

IOR-T2: Anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno de diferenciación de las células tímicas, presente en las células tumorales de pacientes con linfomas T cutáneos

ANA MARÍA VÁZQUEZ¹, RICARDO GISCOMBE², GÖRAN HOLM², ALVARO VELANDIA¹, ULF SUNDIN², GISELA GONZÁLEZ¹, JORGE GAVILONDO¹, MAGNUS BJÖRKHOLM³, CARLOS GARCÍA¹ y JULIO TAÍN⁴

1. Departamento de Biología Tumoral, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, 29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba.
2. Departamento de Inmunología Clínica, Hospital Universitario de Huddinge, F-71, S-141 86, Huddinge, Suecia.
3. Departamento de Medicina, Hospital de Danderyd, Estocolmo, Suecia.
4. Servicio de Cirugía, Instituto Nacional de Cardiología, 17 y A, Vedado, La Habana 4, Cuba.

Recibido el 9 de enero de 1986

RESUMEN

En el presente artículo se reportan las características del reconocimiento del anticuerpo monoclonal (AcM) IOR-T2 sobre células mononucleares normales activadas con Concanavalina A (Con A), células tímicas y líneas celulares de cultivo mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta; además, se realizó la determinación de la subclase de inmunoglobulina y del punto isoeléctrico de este AcM. Los resultados muestran que el AcM IOR-T2 es una IgG2b que no reconoce a los antígenos que se expresan durante el proceso de estimulación con Con A de las células linfoides normales. A diferencia de lo observado en las células mononucleares de la sangre periférica normal, el AcM IOR-T2 reconoce el 59 ± 3% de los timocitos fetales y el 16 ± 3% de las células de los timos pediátricos. El AcM IOR-T2 también tuvo reacción positiva con algunas de las líneas celulares de cultivo estudiadas.

Se concluye que el AcM IOR-T2 parece identificar a un antígeno de diferenciación de las células tímicas, el cual se expresa en un alto porcentaje de las células tumorales de la sangre periférica de pacientes con linfomas T cutáneos.

SUMMARY

In the present article we report the recognition characteristics of the monoclonal antibody (MAb) IOR-T2 when essayed against Concanavalin A (Con A) activated normal mononuclear cells, thymic cells and culture cell lines by the indirect immunofluorescence technique. The determination of the immunoglobulin subclass and isoelectric point of this MAb was also performed.

The results show that the IOR-T2 MAb is a IgG2b which does not recognize the antigens that are expressed during the Con A stimulation process of normal lymphoid cells.

Contrary to the results obtained with mononuclear cells from the normal peripheral blood, IOR-T2 recognizes $59 \pm 3\%$ of the fetal thymocytes and $16 \pm 3\%$ of pediatric thymic cells. The IOR-T2 MAb also evidenced a positive reaction with some of the culture cell lines. It was concluded that IOR-T2 MAb seems to identify a differentiation antigen of the thymic cells, which is expressed in a high percentage of the tumoral cells of the peripheral blood of cutaneous T lymphoma patients.

INTRODUCTION

En los últimos años se han generado AcM que identifican antígenos de diferenciación de las células T. Entre estos AcM se encuentran los que reconocen: a) linfocitos T de la sangre periférica y timocitos medulares (Kung *et al.*, 1979; Reinherz *et al.*, 1979; Reinherz *et al.*, 1980); b) timocitos corticales, pero no a las células T periféricas (McMichael *et al.*, 1979; Knowles *et al.*, 1982; Ishii *et al.*, 1983); y c) subpoblaciones funcionalmente diferentes de las células T periféricas y timocitos corticales (Reinherz *et al.*, 1979a; Reinherz *et al.*, 1980a).

Estos AcM dirigidos contra antígenos de diferenciación de las células T normales son de gran valor en la clasificación y diagnóstico de las leucemias y linfomas de este origen (Foon *et al.*, 1982; Nadler *et al.*, 1982; Sabol *et al.*, 1985).

En estudios preliminares se reportó que el AcM IOR-T2 pudiera reconocer un antígeno relacionado con las células mononucleares periféricas (CMP) tumorales de pacientes con linfomas T cutáneos (Gavilondo, *et al.*, 1985; García *et al.*, 1984; Rodríguez *et al.*, 1985), no asociándose la expresión del antígeno reconocido por el AcM IOR-T2 a un tejido normal específico.

En este trabajo se reportan las características del reconocimiento del AcM IOR-T2 sobre células normales activadas, células tímicas y líneas celulares de cultivo. Los resultados sugieren que este AcM reconoce un antígeno de diferenciación presente en las células del timo, el cual se expresa en células tumorales de los linfomas T cutáneos.

MATERIALES Y METODOS

Purificación del AcM IOR-T2

Los métodos de inmunización, fusión y selección del AcM IOR-T2 se describieron en detalle en trabajos anteriores (Gavilondo *et al.*, 1985). En los experimentos del presente estudio se empleó el ascitis tumoral clarificado, obtenido como ya ha sido reportado (García *et al.*, 1984) o el AcM purificado.

El AcM IOR-T2 se purificó a partir del líquido ascítico mediante cromatografía de afinidad en Sefarosa CL-4B-Proteína A (Pharmacia Fine Chemicals) (Hudson y Hay, 1980).

Determinación de la clase y subclase de inmunoglobulina

Se utilizó la técnica de doble difusión en dos dimensiones (Ouchterlony y Nielsson, 1978) enfrentando al AcM IOR-T2 purificado a antisueros monoespecíficos contra las clases y subclases de inmunoglobulinas de ratón (Meloy Lab.).

Determinación del punto isoeléctrico

Para la determinación del punto isoeléctrico se utilizó la técnica de focalización isoeléctrica en geles de agarosa (Isogel™ Agarose-EF) (pH 3,5-10) (Instrucción LKB 1818-A) y geles de poliacrilamida (pH 3,5-5,2) (LKB Application Note 250).

Ensayo de activación

Se purificaron CMP de donantes sanos en un gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals) durante 30 minutos a 800 g (Böyum, 1968); las células se lavaron tres veces a 4°C con solución salina tamponada con fosfato (SSTF) y se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero AB humano inactivado, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 18 mM de HEPES, 26 mM de CO₃HNa y antibióticos. Las células se incubaron una hora a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, en placas Petri, para eliminar de la muestra las células adherentes. Las células no adherentes se colectaron por decantación (Territo y Clive, 1980).

Las células mononucleares no adherentes se depositaron en placas de 24 pozos (Costar 3524), a una concentración de $1 \cdot 10^6$ células/ml en medio RPMI-1640, con igual suplementación que el medio anteriormente mencionado. A los pozos se les añadió 20 µg/ml de Concanavalina A (Con A) (Sigma) o medio solo como control negativo. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ en el aire.

Se extrajeron muestras de los cultivos a diferentes tiempos de incubación (0, 24, 48 y 72 horas).

Las células se lavaron a 200 g durante 10 minutos a 4°C dos veces con SSTF que contenía 20 mg/ml de α-metil-D-manósido y se realizó un tercer lavado con SSTF.

Obtención de suspensiones celulares de timos fetales y pediátricos

Se obtuvieron muestras de timos de fetos comprendidos en las edades gestacionales de 18 a 19 semanas, durante la primera hora posterior a abortos por Rivanol realizados por prescripción facultativa. La edad gestacional fue determinada tomando en cuenta el último período menstrual y el diagnóstico por ultrasonido de las pacientes.

Se obtuvieron pequeños fragmentos de timos de niños comprendidos en las edades de seis a trece años, durante operaciones quirúrgicas del corazón.

Las muestras de timos se depositaron en medio RPMI-1640 y se cortaron en pequeños fragmentos, obteniéndose las suspensiones celulares por perfusión del tejido. Las células fueron lavadas tres veces con SSTF a 200 g durante 10 minutos a 4°C.

Líneas celulares de cultivo

Se estudió el reconocimiento del AcM IOR-T2 en líneas celulares humanas de cultivo de diferente origen celular. Las células de las líneas K562 (eritroblastoide); Raji, Namalva (origen B); Nalm-1 (origen pre-B); Molt-3, Jurkat (origen T); HL-60 (origen promielocítico) fueron suministradas por el Instituto Karolinska de Estocolmo (Suecia) y la línea CEM-TE (origen T) fue brindada por J.C. Chermann, del Instituto Pasteur (París). Todas las líneas fueron mantenidas en medio RPMI-1640 suplementadas con 10% de suero fetal de ternero.

Técnica de inmunofluorescencia indirecta

El reconocimiento del AcM IOR-T2 en todas las poblaciones celulares analizadas se llevó a cabo mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta descrita por Petterson *et al.* (1978), y se utilizaron como controles de referencia el AcM OKT3 (*Ortho Diagnostic*) que reconoce a la población de linfocitos T (Kung *et al.*, 1979); el AcM OKT9 (*Ortho Diagnostic*) que identifica el receptor de la transferrina presente en las células activadas (Sutherland *et al.*, 1981) y el líquido ascítico de ratones inoculados con la línea parental del mieloma P3/x63-Ag8.653 (Kearney *et al.*, 1979).

RESULTADOS

Determinación de la subclase de inmunoglobulina y del punto isoelectrico del AcM IOR-T2

Los tres picos de inmunoglobulinas eluidos de la columna de Sefarosa CL-4B-proteína A, se probaron por inmunofluorescencia indirecta utilizando como células diana las células de la línea celular Jurkat y se demostró que el AcM IOR-T2 se encontraba en el tercer pico, como corresponde a la IgG2b. Ello se corroboró por la técnica de doble difusión en dos dimensiones al enfrentarlo a las diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas del ratón. La técnica de focalización isoelectrica permitió definir que el punto isoelectrico de este AcM es aproximadamente 4.4.

Ensayo de activación

Cuando se estimularon CMP no adherentes con Con A, se observó que a las 48 horas existió un incremento en el número de células reconocidas por el AcM OKT9. En cambio, en ninguno de los tiempos de activación estudiados pudo detectarse un incremento en el número de células IOR-T2⁺ (tabla 1).

Tabla 1
RECONOCIMIENTO DEL AcM IOR-T2 SOBRE CMP NO ADHERENTES,
ACTIVADAS CON CON A (20µg/ml)

Tiempo de activación	AcM	% de células positivas ^a		n ^b
		Medio + Con A	Medio	
0	IOR-T2	1	0	2
	OKT9	2	2	
24 horas	IOR-T2	4	0	2
	OKT9	3	0	
48 horas	IOR-T2	5	1	2
	OKT9	24	1	
72 horas	IOR-T2	1	0	2
	OKT9	13	0	

Nota: ^a Ver Materiales y Métodos.

^b Número de muestras analizadas.

Reconocimiento del AcM IOR-T2 de células tímicas

En la tabla 2 se muestran los resultados del reconocimiento de las suspensiones celulares de timos fetales y pediátricos por el AcM IOR-T2. El $59 \pm 3\%$ de las células tímicas fetales fueron identificadas por este AcM. Las células de los timos pediátricos también fueron reconocidas por el AcM IOR-T2, pero en menor proporción que en los timos fetales ($16 \pm 3\%$).

Los porcentajes de células OKT3⁺ y OKT9⁺ en los timos fetales estudiados fueron de 33% y 6% respectivamente; y en los timos pediátricos de 39% y 7% respectivamente.

Tabla 2
REACTIVIDAD DEL AcM IOR-T2 EN LAS SUSENSIONES CELULARES DE TIMOS FETALES Y PEDIÁTRICOS

AcM	Timo fetal	Timo pediátrico
IOR-T2	59 ± 3^a (5) ^b	16 ± 3 (3)
OKT3	33 ± 11 (5)	39 ± 4 (3)
OKT9	6 ± 3 (5)	7 ± 3 (2)

Nota: a Media \pm desviación estándar.

b Los números entre paréntesis representan el número de muestras estudiadas.

Reconocimiento de líneas celulares de cultivo por el AcM IOR-T2

La reactividad de este AcM con una variedad de líneas celulares de cultivo fue también ensayada por inmunofluorescencia indirecta y los resultados se muestran en la tabla 3.

De las tres líneas celulares de origen T humano estudiadas, dos de ellas reaccionaron fuertemente con el AcM IOR-T2. También las células de la línea Namalva de origen B humano fueron reconocidas por este AcM, no así la línea Raji del mismo origen. Las células de la línea HL-60 (promielocítica) fueron identificadas por este AcM. No se detectaron células positivas en las líneas celulares Nalm-1 (pre-B) y K562 (eritroblastoide).

Tabla 3
RECONOCIMIENTO DE LINEAS CELULARES DE CULTIVO POR EL AcM IOR-T2

Líneas celulares Origen	IOR-T2	OKT9
Eritroblastoide K562	-	+ ^a
B Raji	-	+
Namalva	+	+
T Molt 3	-	+
Jurkat	+	+
CEM-TE	+	+
Pre-B Nalm-1	-	+
Promielocítico HL-60	+	+

Nota: a Su valor se consideró positivo cuando más del 20% de las células fueron positivas; para valores menores del 4% se consideraron negativas. No se obtuvieron valores intermedios entre estos porcentajes.

DISCUSION

En un artículo anterior (García *et al.*, 1984) se reportó que el antígeno reconocido por el AcM IOR-T2 se expresaba sólo en una baja proporción de las CMP de donantes sanos, y en cambio, en un alto porcentaje de pacientes con linfomas T cutáneos. Posteriormente, por estudios ultraestructurales, se demostró que las células reconocidas por este AcM en los pacientes con linfomas T cutáneos formaban parte de la población de células tumorales circulantes, sugiriéndose que este AcM pudiera reconocer un antígeno relacionado con la proliferación y/o etapas de la progresión neoplásica de estos linfomas (Rodríguez *et al.*, 1985). Estos resultados indicaron la necesidad de diseñar estudios encaminados a conocer la naturaleza y origen del antígeno reconocido por este AcM.

Se conoce que durante el proceso de estimulación de las células linfoides normales, aparecen en su superficie antígenos que no se expresan cuando las células se encuentran en reposo, y a los que se denominan antígenos de activación. Entre ellos están el receptor de la transferrina, el antígeno Tac, el Ta60, el T10, entre otros (Sutherland *et al.*, 1981; Uchiyama *et al.*, 1981; Cotner *et al.*, 1983; Ueda *et al.*, 1985). Algunos de estos antígenos también están presentes en las células de pacientes con leucemias y linfomas de origen T, y en las líneas celulares de cultivo derivadas de estos pacientes (Poiesz *et al.*, 1980; Hattori *et al.*, 1981; Ueda *et al.*, 1985). En nuestros resultados comprobamos que el AcM IOR-T2 no reconoce ninguno de estos antígenos de activación, ya que no hubo un incremento en la proporción de células IOR-T2⁺ después de la estimulación mitogénica.

Por otra parte, considerando la posibilidad de que el AcM IOR-T2 identificara un antígeno de diferenciación expresado en una baja proporción en las CMP normales del adulto y en alta proporción en las CMP de pacientes con linfomas T cutáneos, se decidió enfrentar al AcM IOR-T2 a células del timo, ya que durante el proceso ontogénico intratímico de las células T se adquieren y se pierden antígenos de superficie que caracterizan los diferentes estadios de diferenciación y maduración funcional de estas células (Reinherz *et al.*, 1980; Janossy *et al.*, 1980; Bradstock *et al.*, 1980; Bhan *et al.*, 1980; Janossy *et al.*, 1981) y por el hecho demostrado de que las células malignas de las leucemias y de los linfomas pueden también expresar en su superficie estos antígenos (Haynes *et al.*, 1981; Bernard *et al.*, 1982; Knowles II *et al.*, 1982; Nádler *et al.*, 1982; Bernard y Boumsell, 1984; Sabol *et al.*, 1985).

El AcM IOR-T2 reconoció un alto porcentaje de las células tímicas fetales, a diferencia de lo observado con las células mononucleares de la sangre periférica normal. También existió un cierto reconocimiento de los timocitos en niños. Este hallazgo nos sugiere que el AcM IOR-T2 puede identificar un antígeno de diferenciación que se expresa en el timo, disminuyendo posteriormente su expresión hasta quedar en una pequeña proporción de las células de la sangre periférica normal (García *et al.*, 1984). Este antígeno de diferenciación está, a su vez, presente de forma significativa en parte de la población de células malignas de pacientes con linfomas T cutáneos (Rodríguez *et al.*, 1985), lo cual pudiera ser producto de una reexpresión de este antígeno, colateral al proceso de transformación maligna, o indicativo de que las células que se tornan malignas en estas entidades lo exhiben en su superficie.

Hay que señalar, que aunque el antígeno reconocido por el AcM IOR-T2 está presente en parte de la población de células tímicas y en células tumorales de pacientes con linfomas T cutáneos, no es un antígeno restringido al linaje T. Las células de una línea de cultivo originada de un linfoma de células B y otra proveniente de una leucemia promielocítica, reaccionaron positivamente con este AcM. Por otra parte, no todas las líneas de origen T estudiadas poseen

este antígeno. La no restricción de un antígeno a una población leucocitaria dada se ha evidenciado para otros antígenos de diferenciación y se ha comprobado que muchos de los AcM que se creía eran específicos contra una única población, reaccionan con poblaciones leucocitarias de diferentes orígenes. Más aún, algunos reconocen células de origen no hematopoyético (Foon *et al.*, 1982; Bernard y Boumsell, 1984a; Alsaati *et al.*, 1984).

En conclusión, podemos decir que el AcM IOR-T2 parece identificar a un antígeno de diferenciación de las células tímicas, el cual está poco representado en las CMP normales, pero que se expresa en un alto porcentaje de las células tumorales de la sangre periférica de pacientes con linfomas T cutáneos, lo cual le confiere a este reactivo una potencial utilidad en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estas neoplasias.

Sería de interés conocer la localización de las células IOR-T2⁺ en el timo, para definir si su procedencia es cortical (inmaduras) o medular (maduras) (Janossy *et al.*, 1981; Tidman *et al.*, 1981). Resulta igualmente importante definir la dinámica de aparición del antígeno reconocido por este AcM en las células tímicas, y su enmarcación en el proceso de diferenciación de dichas células, para poder profundizar en la significación de su expresión en células malignas de líneas celulares y de pacientes con linfomas T cutáneos.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer la magnífica colaboración técnica brindada por María E. García, María M. García y Miriam Zaldívar en el desarrollo de este trabajo. A Luisa Bolaño, al doctor Javech y al Departamento de Anatomía Patológica del hospital gineco-obstétrico "Ramón González Coro", y al Servicio de Cirugía del Instituto Cardiovascular, por brindarnos las muestras de órganos.

Este trabajo se realizó en el marco de la colaboración existente entre el Departamento de Biología Tumoral 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

- ALSAATI, T.; G. LAURENT; P. CAVERIVIERE; F. RIGAL y G. DEL SOL (1984). *Reactivity of Leu 1 and T 101 monoclonal antibodies with B cell lymphomas (correlation with other immunological markers)*. Clin. Exp. Immunol. 56: 631-638.
- BERNARD, A.; B. RAYNAL; J. LAMERIE 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.
- BERNARD, A. y L. BOUMSELL (1984). *Les antigènes de différenciation des leucocytes malins*. (2^e partie). Presse Méd. 13: 2371-2380.
- BERNARD, A. y L. BOUMSELL (1984a). *Les antigènes de différenciation leucocytaire humains*. Presse Méd. 13: 2311-2316.
- BHAN, A. K.; E. REINHERZ; S. POPPEMA; R. T. McCLUSKEY y S. F. SCHLOSSMAN (1980). *Location of T cell and major histocompatibility complex antigens in the human thymus*. J. Exp. Med. 152: 771-782.
- BOYUM, A. (1968). *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97): 77-89.

- BRADSTOCK, K. F.; G. JANOSSY; G. PIZZOLO; A. V. HOFFBRAND; A. McMICHAEL; J. R. PILCH; C. MILSTEIN; P. BAVERLEY y F. J. BOLLUM (1980). *Subpopulations of normal and leukemic human thymocytes: an analysis with the use of monoclonal antibodies*. JNCI 65: 33-39.
- COTNER, T.; J. M. WILLIAMS; L. CHRISTENSUN; H. SHAPIRO; T. B. STROM y J. STROMINGER (1983). *Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation expression and DNA content*. J. Exp. Med. 137: 461-472.
- 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.; J. 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 I: 29-38.
- GAVILONDO, J.; G. GARCIA; A. FERNANDEZ; A. M. VAZQUEZ; J. F. AMADOR; L. CABRERA y S. HERNANDEZ (1985). *Obtención de anticuerpos monoclonales anti-T*. Rev. Cub. Oncología 1: 208-215.
- HATTORI, T.; T. UCHIYAMA; T. TOIBANA; K. TAKATSUKI y H. UCHINO (1981). *Surface phenotype of Japanese adult T-cell leukemia cells characterized by monoclonal antibodies*. Blood 58: 645-648.
- HAYNES, B. F.; P. BUNN; D. MANN; C. THOMAS; G. S. EINSENBARTH; J. MINNA y A. S. FAUCI (1981). *Cell surface differentiation antigens of the malignant T cell in Sézary syndrome and Mycosis fungoides*. J. Clin. Invest. 67: 523-530.
- HUDSON, C. y F. HAY (1980). "Isolation of IgG subclasses using Protein-A-Sepharose", en: *Practical Immunology*, pp. 223-224. Blackwell Scientific Publications, 2da. Ed., London-Edinburg-Boston-Melbourne.
- ISHII, Y.; S. KON; T. TAKEI; J. FUJIMOTO y K. KIKUCH (1983). *Four distinct antigen systems on human thymus and T cells defined by monoclonal antibodies: immunohistological and immunochemical studies*. Clin. Exp. Immunol. 53: 31-40.
- JANOSSY, G.; N. TIDMAN; W. SELBY; J. THOMAS; S. GRANGER; P. C. KUNG y G. GOLDSTEIN (1980). *Human T lymphocytes of inducer and suppressor type occupy different microenvironments*. Nature 288: 81-84.
- JANOSSY, G.; N. TIDMAN; E. S. PAPAGEORGIU; P. C. KUNG y G. GOLDSTEIN (1981). *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.
- KNOWLES, R. W. y W. BODMER (1982). *A monoclonal antibody recognizing a human thymus leukemia-like antigen associated with B2-microglobulin*. Eur. J. Immunol. 12: 676-681.
- 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.
- KUNG, P. C.; G. GOLDSTEIN; E. L. REINHERZ y S. F. SCHLOSSMAN (1979). *Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens*. Science 206: 347-349.
- LKB. *Instruction for high-performance analytical electrofocusing in 0,5 mm thin-layer agarose gels 1818-A*.
- LKB. *Application Note 250. Methodological analytical electrofocusing in thin layers on polyacrylamide gels*.
- McMICHAEL, A.; J. R. PILCH; G. GALFRE; D. Y. MASON; J. W. FABRE y C. MILSTEIN (1979). *A human thymocyte antigen defined by a hybrid myeloma monoclonal antibody*. Eur. J. Immunol. 9: 205-210.
- NADLER, L. M.; P. STASHENKO; E. L. REINHERZ; J. RITZ; R. HARDY y S. F. SCHLOSSMAN (1982). "Expression of normal differentiation antigens on human leukemia and lymphoma cells", en: *Malignant Lymphomas: Etiology, Immunology, Pathology and Treatment*, pp. 107-119. Eds. S. A. Rosenberg, H. Kaplan, Bristol Mayer Cancer Symposia. Academic Press, New York-London.
- OUCHTERLONY, O. y L. A. NIELSSON (1978). "Immunodiffusion and immunoelectrophoresis", en: *Hand book of Experimental Immunology*, p. 196. Ed. D. M. Weir. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburg, Melbourne.
- PETERSON, D.; H. MELLSTEDT y G. HOLM (1978). *IgG on human blood lymphocytes studied by immunofluorescence*. Scand. J. Immunol. 8: 535-542.

- POIESZ, B. J.; F. W. RUSCETTI; J. W. MIER; A. M. WOODS y R. C. GALLO (1980). *T-cells lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6815-6819.
- REINHERZ, E.; P. C. KUNG; G. GOLDSTEIN y S. F. SCHLOSSMAN (1979). *A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T-cells*. J. Immunol. 123: 1312-1317.
- REINHERZ, E.; P. C. KUNG; G. GOLDSTEIN y S. F. SCHLOSSMAN (1979a). *Further characterization of the human inducer T-cell subset defined by monoclonal antibody*. J. Immunol. 123: 2894-2896.
- REINHERZ, E.; P. C. KUNG; G. GOLDSTEIN; R. H. LEVEY y S. F. SCHLOSSMAN (1980). *Discrete stages of human intrathymic differentiation. Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblast of T-cell lineage*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1588-1592.
- REINHERZ, E.; P. C. KUNG; G. GOLDSTEIN y S. F. SCHLOSSMAN (1980a). *A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T-cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH2*. J. Immunol. 124: 1301-1307.
- RODRIGUEZ, T.; C. GARCIA; A. M. VAZQUEZ; B. TORMO y J. GAVILONDO (1985). *Obtención de hibridomas de ratón productores de anticuerpos monoclonales que reconocen células humanas de origen T. III. Determinación del reconocimiento ultraestructural de los anticuerpos IOR-T1 e IOR-T2*. Interferón y Biotecnología 2: 41-51, 1985.
- SABOL, R. E.; I. RAYSTON; T. W. LEBIEN; J. MINOWADA; K. ANDERSON; F. R. DAVEY; J. CUTTNER; C. SCHIFFER; R. R. ELLISON y C. D. BLOOMFIELD (1985). *Adult acute lymphoblastic leukemia phenotypes defined by monoclonal antibodies*. Blood 65: 730-736.
- SUTHERLAND, R.; D. DELIA; C. SCHNEIDER; R. NEWMAN; J. KEMSHEAD y M. GREAVES (1981). *Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells in proliferation-associated receptors for transferrin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4515-4519.
- TERRITO, M. y M. CLINE (1980). "Macrophage activation and function", en: *Manual of Clinical Immunology*, pp. 304-308. Eds. N. R. Rose and H. Fireman. American Society for Microbiology, Washington, USA.
- TIDMAN, N.; G. JANOSSY; M. BADGER; S. GRANGER; P. C. KUNG y G. GOLDSTEIN (1981). *Delineation of human thymocytes differentiation pathways utilizing double-staining techniques with monoclonal antibodies*. Clin. Exp. Immunol. 45: 457-567.
- UCHIYAMA, T.; D. NELSON; T. FLEISHER y T. WALDMANN (1981). *A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally nature human T cells. II. Expression of Tac antigen cytotoxic killer T-cells, suppressor cells, and on one of two types of helper T-cells*. J. Immunol. 126: 1398-1403.
- UEDA, R.; K. NISHIDA; Y. KOIDE; I. TSUGE; M. SETO; M. YOSHIDA; I. MIYOSHI; K. OTA y T. TAKAHASHI (1985). *Two mouse monoclonal antibodies detecting two different epitopes of an activated lymphocyte antigen on adult T leukemia cells*. Cancer Research 45: 1314-1319.