

Obtención de hibridomas de ratón productores de anticuerpos monoclonales que reconocen células humanas de origen T. III. Determinación del reconocimiento ultraestructural de los anticuerpos monoclonales IOR-T1 e IOR-T2.

**T. RODRÍGUEZ OBAYA, C. GARCÍA SANTANA, A. M. VÁZQUEZ LÓPEZ, B. TORMO BRAVO y
J. GAVILONDO COWLEY**

**Departamento de Biología, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR), MINSAP
29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba**

Recibido el 10 de agosto de 1984

RESUMEN

La combinación de métodos inmunológicos y ultraestructurales constituye un elemento fundamental para la identificación de las características del reconocimiento celular de los anticuerpos monoclonales. En el presente artículo se reporta la aplicación de la técnica de inmunoperoxidasa para microscopía electrónica, en la dilucidación del reconocimiento celular y la ubicación de las estructuras antigénicas identificadas por los anticuerpos monoclonales IOR-T1 e IOR-T2, utilizando como sustrato antigénico células mononucleares de sangre periférica de individuos normales y de pacientes con linfomas T cutáneos. Se determinó que el IOR-T1 reconoce un marcador de superficie celular característico de los linfocitos humanos T normales, que puede ser expresado también por células tumorales del mismo origen. El IOR-T2 identifica exclusivamente una parte de la población tumoral celular con características morfológicas compatibles con las células de Sézary, provenientes de la sangre periférica de dos pacientes con linfomas T cutáneos.

ABSTRACT

The combination of immunological and ultrastructural methods constitutes a fundamental element for the identification of the characteristics of cell recognition by monoclonal antibodies. In this article we report on the application of the technique of immunoperoxidase for electron microscopy in the determination of the cellular recognition and for the localization of the identified antigens, for IOR-T1 and IOR-T2 monoclonal antibodies. In our study we employed mononuclear cells of peripheral blood from normal individuals and patients with cutaneous T lymphomas, as antigenic substrate. It was determined that IOR-T1 recognizes a cell surface marker characteristic of normal human T lymphocytes, that can also be expressed by tumor cells of the same origin. IOR-T2 identifies exclusively a portion of the tumor cell population with morphological characteristics of Sezary cells, from the peripheral blood of two patients with cutaneous T lymphomas.

INTRODUCCION

En la década anterior (1970-1980) surgió una nueva concepción en la clasificación de las enfermedades linfoproliferativas, al comenzar a usarse los marcadores inmunológicos encontrados en las células linfoides normales para el estudio del origen celular de ellas (Lukes y Collins, 1974; Taylor, 1978; Berard *et al.*, 1978). Posteriormente, estos marcadores comenzaron a ser relacionados con diferentes estadios de diferenciación y maduración de las células normales y la expresión de éstos en distintos tipos de leucemias y linfomas incidió positivamente como factor indicativo del pronóstico y la terapéutica de estas enfermedades (Bowman *et al.*, 1980).

Uno de los marcadores inmunológicos más estudiados es aquel que caracteriza a los linfocitos T. Estas células se han identificado clásicamente por su habilidad de unirse espontáneamente a los eritrocitos de carnero, formando las llamadas "Rosetas E" (Ross y Winchester, 1980), y mediante antiseros policlonales específicos (MacMahon-Pratt *et al.*, 1980; Cotner *et al.*, 1981). Otros métodos han permitido la definición de subpoblaciones de linfocitos T con diferentes funciones en la respuesta inmunológica, basándose igualmente en la capacidad de reconocimiento y unión de células heterólogas a las distintas estructuras superficiales exhibidas por estas subpoblaciones (Ross y Winchester, 1980).

Actualmente, los anticuerpos monoclonales (AcM, ver revisiones en: Köhler, 1981; Waldmann y Milstein, 1982; Gavilondo, 1984), que reconocen los marcadores que expresan las células de estirpe T, están sustituyendo progresivamente los métodos tradicionales de identificación de estos linfocitos. Los AcM han permitido un análisis refinado de las etapas del proceso de diferenciación de las células T normales (Ortho-mune Monoclonal Antibodies 1982; Parkinson y Mier, 1983) y del patrón antigénico superficial que se expresa en las células T malignas (Greaves, 1981; Foon *et al.*, 1982; Nadler *et al.*, 1982; Parkinson y Mier, 1983), lográndose una mejor comprensión de la patogenia, y una adecuada clasificación de las enfermedades linfoproliferativas malignas con este origen. La posibilidad de obtener AcM contra antígenos tumor-asociados poco representados en las células normales maduras ha abierto, además, una vía potencialmente útil para la inmunoterapia de leucemias y linfomas (Ritz y Schlossman, 1982; Damjanov y Knowles, 1983).

La Micosis Fungoides y el Síndrome de Sézary estuvieron entre los primeros linfomas clasificados inmunológicamente como derivados de las células T (Lukes y Collins, 1974; Brouet *et al.*, 1973; Broder *et al.*, 1981). Los AcM contra subpoblaciones de linfocitos han verificado su origen y permitido identificar que las células tumorales se derivan de la transformación de linfocitos T "maduros" con fenotipo "auxiliador" (Kung *et al.*, 1981). Estas dos enfermedades se caracterizan por el dermatotropismo positivo que exhiben sus células malignas, aunque el Síndrome de Sézary es leucemoide desde sus inicios y se pueden encontrar células tumorales circulantes; ambas enfermedades se consideran variantes de un mismo proceso, denominándose genéricamente como linfomas T cutáneos (Bowman *et al.*, 1981; Souteyrand y Thivolet, 1981). Recientemente se han obtenido AcM que reconocen antígenos relacionados con las células tumorales de los linfomas T cutáneos (Haynes *et al.*, 1981 b; Haynes y Metzgar, 1981) y cuya completa caracterización queda aún por realizar.

Utilizando la técnica de fusión de células somáticas (Köhler y Milstein, 1975) para la hibridación de un mieloma de ratón y células esplénicas de animales inmunizados con células mononucleares periféricas (CMP) de un paciente con el Síndrome de Sézary, nuestro grupo ha producido los AcM IOR-T1 e IOR-T2. Después de los estudios comparativos realizados con AcM

comerciales y la técnica de rosetas E, se ha podido determinar que el IOR-T1 reconoce un marcador asociado a células T humanas; el AcM IOR-T2 parece identificar un antígeno tumor-asociado de las células circulantes en los linfomas T cutáneos, poco representado en las CMP de individuos aparentemente sanos (Gavilondo *et al.*, 1984; García *et al.*, 1984).

Un elemento esencial para la completa caracterización de estos AcM es la verificación del tipo celular identificado y la ubicación del antígeno reconocido. El presente trabajo reporta el reconocimiento ultraestructural de los AcM IOR-T1 e IOR-T2, empleando la técnica de inmunoperoxidasa para la microscopía electrónica de transmisión y utilizando como sustrato antigénico CMP de individuos normales y de pacientes con linfomas T cutáneos.

MATERIALES Y METODOS

Células mononucleares de sangre periférica (CMP)

Las suspensiones de CMP se obtuvieron a partir de la sangre periférica de tres individuos aparentemente sanos (controles) y de dos pacientes con diagnóstico clínico e histológico de Síndrome de Sézary y Micosis Fungoides, respectivamente. Se utilizó el método de centrifugación en gradiente de densidad (García y Silva, 1979), ligeramente modificado para la sangre de los controles; en éstos se empleó una densidad específica de 1.080 g/cm³ con el propósito de obtener alguna contaminación con granulocitos y eritrocitos en las muestras.

Anticuerpos monoclonales

Se utilizaron los AcM IOR-T1 e IOR-T2, secretados por hibridomas estables obtenidos mediante la fusión de células de mieloma de ratón P3/x63-Ag8-653 y células esplénicas de ratones Balb/cHab, inmunizados con CMP de un paciente con el Síndrome de Sézary (Gavilondo *et al.*, 1984).

El IOR-T1 fue utilizado en forma purificada, después de pasar líquido ascítico rico en anticuerpos a través de una columna de Sepharosa 4B activada con CNBr (Pharmacia), a la cual se le acopló IgG de conejo anti-IgG de ratón (García *et al.*, 1984). El IOR-T2 fue utilizado en forma de líquido ascítico clarificado por centrifugaciones sucesivas.

Inmunoperoxidasa indirecta para microscopía electrónica

Las CMP obtenidas se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF⁻), pH 7,2 a 4°C, utilizándose 1×10^7 células para cada ensayo. Las muestras se incubaron a 4°C durante 30 minutos con 2% de líquido ascítico clarificado producido por la línea P3/x63-Ag8-653 (García *et al.*, 1984), en SSTF⁻. Después de centrifugar las muestras a 400 g durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas e incubadas a 4°C durante 60 minutos con 50 µl de una dilución 1:30 de los AcM IOR-T1 e IOR-T2, en SSTF⁻. Se lavaron tres veces las muestras a 4°C, 400 g y 10 minutos en el mismo tampón y las células se incubaron 30 minutos a 4°C con 2% de suero de conejo normal, en SSTF⁻. Al término, se centrifugaron como fue descrito anteriormente y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron e incubaron a 4°C y durante 30 minutos con 50 µl de una dilución 1:30 de suero de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma), en SSTF⁻.

Después de tres lavados con SSTF, las células fueron fijadas a 4°C con glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato 0,15 M, pH 7,3, durante 30 minutos. Al término se procedió a lavar tres veces con tampón Tris-HCl 0,15 M, pH 7,2 y los botones celulares se resuspendieron en 2 ml del tampón sustrato (6 mg de tetraclorhidrato de diaminobencidina +10 μ l de H₂O₂ al 30% + 10 ml de tampón Tris-HCl), deteniéndose la reacción al cabo de 10 minutos mediante tres lavados con tampón fosfato 0,15 M, pH 7,3. La posfijación de las células se realizó con OsO₄ al 1% en igual tampón. Las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol, para ser incluidas finalmente en Epon 812. Los bloques fueron cortados en un ultramicrotomo Ultratome III (LKB); se estudiaron rejillas con contraste y sin él, de uranil-acetato y citrato de plomo, en un microscopio Hitachi H-300.

RESULTADOS

Controles normales

La mayoría de las células presentes en las muestras de los tres controles normales poseían núcleo redondeado y escaso citoplasma, donde podía observarse la presencia de numerosos ribosomas libres, mitocondrias y un retículo pobremente desarrollado (figura 1), morfología compatible con aquella de los linfocitos maduros de sangre periférica. Después de la incubación de las muestras con el AcM IOR-T1 y la realización de la técnica de inmunoperoxidasa, una elevada proporción de este tipo celular mostró sobre su membrana citoplasmática un precipitado de alta densidad electrónica, distribuido en forma de "parches" sobre la superficie celular, indicativo del reconocimiento de alguna estructura antigénica por este AcM (figura 2). Otros tipos celulares también presentes y compatibles por su morfología con polimorfonucleares y monocitos no evidenciaron reacción sobre la membrana, presentando únicamente evidencias de la actividad de la peroxidasa endógena en sus gránulos citoplasmáticos, aspecto este que sirvió además como dato de control de la propia técnica (figura 3).

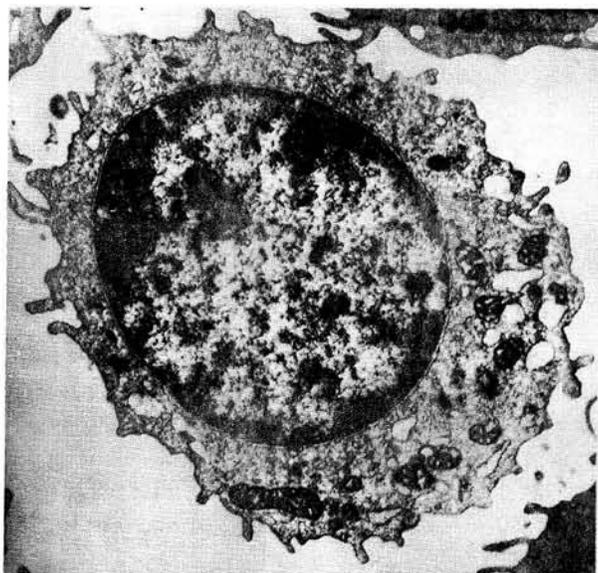


FIG. 1. Microfotografía electrónica que muestra la ultraestructura típica de un linfocito maduro presente en las muestras de los controles sanos. Obsérvese el núcleo redondeado y el citoplasma con escasos organelos (x 17 500).



FIG. 2. Microfotografía electrónica de la membrana citoplasmática de un linfocito normal proveniente de las muestras del grupo control, incubado con el AcM IOR-T1 y sometido a la técnica de inmunoperoxidasa. La flecha señala la reacción positiva sobre la superficie. Sin contraste (x 40 000).

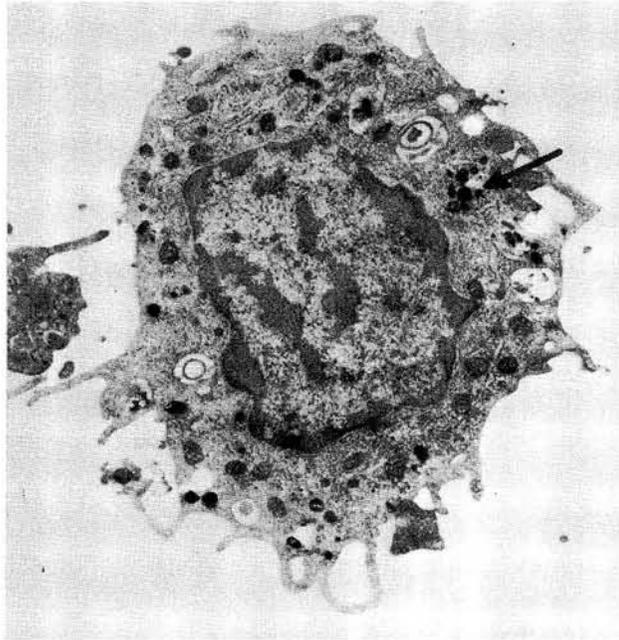


FIG. 3. Microfotografía electrónica que muestra las características ultraestructurales de un monocito proveniente de una muestra del grupo control. Puede observarse la presencia de numerosos gránulos peroxidasa-positivos en su citoplasma y la ausencia de reacción en la superficie celular (x 9 800).

Cuando las muestras de los casos-contrales se incubaron con el AcM IOR-T2, no se pudo evidenciar marcaje específico alguno sobre los linfocitos y leucocitos observados.

Linfomas T cutáneos

Entre las células mononucleares presentes en las muestras de sangre periférica de los dos pacientes con el Síndrome de Sézary y la Micosis Fungoides, se identificaron, además de tipos celulares compatibles con los descritos para los controles, células atípicas de tamaño variable (entre unas 10 y 20 micras), citoplasma con escasos organelos y núcleo con alteraciones morfológicas que iban desde indentaciones en su envoltura hasta un típico aspecto cerebriforme (figura 4); la proporción relativa en las muestras de este tipo celular fue superior para el Síndrome de Sézary.



FIG. 4. Microfotografía electrónica de una célula atípica tumoral característica de los linfomas T cutáneos. El núcleo presenta aspecto "cerebriforme" y el citoplasma exhibe muy escasos organelos. Sin contraste (x 14 000).

El AcM IOR-T1 identificó antígenos de superficie celular en casi el 100% de las células atípicas estudiadas en ambos pacientes (figura 5). Después de la incubación de las muestras con el IOR-T2, se pudo comprobar que además de que sólo reaccionaba con células atípicas, el reconocimiento de estructuras de membrana sólo se producía en parte de esta población celular, tanto en uno como en otro paciente.

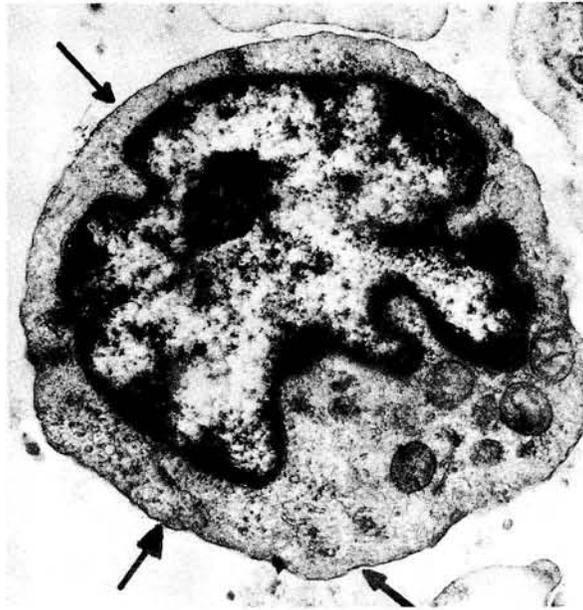


FIG. 5. Microfotografía electrónica de una célula tumoral típica característica de los linfomas T cutáneos. Obsérvense las indentaciones nucleares así como su citoplasma con escasos organelos. En su membrana puede identificarse el tipo de marcaje característico obtenido en la mayoría de las células incubadas con el AcM IOR-T1 y en parte de la población después de la incubación con el IOR-T2. Sin contraste (x 14 000).

DISCUSION

Con la ayuda de los AcM que reconocen diferentes estadios de diferenciación de las células linfoides normales, se ha podido comprobar que el patrón antigénico que muestran en su superficie las células linfoides tumorales puede estar relacionado con estadios discretos de la diferenciación normal (Bernard *et al.*, 1982; Nadler *et al.*, 1982). Los AcM estudiados por nosotros fueron generados a partir de la estimulación antigénica efectuada por CMP de un paciente con el Síndrome de Sézary, que es considerado como un linfoma T de fenotipo "maduro" (Boumsell *et al.*, 1983; Souteyrand y Thivolet, 1981; Parkinson y Mier, 1983). El IOR-T1 reconoció estructuras superficiales de la membrana citoplasmática en una alta proporción de células con características morfológicas compatibles con las de linfocitos maduros normales. Si bien en trabajos anteriores habíamos sugerido, sobre la base de estudios de inmunofluorescencia indirecta, que este AcM debía reconocer un marcador de células T humanas (García *et al.*, 1984), el empleo del método de inmunoperoxidasa para microscopía electrónica permitió ubicar las estructuras identificadas como superficiales y demostró morfológicamente que el IOR-T1 no reconoce otras células hematopoyéticas normales, reafirmando su especificidad.

Existen evidencias que sugieren que los tumores pueden derivarse de la expansión clonal de una sola célula (Sikora y Lennox, 1982), de ahí que si no se pierden con la transformación, los antígenos de diferenciación normales pueden ser expresados por la mayoría de las células malignas. Se ha reportado que el AcM 3A1 (Haynes *et al.*, 1981 b) es capaz de reconocer el 85% de los linfocitos normales circulantes, pero no reacciona con las células de Sézary,

a diferencia de los resultados obtenidos con las series de AcM OKT y Leu (Boumsell *et al.*, 1981; Haynes *et al.*, 1981 a y b; Kung *et al.*, 1981; Laroche y Bach, 1981; Schroff *et al.*, 1982; Foon *et al.*, 1982) que son capaces de identificar tanto a unos como a otras. El AcM IOR-T1 también reconoció una alta proporción de células con núcleos cerebriforme, característico de las células tumorales de los linfomas T cutáneos (Rosa-Uribe *et al.*, 1973; Souteyrand y Thivolet, 1981).

Estas diferencias en el reconocimiento celular de los AcM mencionados pueden atribuirse a la presencia de distintos epítopes en un mismo antígeno de diferenciación, cuya existencia ya ha sido sugerida por los estudios de Cotner *et al.* (1981) para el marcador de células T humanas. Los resultados preliminares de la comparación de los AcM IOR-T1 y OKT-3 sugieren que éstos identifican epítopes distintos en este marcador (U. Landergreen*); de confirmarse esto, la transformación maligna de las células T en los linfomas cutáneos no afecta al marcador de células T normal al menos en dos de sus epítopes.

El AcM IOR-T2 no reconoció CMP de los individuos controles; en estudios anteriores basados en la técnica de inmunofluorescencia indirecta (García *et al.*, 1984), habíamos encontrado que este AcM podía identificar entre 4% y 12% de CMP de individuos aparentemente sanos. Estas diferencias en los resultados son explicables teniendo en cuenta que en los estudios por microscopía electrónica no es factible analizar un número suficiente de células como el requerido cuando el marcador está poco representado en la población celular. Es evidente también que el IOR-T2 está identificando un antígeno expresado muy discretamente en células normales.

Resultó, por tanto, de mucho interés determinar que el AcM IOR-T2 no reconoce todas las células de morfología atípica presentes en la sangre periférica de ambos pacientes con linfomas T cutáneos y que aquellas identificadas no poseen características morfológicas que las distinguen del resto de las células tumorales. Este tipo de observación sólo podía ser realizada mediante estudios ultraestructurales a causa de que la técnica de inmunofluorescencia indirecta empleada en trabajos anteriores (García *et al.*, 1984) no permitía una precisión de la morfología de las células identificadas.

Nuestros resultados indican que el AcM IOR-T2 está reconociendo un antígeno asociado al tumor, distinto del marcador de las células T maduras discutido anteriormente. Su presencia muy discreta en CMP de individuos normales, así como en sólo parte de la población de células tumorales, sugieren que este antígeno puede estar relacionado con la proliferación y/o etapas de la progresión neoplásica de las células T malignas circulantes en los linfomas cutáneos; ésta puede ser, por ejemplo, una variación antigénica producida en la superficie de parte de la población de células tumorales, semejante a la reportada para células T malignas durante las recaídas de la enfermedad en pacientes con linfomas linfoblásticos T (Bernard *et al.*, 1982) o producto de la expresión de receptores de factores de crecimiento o inmunomoduladores.

Por último, queremos destacar que el análisis ultraestructural indicó que el paciente con Micosis Fungoides presentaba células atípicas en periferia, característica esta de las etapas finales de esta enfermedad (Souteyrand y Thivolet, 1981; Parkinson y Mier, 1983); la verificación del reconocimiento celular del AcM IOR-T2 hace que éste pudiera ser potencialmente útil para la identificación precoz de la etapa leucémica en esta enfermedad, empleando técnicas convencionales de inmunofluorescencia indirecta.

* Comunicación personal.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS

- BERARD, C. W.; E. S. JAFFE; R. C. BRAYLAN; R. B. MANN y K. NANBA (1978). *Immunologic Aspects and Pathology of the Malignant Lymphomas*. Cancer **42**, 911-921.
- BERNARD, A.; B. RAYNAL; J. LEMERIE y L. BOUMSELL (1982). *Changes in Surface Antigens and Malignant T Cells from Lymphoblastic Lymphomas at Relapse: an Appraisal with Monoclonal Antibodies and Microfluorometry*. Blood **59**, 808-815.
- BOUMSELL, L.; A. BERNARD; E. L. REINHERZ; L. M. NADLER; J. RITZ; H. COPPIN; Y. RICHARD; L. DEGOS; J. LEMERIE; G. GLANDRIN; J. DAUSSET y S. F. SCHLOSSMANN (1981). *Surface Antigens on Malignant Sezary and T-CLL Cells Correspond to that of Mature T Cells*. Blood **57**, 526-530.
- BOWMAN, W. P.; S. MELVIN y A. M. MAURER (1980). *Cell Markers in Lymphomas and Leukemias*. En: *Advances in Internal Medicine*. Ed. G. H. Stollerman. Vol. **25**. Year Book Medical Pub. Inc. Chicago-London, pp. 391-425.
- BRODER, S.; R. I. EDELSON; M. A. LUTZNER; D. I. NELSON; R. P. MACDERMOTT; M. E. DURM; C. K. GOLDMAN; B. D. MEADE y T. A. WALDMANN (1977). *The Sezary Syndrome. A Malignant Proliferation of Helper T Cells*. J. Clin. Invest. **58**, 1297-1305.
- BROUET, J. C.; G. FLANDRIN y M. SELIGMANN (1973). *Indications of the Thymus-Derived Nature of the Proliferating Cells in Six Patients with Sezary's Syndrome*. New Engl. J. Med. **289**, 341-344.
- COTNER, T.; M. HEMLER y J. B. STROMINGER (1981). *Human T Cell Protein Recognized by Rabbit Heteroantisera and Monoclonal Antibodies*. Int. J. Immunopathol. **3**, 255-268.
- DAMJANOV, I. y B. B. KNOWLES (1983). *Biology of Disease. Monoclonal Antibodies and Tumor-Associated Antigens*. Lab. Invest. **48**, 510-542.
- FOON, K. A.; R. W. SCHROFF y R. P. GALE (1982). *Surface Markers on Leukemia and Lymphoma Cells: Recent Advances*. Blood **60**, 1-19.
- GARCIA, C. A. y C. SILVA (1979). *Cultivo y estimulación de linfocitos humanos purificados con Verografín. Reporte preliminar*. Rev. CENIC **10**, 199-203.
- GAVILONDO, J. V. (1984). *Anticuerpos monoclonales: obtención y aplicaciones*. Rev. Cub. Invest. Biomed. (en prensa).
- GAVILONDO, J. V.; C. A. GARCIA; A. FERNANDEZ; A. M. VAZQUEZ; J. F. AMADOR; L. CABRERA y S. 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. Oncol. (en prensa).
- GARCIA, C. A.; J. V. GAVILONDO; J. F. AMADOR; A. M. VAZQUEZ y A. FERNANDEZ (1984). *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*. Interferón y Biotecnología (en proceso de publicación).

- GREAVES, M. F. (1981). *Analysis of the Clinical and Biological Significance of Lymphoid Phenotypes in Acute Leukemia*. *Cancer Res.* **41**, 4762-4766.
- HAYNES, B. F. y R. S. METZGAR (1981). *Letter to the Editor*. *N. Engl. J. Med.* **305**, 831-832.
- HAYNES, B. F.; P. BUNN; D. MANN; C. THOMAS; G. S. EISENBARTH; J. MINNA y A. S. FAUCI (1981 a). *Cell Surface Differentiation Antigens of the Malignant T Cell in Sezary Syndrome and Mycosis Fungoides*. *J. Clin. Invest.* **67**, 523-530.
- HAYNES, B. F.; R. S. METZGAR; J. D. MINNA y P. A. BUNN (1981 b). *Phenotypic Characterization of Cutaneous T Cell Lymphoma. Use of Monoclonal Antibodies to Compare with Other Malignant T Cells*. *N. Engl. J. Med.* **304**, 1319-1323.
- 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. Eds. I. Lefkovits, B. Pernis. Academic Press. New York, pp. 285-298.
- KUNG, P. C.; C. L. BERGER; G. GOLDSTEIN; P. COGERTO y R. L. EDELSÓN (1981). *Cutaneous T Cell Lymphoma. Characterization by Monoclonal Antibodies*. *Blood* **57**, 261-266.
- LAROCHE, L. y J. F. BACH (1981). *T Cell Imbalance in Nonleukemic and Leukemic Cutaneous Lymphoma Defined by Monoclonal Antibodies*. *Clin. Immunol. Immunopath.* **20**, 2778-2784.
- LUKES, R. J. y R. D. COLLINS (1974). *Immunologic Characterization of Human Malignant Lymphoma*. *Cancer* **34**, 1488-1503.
- MACMAHON-PRATT, D.; S. F. SCHLOSSMANN y J. L. STROMINGER (1980). *Human T Lymphocyte Surface Antigens: Partial Purification and Characterization Utilizing a High-Titer Heteroantiserum*. *J. Immunol.* **124**, 1449-1461.
- NADLER, L. M.; P. STASHENKO; E. L. REINHERZ; J. RITZ; R. HARDY y S. F. SCHLOSSMANN (1982). *Expression of Normal Differentiation Antigens on Human Leukemia and Lymphoma Cells*. En: *Malignant Lymphomas: Etiology, Immunology, Pathology and Treatment*. Eds. S. A. Rosenberg, H. Kaplan. Bristol Mayers Cancer Symposia. Academic Press. New York-London, pp. 107-119.
- Ortho-mune Monoclonal Antibodies (1982). *Product Monograph of Ortho Diagnostics*.
- PARKINSON, D. R. y J. W. MIER (1983). *T-Lymphocyte Malignancies: Recent Advances in the Understanding of their Biology, Diagnosis, and Treatment*. *Clin. Immunol. Rev.* **2**, 59-121.
- RITZ, J. y S. F. SCHLOSSMANN (1983). *Utilization of Monoclonal Antibodies in the Treatment of Leukemia and Lymphoma*. *Blood* **59**, 1-11.
- ROSA-URIBE, A.; D. VARIAKOJIS; Z. MOLNAR y H. RAPPAPORT (1974). *Mycosis Fungoides: an Ultrastructural Study*. *Cancer* **34**, 634-645.
- ROSS, G. D. y R. J. WINCHESTER (1980). *Methods for Enumerating Lymphocyte Populations*. En: *Manual of Clinical Immunology*. Eds. N. R. Rose, H. Friedman. Amer. Soc. Microbiol. Washington, pp. 213-228.
- SCHROFF, R. W.; K. A. FOON; R. J. BILLING y J. L. FAHEY (1982). *Immunologic Classifications of Lymphocytic Leukemia Based on Monoclonal Antibody Defined Cell Surface Antigens*. *Blood* **59**, 207-215.
- SIKORA, K. y E. LENNOX (1982). *Tumor Antigens*. En: *Clinical Aspects of Immunology*. Eds. P. J. Lachmann, D. K. Peters. Blackwell Sci. Pub. Oxford. Vol. II, pp. 1249-1269.
- SOUTEYRAND, P. y J. THIVOLET (1981). *Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome*. *Path. Res. Pract.* **171**, 240-261.

- TAYLOR, C. R. (1978). *Classification of lymphoma. "New thinkings" on Old Thoughts.* Arch. Pathol. Lab. Med. **102**, 549-554.
- WALDMANN, H. y C. MILSTEIN (1982). *Monoclonal Antibodies.* En: Clinical Aspects of Immunology. Vol. I. Eds. P. J. Lachmann, D. K. Peters. Blackwell Sci. Pub. Oxford, pp. 476-503.