correspondientes, el botón celular de cada muestra se resuspende en 2 cc de medio.

- La jeringa ya incubada, se escurre con su émbolo hasta alcanzar los 2-5 cc de su graduación.

- Se colocan los 2 cc de la suspensión celular.

- Se incuba durante otra media hora a 37°C en estufa.

- Para separar los linfocitos T se pasan 10 cc de medio frío por la jeringa, muy lentamente, recogándose en un tubo cónico graduado. Después de centrifugar se ajustan a 5×10^6 células/ml.

- Posteriormente se lava la jeringa con 50 cc de medio atemperado.

d).- Obtención de los linfocitos B

- Se saca la lana de la jeringa, después del último lavado.
- Se coloca en un colador, situado sobre una taza. La lana se va abriendo, con cuidado, por medio de dos agujas, extendiéndola lo máximo posible para evitar la formación de grumo, mientras se lava con medio de cultivo para evitar que se seque.
- El medio de cultivo recogido en la taza se centrifuga a 250 g durante 10 minutos. Después de resuspender el botón celular, los linfocitos B se ajustan a 5×10^6 células/ml.
- La viabilidad de los linfocitos se comprueba en microscopio de contraste de fase.

3.1.1.4.- Separación de granulocitos (English y Andersen 1974)

A.- MATERIALES: Se utilizaron los mismos que para la separación de linfocitos.

B.- REACTIVOS:

- Histopaque-1,119 (Sigma): contiene Ficoll (tipo 400) -
6 gr/dl y ditrizoato de sodio 16,7 gr/dl en solución -
estéril.
- Histopaque-1,077
- PBS

B.- PROCEDIMIENTO:

- a).- De cada donante se extraen 6 ml de sangre heparinizada
- b).- Por cada muestra, se utilizan dos tubos cónicos, en los que se colocan 3 ml de Histopaque-1,119
- c).- Sobre el Histopaque-1,119 se colocaron otros 3ml de Histopaque 1,077.
- d).- Los 6 ml de sangre total de cada muestra se mezclan con otros 6 de PBS.
- e).- A cada uno de los tubos con los gradientes de Ficoll se le añaden 6 ml de la mezcla de sangre total y PBS.
- f).- Los tubos se centrifugan a 700g durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- g).- Después de la centrifugación, se observan en los tubos dos halos opacos. El superior corresponde a las células mononucleares y el inferior a los granulocitos.
- h).- Cada halo se recoge por separado. Los granulocitos se lavan con PBS, centrifugándose a 250g durante 10 minutos.
- i).- Finalmente se ajustan a 5×10^6 células/ml.

3.1.1.5.- Separación de Monocitos.

A.- MATERIALES:

- Frascos de cultivo de 75 ml (Corning N°25116)

- Estufa de cultivo

- Espátula de plástico

B.- REACTIVOS:

- Medio de cultivo RPMI 1,640

- Suero fetal de ternera

- Solución 10^{-4} M de etilendiaminotetraacetato (EDTA)

C.- PROCEDIMIENTO:

a).- Se parte de las células mononucleares separadas por F1 coll. Después de los lavados con PBS, las células se resuspenden en 10 ml de medio de cultivo con 20% de suero fetal de ternera.

b).- La suspensión celular se coloca en un frasco de cultivo de 75 ml, que se dejó incubando durante 1 hora a 37°C en la estufa de cultivo.

c).- Las células no adherentes se eliminan, vaciando el contenido del frasco.

d).- Los monocitos se despegan al añadir la solución de EDTA. En ocasiones es necesario utilizar una espátula especial y frotar con ella el fondo del frasco para poder despegar los monocitos.

e).- Los monocitos se lavan dos veces con PBS y se ajustan a 5×10^6 células/ml.

3.1.1.6.- Separación de plaquetas.

Se recogen 4,5 ml de sangre venosa sobre un tubo de plástico conteniendo 0,5 ml de citrato sódico al 3,8%. Se agita suavemente por inversión del tubo y se centrifuga durante 8 minutos a 130g. a temperatura ambiente. El plasma rico en plaquetas así obtenido se transfiere con pipeta de plástico a otro tubo de plástico y se centrifuga durante 15 minutos a 25000g a 4°C. El plasma se decanta y el botón plaquetas se resuspende con suero fisiológico. Se repiten el lavado y la centrifugación, resuspendiéndose tras el último lavado en suero fisiológico (Owen 1975).

3.1.1.7.- Separación de células de amígdala.

Las amígdalas procedentes de individuos amigdalectomizados son cortadas, desbridándose el tejido con ayuda de dos agujas, sobre una placa de Petri conteniendo medio RPMI 1640. La suspensión celular es filtrada a través de un colador metálico, lavándose a continuación dos veces con el mismo medio.

3.1.1.8.- Separación de células de bazo.

El bazo procedente de un individuo esplenectomizado es tratado como se describe en el apartado anterior, para la obtención de la suspensión celular.

3.1.2.- ESTIMULACION BLASTOGENICA CON LECTINAS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (Oppenheim et al 1975).

A.- MATERIALES:

- PHA: Fitohemaglutinina (Burroughs Welcome Co.)
- Con A: Concanavalina A (Calbiochem)
- PW: Pokeweed (Gibco)
- L-Glutamina a una concentración de 0,59 gr/ml
- Medio de cultivo RPMI
- Ampicilina 500 mgr/l
- Gentamicina 40 mgr/l
- Frascos de cultivo de 75 ml (Falcon)

B.- PROCEDIMIENTO:

a).- Los linfocitos después de separarse por gradiente de Ficoll, se distribuyen en tres alícuotas de 0,5 ml de medio de cultivo enriquecido con el 10% de suero fetal de ternera. Cada una de las alícuotas contiene 3×10^6 células.

b).- Las células se añaden a tres frascos de cultivo que contienen 11,5 ml de medio cada uno.

c).- Al primer frasco se le añaden $100 \mu\text{l}$ de PHA disuelta al 1/4 en PBS.

- Al segundo $100 \mu\text{l}$ de Con A al 1/32
- Al tercero $100 \mu\text{l}$ de PWM al 1/32

d).- Se dejan incubar:

- 48 horas para la PHA
- 72 horas para la Con A
- 96 para el PWM

e).- Pasado el tiempo de incubación, para cada una de las lectinas, se valora el tanto por ciento de blastos por contraste de fase.

3.1.3.- PANEL DE CELULAS LEUCEMICAS

Las células leucémicas utilizadas procedían de sangre periférica y/o médula ósea de enfermos diagnosticados en el Servicio de Hematología de la C.S. Virgen de las Nieves. El diagnóstico se realizó atendiendo a criterios clínicos, morfológicos y citoquímicos completándose con la elaboración de un protocolo para la caracterización inmunológica de células leucémicas. Todas las muestras fueron extraídas previamente al tratamiento del enfermo.

Se estudiaron las células leucémicas de un total de 77 enfermos. De las leucemias estudiadas 29 correspondían a síndromes linfoproliferativos crónicos y 48 a leucemias agudas. Estas últimas se distribuían de la siguiente forma: LAL 30 casos, LAM 12 casos, LAI 3 casos, brote linfoblástico de LMC 2 casos y brote no linfoblástico de LMC 1 caso.

3.1.4.- Protocolo de estudio para las células leucémicas.

Las leucemias utilizadas para el estudio de distribución antigénica se caracterizaron según el siguiente protocolo:

3.1.4.1.- Marcadores Inmunológicos de Linfocitos T.

a).- Formación de rosetas con hematíes de carnero

b).- Antígenos de membrana detectados por anticuerpos monoclonales:

- T3: reconocido por el Ac Mo OKT3 (ORTHO) y que está presente en la mayoría de los linfocitos T maduros (Kung et al 1979, Borst et al 1982)

- T4: reconocido por el Ac Mo OKT4 (ORTHO) y que se expresa en los linfocitos T "helper"/inductores (Thomas et al 1980, Reinherz et al 1979, Terhorst et al 1980)

- T8: reconocido, por el Ac Mo OKT8 (ORTHO) y que se encuentra en la subpoblación de linfocitos T supresores/citotóxicos (Kung y Goldstein 1980).

- T11: reconocido por el Ac Mo OKT11 (ORTHO) y que corresponde al receptor para los hematíes de carnero de los linfocitos T (Cotner et al 1981, Van Wauwe et al 1981)

- WT1: reconocido por el Ac Mo del mismo nombre y que se encuentra en linfocitos T inmaduros. También está presente en linfocitos T de sangre periférica normal.

3.1.4.2.- Marcadores inmunológicos de Linfocitos B.

a).- Inmunoglobulinas de superficie

b).- Formación de rosatas de ratón

c).- Antígenos de membrana detectados por anticuerpos monoclonales: Antígenos de histocompatibilidad de clase II: reconocidos por el Ac Mo OKIa que define un determinante antigénico común a todas las variantes alogénicas de los antígenos DR (Reinherz et al 1979, Hadler et al 1981). También se usó el Ac Mo GABI obtenido en nuestro laboratorio y que tiene un patrón de distribución idéntico al OKIa. Los antígenos DR cumplen un papel fundamental a nivel de las interacciones entre los monocitos y los linfocitos T y B. No son exclusivos de la serie linfocito B, pues también se encuentran en los monocitos y linfocitos T activados y en células hematopoyéticas.

BI: reconocido por el anticuerpo del mismo nombre y que aparece en el estadio de linfocito pre B y se mantiene durante las diferentes fases de la serie linfocito B hasta llegar a la fase de célula plasmática, donde se pierde su expresión (Stashenko et al 1980).

3.1.4.3.- Antígenos asociados a leucemias.

a).- CALLA: reconocido por el ac monoclonal J5 que -

precipita un antígeno de 100 Kd de peso molecular que se encuentra en las leucemias linfoblásticas agudas comunes (Ritz et al 1980)

b).- P24: reconocido por el anticuerpo monoclonal FMC8. -
Tiene un peso molecular de 24KD y está presente en LAL no T. (Brooks et al 1982).

3.1.5.-Técnicas para la aplicación del protocolo en el diagnóstico inmunológico de las leucemias humanas:

3.1.5.1.- Formación de rosetas con hematíes de carnero (Greaves et al 1973).

Materiales:

- tubos de plástico
- Centrifuga
- Hematíes de carnero.

Procedimiento:

En un tubo de plástico de 12 por 75 mm, se colocan 0,1 ml de una suspensión al 0,5% de hematíes de carnero y $(1 \pm 0.5) \times 10^6$ células mononucleares en 0,1 ml de PBS. Se añade una gota de suero humano previamente absorbido con hematíes de carnero y después inactivado con calor. Se centrifuga lentamente 50g, durante cinco minutos y se deja durante 18 horas a 4°C, sin despegar el botón celular. Después con mucho cuidado, haciendo oscilar el tu-

bo durante dos minutos, sin golpearlo, se disuelve el botón celular. Las células se observan en cámara de Neubauer y se calcula el porcentaje de rosetas. Se considera como roseta a todo linfocito rodeado al menos por tres hematíes. El conteo se realiza en microscopio de contraste de fase.

3.1.5.2.- Formación de rosetas con hematíes de ratón.

Los hematíes de ratón se obtienen por punción retroorbitaria con un capilar heparinizado. La técnica se desarrolla con la misma metodología que la anterior. Tiene como finalidad determinar el grado de diferenciación de los linfocitos B.

3.1.5.3.- Técnica de inmunofluorescencia directa para detectar la presencia de inmunoglobulinas de superficie en las células leucémicas (Collins et al 1980).

Materiales y reactivos:

- Tubos de plástico de 3 ml
- Centrifuga refrigerada.
- PBS con el 0,1% de albúmina
- Antiinmunoglobulina humana marcada con fluoresceína - (NORDIK) obtenida de

Procedimiento:

- Las células leucémicas a estudiar se ajustan a 10×10^5 / ml.

- 50 microlitros de la suspensión celular se colocan en un tubo de plástico de 3 ml en una gradilla situada sobre un baño de hielo. Se añaden 10 microlitros de la antiinmunoglobulina humana marcada con fluoresceína, diluida en PBS al 1/5.

- Se deja incubando durante treinta minutos a 4°C

- Se realizan tres lavados con PBS-albúmina, centrifugando a 250g durante 10 minutos a 4°C.

- Después del último lavado, se decanta el sobrenadante y las células con una pipeta de 50 microlitros se llevan a un portaobjetos para ser observadas al microscopio de fluorescencia.

- Se realiza el conteo de las células fluorescentes, valorando solo la positividad en las células vivas. El resultado se presenta en % de células positivas (fluorescentes).

3.1.5.4.- Técnica de inmunofluorescencia indirecta.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta se utiliza para estudiar la expresión, a nivel de las células leucémicas, de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales que forman parte del protocolo, anteriormente descrito.

Procedimiento:

- Las células leucémicas se ajustan a 10×10^6 /ml

- 50 microlitros de la suspensión celular se colocan en tu

bos de plástico de 3 ml. A cada uno de los tubos se le añaden 10 microlitros del anticuerpo monoclonal deseado diluido al 1/10.

- Se incuban durante media hora a cuatro grados en el refrigerador.

- Se realizan, después de incubar, tres lavados con PBS-albúmina.

- Después del último lavado, se decante el sobrenadante y sobre el botón celular se añaden 10 microlitros de antiinmunoglobulina de ratón (NORDIK) marcada con fluoresceína, diluida en PBS al 1/10.

- Se incuban durante media hora a 4°C en el refrigerador.

- Se realizan tres lavados con PBS-acida sódica, centrifugando a 250 g, durante 10 minutos, a 4°C.

- Las células después del último lavado se recogen con una pipeta de 50 microlitros para colocarlas sobre un portaobjetos. - Se observan al microscopio de fluorescencia. Se valoraron solo las células fluorescentes vivas.

3.1.6.- PANEL DE LINEAS CELULARES.

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Líneas celulares B: Ramos, B1A8, Dandi, Lundac, 885, P3HR-1

- Línea celular de linfoma de Burkitt 1 Raji.

- Línea mieloeritroide K562
- Líneas de carcinoma de pulmón: 5K-LU-1 y Oat75
- Línea linfoblástica común L68

Todas las líneas se mantienen en cultivo antes de ser tes
tadas por IFI, en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal de ter-
nera en incubador con 5% CO₂ a 37°C

3.2.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL ANTIGENO RECONO- GIDO POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL

3.2.1.- ACOPLAMIENTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL GR2110 A GEL
DE SEFAROSA ACTIVADA 4B-CN Br. (Según técnica descrita por el fa-
bricante -Farmacia Fine Chemical-)

A.- REACTIVOS Y MATERIALES

- Anticuerpo monoclonal GR2110 purificado
- Tampón de acoplamiento:

CO₃NaH 0,1 M

Cl Na 0,5 M

pH: 8,3

- Gel de sefarosa 4B activada CN Br (Fine chemicals)
- Solución de ClH 1mM
- Solución bloqueante de grupos activos: solución de glicina

0,2 M, pH 8 (Merck art 42G1)

- Tampón de acetato sódico 0,1 M pH 4, conteniendo ClNa 0,5M
- Bolsas de diálisis
- Agitador magnético
- Filtros de vidrio de 63 porosidad
- Matraz Kitasato (Simax)
- Bomba de vacío

B.- PROCEDIMIENTO:

a).- Se disuelve 1 ml del Ac monoclonal purificado en 2 ml de tampón de acoplamiento. La solución se coloca en una bolsa de diálisis que se deja durante 18 horas a 4°C, frente a 1 litro de tampón de acoplamiento. La solución se mantiene en agitación cambiándose el tampón cada 6 horas.

b).- Se pesa 1 gr. de gel de sefarosa 4B activada CNBr que se mezcla con 10 ml de una solución 1mM de ClH durante 15 minutos, posteriormente se lava con la misma solución, utilizando un filtro de vidrio de 63 de porosidad unido a un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío. Para el lavado se utiliza un volumen total de 200 ml de la solución de ClH, en 10 alícuotas de 20 ml, aspirándose el sobrenadante entre los sucesivos lavados. El gramo de gel después del lavado alcanza un volumen de 3,5 ml.

c).- El gel se lava posteriormente con 5 ml de tampón de a

acoplamiento e inmediatamente se mezclan 2 ml de la solución del -
ligando (2 ml de la solución del anticuerpo monoclonal dializado
frente a tampón de acoplamiento) con 1 ml de la suspensión del -
gel durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave.

d).- El gel se centrifuga a 300 g durante 5 minutos, tras-
firiéndose a continuación a una solución 0,2 M de glicina de pH 8
durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave para -
bloquear los grupos activos que habían quedado sin acoplar.

e).- El gel se lava cinco veces alternativamente con tam-
pón de acoplamiento y tampón acetato conteniendo ClNa para elimi-
nar las proteínas ligadas no covalentemente.

3.2.2.- MARCAJE EXTERNO DE LAS CELULAS INMUNIZANTES CON ^{125}I

A.- REACTIVOS Y MATERIALES:

- ^{125}I Na: 1 mCi (General Radioquímica).
- Lactoperoxidasa: 200 μgr .
- PBS
- H_2O_2 al 0,06% (Merck art 822287)
- Tubos universales
- Baño de hielo
- Células: 80×10^6

B.- METODO:

Las células son recogidas y lavadas 2 veces con PBS. Después del último se resuspenden en 1 ml de PBS conteniendo 200 μ gr de - lactoperoxidasa, manteniendo la suspensión en baño de hielo. A la mezcla se le añade 1 μ Ci de 125 I Na y se comienza la reacción con - la adición de 10 μ l de H₂O₂, volviendo a repetir la operación 2,5 y 5 minutos más tarde. Tras la última adición de 10 μ l de H₂O₂ se esperan 5 minutos tras lo cual añadimos PBS frío y lavamos dos veces.

Durante el proceso del marcaje se debe agitar la suspensión celular con frecuencia y de forma suave, manteniéndose a una temperatura de 4°C.

3.2.3.- LISADO DE LAS CELULAS MARCADAS.

A.- REACTIVOS:

- Azida sódica
- ClNa (Merck art. 6404)
- EDTA. Etilendiaminotetraacético, dihidratado (sal sódica del ácido)(Merck art 8421)
- Etanol.
- NP-40. Nonidet-40. Acetilfenilpolietilenglicol (Flucka 74,385)

- PMSF. Fenil metilsulfonilfluoride (Sigma Nº T-7626)
- Tritón X-114. Octofenoxipolietoxietanol (Sigma Nº T-7003)
- Tris/ClH. Tris (Hidroximetil-aminometano)(Merck, art. - 6386).

B.- SOLUCIONES Y MATERIALES:

a).- Solución tampón de lavado:

10 mM Tris/ClH

150 mM ClNa

pH 7,4

b).- Solución tampón de lisis

900 μ l de la solución tampón de lavado

100 μ l de Tritón X-114 al 10%

20 μ l de solución PMSF

c).- Solución para floculación

solución tampón de lavado con 0,5% de Tritón X-114 y 10% de sacarosa.

d).- Solución de Tritón al 10%

Solución de Triton X-114 al 10% en solución tampón de lavado

e).- Solución tampón NET

50mM Tris/ClH + 150 mM de ClNa + 5 mM de EDTA

se ajusta pH a 7,4 y se le añade 0,02% de NaN_3

f).- Soluciones de lavado

- Solución tampón NET con un 0,5% de NP 40 y 1/10 de su volumen final de solución de ClNa saturada.

- Solución tampón NET con un 0,5% de NP 40 y 1/20 de su volumen final de solución saturada de ClNa.

- Solución tampón NET con un 0,5% de NP 40

g).- Solución NP 40

Solución de NP 40 al 10% disuelto en NET.

h).- Solución PMSF

2 mgr de PMSF (Phenyl Methyl Sulfoethyl Fluoride) disueltos en 40 μ l de etanol.

i).- Solución saturada de ClNa en agua.

- Tubos Eppendorf

- Microcentrifuga

C.- METODO.

a).- Preparación del lisado celular:

- Lavado: las células ya marcadas y lavadas una vez con PBS son lavadas otra vez con solución tampón de lavado a la que se agrega 40 μ l de PMSF.

- Lisis: después de este lavado las células son resuspendidas en 1 ml de solución tampón de lisis e incubadas a 4°C durante

30 minutos. Transcurrido este tiempo, la suspensión se centrifuga a 15.000 r.p.m. durante 20 minutos separándose un lisado donde se encuentran las proteínas tanto de membrana como citoplasmáticas y un precipitado que contiene restos celulares.

- Purificación de lisado: este solubilizado es sometido a un proceso de purificación por floculación del Tritón X-114 a 37°C. Para ello en dos tubos de eppendorf, de 1 ml de capacidad que contienen 250 μ l de solución para floculación, se reparte el lisado (500 μ l en cada tubo) se agita y se mantiene en baño de agua a 37°C durante 10-15 minutos, después se centrifugan los tubos 3 minutos en microcentrífuga.

b).- A continuación se separa la fase pesada de la ligera. La pesada se redisuelve con 200 μ l de buffer NET con 0,5% de NP 40. A la fase ligera se le añaden 50 μ l de Triton X-114 al 10% y se repite la purificación. Se vuelve a redissolver la fase pesada con 200 μ l del mismo buffer, desechándose la fase ligera. Todas las fases pesadas se recogen juntas.

3.2.4.- INMUNOPRECIPITACION

El lisado después de la purificación se enfrenta con 100 μ l de sefarosa 4B que tiene acoplado el Ac Mo GR2110 durante 4 horas. Después se realizan los siguientes lavados:

a).- Dos veces con NET 0,5% de NP 40 1/10 del volumen total de solución de ClNa saturado .

b).- Dos veces con NET 0,5% NP40 1/20 del volumen total de solución de ClNa saturado.

c).- Una vez con NET 0,5% NP40

3.2.5.- ELECTROFORESIS DEL INMUNOPRECIPITADO EN GEL DE POLI-ACRILAMIDA CON S.D.S.

A.- REACTIVOS:

- Acrilamida (Bio-Rad, catalog: 161-0 100)
- Bis Acrilamida (Merck art 10.897)
- Bromofenol (Shandon Southern 2560080)
- Glicerol (CID)
- Glicerina (Merck art 4.201)
- 2-Beta-Mercaptoetanol (Biorad, catalog 161-0710)
- 2-Propanol (Merck art 963)
- Persulfato amónico (Bio-Rad Catalog 161-0700)
- SDS Sulfatododecil-sódico (Bio-Rad, catalog 161-0301)
- TEMED.N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamino (Merck art 10.732)
- Tris/ClH (Merck, art 8.386)
- Controles de peso molecular (Amersham CFA 645):

Lisozima. Pm 14.300

Anhidrasa carbónica Pm 30.000

Ovoalbúmina Pm 46.000

Albúmina humana. Pm 69.000

Las proteínas de los controles de peso molecular van marcadas con C¹⁴.

B.- SOLUCIONES:

- Solución de Acrilamida Madre

22,2 gr de acrilamida

0,6 gr de bis acrilamida

disueltos hasta 100 ml con agua bidestilada y desionizada.

- Solución tampón gel inferior: 1,5 μ Tris/ClH pH 8,8

- Solución tampón gel superior: 0,5 μ Tris/ClH pH 6,8

- Solución S.D.S: 10% de SDS en agua.

- Solución de persulfato amónico

100 mgr de persulfato amónico disueltos en 1 ml de agua.

- Solución de bromofenol: 0,2% de bromofenol en agua.

- Solución tampón de la muestra:

10 ml de glicerol

12,5 ml de tampón de gel inferior

10 ml de solución de S.D.S.

5 ml de solución de azul de bromofenol

5 ml de 2 β mercaptoetanol. Agua bidestilada esteril hasta

100 ml.

El mercaptoetanol se añade inmediatamente antes de su uso.

- Tampón de electroforesis:

Glicina 28,8 gr/l

Tris 6,06 gr/l

SDS 1 gr/l

Agua destilada 1/litro

C.- MATERIALES:

- Cubeta LKD 2001

- Fuente alimentadora LKB (Biochem 2103)

D.- METODO:

Una vez finalizados los lavados, el complejo formado por se-
ferosa 48-Ac Mo-antígeno se disgrega y reduce agregándole 100 μ l
de solución tampón de la muestra y sometiéndolo a ebullición de 5
a 10 minutos, transcurridos los cuales el antígeno está liberado y
se le somete a electroforesis en geles de poliacrilamida en presen-
cia de SDS (SDS + PAGE). Al mismo tiempo se realiza la electrofore-
sis de un control de peso moleculares.

Los geles de poliacrilamida se preparan según describen We-
ber y Osborn (1973). Para la preparación del gel inferior se emplea
la siguiente mezcla:

Solución de acrilamida	17 ml
Solución tampón gel inferior	7,5 ml

H ₂ O	4,9 ml
Solución SDS	0,3 ml
Solución de persulfato	0,2 ml
TEMED	0,02 ml

Los tres primeros componentes se mezclan en la primera fase, desgasificándose, tras lo cual se añade el SDS, Persulfato y TEMED son añadidos justo antes de introducir la mezcla en el molde. Una vez introducida la mezcla, se le recubre con una pequeña capa de propanol para que el frented del gel sea recto. El proceso de polimerización lleva de 30 minutos a una hora, tras la cual se retira el propanol y se le agrega la mezcla para la fabricación del gel superior. Mezcla formada por:

Solución de acrilamida	2,25 ml
Solución tampón gel superior	2,50 ml
H ₂ O	5 ml
Solución SDS	0,1 ml
Solución de persulfato amónico	0,1 ml
TEMED TEMED	0,1 ml

La mezcla se realiza de una sola vez y sin desgasificación.

A los 30 minutos el gel está listo para su uso.

La electroforesis se corre durante la noche a una intensidad de 180 mA. La cubeta usada en nuestro trabajo ha sido la LKB2001.

3.2.6.- PREPARACION DEL GEL PARA LA AUTORADIOGRAFIA.

3.2.6.1.- Fluorografía

Tiene como finalidad impregnar el gel de PPO que amplifica las radiaciones beta, emitidas por el carbono 14, utilizado para marcar los controles de peso molecular. De esta manera los controles podrán impregnar la placa de autoradiografía.

REACTIVOS.-

- = Acido acético (Euro-kurz)
- DMSO Dimetil-sulfóxido (Merck art 2931)
- = Metanol (Riser)
- PPO (2,5-Difeniloxazol)(Merck, art: 2.946)

SOLUCIONES:-

- Solución fijadora:

Metanol 25%

Acido acético 10%

- Solución PPO/DMSO:

PPO 26,6 grs

DMSO 120 ml.

METODO.-

- El gel después de concluida la electroforesis, se corta -
con una cuchilla, por la línea de separación entre las porciones -
superior e inferior.

- La porción inferior se coloca en un baño de solución fijadora durante 30 minutos.

- Treinta minutos en DMSO antiguo (usado)

- Treinta minutos en DMSO nuevo

- Tres horas en la solución de PPO/DMSO

- Cuarenta minutos en agua corriente

3.2.6.2.- Secado del gel.

MATERIALES.-

- Papel de celofan

- Papel Wathmann

- Secador de geles (LKB.2,003)

- Bomba de vacío

METODO.-

- El gel después del baño en agua se coloca sobre un trozo de papel Wathmann húmedo que está situado sobre la rejilla del se cador.

- El gel se cubre con papel de celofan y la rejilla se coloca en el secador.

- El secador se conecta a la bomba de vacío y antes de encenderlo se comprueba la colocación correcta del gel.

- Se interrumpe el secado a los treinta minutos.

3.2.7.-AUTORADIOGRAFIA.-

El gel una vez seco, se sitúa dentro de un chasis con una placa de radiografía. Se deja en el congelador de -80° y la placa se revela a los tres o cuatro días. El tiempo de exposición varía según la intensidad del marcaje con I^{125} de las proteínas inmunoprecipitadas.

3.2.8.- CALCULO DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS INMUNOPRECIPITADAS

Al revelar la placa radiográfica, se observan las bandas - de los controles de peso molecular y las de las proteínas inmunoprecipitadas.

Se calculan las distancias relativas de todas las bandas.- La distancia relativa de una banda es la relación entre la distancia recorrida por esta banda y la distancia alcanzada por el frente del gel.

Los valores de los pesos moleculares en Kd, de los controles, divididos por 10^4 , se llevan a las ordenadas de una gráfica semilogarítmica y en abscisas 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.

4.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

GR2110 Y FMC8

4.1.- DISTRIBUCION CELULAR

4.1.1.- Reactividad comparativa de los anticuerpos monoclonales GR2110 y FMC8 con células de leucemia aguda linfoblástica.

El patrón de reactividad de los anticuerpos monoclonales GR2110 y FMC8 se probó en paralelo utilizando la técnica de IFI ya descrita (pag) con un panel de células procedentes de 14 - enfermos diagnosticados de LAL. De las muestras estudiadas cinco corresponden a LAL común, cuatro a LAL nula, una a LAL B, tres a LAL T y una a crisis linfoblástica de LMC.

4.1.2.- Reactividad comparativa de los anticuerpos monoclonales GR2110 y FMC8 con líneas celulares.

Se estudió la reactividad en paralelo de estos dos anticuerpos monoclonales con las siguientes líneas celulares:

- Líneas procedentes de linfoma de Burkitt: RAJI y DAUDI.
- Líneas B: LUNDAO, p3-HR-1, B85.
- Líneas pre B: REH y KM3.

- Línea mielocitroide K 562.
- Líneas de carcinoma de pulmón: SK-LU-1 y Oat 75
- Línea procedente de una LAL común L68.

El estudio se llevó a cabo mediante técnica de IFI ya descrita (pag.).

4.2.- TECNICA DE CAPPING PARA EL ESTUDIO DE LA REDISTRIBUCION DE LAS MOLECULAS RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES GR2110 y FMC8.

Se utilizaron células de la leucemia L21 (GR2110+, FMC8+, Ia/DR+).

- Las células leucémicas se ajustan a 10×10^6 /ml.
- Se utilizaron cuatro tubos de plástico de 3 ml de capacidad, en cada uno de los cuales se colocan 50 microlitros de la suspensión celular.

En cada tubo se añaden 50 microlitros del anticuerpo monoclonal GR2110 diluido a 1/10.

- Se incuban a 4°C durante 30 minutos
- Se realizan tres lavados con PBS-albúmina.
- Después del último lavado, se decanta el sobrenadante y -

sobre el botón celular se añaden 10 microlitros de antiinmunoglobulina de ratón (NORDIK) marcada con fluoresceína, diluida en PBS al 1/10.

- Se incuba 40 minutos a 37°C.

- Se lavan dos veces con PBS más azida sódica al 0,1%

- El tubo nº 4 se observa en microscopio de fluorescencia para comprobar la existencia de capping.

- Se añaden a continuación 20 microlitros de anticuerpo monoclonal GR2110 al tubo nº1 (control), anticuerpo monoclonal GRB1 (anti DR) al tubo nº2 (control), anticuerpo monoclonal FMCS al tubo nº3.

- Se incuban 30 minutos a 4°C

- Después de la incubación se lavan dos veces con PBS más azida sódica al 1%.

- Se añaden a continuación en cada tubo 20 microlitros de antiinmunoglobulina de ratón (NORDIK) marcada con fluoresceína diluida en PBS al 1/10.

- Se incuban a 4°C durante 30 minutos.

- A continuación se lavan dos veces en PBS conteniendo 1% de azida sódica.

- Se valora en microscopio de fluorescencia. En el tubo nº1

(control) se observa la persistencia del capping y ausencia de -
fluorescencia en el resto de la célula. En el tubo nº2 (control)
se observa la fluorescencia de todo el contorno celular.

IV.- RESULTADOS

1.- RESULTADOS DE LA FUSION ENTRE LOS ESPLENCITOS INMUNIZADOS CON LAS CELULAS DE LA LEUCEMIA BSF Y LA LINEA MIELOMATOSA MURINA NS1

Del bazo procedente del ratón BALB/C mejor inmunizado frente a la leucemia se obtuvieron 100×10^6 células de bazo que se fusionaron con 30×10^6 células de la línea NS1.

Las células resultantes de la fusión se repartieron en 25 placas de 24 pocillos.

A la cuarta semana de cultivo y después del cambio de medio HAT por HT, se observó crecimiento de hibridomas en 75 pocillos de los 550 iniciales. Los sobrenadantes de estos pocillos se testaron mediante IFI con células de la leucemia inmunizante BSF. Sólo un sobrenadante fue positivo.

Los hibridomas se denominaron por el número de la placa, - seguido de la letra de la fila y del número de la columna en la - que se encontraba el pocillo. El sobrenadante positivo correspondía al hibridoma 21D10. Posteriormente se procedió a su clonación por el método de la dilución límite según se indica en el apartado de material y métodos.

El anticuerpo monoclonal GR2110, producido por el hibridoma 21D10, reaccionaba con el 95% de las células de la leucemia inmunizante BSF.

2.-CARACTERIZACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL GR2110

2.1.-TITULACION DEL ANTICUERPO GR2110.

Se recogieron las ascitis de tres ratones BALB/c previamente inyectados con el hibridoma 2D10. El pool de ascitis se tituló frente a la leucemia inmunizante, utilizando la técnica de Inmunofluorescencia indirecta. El título resultante fue de 1/4000 (tabla. 1).

Tabla 1

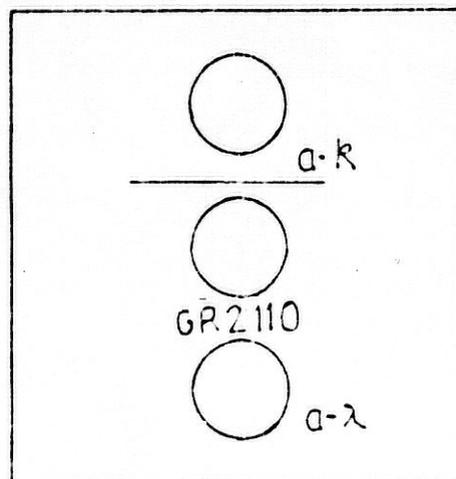
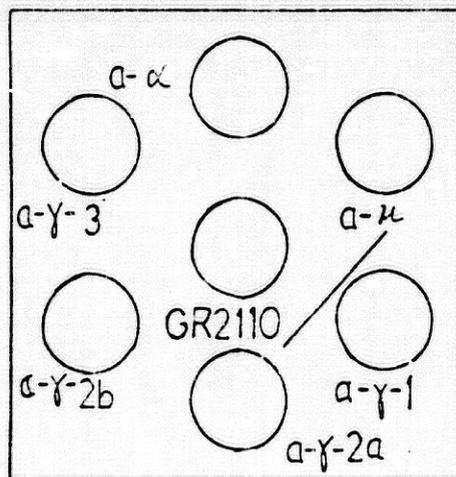
1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/32000	1/64000
+++	+++//	++	+	<u>+</u>	<u>+</u> /-	-	-

TITULACION DEL GR2110

2.2.- DETERMINACION DEL ISOTIPO DE INMUNOGLOBULINA.

El sobrenadante de cultivo del hibridoma productor del GR2110 se concentró 20 veces y la subclase de inmunoglobulina se determinó por el método de doble inmunodifusión, utilizando suero anti-inmunoglobulina de ratón (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, Kappa y lambda) obtenido en conejo.

El GR2110 es una IgG1 kappa (Fig. 1).



3.- CARACTERIZACION DEL ANTIGENO RECONOCIDO POR EL ANTI-

CUERPO MONOCLONAL GR2110

3.1.- DISTRIBUCION CELULAR

3.1.1.- Reactividad del GR2110 con un panel de células -
normales.

El anticuerpo monoclonal GR2110 se probó mediante la técnica de IFI según se indica en la pag.102 , con un panel de un total de 70 células normales distribuidas de la siguiente forma: linfocitos T 22, células de amígdala 13, linfocitos B 10, células de médula ósea 7, granulocitos 6, monocitos 6, plaquetas 5 y células de bazo 1.

El porcentaje de células positivas para cada muestra se -
señala en la Tabla 2.

Tabla 2

cél.nº	L.T amígdala	L.B	M.O.	granulocitos	monocitos	plaquetas	bazo
1	0	1	0	0	12	0	95 4
2	3	1	0	0	5	70	97
3	2	3	0	2	16	0	99
4	1	1	0	1	4	0	100
5	0	1	11	1	20	0	100
6	1	1	0	1	22	0	
7	0	0	0	1			
8	0	3	0				
9	0	0	0				
10	0	2	14				
11	0	0					
12	0	6					
13	0	0					
14	0						
15	0						
16	0						
17	0						
18	0						
19	0						
20	0						
21	3						
22	0						

REACTIVIDAD DEL GR2110 CON CELULAS NORMALES (% de células positivas).

LT Linfocitos T

LB Linfocitos B

3.1.2.- Reactividad del anticuerpo monoclonal GR2110 con linfocitos transformados con lectinas (PHA, Con A y PWM).

El GR2110 se enfrentó mediante la técnica de IFI a un panel de linfocitos transformados con PHA, conA y PWM. Los linfocitos procedían de seis donantes sanos.

El porcentaje de células positivas para el GR2110 se representa en la Table 3.

Tabla 3

	PHA (48h)	ConA(72h)	PWM (96)
1	0	4	0
2	0	2	2
3	2	0	3
4	1	6	2
5	0	1	2
6	0	1	2

REACTIVIDAD DEL GR2110 CON LINFOCITOS TRANSFORMADOS CON LECTINAS

(% de células positivas)

3.1.3.- Reactividad del anticuerpo monoclonal GR2110 con células leucémicas.

El GR2110 fue probado mediante IFI, con las células procedentes de 87 enfermos diagnosticados de leucemia. 29 muestras correspondían a Síndromes linfoproliferativos crónicos, 32 muestras a leucemia aguda linfoblástica, entre las que incluimos dos casos de brote linfoblástico de leucemia mieloide crónica, 16 muestras a leucemia aguda no linfoblástica, entre las que se incluye un caso de brote no linfoblástico de leucemia mieloide crónica (LMC).

3.1.3.1.- Reactividad del GR2110 con Síndromes linfoproliferativos crónicos.

Del total de 29 muestras analizadas 22 procedían de enfermos diagnosticados de leucemia linfática crónica B (LLC-B), dos de enfermos con el diagnóstico de leucemia linfática crónica T (LLC-T), una muestra correspondía a una leucemia linfoide crónica con marcadores T y B (LLC T-B), una a un linfoma T leucemizado, una a un leucemia prolinfocítica y dos a tricoleucemia.

La cifra inicial de leucocitos y el porcentaje de linfocitos de cada muestra analizada así como el porcentaje de reactividad con el GR2110 en cada uno de los casos se muestran en la Tablas 4 y 5.

Tabla 4

LLC-B	Leucocitos/mm ³	% Linfocitos	GR2110 % cél.+
LC 14	40.000	90	0
LC 15	100.000	90	1
LC 16	28.000	98	0
LC 17	45.000	80	0
LC 22	40.000	95	0
LC 23	44.500	77	5
LC 24	120.000	80	1
LC 25	166.000	100	9
LC 26	46.000	90	2
LC 27	30.000	70	4
LC 30	100.000	96	0
LC 34	50.000	80	0
LC 36	130.000	65	0
LC 39	24.300	60	0
LC 40	100.000	96	0
LC 43	26.000	96	2
LC 44	100.000	95	0
LC 46	24.300	70	0
LC 49	20.000	80	8
LC 50	20.000	80	4
LC 51	20.000	78	0
LC 52	17.000	60	0

REACTIVIDAD DEL GR2110 CON LLC-B

Tabla 5

	Leucocitos/mm ³	% Linfocitos	GR2110 % cél.+
LLC-T			
LC 3	18.200	60	0
LC 38	19.000	74	0
LLC (B-T)			
LC 45	65.000	92	0
LINFOMA T			
LC 48	13.600	74	0
L. PROLINFOCITICA			
LC 1	100.000	90	2
TRICOLEUCEMIA			
LC 18	5.400	81(14%tricol.)	0
LC 47	4.100	42(5% tricol.)	6

REACTIVIDAD DEL GR2110 CON OTROS SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS
CRONICOS

3.1.3.2.- Reactividad del GR2110 con leucemias agudas linfoblásticas (LAL).

Se estudiaron en total 32 casos. La caracterización fenotípica de estas leucemias se realizó atendiendo a los siguientes marcadores: TdT, CALLA (anticuerpo monoclonal J-5), T3 (anticuerpo monoclonal OKT 3), WT1, Rosetas E, Inmunoglobulinas de superficie y moléculas Ia/DR (anticuerpo monoclonal GRB1), según se describe en la pag. 98 de material y métodos.

De estos 32 casos, 19 correspondían a LAL común (se incluye la leucemia inmunizante, BSF) cinco a LAL nula, dos a LAL B, tres a LAL T, uno a LAL-pre T y dos a crisis linfoblástica de leucemia mieloide crónica (LMC).

En las Tablas 6, 7, 8, 9 y 10 se muestran las características fenotípicas, cifra de leucocitos y porcentaje de blastos iniciales, así como el porcentaje de células reactivas con el GR2110 para cada caso de los grupos antes mencionados.

Tabla 6

	Leucocitos/mm ³	Blastos %	TDT +/-	CALLA (J-5)%	T3 %	WT1 %	ER %	SIg %	Ia/DR +/-	GR2110 %
BSF	—	—	+	95	0	0	0	0	+	95
L-21	94.400	90	+	95	N.T.	N.T.	1	0	+	85
L-22	22.500	60	+	95	N.T.	N.T.	8	0	+	1
L-24	14.200	60	+	30	7	N.T.	8	0	+	55
L-25	130.000	96	+	90	2	N.T.	4	0	+	90
L-34	1.000	—	+	90	10	N.T.	3	0	+	0
L-35	4.500	55	+	60	12	N.T.	4	18	+	0
L-39	12.700	65	+	83	16	3	8	8	+	30
L-41	92.000	—	+	92	11	4	7	5	+	88
L-45	—	60	+	62	18	0	13	0	+	42
L-47	—	90	+	64	0	0	0	12	+	84
L-49	15.900	—	N.T.	48	34	N.T.	26	N.T.	+	28
L-53	16.500	83	+	76	18	10	7	2	+	62
L-59	16.100	34	+	40	32	24	23	6	+	0
L-64	28.000	87	+	92	20	4	0	0	+	95
896	12.500	84	+	90	N.T.	N.T.	0	0	-	90
901	4.300	49	+	30	N.T.	N.T.	0	0	-	0
913	50.000	66	+	50	N.T.	N.T.	0	0	+	16
915	300.000	89	+	95	N.T.	N.T.	0	0	+	0

CARACTERISTICAS FENOTIPICAS Y REACTIVIDAD CON EL GR2110 DE LA
LAL COMUN

Tabla 7

	Leucocitos/mm ³	Blastos %	TDT +/-	CALLA (J-5)%	T3 %	WT1 %	ER %	SIg %	Ia/DR +/-	GR2110 %
L-29	8.500	93	+	7	9	N.T.	10	0	+	60
L-33	2.200	88	+	7	N.T.	N.T.	7	6	-	27
898	18.900	90	+	0	N.T.	N.T.	0	0	+	0
867	22.000	97	+	0	N.T.	N.T.	0	0	+	0
872	2.900	48	+	0	N.T.	N.T.	28	0	+	0

CARACTERISTICAS FENOTIPICAS Y REACTIVIDAD CON EL GR2110 DE LA
LAL NULA

Tabla 8

	Leucocitos/mm ³	Blastos %	TDT +/-	CALLA (J-5)%	T3 %	WT1 %	ER %	Sig %	Ia/DR +/-	GR2110 %
1004	20.000	80	-	0	0	N.T.	0	30(k)	+	90
L-12	30.000	60	N.T.	14	0	5	2	80(λ)	+	6

CARACTERISTICAS FENOTIPICAS Y REACTIVIDAD CON EL GR2110 DE LA LAL-8

Tabla 9

	Leucocitos/mm ³	Blastos %	TDT +/-	CALLA (J-5)%	T3 %	WT1 %	ER %	Sf _{er} %	Ia/OR +/-	GR2110 %
LAL-T										
LCJ	4.000	---	+	17	15	74	64	5	-	7
L-43	300.000	96	+	0	0	100	56	0	-	0
L-50	43.000	39	+	29	18	75	40	0	-	0
LAL preT										
L-63	62.400	85	+	0	14	90	14	0	-	0

CARACTERIZACION FENOTIPICA Y REACTIVIDAD CON EL GR2110 DE LA
LAL T Y PRE T

Tabla 10

	Leucocitos/mm ³	Blastos %	TDT +/-	CALLA (J-5)%	T3 %	WT1 %	ER %	Sig %	Ia/DR +/-	GR2110 %
L-44	99.000	64	+	60	5	N.T.	3	5	+	0
L-54	26.200	80	+	98	16	6	8	16	+	80

CARACTERISTICAS FENOTIPICAS Y REACTIVIDAD CON EL GR2110 DE LA CRISIS
LINFOBLASTICA DE LA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

3.1.3.3.- Porcentaje de leucemias agudas linfoblásticas -
reactivas con el GR2110.

En la Tabla 11 se especifica el porcentaje de LAL posi-
vas para el GR2110 agrupadas según el subgrupo inmunológico.

Tabla 11

	Nº de casos	Nº de casos GR2110+	%
LAL común	19	13	68
LAL nula	5	2	40
LAL B	2	1	50
LAL T	3	0	0
LAL pre T	1	0	0
CS LMC	2	1	50
Total	32	17	53

PORCENTAJE DE LAL REACTIVAS CON GR2110

LAL: Leucemia aguda linfoblástica

CS LMC: Crisis linfoblástica de la leucemia mieloide crónica

3.1.3.4.-Relación entre la expresión de la molécula GR2110 y otros marcadores asociados a leucemia (p100 (CALLA) e Ia/DR) en la LAL.

- En la Tabla 12 se especifican los casos de asociación y discordancia en la expresión de las moléculas GR2110 y p100 (CALLA) en los 32 casos de LAL estudiados.

- En la Tabla 13 se resumen los casos de asociación y discordancia en la expresión de las moléculas GR2110 e Ia/DR en los 32 casos de LAL estudiados.

Tabla 12

	Nº casos	%
GR2110+ CALLA+	14	44
GR2110- CALLA-	5	16
GR2110+ CALLA-	3	9
GR2110- CALLA+	10	31

EXPRESION DE LAS MOLECULAS GR2110 Y CALLA EN LA LAL

Tabla 13

	Nº casos	%
GR2110+ Ia/DR+	15	47
GR2110- Ia/DR-	5	16
GR2110+ Ia/DR-	2	6
GR2110- Ia/DR+	10	31

EXPRESION DE LAS MOLECULAS GR2110 E Ia/DR EN LA LAL

3.1.3.5.- Reactividad del anticuerpo monoclonal GR2110 -
con leucemias agudas no linfoblásticas.

Se estudiaron un total de 16 casos entre los que se incluye un caso de brote no linfoblástico de leucemia mieloide crónica (LMC). Del resto de las células analizadas doce muestras procedían de enfermos diagnosticados de leucemia aguda mieloblástica (LAM) y tres de enfermos diagnosticados de leucemia aguda indiferenciada (LAI).

La cifra de leucocitos y el porcentaje de blastos iniciales, así como el porcentaje de células positivas para el GR2110 en cada una de las muestras estudiadas se especifica en la Tabla

14.

Tabla 14

	Leucocitos/mm ³	% blastos	GR2110%/cél.+
L.A.M.			
L-30	13,200	13	0
L-31	28.000	-	0
L-37	47.500	75	0
L-38	-	34	0
L-40	18.400	58	2
L-51	20.000	85	36
906	-	-	0
911	-	-	0
860	-	-	0
873	-	-	0
883	-	-	0
884	-	-	0
L.A.I.			
L-52	-	60	2
L-36	108.000	-	6
RTD	111.000	84	0
BROTE NO LINF.			
L.M.C.*			
L-46	56.000	51	6

REACTIVIDAD DEL GR2110 CON LEUCEMIAS AGUDAS NO LINFOBLASTICAS

L.A.M.: Leucemia aguda mieloblástica

L.A.I.: Leucemia aguda indiferenciada

* : Brote no linfoblástico de leucemia mieloide crónica

3.1.4.- Reactividad del GR2110 con líneas celulares.

Se analizó la reactividad del GR2110 con un total de trece líneas celulares. Los nombres, origen celular y porcentaje de células positivas para el GR2110 de cada una de las líneas estudiadas se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15

Línea celular	Origen	GR2110 % cel.+
RAJI	Burkitt	0
RAMOS	B	0
BIAB	B	0
DAUNDI	Burkitt	0
LUNDAC	B	0
P3-HR-1	B	0
B85	B	0
REH	Pre B	0
KM3	Pre B	26
K562	Mieloide	0
SK-LU-1	Carcinoma de pulmón	0
Def 75	Carcinoma de pulmón	0
L-68	LAL común	85

REACTIVIDAD DEL GR2110 CON LINEAS CELULARES

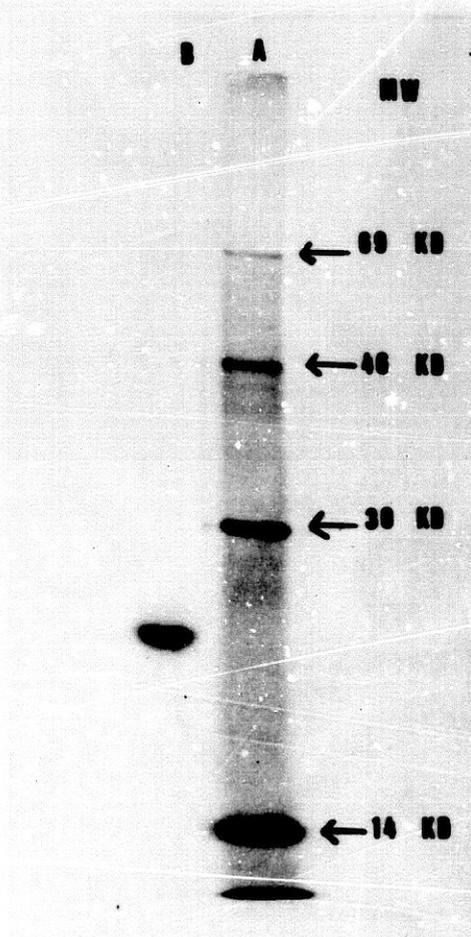
3.2.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL ANTIGENO RECONOCIDO POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL GR2110.

3.2.1.- Electroforesis del Inmunoprecipitado.

Las células inmunizantes de la leucemia BSF se lisaron con una solución de NP-40, a continuación se obtuvo un precipitado del lisado celular con el anticuerpo monoclonal GR2110, procediéndose a realizar una electroforesis (SPS-PAGE) del precipitado, tal y como se describe en la página 111 de esta memoria.

La autorradiografía del gel (Fig 2) muestra una banda que corresponde a la proteína inmunoprecipitada con el GR2110.

Figura 2



Autorradiografía del lisado de células de BASF marcadas con I^{125} e inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal GR2110.

A la derecha controles de peso molecular.

3.2.2.- Cálculo del peso molecular.

Para calcular el peso molecular del antígeno precipitado con el GR2110, se construyó una recta de regresión en papel semi-logarítmico. En ordenadas se colocan los valores de peso molecular de los controles y en abscisas sus distancias relativas.

Las distancias relativas de los controles de peso molecular fueron.

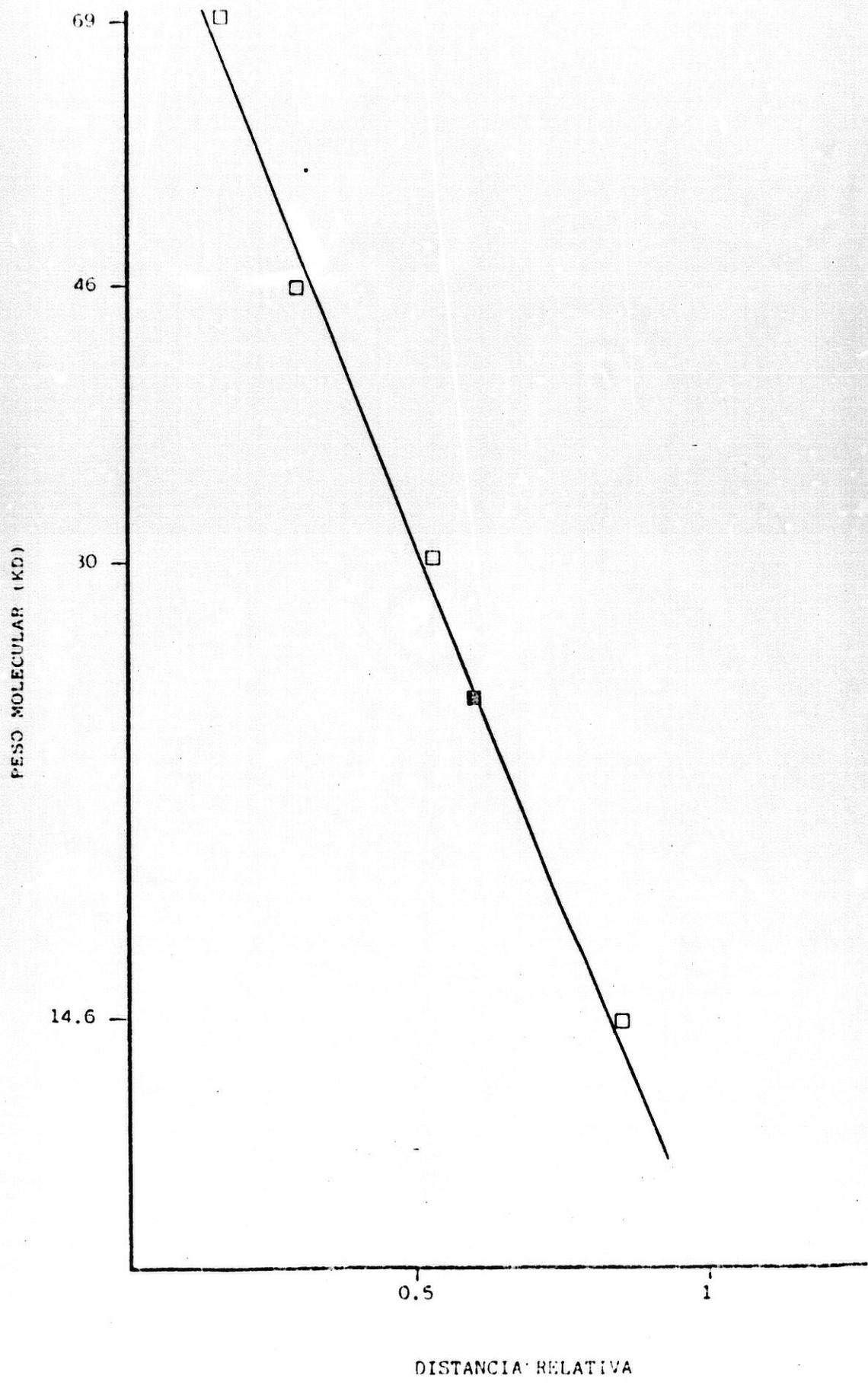
0,17 para la albúmina humana (69KD de peso molecular)

0,32 para la ovoalbúmina (46KD de peso molecular)

0,54 para la anhidrasa carbónica (30 KD de peso molecular)

0,67 para la lisozima (14,6 KD de peso molecular)

La distancia relativa para la molécula inmunoprecipitada por el GR2110 fue de 0,63 lo que corresponde a un peso molecular de 24 KD (Fig. 3).



4.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES -

GR2110 Y FMC8

4.1.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DISTRIBUCION CELULAR DE -
LAS MOLECULAS RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES GR2110
Y FMC8.

4.1.1.- Reactividad del GR2110 y FMC8 con líneas celula--
res.

Se realizó un estudio en paralelo de la reactividad de -
estos dos anticuerpos monoclonales con un panel de líneas celula
res utilizando la técnica de IFI.

Las líneas empleadas, su origen, así como el porcentaje de
células de cada línea reactivas con los anticuerpos GR2110 y FMC8
se especifica en la Tabla 16

Tabla 16

Línea celular	Tipo	GR2110	FMC8
RAJI	Burkitt	-	-
DAUDII	B	-	-
LUNDAC	B	-	-
P3-HR-1	B	-	-
B 85	B	-	-
REH	Pre B	-	+(10%)
KM3	Pre B	+(26%)	+(35%)
K562	Mieloide	-	-
SK-LU-1	Ca. Pulmón	-	-
Oat 75	Ca. Pulmón	-	-
L 68	LAL Común	++(85%)	++(87%)

REACTIVIDAD DE GR2110 y FMC8 CON LINEAS CELULARES

4.1.2.- Reactividad del GR2110 y FMC8 con células de la -
leucemia aguda linfoblástica (LAL).

Se estudió en paralelo la reactividad de estos dos anti--
cuerpos monoclonales con un panel de células procedentes de 14 -
enfermos diagnosticados de LAL. De las muestras analizadas cinco
corresponden a LAL común, cuatro a LAL nula, una a LAL B, tres a
LAL T y una a crisis linfoblástica de leucemia mieloide crónica
(LMC).

El porcentaje de células reactivas de cada muestra con los
anticuerpos monoclonales GR2110 y FMC8 se especifica en la Tabla 17

En la Tabla 18 se resumen los casos de asociación y dis--
cordancia en la expresión de las moléculas reconocidas por los -
anticuerpos monoclonales FMC8 y GR2110 en los catorce casos de -
LAL estudiados.

Tabla 17

Tipo de LAL	% de células leucemicas positivas	
	GR2110	FMCS
LAL COMUN		
L21	80	92
L45	42	84
896	90	90
913	16	29
915	0	62
LAL NULA		
L 33	27	8
898	0	0
867	0	43
872	0	58
LAL B		
1004	90	90
LAL T		
LCJ	7	4
L 43	0	0
L 50	0	0
CRISIS LINFOBLASTICA		
LMC		
L 44	0	14

COMPARACION DE LA REACTIVIDAD DEL GR2110 Y FMCS CON LEUCEMIAS
LINFOBLASTICAS

Tabla 18

	Nº casos	%
GR2110+ FMC8+	5	35
GR2110- FMC8-	4	29
GR2110+ FMC8-	1	7
GR2110- FMC8+	4	29

EXPRESION DE LAS MOLECULAS FMC8 Y GR2110 EN LA LAL

4.2.- ESTUDIO DE LA REDISTRIBUCION CELULAR DE LAS MOLECULAS RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES GR2110 y FMC8.

Se estudió mediante la técnica de capping ya descrita en la pag.119 de este trabajo.

La molécula reconocida por el anticuerpo monoclonal FMC8 se redistribuye conjuntamente con el antígeno reconocido por el GR2110.

En la Figura 4 se muestra la formación de capping con el GR2110. La incubación posterior de las células con el anticuerpo monoclonal GRBI (control) que reconoce moléculas Ia/DR hace que, tras la adición de suero fluoresceinado, aparezca todo el contorno de la célula fluorescente (Fig. 5) ya que las moléculas Ia/DR y las reconocidas por el GR2110 no se redistribuyen conjuntamente. Sin embargo si, tras la formación de capping con el GR2110, las células se incuban con el anticuerpo monoclonal FMC8, persiste la imagen de capping (Fig. 6) no tiñéndose el resto de la célula indicando que las moléculas reconocidas por el GR2110 y FMC8 se redistribuyen juntas.

Figura 4



Figura 5

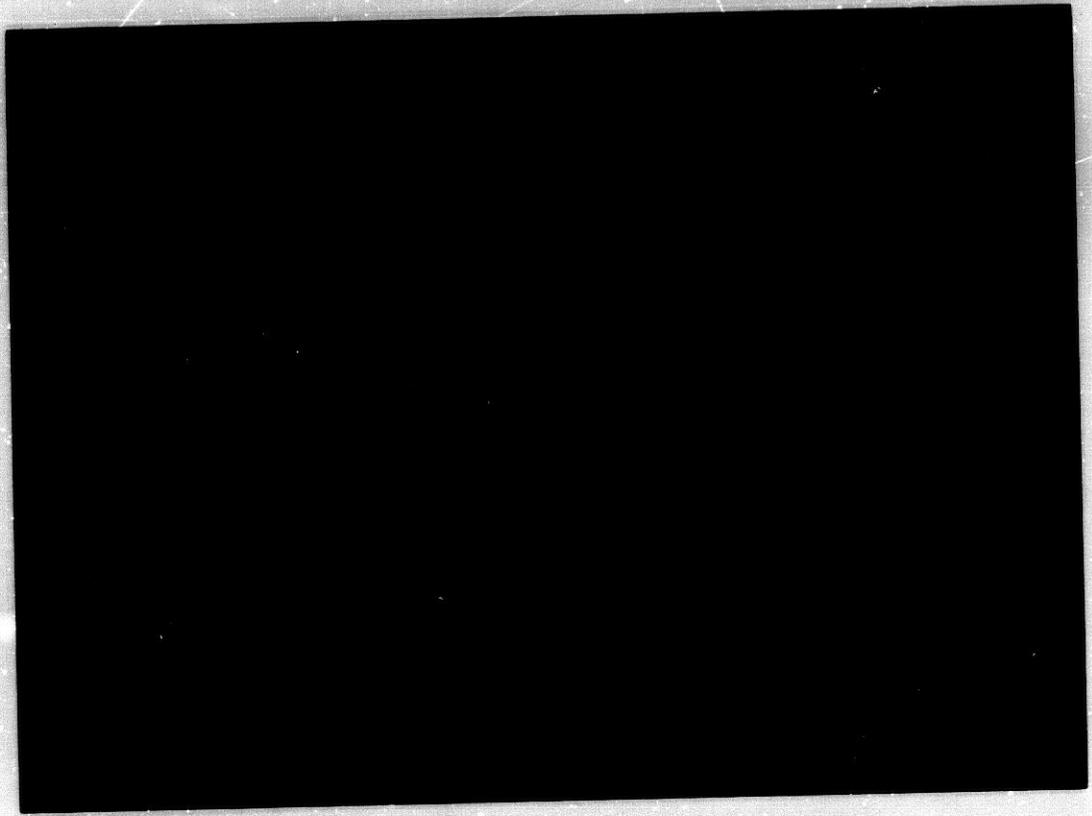


Figura 6



V.- DISCUSSION

Los anticuerpos monoclonales reconocen determinantes o epítopos únicos de una macromolécula antigénica. Su utilización ha venido a solucionar gran parte de los problemas asociados a los heteroantisueros clásicos y ha permitido la identificación de determinantes antigénicos menores, sin embargo, para la correcta valoración de la reactividad de los anticuerpos monoclonales hay que considerar una serie de circunstancias que pueden influenciarla:

1^o.- La existencia de reacciones cruzadas por identidad de su epitopo; esto ocurre con mayor frecuencia de la esperada, dando lugar a interpretaciones erróneas. La identidad de un epitopo explica la reacción cruzada de anticuerpos monoclonales anti $\bar{\gamma}$ con células de Purkinje de varias especies (Garson et al 1983).

2^o.- El polimorfismo genético puede explicar algunas reacciones negativas como la obtenida con el anticuerpo monoclonal OKT4 en algunas células T helper (Bach y Bach 1981).

3^o.- La expresión críptica o la pérdida de un epitopo debe también considerarse en las reacciones negativas especialmente con células malignas.

En el presente trabajo se ha obtenido un anticuerpo monoclonal, GR2110, inmunizando con una leucemia linfoblástica humana

de fenotipo común. El GR2110 como se desprende de los estudios de inmunoprecipitación, reconoce un determinante antigénico presente en una molécula de 24.000 daltons de peso molecular.

El estudio de la reactividad del GR2110 con un panel de células normales (Tabla 2) muestra que el antígeno GR2110 está presente fundamentalmente en plaquetas, y ausente en los linfocitos T y monocitos.

De las diez muestras de linfocitos B estudiadas el anticuerpo monoclonal GR2110 sólo reaccionó con dos (11 y 14% de células positivas respectivamente); sólo un escaso porcentaje de células de amígdala, bazo y médula ósea es reactiva con el GR2110.

La positividad para el GR2110 en granulocitos es muy variable en las seis muestras analizadas. El porcentaje de células GR2110 + varía desde 4 a 22%.

El GR2110 no reaccionó con linfocitos transformados con lectinas (Tabla 3).

De las líneas celulares estudiadas (Tabla 12) sólo las líneas KM3 (Pre B) y L68 (linfoblástica CALLA +) reaccionan con el GR2110, con un 26 y 85% respectivamente de células GR2110 positivas.

La distribución de la molécula GR2110 en la leucemia humana se ha estudiado sobre un panel de 77 células. Las muestras se consideraron positivas cuando un porcentaje > 10% de las células eran fluorescentes.

De las 22 muestras de LLC-B analizadas ninguna fue positiva (Tabla 4), como tampoco lo fueron el resto (siete casos) de Síndromes linfoproliferativos crónicos estudiados (Tabla 5).

De los 32 casos de LAL, en los que se incluyen dos crisis linfoblásticas de LMC, 17 (53%) fueron positivas para el GR2110. Si se estudian por separado cada uno de los subgrupos inmunológicos de la LAL el mayor porcentaje de positividad para el GR2110 corresponde a la LAL común en la que 13 de las 19 muestras analizadas (68%) eran reactivas con el GR2110 (Tabla 6), dos de los cinco casos de LAL nula (40%) fueron positivas (Tabla 7). En la LAL-B (Tabla 8) uno de los dos casos reaccionaba con el GR2110. Uno de dos casos de crisis linfoblástica de la LMC (CALLA +) fue positivo para el GR2110 (Tabla 10) sin embargo ninguna de las cuatro muestras de LAL T fue reactiva para el GR2110 (Tabla 9).

Si evaluamos la relación en la LAL entre la expresión de la molécula GR2110 y otros marcadores asociados a leucemia (p100 (CALLA) y IA/OR), encontramos que de los 32 casos investigados -

14 (44%) expresaban tanto el antígeno GR2110 como el CALLA; 5 casos (16%) no expresaban ninguno de los dos y existía discordancia en la expresión de ambos antígenos en 13 casos, de los cuales diez expresaban la molécula p100 pero no la GR2110 y tres expresaban la molécula GR2110 pero no la p100. (Tabla 12).

También comparamos la relación entre moléculas Ia/DR y GR2110: En 15 casos (47%) se expresaban los dos antígenos, mientras que en cinco casos (16%) ambos estaban ausentes. Encontramos discordancia en la expresión de sus dos moléculas en 12 casos de los cuales dos eran GR2110+, Ia/DR - y diez eran GR2110-, Ia/DR+. (Tabla 13).

Del total de 16 leucemias agudas no linfoblásticas solo una LAM fue positiva con un porcentaje de 36% de células fluorescentes (Tabla 14).

Diferentes laboratorios han obtenido anticuerpos monoclonales (Tabla 19) que como el GR2110 reaccionan con un antígeno de membrana de peso molecular entre 24-26KD. Este antígeno denominado p24 se expresa fuertemente en LAL no T y en plaquetas. En nuestro trabajo comparamos el patrón de reactividad del GR2110 y del anticuerpo monoclonal FM08 que también reconoce una molécula p24, enfrentándolos a un panel de líneas celulares y células de

la LAL.

Los dos anticuerpos monoclonales reaccionan con las líneas KM3(preB) y L69 (linfoblástica CALLA+) con porcentajes de células positivas similares (Tabla 16) sin embargo, solo el FMC8 reacciona con un pequeño porcentaje (10%) de células de la línea preB - REH, que es negativa para el GR2110.

De las 14 células de LAL (Tabla 17) enfrentadas a estos dos anticuerpos monoclonales, 5 (33%) son GR2110+ FMC8+, cuatro (27%) son GR2110- FMC8-, observándose discrepancia en la expresión de estos dos antígenos en los cinco casos restantes de los que uno es GR2110+ FMC8- y cuatro son GR2110- FMC8+. Esta discrepancia en la reactividad con los anticuerpos monoclonales GR2110 y FMC8 es especialmente marcado en el caso 915 (LAL común) y en los casos 867 y 872 (LAL nula).

A la vista de estos hallazgos decidimos investigar si la adición de una dosis saturante de GR2110 bloqueaba los lugares de unión del FMC8. El estudio se realizó sobre una LAL GR2110+ FMC8+ (L21) utilizando la técnica de capping ya descrita en el apartado de material y métodos, demostrándose (Fig 6), que las moléculas reconocidas por estos dos anticuerpos monoclonales se redistribuían conjuntamente. Cabe pensar que cada uno de estos anticuerpos -

reconoce un determinante antigénico diferente dentro de una misma molécula (p24), expresada en la superficie de la célula leucémica L21. La existencia de leucemias reactivas con uno solo de estos dos anticuerpos podría explicarse por modificación en la molécula consistente en cambio o pérdida de un epitopo que con relativa frecuencia se observa en los procesos malignos.

Sin embargo mucho más interesante es comparar el patrón de reacción con células normales del GR2110 con el resto de anticuerpos monoclonales anti p24 descritos en la actualidad (Tabla 19). Para ser considerados como anti p24 estos anticuerpos deben cumplir dos requisitos:

1º.- Reaccionar con una molécula de peso molecular entre 24-26KD (esta diferencia en el peso molecular no es significativa cuando los análisis se realizan en diferentes laboratorios).

2º.- Reaccionar con plaquetas y células de la LAL no T.

Esta combinación de reactividad con dos clases de células no relacionadas y un rango de peso molecular restringido permite asegurar que los anticuerpos incluidos reconocen antígenos relacionados. El GR2110 puede incluirse dentro de este grupo de anticuerpos anti p24.

Tabla 19

Anticuerpo monoclonal	Peso Molecular (daltons)	Subclase IgG	Referencias
BA2	24.000	3	Kersey et al 1981
J2	26.000		Hercend et al 1981
FMC8	24.000	2a	Brooks et al 1982
DuALL 1	24.000	2a	Jones et al 1982
SJ-9A4	24.000	1	Melvin et al 1984 Komada et al 1983
CALL 1	26.000		Deng et al 1983
3A9, 3A8, 2E7	24.000		Clark y Yokochi 1984
ALB6	24.000		Boucheix et al 1983

ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE RECONOCEN MOLECULAR DE PESO

MOLECULAR ENTRE 24 y 26 KD Y QUE REACCIONAN CON PLAQUETAS

Y LAL NO T

Estos anticuerpos muestran una reactividad variable con otras células incluyendo linfocitos B, monocitos y granulocitos. Estas diferencias en el espectro de reacción de los anticuerpos monoclonales anti p24 podrían indicar que el antígeno existe como una familia de proteínas expresada de forma diferente sobre distintas células. Otra explicación, aunque menos interesante, es que la variación en la reactividad reflejaría diferencias en la afinidad del anticuerpo, en el tipo de inmunoglobulina o en la metodología empleada en cada laboratorio.

Es importante decidir cual de estas explicaciones es correcta. Si existe una familia de moléculas p24 su valor como marcadores de diferenciación debe ser considerable, la demostración de que las diferencias son debidas a la distinta metodología empleada, debe ayudar para conseguir técnicas standard.

Basándonos en los datos publicados, existen diferencias aparentes en la reactividad con linfocitos, monocitos y polinucleares de los anticuerpos monoclonales BA2 (Kersey et al 1981) FMC8 (Brooks et al 1981) DUALL1 (Jones et al 1982) SJ-9A4 (Komada et al 1983, Melvin et al 1984) y CALL1 (Deng et al 1983), así mientras que los anticuerpos SJ-9A4 y CALL1 no reaccionan con linfocitos

tos, FMC8 y DUALL1 reaccionan aunque con distinto porcentaje de reactividad. FMC8 reacciona con monocitos y polinucleares y el resto no. También existen diferencias en la reactividad con linfocitos T transformados con lectinas; mientras que FMC8 reaccionaba (Brooks et al 1982) el anticuerpo DU-ALL1 (Jones et al 1982) como el GR2110 no reaccionaba.

Cuatro de estos anticuerpos BA2, FMC8, DU-ALL1 y SJ-9A4, fueron incluidos en el protocolo de células E del Workshop Internacional sobre antígenos de diferenciación leucocitaria celebrado en París (Bernard et al 1984). El análisis estadístico de los datos enviados al Workshop por diferentes laboratorios confirma la similaridad general de estos antígenos pero al mismo tiempo demuestra la existencia de algunas diferencias en su reactividad. Clark y Yokochi (1984) en su contribución al Workshop encuentran que el 20-36% de polimorfonucleares y el 30-43% de las células no T reaccionan con los anticuerpos anti p24 y en base a sus estudios de bloqueo agrupan los anticuerpos monoclonales anti p24 en tres grupos sugiriendo que cada uno de los grupos podían reconocer un epitopo diferente, aunque los mismos autores señalan que las diferencias podían también ser debidas a variaciones en la afinidad de los anticuerpos. Sin embargo Le Bien et al (1984) encuentran -

que los cuatro anticuerpos tienen un patrón de reactividad similar con parénquima renal.

Pilkimpton et al (1984) basándose en estudios inmunoquímicos agrupan a los cuatro anticuerpos como anti p24, aunque el anticuerpo monoclonal DU-ALL 1 también precipita una molécula de 150.000 daltons de peso molecular.

Zola et al (1984) realizaron un estudio comparativo de la reactividad de cinco anticuerpos monoclonales anti p24, cuatro de los cuales habían sido incluidos en el protocolo de células B del Workshop Internacional sobre Antígenos de Diferenciación Leucocitaria de París. De este estudio se desprende que, en idénticas condiciones de trabajo no existen diferencias significativas en el patrón de reactividad de los anticuerpos anti p24. Estos mismos autores realizan mezclas de anticuerpos anti p24 para comprobar fluorescencia en la línea NALM/6 (p24+), lo que sugeriría la existencia de diferentes epitopos no encontrando ningún efecto sumativo de la mezcla; esto indica que sus lugares de reacción eran lo suficientemente próximos como para producir inhibición estérica mutua.

Es muy probable que gran parte de las diferencias encontradas en la reactividad de los anticuerpos monoclonales anti p24 -

sea debida a las variaciones en la metodología empleada por cada laboratorio, sin embargo en lo que respecta al patrón de reacción de los anticuerpos monoclonales FMC8 y GR2110 nuestros resultados parecen estar en desacuerdo con los de Zola et al (1984), si bien el GR2110 no fue probado por este grupo. Cuando se estudiaron en paralelo, y por tanto en idénticas condiciones de trabajo, FMC8 y GR2110, se observó una clara discrepancia en su reactividad en varios casos de LA1, lo que sugiere que estos dos anticuerpos anti p24 reconocen diferentes determinantes antigénicos. Al mismo tiempo los estudios de redistribución molecular mediante la técnica de capping sugieren que las moléculas reconocidas por los anticuerpos monoclonales FMC8 y GR2110 son idénticas. Estos resultados podrían explicarse por un modelo consistente en una molécula p24 con dos epitopos A y B. Algunos anticuerpos monoclonales anti p24 reconocerían el epitopo A y otros el B. Ahora bien si por ejemplo en una célula leucémica el epitopo A se conserva pero el B se pierde o se modifica bajo diversas circunstancias (cambios en la transcripción y traslación genética, diferencias en la glicosilación), los anticuerpos anti A reaccionarán con la célula mientras que los B no.

El papel de la molécula p24 en la diferenciación celular

es desconocido. Royston et al (1984) sugieren que la molécula p24 junto con los antígenos Ia/DR aparecen antes que otros marcadores, persistiendo en los estadios más precoces de la diferenciación linfóide y mielóide, sin embargo el hecho de que esté presente en un escaso porcentaje de linfocitos normales, células de la LLC y de la leucemia prolinfocítica, así como en linfocitos T activados y plaquetas hace difícil encuadrarlo en un esquema de maduración celular simple.

La molécula p24 es una proteína de membrana de cadena única. Los trabajos referentes a la existencia o no de glicosilación y a la naturaleza de su asociación a la membrana celular son por el momento contradictorios (Zola et al 1984).

Por último el único dato referente a la función de la molécula p24 es el aportado por Boucheix et al (1983) en sus experiencias sobre el efecto de anti p24 sobre la agregación plaquetaria: los anticuerpos anti p24 se comportan de forma similar a los agentes bloqueadores del Ca^{2+} , sugiriendo que la molécula p24 está en relación con el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana celular. Sin embargo si esto es así cabría esperar una distribución celular más amplia de la molécula p24.

VI.- CONCLUSIONES

1º.- El anticuerpo monoclonal GR2110, obtenido por inmunización con una leucemia linfoblástica común, reconoce una molécula de 24 KD de peso molecular.

2º.- El antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal GR2110, se distribuye sobre células normales, fundamentalmente plaquetas y granulocitos.

3º.- La molécula reconocida por el GR2110 es un antígeno asociado a leucemia linfoblástica humana.

4º.- El anticuerpo monoclonal GR2110 puede incluirse en el grupo de anticuerpos monoclonales anti p24 definido por las siguientes características:

- precipitación de una molécula de peso molecular entre 24-26 KD, de función biológica desconocida
- reactividad con plaquetas
- reactividad con células de la leucemia aguda linfoblástica no T.

5º.- Los anticuerpos monoclonales GR2110 y FMCS reconocen distintos determinantes antigénicos de la molécula p24.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABRAMSON G.S., KERSEY J.H., LeBIEN T.W. (1981). A monoclonal antibody (BA-1) reactive with cells of human B lymphocyte lineage. *J. Immunol* 126:83.
- 2.- AIUTI F., WIGZELL H. (1973) Function and distribution of human lymphocytes. I. Production of anti-T lymphocyte specific sera as estimated by cytotoxicity and elimination of function of lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 13: 171.
- 3.- ANDERSON L.G., KARHI K.K., GAHMBERG C.G., BRODT H (1980). Molecular identification of T cell-specific antigens on human T lymphocytes and thymocytes. *Eur J Immunol* 10: 359.
- 4.- BACCARINI M., TURA S., (1979) Differentiation of myeloid leukemia cells: new possibilities for therapy. *Br J Haematol* 42: 485.
- 5.- BACH M.A., BACH J.F. (1981) The use of monoclonal anti-T cell antibodies to study T cell imbalances in human diseases. *Clin. Exp Immunol* 45: 449.
- 6.- BACH J.F., DORMONT J., DARDENNE M., BALNER H (1969) In vitro rosette inhibition by antihuman antilymphocyte serum. Correlation with skin graft prolongation in subhuman primates. *Transplantation* 8: 265.

- 7.- BALCH C.M., DOUGHERTY P.A., VOGLER L.B., ADES E.W., FERRONE S. (1978). A new B-cell differentiation antigen (BDA) on normal and leukemic human B lymphocytes that is distinct from known DR (Ia-like) antigens. J Immunol 121: 2322.
- 8.- BELZER M., FITCHEN J.H., FERRONE S., FOON K.A., BILLING R.J., GOLDEN D. (1981). Expression of Ia-like antigens on human erythroid progenitor cells as determined by monoclonal antibodies and heteroantiserum to Ia-like antigens. Clin Immunol - Immunopathol 20: 111-115.
- 9.- BENACERRAF B., Mc DEVITT H.O. (1972) Histocompatibility linked immune response genes. Science 175: 273.
- 10.- BENNETT J.M., CATOVSKY D., DANIEL M.T., FLANDRIN G., GALTON D.A.G., GRALNICK H.R., SULTAN C. (1976) Proposals for the classification of acute leukemias. Br J Haematol 33: 451.
- 11.- BERNARD A., BOUNSELL L., REINHERZ E.L., NADLER L.M., RITZ I., COPPIN H., RICHARD Y., VALENSI F., DAUSSET J., FLANDRIN G., LEMERLE J., SCHLOSSMAN S.F. (1981) Cell surface characterization of malignant T cells from lymphoblastic lymphomas using monoclonal antibodies: evidence for phenotypic differences between malignant T cells from patients with acute lymphoblas

- tic leukemia and lymphoblastic lymphoma. *Blood* 57: 1105.
- 12.- BERNARD A., BOUNSELL L., DAUSSET J., MILSTEIN C., SCHLOSSMAN S.F. (1984) *Leucocyte typing*. Springer-Verlag. Berlin. p. 61.
- 13.- BERNTROP E., TURESSON I., ZETTERVALL O. (1979) Heterologous B-cell antisera may detect non-Ig non-HLA-DR antigens. *Scand J Immunol* 10: 17.
- 14.- BERTOGLIO J., THIERRY C., FLORES G., BOUCHARREL C., DORE J.F. (1977) Mouse red cell rosette formation by subpopulations of human lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 27: 172.
- 15.- BESLEY G.T.N., BROADHEAD D.M., BAIN A.D., DEWAR A.E., EDEN O. B. (1978) Enzyme markers in acute lymphoblastic leukemia. - *Lancet* 2: 1311.
- 16.- BHAN A.K., REINHERT E.L., POPPEMA S., CLUSKEY R.T., SCHLOSSMAN S.F., (1980) Location of T cell and major histocompatibility complex antigens in the human thymus. *J Exp Med* 152:771
- 17.- BIANCO C., PATRICK R., NUSSENZWEIG V (1970) A population of lymphocytes bearing a membrane receptor of antigen-antibody complement complexes. I. Separation and characterization. *J. Exp Med* 132: 702.

- 18.- Le BIEN T.W., BRADLEY J.G., BONE D.R., PLATT J.L., MICHAEL A.F., KERSEY J.H. (1984) B cell and kidneys: A "B+ CALLA" - Workshop Analysis. En: BERNARD A, BOUNSELL L., DAUNSSSET J. MILSTEIN C., SCHLOSSMAN S... (ed.) Leucocyte typing. Springer. Verlag Berlin, p. 346.
- 19.- BILLING R., RAFIZADEH B., DREW I., HARTMANN G., GALE R., TERASAKI P (1976). Human B-lymphocyte antigens expressed by - lymphocytic and myelocytic leukemia cells. I. Detection by rabbit antisera. J Exp Med 144: 167.
- 20.- BILLING R.J., SAFANI M., PETERSON P. (1976) Isolation and - characterization of human B cell alloantigens. J. Immunol - 117:1589.
- 21.- BILLING R., MINOWADA J., CLINE M., CLARK B., LEE K. (1978) Acute lymphocytic leukemia-associated cell membrane antigens J Natl Cancer Inst 61: 423-429.
- 22.- BLACKSTOCK A.M., GARSON O.M., (1974). Direct evidence for - involvement of erythroid cells in acute myeloblastic leukemia. Lancet 11: 1178. -
- 23.- BLACKSTOCK R., HUMPHREY G.B. (1982) Cell surface markers in

- the characterization of leukemias. *Methods Cancer Res.* 19:3.
- 24.- BLATT J., REAMAN G., POPLACK D.G. (1980) Biochemical markers in lymphoid malignancy. *N. Engl Med* 303: 918.
- 25.- BLOOMFIELD C.D., PETERSON B.A., SMITH K.A., GAJL-PECZALSKA - K.J., MUNCK A (1980) In vitro glucocorticoid studies for predicting response to glucocorticoid therapy in adults with malignant lymphoma. *Lancet* 1:952.
- 26.- BOKISCH V.A., SOBEL A.T. (1974) Receptor for the fourth component of complement on human B lymphocytes and cultured human lymphoblastoid cells. *J Exp Med* 140: 1336.
- 27.- BOLLUM F.J. (1979) Terminal deoxynucleotidyl transferase as a hematopoietic cell marker. *Blood* 54: 1203.
- 28.- BORELLA L., SEN L., CASPER J.T. (1977) Acute lymphoblastic leukemias (ALL) Antigens detected with antisera to E rosette-forming and non-E rosette-forming ALL blasts. *J Immunol* 188: 309-315.
- 29.- BORELLA L., CASPER J.R., LAUER S.J. (1979). Shifts in expression of cell membrane phenocytes in childhood lymphoid malignancy.

nancies at relapse. Blood 54: 56.

- 30.- BERGERS M., VERHAEGEN H., De BRABANDER M et al (1978) Purine nucleoside phosphorylase in chronic lymphocytic leukemia - (CLL). Blood 52:886-894.
- 31.- BOUCHEIX C., SORIA C., MIRSHAHI M., SORIA J., PERROT J.Y., - FOURNIER N., BILLARD M., ROSENFELD C (1983). Characteristics of platelet aggregation induced by the monoclonal antibody - ALB6 (acute lymphoblastic leukemia antigen p24) FEBS Letters 161:289.
- 32.- BOUMSELL L., BERNARD A., REINHERZ E.L., NADLER L.M., RITZ J., COPPIN H., RICHARD Y., DUBERTREY L., VALENSI F., DEGOS L., - LEMERLE J., FLANDRIN G., DAUSSET J., SCHLOSSMAN S.F. (1981) Surface antigens on malignant Sézary and T-CLL cells correspond to those of mature T cells. Blood 57: 526.
- 33.- BOYDEN S.V., SORKIN E (1964) The absorption of antibody and antigen by spleen cells in vitro. Some further experiments. Immunology 4:244.
- 34.- BOYUM A (1966) Ficoll hypaque method for separating mononuclear cells and granulocytes from human blood scand. J Clin

Lab Invest Suppl. 77.

- 35.-- BRAM P., GORDON J., WILLETTS W.A. (1970) Rosette formation by peripheral lymphocytes. Clin Exp Immunol 6:601.
- 36.-- BRANDSTOCK K.F., JANOSSY G., BOLLUM F.J., MILSTEIN C (1980) A nomalous gene expression in human thymic acute lymphoblastic leukemia (Thy-LL). Nature 294:455.
- 37.-- BRADSTOCK K.F., HOFFBRAND A.V., GANESHAGURU K., LLEWELEIN P., PATTERSON K., WONKE B., PRENTICE A.G., BENETT M., PIZZOLO G., BOLLUM F.J., JANOSSY G (1981) Terminal deoxynucleotidyl trans ferase expression in acute non-lymphoid leukemia: an analysis by immunofluorescence. Br J Haematol 47:133.
- 38.-- BRAUN M.P., MARTIN P.J., LEDBETTER J.A., HANSEN J.H. (1983) - Granulocytes and cultured human fibroblasts express common a- cute lymphoblastic leukemia-associated antigen. Blood 61:718.
- 39.-- BREARD J., RENHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G., SCHLOSSMAN S.F. (1980) A monoclonal antibody reactive with human periphe ral blood monocytes. J Immunol 124:1943.
- 40.-- BREARLY R.L., JOHNSON S.A.N., LISTER T.A. (1975) Acute lympho blastic leukemia in adults: clinico-pathological correlations

with the French-American-British (FAB) co-operative group classification. Eur J Cancer 15:905.

41.- BREITMAN T.R., COLLINS S.T., KEENE B.R., (1981) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells in primary culture in response to retinoic acid. Blood 57:1000.

42.- BRETON-GORIUS J., REYES F., DUHAMEL G., NAJMAN A., GORIN N.C. (1978) Megakaryoblastic acute leukemia= identification by the ultrastructural demonstration of platelet peroxidase. Blood - 51:45.

43.- BRODER S., EDELSON R.L., LUTZNER M.A., NELSON D.L., McDERMOTT R.P., DURM M.E., GOLDMAN C.K., MEADE B.D., WALDMANN T.A. - (1976) The Sézary syndrome: a malignant proliferation of helper T cells. J Clin Invest 58: 1297.

44.- BROOKS D.A., BECKMAN I.G., BRADLEY J. McNAMARA P.J., THOMAS M. E., ZOLA H. (1981a) Human lymphocyte markers defined by antibodies derived from somatic cells hybrids. I. Hybridoma secreting antibody against a marker specific from human S lymphocytes. Clin Exp Immunol 39:477.

45.- BROOKS D.A., BECKMAN I.G., BRADLEY J., McNAMARA P.J., THOMAS

- M.E., ZOLA H. (1981b) Human lymphocyte markers defined by antibody derived from somatic cell hybrids. IV. A monoclonal antibody reacting specifically with a subpopulation of human B lymphocytes. *J Immunol* 126:1373.
- 46.- BROOKS D.A., BRADLEY J., ZOLA H. (1982). A differentiation antigen expressed selectively by a proportion of human blood cells: detection with a monoclonal antibody. *Pathology* 14:5.
- 47.- BROUET J.C., VALENSI M.T., DANIEL G., FLANDRIN J.L. (1976) - Immunologic classification of acute lymphoblastic leukemias: Evaluation of its clinical significance in a hundred patients. *Br J Haematol* 33:319.
- 48.- BROUET J.C., SEGHMAN M. (1978) The immunological classification of acute lymphoblastic leukemias. *Cancer* 42:817.
- 49.- BROUET J.C., PREUD'HOMÉ J.L., PENIT C., VALENGI F., ROUGET P., BELIGMAN M. (1979) Acute lymphoblastic leukemia with pre-B cells characteristics. *Blood* 54:269.
- 50.- BROWN G., HOGG N., GREAVES M.F. (1975) A candidate human leukemia antigen. *Nature* 258:454.

- 51.- CANALE D., COLLINS R.D. (1974) Use of bone marrow particle - sections in the diagnosis of multiple myeloma. Am J Clin Pathol 61:382.
- 52.- CANELLOS G.P., DeVITA W.T., WHANG-PENG J., CARBONE P.D., - (1971) Hematologic and cytogenetic remission of blastic transformation in chronic granulocytic leukemia. Blood 38:671.
- 53.- CATOVSKY D., GREAVES M.F., PAIN C., CHERCHI K., JANOSSY G. - KAY H.E. (1978) Acid-phosphatase reaction in acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 1:749.
- 54.- CATOVSKY D., CHERCHI M., BROOKS D., BRADLEY J., ZOLA H. (1981) Heterogeneity of B-cell leukemias demonstrated by the monoclonal antibody FMC7. Blood. 58:406.
- 55.- CATOVSKY D., MELO J.V., MATUTES E., SAN MIGUEL J.F. (1983) - Cell markers in lymphoproliferative disorders. VII Meeting - of the international society of Haematology. European and African Division, Barcelona 1983.
- 56.- CIVIN C.I., MIRRO J., BANQUERIGO M.L. (1981) My-1, a new myeloid-specific antigen identified by a mouse monoclonal antibody. Blood. 57:842.

- 57.- CLARK E.A., YOKOCHI T (1984) Human B-cell and B cell blast-associated surface molecule defined with monoclonal antibodies. En: BERNARD A., BOUMSELL L., DAUNSSSET J., MILSTEIN C., SCHLOSSMAN S.F. (ed) Leucocyte typing. Springer-Verlag Berlin, p 339.
- 58.- CLINE M.S., BILLING R (1977) Antigens expressed by lymphocytes and myeloid stem cells. J Exp Med 146:1143.
- 59.- COLEMAN M.S., GREENWOOD M.F., HUTTON J.J. et al. (1978) Adenosine deaminase, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and cell surface markers in childhood acute leukemia. Blood 52:1125.
- 60.- COOMBS R.R.S., GURNER B.W., WILSON A.B., HOLM G., LINDGREN B (1970) Rosette formation between human lymphocytes and sheep red cells not involving immunoglobulin receptors. Int Arch Allergy Appl Immunol 39:658.
- 61.- CROWLE A.J. (1973) Immunodiffusion. 2nd ed. Academic Press. New York.
- 62.- CHIAO J.W., GOOD R.A. (1976) Studies of the presence of membrane receptors for complement IgG and the sheep erythrocy-

- te resetting capacity on the same human lymphocytes Eur J -
Immunol 6:157.
- 63.-- DACHS D., CONE J.L. (1973) A mouse "B" cell allo-antigen de-
termined by gene(s) linked to the major histocompatibility -
complex. J Exp Med 138:1289.
- 64.-- DENG C.T., TERSAKI P.I., IWAKI Y., HOFMAN F.M., KOEFFLER P.,
CAHAN L., AWAR N.E., BILLING R. (1983) A monoclonal antibody
cross-reactive with human platelets megakaryocytes and common
acute lymphocytic leukemia cells. Blood 61:759.
- 65.-- DICKLER H.B., KUNKEL H.G. (1972) Interaction of aggregated--
globulin with B lymphocyte. J Exp Med 136:191.
- 66.-- DIGHIRO G., BODEGA E., MAYZNER R., BINET J.L. (1980) Indivi-
dual cell-by-cell quantitation of lymphocyte surface membra-
ne Ig in normal and CLL lymphocytes and du. g ontogeny of -
mouse B lymphocytes by immunoperoxidase assay. Blood 55:93.
- 67.-- DOBOZY A., HUSZ S., HUNYADI J., SIMON N. (1976) Formation of
mouse erythrocyte rosettes by human lymphocytes. A B-cell -
marker. Clin Exp Immunol 23:382.

- 68.- ELLIS R.B., RAPSON N.T., PATRICK A.D., GREAVES M.F. (1978) -
Expression of hexoaminidase isoenzymes in childhood leukemia.
N. Engl J Med 298:476.
- 69.- ENGLISH D., ANDERSEN B.R. (1974) Single-step separation of -
red blood cells granulocytes and mononuclear leucocytes on -
discontinuous density gradients of Ficoll-Hypagne. J Immunol
Methods 5:249.
- 70.- ERSSEN S.A., WEDNER H.J., PARKER C.W. (1972) Isolation of pu-
re human peripheral blood T lymphocytes using nylon wool co-
lumns. Immunol Commun. 1:571.
- 71.- EVANS R.I., FALDETTA T.J., HUMPHREYS R.E., PRATT D.M., YUNIS
E.J., SCHLOSSMAN S.F. (1978) Peripheral human T cells sensi-
tized in mixed leukocyte culture synthesize and express Ia--
like antigens. J Exp Med 148:1440-1445.
- 72.- EVANS R.L., LAZARUS H., PENTA A.C., SCHLOSSMAN S.F. (1978) -
Two functionally distinct subpopulations of human T cells -
that collaborate in the generation of cytotoxic cells respon-
sible for cell-mediated lympholysis. J Immunol 120:1423.
- 73.- FIALKOW P.J., JACOBSON R.J., PAPAYANNOPOULOU T. (1977) Chro-

nic myelocytic leukemia: Clonal origin in a stem common to -
the granulocyte, erythrocyte platelet and monocyte/macrophage. AM J Med 63:125.

74.- FIALKOW P.J., DENMAN A.M., JACOBSON R.J., LOWENTHAL M.N. -
(1978) Chronic myelocytic leukemia. Origin of some lymphocytes from leukemic stem cells. J Clin Invest 62:815.

75.- FIALKOW P.J., SINGER J.W., ADAMSON J.W., BERKOW R.L., FRIEDMAN J.M., JACOBSON R.J., MOOHR J.W., (1979). Acute non-lymphocytic leukemia. Expression in cells restricted to granulocytic and monocytic differentiation. N Engl J Med 301:1.

76.- FIALKOW P.J., SINGER J.W., ADAMSON J.W., VAIDYA K., DOW L.W., OCHS J., MOOHT J.W. (1981). Acute nonlymphocytic leukemia: -
Heterogeneity of stem cell origin. Blood 57:1068.

77.- FOON K.A., SCHROFF R.W., GALE R.P. (1982) Surface markers on leukemia and lymphoma cells: recent advances. Blood 60:1.

78.- FORBES I.J., ZALEWSKI P.D. (1976) A subpopulation of human B lymphocytes that rosette with mouse erythrocytes. Clin Exp Immunol 26:99.

- 79.- FROLAND S.S. (1972) Binding of sheep erythrocytes to human - lymphocytes. A probable marker of T-lymphocytes. Scand J Immunol 1:269.
- 80.- FROLAND S.S., NATVIG J.B. (1973). Identification of three different human lymphocyte populations by surface markers. - Transplant Rev 16:114.
- 81.- FU S.M., WINCHESTER R.J., FEIZI T., WALZER P.D., KUNKEL H.G. (1974) Idiotypic specificity of surface immunoglobulin and - the maturation of leukaemic bone marrow derived lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 71:4487.
- 82.- FU S.M., CHIORAZZI N., WANG C.Y., MONTAZERI G., KUNKEL H.C., KO H.S., GOTTLIEB A.B. (1978) Ia-bearing T lymphocytes in - man. Their identification and role in the generation of allogenic helper activity. J Exp Med 148:1423-1428.
- 83.- GALILI U., POLLIACK A., OHON E., GAMBEL H., IZAK G. (1982) - Human prothymocytes: membrane properties, differentiation patterns, glucocorticoid sensitivity and ultrastructural feature. J Exp Med 148:1423.
- 84.- GARSON J.A., BEVERLY P.C.L., COAKHAM H.B., HAIPER E.T. (1982)

- Monoclonal antibodies against human T-lymphocytes label Purkinje neurones of many species . Nature 298:375.
- 85.- GEISEN H.P., DORKEN D., LENHARD V., ROELCKEW D. (1977) The a autoantigen determinants I/i, Pr 1-3 of normal and leukemic - leukocytes, Haematol Bluttrans 20:347.
- 86.- GELFAND M.C., ELFENBEIN G.J., FRANK M.M., PAUL W.E. (1974) - Ontogeny of B lymphocytes. II. Relative rates of appearance of lymphocytes bearing surface immunoglobulin and complement receptors. J Exp Med 139:1125.
- 87.- GHOSE T., BLAIR A.H. (1978). Antibody-linked cytotoxic agents in the treatment of cancer: current status and future prospects. J Natl Cancer Inst 61:657.
- 88.- GOODFELLOW P., BARNSTABLE C., JONES E., BODMER F.W., CRUMPTON M.J., SNARY D. (1976) Production of specific antisera to human δ -lymphocytes. Tissue Antigens 2:105.
- 89.- GOTZE D., THIEL E., ROOT H., THIERFELDER S. (1977) Heterologous group specific antiserum against Ia^k determinants. Haematol Bluttransfus 20:341.

- 90.- GREAVES M.F. (1981a). Analysis of the clinical and biological significance of lymphoid phenotypes in acute leukemia. *Cancer Res* 41:4752.
- 91.- GREAVES M.F. (1981b) Monoclonal antibodies as probes for leukemic heterogeneity and hemopoietic differentiation. En: KNAPP W. (ed) *Leukemia markers*. Academic Press, New York, p 19.
- 92.- GREAVES M.F., OWEN J.T.T., RAFF M.C. (1973). T and B lymphocytes, origins properties and roles in immune responses. Ed American Elsevier New York.
- 93.- GREAVES M.F., BROWN G., RAPSON N., LISTER T.A. (1975) Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin Immunol Immunopathol* 4:67.
- 94.- GREAVES M.F., JANOSSY G. (1978) Patterns of gene expression - and the cellular origins of human leukaemias. *Biochim Biophys Acta* 516:193.
- 95.- GREAVES M., VERBI W., VOLGER L., COOPER M., ELLIS R., GANESHOGURU K., HOFFBRAND V., JANOSSY G., BOLLUM F.J. (1980). Antigenic and enzymatic phenotypes of the ore-B subclass of acute - lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 3:353.

- 96.- GREAVES M.F., DELIA D., ROBINSON J., SUTHERLAND R., NEWMAN R.
(1981) Exploitation of monoclonal antibodies: a "Who's Who"
of haemopoietic malignancy. *Blood Cells* 7:257.
- 97.- GREAVES M., DELIA D., SUTHERLAND R., RAO J., VERBI W., KEMSHEAD
J., HARI RI G., GOLDSTEIN G., KUNG P. (1981) Expression of -
the OKT monoclonal antibody defined antigenic determinants -
in malignancy. *Int J Immunopharmacol* 3:283.
- 98.- GREAVES M.F., RAO J., HARI RI G., VERBI W., CATOVSKY D., KUNG
P., GOLDSTEIN G. (1981) Phenotypic heterogeneity and cellu--
lar origins of T cell malignancies. *Leuk Res* 5:281.
- 99.- GRIFFIN J.D., RITZ J., NADLER L.M., SCHLOSSMAN S.F. (1981) -
Expression of myeloid differentiation antigens on normal and
malignant myeloid cells. *J Clin Invest* 68:932.
- 100.- GUPTA S., PAHWA R., O'REILLY R., GOOD R.A., SIEGAL F.P. (1976)
Ontogeny of lymphocyte subpopulations in human fetal liver.-
Proc. Natl Acad Sci USA 73:919.
- 101.- GUTENSOHN W., THIEL E. (1981) High levels of 5'nucleotidase
activity in blastic chronic myelogenous leukemia with common
ALL-antigen. *Leuk Res* 5:505.

- 102.- GUTENSOHN W., THIEL E., EMMERICH B. (1983) Evaluation of 5'-Nucleotidase as biochemical marker in leukemias and lymphomas. *Klin Wochenschr* 61:57.
- 103.- HAYNES B.F., METZGAR R.S., MINA J.D., BUN P.A. (1991) Phenotypic characterization of cutaneous T cell lymphoma. *New Engl J of Med.* 304:1319.
- 104.- HERCEND T., NADLER L.M., PESANDO J.M., REINHERZ E.L., SCHLOSSMAN S.F., RITZ J. (1991) Expression of a 26000 Dalton glycoprotein on activated human T cells. *Cellular Immunology* 64:192.
- 105.- HERZENBERG L.A., HERZENBERG L.A. (1978) Analysis and separation using the fluorescence activated cell sorter (FACS). In: Weir DM(ed) *Handbook of experimental immunology vol 2,1* Blackwell, Oxford.
- 106.- HILDEBRAND J., STRYCHMANS P.A., VANHOUSE J. (1972) Gangliosides in leukemic and non-leukemic human leukocytes. *Biochim - Biophys Acta* 230:272.
- 107.- HOELZER D., THIEL E., LOEWLER H., BODENSTERN H., BUCHNER T., MESSERER D. (1983) Multicentre pilot study for therapy of a-

- cute lymphoblastic and acute undifferentiated leukemia in adults. Haematol Bluttransfus 28:36.
- 108.- HOLM G., MELLSTEDT H., PETTERSON O., BIBERFELD P. (1977) Idiotypic immunoglobulin structure on blood lymphocytes in human plasma cell myeloma. Immunol Rev 34:139.
- 109.- HOUSSET M., DANIEL M.T. DEGOS L. (1982) Small doses of ARA-C in the treatment of acute myeloid leukaemia: differentiation of myeloid leukaemia cells? Br J Haematol 51:125.
- 110.- HUHN D., THIEL E., ROOT H. (1980) Classification of normal and malignant lymphatic cells using acid phosphatase and acid esterase. Klin Wochenschr 58:65.
- 111.- HUHN D., THIEL E., ROOT H., ANDREWA P. (1981) Cytochemistry and membrane markers in acute lymphatic leukaemia (ALL). - Scand J Haematol 26:311.
- 112.- HUTTON J.J., COLEMAN M.S., MOFFITT S., GREENWOOD M.F., HOLLAND P., LAMPKIN B., KISHER T., KRILL C., KASTELIC J.E., VALDEZ L., BOLLUM F.J. (1982) Prognostic significance of terminal transferase activity in childhood acute lymphoblastic leukemia: a prospective analysis in 164 patients. Blood 60:1267.

- 113.- JANOSSY G., ROBERTS M., GREAVES M.F. (1976) Target cell in -
chronic myeloid leukemia and its relationship to common ALL.
Lancet 2:1058.
- 114.- JANOSSY G., TIDMAN N., SELBY W.S., THOMAS J.A., GRANGER S., -
KUNG P.C., GOLDSTEIN G. (1980) Human T lymphocytes of inducer
and suppressor type occupy different microenvironments. Natu
re 288:81.
- 115.- JANOSSY G., PRENTICE H.G. (1982) T cell subpopulations, mono-
clonal antibodies and their therapeutic applications. Clin -
in Haematol 11:631.
- 116.- JENSEN M.K., KILLMANN S.A. (1971) Additional evidence for -
chromosome abnormalities in the erythroid precursors in acu-
te leukemia. Acta Med Scand 139:97.
- 117.- JONDAL M., HOLM G., WIGZELL H. (1972) Surface markers on hu-
man T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocy-
tes forming non-immune rosettes with SRBC. J Exp Med 136:207
- 118.- JONES N.H., BOROWITZ M.J., METZGAR R.S. (1982). Characteriza-
tion and distribution of a 24,000 molecular weight antigen -
defined by a monoclonal antibody (Au-ALL-1) elicited to co-
mmon acute lymphoblastic leukemia (cALL) cell. Leuk Res 5:449

- 119.- KANTER R.J., FREIBERGER I.A., RAI K.R., SAWITSKY A. (1979) -
Lymphocymphocyte populations with 5'-nucleotidase in chronic
lymphocytic leukemia. Clin Immunol Immunopathol 12:351.
- 120.- KERSEY J.H., LE BIEN T.W., ADRAMSON C.S., NEWMAN R., SUTHER-
LAND R., GREAVES M. (1981) p 24: A human leukemia-associated
and lymphochemopoietic progenitor cell surface structure i--
dentified with monoclonal antibody. J Exp Med 153:726.
- 121.- KESSLER J.F., MEYSKENS F.R., LEVINE N., LYNCH P.J., JONES S.
E. (1983) Treatment of cutaneous T-cell lymphoma (myelosis -
fungoides) with 13-cis-retinoic acid. Lancet 1:1345.
- 122.- KNAPP W., MAJDIC O., BETTELHEIM P., LISZKA K., (1982) VIL-A1
a monoclonal antibody reactive with common acute lymphatic -
leukemia cells. Leuk Res 6:137.
- 123.- KOEFFLER H.P., BAR-ELI M., TERRITO M. (1980) Phorbol diester
induced macrophage differentiation of leukemic blasts from -
patients with human myelogenous leukemia. J. Clin Invest 66:
1101.
- 124.- KOEHLER G., MILSTEIN C. (1977) Continuous cultures of fuses -
and lymphomas. Springer, Berlin Heidelberg New York.

- 125.- KOLLER C.A., MITCHELL B.S., GREVER M.R., MEJIAS E., MALSPEIS L., METZ E.N. (1979) Treatment of acute lymphoblastic leukemia with 2'-deoxycoformycin: clinical and biochemical consequences of adenosine deaminase inhibition. *Cancer Treat Rep.* 63:1949-1952.
- 126.- KOMADA Y., PEIPER S.C., MELVIN S.L., METZGER D.W., TARNOWSKY B.H., GREEN A.A. (1983a) A monoclonal antibody (SJ-9A4) to p24 present on common ALLs, neuroblastomas and platelets. I: characterization and development of a unique radioimmuno-metric assay. *Leuk. Res* 7:487.
- 127.- KOMADA Y., PEIPER S.C., MELVIN S.L. TARNOWSKI B.H., GREEN A. A. (1983b) A monoclonal antibody (SJ-9A4) to p24 present on common ALLs, neuroblastomas and platelets. II. Characterization of p24 and shedding in vitro and in vivo. *Leuk Res* 7:499
- 128.- KORSMEYER S.J., HIETER P.A., RAVECH J.V., POPLACK D.G., WALDMANN T.A., LEDER P. (1981) Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7096.
- 129.- KOZINER B., MERTELSMANN R., ANDREFF M., HANSEN H., DE HARVEN E., Mc KENZIE S., GEE T., GOOD R.A., CLARKSON B. (1980) Hete

- rogeneity of cell lineages in L3 leukemias. Blood 55:694.
- 130.- KUMAGAI K., AEO T., SEKIZAWA T., SASAKI M. (1975) Studies of surface immunoglobulins on human B lymphocytes. I. Dissociation of cell-bound immunoglobulins with acid pH or at 37°C.- J Immunol 155:982.
- 131.- KUNG P.C., BERGER C.L., GOLDSTEIN G., LOGERFO P., EDELSON R. L. (1981) Cutaneous T cell lymphoma: characterization by monoclonal antibodies. Blood 57:261.
- 132.- LAEMMLY V.K. (1970) Cleavage of structural proteins during - the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680.
- 133.- LAMPSON L.A., LEVY R. (1980) Two populations on Ig-like molecules on a human B-cell line. J Immunol 125:293.
- 134.- LAY H.L., MENDES N.F., BIANCO C., NUSSENZWEIG V. (1971) Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes. Nature 230:531.
- 135.- LE BIEN T.W., BOUE D.R., BRADLEY J.G., KERSEY J.H. (1982). - Antibody affinity may influence antigenic modulation of the common acute lymphoblastic leukemia antigen in vitro. J Immunol 129:2287.

- 136.- LIPPMAN M.E., YABRO G.K., LEVENTHAL B.G. (1978) Clinical implications of glucocorticoid receptors in human leukemia. Cancer Res 38:4251.
- 137.- MAJDIC O., LISZKA K., LUTZ D., KNAPP W. (1981) Myeloid differentiation antigen defined by a monoclonal antibody. Blood - 58:1127.
- 138.- MARIE J.P., PERROT J.Y., BOUCHEIX C., ZITTOUN J., MARTYRE M.C. KAYIBANDA M., ROSENFELD C., MISHAL Z., ZITTOUN R. (1982) Determination of ultrastructural peroxidases and immunologic membrane markers in the diagnosis of acute leukemias. Blood - 59:270.
- 139.- MARKS S.M., BALTIMORE D., McCAFFREY R. (1978) Terminal transferase as a predictor of initial responsiveness to vincristine and prednisone in blastic chronic myelogenous leukemia: a co-operative study. N Engl J Med 298:812.
- 140.- MARTIN P.J., HANSEN K.A., NOWINSKI R.C., BROWN M.A. (1980) A new human T-cell differentiation antigen: unexpected expression on chronic lymphocytic leukemia cells. Immunogenetics - 11:429.

- 141.- McMICHAEL A.J., RUST N.A., PILCH J.R., SOLCHYNSKY R., MORTON J., MASON D.Y., RUAN C., TOBELEM G., CAEN J. (1981) Monoclonal antibody to human platelet glycoprotein I:I. Immunological studies. Br J Haematol 49:501.
- 142.- MEIER J., COLEMAN M.S., HUTTON J.J. (1976) Adenosine deaminase activity in peripheral blood cells of patients with hematological malignancies. Br J Cancer 33:312-319.
- 143.- MELLSTEDT H., PETERSON D., HOLIN G. (1976) Monoclonal B lymphocytes in peripheral blood of patients with plasma cell myeloma. Relation to activity of the disease. Scand J Haematol. 16:112.
- 144.- MELVIN S., KOMADA Y., PEIPER S., METZGER D. (1982) Hybridoma antibodies to leukemia-associated antigens of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). In: BERNARD A., BOUMSELL L., DAUNSSSET J., MILSTEIN C., SCHLOSSMAN S.F. (ed) Leucocyte typing. Springer-Verlag Berlin p 596.
- 145.- METZGAR R.S., BOHOWITZ M.J., JONES N.H., DOWEIC B.L. (1981)- Distribution of common acute lymphoblastic leukemia antigen in nonhematophoretic tissues. J Exp Med 154:1249.

- 146.- MILLER R.A., MALONEY D.G., WARNKE R., LEVY R. (1982) Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. N Engl J Med 306:517.
- 147.- MORETTA L., WEBB S.R., GROSSI C.E., LYDYARD P.M., COOPER M.C. (1975) Functional analysis of two subpopulations of human T cells and their distribution in immunodeficient patients. Clin Res 24:489.
- 148.- NADLER L.M., STASHENKO P., HARDY R., AGTHOVEN A., TERHOST C. SCHLOSSMANN S.F. (1981) Characterization of a human B cell-specific antigen (B-2) distinct from B 1. J Immunol 120:1941
- 149.- NADLER L.M., RITZ J., BATES M.P., PARK E.K., ANDERSON K.C., SALLEN S.E., SCHLOSSMAN S.F. (1982) Induction of human B cell antigens in non-T cell acute lymphoblastic leukemia. J Clin Invest 70:433.
- 150.- NADLER L.M., ANDERSON K.C., BATES M., PARK E., SLAUGHENHONPT B., SCHLOSSMAN S.F. (1984) Human B cell-associated antigens: expression on normal and malignant B lymphocytes. In: BERNARD A., BOUNSELL L., DAUNSET J., MILSTEIN C., SCHLOSSMAN S.F. (ed) Leucocyte typing. Springer-Verlag. Berlin, p 354.

- 151.- NAGASAWA K., MAK T.W. (1980) Phorbol esters induce differentiation in men malignant T lymphoblasts. Proc Natl Acad Sci USA 77:2964.
- 152.- NAKAHARA K., OHASHI T., ODA T., HIRANO T., KASAI M., OKUMURA G., TADA T. (1980). Asialo GM₁, as a cell-surface marker detected in acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 302:674.
- 153.- NAKAO Y., TSUBOI S., FUJI A T., MASAOKA T., MORIKAWA I., WATANABE S. (1981) Glucocorticoid receptors and terminal deoxy nucleotidyl transferase activities in leukemia cells. Cancer 47:1812.
- 154.- NETZEL B., ROOT H., HAAS R.J., KOLL H.J., THIERFELDER S., - (1980) Immunological conditioning of bone marrow for auto-- transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. - Lancet 1:1330.
- 155.- OPPENHEIM J.J., BLAESE R.M., WALDMANN T.A. (1970) Impaired - lymphocyte transformation and delayed hypersensitivity in - Wiskott Aldrich Syndrome. J Immunol 104:835.
- 156.- OWEN C.A., BOWIE E.J.E., THOMPSON J.H. (1975) The diagnosis of Bleeding Disorders. Edit. Little, Brown and Company. Boston

- 157.- PALMER M.K., HANN I.M., JONES P.M., EWANS D.I.K. (1980) A sequential diagnosis for predicting length of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. Br J Cancer 42:841.
- 158.- PEARL E.R., VOGLER L.B., OKOS A.J., CRIST W.M., LAWTON A.R., COOPER M.D. (1978) B lymphocyte precursors in human bone marrow: an analysis of normal individuals and patients with antibody-deficiency states. J Immunol 120:1169.
- 159.- PILKIMPTON G.R., QUIRK J., De KRETZER T., LEE G.T.H., HANCOEK W., KRAFT N., ATKINS R.C., JOSE D.G. (1984) Analysis of B-cell CALLA and monocyte-granulocyte protocol reagents using immunofluorescence tissue sections and molecular weight determination. In: BERNARD A., BOUMSELL L., DAUNSET J., MILSTEIN C., SCHLOSSMAN S.F. (ed) Leucocyte typing. Springer. Verlag Berlin p 481.
- 160.- PLATT J.L., LE BIEN T.W., MICHAEL A.E., (1983) Stages of renal ontogenesis identified by monoclonal antibodies reactive with lymphonematopoietic differentiation antigens. J Exp Med. 157:155.
- 161.- FREUDHOMME J.L., KLEIN M., LABAUME S., SELIGMANN M. (1977) - Idiotype-bearing antigen-binding receptors produced by blood

T lymphocytes in a case of human myeloma. Eur J Immunol 7:
840.

162.- RABELLINO E.M., ROSS G.D., TRANG H.T.K., WILLIAMS N., METCALF
G. (1978) Membrane receptors of mouse leukocytes. II. Sequen-
tial expression of membrane receptors and phagocytic capaci-
ty during leukocyte differentiation. J Exp Med 147:434.

163.- RAFF M.C. (1969) Theta isoantigen as a marker of thymus-deri-
ved lymphocytes in mice. Nature 224:378-379.

164.- REAMAN G.H., LEVIN N., MUCHMORE A., HOLIMAN B.J., POPLACK D.
G. (1979) Diminished lymphoblast 5'-nucleotidase activity in
acute lymphoblastic leukemia with T-cell characteristics. N.
Engl J Med 300:1374.

165.- REIF A.A., ALLEN J.V. (1963) Specificity of isoantisera against
leukemia and thymic lymphocytes. Nature 200:1332.

166.- REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G., SCHLOSSMAN S.F. -
(1979) Separation of functional subsets of human T cells by
a monoclonal antibody. Proc Natl Sci Acad USA 76:4061.

167.- REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G., LEVEY R., SCHLOSSMAN

- S.F. (1980) Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T cell lineage. Proc Natl Acad Sci USA 77:6152.
- 168.- REUBEN P., SIRAGAMIAN S., FOX P.C., BERENSTEIN E.H. (1983) - Methods of enhancing the frequency of antigens-specific hybridomas. Methods in Enzymology 92:17.
- 169.- REVESZ T., GREAVES M.F., CAPELLARO D., MURRAY R.K. (1976) Differential expression of cell surface binding sites for cholera toxin in acute and chronic leukaemias. Br J Haematol - 34:623.
- 170.- RITZ J., PESANDO J.M., NOTIS-McCONARTY J., LAZARUS H., SCHLOSSMAN S.F., (1980) A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukaemia antigen. Nature 283:583.
- 171.- RITZ J., SALLAN S.E., BAST R.C., LIPTON J.M., NATHAN D.G., SCHLOSSMAN S.F. (1981) Autologous bone marrow transplantation in cALLA positive ALL following in vitro treatment with J5 monoclonal antibody and complement. Blood 58 (suppl):175a.
- 172.- ROCKLIN R.E., MAC DERMOTT R.P., CHESS L., SCHLOSSMAN S.F., DAVID J.R. (1974) Studies on mediator production by highly -

purified human T and B lymphocytes. J Exp Med 140:130.

- 173.- ROOT H., THIERFELDER S., THIEL E., GOTZE D., NETZEL B., HUHN D., EULITZ M. (1975) Identification and quantification of human T-cell antigen by antisera purified from antibodies cross reacting with hemopoietic progenitors and other blood cells. Immunogeneics 2:411.
- 174.- ROOT H., NETZEL B., THIEL E., JAGER G., HUHN D., HAAS R., - GOTZE D., THIERFELDER S. (1977) Classification of leukemic - cells with T and O-ALL -specific antisera. Hematol Bluttransfus 20:87-95.
- 175.- ROOT H., THIEL E., HOFFMANN-FEZER G., NETZEL B., THIERFELDER S. (1980) Identification of two different T-cell antigens ex pressed on early and mature thymus-derived lymphocytes and - leukemic cells. Exp Hematol (Suppl 7) 8:15.
- 176.- ROSS G.D., POLLEY M.J., RABELLINO E.M., GREY H.M. (1973) Two different complement receptors on human lymphocytes. J Exp - Med 138:798.
- 177.- ROSENTHAL S., CANELLOS G.P., WHANG-PENG J., GRALNICK H.R. - (1977) Blast crisis of chronic granulocytic leukemia: morpho

- logic variants and therapeutic implications. Am J Med 63:542
- 178.- ROVERA G., SANTOLI D., DAMSKY C. (1979) Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells treated with a phorbol diester. Proc Natl Acad Sci USA 76:2779.
- 179.- ROYSTON I., MINOWADA J., LE BIEN T.W., PAULOV G., VOSIKA G., BLOOMFIELD C.D., ELLISON R.R. (1984) Phenotypes of adult acute lymphoblastic leukemia defined by monoclonal antibodies.-
En: BERNARD A., BOUNSELL L., DAUNSETT., MILSTEIN C., SCHLOSSMAN S.F. (ed) Leucocyte Typing Springer-Verlag Berlin, p 558.
- 180.- SALMON S.E., SELIGMANN M. (1974) B-cell neoplasia in man. -
Lancet II:1230.
- 181.- SCHLOSSMAN S.F., CHESS L., HUMPHREYS R.E., STROMINGER J.L. -
(1976) Distribution of Ia-like molecules on the surface of -
normal and leukemic human cells. Proc Natl Acad Sci USA. 73:
1288.
- 182.- SEN L., BORELLA L. (1975) Clinical importance of lymphoblasts
with T markers in childhood acute leukemia. N Engl J Med 292
:829.

- 183.- SILBER R., CONKLYN M., GRUSKY G., ZUCKER-FRANKLIN D. (1975)
Hum. lymphocytes: 5'Nucleotidase-positive and -negative sub
populations. J Clin Invest 56:1324.
- 184.- SILVEIRA N.P.A., MENDES N.F., TOLNAI M.E.A. (1972) Tissue lo
calization of two populations of human lymphocytes distin-
guished by membrane receptors. J Immunol 109:1456.
- 185.- SIPHARDT M.J., KAUFMAN J.F., FUKS A., ALBRECHTSEN D., SOLHEIM
B.G., BRUNNING J.W., STROMINGER J.L. (1977) HLA-d associated
alloantisera react with molecules similar to Ia antigens. -
Proc Natl Acad Sci USA 74:3533.
- 186.- SISIMINOVITCH L., McCULLOCH E.A., TILL J.E. (1983) The dis-
tribution of colony forming cells among spleen colonies. Jour
nal of cellular and comparative physiology 62:327.
- 187.- SMITH R.W., TERRY W.D., BUELL D.N., SELL K.W. (1973) An anti
genic marker for human thymic lymphocytes. J Immunol 110:884.
- 188.- STASHENKO P., NADLER L.M., HARDY R., SCHLOSSMAN S.F. (1980)-
Characterization of human B lymphocyte-specific antigen. J -
Immunol 125:1678.
- 189.- STATHOPOULOS G. ELLIOTT E.V. (1974) Formation of mouse or -

sheep red blood cell rosettes by lymphocytes from normal and leukaemic individuals. Lancet 1:600.

190.- STOBO J.D. (1984) Lymphocytes. En: STITES D.P., STOBO J.D., - FUNDENBERG H.H., WELLS J.V. (Ed) Basic and clinical Immunology. Jange Medical Publications, Los Angeles, p 69.

191.- STUTMAN O. (1977) Two main features of T-cell development:Thy mic traffic and post thumic maturation. Contemp Top Immunobiol 7:1.

192.- SUKURAI M., SAMPI K., HOZUMI M. (1983) Possible differentiation of human acute myeloblastic leukemia cells by daily and intermittent administration of aclacinomytin A. Leuk Res 7:139

193.- SUTHERLAND R., SMART J., NIAUDET P., GREAVES M.F. (1978) Acute lymphoblastic leukaemia associated antigen II. Isolation and partial characterization. Leuk Res 2:115-216.

194.- TAX W.J.M., WILLEMS H.W., KIBBELAAR M.D.A. et al (1981) Monoclonal antibodies against human thumocytes and T-Lymphocytes. Prot Biol Fluids 29:701.

195.- THIEL E., DORMER P., ROOT H., HUHN D., BAUCHINGER M., KLEY H.

- THIERFELDER S. (1977) Quantitation of T-antigenic sites and Ig-determinants on leukemic cells by microphotometric immunog_u autoradiography Proof of the clonal origin of thymus-derived lymphocytic leukemias. Haematol Bluttransfus 20:131.
- 196.- THIEL E., ROOT H., NETZEL B., HUHN D., WUNDISCH G.F., HAAS R, BENDER B., THIERFELDER S. (1978) T antigen positive but E-ro_u sette negative acute lymphatic leukemia. Blut 36:363.
- 197.- THIEL E., ROOT H., HUNH D., NETZEL B., GROSSE-WILDE H., GANESHAGURU K., THIERFELDER S. (1980) Multimarker classifica-- tion of acute lymphoblastic leukemia: evidence for further T subgroups and evaluation of their clinical significance. Blood 56:759.
- 198.- THIEL E., LAU B., ROOT H., JAGER G., PACHMANN K (1981) Appea_u rance of B- or T-lymphocyte markers after diffusion chamber culture of acute lymphoblastic leukemia cells. Blut 42:315.
- 199.- THOMPSON L.F., BOSS G.R., SPIEGELBERG H.L. et al (1979) Ec- to-5'nucleotidase activity in T and B lymphocytes from nor- mal subjects and patients with congenital X-linked agamma-- globulinemia. J Immunol 123:2475.

- 200.- TILL J.E., McCULLOCH E.A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research* 14:213.
- 201.- TUNG R., SILBER R., QUAGLIATA F., CONKLYN m., GOTTESMAN J.,- HIRSCHHORN R. (1976) Adenosine deaminase activity in chronic lymphocytic leukemia: relationship to B- and T-cell subpopulations. *J Clin Invest* 57:756.
- 202.- UCHIYAMA T., YODOI J., SAGAWA K., TAKATSUKI K., UCHIN O.H. - (1977) Adult T-cell leukemia: clinical and hematological features of 16 cases. *Blood* 50:481.
- 203.- UEDA R., TANIMOTO M., TAKAHASHI T., OGATO S.I., NISHIDA K.,- NAMIKAWA R., NISHIZUTA T., OTA K. (1982) Serological analysis of cell surface antigens of null cell acute lymphocytic leukemia by mouse monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4386.
- 204.- UHR J.W., PHILIPPS J.M. (1966) In vitro sensitization of phagocytes and lymphocytes by antigen-antibody complexes. *Ann NY Acad Sci* 129:792.
- 205.- VILLEGAS A., GARCIA TALAVERA J., ALVAREZ CARMONA A., ESPINOS

- PEREZ D. (1981). Leucemia aguda: consideraciones generales -
clasificación y manifestaciones clínicas. *Medicine* 9:601.
- 206.- VOGLER L.B., CRIST W.M., BOCKMAN D.E., PEARL E.R., LAWTON A.
R., COOPER M.D. (1978) Pre-B cell leukemia: a new phenotype
of lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 298:872.
- 207.- WANG C.Y., FU S.M., KUNKEL H. G. (1979) Isolation and immuno-
logical characterization of a major surface glycoprotein -
(gp 54) preferentially expressed on certain human B cells. *J*
Exp Med 149:1424.
- 208.- WELLS J.R., BILLING R., HERZOG P., FEIG S.A., GALE R.P., TE-
RASAKI P.I., CLINE M.J. (1979) Autotransplantation after in
vitro immunotherapy of lymphoblastic leukemia. *Exper Hema* 7
(suppl):164.
- 209.- WERNET P. (1978) Human Ia-type alloantigens: methods of de-
tection, aspects of chemistry and biology, markers for disea-
se states. *Transplant Rev* 30:271.
- 210.- WICK G., GATTRINGER C. (1977) Two antibodies in anti-human T
-cell sera. En: THIERFELDER S., ROOT H., THIEL E. (eds) *Immuno-*
nological diagnosis of leukemias and lymphomas. Springer, -
Berlin Heidelberg New York, p 351.

- 211.- WILLIAMS R.C., DE BOARD J.R., MELLBYE O.J., MESSNER R.P., -
LINDSTROM R.F. (1973) Studies of T-and B-lymphocytes in pa-
tients with connective tissue diseases. J Clin Invest 52:283
- 212.- WINCHESTER R.J., ROSS G.D., JAROWSKI C.J., WANG C.Y., HAL-
PER J., BROXMEYER H.E. (1977) Expression of Ia-like antigens
on human granulocytes during early phases of differentiation
Proc Natl Acad Sci USA 74:4012.
- 213.- WINCHESTER R.J., MEYERS P.A., BROXMEYER H.E., WANG C.Y., -
MOORE M.A.S., KUNKEL H.G. (1978) Inhibition of human eryth-
ropoietic colony formation in culture by treatment with Ia
antisera. J Exp Med 148:613-617.
- 214.- WODA B.A., FENAGLIO C.M., NETTE E.G., KING D.W. (1977) The
lack of specificity of the sheep erythrocyte - T lymphocyte
rosetting phenomenon. Am J Pathol 86:69.
- 215.- YABRO G.K., LIPPMAN M.E., JOHNSON G.E., LEVENTHAL S.G. -
(1977) Glucocorticoid receptors in subpopulation of child--
hood acute lymphocyte leukemia. Cancer Res 37:2688.
- 216.- YAM L.T. (1974) Clinical significance of the human acid phos-
phatase. Am J Med 56:604.

- 217.- YODOI J., MIYAMA M., MASUDA T. (1978) Immunological properties of Fc receptors on lymphocytes. 2. Differentiation - from Fc β -to Fc α cells and their functional differences in - vitro antibody response. Cell Immunol 35:266.
- 218.- ZIEGLER A., STEIN H., MULLER C., WERNET P. (1981) T α -1: a - monoclonal antibody defining a B cell subpopulation. - use-- fulness for the classification of non-Hodgkin's lymphomas. En: KNAPP W., (ed) Leukemia markers. Academic Press London, p 113.
- 219.- ZOLA H., MOORE H.A., McNAMARA P.J., HUNTER L.K., BRADLEY J., BROOKS D.A., GORMAN D.J., BERNDT M.C. (1984) A membrane pro α tein antigen of platelets and non-T ALL Disease Markers 2: 366.
- 220.- ZUKER-FRANKLIN D., GREAVES M.F., GROSSI C. . MARMONT A.M. (1981) Atlas of Blood cells. Edit: Ermes. Milán.