

Obtención de hibridomas de ratón productores de anticuerpos monoclonales que reconocen células humanas de origen T. II. Caracterización de los anticuerpos monoclonales IOR-T1 e IOR-T2

C. A. GARCIA, J. V. GAVILONDO, J. F. AMADOR, A. M. VAZQUEZ, A. FERNANDEZ

**Departamento de Biología, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología,
La Habana, Cuba**

RESUMEN

Los anticuerpos monoclonales han contribuido de manera particular a la caracterización de las diferentes subpoblaciones celulares del sistema linfoide y han demostrado su utilidad para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de diferentes enfermedades. En el presente trabajo se estudian dos anticuerpos monoclonales: IOR-T1 e IOR-T2, secretados por hibridomas estables obtenidos por la fusión de la línea de mieloma murino P3/x63-Ag8-6.5.3 y células esplénicas de ratones Balb/cHab, inmunizados con células mononucleares periféricas de un paciente con síndrome de Sézary.

Las especificidades fueron probadas sobre células mononucleares periféricas de individuos sanos, pacientes con linfomas T cutáneos y pacientes con leucemias, y sobre diferentes líneas celulares de cultivo. Por otra parte se realizaron comparaciones con el anticuerpo monoclonal OKT 3 y con el método de Rosetas-E. Se demostró que el IOR-T1 reconoce específicamente el marcador de las células T humanas y que puede ser utilizado confiablemente para el diagnóstico inmunológico de las leucemias y linfomas. El IOR-T2 parece identificar un antígeno tumor asociado relacionado con alguna de las etapas de la progresión y/o proliferación neoplásica de los linfomas T cutáneos.

SUMMARY

Monoclonal antibodies have greatly contributed to the characterization of the different cellular subpopulations within the lymphoid system and have demonstrated their usefulness in the diagnosis, prognosis and treatment of a variety of diseases. In the present paper, two monoclonal antibodies, IOR-T1 and IOR-T2, are studied. These are secreted by stable hybridomas obtained from the fusion of P3/x63-Ag8-6.5.3 myeloma cells and splenic cells of Balb/c Hab mice, immunized with peripheral mononuclear cells of a patient with a Sezary Syndrome.

Antibody specificity was tested against peripheral mononuclear cells from healthy subjects, cutaneous T lymphoma patients and leukemic patients, as well as against different established culture cell lines. In addition, the monoclonal antibodies obtained were compared to the OKT 3 monoclonal antibody and the E-Rosette test. We demonstrated that the IOR-T1 antibody specifically recognized a human T cell marker and can be reliably used in the immunologic diagnosis of leukemias and lymphomas. The IOR-T2, on the other hand, seems to identify a tumor-associated antigen related to some stage of the neoplastic progression and/or proliferation of cutaneous T lymphomas.

INTRODUCCION

Con el desarrollo de la tecnología de producción de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales (AcM), se ha logrado obtener cantidades ilimitadas de reactivos biológicos de especificidad única y gran homogeneidad (Köhler y Milstein, 1975).

Los estudios realizados con AcM que reconocen marcadores de membrana, han permitido identificar y cuantificar diferentes subpoblaciones de células linfoides con funciones biológicas definidas (Van Wanwe *et al.*, 1980; Zarling y Kung, 1980; Van Griend *et al.*, 1982) y han contribuido a esclarecer la evolución de algunos de esos marcadores durante el proceso de diferenciación y maduración celular (Janossy *et al.*, 1981; Nadler *et al.*, 1982).

Por otra parte, estos AcM han demostrado tener gran utilidad para la clasificación inmunológica de las leucemias y los linfomas, (Knowles II y Halper, 1982; Kenneth *et al.*, 1982), para la eliminación de células indeseables en los trasplantes de médula ósea (Bast *et al.*, 1982; Prentice *et al.*, 1982) y en la purificación de células linfoides (Braun *et al.*, 1982).

El presente trabajo reporta los estudios con los cuales se caracterizan las especificidades de dos AcM previamente seleccionados (Gavilondo *et al.*, en prensa) y que denominamos IOR-T1 e IOR-T2. Se demostró que el AcM IOR-T1 reconoce específicamente el marcador de las células T humanas de sangre periférica y que el AcM IOR-T2 parece identificar, al menos, un antígeno tumor asociado, relacionado con alguna de las etapas de la progresión y/o proliferación neoplásica de los linfomas T cutáneos.

MATERIALES Y METODOS

Obtención, expansión e inoculación *in vivo* de hibridomas

Los procedimientos de inmunización, fusión y selección de los hibridomas 43/27/F6 y 47/23/C8, secretores de los AcM IOR-T1 e IOR-T2, respectivamente, han sido descritos en detalle en un trabajo previo (Gavilondo *et al.*, en prensa).

El proceso utilizado fue el siguiente. Ratones Balb/cHab fueron inmunizados a intervalos de 21 días e intravenosamente con $1,3$ y $5 \cdot 10^7$ células mononucleares periféricas (CMP) purificadas por centrifugación con gradiente de densidad (García y Silva, 1979) provenientes de un paciente diagnosticado con el síndrome de Sézary con una alta proporción de células con marcadores T (Souteyrand y Thivolet, 1981). Los ratones con mejor respuesta de anticuerpos contra CMP de controles se reinmunizaron con $10 \cdot 10^7$ CMP del paciente, tres días antes de la fusión.

Se realizó la hibridación de esplenocitos de ratón con células de la línea de mieloma P3/x63-Ag8-6.5.3 (Kearney *et al.*, 1979) en relación 10:1, utilizando polietilenglicol 4000 y siguiendo fundamentalmente la técnica descrita por Köhler (1981) con pequeñas variaciones. Las células fundidas y resuspendidas en Medio Esencial Mínimo modificado por Dulbecco (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Difco), 18 mM de HEPES, 26 mM de CO_3HNa , 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y antibióticos (MEDS), al cual se le añadió 10 mM hipoxantina, $4 \cdot 10^{-7}$ M aminopterin y $1,6 \cdot 10^{-5}$ M timidina (HAT), (Littlefield, 1964); se distribuyeron en placas de 24 pozos (Costar 3524) e incubaron a 37°C y 5% CO_2 .

A los 12 días de cultivo se comenzó a sustituir el medio MEDS-HAT por MEDS-HT y el ensayo de los sobrenadantes de los pozos con buen crecimiento. Los clonajes y reclonajes de los hibridomas se llevaron a cabo utilizando la técnica de dilución limitante (Hudson y Hay, 1980) en placas de 96 pozos (Costar 3596), empleando medio MEDS-HT, al cual se le añadió 3% de sobrenadante de cultivos de células endoteliales de cordón umbilical humano (HECS) (Astaldi, 1980).

Para la selección de los cultivos y clones productores se utilizaron las técnicas de microcito-toxicidad (Kennett, 1980), inmunofluorescencia indirecta (Rabellino, 1971) y ELISA (Kennett, 1980), utilizando como células diana y en forma progresiva: CMP del paciente de Sézary, CMP de individuos sanos y células mononucleares adherentes y no adherentes al vidrio, tanto del paciente como de los controles sanos.

Los hibridomas 43/27/F6 y 47/23/C8 se expandieron en frascos de vidrio de 75 cm² (Sani-Glass, Brockway), utilizando medio McCoy 5A (Gibco) suplementado con 2% de HECS, 6% de suero bovino, y el resto de los aditivos descritos anteriormente para el MEDS. Para la producción de líquido ascítico tumoral rico en anticuerpos se inocularon por vía intraperitoneal $3-5 \cdot 10^6$ células híbridas a ratones Balb/cHab, inyectados 1-7 días antes por la misma vía, con 0,5 ml de adyuvante incompleto de Freund (Difco). Después de 14-21 días, los líquidos ascíticos se extrajeron por punción, se clarificaron por centrifugaciones sucesivas a 400 G durante 15 minutos y posteriormente a 10 000 G durante 20 minutos y se distribuyeron en alícuotas para su conservación a -20°C hasta su uso.

Inmunofluorescencia indirecta

Para la detección de los antígenos de membrana se empleó esencialmente la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) según Rabellino (1971). Se emplearon $2 \cdot 10^6$ células diana, lavadas previamente en tres ocasiones con solución salina tamponada con fosfato (SSTF) pH 7,2 a 200 G, 10 minutos y 4°C . Se incubaron a 37°C , 30 minutos con 1% de seroalbúmina bovina y 0,02% de azida sódica en SSTF. Después de tres lavados con igual tampón a 200 G, 10 minutos y 4°C , las células se incubaron a 4°C durante 30 minutos con 20 μl de la solución de anticuerpos. Seguidamente se hicieron tres lavados en iguales condiciones a los anteriores y se realizó una segunda incubación a 4°C durante 30 minutos con 20 μl de una dilución 1:30 de suero de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Mely Lab.). Las células se lavaron tres veces con SSTF, igual que anteriormente, y se montaron en SSTF-glicerol para ser analizadas en un microscopio Ortholux II (Leitz).

Se consideraron positivas las células con tres o más puntos fluorescentes en su superficie. En cada experimento se incluyó como control positivo el suero de ratón anti-CMP del paciente y como control negativo la SSTF durante la primera incubación.

En varios experimentos se utilizó como reactivo de referencia el AcM comercial OKT 3 (Ortho Diagnostics) que reconoce linfocitos T humanos de sangre periférica.

Líneas celulares de cultivo

En los estudios de reconocimiento por IFI, se emplearon las líneas celulares de origen humano MOLT 4 (Minowada *et al.*, 1972), Raji (Epstein *et al.*, 1966) y K562 (Lozzio y Lozzio, 1975). Estas células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% suero bovino y antibióticos, y se cosecharon en fase de crecimiento exponencial.

Rosetas E

Se realizó el método descrito por Schaffer *et al.* (1975). Se consideró roseta a aquellos linfocitos con tres o más glóbulos rojos de carnero (GRC) adheridos a su superficie.

IFI sobre rosetas E

Este estudio se realizó utilizando primero el método de rosetas E (Schaffer *et al.*, 1975), sin la fijación final con glutaraldehído y seguidamente se continuó con el método de IFI (Rabellino, 1971). Se cuantificaron los linfocitos rosetas-E positivos que se marcaron mediante fluorescencia.

Cromatografía de afinidad con Sepharosa CNBr

El anticuerpo IOR-T1 fue purificado a partir del líquido ascítico clarificado por cromatografía de afinidad (Hudson y Hay, 1980), utilizando una columna de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Farmacia Fine Chem), a la cual se le acopló IgG de conejo anti-IgG de ratón obtenida en nuestro laboratorio. Las soluciones de anticuerpos (Ac) eluidos se ajustaron a 100 μ g de proteína/ml.

Determinación de la subclase de inmunoglobulina

Se utilizó la técnica de precipitación de Ouchterlony (Ouchterlony y Nilsson, 1978) enfrentando IOR-T1 purificado por cromatografía de afinidad e IOR-T2 en forma de ascitis clarificado, contra antisueros monoespecíficos contra clases y subclases de inmunoglobulinas de ratón (Miles Lab.).

Estudios estadísticos

En los experimentos de comparación entre el reconocimiento de diferentes AcM se utilizó el test estadístico "t" de comparación de medias. Los niveles de significación se mencionan en los resultados correspondientes.

RESULTADOS

Identificación de clase y subclase de inmunoglobulinas

Los estudios de precipitación por Ouchterlony demostraron que el IOR-T1 es un AcM del tipo IgG₁; por otro lado, el AcM IOR-T2 resultó ser una IgG_{2b}.

Especificidad del reconocimiento del IOR-T1

En estos estudios se utilizó el AcM purificado por cromatografía de afinidad; parte de este reactivo fue esterilizado por filtración por 0,22 μ , liofilizado, envasado en bulbos estériles, y almacenado a -70°C. De esta forma y conteniendo 0,1% de BSA, y 0,02% de azida sódica, la preparación de AcM ha mantenido su potencia por 8 meses.

a) Comparación de los valores de reconocimiento por IFI entre el IOR-T1 y el AcM comercial OKT 3:

En la tabla 1 se presentan los valores correspondientes al reconocimiento por IFI de diferentes células diana por ambos AcM. Como se observa, no existen diferencias significativas entre las proporciones de CMP de individuos controles identificadas por el IOR-T1 y el OKT 3, cuando se comparan los valores medios. Ambos AcM tuvieron un comportamiento similar frente a líneas celulares de cultivo humanas de diferente origen, no reconociendo las líneas MOLT 4, de origen T, RAJI6HAT, de origen B y K562 de origen noT-noB.

No hubo diferencias entre los reconocimientos del OKT 3 y el IOR-T1, cuando se probaron frente a CMP de pacientes con diferentes tipos de leucemias. Se debe destacar que el IOR-T1 no reconoció los CMP de un paciente con leucemia mieloide; reconoció alta proporción de CMP de un paciente con síndrome de Sézary y valores normales en un paciente con Micosis Fungoide (tabla 4).

b) Comparación de la IFI con el IOR-T1 y las rosetas E:

En la tabla 2 se refleja la comparación de los valores (en por ciento) de identificación de CMP de controles sanos por ambas técnicas. Puede observarse que los valores medios no difieren estadísticamente. En la tabla 3 se puede corroborar que el IOR-T1 reconoce una alta proporción de linfocitos rosetas E positivos.

Reconocimiento del IOR-T2

Los experimentos aquí reportados se realizaron con el AcM IOR-T2 en forma de ascitis clarificado, para las comparaciones de éste con el IOR-T1. En la tabla 4 se presentan los resultados de la comparación de los valores porcentuales de reconocimiento por IFI de diferentes células diana, cuando son incubados con uno u otro AcM. El IOR-T2 reconoce solamente entre 4-10% (valores medios) de CMP de individuos sanos y altos porcentajes de células en el caso de pacientes con linfomas T cutáneos. Los valores para la Micosis Fungoide fueron superiores que para el síndrome de Sézary. Por último, el IOR-T2 no reconoció ningún marcador en las líneas celulares de cultivo estudiadas.

DISCUSION

Si bien los linfocitos son células que morfológicamente no presentan diferencias, constituyen de hecho una población celular heterogénea con múltiples funciones (Douglas, 1980). Los AcM han contribuido de manera particular a la caracterización de tales subpoblaciones, siendo ejemplo de ello las ya conocidas series de AcM OKT (*Ortho-mune Monoclonal Antibodies Product*. Monograph, 1982) y más recientemente la OKB (Mitter *et al.*, 1983), con las cuales se han podido identificar, a través de los marcadores de membrana, diferentes poblaciones linfomonocitarias (Kung *et al.*, 1979), subpoblaciones funcionales (Reinherz *et al.*, 1979; Nagel *et al.*, 1981) y algunas de las etapas de diferenciación y maduración de los linfocitos T (Jannosy *et al.*, 1981; Nadler *et al.*, 1982).

En nuestros resultados obtuvimos que el IOR-T1 reconoce el 92-94% de las CMP que son rosetas E positivas, y ofrece valores de reconocimiento cuantitativamente similares a los obtenidos con el AcM OKT 3 en las diferentes muestras de células estudiadas, así como para aquellos obtenidos según la técnica de rosetas E en CMP de individuos sanos. Por otra parte el IOR-T1,

al igual que el OKT 3, no reconoce las líneas de células de cultivo estudiadas ni las CMP de un paciente con leucemia mieloide. Por todas estas razones no dudamos en afirmar que el AcM IOR-T1 reconoce un marcador de las células T humanas.

Resultados preliminares (U. Landergreen, comunicación personal), parecen demostrar que el AcM IOR-T1 no reconoce el mismo epítopo que el AcM OKT 3; de ser esto cierto, el AcM IOR-T1 puede estar reconociendo uno de los antígenos de las células T demostrado por hetero-antisueros obtenidos con la inmunización de membranas de células de pacientes con síndrome de Sézary, y que hasta el presente no han sido reconocidos por AcM (Cotner *et al.*, 1981).

Durante nuestro estudio pudimos comprobar que con los valores obtenidos con el IOR-T1 en CMP, se pueden diferenciar distintos tipos de leucemias diagnosticadas clínicamente, así como corroborar las características descritas para dos linfomas T cutáneos, la Micosis Fungoide que no presenta la diseminación leucémica de la enfermedad y el síndrome de Sézary que sí lo presenta (Souteyrand y Thivolet, 1981).

Los resultados, en su conjunto, sugieren que el IOR-T1 puede ser utilizado confiablemente para la clasificación inmunológica de los linfomas y leucemias, y para el resto de los métodos donde intervenga el reconocimiento del marcador de las células T humanas (Parkinson y Mier, 1983). El hecho que el IOR-T1 sea una IgG₁, inmunoglobulina que no fija adecuadamente el complemento, le confiere la posibilidad de ser utilizado en métodos de radioinmuno-detección *in vivo* (Order, 1982) por su probable poco efecto citotóxico directo sobre las células T inmunocompetentes, no provocando durante la prueba una inmunodeficiencia celular secundaria.

Teniendo en cuenta las posibilidades y ventajas que ofrece el método de obtención de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, se ha podido profundizar en el conocimiento de los antígenos tumor asociados de las neoplasias malignas y particularmente en las enfermedades linfoproliferativas (Negoro y Seon, 1982; Bernard *et al.*, 1982).

El AcM IOR-T2 se caracterizó fundamentalmente por el reconocimiento de un alto porcentaje de CMP de los pacientes con linfomas T cutáneos y un bajo porcentaje de las CMP de los individuos sanos. Estos resultados *a priori* sugieren que el IOR-T2 pudiera estar reconociendo un antígeno tumor asociado a las células malignas de los linfomas T cutáneos, aunque esta hipótesis no queda justificada completamente por el hecho que el IOR-T2 reconoce un alto porcentaje de CMP del paciente con Micosis Fungoide, el cual por definición clínica no debe tener células tumorales en circulación (Souteyrand y Thivolet, 1981).

El hecho que el IOR-T2 reconozca un marcador de membrana presente en bajas proporciones en las CMP de los individuos sanos, sugiere que este AcM parece identificar, al menos, un antígeno tumor asociado relacionado con alguna de las etapas de la progresión y/o proliferación de las células neoplásicas de los pacientes con linfomas T cutáneos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la licenciada L. Cabrera y a la doctora S. Hernández, que amablemente nos brindaron el sobrenadante de cultivo de células endoteliales de cordón umbilical humano para nuestro trabajo, y a las técnicas M. E. García, M. Zaldívar e I. Beausoleil por sus excelentes colaboraciones.

Este trabajo se realizó en el marco de la colaboración existente entre el Departamento de Biología del Instituto de Oncología y Radiobiología de Cuba y el Departamento de Inmunología Clínica, Hospital de Huddinge, Suecia, parcialmente financiado por la agencia sueca SAREC.

Tabla 1
COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON EL OKT 3 Y EL IOR-T1
CON EL METODO DE IFI

<i>Muestras</i>	<i>OKT 3*</i>	<i>IOR-T1*</i>	<i>t-Student</i>
Control 1	74	69	
Control 2	74	84	
Control 3	72	74	
Control 4	78	78	
Control 5	66	71	
Control 6	71	76	
Control 7	68	72	
$\bar{X} \pm DS$	72 ± 4	75 ± 2	NS
Molt 4	0	0	
Raji6HAT	0	0	
K562	0	0	
Leucemia linfoblástica aguda	77	77	
Leucemia linfoblástica aguda	83	72	
Leucemia mieloide	NT	2	
Leucemia mieloide	NT	0	

Nota: \bar{X} : media, DS: desviación estándar, NT: no testado, NS: no significativo.

(*) Los valores representan porcentajes de células positivas por IFI.

Tabla 2
COMPARACION DE LOS VALORES OBTENIDOS
MEDIANTE LA TECNICA DE ROSETAS ESPONTANEAS Y POR IFI, UTILIZANDO EL IOR-T1

<i>Muestras</i>	<i>IOR-T1*</i>	<i>Rosetas E**</i>	<i>t-Student</i>
Controles			
1	69	72	
2	84	52	
3	74	68	
4	58	68	
5	60	57	
6	72	64	
7	58	52	
8	73	79	
$\bar{X} \pm DS$	$68,5 \pm 8,6$	64 ± 9	NS

Nota: \bar{X} : media, DS: desviación estándar, NS: no significativo.

(*) Los valores representan porcentajes de células positivas por IFI.

(**) Los valores representan porcentajes de células positivas por rosetas E.

Tabla 3
CUANTIFICACION DE ROSETAS E POSITIVAS AL IOR-T1

<i>Muestra</i>	<i>Rosetas E marcadas por IOR-T1 (%)</i>	<i>Rosetas E no marcadas por IOR-T1 (%)</i>
Control 1	92	8
Control 2	94	6

Tabla 4
RESULTADOS OBTENIDOS UTILIZANDO EL IOR-T1 E IOR-T2
MEDIANTE LA TECNICA DE IFI EN INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES
CON LINFOMAS T CUTANEOS

<i>Control</i>	<i>IOR-T1*</i>	<i>IOR-T2*</i>	<i>t-Student</i>
1	72	6	
2	63	5	
3	60	12	
4	58	6	
5	80	7	
6	58	7	
7	78	13	
8	71	4	
9	76	4	
10	72	5	
11	74	4	
$\bar{X} \pm DS$	69 ± 8	$6,6 \pm 3$	$p < 0,005$
Síndrome Sézary	97	38	
Micosis Fungoide	79	64	

Nota: \bar{X} : media, DS: desviación estándar.

(*) Los valores representan % de células positivas por IFI.

REFERENCIAS

- ASTALDI, G. C. B.; M. C. JANSSEN; P. M. LANSDORP; C. WILLERUS; W. P. ZEIJBMAKER y F. OOSTERHOF (1980). *Human endothelial culture supernatant (HECS): a growth factor for hybridomas*. *J. Immunol.* **125**, 1411-1418.
- BAST, R. C.; J. RITZ; J. M. LIPTON; M. FEENEY; S. E. SALLAN; D. G. NATHAN y S. F. SCHLOSSMAN (1982). *Elimination of leukemic cells from human bone marrow using monoclonal antibody and complement*. *Cancer Research* **43**, 1389-1394.

- BERNARD, A.; B. RAYNAL; J. LERNERIE y L. BOUMSELL (1982). *Changes in surface antigens on malignant T cells from lymphoblastic lymphomas at relapse: an appraisal with monoclonal antibodies and microfluorometry*. Blood **59**(4), 809-815.
- BRAUN, R.; H. TEUTE; H. KIRCHNER y K. MUNK (1982). *Rapid separation of T cell subpopulations with monoclonal antibodies and affinity chromatography*. J. Immunol. Meth. **54**, 251.
- CHANG, T. W.; P. C. KUNG; S. T. GINGRAS y G. GOLDSTEIN (1981). *¿Does OKT 3 monoclonal antibody react with an antigen-recognition structure on human T cells?* Proc. Natl. Acad. Sci **78**, 1805-1808.
- COTNER, T.; M. HEMLER y J. B. STROMINGER (1981). *Human T cell Protein recognized by rabbit heteroantiserum and monoclonal antibodies*. Int. J. Immunol. Pathol. **3**, 255-268.
- DOUGLAS, S. D. (1980). *Cells involved in immune responses*. En: Basic and Clinical Immunology. Ed. H. H. Fudenberg, D. P. Stittes, J. L. Coldwell y J. V. Wells 3rd. Ed., chap. 9, pp. 96-114, Lange Medical Pub. Calif.
- EPSTEIN, M. A.; B. G. ACHONG; Y. M. BARR; B. ZATAC; G. HENLE y W. HENLE (1966). *Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblast (strain Raji)*. J. Natl. Canc. Inst. **37**, 547-559.
- GARCIA, C. A. y C. SILVA (1979). *Cultivo y estimulación de linfocitos humanos purificados con Verografin*. Reporte preliminar. Rev. CENIC **10**, 199-203.
- GAVILONDO, J. V.; C. A. GARCIA; A. FERNANDEZ; A. M. VAZQUEZ; J. F. AMADOR; L. CABRERA y C. HERNANDEZ (1984). *Obtención de hibridomas de ratón productores de anticuerpos monoclonales que reconocen células humanas de origen T. I. Inmunización, fusión y selección de híbridos secretores*. Rev. Cub. Oncología (en prensa).
- HUDSON, C. y F. HAY (1980). *Practical Immunology*. Blackwell Scientific Publications 2nd. Ed. London Edimburgh, Boston, Melbourne.
- JANOSY, G.; N. TIDMAN; E. S. PAPAGEORGIOU; P. C. KUNG y G. GOLDSTEIN. *Distribution of T lymphocyte subsets in the human bone marrow and thymus: an analysis with monoclonal antibodies*. J. Immunol. **126**, 1608-1613.
- KEARNEY, J. F.; A. RADBRUCH; B. LIESEGANG y K. RAJEWSKY (1979). *A new mouse myeloma cell line which has lost immunoglobulin expression but permits construction of antibody-secreting hybrid cell lines*. J. Immunol. **123**, 1548-1550.
- KENNETT, R. H. (1980). *Microcytotoxicity assay in monoclonal antibodies. Hybridomas: a new dimension in biological analysis*. Ed. R. H. Kennett, T. J. McKearn y K. B. Bechtol., pp. 391-392. Plenum Press, New York-London.
- KENNETH, A. F.; R. W. SCHROFF y R. P. GALE (1982). *Surface markers on Leukemia and lymphoma cells: Recent Advances*. Blood **60**/1, 1-19.
- KNOWLES II, D. M. y J. P. HALPER (1982). *Human T cell malignancies: correlative clinical histopathologic and cytochemical analysis of 23 cases*. Am. J. Pathol. **106**, 187-203.
- KOHLER, G. y C. MILSTEIN (1975). *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature **256**, 495-497.
- KOHLER, G. (1981). *The technique of hybridoma production*. Immunological Methods. Vol. II, 285-298.
- KUNG, P. C.; G. GOLDSTEIN; E. L. REINHERZ y S. F. SCHLOSSMAN (1979). *Monoclonal antibodies defining distinctive T cell surface antigens*. Science **206**, 347-349.
- KUNG, P. C. y G. GOLDSTEIN (1980). *Functional and developmental compartments on human T lymphocytes*. Vox Sanguinis **39**, 14-127.

- LANDERGREEN, U. (Comunicación personal).
- LITTLEFIELD, J. W. (1964). *Selection of hybrids from mating of fibroblasts in vitro and their presumed recombinant*. *Science* **145**, 709-711.
- LOZZIO, C. B. y B. B. LOZZIO (1975). *Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome*. *Blood* **45**, 321-326.
- MINOWADA, J.; B. OHNUNAT y G. E. MOORE (1972). *Brief communication: Rossette-forming lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocyte*. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 891-895.
- MITTER, R. S.; M. A. TALLE; K. CARPENTER; P. E. RAO y G. GOLDSTEIN (1983). *Generation and characterization of monoclonal antibodies reactive with human B lymphocytes*. *J. Immunol.* **131**, 1754-1761.
- NADLER, L. M.; P. STASHENKO; E. L. REINHERZ; J. RITZ; R. HARDY y SCHOLOSSMAN (1982). *Expression of normal differentiation antigens on human leukemia and lymphoma cells*. En: *Malignant Lymphoma* (Ed. S. A. Rosenberg y H. S. Kaplan), pp. 107-119. Academic Press. New York-London.
- NAGEL, J. E.; F. J. CHREST y W. H. ADLER (1981). *Enumeration of T lymphocyte subsets by monoclonal antibodies in young and aged humans*. *J. Immunol.* **127**, 2086-2088.
- NEGORO, S. y B. K. SEON (1982). *Several new monoclonal antibodies directed to human T cell leukemia antigens*. *Cancer Research* **42**, 4259-4262.
- OUCHTERLONY, O. y L. A. NIELSSON (1978). *Immunodiffusion and immunoelectrophoresis*. *Handbook of Experimental Immunology* (Ed. D. M. Weir), p. 196. Blackwell Scientific Publication. Oxford, London, Edimburgh, Melbourne.
- ORDER, S. E. (1982). *Monoclonal antibodies: Potential role in radiation therapy and oncology*. *Radiation Oncology Biol. Phys.* **8**, 1193-1201.
- Ortho-mune Monoclonal Antibodies*. Product Monograph, Ortho Diagnostic Systems (1982).
- PARKINSON, D. R. y J. W. MIER (1983). *T lymphocyte malignancies: Recent advances in the understanding of their Biology, Diagnosis and Treatment*. *Clinical Immunology Reviews* **2** (1), 59-121.
- PRENTICE, H. G.; G. JANOSSY; D. SKEGGS; H. A. BLACKLOCK; K. F. BRANDSTOCK; G. GOLDSTEIN y A. V. HOFFBRAND (1982). *Use of anti T cell monoclonal antibody OKT 3 to prevent acute graft-versus-host disease in allogenic bone marrow transplantation for acute leukemia*. *The Lancet* **1**, 700-703.
- RABELLINO, E.; S. COLON; H. M. GREY y E. R. UNANUE (1971). *Immunoglobulin on the surface of lymphocytes. I. Distribution and quantitation*. *J. Exp. Med.* **33**, 156-167.
- REINHERZ, E. L.; P. C. KUNG; G. GOLDSTEIN y S. F. SCHLOSSMAN (1979). *A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally nature thymocytes and all peripheral human T cells*. *J. Immunol.* **123**, 1312-1317.
- SCHAFFER, L. A. (1975). *Permanent slide preparations of T lymphocyte sheep red blood cell rosettes*. *J. Immunol. Meth.* **8**, 241-250.
- SOUTEYRAND, P. y J. THIVOLET (1981). *Mycosis fungoides and Sezary syndrome*. *Path. Res. Pract.*, pp. 171-240.
- VAN DE GRIEND, R. J.; H. G. DEBRUIN; H. C. RUMKE; R. VAN DOORN; D. ROOS y A. ASTALDI (1982). *Isolation and partial characterization of a novel subset of human T lymphocytes defined by monoclonal antibodies*. *Immunology* **47**, 313.
- VAN WAUWE, J. P.; J. R. DE MEY y J. G. GOOSSENS (1980). *OKT 3: A monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties*. *J. Immunol.* **124**, 2708-2713.
- ZARLING, J. M. y P. C. KUNG (1980). *Monoclonal antibodies which distinguish between human NK cells and cytotoxic T lymphocytes*. *Nature* **288**, 394-396.