



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

PREPARACION DE INMUNOGLOBULINAS ESPECIFICAS ANTI-LINFOCITOS B, ANTI-LINFOCITOS T Y ANTI-LEUCEMIA AGUDA LINFOBLASTICA HUMANA DEMOSTRADOS POR INMUNOFLUORESCENCIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :  
MOISES ENRIQUE FIERRO RAMOS

Director: Dr. Mario Gutiérrez Romero

Cuautitlán Izcalli, Méx.,

1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVO.....	31
MATERIAL Y METODOS.....	32
RESULTADOS.....	46
DISCUSION.....	69
CONCLUSIONES.....	86
ABREVIATURAS.....	88
BIBLIOGRAFIA.....	90

## RESUMEN

Se prepararon 3 diferentes heterosueros marcados con ITCF, uno específico para las células linfoides B, otro para las células T y otro más para las células no-T, no-B de la LAL.

El primer conjugado fué preparado mediante varias inyecciones por vía intravenosa de células de LLC a un conejo; se obtuvo el suero y se probó su especificidad y potencia mediante una prueba de aglutinación; luego, el suero fué absorbido con GR, hígado y cerebro humanos; se valoró su potencia por inhibición de formación de rosetas EAC, EA, M, ES y E. Después, los Ac fueron purificados y conjugados con ITCF, y se valoró su potencia mediante inmunofluorescencia directa. Su reactividad con las células linfoides normales fué de 0 - 9 % de células positivas. Reaccionó contra las células de 1 de 6 pacientes (17%) con LAL-L1; con las de 6 de 30 (20%) con LAL-L2; con las de 1 de 2 (50%) con LAL-L3; con las de 1 de 7 (14%) con LAM-M1; con las de 1 de 8 (13%) con LAM-M4; con las de 7 de 8 (88%) con LLC; con las de 1 de 9 (11%) con linfoma no Hodgkin y con las de 1 (100%) con MI. No reaccionó con las células de LAM-M2, LAM-M5, LAM-M6, LGC, LGC/CB, linfoma de Hodgkin y de Burkitt en remisión, RPE, LAL en remisión, LCP y LCM.

El segundo conjugado fué preparado mediante varias inyecciones por vía subcutánea de cerebro humano normal, emulsificado con igual volumen de adyuvante incompleto de Freund, a un conejo; se obtuvo el suero y se probó su especificidad y potencia mediante inhibición de formación de rosetas E, ES, M, EA y EAC; luego, el suero fué absorbido con GR, hígado, células de LLC y LAM-M1 humanos; se valoró su potencia por inhibición de formación de rosetas E. Después, los Ac fueron purificados y conjugados con ITCF, y se valoró su potencia mediante inmunofluorescencia directa. Su reactividad contra las células linfoides normales fué de 0 - 5 % de células positivas. Reaccionó con las células de 3 de 30 pacientes (10%) con LAL-L2; con las de 1 de 2 (50%) con LAL-L3; con las con las de 2 de 7 (29%) con LAM-M1; con las de 2 de 8 (25%) con LLC y con las de 1 de 9 (11%) con linfoma no Hodgkin. No reaccionó con las

células de LAL-L1, LAN-M2, LAN-M4, LAN-M5, LAN-M6, LGC, LGC/CB, linfoma de Hodgkin y de Burkitt en remisión, EPE, LAL en remisión, LCP, NI y LCN. El número y la distribución en la circulación sanguínea, de las células linfoides que soportan los Ag B y T que reconocen, respectivamente, los conjugados anti-linfocito B y anti-linfocito T estuvo alterado significativamente en la gran mayoría de los pacientes.

El conjugado anti-LAL fue preparado mediante varias inyecciones por vía intravenosa de células de LAL-L1, no-T, no-B a un conejo; se obtuvo el suero y se probó su especificidad y potencia mediante una prueba de aglutinación; luego, el suero fue absorbido con GR, células de LLC y LAN-M4, bazo e hígado humanos; se valoró su potencia con otra prueba de aglutinación. Después, los Ac fueron purificados y conjugados con ITCF, y se valoró su potencia por inmunofluorescencia directa. Su reactividad contra las células linfoides normales fue de 0 - 2 % de células positivas. Reaccionó con las células de 5 de 6 pacientes (83%) con LAL-L1; con las de 24 de 30 (80%) con LAL-L2; con las de 2 (100%) con LAL-L3; con las de 3 de 7 (43%) con LAN-M1; con las de 1 de 8 (13%) con LAN-M4; con las de 1 de 2 (50%) con LAN-M5; con las de 2 de 8 (25%) con LLC; con las de 3 de 8 (38%) con LGC; con las de 2 de 3 (67%) con LGC/CB; con las de 1 de 9 (11%) con linfoma no Hodgkin; con las de 1 (100%) con EPE; con las de 1 (100%) con LCP y con las de 1 (100%) con LCN. No reaccionó con las células de LAN-M2, LAN-M6, linfoma de Hodgkin y de Burkitt en remisión, NI y LAL en remisión. Se encontró en las células de 6 de los 38 pacientes (16%) con LAL, el fenotipo inmunológico de LAL de células nu-llas; en 15 (40%), el de LAL de célula común; en 2 (5%), el de LAL de células pre-B; en 9 (24%), el de LAL de células B; en 1 (3%), el de LAL de células pre-T; en 2 (5%), el de LAL de células T y en 3 (8%), el de LAL con fenotipo de células B y T. El número y distribución de las células que soportan el AgCLAL, que reconoce el conjugado anti-LAL, fue muy variable en las diferentes hemopatías malignas, indicando bifenotipicidad de estos padecimientos.

## I N T R O D U C C I O N

LINFOCITOSCélulas B y células T (1,2,3,4,26).

El sistema inmunológico del ser humano está dividido para su estudio en dos mecanismos de respuesta que forman la inmunidad celular y la inmunidad humoral. El tipo de respuesta ha sido caracterizado por muchos estudios y es frecuente encontrar áreas de cooperación e interrelación entre ambas reacciones inmunes. La célula más importante en ambas respuestas inmunes es el linfocito circulante, derivado de una célula madre común en la médula ósea.

En el microscopio óptico, las dos principales subpoblaciones linfocitarias, llamadas células B y células T, son células indistinguibles, de forma ovoide, relativamente pequeñas (de 5 a 15  $\mu$ m de diámetro), que contienen cromatina nuclear densamente empacada y un pequeño borde de citoplasma que se tinte de color pálido con los colorantes de Romanovsky. El citoplasma contiene numerosos gránulos azurófilos y vacuolas ocasionales. En la zona donde se encuentra la mayoría de los organelos citoplásmicos (zona de Golgi), el borde citoplásmico está engrosado.

Entre los mamíferos, el conjunto de linfocitos constituye aproximadamente el 1 % del total del peso corporal; el cuerpo humano contiene alrededor de  $10^{12}$  linfocitos. Los linfocitos se encuentran en la sangre, en la linfa y en los tejidos conectivos; los linfocitos en los tejidos se encuentran en equilibrio dinámico con la sangre circulante. La mayor parte de linfocitos se encuentra en el bazo, ganglios linfáticos y placas de Peyer del ileon.

Las células B y las células T son móviles y no fagocíticas, las cuales se diferencian entre sí con respecto a sus vías de maduración, a sus macromoléculas superficiales o marcadores inmunológicos, en sus patrones circulatorios y sobre todo, en el tipo y consecuencias de sus interacciones con los antígenos (Ag). Para fines funcionales, el sistema linfóide puede dividirse en tres unidades principales: 1) los precurso-

res linfoides (células precursoras); 2) estirpes de células T y células B, incluyendo subpoblaciones y 3) clonas específicas de Ag. También puede dividirse en linfocitos T, dependientes del timo (derivados o producidos por el timo) y linfocitos B, timoindependientes.

Los linfocitos T (timodependientes) a su paso por el timo son afectados por la acción de las hormonas tímicas y son éstos (auxiliares, supresores y efectores) los responsables de la inmunidad celular, incluyendo reacciones cutáneas de sensibilidad tardía, actividad citotóxica contra hongos, bacterias patógenas intracelulares y ciertos virus, así como en el rechazo agudo y crónico de aloinjertos y en el desarrollo de la inmunidad antitumoral.

Los linfocitos B (precursores de las células que sintetizan y secretan anticuerpos y también, de las de memoria) han sido caracterizados como derivados de la bursa de Fabricius de las aves, cuyo equivalente no ha sido aún identificado en los mamíferos; considerándose que provienen directamente de la médula ósea y son los responsables de todas las funciones de inmunidad humoral a través de su reproducción y transformación en células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos (Ac).

#### Marcadores inmunológicos de los linfocitos B y linfocitos T.

Existe una distinción importante entre el determinante de membrana plasmática, que es una macromolécula presente sobre la membrana de la célula, descubierta mediante los métodos de marcación de Ac y la identificación de tipos particulares de células o de subpoblaciones; y el receptor, que es una macromolécula que puede ser característica de un tipo de célula específica y tiene una afinidad conocida de enlace para un ligando específico (2).

##### a) Inmunoglobulina de superficie (IgS) (1,3,4).

Las células B poseen numerosas moléculas de Ig unidas a la superficie de la membrana (alrededor de 100 000 por célula); estas moléculas, en una célula determinada, se hallan limitadas a un determi-

nado alotipo e isotipo, y probablemente, también a un único idiotipo, lo que explicaría la selectividad de la respuesta celular con un Ag determinado. La IgS se refiere a la Ig sintetizada por el linfocito y expresada sobre la membrana celular, en contraste a la Ig absorbida pasivamente o por la vía del receptor Fc sobre la superficie. La IgS parece ser el único marcador que es verdaderamente específico para las células B en el hombre, aunque puede estar disminuida o ausente en sus vías tempranas de diferenciación. La Ig que se ha encontrado con mayor frecuencia sobre los linfocitos B circulantes es la IgM en forma monomérica, también pueden existir IgD, IgG e IgA sobre las membranas de los linfocitos; bajo algunas condiciones IgM e IgD han sido descubiertas sobre el mismo linfocito.

Las células T presentan un número muy inferior de Ig superficiales (quizás unas 1,000 veces menos, que en las células B); aunque estas moléculas son principalmente IgM, no se sabe con seguridad si se hallan limitadas a un único idiotipo. Algunos laboratorios han descrito a la IgS sobre las células T mediante técnicas especializadas, pero esto no ha sido observado con el empleo de las pruebas de inmunofluorescencia; estos resultados quedan en controversia, puesto que los receptores Fc para IgM e IgG de las células T, pueden explicar lo anterior. La IgS es detectada con el empleo de los Ac anti-inmunoglobulínicos conjugados a fluorocromos, radioisótopos, peroxidasa o partículas (esferas de polímeros).

b) Inmunoglobulina intracitoplasmática (IgIC) (4,5).

La determinación de la IgM intracitoplasmática es esencial para la demostración de células con el fenotipo pre-B ( $IgS^-$ ,  $IgIC^+$ ), grandes células linfoides con IgM difundida en el citoplasma.

c) Antígeno Ia (4,6).

Los Ag Ia son detectables serológicamente sobre los linfocitos B, macrófagos, un subtipo de células nulas, células primordiales de la médula ósea no diferenciadas y células T periféricas activadas; las células T normales, pueden expresar estos Ag sobre su superficie des-

pués de una activación aloantigénica o mitogénica y durante el curso de una enfermedad injerto contra huesped.

d) Antígenos T (4,7,8,9,10).

La población de linfocitos T es funcionalmente heterogénea, compuesta de células antígeno reactivas, células T auxiliares, células T efectoras y células T supresoras. Estas diferentes subpoblaciones de linfocitos T pueden expresar marcadores de superficie que varían en calidad y/o cantidad de una a otra subpoblación. La expresión de los marcadores de superficie puede ser afectada por el grado de activación, etapa de diferenciación o actividad mitótica de los linfocitos. Es razonable esperar, que en los procesos de las enfermedades, particularmente aquellos que envuelven al sistema linforeticular, alteren la expresión de tales marcadores de superficie.

Los marcadores comunmente usados para la identificación de los linfocitos T circulantes son: 1) la capacidad para formar rosetas espontáneas (E) con los glóbulos rojos de carnero (GRC) y 2) la reactividad con el suero anti-linfocito T. Los resultados obtenidos en la identificación de las poblaciones de linfocitos T mediante estas dos pruebas, indican que algunas células T circulantes poseen una sola clase de receptor T. Los experimentos de Williams y colaboradores y de Bentwich y colaboradores, sugirieron que los timocitos poseen dos diferentes marcadores T, uno de los cuales está expresado sobre los linfocitos de la leucemia linfocítica crónica (LLC).

Los sueros dirigidos contra Ag de las células T humanas, han sido preparados mediante el empleo de una gran variedad de programas de inmunización, procedimientos de absorción y métodos de prueba; han sido desarrollados en conejos, caballos y monos; los Ag usados, han incluido timocitos de humano y mono, extractos solubles de timocito, células de timoma, células de cerebro, linfoblastos leucémicos que tenían el receptor para las rosetas E y linfocitos periféricos de sujetos normales o pacientes con agammaglobulinemia ligada al cromosoma X. Todos los sueros requirieron la absorción con una gran variedad de células, incluyendo células B alogénicas cultivadas de lí-

neas de células linfoblastoides, células B de LLC, células de médula ósea, glóbulos rojos (GR) o células fetales para hacerlos altamente específicos. Los estudios serológicos y bioquímicos han demostrado que estos sueros reconocen a diferentes Ag y probablemente a distintas subpoblaciones de células T. Por ejemplo, los Ac del suero heterólogo desarrollado contra el Ag celular T asociado al cerebro, son Ac dirigidos contra el glucolípido asialo GM<sub>1</sub>, el cual está asociado a las células de la leucemia aguda linfoblástica (LAL) de células T o nulas, pero no con otros trastornos hematológicos o neoplasias linfoides.

Algunos heteroantisueros han detectado determinantes antigénicos de las células T, compartidos por los timocitos, células T periféricas y células de LAL tipo T, y otros han reaccionado con un Ag que sólo es compartido por los timocitos y células de LAL tipo T. Se han empezado a definir los Ag de diferenciación de las subpoblaciones de las células T humanas, empleando sueros heterólogos absorbidos únicamente con células B autólogas o células B mas células de diferentes LAL de tipo T. Utilizando estos reactivos se han identificado diferentes subtipos de células T, designados TH<sub>2</sub><sup>+</sup> y TH<sub>2</sub><sup>-</sup>. La sangre periférica humana normal está compuesta del 80% de células TH<sub>2</sub><sup>-</sup> y el 20% de células TH<sub>2</sub><sup>+</sup>; las células T supresoras son TH<sub>2</sub><sup>+</sup>, mientras que las células T cooperadoras o auxiliares son TH<sub>2</sub><sup>-</sup>. También, se ha descrito la obtención de Ac monoclonales que son reactivos con Ag de los linfocitos T periféricos y de los timocitos humanos, de diferentes especificidades.

e) Antígeno 1 (4,11).

El Ag fue descrito originalmente sobre las células fetales y GR del cordón umbilical, después, ha sido descrito sobre una gran variedad de células no eritroides normales y malignas. Las células con Ag 1 detectable son: linfocitos, polimorfonucleares, monocitos, fibroblastos, tejido pulmonar fetal, las células HeLA y las de las mucosas gastrointestinales, normales o malignas.

El Ag 1 ha sido descrito en los blastos de la leucemia aguda mie-

loblástica (LAM) y la LAL, también sobre los linfocitos de la LLC. La cuantificación del Ag i ha demostrado que se encuentra en menor proporción sobre los mieloblastos que sobre los linfocitos o linfoblastos. Esta diferencia en los niveles del Ag i, se observa bien, en la prueba de citotoxicidad usando potentes aloantisueros anti-i y puede ser útil en la diferenciación de la LAL de la LAM.

**f) Antígeno de diferenciación B (ADB) (12).**

Se ha descrito un suero contra las células B, preparado en conejo, que detecta un ADB sobre las células de la línea linfóide B, distinto del Ag Ia. El ADB se encuentra presente sobre las células pre-B, linfocitos B y las células plasmáticas, en líneas linfoblastoides B y en malignidades linfóides B; pero no se ha encontrado sobre otro tipo de células sanguíneas; la calificación del ADB, es la de un Ag celular B único.

**g) Receptores Fc (Rfc) (4,13).**

Cuatro tipos de Rfc son ahora reconocidos, uno para cada una de las porciones Fc de la IgG, IgM, IgE e IgA. Los métodos más utilizados para la identificación de los receptores Fc para IgG (RfcIgG), son las técnicas de formación de rosetas empleando los complejos anticuerpo-glóbulos rojos humanos (AcGRH), anticuerpo-glóbulos rojos de carnero (AcGRC), anticuerpo-glóbulos rojos de bovino (AcGRB) y las técnicas de inmunofluorescencia, utilizando IgG humana agregada por calor (IgGHag). La información referente a los RfcIgG indica, que no sólo las pruebas simples son óptimas para la demostración de todos los RfcIgG; existe la evidencia de que los receptores de los linfocitos que enlazan los complejos eritrocito-anticuerpo (EA), son diferentes de aquellos que enlazan IgG agregada. Las IgGHag y los complejos AcGRB parecen tener el rango de sensibilidad más amplio para el RfcIgG de los diferentes tipos de células.

Los complejos AcGRH y AcGRB demuestran el RfcIgG en las células T y tienen una menor reacción con los linfocitos B. Sin embargo, el RfcIgG de las células B tiene mayor avidéz para la IgGHag que el de

las células T. Estos hallazgos, sugieren una heterogeneidad cualitativa en la presencia del RFcIgG en las células B, con la presencia de éste sobre las células no B. Los RFcIgG se encuentran presentes sobre los linfocitos B, células T supresoras, la tercera población de linfocitos, carentes de marcadores B o T específicos, en los macrófagos y en los granulocitos.

Los receptores Fc para IgM (RFcIgM), son detectados por medio de la prueba de formación de rosetas con los complejos AcGRB, empleando una IgM anti-GRB. Los RFcIgM son difíciles de detectar en las células aisladas recientemente, debido a su gran avidéz por las IgM plasmáticas. Los RFcIgM están aparentemente restringidos a los linfocitos T cooperadores o auxiliares y débilmente presentes sobre una proporción de linfocitos B.

La presencia de los RFc sobre las células linfoides y no linfoides, limita el valor de la detección del RFc en la identificación celular. Además, la presencia de Ac antileucémicos sobre la superficie celular, puede inducir a resultados falsos positivos. Por lo tanto, los RFc, deben ser considerados como descriptivos y no como marcadores distintivos o discriminantes.

#### h) Receptores para complemento (RC) (4,14).

Los linfocitos tienen dos diferentes tipos de RC, el RC1 (detecta C4b, C3b) y el RC2 (detecta C3d). Estos dos tipos de RC son estructuralmente distintos y están localizados sobre diferentes moléculas, en la membrana del linfocito.

El RC1 es compartido con los glóbulos rojos, granulocitos y monocitos; y el RC2, sólo con los monocitos. Los granulocitos y los macrófagos tienen un tercer tipo de RC (RC3), que es diferente al de los linfocitos, RC2. Los linfocitos B expresan el RC1 y el RC2, mientras que, en la tercera población de linfocitos, sólo es expresado el RC1. Los linfocitos T supresores y T cooperadores no parecen expresar RC sobre su superficie, pero los RC han sido descritos sobre algunos linfocitos formadores de rosetas E.

La mayor parte de los investigadores ha ensayado para los RC, el

uso de GRC recubiertos con Ac IgM de conejo, anti-GRC y complemento no lítico de humano o ratón. Suero fresco de ratón, deficiente en C5, es la fuente de complemento (C) más común para esta prueba. Es esencial que se utilice una IgM purificada para sensibilizar a los GRC, puesto que los GRC recubiertos con Ac de tipo IgG se pueden enlazar a los RfC de los linfocitos. Los glóbulos rojos humanos (GRH) no se utilizan para preparar ensayos de eritrocito-amboceptor-complemento (EAC) debido a la presencia del RCl sobre su superficie. Si se emplean GRC, la incubación es llevada a cabo a 37°C, para evitar la formación de rosetas E con los linfocitos T y deben incluirse, como controles, preparaciones de rosetas E y EA.

La estandarización de los reactivos para la prueba de formación de rosetas EAC es difícil, debido a la variabilidad biológica de los glóbulos rojos, de las moléculas de IgM y del C. También debido a que el fragmento C3b enlazado, es rápidamente degradado por las enzimas séricas; los glóbulos rojos recubiertos con C, preparados mediante incubación con suero entero, detectan en forma primaria al RC2. El ensayo de RC como el de RfC, es descriptivo pero no específico.

1) Receptores para glóbulos rojos (RGR) (4,15,16).

Los GR de diferentes especies animales se enlazan espontáneamente a los linfocitos humanos, formando rosetas. Los GR de ratón y del mono *Macaca speciosa*, han mostrado adherirse a los linfocitos B; mientras que los GRC, del mono rhesus y de cabra, se adhieren a las células T. El método de formación de rosetas E, con los GRC, ha sido aceptado como una técnica para la identificación de los linfocitos T normales y de los linfocitos T neoplásicos. La valoración de la formación de rosetas E es llevada a cabo a 4°C ( $E^{+4}$ ) y a 37°C ( $E^{+37}$ ), debido a que alrededor del 75 % de las LAL de tipo T, son termoestables (más del 40 % de rosetas son formadas a 37°C), en comparación con las termolábiles, formadas por los linfocitos T normales.

Rutinariamente, las rosetas con los GR de ratón, no son empleadas como marcadores de los linfocitos B; el receptor para los GR de ra-

tón, es considerado como un marcador de diferenciación transitorio, que puede ser perdido durante la maduración de los linfocitos B. La leucemia prolinfocítica y la de células de linfosarcoma crónico son negativas a la formación de rosetas con GR de ratón.

Antígenos asociados a la leucemia (AAL) (4,6,8,10,12,16,18,19,21).

La leucemia es un síndrome proliferativo maligno de los órganos hematopoyéticos en la médula ósea, de etiología desconocida y casi siempre de terminación fatal, el cual se traduce por la proliferación anormal de las distintas variedades de las células hematopoyéticas, y se caracteriza por la presencia de éstas, en sangre periférica e/o infiltración a cualquier órgano o tejido del organismo.

Los estudios de varios investigadores empleando sistemas de prueba inmunológicos, y utilizando células y/o sueros contra las células blásticas o sus extractos, han sugerido claramente, la existencia de Ag de superficie celular asociados característicamente a las leucemias agudas.

Los linfocitos de pacientes en remisión sufren transformación blástica en cultivo cuando se ponen en contacto con células leucémicas inactivadas de los mismos, sugiriendo la presencia de Ag extraños sobre la superficie de las células leucémicas. Los linfocitos de familiares idénticos en el complejo mayor de histocompatibilidad, reaccionaron en el cultivo mixto de linfocitos contra las células leucémicas de parientes idénticos, pero no contra sus leucocitos normales. Algunos laboratorios han informado de la presencia de autoanticuerpos circulantes contra las células leucémicas, y la presencia de Ig sobre la superficie de la célula blástica. Metzgar y colaboradores fueron capaces de detectar Ig sobre la superficie de la célula leucémica, y la actividad de Ac contra los AAL, se encontró en los eluidos preparados a partir de estas células. La especificidad de los Ac eluidos para los AAL fué similar a la encontrada con un antisuero de mono.

Los antisueros contra los blastos leucémicos han sido preparados en ratones, conejos, monos, humanos (en los pacientes que reciben inmunoterapia contra las células leucémicas) y por técnicas somáticas de hi-

bridación. Los heterosueros antileucémicos y los Ac monoclonales de ratón han demostrado diferenciar los blastos leucémicos de las células blancas normales, en sangre periférica y en médula ósea.

Las células leucémicas pueden expresar Ag de superficie normales demasiado inmunogénicos, particularmente, los Ag de histocompatibilidad, incluyendo los Ag Ia, de suerte que los animales inmunizados reconocen estas estructuras normales en preferencia a los Ag específicos. Los planteamientos para este problema han incluido una gran variedad de estrategias inmunológicas. Baker y colaboradores desarrollaron sueros contra mieloblastos leucémicos en ratones hechos tolerantes, con ciclofosfamida, a las células en remisión y a las plaquetas de los mismos pacientes. Greaves y colaboradores prepararon un suero contra linfoblastos leucémicos en un conejo, recubriendo los blastos inyectados con Ac de conejo contra los Ag normales de las células sanguíneas humanas. Mohanakumar y colaboradores inmunizaron a chimpances y a monos rhesus con células de leucemias agudas.

Como las absorciones con tejidos normales y células leucémicas no relacionadas puede ser necesario para estos heterosueros, el título y la cantidad de Ac puede ser limitada. La inmunización de los animales con los Ag obtenidos por medio de la solubilización, purificación y procedimientos de extracción ha mejorado la especificidad de los sueros.

Los sueros contra los AAL han sido utilizados en la descripción, aislamiento y caracterización bioquímica parcial de por lo menos 3 diferentes AAL: el Ag común asociado a la LAL (AgCLAL), el Ag tímico humano asociado a la leucemia (AgTHL) y el Ag asociado a la LAM (AgLAM).

**A) Antígeno común asociado a la leucemia aguda linfoblástica (AgCLAL o CALLA, del inglés: common acute lymphoblastic leukemia antigen) (4, 17,18,68).**

El AgCLAL ha sido definido por heterosueros desarrollados en ratones, conejos, monos y por la técnica de hibridoma. Un suero contra células de LAL, producido en un ratón tolerante, retuvo actividad exclusiva contra las células de LAL, después de la absorción con células de LAM. Un mono inmunizado con células de LAL produjo un suero

que detectó un Ag común a las células de LAL y LLC.

Greaves y colaboradores desarrollaron un suero en conejo contra células de LAL, recubiertas con Ac de conejo anti-linfocito humano. El suero absorbido detectó un Ag no-B, no-T asociado a la LAL. Este, siempre reaccionó con una proporción variable de células malignas de los pacientes con diagnóstico de leucemia aguda indiferenciada, LAL tipo T, LAL con cromosoma Filadelfia (+) y con leucemia granulocítica crónica en crisis blástica (LGC/CB).

El Ag definido para la LAL por medio del antisuero de conejo, ha demostrado ser un Ag de diferenciación temprano de la línea linfóide, puesto que el estudio mediante el empleo del clasificador de células activado por fluorescencia (FACS), detectó actividad antigénica en varios tejidos de tipo linfóide, no leucémicos.

También se ha informado de la producción de Ac monoclonales contra el Ag asociado a la LAL; los cuales no reaccionaron con las células hematopoyéticas normales, pero sí con las de la LAL común y con las de LGC/CB de tipo linfóide.

Experimentos de inmunoprecipitación demostraron que los Ac anti-LAL de conejo e híbridos son reactivos con una glicoproteína con un PM de 95 000 - 100 000 daltons, lo que indica, que los antisueros reconocen el mismo Ag.

#### B) Antígeno tímico humano asociado a la leucemia (AgTHL) (4,8,19).

El AgTHL ha sido definido mediante heterosueros de mono, conejo y por Ac monoclonales. Mediante el radioinmunoensayo (RIE), niveles elevados del AgTHL han sido detectados en las células leucémicas y en el plasma, principalmente, en las células de LAL tipo T, en algunas LAL con E<sup>-</sup>, en LAM, en leucemia aguda mielomonoblástica (LAM-M4), en leucemia aguda indiferenciada y en LGC/CB.

Chechick y colaboradores han identificado este Ag como una isoenzima tímica, la adenosina desaminasa, con un PM de 45 000 daltons. Se ha encontrado que los linfoblastos T, tienen una mayor actividad de adenosina desaminasa que los linfoblastos nulos, lo que es útil para la diferenciación entre estos dos grupos.

Levy y colaboradores elaboraron Ac monoclonales que detectan un AgTHL, expresado preferentemente sobre las células T, líneas celulares derivadas de la LAL tipo T y en algunas células nulas de la LAL. En contraste, las leucemias de células B, las líneas linfoblastoides B, las células mieloides normales y malignas contienen cantidades indetectables del AgTHL. La caracterización bioquímica que se realizó preliminarmente, demostró que este Ag está asociado a un polipéptido de 28 000 daltons, indicando éste, que los Ac anti-AgTHL de conejo y monoclonales pueden tener diferentes especificidades.

#### Perfil inmunológico para la identificación de la LAL (4,6,20,21).

La LAL es una enfermedad heterogénea, definida mediante el criterio clínico, morfológico, citotóxico e inmunológico. El grupo Franco-Americano-Británico (FAB) ha propuesto 3 subtipos de LAL (L1,L2,L3), basados en el criterio morfológico: tamaño celular; cantidad, basofilia y vacuolización del citoplasma; tamaño y contorno del núcleo y la cantidad y predominancia de nucleolos.

El diagnóstico inmunológico de la LAL está basado en el estudio de los blastos de la médula ósea y/o de las células periféricas. La presencia de linfocitos T normales en la circulación, puede conducir a resultados conflictivos con respecto a la naturaleza del proceso leucémico. Se han descrito 3 categorías mayores con significado clínico: el tipo celular no-T, no-B y las variantes celulares T y B. La aplicación de la diferenciación adicional y de los marcadores funcionales ha permitido la subclasificación de estos tipos; cinco categorías de LAL pueden ahora ser distinguidas, mediante el empleo de la fenotipificación inmunológica de los blastos de sangre periférica y/o médula ósea:

#### 1) LAL de células no-T, no-B (4,6,21,22,23,24).

El 75% de los pacientes con LAL, tienen blastos que son negativos a todos los marcadores B y T tradicionales. La leucemia de este grupo, ha sido generalmente denominada LAL no-T, no-B o nula o LAL común, sin ninguna distinción adicional. Algunos investigadores, pre-

fieren subdividir la LAL no-T, no-B en LAL de célula común (AgCLAL<sup>+</sup>) y LAL de células nulas (AgCLAL<sup>-</sup>), basándose en la reactividad con los sueros anti-LAL.

Las evidencias indican que los subgrupos no-T, no-B de la LAL son inmunológicamente heterogéneos y pueden expresar múltiples fenotipos. El perfil inmunológico más frecuente es: IgS<sup>-</sup>, Ia<sup>+</sup>, AgCLAL<sup>+</sup>, E<sup>-</sup>, T<sup>-</sup> (timocite). Algunas células no expresan el Ia y el AgCLAL (IgS<sup>-</sup>, Ia<sup>-</sup>, AgCLAL<sup>-</sup>, E<sup>-</sup>, T<sup>-</sup>); los pacientes con células con AgCLAL<sup>+</sup> tienen un pronóstico más favorable que aquellos sin él. Alrededor del 20% de las células no-T, no-B de la LAL con el fenotipo IgS<sup>-</sup>, Ia<sup>+</sup>, AgCLAL<sup>+</sup>, E<sup>-</sup>, T<sup>-</sup> tienen IgIC<sup>+</sup> y pueden ser consideradas como LAL pre-B, en lugar de LAL no-T, no-B.

Los RfCIgG y RfCIgM se han detectado sobre los linfoblastos no-T, no-B, empleando GR recubiertos con una concentración alta de Ac. Como los linfoblastos leucémicos expresan RfC sin hacer caso de sus marcadores de diferenciación, la presencia de RfC no parece ser específica para un tipo particular, inmunológicamente, de linfoblasto leucémico.

Se ha sugerido que las células nulas de la LAL que expresan exclusivamente RC, están asociadas con un pronóstico desfavorable y a una frecuencia más alta de complicaciones mediastinales. Recientemente, los estudios de los pacientes con RC<sup>+</sup> e Ia<sup>-</sup> en los linfoblastos, han demostrado que son similares clínicamente a los pacientes con LAL de células T (usualmente RC<sup>+</sup> e Ia<sup>-</sup>) y pueden representar una LAL derivada de T, carente de receptores para GRC (LAL pre-T). Esbar y colaboradores observaron que los pacientes con células nulas que no expresaron RfC o RC, tuvieron una duración media de remisión mayor, que aquellos, que expresaron uno u otro marcador.

La LAL de células no-T, no-B observada en los adultos difiere clínica y morfológicamente de la LAL infantil; las células en los adultos son usualmente de tipo L2 y muestran una menor reactividad con el suero anti-AgCLAL de conejo.

2) LAL de células pre-T (4).

Las enfermedades malignas que provienen de la diferenciación temprana de las células T, están caracterizadas por la ausencia de receptores para GRC ( $E^-$ ) y por la presencia de Ag T. Pueden o no expresar Ag de diferenciación normal, tales como el Ia y el AgCLAL.

La significancia clínica de estas leucemias, en el 4 - 5% de los pacientes con LAL y con el fenotipo  $IgS^-$ ,  $Ia^+$ ,  $AgCLAL^+$ ,  $E^-$ ,  $T^+$ ; no está bien establecida. Algunos investigadores son de la opinión que los casos  $E^+$ ,  $T^+$ ,  $Ia^-$  y  $E^-$ ,  $T^+$ ,  $Ia^-$  responden pobremente a la terapia y otros piensan, que la LAL pre-T se comporta más como LAL de células no-T, no-B.

3) LAL de células T (4,8,19).

La LAL de células T está limitada a aquellos casos que son positivos al receptor para GRC y los AgTHL o Ag T. Los blastos muestran rasgos de células T en el 20 a 25% de los pacientes con LAL. La presencia de los Ag T, algunas veces, contrasta con la poca capacidad de los blastos para formar rosetas E y estas LAL pre-T han sido consideradas ser LAL de células T, sin ninguna otra distinción adicional; estos casos, tienen probablemente, el 20% de LAL derivadas de células T.

El fenotipo más frecuente de las células de la LAL tipo T es:  $IgS^-$ ,  $Ia^-$ ,  $AgCLAL^-$ ,  $E^+$ ,  $T^+$  o  $AgTHL^+$ . La LAL tipo T,  $Ia^+$  no es común, pero ha sido reportado ocasionalmente. El AgCLAL puede ser débilmente detectado, en el 10% de los casos de la LAL tipo T, aunque, algunos investigadores consideran que la LAL tipo T debe ser, estrictamente,  $AgCLAL^-$ . Varios reportes indican que las enfermedades del fenotipo T ( $E^+$ ,  $T^+$ ) son a menudo  $RC^+$ .

Reinherz y colaboradores observaron que los pacientes con LAL tipo T,  $TH_2^+$ , parecen diferir en la presentación y curso clínico de los que presentaren LAL tipo T,  $TH_2^-$ . Saxon y colaboradores reportaron un caso de LAL tipo T, cuyas células expresaron porciones de Fc de IgM e IgG. A causa de la heterogeneidad en la expresión fenotípi-

ca de las células de la LAL tipo T, la variabilidad clínica entre los diferentes casos de LAL de este tipo, no es sorprendente.

#### 4) LAL de células pre-B (4,5,23).

La LAL del fenotipo celular pre-B, está caracterizada por los linfoblastos que contienen pequeñas cantidades de IgG e indetectable IgS. Se ha reportado que estas células tienen los Ag Ia y AgCLAL, y pueden manifestar RFcIgG y RC. Alrededor del 20% de los pacientes con LAL no-T, no-B tienen blastos con características de células pre-B. También éste puede ocurrir durante la LGC/CB. Crist y colaboradores sugirieron que los dos tipos de LAL, el de células pre-B y el de células no-T, no-B, son entidades estrechamente relacionadas; de acuerdo a los datos de las características clínicas y de laboratorio.

#### 5) LAL de células B (4).

Las LAL de células B, constituyen alrededor del 2% de todos los casos de LAL. Sobrellevan moléculas de IgS enlazadas a la membrana; sintetizan IGM monoclonal y poco o nada de IgD. El fenotipo más frecuente de la LAL de células B es  $IgS^+$ ,  $Ia^+$ ,  $AgCLAL^+$ ,  $E^-$ ,  $T^-$ . Los Ag Ia parecen estar presentes, sin excepción, sobre la superficie de estos blastos. Las células pueden o no llevar, RFc o RC sobre su superficie.

#### Métodos de inmunodiagnóstico (4,25,26).

Las células pueden ser evaluadas serológicamente, con respecto a la presencia de AAL por varias técnicas, las cuales incluyen la de microcitotoxicidad dependiente de C, el RIE, métodos inmunoenzimáticos y el método de inmunofluorescencia.

Las pruebas dependientes de C, llevan el riesgo de una muerte variable inespecífica de las células leucémicas, por el C de conejo. El RIE es muy sensible para la detección de Ag enlazados a las células, también puede ser aplicado para la detección de Ag solubles circulantes

en el plasma. El método inmunoenzimático puede ser tan específico y sensible como el RIE, y tiene la ventaja de requerir equipo barato y la utilización de reactivos no tóxicos.

La inmunofluorescencia, también es un método muy sensible, ya que el marcado con fluorescencia, provee una localización rápida y precisa del sitio de la interacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) y además, con el empleo de un clasificador celular activado por fluorescencia puede mejorar, marcadamente, la sensibilidad del ensayo, ya que detecta células reactivas en una frecuencia de por lo menos el 1%.

#### Anticuerpos (1,26,27).

El empleo de la inmunofluorescencia como herramienta inmunológica de diagnóstico, implica la preparación de antisueros específicos, mediante la inmunización experimental de animales de laboratorio, y la síntesis de Ac monoclonales por medio de hibridomas, método difícil de realizar en nuestro medio.

La inmunización experimental se lleva a cabo inyectando inmunógenos de forma deliberada, ya sea en la piel (por vía intradérmica o subcutánea) o en el músculo; el volumen de inmunógeno inyectado depende de su irritabilidad; en el caso de ciertos Ag, también se utilizan las vías intraperitoneal e intravenosa.

Si una célula extraña, sea de origen animal, bacteriano o micótico, es introducida en otro organismo, dicha célula actúa como inmunógeno, y es destruida en el huésped; muchos de los componentes de la superficie celular o de su medio interno (componentes del citoplasma y del núcleo) poseen capacidad inmunogénica. Los Ag de superficie poseen mayor capacidad inmunogénica cuando se administran formando parte de una célula intacta, que cuando son administrados en forma purificada, probablemente debido a que, su presencia en células intactas facilita las interacciones con las células productoras de Ac.

La potencia inmunogénica de las proteínas solubles, se mejora generalmente, si éstas pueden persistir en los tejidos durante períodos prolongados, de acuerdo con esto, se ha desarrollado un método de inmu-

nización que implica la administración de geles, a los cuales se adsorben los inmunógenos solubles; el lento desprendimiento del inmunógeno sirve para mantenerlo en los tejidos durante períodos prolongados. Estos geles se denominan adyuvantes, término que se aplica a toda sustancia que incrementa la respuesta ante el inmunógeno con el cual se inyecta.

### Inmunofluorescencia (1,26,27,28,29,30).

El método de Ac fluorescentes combina los métodos histoquímicos e inmunológicos para localizar complejos Ag-Ac específicos, presentes en secciones de tejidos e preparaciones de células, bacterias, protozoarios, e bien, componentes celulares como proteínas, hormonas y enzimas, con ayuda de sustancias químicas acopladas e conjugadas a la estructura del Ac, de manera que se pueda estudiar su especificidad inmunológica. Así, se preparan Ac purificados que se marcan con colorantes fluorescentes -fluorocromos- que se emplean en la técnica descrita por Coons, quien introdujo el uso de derivados de la fluoresceína como fluorocromos para localizar los sitios en que se encuentra el Ag, observando el complejo Ag-Ac al microscopio de fluorescencia.

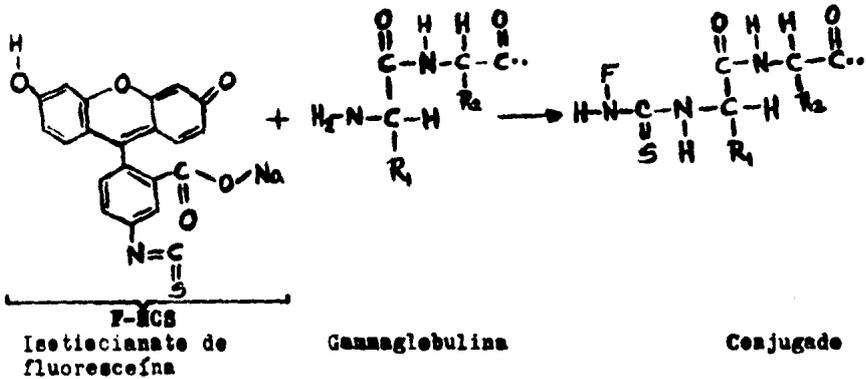
Los derivados de la fluoresceína que más se han usado como fluorocromos, son los compuestos en forma de isocianato e isotiocianato, siendo este último, el que se emplea actualmente, debido a la facilidad con se conjuga a la gammaglobulina.

Coons y colaboradores, en 1941, fueron los primeros en obtener resultados satisfactorios al localizar el polisacrido soluble de neumococos, en secciones de tejidos de ratón infectado, utilizando un Ac conjugado con fluoresceína. Posteriormente, en 1958, emplearon isocianato de fluoresceína para marcar el Ac, y en ese mismo año Riggs y colaboradores sintetizaron el isotiocianato de fluoresceína (ITCF) que se conjuga mejor a la gammaglobulina, y que se aplicó a esta técnica, gracias a Marshal y colaboradores. Goldstein, en 1960, introdujo la cromatografía en columna y la filtración en gel para la purificación del conjugado.

Se ha comercializado el isómero No 1 del ITCP, que es el más adecuado, debido a su intensidad de fluorescencia, su estabilidad y capacidad de combinación con la proteína. Este compuesto presenta fluorescencia verde-amarilla a la radiación ultravioleta y tiene un PM de 389.4.

Cuando el fluorocromo se hace reaccionar con una solución alcalina de proteína, se forma un enlace tiocarbamida entre el radical  $\text{SCN}^-$  del primero y los grupos amine libres ( $\epsilon\text{-NH}_2$ ) de los aminoácidos lisina de la gammaglobulina, quedando marcado el Ac. La experiencia indica que sólo un 15% de los restos de lisina de la gammaglobulina se enlaza al fluorocromo.

Esquema de la reacción (31):



El fluorocromo es aquella sustancia que absorbe energía radiante en forma de cuantos luminosos de una cierta longitud de onda, de tal manera, que al ser excitados sus electrones, éstos son desplazados a un orbital de mayor energía, del que regresan a su posición original, emitiendo energía luminosa de mayor longitud de onda a la absorbida en la porción visible del espectro. La fluoresceína es excitada por la luz ultravioleta o azul, para emitir luz verde-amarilla visible. Si la emisión es de corta duración ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  seg para el retorno de la molécula excitada al estado de reposo), el proceso se denomina fluorescencia; si la emisión es de larga duración, el proceso se denomina fosfo-

rescencia.

Las sustancias fluorescentes pueden ser conjugadas con los Ac sin interferir con su especificidad y capacidad para combinarse con su Ag, siempre y cuando, la sección de tejido o las células se preparen adecuadamente. El Ag puede ser de origen exógeno al tejido o célula (microorganismos), o bien, ser parte intrínseca de ellos, y la localización del complejo Ag-Ac fluorescente, puede servir para el diagnóstico o para establecer la posición exacta de un determinado Ag.

#### Métodos de la técnica de inmunofluorescencia.

Existen cuatro métodos para el desarrollo de la técnica de inmunofluorescencia, cada uno con sus aplicaciones y ventajas particulares.

##### 1) Método directo (26,29,31).

Consiste en la reacción específica de un Ac marcado con su Ag correspondiente. Se aplica en la búsqueda rápida de Ag en secciones de tejidos u otra preparación.

##### 2) Método indirecto (26,28,29).

Es el más adecuado y conveniente, el Ac específico para el Ag no se marca, pero después de formado el complejo Ag-Ac se hace reaccionar con un conjugado frente a la especie de que precede el primer Ac. De esta manera, es posible trabajar con Ac obtenidas en conejo, específicos para una gran variedad de Ag y usar un sólo reactivo fluorescente, que podría ser una gammaglobulina de cabra anti-gammaglobulina de conejo. Si se observa fluorescencia específica, se tiene evidencia indirecta de la presencia del Ag o del Ac en la muestra que se estudia.

##### 3) Método del complemento (26,29,31).

Este método, emplea la capacidad del Ag y el C para unirse al Ac. El C de caballo se localiza con Ac anti-C conjugados.

Figura No 1. Técnica de inmunofluorescencia.

1) Método directo

- a) Ac + Fluorecromo  $\longrightarrow$  Conjugado
- b) Ag + Conjugado  $\longrightarrow$  Fluorescencia específica
- c) Ag + Conjugado heterólogo  $\longrightarrow$  No hay fluorescencia

2) Método indirecto

- a) Ac anti-Ig de la especie de los Ac + Fluorecromo  $\longrightarrow$  Conjugado anti-especie de los Ac
- b) Ag + Ac  $\longrightarrow$  Complejo Ag-Ac
- c) Conjugado anti-especie de los Ac + Complejo Ag-Ac  $\longrightarrow$  Fluorescencia específica

3) Método del complemento

- a) Ac anti-C + Fluorecromo  $\longrightarrow$  Conjugado anti-C
- b) Ag + Ac + C  $\longrightarrow$  Complejo Ag-Ac-C
- c) Complejo Ag-Ac-C + Conjugado anti-C  $\longrightarrow$  Fluorescencia específica

4) Método de la inhibición de la fluorescencia

- a) Ag + Ac que se investiga no marcado  $\longrightarrow$  Complejo Ag-Ac
- b) Complejo Ag-Ac + Conjugado conocido  $\longrightarrow$  No hay fluorescencia

#### 4) Método de la inhibición de la fluorescencia (26,29,32).

Consiste en el bloqueo de la reacción entre el conjugado y el Ag por un Ac no conjugado. El método asegura una gran especificidad, y es muy usado en el diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias; un Ag se hace reaccionar con el suero sospechoso de contener Ac frente a ese Ag, para formar un complejo Ag-Ac que a continuación se hace reaccionar con el Ac, pero ahora conjugado. Si no existen Ac en el suero se observará fluorescencia, mientras que, si el suero contiene Ac, no habrá fluorescencia. Este método, también se emplea para probar la especificidad de algunos conjugados antes de utilizarlos.

#### Características de la técnica de inmunofluorescencia.

##### 1) Especificidad (26,27,28,29).

El Ac fluorescente es una proteína altamente específica y reacciona sólo con el Ag para el que se preparó. Se utilizan sueros de altos títulos, para que el conjugado resultante también lo posea.

La alta especificidad de la técnica se debe, en parte, al cuidado que debe tenerse en la preparación y purificación de los Ac, así como, en la absorción del conjugado con polvo de órganos desecados con acetona. Generalmente, se emplea polvo de hígado o de cerebro de ratón para la absorción del conjugado, pero es preferible utilizar polvo del sustrato sobre el que se desarrolló, o del cual se obtuvo el Ag, desecado con acetona.

##### 2) Sensibilidad (26,29,31,32).

La sensibilidad del método directo es muy similar a la de la prueba de fijación de C, pero difiere de la que poseen las pruebas de neutralización o hemaglutinación. Como no se puede medir la intensidad de la fluorescencia específica, no es posible determinar la sensibilidad exacta del método; en el cual, se emplea un exceso de Ac marcado, y la sensibilidad depende de la cantidad de Ag presente.

La sensibilidad del método indirecto es de cinco a diez veces mayor que la del directo, debido a que cada capa añadida, se combina como un Ac con un Ag subyacente; además, puede hacerse semicuantitativo si se prueban diluciones del Ag o del Ac problema. El método indirecto es muy conveniente, cuando sólo se pueden obtener pequeñas cantidades de muestra. Los métodos del complemento y de la inhibición de la fluorescencia, tienen una sensibilidad similar a la del método indirecto.

### 3) Rapidez (26,27,29,32).

El procedimiento de tinción y observación de fluorescencia, puede completarse en una o dos horas, siempre y cuando se tenga la habilidad necesaria; por lo que la inmunofluorescencia es más rápida que las pruebas serológicas, el aislamiento de un virus u otras pruebas, lo cual representa una clara ventaja, cuando es urgente un diagnóstico rápido y seguro.

## Requerimientos de la técnica de inmunofluorescencia.

### 1) Antígeno (26,27,29,31).

En cuanto a la preparación del Ag, este proceso debe llevarse a cabo, de manera que no lo enmascare y dificulte su unión con el Ac, o que pierda su reactividad frente a dicho Ac.

La muestra que contiene al Ag o al Ac que se sanejara como Ag a su vez, se trata con acetona para adherirlo firmemente al portaobjetos, para eliminar grasas y otras sustancias que puedan interferir con la reacción Ag-Ac. Sin embargo, en ocasiones la fijación con acetona puede aumentar la fluorescencia inespecífica, o la autofluorescencia del material en estudio, por lo que no se somete a este tratamiento. La concentración del Ag en el material, debe ser la adecuada para que sea detectado por esta técnica.

Los Ag pueden ser intracelulares, dentro o cerca de la superficie celular, o extracelulares, y el modo de manipulación del sustrato es

en gran parte, determinado por su distribución. Para la reacción con Ag intracelulares, se requiere el acceso de los Ac específicos, por lo que las células deben ser tratadas en cortes y abiertas en las secciones criostáticas de tejidos; o bien, sus membranas deben ser averiadas para la fijación en seco, realizado a partir de suspensiones celulares.

Los Ag sobre la superficie celular pueden ser escasos o lábiles, de modo que el tejido específico, es difícil de reconocer en las secciones criostáticas, en frotis y en la fijación en seco; por lo que los procedimientos de tñido y observación, son llevados a cabo con suspensiones de células vivientes, cuya superficie celular es mantenida íntegramente.

## 2) Anticuerpo (26,27,28,29,31).

El programa de inmunización que se realiza para obtener los Ac específicos, que se conjugaran, debe realizarse, siempre que sea posible, con el Ag libre de sustancias o componentes del tejido normal, para evitar la formación de Ac contra éste. En todo caso, el suero y/o la solución del conjugado deben absorberse con preparaciones del tejido o con polvo del mismo, y también con otros órganos desecados con acetona, para evitar la fluorescencia inespecífica o extraña.

El suero insune específico debe contener un alto título de Ac, para que el conjugado que se prepare resulte potente; los conejos, ovejas y cabras son los animales apropiados para obtener este tipo de sueros.

El proceso de conjugación debe llevarse a cabo de manera que permita al suero conservar su título original de Ac, o que al menos resulte muy próximo a él. El antisuero para ser conjugado debe estar libre de albúmina,  $\alpha$  y  $\beta$ -globulinas; puesto que, para combinarse con la marca fluorescente, las inmunoglobulinas poseen menor afinidad que las anteriores. Además, estas proteínas tienen mayor carga negativa cuando están conjugadas, y producen coloración inespecífica por enlace electrostático a proteínas básicas presentes en los tejidos o

células.

Es importante que se determine con exactitud, la proporción fluorocromo-proteína, que debe ser 1:2 en relación molar, para evitar que el Ac fluorescente adquiriera una fuerte carga negativa, la cual, se incrementa, si la proporción no es la adecuada. Lo anterior, produciría la aparición de fluorescencia inespecífica, debido a la adsorción de las proteínas que acompañan al Ac específico; pues la globulina no conjugada posee carga negativa más débil y reacciona más rápidamente que la marcada.

### 3) Fluorocromo (26,29,30,31,32).

Se busca siempre que sea fácilmente conjugable y que la unión fluorocromo-proteína sea estable. Así mismo, que no interfiera con la reactividad del Ac.

Una característica esencial del fluorocromo, debe ser una alta intensidad fluorescente, es decir, que emita luz de longitud de onda diferente a la de radiación de excitación (sólo mientras exista ésta), y que tal diferencia sea lo más grande posible.

El ITCF absorbe luz a una longitud de onda de 490 nm y la emite a una longitud de onda de 520 nm, la cual es visible en la región verde-amarilla del espectro, al microscopio de fluorescencia. El color fluorescente, rara vez es encontrado en los tejidos de mamíferos como autofluorescencia, y de esta forma, es rápidamente diferenciado de la autofluorescencia azul, a menudo observada en los sustratos. El isómero No 1 del ITCF es el preferido, debido a su alta densidad óptica y emisión de fluorescencia.

### 4) Condiciones de reacción (26,29,32,33).

Se debe establecer la dilución óptima operante o título de trabajo del conjugado, lo cual se determina realizando diluciones seriadas del conjugado, y comparando los resultados con los de un Ag o un Ac estandarizados; debe controlarse el tiempo, la temperatura y la humedad a las cuales se lleva a cabo la reacción, así como el pH de la solución salina amortiguadora, tanto para diluir el suero y el

conjugado, como para lavar las preparaciones y la forma en que deben realizarse estos lavados.

El alargamiento del tiempo de aplicación del conjugado a las preparaciones, puede aumentar el teñido inespecífico, por lo que, como ya se mencionó antes, se debe controlar.

#### 5) Controles (26,29,31,32).

Los controles sirven para diferenciar la fluorescencia atribuible a la reacción inmunológica específica de la fluorescencia inespecífica, la autofluorescencia y de la fluorescencia específica indeseable o extraña.

Es importante incluir en la preparación y observación, controles positivos y negativos, para poder establecer si una imagen fluorescente es el resultado de la localización específica del Ac conjugado a su Ag.

Un primer control, sería una sección de la muestra en estudio sin reaccionar con el conjugado; otro control, la muestra tratada con suero o globulina homólogos, sin conjugar; otro, sería un Ag heterólogo tratado con el conjugado, y un cuarto control, sería el uso de un suero conjugado inespecífico contra el Ag en cuestión. También, debe correrse un testigo positivo, que consistiría de una muestra antigénica tratada con un conjugado, de ser posible estandarizado.

#### 6) Observación (26,29,32).

Para la observación de la fluorescencia al microscopio, la elección de la fuente de luz, el sistema de iluminación y la combinación de los filtros, son los principales factores en la determinación de la sensibilidad de la inmunofluorescencia.

Se utiliza una fuente de luz ultravioleta, que puede ser una lámpara de vapor de mercurio de alta presión, que requiere de ciertos cuidados especiales para su empleo, o una lámpara de halógeno, que es más sencilla de manejar. La lámpara de vapor de mercurio a alta presión más utilizada, es la denominada HBO-200 y de halógeno es la de Iodo-cuarzo.

La longitud de onda deseada se obtiene mediante los filtros adecuados. Los filtros utilizados son: el filtro de excitación BG-12, filtros OG-1 o de 530 nm y filtro GG-9.

Actualmente, el sistema de iluminación más utilizado, es el sistema de epiiluminación, introducido por Ploem, el cual emplea un iluminador vertical y un espejo dicroico. En este sistema, el haz luminoso excitatorio es enfocado directamente sobre la muestra a través de la lente del objetivo. La luz fluorescente emitida a partir de la muestra epiiluminada, es transmitida al ojo a través del espejo dicroico; un espejo dicroico permite el paso de la luz de longitud de onda seleccionada en una dirección a través del espejo, pero en la dirección opuesta.

La fluorescencia puede combinarse con la luz transmitida, para el examen por contraste de fases de las muestras, permitiendo una mejor definición de la morfología y la fluorescencia.

El sistema de filtros intercambiables, permite un examen rápido de la muestra a diferentes longitudes de onda, para el tefido doble con distintos fluorocromos, por ejemplo, rojo y verde (rodamina y fluoresceína, respectivamente), da por resultado una sensibilidad mayor para el examen de fluorescencia en la membrana celular de los linfocitos.

## 7) Interpretación de la fluorescencia (26,27,28,29).

Existen varios problemas típicos en la técnica de inmunofluorescencia, que es necesario conocer para evitar confusiones y resultados falsos. Estos problemas son la autofluorescencia, la fluorescencia específica indeseable o extraña, y la fluorescencia inespecífica.

La autofluorescencia, es la que presenta la muestra en estudio por sí misma, al recibir la radiación ultravioleta. Puede ser blanca o azul-violeta, y se distingue fácilmente de la fluorescencia específica, que es verde-amarilla. La autofluorescencia se incrementa por la fijación con formalina y la inclusión en parafina.

La fluorescencia específica indeseable o extraña se produce cuando el inmutógeno que se empleó fué impuro, debido a la presencia de

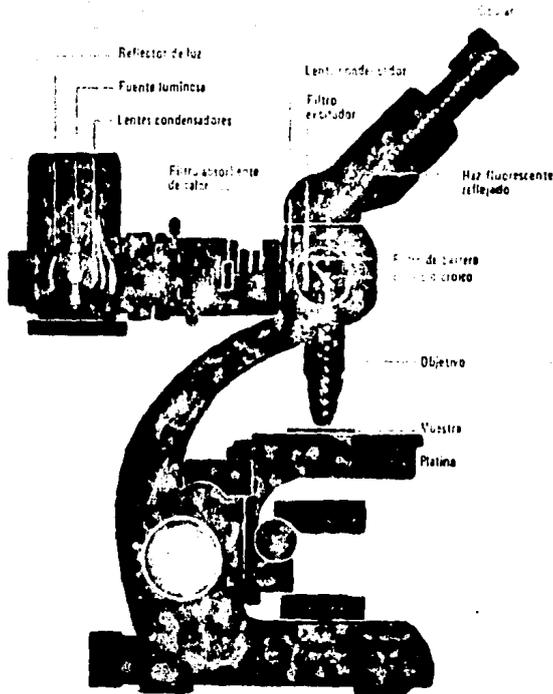
proteínas o de otros Ag heterólogos, que indujeron la producción de Ac que no pueden eliminarse del suero y/o conjugado con la absorción de tejidos normales.

La fluorescencia inespecífica puede deberse al fluorocromo mismo, a la alta concentración del conjugado o al exceso de fluorocromo sin conjugar; se ha observado que se produce en menor proporción con el isotiocianato que con el isocianato de fluoresceína.

También la fluorescencia inespecífica puede producirse debido a la fuerte carga negativa del Ac, a la fijación de la muestra y a la desecación de la preparación durante la reacción, lo que favorece la formación de cristales fluorescentes. La posibilidad de que se presente este problema, disminuye cuando se controlan las concentraciones de proteína y fluorocromo, el tiempo, la temperatura y las demás variables que puedan influir en la reacción, así como, llevar a cabo una apropiada purificación del conjugado.

Para que la observación de la fluorescencia se tome como específica, deben tomarse en cuenta las imágenes resultantes de los testigos positivo y negativo, la manera en que se manejaron las preparaciones, y si el examen de fluorescencia al microscopio ha sido correcto.

También es necesario recordar que la intensidad de la fluorescencia depende de la cantidad de Ag presente, y que la fluorescencia específica no puede ser identificada o localizada, a menos que exista una emisión suficiente de fluorescencia; lo que indica, que no necesariamente, la falta de fluorescencia, es por ausencia de Ag específico. Es evidente que la experiencia en la observación de la fluorescencia específica es indispensable.



**Fig. 2. Microscopio fluorescente con epilluminação. El haz luminoso es dirigido a través de un filtro excitatorio y hacia abajo hasta la muestra. Un espejo dicróico permite el paso de ondas luminosas de longitud seleccionada en una dirección, pero no en otra. Después de alcanzar la muestra, la luz es reflejada a través del espejo dicróico y la luz fluorescente emitida es visualizada en el ocular.**

**O B J E T I V O**

Preparar inmunoglobulinas específicas que detecten marcadores en la superficie de los linfocitos y de las células leucémicas, que al ser demostradas por el método de inmunofluorescencia, sirvan para identificar y clasificar las diferentes variedades inmunológicas de la leucemia aguda linfoblástica.

## MATERIAL Y METODOS

Material biológico .

- Células de LAL-L1 (clasificación FAB) de la paciente C.P., de 17 años, la cual presentaba en sangre periférica Hb 10g/100 cm<sup>3</sup>, Ht 30%, 58 000 leucocitos/mm<sup>3</sup>, 95% de blastos y en médula ósea 98%, inmunológicamente no-T, no-B (E 6%, EA 8%, EAC 7%, IgS<sup>-</sup>, IgIC<sup>-</sup>) y citoquímicamente PAS SCHIFF (+), y SUDAN NEGRO B (-).
- Células de LAM-M1 y LAM-M4 (clasificación FAB), de pacientes citoquímicamente SUDAN NEGRO B (+).
- Células de LLC del paciente D.M.S., de 62 años, el cual presentaba en sangre periférica Hb 11.5g/100 cm<sup>3</sup>, Ht 36%, 104000 leucocitos/mm<sup>3</sup> y 98% de linfocitos, inmunológicamente de tipo B (IgS<sup>+</sup>, 98%; IgIC<sup>-</sup>, 3%; EAC 83%; EA 42%; M 26% y E 1%).
- Glóbulos rojos de bovino al 2%, sensibilizados con IgG de conejo anti-glóbulos rojos de bovino.

Se realizaron 3 lavados de 2 ml de glóbulos rojos de bovino (Grandes Especies, Pac. Veterinaria, UNAM, México) con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Luego, se prepararon 5 ml de una suspensión al 2%. También se preparó una solución de IgG de conejo anti-glóbulos rojos de bovino (Lab. de Investigación-Hematología, H.G..SS) 1:100. Se tomaron 5 ml de glóbulos rojos de bovino al 2% y se mezclaron con los 5 ml de la solución 1:100 de IgG de conejo anti-glóbulos rojos de bovino, incubándose la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Después, se lavaron los glóbulos rojos de bovino 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Se desechó el último sobrenadante y se ajustó a una suspensión al 2%, guardándose ésta a 4°C hasta su empleo.

- Glóbulos rojos de carnero al 2%.

Se tomaron 2 ml de glóbulos rojos de carnero (Bioterio, H.G., SS) y se lavaron 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Se desechó el último sobrenadante y se ajustó a una suspensión al 2%, guardándose ésta a 4°C hasta su empleo.

- Glóbulos rojos de carnero al 2%, sensibilizados con IgM de conejo anti-glóbulos rojos de carnero y complemento.

Se tomaron 2 ml de glóbulos rojos de carnero y se lavaron 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, y después se preparó una suspensión al 5%. Se preparó una solución 1:2000 de hemolisina (IgM de conejo anti-glóbulos rojos de carnero, Aboceptor 6000, Behring Institute, Germany). Se tomaron 5 ml de glóbulos rojos de carnero al 5% y se mezclaron con 5 ml de la solución 1:2000 de hemolisina, incubándose la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Después, se lavaron los glóbulos rojos de carnero 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Se prepararon 5 ml de una solución 1:50 de suero humano (como fuente de complemento). Se tomaron 5 ml de glóbulos rojos de carnero al 5% sensibilizados con la IgM de conejo anti-glóbulos rojos de carnero, y se mezclaron con 5 ml de solución 1:50 de suero humano, incubándose la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Después, se lavaron los glóbulos rojos de carnero y se desechó el último sobrenadante. Se ajustó a una suspensión al 2% y se guardaron a 4°C hasta su empleo.

- Glóbulos rojos de ratón al 2%.

Se tomaron 0.2 ml de glóbulos rojos de ratón (Bioterio, H.G., SS) y se lavaron 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Después, se preparó una suspensión al 2% y se guardó a 4°C hasta su empleo.

### Suero anti-linfocito B

Se aislaron las células linfoides de sangre periférica del paciente D.M.S. (ver material biológico), con diagnóstico de LLC, por gradiente de densidad en ficoll-telebrix. Esta suspensión de células, rica en linfocitos B, fué criopreservada a  $-195^{\circ}\text{C}$ , en nitrógeno líquido hasta su empleo, en alícuotas de  $6.1 \times 10^8$  células/ml (26,34,49).

Una cantidad de  $7.6 \times 10^8$  células/ml, descongeladas y lavadas con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, conteniendo mas del 95% de linfocitos con el 90% de viabilidad, medida por medio del colorante de exclusión vital, azul tripano al 0.3%; se inyectó por vía intravenosa, en la vena marginal de la oreja, a un conejo albino Nueva Zelanda de 3 meses de edad y 2.5 Kg de peso (Bioterio, H.G.,SS), en intervalos de una semana. Este animal fué sangrado mediante punción cardiaca, 9 días después de la segunda inyección, separando el suero e inactivándolo a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos (26,27,34,35).

Se valoró la potencia del suero inmune con células linfoides de LLC, mediante una prueba de aglutinación en tubo a  $37^{\circ}\text{C}$ : en una serie de 12 tubos, en el primero se colocaron 50  $\mu\text{l}$  de suero anti-linfocito B y en los restantes 50  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2. Al segundo tubo se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de suero anti-linfocito B, se mezcló y se extrajeron 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla, transfiriéndose al siguiente; nuevamente se mezcló y se extrajeron 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla, transfiriéndose al cuarto tubo, y así sucesivamente hasta el penúltimo, del cual, se eliminaron 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla. El último tubo, con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, se empleó como control de linfocitos sin reaccionar con el suero anti-linfocito B. En un tubo adicional o tubo No 13, se colocaron 50  $\mu\text{l}$  de suero normal de conejo, como segundo control. A cada uno de los tubos se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de una suspensión de  $2 \times 10^6$  células/ml de LLC, y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. El título estuvo dado por la máxima dilución que fué capaz de dar aglutinación visible (26,27,28).

El suero inmune de conejo, reactivo con las células de LLC en la prueba anterior, fué diluido 1:4 y absorbido volúmen a volúmen con gló-

bulos rojos humanos AB, Rh(+), usando  $15-60 \times 10^6$  células/ml; también, con tejido homogeneizado de hígado y cerebro humanos ( donados por la U. PATOLOGIA, H.G.,SS); la absorción con cada uno de los tejidos se llevó a cabo 5 veces a 25°C durante 30 minutos (26,34,35).

Se valoró la potencia del suero inmune absorbido con linfocitos normales, mediante una prueba de inhibición de formación de rosetas EAC, EA, M, ES, E: en 3 series de 5 tubos cada una, se colocaron 250  $\mu$ l de una suspensión de  $4 \times 10^6$  células/ml de linfocitos normales, obtenidos de sangre periférica mediante centrifugación por gradiente de densidad en ficoll-telebrix. A cada tubo de la primer serie se le agregaron 250  $\mu$ l de suero anti-linfocito B, y a los de la segunda, 250  $\mu$ l de suero normal de conejo, como primer control. Como segundo control, los tubos de la tercer serie, permanecieron sólo con los linfocitos normales. Los tubos de las dos primeras series fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos; luego, los linfocitos se lavaron 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, mediante centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. Los linfocitos de un tubo de cada serie fueron tratados mediante uno de los métodos de formación de rosetas EAC, EA, M, ES y E. Para la formación de rosetas EAC, se adicionaron 250  $\mu$ l de una suspensión al 2% de glóbulos rojos de carnero sensibilizados, mezclándose; luego, la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 30 segundos y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Para la formación de rosetas EA, se agregaron 250  $\mu$ l de una suspensión al 2% de glóbulos rojos de bovino sensibilizados, mezclándose; luego, la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 30 segundos y se incubó a 4°C durante 60 minutos. Para la formación de rosetas M, se adicionaron 250  $\mu$ l de una suspensión al 2% de glóbulos rojos de ratón, mezclándose; luego, la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 30 segundos y se incubó a 4°C durante 60 minutos. Para la formación de rosetas ES, se agregaron 250  $\mu$ l de una suspensión al 2% de glóbulos rojos de carnero, mezclándose; luego, la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 30 segundos y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Para la formación de rosetas E, se adicionaron 250  $\mu$ l de una suspensión al 2% de glóbulos rojos de carnero, se mezcló y se incubó a 37°C durante 15 minutos; luego, la mezcla se centrifugó a 1500 rpm du-

rante 30 segundos y se incubó a 4°C durante 24 horas. Se determinó el porcentaje de células formadoras de rosetas (linfocitos con 3 o más glóbulos rojos adheridos a su membrana), el cual fué determinado en un hemocitómetro, mediante el conteo de 200 linfocitos en campos diferentes, con el objetivo seco fuerte de un microscopio óptico (K 17, Zeiss, West Germany) (14,26,34).

Se agregó 0.0001% de merthiolate al suero inmune absorbido y se almacenó a -20°C.

### Suero anti-linfocito T

Se utilizó una sección de tejido de cerebro humano normal (donado por la U. PATOLOGIA, H.G.,SS), la cual fué lavada y homogeneizada con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, y almacenada en alícuotas de 300 mg, peso húmedo, a -70°C hasta su empleo (36,37).

Las alícuotas de cerebro normal humano se descongelaron según fueron utilizadas, y sus contenidos se emulsificaron con un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund (Gibco Laboratories, USA); La emulsión resultante fué inyectada por vía subcutánea a un conejo albino Nueva Zelanda de 3 meses de edad y 2.5 Kg de peso (Bioterio, H.G.,SS), en diversas partes del lomo, en intervalos de una semana. El conejo recibió 300 mg, peso húmedo, de cerebro normal humano por inyección; inmunizándolo con un total de 7 inyecciones. Fué sangrado el animal mediante punción cardiaca, 7 días después de la última inyección, separando el suero e inactivándolo a 56°C durante 30 minutos (26,27,34,37).

Se valoró la potencia del suero inmune con linfocitos normales, mediante una prueba de inhibición de formación de rosetas E,ES,M,EA, EAC: en 3 series de 5 tubos cada una se colocaron 250 µl de una suspensión de  $4 \times 10^6$  células/ml de linfocitos normales, obtenidos de sangre periférica mediante centrifugación por gradiente de densidad en ficoll-tallex. A cada tubo de la primer serie se le adicionaron 250 µl de suero anti-linfocito T, y a los de la segunda, 250 µl de suero normal de conejo, como primer control. Como segundo control, los tubos de la

tercer serie, permanecieron sólo con los linfocitos normales. Los tubos de las dos primeras series fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos; luego, los linfocitos se lavaron 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, mediante centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. Los linfocitos de un tubo de cada serie fueron tratadas mediante uno de los métodos de formación de rosetas E, ES, M, EA y EAC, los cuales ya fueron descritos en la valoración del suero anti-linfocito B. Se determinó el porcentaje de células formadoras de rosetas (linfocitos con 3 o más glóbulos rojos adheridos a su membrana), el cual fué determinado en un hemocitómetro, mediante el conteo de 200 linfocitos en campos diferentes, con el objetivo seco fuerte (15,26,34, 37).

El suero inmune de conejo, reactivo con los linfocitos normales, en la prueba anterior, fué diluido 1:4 y absorbido volumen a volumen con glóbulos rojos humanos AB, Rh(+), usando  $15-60 \times 10^6$  células/ml, con células de LLC y LAM-M1, en igual concentración, y tejido homogeneizado de hígado normal humano. La absorción con los glóbulos rojos y las células de LLC se llevó a cabo, con cada uno, 5 veces a 25°C durante 30 minutos; con las de LAM-M1, 2 veces, a la misma temperatura y tiempo de absorción anteriores, y con el hígado, 5 veces a 4°C durante 60 minutos (26,34,37).

Se valoró la potencia del suero inmune absorbido con linfocitos normales, mediante una prueba de inhibición de formación de rosetas E: en una serie de 12 tubos, en el primero se colocaron 250 µl de suero anti-linfocito T y en los restantes 250 µl de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2. Al segundo tubo se agregaron 250 µl de suero anti-linfocito T, se mezcló y se transfirieron 250 µl al siguiente; nuevamente se mezcló, se extrajeron 250 µl de la mezcla y se transfirieron al cuarto, y así sucesivamente hasta el penúltimo tubo, del cual se eliminaron 250 µl de la mezcla. El último tubo con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, se empleó como control de linfocitos sin reaccionar con el suero anti-linfocito T. En un tubo adicional se colocaron 250 µl de suero normal de conejo, como segundo

control. A cada uno de los tubos se agregaron 250  $\mu$ l de una suspensión de  $4 \times 10^6$  células/ml de linfocitos normales, obtenidos de sangre periférica mediante centrifugación por gradiente de densidad en ficoll-telebrix, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Los linfocitos se lavaron 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, mediante centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. Se agregaron 250  $\mu$ l de una suspensión al 2% de glóbulos rojos de carnero, se mezcló y se incubaron a 37°C durante 15 minutos; luego, la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 30 segundos y se incubó a 4°C durante 24 horas. Se determinó el porcentaje de células formadoras de rosetas (linfocitos con 3 o más glóbulos rojos de carnero adheridos a su membrana), el cual, fue determinado en un hemocitómetro mediante el conteo de 200 linfocitos en campos diferentes, con el objetivo seco fuerte (15,26,34,37).

Se agregó 0.0001% de merthiolate al suero inmune absorbido y se almacenó a -20°C.

### Suero anti-LAL

Se aislaron las células linfoides de sangre periférica heparinizada, de la paciente C.P. (ver material biológico), con diagnóstico de LAL-L1, mediante centrifugación por gradiente de densidad en ficoll-telebrix. Esta suspensión de células, rica en linfoblastos no-T, no-B, fue criopreservada a -195°C, en nitrógeno líquido hasta su empleo, en alícuotas de  $2-5 \times 10^8$  células/ml (17,21,25,26,27,35).

Una cantidad inicial de  $2.5 \times 10^8$  células/ml, descongeladas y lavadas con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, conteniendo más del 95% de linfoblastos con el 90% de viabilidad, medida por medio del colorante de exclusión vital, azul tripano al 0.3%; se inyectó 2 veces, por vía intravenosa, en la vena marginal de la oreja, a un conejo albino Nueva Zelanda de 3 meses de edad y 2.5 Kg de peso (Bioterio, H.G., SS), en intervalos de una semana. Se inyectaron  $4.41 \times 10^8$  células/ml, 121 días después de la primera inoculación, y a los 18 días siguientes fue sangrado el animal mediante punción cardiaca, separando el suero e

inactivándolo a 56°C durante 30 minutos (17,25,26,35).

Se valoró la potencia del suero inmune con células de LAL-L1, no-T, no-B, mediante una prueba de aglutinación en tubo a 37°C: en una serie de 12 tubos, en el primero se colocaron 50 µl de suero anti-LAL y en los restantes 50 µl de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2. Al segundo tubo se agregaron 50 µl de suero anti-LAL, se mezcló y se extrajeron 50 µl de la mezcla, transfiriéndose al tercero; nuevamente se mezcló y se transfirieron 50 µl al cuarto, y así sucesivamente hasta el penúltimo tubo, del cual se eliminaron 50 µl. El último tubo con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, se empleó como control de células de LAL-L1, no-T, no-B, sin reaccionar con el suero anti-LAL. En un tubo adicional se colocaron 50 µl de suero normal de conejo, como segundo control. A cada uno de los tubos se agregaron 50 µl de una suspensión de  $2 \times 10^6$  células/ml de LAL-L1, no-T, no-B, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. El título estuvo dado por la máxima dilución que fué capaz de dar aglutinación visible (26,27,28).

El suero inmune de conejo, reactivo con las células de LAL-L1, no-T, no-B, en la prueba anterior, fué diluido 1:4 y absorbido volúmen a volúmen con glóbulos rojos humanos AB, Rh(+), usando  $15-60 \times 10^6$  células/ml con células de LLC y de LAM-M4, en igual concentración, y con tejidos homogeneizados de hígado y bazo humanos normales (donados por la U. PAATOLOGIA, H.G.,SS). La absorción con los dos primeros tipos de células, se llevó a cabo 5 veces a 25°C durante 30 minutos; con las de LAM-M4, 3 veces a la misma temperatura y tiempo de absorción anteriores, y con el hígado y bazo humanos, 5 veces a 25°C durante 30 minutos (17,25,26,35).

Se valoró la potencia del suero inmune absorbido con células de LAL-L1, no-T, no-B, mediante una nueva prueba de aglutinación en tubo a 37°C.

Se agregó 0.0001% de merthiolate al suero inmune absorbido y se almacenó a -20°C.

Preparación de los conjugados de gamma-globulinas anti-linfocito B, anti-linfocito T y anti-LAL con isotiocianato de fluoresceína

Se purificó cada una de las fracciones de gamma-globulinas a partir de 6.4 ml de suero anti-linfocito B, 16.5 ml de suero anti-linfocito T y 7 ml de suero anti-LAL mediante el método por precipitación con sulfato de amonio: 1) Con una solución de NaOH 2.0 N, se ajustó a 7.8 el pH de la solución saturada de sulfato de amonio, inmediatamente antes de la precipitación. 2) A cada volumen de suero contenido en un vaso de precipitados, se adicionó lentamente, gota a gota, y con agitación constante, medio volumen de solución de sulfato de amonio saturada (la concentración final de éste quedó a un tercio de saturación); se ajustó el pH a 7.8 con la solución de NaOH 2.0 N. 3) Se continuó agitando durante 1 hora, después de terminada la adición de la solución de sulfato de amonio; esto, con el fin de que precipitara toda la gamma-globulina y no quedaran absorbidas en el precipitado otras proteínas. 4) Se centrifugó cada suspensión a 3500 rpm durante 15 minutos. 5) Cada uno de los precipitados se disolvió con solución salina al 0.85%, pH 7.8, hasta que alcanzó un volumen igual al original de cada suero. 6) Se purificaron las fracciones de gamma-globulinas por una segunda y tercera precipitación; para la segunda precipitación se repitieron los pasos 1) al 5), y para la tercera, del 1) al 4). 7) Cada uno de los sedimentos de la última centrifugación, se disolvió en solución salina-amortiguador de boratos 0.2 M (en términos de borato), pH 7.8, hasta que alcanzó un tercio del volumen original de cada suero. 8) Las soluciones anteriores se dializaron a 4°C, contra la solución salina-amortiguador de boratos y se mantuvieron en agitación durante varios días, realizando 2 cambios diarios de la solución amortiguadora para eliminar completamente el sulfato de amonio; los iones sulfato se detectaron por adición de unas gotas de BaCl<sub>2</sub> al 10% a una pequeña muestra del dializado. 9) Se completó la diálisis cuando la prueba para los iones sulfato fué negativa, extrayendo inmediatamente las soluciones de las membranas (Spectrum Medical Industries, Inc, USA) y centrifugándolas a 3500 rpm a 4°C

durante 10 minutos, con el fin de eliminar los precipitados indeseables formados por proteínas deánaturalizadas y otros materiales insolubles (26,27,28).

Se determinó la concentración de proteínas de cada una de las preparaciones dializadas, mediante el método de Biuret, obteniéndose una concentración de 500 mg/100 ml en la de anti-linfocito B; 470 mg/100 ml en la de anti-linfocito T y de 400 mg/100 ml en la de anti-LAL.

Se midió el volumen de cada una de las soluciones de gamma-globulinas, obteniéndose 8.3 ml de la solución anti-linfocito B, 10 ml de la de anti-linfocito T y 11 ml de la de anti-LAL.

A nueve partes de cada una de las soluciones de gamma-globulinas se agregó una parte de solución amortiguadora de carbonatos 0.5 M, pH 9.0, y se colocaron las mezclas en un agitador magnético y éste a su vez, en el refrigerador a 4°C. Se pesó el isotiocianato de fluoresceína (Gibco Laboratories, USA) en una proporción de 0.02 mg/mg de proteína y se disolvió en 1 ml de acetona fría; para la solución de gamma-globulinas anti-linfocito B se pesaron 0.83 mg de ITCF, para la de anti-linfocito T, 0.94 mg, y para la de anti-LAL, 0.88 mg. Se agregaron las diluciones de fluoresceína a cada una de las de gamma-globulinas, gota a gota durante 15 minutos y se dejaron conjugar en el agitador, con agitación lenta y constante (evitando la formación de espuma), a 4°C durante 18 horas. Las soluciones resultantes se dializaron a 4°C contra varios cambios de solución salina-amortiguador de boratos 0.2 M, a un pH de 7.8. La diálisis fue completa cuando no hubo paso ya de fluoresceína por la membrana a la solución amortiguadora circundante, y estuvo visualmente libre del color verde-amarillo, bajo irradiación de luz ultravioleta. Hígado fresco de rata (Bioterio, H.G., 39) se cortó finamente y se lavó hasta dejarlo libre de sangre; fue homogeneizado en acetona y filtrado a través de papel filtro de poros amplios. Se secó a 37°C y se molió en un triturador, y en un mortero hasta polvo fino, tansándose para retirar las partículas gruesas. Se adicionó el tejido pulverizado a cada uno de los conjugados, en proporción de 100 mg/ml del volumen original de cada antisuero. Se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Nueva-

mente, esta operación se repitió. El volumen de los conjugados, clarificados mediante centrifugación, fué medido en una probeta, obteniéndose 8.0 ml de conjugado anti-linfocito B, 10.7 ml de anti-linfocito T y 10.5 ml de anti-LAL. Cada uno de los conjugados fué transferido a un matraz Erlenmeyer, y se les agregó 0.01 ml de solución de merthiolate por ml de conjugado; se taparon los matraces y se congelaron a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  (26,27,28,29).

Se valoró la potencia de los conjugados anti-linfocito B, anti-linfocito T y anti-LAL mediante el método directo de la técnica de inmunofluorescencia: para la titulación del conjugado anti-linfocito B, se usaron  $1 \times 10^6$  células/ml de LLC; para la del conjugado anti-linfocito T,  $1 \times 10^6$  células/ml de LAL-L1, tipo T (E 75%), y para la del conjugado anti-LAL,  $1 \times 10^6$  células/ml de LAL-L1, no-T, no-B. Se hicieron diluciones seriadas de cada conjugado, y se hicieron reaccionar mediante inmunofluorescencia directa con su respectivo Ag para establecer la dilución de trabajo. Para la titulación del conjugado anti-linfocito B se utilizó como control negativo, el conjugado anti-LAL; para las titulaciones de los conjugados anti-linfocito T y anti-LAL, se usó el conjugado anti-linfocito B. De acuerdo con los resultados obtenidos, el conjugado anti-linfocito B se diluyó a 1:5, el anti-linfocito T no se diluyó, y el anti-LAL se diluyó a 1:3. Se envasó cada uno de los conjugados en ampollitas selladas de 0.5 ml, y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo (26,27,29).

#### Método directo de la técnica de inmunofluorescencia

Se separaron células linfoides de una muestra de sangre periférica heparinizada, mediante centrifugación por gradiente de densidad en ficoll-telebrix: a 16 partes de una solución al 2% de ficoll (Ficoll 400 000, Pharmacia Fine Chemicals, Sweden), se le agregaron 10 partes de una solución al 33.9% de telebrix (Rudofea, Mexico), para preparar una solución con una densidad de  $\rho = 1.076 \text{ g/cm}^3$ . En un tubo de ensayo se colocaron 5 ml de la solución de ficoll-telebrix y sobre ella se

colocaron, resbalando por la pared del tubo, 5 ml de la muestra sanguínea, teniéndose cuidado de conservar la interfase que se formó entre la solución de ficoll-telebrix y la sangre. El tubo se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 2000 rpm, en una centrífuga refrigerada (CRU-5000, Damon/IEC Division, USA), al cabo de los cuales, los glóbulos rojos se depositaron en el fondo del tubo; el plasma quedó en el sobrenadante y entre éste y la solución de ficoll-telebrix, quedaron separadas las células linfoides como una capa de células. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se extrajeron las células linfoides de la interfase por aspiración, y se colocaron en un tubo de ensayo con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2. Las células se lavaron 2 veces con la solución amortiguadora mediante centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se contó el número de células recuperadas en un hemocitómetro, y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml (3,26,27).

En una serie de tubos, en cada uno, se colocaron 0.25 ml de una suspensión de  $1 \times 10^6$  células/ml y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se eliminaron los sobrenadantes por decantación y a cada tubo se agregaron 20 µl de un determinado conjugado, y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Se eliminó el exceso de conjugado, lavando 2 veces las células con la solución amortiguadora de fosfatos, mediante centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se procesó 0.25 ml de la suspensión celular con 20 µl de un conjugado de IgG-ITCF inespecífico, de conejo (Lab. de Investigación-Hematología, H.G.,SS), a fin de distinguir el tinte inespecífico de la fluorescencia atribuible a la reacción inmunológica específica de cada conjugado. Se montó, en forma separada, una gota de cada suspensión celular y se leyó a inmersión con glicerina amortiguada, pH 8.5, el porcentaje de células que presentaron fluorescencia de superficie específica en un microscopio de fluorescencia con sistema de epiluminación (Zeiss, West Germany) (26,29,31).

### Método intracitoplasmático directo de la técnica de inmunofluorescencia

Se separaron células linfoides de una muestra de sangre periférica heparinizada, mediante centrifugación por gradiente de densidad en ficoll-telebrix, como es descrito en el método anterior. Se fijaron 0.15 ml de una suspensión de  $1 \times 10^6$  células/ml en una laminilla, mediante centrifugación a 500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, en una citocentrífuga (SCA-003, Smiths Industries Limited, Great Britain) e incubación en acetona a 4°C durante 10 minutos. La preparación fijada se cubrió con 20  $\mu$ l de un conjugado anti-IgM (Hoeschst, USA) y se incubó a temperatura ambiente, en una cámara húmeda durante 20 minutos. El exceso de conjugado se eliminó mediante 2 lavados del portaobjetos en un baño de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, durante 5 minutos a 4°C. Se secó alrededor de la preparación fijada y se montó en glicerina amortiguada, pH 8.5, leyéndose a inmersión, el porcentaje de células que presentaron fluorescencia intracitoplasmática específica, en un microscopio de fluorescencia con sistema de epiluminación (5,26,29,31).

### Determinación de la distribución de los linfocitos B, linfocitos T y las células linfoides con el AgCLAL, en sujetos normales y pacientes con hemopatías malignas

Los conjugados anti-linfocito B, anti-linfocito T y anti-LAL se utilizaron para estudiar la distribución de los linfocitos B, linfocitos T y las células linfoides con el AgCLAL, en la circulación sanguínea de sujetos normales y pacientes con diferentes hemopatías malignas, mediante el método directo de la técnica de inmunofluorescencia.

El estudio de la distribución de las diferentes células linfoides, se completó detectando la presencia de IgS (células B), IgIC (células pre-B) y de receptores para glóbulos rojos de carnero (células T). Para detectar la presencia de IgS, se utilizó una mezcla de los conjugados anti-IgG (anti-cadena  $\gamma$ ), anti-IgM (anti-cadena  $\mu$ ) y anti-IgA (anti-ca-

dena  $\alpha$ ) (Hoeschst, USA), diluidos 1:4, y el método anterior de inmunofluorescencia; para detectar la presencia de IgIC, se usó el conjugado anti-IgM, diluido 1:4, y el método intracitoplasmático directo de la técnica de inmunofluorescencia. Para detectar la presencia de los receptores para los glóbulos rojos de carnero, se usaron los métodos de formación de rosetas E y ES, descritos anteriormente.

Se estudiaron las suspensiones de células linfoides de 36 sujetos normales, entre médicos, enfermeras, trabajadores y visitantes del Hospital General de México, SS. Con edades comprendidas entre los 18 y 59 años, de los cuales, 8 correspondieron al sexo masculino y 28 al femenino.

Se estudiaron las suspensiones de células linfoides de 76 pacientes leucémicos, de 2 pacientes con linfoma de Hodgkin (LH), de 9 con linfoma no Hodgkin (L no-H) y de 6 con diferentes afecciones malignas. Los casos se seleccionaron, dentro de los que no se encontraban aun controlados terapéuticamente de su padecimiento, a excepción de 2 de los 6 pacientes con diferentes afecciones malignas, que se encontraban en fase de remisión total. Los pacientes tuvieron edades comprendidas entre los 20 y 70 años, de los cuales, 55 correspondieron al sexo masculino y 21 al femenino. Todos ellos eran asistentes a la consulta externa o se encontraban encamados en el Servicio de Hematología, Unidad 103, del Hospital General de México, SS.

Dentro de los pacientes leucémicos estudiados, 6 casos presentaban LAL-L1; 30 LAL-L2; 2 LAL-L3; 7 LAM-M1; 1 LAM-M2; 8 LAM-M4; 2 LAM-M5; 1 LAM-M6; 8 LLC; 8 LGC y 3 LGC/CB. Dentro de los pacientes con diferentes afecciones malignas, 1 caso presentaba linfoma de Burkitt (LB) en remisión total; 1 enfermedad de Fisher-Evans (EFE); 1 LAL en remisión total; 1 leucemia de células peludas (LCP); 1 mononucleosis infecciosa (MI) y 1 leucemia crónica de megacariocitos (LCM).

## R E S U L T A D O S

Suero anti-linfocito BValoración de la especificidad y potencia

Al valorar la especificidad y potencia del suero anti-linfocito B con células linfoides de LLC, mediante la prueba de aglutinación en tubo a 37°C, se encontró un título de 256, como puede observarse en la tabla I.

Al valorar la especificidad y potencia del suero anti-linfocito B absorbido, mediante la prueba de inhibición de formación de rosetas EAC, EA, M, ES y E con linfocitos normales, se encontró un 72.20% de inhibición de formación de rosetas EAC en los linfocitos preincubados con el suero anti-linfocito B, con respecto a los linfocitos sin ningún tratamiento y un 53.48% de inhibición con respecto a los linfocitos preincubados con suero inespecífico, como puede observarse en la tabla II. Se encontró un 40.27% de inhibición de formación de rosetas EAC en los linfocitos preincubados con el suero inespecífico, con respecto a los linfocitos sin ningún tratamiento. También en esta tabla II, se muestran los porcentajes de inhibición en la formación de las rosetas EA, M, ES y E, producidos por cada uno de los sueros anteriores.

Al valorar la especificidad y potencia del conjugado anti-linfocito B con células linfoides de LLC, mediante el método directo de la técnica de inmunofluorescencia; se observó fluorescencia específica hasta la dilución 1:32, con un 10% de células positivas, como puede observarse en la tabla III. Se escogió la dilución 1:5 como dilución óptima operante o título de trabajo, ya que en ella existe un rango de sensibilidad adecuado, mayor al 60%, con respecto a las células linfoides B. Con esta dilución se trabajó en la identificación de los linfocitos B en sangre periférica humana.

**TABLA I**  
**Valoración de la especificidad y potencia del suero anti-linfocito B con células de LLC, por aglutinación**

Tubo	Dilución <sup>b</sup>	Aglutinación <sup>a</sup>	
		Macro	Micro
1	1:1	+	+
2	1:2	+	+
3	1:4	+	+
4	1:8	+	+
5	1:16	+	+
6	1:32	+	+
7	1:64	+	+
8	1:128	+	+
9	1:256	+	+
10	1:512	-	-
11	1:1024	-	-
12	Control I	-	-
13	Control II	-	-

<sup>a</sup>La valoración se realizó mediante la prueba de aglutinación en tubo a 37°C.

<sup>b</sup>El título se valoró en la última dilución que dió reacción positiva.

TABLA II

Valoración de la especificidad y potencia del suero anti-linfocito B con linfocitos normales, por inhibición de formación de rosetas

Condiciones	Tipo de rosetas (%)				
	EAC	EA	M	ES	E
Linfocitos	10	8	0	0	10
1. + Suero anti- linfocito B	(72.20) <sup>a</sup> (53.48) <sup>b</sup>	(76.47) <sup>a</sup> (38.46) <sup>b</sup>	(100) <sup>a</sup> (100) <sup>b</sup>	(100) <sup>a</sup> (100) <sup>b</sup>	(61.54) <sup>a</sup> ---
Linfocitos	22	13	1	1	9
2. + Suero inespecífico	(40.27) <sup>c</sup>	(61.76) <sup>c</sup>	(50) <sup>c</sup>	(50) <sup>c</sup>	(65.38) <sup>c</sup>
3. Linfocitos normales	36	34	2	2	26

<sup>a</sup> Porcentaje de inhibición de formación de rosetas de 1 con respecto a 3.

<sup>b</sup> Porcentaje de inhibición de formación de rosetas de 1 con respecto a 2.

<sup>c</sup> Porcentaje de inhibición de formación de rosetas de 2 con respecto a 3.

TABLA III

Valoración de la especificidad y potencia del conjugado anti-linfocito B con células de LLC, por inmunofluorescencia directa

Tubo	Dilución	% de células fluorescentes
1	1:1	98
2	1:2	80
3	1:4	63
4	1:8	62
5	1:16	20
6	1:32	10
7	1:64	0
8	1:128	0
9	1:256	0
10	Control	0

### Distribución de los linfocitos B en sujetos normales y pacientes con hemopatías malignas

En la tabla IV se muestra la reactividad del conjugado anti-linfocito B con las células linfoides de los 36 sujetos normales, la cual tuvo una gama de fluctuación ( $\bar{X} \pm 2D.S.$ ) de 0 - 9 % de células positivas, promedio  $\bar{X}=3.75\%$ . También pueden observarse las reactividades de los conjugados anti-IgS y anti-IgIC, así como los valores normales encontrados para la formación de rosetas E y ES.

El comportamiento del conjugado anti-linfocito B con las células linfoides de pacientes con diferentes hemopatías malignas, se muestra en la tabla V.

En la tabla VI se muestran los resultados de la reactividad del conjugado anti-linfocito B con las células linfoides de los pacientes con diferentes hemopatías malignas. También se pueden observar las reactividades de los conjugados anti-IgS y anti-IgIC, así como los valores encontrados para la formación de rosetas E y ES.

### Suero anti-linfocito T

#### Valoración de la especificidad y potencia

Al valorar la especificidad y potencia del suero anti-linfocito T con linfocitos normales, mediante la prueba de inhibición de formación de rosetas E, ES, M, EA y EAC, se encontró un 73.91% de inhibición de formación de rosetas E en los linfocitos preincubados con el suero anti-linfocito T, con respecto a los linfocitos sin ningún tratamiento y un 69.23% de inhibición con respecto a los linfocitos preincubados con suero inespecífico, como se puede observar en la tabla VII. También se encontró un 100.00% de inhibición en la formación de rosetas ES por los linfocitos preincubados con el suero anti-linfocito T, con respecto a los linfocitos sin ningún tratamiento y los preincubados con suero inea-

TABLA IV

Resultados de la reactividad de cada uno de los conjugados con las células linfoides normales, y valores normales encontrados para la formación de rosetas E y ES

Conjugado:	<sup>a</sup> Promedio %	<sup>b</sup> Gama de fluctuación
anti-linfocito B	3.75	0 - 9
anti-linfocito T	1.25	0 - 5
anti-IAL	0.53	0 - 2
anti-IgS	2.58	0 - 7
anti-IgIC	1.19	0 - 4
Rosetas:		
E	49.10	45 - 53
ES	0.65	0 - 2

<sup>a</sup> $\bar{x}$  de 36 sujetos normales.

<sup>b</sup> $\bar{x} \pm 2D.S.$

TABLA V

Resultados del comportamiento del conjugado anti-linfocito B con las células linfoides de diferentes hemopatías malignas

Hemopatías malignas	Número de casos examinados	Positivos	Porcentaje	
<b>Leucemias</b>				
LAL	L1	6	1	16.66
	L2	30	6	20.00
	L3	2	1	50.00
	TOTAL	38	8	21.05
LAN	M1	7	1	14.28
	M2	1	0	00.00
	M4	8	1	12.50
	M5	2	0	00.00
	M6	1	0	00.00
	TOTAL	19	2	10.52
LIG	8	7	87.50	
LGC	8	0	00.00	
LGC/CB	3	0	00.00	
<b>Linfomas</b>				
Hodgkin	2	0	00.00	
No Hodgkin	9	1	11.11	
Burkitt en remisión total	1	0	00.00	
<b>Diversas</b>				
EFE	1	0	00.00	
LAL en remisión total	1	0	00.00	
LCP	1	0	00.00	
NI	1	1	100.00	
LCH	1	0	00.00	
TOTAL	93	19	20.43	

TABLA VI

Resultado porcentual de la reactividad de los conjugados fluorescentes, con las células linfoides de pacientes con diferentes hemopatías malignas, y valores encontrados para la formación de rosetas E y ES

Hemopatías malignas	Caso No.	Sexo	Anti-B <sup>a</sup>	Anti-IgS	Anti-IgC	E	ES
<b>Leucemias</b>							
LAL-L1	1	M	10	18	9	75	5
	2	F	10	0	2	11	4
LAL-L2	3	F	12	15	3	9	0
	4	M	12	40	7	2	0
	5	M	12	7	9	97	40
	6	F	13	10	25	4	0
	6	M	15	5	0	30	2
$\bar{x}$			12.33	15.40	7.60	25.50	7.60
LAL-L3	1	M	15	20	9	60	5
LAN-N1	1	F	10	3	2	0	0
LAN-N4	1	F	10	12	3	26	0
	2	F	12	45	0	8	0
LLC	3	M	13	59	0	7	0
	4	M	15	3	0	7	0
	5	M	16	22	0	14	0
	6	M	17	80	0	48	9
	7	F	18	6	0	7	1
	7	M	36	3	1	1	3
$\bar{x}$			18.00	31.14	0.14	12.85	1.86
<b>Linfomas</b>							
No Hodgkin	1	F	12	3	3	70	1
<b>Diversas</b>							
MI	1	M	12	0	0	30	1

<sup>a</sup>Anti-linfocite B

pecífico. En la misma tabla, también se muestran los porcentajes de inhibición causados por el suero inespecífico en la formación de las rosetas anteriores; así, como los producidos por cada uno de los sueros en la formación de las rosetas M, EA y EAC.

Al valorar la especificidad y potencia del suero anti-linfocito T absorbido, mediante la prueba de inhibición de formación de rosetas E con linfocitos normales, se encontró un porcentaje de inhibición mayor al 50% en la dilución 1:128, como puede observarse en la tabla VIII; en la misma, se muestran los correspondientes porcentajes de inhibición producidos en cada dilución del suero anti-linfocito T.

Al valorar la especificidad y potencia del conjugado anti-linfocito T con células linfoides de LAL-L1, tipo T, mediante el método directo de la técnica de inmunofluorescencia; se observó fluorescencia específica hasta la dilución 1:2, con un 3% de células positivas, como se puede observar en la tabla IX. Se utilizó la dilución 1:1, como dilución óptima operante o título de trabajo, para la identificación de los linfocitos T en sangre periférica humana.

#### Distribución de los linfocitos T en sujetos normales y pacientes con hemopatías malignas

En la tabla IV se muestra la reactividad del conjugado anti-linfocito T con las células linfoides de los 36 sujetos normales, la cual tuvo una gama de fluctuación ( $\bar{X} \pm 2D.S.$ ) de 0 - 5 % de células positivas, promedio  $\bar{X} = 1.25\%$ .

El comportamiento del conjugado anti-linfocito T con las células linfoides de pacientes con diferentes hemopatías malignas se muestra en la tabla X.

En la tabla XI se muestran los resultados de la reactividad del conjugado anti-linfocito T con las células linfoides de los pacientes con diferentes hemopatías malignas. También se pueden observar las reactivi-

TABLA VII

Valoración de la especificidad y potencia del suero anti-linfocito T con linfocitos normales, por inhibición de formación de rosetas

Condiciones	Tipo de rosetas (%)				
	E	ES	M	EA	EAC
Linfocitos	12	0	1	19	27
1. Suero anti-linfocito T	(73.91) <sup>a</sup>	(100) <sup>a</sup>	-	(38.71) <sup>a</sup>	-
	(69.23) <sup>b</sup>	(100) <sup>b</sup>	-	(20.83) <sup>b</sup>	-
Linfocitos	39	1	2	24	26
2. Suero inespecífico	(15.20) <sup>c</sup>	-	-	(22.58) <sup>c</sup>	(3.70) <sup>c</sup>
3. Linfocitos normales	46	1	0	31	27

<sup>a</sup> Porcentaje de inhibición en la formación de rosetas de 1 con respecto a 3.

<sup>b</sup> Porcentaje de inhibición en la formación de rosetas de 1 con respecto a 2.

<sup>c</sup> Porcentaje de inhibición en la formación de rosetas de 2 con respecto a 3.

TABLA VIII

Valoración de la especificidad y potencia del suero anti-linfocito T con linfocitos normales, por inhibición de formación de rosetas E

Tubo	Dilución	E (%)	Inhibición (%)
1	1:1	4	91.49
2	1:2	12	74.47
3	1:4	13	72.34
4	1:8	15	68.08
5	1:16	16	65.95
6	1:32	18	61.70
7	1:64	20	57.44
8	1:128	22	53.19
9	1:256	33	29.78
10	1:512	37	21.27
11	1:1024	39	17.02
12	Control I	53	—
13	Control II	47	11.32

TABLA IX

Valoración de la especificidad y potencia del conjugado anti-linfocito T con células de LAL-L1, tipo T, por inmunofluorescencia directa

Tubo	Dilución	% de células fluorescentes
1	1:1	70
2	1:2	3
3	1:4	0
4	1:8	0
5	1:16	0
6	1:32	0
7	1:64	0
8	1:128	0
9	1:256	0
10	Control	0

TABLA X

Resultados del comportamiento del conjugado anti-linfocito T con las células linfoides de diferentes hemopatías malignas

Hemopatías malignas	Número de casos examinados	Positivos	Porcentaje	
<b>Leucemias</b>				
	L1	6	0	00,00
LAL	L2	30	3	10,00
	L3	2	1	50,00
	TOTAL	38	4	10,52
	M1	7	2	28,57
	M2	1	0	00,00
LAM	M4	8	0	00,00
	M5	2	0	00,00
	M6	1	0	00,00
	TOTAL	19	2	10,52
	LIG	8	2	25,00
	LGG	8	0	00,00
	LGC/CB	3	0	00,00
<b>Linfomas</b>				
	Hodgkin	2	0	00,00
	No Hodgkin	9	1	11,11
	Burkitt en remisión total	1	0	00,00
<b>Diversas</b>				
	EFE	1	0	00,00
	LAL en remisión total	1	0	00,00
	LCP	1	0	00,00
	MI	1	0	00,00
	LCH	1	0	00,00
TOTAL		93	9	9,67

vidades de los conjugados anti-IgS y anti-IgIC, así como los valores encontrados para la formación de rosetas E y ES.

### Suero anti-LAL

#### Valoración de la especificidad y potencia

Al valorar la especificidad y potencia del suero anti-LAL con células linfoides de LAL-L1, no-T, no-B, mediante la prueba de aglutinación en tubo a 37°C, se encontró un título de 64, como se puede observar en la tabla XII.

Al valorar la especificidad y potencia del suero anti-LAL absorbido, mediante la segunda prueba de aglutinación en tubo a 37°C con células linfoides de LAL-L1, no-T, no-B, se encontró un título de 32 (observándose microaglutinación en la dilución 1:64), como puede observarse en la tabla XIII.

Al valorar la especificidad y potencia del conjugado anti-LAL con células linfoides de LAL-L1, no-T, no-B, mediante el método directo de la técnica de inmunofluorescencia; se observó fluorescencia específica hasta la dilución 1:16, con un 12% de células positivas, como puede observarse en la tabla XIV. Se escogió la dilución 1:3, como dilución óptima operante o título de trabajo, ya que en ella existe un rango de sensibilidad adecuado, mayor al 60%, con respecto a las células linfoides AgCLAL<sup>+</sup>.

#### Distribución de las células linfoides con el AgCLAL, en sujetos normales y pacientes con hemopatías malignas

En la tabla IV se muestra la reactividad del conjugado anti-LAL con las células linfoides de los 36 sujetos normales, la cual tuvo una gama de fluctuación ( $X \pm 2D.S.$ ) de 0 - 2% de células positivas, prome-

TABLA XI

Resultado porcentual de la reactividad de los conjugados fluorescentes, con las células linfoides de pacientes con diferentes hemopatías malignas, y valores encontrados para la formación de rosetas E y ES

Hemopatías malignas	Caso No.	Sexo	Anti-T <sup>a</sup>	Anti-IgS	Anti-IgIC	E	ES
<b>Leucemias</b>							
	1	F	8	1	0	24	0
LAL-L2	2	M	9	8	0	3	7
	3	M	10	3	0	14	1
$\bar{X}$			9.00	4.00	0.00	13.66	2.66
LAL-L3	1	M	10	20	9	60	5
	1	F	7	7	2	9	0
LAM-M1	2	F	9	3	2	0	0
$\bar{X}$			8.00	5.00	2.00	4.50	0.00
	1	F	9	6	0	7	1
LLC	2	M	15	80	0	48	9
$\bar{X}$			12.00	43.00	0.00	27.50	5.00
<b>Linfomas</b>							
No Hodgkin	1	F	8	3	3	70	1

<sup>a</sup>Anti-linfocito T

TABLA XII

Valoración de la especificidad y potencia del suero anti-LAL con células de LAL-I1, no-T, no-B, por aglutinación

Tubo	Dilución <sup>b</sup>	Aglutinación <sup>a</sup>	
		Macro	Micro
1	1:1	+	+
2	1:2	+	+
3	1:4	+	+
4	1:8	+	+
5	1:16	+	+
6	1:32	+	+
7	1:64	+	+
8	1:128	-	-
9	1:256	-	-
10	1:512	-	-
11	1:1024	-	-
12	Control I	-	-
13	Control II	-	-

<sup>a</sup>La valoración se realizó mediante la prueba de aglutinación en tubo a 37°C.

<sup>b</sup>El título se valoró en la última dilución que dió reacción positiva.

TABLA XIII

Valoración de la especificidad y potencia del suero anti-LAL con células de LAL-L1, no-T, no-B, por aglutinación

Tubo	Dilución <sup>b</sup>	Aglutinación <sup>a</sup>	
		Macro	Micro
1	1:1	+	+
2	1:2	+	+
3	1:4	+	+
4	1:8	+	+
5	1:16	+	+
6	1:32	+	+
7	1:64	-	+
8	1:128	-	-
9	1:256	-	-
10	1:512	-	-
11	1:1024	-	-
12	Control I	-	-
13	Control II	-	-

<sup>a</sup>La valoración se realizó mediante la segunda prueba de aglutinación en tubo a 37°C.

<sup>b</sup>El título se valoró en la última dilución que dió reacción positiva.

TABLA XIV

Valoración de la especificidad y potencia del conjugado anti-LAL con células de LAL-L1, no-T, no-B por inmunofluorescencia directa

Tubo	Dilución	% de células fluorescentes
1	1:1	100
2	1:2	62
3	1:4	60
4	1:8	40
5	1:16	12
6	1:32	0
7	1:64	0
8	1:128	0
9	1:256	0
10	Control	0

dió  $\bar{x} = 0.53\%$  (en el 1 - 2 % de las células de 15 sujetos normales se observó fluorescencia específica, y en las células de los 21 restantes no se observó).

En la tabla XV se muestra el comportamiento del conjugado anti-LAL con las células linfoides de pacientes con diferentes hemopatías malignas. Los pacientes fueron considerados  $\text{AgCLAL}^+$ , cuando se observó más del 3.00% de células positivas con el conjugado anti-LAL.

En la tabla XVI se muestran los resultados de la reactividad del conjugado anti-LAL con las células linfoides de los pacientes con LAL. También se muestran las reactividades de los otros conjugados y los valores encontrados para la formación de rosetas E y ES.

En la tabla XVII se muestran los resultados de la reactividad del conjugado anti-LAL con las células linfoides de los pacientes con diferentes hemopatías malignas. También se pueden observar las reactividades de los otros conjugados y los valores encontrados para la formación de rosetas E y ES.

En la tabla XVIII se muestra el perfil inmunológico encontrado con los conjugados fluorescentes y la formación de rosetas E y ES, en las células linfoides de los 38 pacientes con LAL. Se puede observar que se encontraron 8 grupos inmunológicos diferentes, y que el grupo de LAL de células no-T, no-B,  $\text{AgCLAL}^+$  fué el que se encontró en mayor proporción (39.47%) con respecto a los demás.

TABLA XV

Resultados del comportamiento del conjugado anti-LAL con las células linfoides de diferentes hemopatías malignas

Memopatías malignas	Número de casos examinados	Positivos	Porcentaje
<b>Leucemias</b>			
LAL	L1	6	83.33
	L2	30	80.00
	L3	2	100.00
	TOTAL	38	81.58
LAM	M1	7	42.85
	M2	1	00.00
	M4	8	12.50
	M5	2	50.00
	M6	1	00.00
	TOTAL	19	26.31
LIG	8	2	25.00
LGC	8	3	37.50
LGC/CB	3	2	66.66
<b>Linfomas</b>			
Hodgkin	2	0	00.00
No Hodgkin	9	1	11.11
Burkitt en remisión total	1	0	00.00
<b>Diversas</b>			
EFE	1	1	100.00
LAL en remisión total	1	0	00.00
LCP	1	1	100.00
MI	1	0	00.00
LCM	1	1	100.00
TOTAL	93	47	50.53

TABLA XVI

Resultado porcentual de la reactividad de los conjugados fluorescentes con las células linfoides de pacientes con LAL, y valores encontrados para la formación de rosetas E y ES

Cito- merfo- logía <sup>x</sup>	Caso No.	Sexo	Anti- LAL	Anti- IgIC	Anti- IgS	Anti-B <sup>y</sup>	Anti-T <sup>z</sup>	E	ES
L1	1	M	7	0	0	4	1	6	0
	2	F	8	10	0	7	0	14	0
	3	M	9	0	1	4	0	-	-
	4	M	18	9	18	10	3	75	5
	5	F	21	1	0	0	0	12	2
$\bar{x}$			12.60	4.00	3.80	5.00	0.80	21.40	1.40
L2	1	M	4	0	2	2	0	0	0
	2	F	7	5	0	1	0	4	0
	3	M	8	0	8	7	9	3	7
	4	M	8	24	10	7	0	33	4
	5	M	8	0	1	1	1	29	0
	6	M	8	1	2	0	0	2	1
	7	M	9	0	1	0	0	4	1
	8	M	9	2	0	0	0	18	0
	9	F	9	0	2	2	0	0	0
	10	F	11	25	10	13	2	4	0
	11	F	13	5	1	0	0	3	0
	12	F	16	2	0	10	0	11	4
	13	M	17	9	7	12	3	97	40
	14	F	17	0	13	0	0	3	0
	15	M	18	7	40	12	3	2	0
	16	M	19	0	5	15	1	30	2
	17	F	22	0	0	7	0	7	1
	18	M	22	1	5	7	4	2	1
	19	M	23	0	17	6	0	0	0
	20	F	25	0	1	1	8	24	0
	21	M	30	0	3	6	10	14	1
	22	M	31	0	2	4	3	19	0
	23	F	33	3	15	12	1	9	0
	24	F	70	1	2	3	2	6	0
$\bar{x}$			18.20	3.24	6.13	5.33	1.95	13.58	2.58
L3	1	M	9	9	20	15	10	60	5
	2	M	15	20	7	3	1	0	0
$\bar{x}$			12.00	14.50	13.50	9.00	5.50	30.00	2.50

<sup>x</sup>Clasificación FAB.

<sup>y</sup>Anti-linfocito B.

<sup>z</sup>Anti-linfocito T.

TABLA XVII

Resultado porcentual de la reactividad de los conjugados fluorescentes, con las células linfoides de pacientes con diferentes hemopatías malignas, y valores encontrados para la formación de rosetas E y ES

Hemopatías malignas	Caso No.	Sexo	Anti-LAL	Anti-IgIC	Anti-IgS	Anti-D <sup>a</sup>	Anti-T <sup>b</sup>	E	ES
<b>Leucemias</b>									
LAM-M1	1	F	6	2	3	10	9	0	0
	2	F	7	2	7	7	7	9	0
	3	F	8	0	1	2	0	15	0
$\bar{X}$			7.00	1.33	3.66	6.33	5.33	8.00	0
LAM-M4	1	F	60	6	0	6	0	6	0
LAM-M5	1	M	12	0	1	6	0	0	0
LLC	1	M	7	0	80	17	15	48	9
	2	M	12	0	3	15	0	5	0
$\bar{X}$			9.50	0	41.50	16.00	7.50	26.50	4.50
LGC	1	F	4	4	0	1	1	67	1
	2	M	8	0	2	0	2	0	0
	3	F	15	0	0	2	2	6	1
$\bar{X}$			9.00	1.33	0.66	1.00	1.66	24.33	0.66
LGC/CB	1	M	5	0	0	0	3	11	0
	2	F	15	3	0	0	1	0	0
$\bar{X}$			10.00	1.50	0	0	2.00	5.50	0
<b>Linfomas</b>									
No Hodgkin	1	F	5	3	3	12	8	70	1
<b>Diversas</b>									
RFE	1	M	14	2	0	0	0	28	0
LCP	1	M	5	1	0	0	0	27	0
LCM	1	M	5	1	2	3	1	18	1

<sup>a</sup>Anti-linfocito B.

<sup>b</sup>Anti-linfocito T.

TABLA XVIII

Perfil inmunológico encontrado con los conjugados fluorescentes y la formación de redes E y ES, en las células linfoides de pacientes con LAL

Citome- fología <sup>a</sup>	Grupos inmunológicos		
	No-T, No-B, AgCLAL <sup>+</sup>	No-T, No-B, AgCLAL <sup>-</sup>	Pre-B, AgCLAL <sup>+</sup>
L1	3/38 ( 7.89%)	1/38 ( 2.63%)	1/38 (2.63%)
L2	12/38 (31.58%)	5/38 (13.16%)	0/38 (0.00%)
L3	<u>0/38 ( 0.00%)</u>	<u>0/38 ( 0.00%)</u>	<u>1/38 (2.63%)</u>
	15/38 (39.47%)	6/38 (15.79%)	2/38 (5.26%)
	B, AgCLAL <sup>+</sup>	B, AgCLAL <sup>-</sup>	Pre-T, AgCLAL <sup>+</sup>
L1	0/38 ( 0.00%)	0/38 (0.00%)	0/38 (0.00%)
L2	8/38 (21.05%)	1/38 (2.63%)	1/38 (2.63%)
L3	<u>0/38 ( 0.00%)</u>	<u>0/38 (0.00%)</u>	<u>0/38 (0.00%)</u>
	8/38 (21.05%)	1/38 (2.63%)	1/38 (2.63%)
	T, AgCLAL <sup>+</sup>	B/T, AgCLAL <sup>+</sup>	
L1	0/38 (0.00%)	1/38 (2.63%)	
L2	2/38 (5.26%)	1/38 (2.63%)	
L3	<u>0/38 (0.00%)</u>	<u>1/38 (2.63%)</u>	
	2/38 (5.26%)	3/38 (7.90%)	

<sup>a</sup>Clasificación FAB

## DISCUSION

Suero anti-linfocito B

Un marcador fenotípico con representación limitada a los linfocitos B sería extremadamente útil en la enumeración, fraccionamiento y análisis de la función de la población de células B. Ya han sido descritos heteroantisueros con especificidad para las células B, producidos por inmunización entre especies y absorción extensiva con líneas celulares no B y tumores. Algunos de estos sueros parecen definir aloantígenos específicos de las células B (12), aunque varios se han encontrado que están, principalmente, dirigidos contra Ag del locus HLA-B (con un PM de 29,000 y 34,000) (41,42), también presentes sobre los monocitos y otros tipos de células (43).

La presencia de la IgS, detectada mediante tinción inunofluorescente, ha sido el método más frecuentemente usado para distinguir a los linfocitos B de los linfocitos T. Sin embargo, una cantidad importante de IgS, que se encuentra sobre los linfocitos B, no es una parte integral de la membrana, pero representa IgG enlazada a través de los receptores Fc. Para caracterizar a los Ag de los linfocitos B, diferentes de la IgS, Billing y colaboradores (44) informaron sobre un suero de conejo producido contra digeridos de papaña de membranas de células malignas de bazo humano, el cual pareció detectar antígenos asociados a la leucemia; mediante pruebas de citotoxicidad dependientes de complemento, las células de las leucemias aguda y crónica fueron positivas, aunque la mayoría de los linfocitos normales fueron negativos. En un estudio posterior, Billing y colaboradores (45) detectaron un antígeno de linfocito B humano, no caracterizado aún, mediante otro suero de conejo producido contra digeridos de papaña de membranas de células de bazo. El suero no absorbido reaccionó, en los ensayos de citotoxicidad e inunofluorescencia, con linfocitos B normales y líneas de células B, pero no con linfocitos T normales o líneas de células T. Los títulos de

citotoxicidad contra las células B fueren altas, mientras que el mismo suero no diluido fué negativo contra las células T. Mediante la tinción inmunofluorescente el 6 - 15% de los linfocitos normales y el 48 - 85% de las preparaciones ricas en linfocitos B fueron positivas; granulocitos, plaquetas y glóbulos rojos fueron negativos. El suero reaccionó, aproximadamente, con las células del 70% de los pacientes con LAL, LAM, LSC y con 7 de 8 casos de LLC.

En el presente trabajo se trató de preparar un suero reaccionante contra los linfocitos B, pero no contra los linfocitos T, mediante inyección intravenosa a un conejo de células de LLC, tipo B. Con el fin de utilizar este suero para la identificación de células B, mediante inmunofluorescencia directa, en sujetos normales y en estados de enfermedad de pacientes con hemopatías malignas, fué necesario averiguar su especificidad y potencia mediante una prueba de aglutinación en tubo a 37°C, con la cual se encontró un título de 256, que indicó, que el suero tuvo una especificidad y potencia en un range aceptable, e sea, que se produce una buena respuesta inmunológica por parte del animal inmunizado, para producir Ac contra un determinado antígeno de las células B (tabla I). El suero titulado fué absorbido extensivamente para eliminar los Ac inespecíficos, dirigidos contra Ag de la especie humana, Ig y otros Ag linfocíticos.

La especificidad y potencia del suero absorbido, y de las  $\gamma$ -globulinas de éste, ya conjugadas con el ITCP, contra los linfocitos B, fueron comprobadas y evaluadas mediante diferentes criterios, como está destacado en las tablas II y III; encontrándose en la prueba de inhibición de formación de rosetas EAC, EA, N, ES, E, un porcentaje de inhibición de formación de rosetas EAC mayor al 53%, indicando ésto, que la potencia disminuyó levemente después de haber sido diluido y absorbido con los tejidos para volverlo altamente específico, e también ésto puede indicar, que los receptores para C3b son diferentes de los receptores definidos por el suero anti-linfocito B; así, la inhibición parcial encontrada puede ser resultado del impedimento estérico por el Ac, más bien que al bloqueamiento directo de los sitios receptores de rosetas.

En la evaluación de la especificidad y sensibilidad del conjugado anti-linfocito B mediante inmunofluorescencia directa, para obtener la dilución óptima operante, se observó fluorescencia específica hasta la dilución 1:32, con un 10% de células de LLC fluorescentes; pero para establecer la dilución óptima operante, se escogió la dilución 1:5, en la que existe un rango de sensibilidad adecuado, mayor al 60%, con respecto a las células B; con esta dilución se trabajó en la identificación de los linfocitos B, en la sangre periférica de sujetos normales y de pacientes con hemopatías malignas.

El conjugado dirigido contra las células B pareció reconocer un Ag de ellas, aún no caracterizado. El conjugado fué positivo, mediante la prueba de inmunofluorescencia directa, con las células linfoides de sujetos normales, las células leucémicas de pacientes con LAL-L1, LAL-L2, LAL-L3, LAM-M1, LAM-M4, LLC y las células de pacientes con linfoma no Hodgkin y mononucleosis infecciosa (tablas IV y V); resultados positivos que se asemejan con los encontrados mediante el heterosero preparado por Billing y colaboradores (45), lo que indica, que el conjugado reconoció un Ag de linfocito B normal, el cual es expresado en las células B, existentes en la sangre de pacientes con enfermedades linfoproliferativas y otras antes mencionadas. Aunque es posible que el suero anti-linfocito B tuviera Ac contra Ag asociadas a la leucemia, que son diferentes de los Ac contra los linfocitos B normales, puesto que se utilizaron células leucémicas de LLC, tipo B, para su preparación.

El porcentaje de células positivas observadas, mediante el método directo de la técnica de inmunofluorescencia, en preparaciones con el 70 - 90% de linfocitos de sangre periférica de los 36 sujetos normales, tuvo un rango de variación de 0 - 9% (tabla IV), el cual fué inferior al reportado por Billing y colaboradores (45), de 6 - 15%, obtenido mediante inmunofluorescencia indirecta; pero puede estar dentro de este rango, generalmente aceptado para el porcentaje existente de células B normales, tomando en cuenta la dilución del conjugado con que se trabajó y el método de inmunofluorescencia utilizado; puesto que se ha com-

probado, que con el método indirecto se obtiene una sensibilidad 5 a 10 veces mayor que con el método directo.

Estudios anteriores han demostrado que las células leucémicas de la mayoría de los casos de LAL, LAM y LGC/CB son células que carecen de los marcadores B y T conocidos, tales como los receptores para Fc y C3, la IgS y los receptores para glóbulos rojos de carnero (46,47). En el presente estudio, parece que las células leucémicas de la LAL expresan el Ag celular B, definido por el conjugado anti-linfocito B preparado en el laboratorio, así como, también algunas leucemias mieloides (tabla V). Un estudio de Pa y colaboradores (48) ha demostrado que la LAL, no-B, no-T, parece ser aquella con células que reaccionan con el suero anti-linfocito B, mientras que las células de la LAL tipo T, no lo realizan.

No es claro, el porque las células derivadas de las series mieloides expresen un Ag que se encontró sobre los linfocitos B maduros, pero no sobre los granulocitos maduros (tabla VI). Sin embargo, aunque el Ag es expresado por los linfocitos B, no se ha considerado que ésto indique necesariamente, que las leucemias mielocíticas sean originarias de células B.

El conjugado anti-linfocito B reaccionó con los blastos de la LAL de células B, IgS<sup>+</sup>, pero no con las células T de LAL de rosetas E<sup>+</sup>, indicando que el Ag celular B está presente aparentemente, sobre los blastos de las series linfoides y mieloides (tabla VI), pero no significativamente, sobre los blastos T.

El conjugado anti-linfocito B detectó Ag de células B, pero no de células T, puesto que reaccionó con células con IgS<sup>+</sup>, pero no con rosetas E<sup>+</sup>, aunque parece que el suero anti-linfocito B no es sólo reactivo con la población de células IgS<sup>+</sup>, no-T (células B), sino también con la población de células IgS<sup>-</sup>, no-T (tabla VI).

La mayoría de las células de las LLC son de origen B (49), lo cual hace menos sorprendente que las células de 7 de 8 casos con LLC reaccionaran con el conjugado anti-linfocito B y que tengan el rango de positividad más elevado, de 12 - 36% de células positivas (tabla VI), con

respecto a otras hemopatías malignas; las células de LLC, negativas con el conjugado anti-linfocito B, parece que pertenecen a las LLC que expresan características de células T. Lo anterior indica, que diferentes cantidades de poblaciones de células B, que soportan el Ag definido por el conjugado anti-linfocito B, pueden predominar en la circulación sanguínea durante el curso de una enfermedad o trastorno linfoproliferativo.

### Suero anti-linfocito T

Las tentativas para preparar un suero anti-linfocito T han sido limitadas a los timocitos como una fuente de Ag T humanos. Ablin y colaboradores (50) prepararon un suero anti-timocito humano, el cual reaccionó en una prueba de inmunodifusión y en una de inmunofluorescencia con un sólo Ag presente sobre las células tímicas fetales, pero ausente en los linfocitos de sangre periférica. Smith y colaboradores (51) utilizaron células tímicas obtenidas de fetos y bebés, con las cuales prepararon un antisuero de conejo que causó lisis selectiva de timocitos y otras células de probable origen tímico. Todas las células sensibles a este suero expresaron un marcador antigénico designado, tentativamente por los investigadores, como Ag tímico de linfocito humano.

Otros investigadores, produjeron sueros anti-timocito en diferentes animales, incluyendo primates (52), y cada uno de estos sueros tuvo una diferente baja reactividad en términos de citotoxicidad, inhibición de formación de rosetas E, a los efectos sobre la respuesta hacia los mitógenos y la estimulación alogénica (53,54). Estos estudios han indicado, que la reactividad diferente del suero anti-timocito es un reflejo de la heterogeneidad dentro de la población de las células T (53). La situación en el humano puede ser equivalente en el ratón, donde el suero dirigido contra los timocitos detectó el Ag T, y un suero contra los Ag T leucémico y el Ag definido en el linfocito, identificó varias subpoblaciones entre las células T (55,56).

respecto a otras hemopatías malignas; las células de LLC, negativas con el conjugado anti-linfocito B, parece que pertenecen a las LLC que expresan características de células T. Lo anterior indica, que diferentes cantidades de poblaciones de células B, que soportan el Ag definido por el conjugado anti-linfocito B, pueden predominar en la circulación sanguínea durante el curso de una enfermedad o trastorno linfoproliferativo.

### Suero anti-linfocito T

Las tentativas para preparar un suero anti-linfocito T han sido limitadas a los timocitos como una fuente de Ag T humanos. Ablin y colaboradores (50) prepararon un suero anti-timocito humano, el cual reaccionó en una prueba de inmunodifusión y en una de inmunofluorescencia con un sólo Ag presente sobre las células tímicas fetales, pero ausente en los linfocitos de sangre periférica. Smith y colaboradores (51) utilizaron células tímicas obtenidas de fetos y bebés, con las cuales prepararon un antisuero de conejo que causó lisis selectiva de timocitos y otras células de probable origen tímico. Todas las células sensibles a este suero expresaron un marcador antigénico designado, tentativamente por los investigadores, como Ag tímico de linfocito humano.

Otros investigadores, produjeron sueros anti-timocito en diferentes animales, incluyendo primates (52), y cada uno de estos sueros tuvo una diferente baja reactividad en términos de citotoxicidad, inhibición de formación de rosetas E, a los efectos sobre la respuesta hacia los mitógenos y la estimulación alogénica (53,54). Estos estudios han indicado, que la reactividad diferente del suero anti-timocito es un reflejo de la heterogeneidad dentro de la población de las células T (53). La situación en el humano puede ser equivalente en el ratón, donde el suero dirigido contra los timocitos detectó el Ag T, y un suero contra los Ag T leucémico y el Ag definido en el linfocito, identificó varias subpoblaciones entre las células T (55,56).

En años anteriores, el suero específico para las células T fué producido por primera vez, mediante heteroimmunizaciones con cerebro de ratón (57), por lo que se pensó, que lo mismo podría ser útil para la preparación de un suero anti-células T humanas. Takada y colaboradores (36) reportaron que el cerebro humano tiene determinantes antigénicos idénticos o muy similares a los encontrados en una línea celular Molt timo-derivada. Brown y Greaves (58) fabricaron un suero específico para las células T, mediante absorciones apropiadas, para marcar la población celular que formó rosetas E con los glóbulos rojos de carneiro. Whiteside y colaboradores (37) prepararon un suero anti-células T, mediante inmunización de conejos con cerebro humano emulsificado con adyuvante incompleto de Freund, el cual reaccionó, mediante inmunofluorescencia indirecta, con los timocitos y linfocitos T humanos, pero no con las células B.

Varios investigadores fracasaron para producir un suero específico anti-células T, mediante heteroimmunizaciones con cerebro humano, algunos de ellos, fueron los trabajos de Schlesinger y colaboradores (59) y de Thiele y colaboradores (60). Este fracaso podría ser debido a las diferencias en las preparaciones del cerebro y/o a los diferentes programas de inmunización. El uso de adyuvantes, completo e/o incompleto, para la inmunización de los animales y las diferencias en la reactividad del suero resultante, ilustra la dificultad. La distribución y la concentración de los Ag T celulares en el cerebro, pueden variar entre los individuos. Además, algunos conejos responden bien y otros pobremente, en términos de síntesis de Ac para los Ag de cerebro humano (61).

En el presente trabajo se trató de preparar un suero reaccionante con los timocitos y linfocitos T humanos, pero no con los linfocitos B, mediante inyección subcutánea a un conejo de cerebro humano emulsificado con adyuvante incompleto de Freund. A fin de utilizar este suero para la identificación de las células T, mediante inmunofluorescencia directa, en sujetos normales y en pacientes con hemopatías malignas, fué necesario averiguar su especificidad y potencia mediante una prueba de inhibición de formación de rosetas E, ES, EA, EAC y M, con la cual se

encontró un porcentaje de inhibición de formación de rosetas E, mayor al 69% y de ES, de un 100%, indicando ésto, que el suero tuvo una especificidad y potencia en un rango aceptable, o sea, que si hubo una respuesta inmunológica por parte del animal insumizado, para producir Ac contra un determinado Ag de las células T (tabla VII).

El suero preparado fué absorbido extensivamente para eliminar los Ac no específicos, dirigidos contra Ag de la especie humana, Ig y otros Ag linfocíticos. La especificidad y potencia del suero absorbido, y de las  $\gamma$ -globulinas de éste, ya conjugadas con el ITCF, contra las células T, fueron comprobadas y evaluadas mediante diferentes criterios, como está destacado en las tablas VIII y IX; encontrándose en la prueba de inhibición de formación de rosetas E, un porcentaje de inhibición mayor al 91% con el suero sin diluir, un 72.34% de inhibición en la dilución 1:4 y un 53.19% en la dilución 1:128, indicando ésto, que su potencia no disminuyó, después de haber sido diluido y absorbido con los tejidos para volverlo altamente específico. Las inhibiciones parciales de formación de rosetas E, encontradas en las pruebas anteriores, hacen suponer que los receptores para los glóbulos rojos de carnero son diferentes de los receptores definidos por el suero anti-linfocite T; así, la inhibición parcial encontrada, más bien, puede ser resultado del impedimento estérico por el Ac, que al bloqueo directo de los sitios receptores de rosetas.

En la evaluación de la especificidad y sensibilidad del conjugado anti-linfocite T mediante inmunofluorescencia directa, para obtener la dilución óptima operante, se observó fluorescencia específica hasta la dilución 1:2, con un 3% de células de LAL-L1, tipo T, positivas (tabla IX); por lo que se tuvo que trabajar con el conjugado sin diluir, en la identificación de células T en la sangre periférica de sujetos normales y pacientes con hemopatías malignas.

El conjugado anti-linfocite T presentó una baja potencia en su valoración (tabla IX), así como para reaccionar con las células de las diferentes suspensiones de células linfoides, tanto de sujetos normales como de pacientes con hemopatías malignas; ya que tan sólo comparando

con los resultados obtenidos por Whiteside y colaboradores (37), mediante inmunofluorescencia indirecta, de 70 - 80% de células positivas, en preparaciones de linfocitos de sangre periférica de donadores normales; el rango de 0 - 5% de células positivas obtenido con el conjugado es muy pobre (tabla IV), indicando que el proceso de purificación, tanto de los Ac como del conjugado, produjeron una disminución en la cantidad de Ac específicos dirigidos contra los linfocitos T. Así como al trabajar con las células linfoides, estuvo presente la limitación por la disponibilidad de poblaciones de células T puras, que pudieran ser empleadas para la comprobación.

El conjugado dirigido contra las células T pareció reconocer un Ag de ellas, aun no caracterizado; pero que podría ser el Ag T asociado al cerebro, el glucolípido asialo  $\text{GM}_1$ , encontrado por Nakahara y colaboradores (10), el cual está asociado con las células T o nulas de la LAL, pero no con otras neoplasias linfoides y trastornos hematológicos.

El conjugado anti-linfocito T fué positivo, mediante la prueba de inmunofluorescencia directa, con las células linfoides de sangre periférica de sujetos normales, las células leucémicas de pacientes con LAL-L2, LAL-L3, LAM-M1, LLC y las células de pacientes con linfoma no Hodgkin (tablas IV y X); lo que indica que el conjugado reconoció un Ag de linfocito T normal, el cual es expresado en las células T, existentes en la sangre de pacientes con enfermedades linfoproliferativas y otras antes mencionadas.

Estudios anteriores han demostrado que las células leucémicas de la mayoría de los casos de LAL, LAM y LGC/CB son células que carecen de los marcadores T conocidos, tales como los receptores para glóbulos rojos de carnero y los antígenos de células T. En el presente trabajo, parece que un pequeño porcentaje de las células de LAL, LAM y LLC expresan el Ag celular T (tabla XI), definido por el conjugado anti-linfocito T que se preparó.

Ha sido enfatizado que las pruebas para la especificidad demostrarían la reciprocidad y coincidencia con otros marcadores de la membrana, tales como la IgS, los receptores para complemento y glóbulos rojos

de carnero (62). El traslapo entre las células formadoras de rosetas con glóbulos rojos de carnero y las células, Ag T positivo, no fué completa (tabla XI); ésto indicó que diferentes cantidades de células T, en la circulación sanguínea, llevan el antígeno T o los receptores para glóbulos rojos de carnero.

El conjugado anti-linfocito T reaccionó con los blastos de la LAL de células T, E<sup>+</sup> y/o ES<sup>+</sup>, pero no con las células B de LAL, con IgS<sup>+</sup> (tabla XI), indicando que el Ag celular T está presente, aparentemente, en los blastos de las series linfoides, pero no, significativamente, sobre los blastos B.

El conjugado anti-linfocito T detectó, débilmente, un Ag de células T, pero no de células B, puesto que reaccionó con células E<sup>+</sup> y/o ES<sup>+</sup>, aunque el conjugado no es sólo reactivo con la población de células E<sup>+</sup> y/o ES<sup>+</sup>, no-B (células T), sino también con células E<sup>-</sup> y/o ES<sup>-</sup>, no-B (tabla XI).

No es claro el motivo por el cual las células derivadas de las series mieloides expresen un Ag que se encontró sobre los linfocitos T maduros, pero no sobre los granulocitos maduros (tabla X). Sin embargo, aunque el Ag es expresado por los linfocitos T, no necesariamente, ésto se ha considerado que indique que las leucemias mielocíticas sean originarias de células T.

La mayoría de las células de las LLC son de origen B (49); sin embargo, las células de la LLC, positivas con el conjugado anti-linfocito T (tabla XI), indican que pertenecen a las LLC que expresan características de células T, o sea que, los linfocitos leucémicos, a diferencia de las células B normales, comparten marcadores antigénicos con los linfocitos T.

Los timocitos representan la mejor fuente de células T humanas; sin embargo, recientes evidencias indican un alto grado de heterogeneidad entre las células T, lo que sugiere que los timocitos constituyen sólo una subpoblación de las células T. Así, en la evaluación de la especificidad, parece más importante demostrar que las células B (linfocitos que soportan IgS y receptores para C3b) no reaccionan con el conjugado

anti-linfocito T, que demostrar la reactividad positiva con todas las células T. No obstante, ha sido reportado que las células T estimuladas por mitógenos (63) y las antígeno-activadas (64) pueden expresar IgG.

Muy poco es conocido acerca de la distribución cualitativa y cuantitativa, y el significado funcional de los diferentes Ag T en humanos. Varias evidencias indican, por ejemplo, que los timocitos y los linfocitos de sangre periférica humana poseen diferentes determinantes T, y algunos de ellos los comparten (52). Utilizando un antisuero contra los Ag tímicos humanos, Woody y colaboradores (53) demostraron que las células linfoides de sangre periférica que responden a la con-A, las células reaccionantes en cultivo mixto de linfocitos y las células T killer reaccionan con el antisuero, mientras que los linfocitos de sangre periférica que responden a la PHA y al estimulante mitogénico, y los que producen MIF y TF, no fueron afectados en sus funciones mediante el trate con el antisuero.

Lo anteriormente discutido indica, que diferentes cantidades y subpoblaciones de células T, que soportan el Ag T definido por el conjugado anti-linfocito T, aun tomando en cuenta su baja potencia, pueden predominar en la circulación sanguínea durante el curso de una enfermedad o trastorno linfoproliferativo.

### Suero anti-LAL

La identificación reproducible experimentalmente, de marcadores semejantes en la superficie celular de las células de LAL mediante métodos inmunológicos, ha permitido la clasificación de esta hemopatía maligna en: LAL de células nulas (no-T, no-B), LAL de célula común (no-T, no-B, AgCLAL<sup>+</sup>), LAL de células T, LAL de células pre-T, LAL de células pre-B y LAL de células B (4,6,40,69). Además de revelar que la LAL es una enfermedad muy heterogénea, tal clasificación inmunológica ha probado ser de significancia pronóstica (4,22,46). Sin embargo, aún la mayoría de las LAL no pueden ser claramente asignadas a la diferenciación

T o B. Varios estudios comparativos han demostrado que el fenotipo de estas células se asemeja al de los progenitores linfáticos tempranos, demostrable raras veces en la médula ósea y órganos fetales (4,17). Si uno asume que en un paciente dado, la LAL es resultado de la proliferación de una clona maligna derivada de una sólo célula, detenida en una etapa o fase específica de la diferenciación linfóide; el análisis de los diferentes subgrupos de la LAL proveería un medio de evidenciar los marcadores de superficie que caracterizan a la diferenciación linfóide normal.

Originalmente, el AgCLAL fué descrito como un Ag asociado a la leucemia (4,65,67), y después de diversos estudios se ha postulado que es un marcador temprano de las células primarias hematopoyéticas, y su expresión es, simplemente, un reflejo de la derivación de estas células malignas, de las células precursoras linfoides normales, las cuales en esa etapa también expresan el AgCLAL (65,66). No se ha encontrado sobre células sanguíneas maduras normales, pero ha sido identificado sobre un pequeño porcentaje de células de hígado fetal normal, células linfoides de médula ósea normal de niño, células de túbulo renal y glomerulo de fetos y adultos, células epiteliales de intestino delgado de fetos y células mioepiteliales de tórax de adulto. También ha sido demostrado que los precursores tempranos de las células mieloides no expresan el AgCLAL (67).

La expresión del AgCLAL en los linfomas puede ser una aberración de la diferenciación normal en las células malignas, o el AgCLAL puede no ser un marcador de diferenciación que sea expresado exclusivamente por las células hematopoyéticas precursoras tempranas. Considerando ésto, estudios anteriores han demostrado que el AgCLAL es un miembro de una familia de glucoproteínas (18) de la superficie celular, y las moléculas relacionadas a el AgCLAL son expresadas sobre varias células diferenciadas, como también en células hematopoyéticas no diferenciadas. El AgCLAL puede, por ésto, estar relacionado a un evento de transformación específica o quizás puede tener un papel funcional que no ha sido aún identificado.

La mayor dificultad en la preparación de antisueros específicos para los blastos leucémicos, es que estas células como sus contrapartes normales, con frecuencia expresan Ag de superficie normales de gran inmunogenicidad. Los animales inmunizados reconocen estos Ag normales y producen un antisuero carente o falto de la especificidad deseada. Los planteamientos para este problema han incluido la inmunización de animales, primero, haciéndolos tolerantes a los Ag humanos normales (38); el uso de primates, para reducir el número de Ag específicos de especie (25,39), y la inmunización con células tumorales cubiertas o revestidas con Ac contra tejidos normales (17,40). El suero preparado por el primer método, se ha demostrado, que es comparable con aquellos producidos en animales no tratados (25), mientras que el suero preparado por los dos últimos métodos, aún requiere absorción intensa con tejidos humanos normales para producir la especificidad necesaria. La reproducibilidad y la disponibilidad de un suero específico para las células leucémicas de la mayor parte de los pacientes con LAL de células no-T, no-B, han sido mejoradas significativamente, mediante el uso de células leucémicas no tratadas, para la inmunización, y de líneas celulares renovables, para la absorción.

En el presente experimento, se trató de preparar un suero reactivo con los linfoblastos no-T, no-B de la LAL, pero no con los linfoblastos de tipo B o T de la misma, mediante inyección intravenosa de células de LAL, inmunológicamente no-T, no-B, a un conejo. Con el fin de utilizar este suero para la identificación inmunológica de células AgCLAL<sup>+</sup>, mediante inmunofluorescencia directa, en estados de enfermedad de pacientes con hemopatías malignas, fué necesario averiguar su especificidad y potencia mediante una prueba de aglutinación en tubo a 37°C, con la cual se encontró un título de 64 (tabla XII), que indicó que el heterosuero tuvo una especificidad y potencia en un rango aceptable, o sea, que se produjo una buena respuesta inmunológica por parte del animal inmunizado, para producir Ac contra el AgCLAL. El suero titulado fué absorbido extensivamente, para eliminar los Ac no específicos dirigidos contra Ag de la especie humana, Ig y otros Ag de las lí-

neas linfoides normales.

La especificidad y potencia del suero absorbido, y de las  $\gamma$ -globulinas, ya conjugadas con el ITCF, contra las células no-T, no-B, AgCLAL<sup>+</sup> de la LAL, fueron comprobadas y evaluadas mediante diferentes criterios, como está destacado en las tablas XIII y XIV; encontrándose en la segunda prueba de aglutinación en tubo a 37°C, una aglutinación visible en la dilución 1:32 y una microaglutinación en la dilución 1:64. La absorción extensa del suero anti-LAL con las células y tejidos humanos produjo una pequeña disminución en su título, sin alterar su especificidad; indicando que las células de los tejidos usados para la absorción, poseen el Ag definido por el suero anti-LAL en pequeñas cantidades, o que poseen un determinante de superficie, químicamente diferente, pero serológicamente, de reactividad cruzada, o también que las células no poseen el Ag que es definido en una proporción mayor, pero poseen uno o más Ag no relacionados, definidos por este suero.

En la evaluación de la especificidad y sensibilidad del conjugado anti-LAL mediante inmunofluorescencia directa, para obtener la dilución óptima operante, se observó fluorescencia específica hasta la dilución 1:16, con un 12% de células de LAL-L1, no-T, no-B, positivas; pero para establecer la dilución de trabajo, se escogió la dilución 1:3, en la que existe un rango de sensibilidad adecuado, mayor al 60%, con respecto a las células inmunológicamente no-T, no-B de la LAL. Con esta dilución se trabajó en la identificación de células no-T, no-B, AgCLAL<sup>+</sup>, en sangre periférica de pacientes con hemopatías malignas.

El conjugado dirigido contra las células no-T, no-B de la LAL, pareció reconocer al AgCLAL que en forma inicial, fué definido serológicamente, por Greaves y colaboradores (17) con un heterosuero de conejo convencional, y que posteriormente, se ha encontrado que es una gluco-proteína con un PM de 95,000 - 100,000 daltons y un punto isoelectrico cercano a 5.2; así como, que se encuentra asociado, pero no integrado a la membrana de los linfoblastos (4,18,68).

El conjugado anti-LAL no tiñó las células linfoides de sangre periférica de 21 de los 36 sujetos normales, pero unos puntos fluorescentes

muy débiles fueron observados en el 1-2% de las células linfoides de 15 de ellos (tabla IV); indicando la presencia de proteínas o de otros Ag heterólogos que indujeron la producción de Ac, que no pudieron eliminarse del suero y/o conjugado con la absorción de tejidos normales.

A pesar de la especificidad del conjugado anti-LAL contra las células de un gran subgrupo de pacientes con LAL de células no-T, no-B, una reactividad inesperada fué observada con las células de un pequeño número de pacientes con enfermedades clínica, morfológica e histoquímicamente diferentes (tabla XV). El conjugado fué positivo, mediante el método directo de la técnica de inmunofluorescencia, con las células leucémicas de sangre periférica de pacientes con LAL-L1, LAL-L2, LAL-L3, LAM-M1, LAM-M4, LAM-M5, LLC, LGC, LGC/CB y las células de pacientes con linfoma no Hodgkin, enfermedad de Fisher-Evans, leucemia de células peludas y leucemia crónica de megacariocitos; lo que indica que el AgCLAL es expresado en las células de sangre periférica de diversas enfermedades linfoproliferativas y otras antes mencionadas.

Estudios anteriores han demostrado que el AgCLAL es expresado por las células leucémicas de aproximadamente, el 80% de los pacientes con LAL no-T, no-B, y el 30-50% de los pacientes con LGC/CB (25). También es expresado en el 10% de los casos de la LAL de células T y algunas líneas celulares derivadas de ella o del linfoma no Hodgkin de células T (66); en el 25% de los casos de linfoma de Burkitt y linfoma folicular. Las líneas de linfoma B virus Epstein-Barr (-) pueden ser positivas también, aunque las líneas de células B normales, transformadas por virus Epstein-Barr, son negativas. En casos diagnosticados como LAL de células pre-B, y algunos de LAL de células pre-T, también el AgCLAL es expresado (4,23).

El conjugado anti-LAL que se preparó, discrimina casi óptimamente a la LAL de la LAM y la LAL de células no-T, no-B, de la LAL de células T o de células B, y puede permitir, aunque sea en baja proporción, la identificación de la crisis blástica de la LGC (tablas XV y XVIII). El tefimiento de las células de LAM fué muy débil e identificable sólo, sobre un bajo porcentaje de ellas (tabla XVII); las cuales son a veces,

difíciles de diferenciar de las células linfoides con el microscopio de fluorescencia. En general, se ha creído que la adhesión a los receptores Fc para IgG de conejo o cabra, que se encuentran sobre la superficie celular, produce la reactividad no específica (70).

En este trabajo, se pudo llevar a cabo una clasificación de los casos con LAL en 8 subgrupos inmunológicos, mediante el uso de los conjugados heterólogos, preparados contra los linfocitos B y T, y las células de LAL, libres de marcadores B y T (tabla XVIII). Así, las células positivas con el conjugado anti-linfocito T y negativas o positivas con el anti-LAL, caracterizan al pequeño porcentaje de los pacientes con LAL de células T, que presentan el fenotipo  $E^+$ ,  $ES^+$ ,  $T^+$ ,  $B^-$ ,  $IgS^-$ ,  $IgIC^-$  y  $AgCLAL^+$  (4); así como, a las células de la LAL de tipo Pre-T, que presentan  $E^-$ ,  $ES^-$ ,  $T^+$ ,  $B^-$ ,  $IgS^-$ ,  $IgIC^-$  y  $AgCLAL^+$ . Las células negativas con los conjugados anti-linfocito B y T, pero positivas con el anti-LAL, son típicas de la mayoría de los pacientes con LAL de células no-T, no-B,  $AgCLAL^+$  ( $IgIC^-$ ,  $IgS^-$ ,  $B^-$ ,  $E^-$ ,  $ES^-$ ,  $T^-$ ), como se pudo comprobar en el presente trabajo, donde se encontró que un 39.47% de las LAL examinadas, pertenecen a este subgrupo. Las células positivas con el conjugado anti-linfocito B y negativas o positivas con el anti-LAL, caracterizan al pequeño porcentaje de pacientes con LAL de células B, que presentan  $IgIC^-$ ,  $IgS^+$ ,  $Ia^+$ ,  $B^+$ ,  $E^-$ ,  $ES^-$ ,  $T^-$ ,  $AgCLAL^+$ . Mientras que las células negativas con los conjugados anti-linfocito B, anti-linfocito T y anti-LAL, comunmente define a la LAL de células nulas ( $IgIC^-$ ,  $IgS^-$ ,  $B^-$ ,  $E^-$ ,  $ES^-$ ,  $T^-$ ,  $AgCLAL^-$ ) o a la LAM (tablas XVI y XVIII), lo cual puede definirse claramente, si existe duda, con la ayuda de los criterios morfológico e histoquímico.

La subclasificación de la LAL, conforme a los marcadores celulares B y T, y su reactividad con el conjugado anti-LAL, es relevante clínicamente. Las LAL de tipo T o B tienen, significativamente, peores pronósticos que las LAL,  $AgCLAL^+$  (4,22,46,48,69,70).

Existen ciertas limitaciones para la hipótesis concerniente a una diferenciación linfoide normal, basada en una clasificación antigénica de las células leucémicas. Primeramente, las células malignas pueden

tener una diferenciación aberrante y entonces, no pueden reflejar los marcadores de superficie de las células normales. El conocimiento que se tiene sobre las leucemias maduras, tales como la leucemia de células de Sezary y LGC, indica que este fenómeno, probablemente, no es generalmente verdadero. En segunda, algunos de los subgrupos de la LAL, en las series, comprenden sólo a 1 o 2 pacientes; más pacientes deben ser estudiados antes de que se puedan trazar firmes conclusiones acerca de los modelos antigénicos celulares de los diferentes subgrupos. El fin de este esquema es el de subrayar la marcada heterogeneidad de la enfermedad y a su vez, es de utilidad en la comprensión de la maduración linfóide. En tercera, se ha comprobado que las poblaciones de células leucémicas son, algunas veces, heterogéneas, según lo indican los resultados obtenidos (tablas XVI y XVII), lo cual podría oponerse con la hipótesis de que existe una detención en la maduración en un nivel específico de la diferenciación.

Por otra parte, diversos descubrimientos en gran cantidad de pacientes con LAL de células no-T, no-B sugieren que estas células pueden representar progenitores de células T, pues, además de que se demostró bioquímicamente a la enzima tímica, la transferasa terminal, en la LAL (40,69), una reacción positiva con el suero anti-timocito de las células que fueron negativas con los glóbulos rojos de carnero, favoreció la suposición de una diferenciación de T (4,19,35,69).

También se sabe que la leucemia es con frecuencia un proceso no estático, pero puede desarrollarse en un determinado paciente. La evolución de los fenotipos membranales y las anomalías cromosomales apoyan el concepto de un proceso dinámico de la enfermedad. Por lo tanto, podría ser previsto que en cualquier momento o punto dado en el tiempo, las células en los diferentes niveles de diferenciación podrían estar presentes en la médula ósea y en la circulación sanguínea.

Los linfoblastos leucémicos, ya sea derivados de las células linfoides que se clonan o dan origen a otras (LAL y algunas de linfoma no Hodgkin), o células primarias pluripotenciales (LGC/CB), están detenidas en una maduración parcial o completa y mantienen una fidelidad com-

pleta de la expresión antigénica, que incluye el AgCLAL (65,66) y es apropiada para los compartimientos relativamente tempranos, de la diferenciación de las células T o B. Por lo tanto, la interpretación más adecuada de los resultados disponibles (tablas XVI y XVII), es que dentro del sistema hematopoyético, el AgCLAL es expresado normalmente sobre las células precursoras y en células relativamente inmaduras en las líneas T y B, y puede ser considerado, funcionalmente, como un Ag de diferenciación de estas células (65).

El porcentaje de células reactivas con el conjugado anti-LAL está estrechamente relacionado con el porcentaje de blastos en la sangre periférica, por lo que sería señalado que las muestras de médula ósea de sujetos normales o pacientes con LAL en remisión, pueden contener algunos linfoblastos, los cuales son morfológicamente y/o citoquímicamente indistinguibles de los linfoblastos neoplásicos. Por lo que la reactividad con el anti-LAL puede ser un útil indicador pronóstico en la detección temprana de la recaída de la enfermedad. Sin embargo, redundando, los reportes recientes han indicado que una célula linfóide no-T, no-B en feto neonatal y en la médula en regeneración pueden tener una débil expresión del AgCLAL, sugiriendo que el Ag es producto de un gen normal de las células precursoras hematopoyéticas (4); entonces, es necesario tener precaución en la interpretación de la reactividad del conjugado anti-LAL con aquellas muestras celulares. También es concebible que algunos pacientes  $\text{AgCLAL}^+$ , puedan llegar a ser  $\text{AgCLAL}^-$  en la recaída (70).

Lo anteriormente discutido indica que diferentes cantidades y subpoblaciones de células linfoides y no linfoides, que soportan el AgCLAL definido por el conjugado anti-LAL, pueden predominar en la circulación sanguínea durante el curso de algunos trastornos linfoproliferativos y otras hemopatías malignas; por lo que podrían correlacionarse las manifestaciones clínicas con la distribución de las células  $\text{AgCLAL}^+$  en la circulación sanguínea de los pacientes, a fin de tratar de definir como afecta ésto al curso y a la progresión del trastorno o enfermedad.

## C O N C L U S I O N E S

- Los conjugados dirigidos contra los Ag de los linfocitos B, linfocitos T y las células no-T, no-B de la LAL, han sido preparados a partir de sueros de conejos que requieren una absorción exhaustiva, lo cual produce la especificidad adecuada, y limita los títulos y las cantidades de conjugados que pueden ser preparados, como ha sido comprobado en este trabajo.
- Los resultados obtenidos con los conjugados anti-linfocito B y anti-linfocito T, indican que éstos reconocieron, respectivamente, un Ag de linfocito B y un Ag de linfocito T normales, los cuales son expresados en las células de pacientes con enfermedades linfoproliferativas y otras antes mencionadas.
- El uso de los conjugados anti-linfocito B, anti-linfocito T y anti-LAL resultaron ser una arma muy importante para el diagnóstico de malignidades hematológicas, pues complementaron y extendieron los métodos morfológicos e histoquímicos empleados.
- Mediante el empleo del panel de estos conjugados y de los anti-IgS y anti-IgIC se puede distinguir del 80 - 90 % de los pacientes con LAL de aquellos con LAM.
- Los mismos conjugados resultaron ser útiles para diagnosticar pacientes con las variantes celulares B o T, respectivamente, de la LAL.
- Se encontró una evidencia substancial de que la mayoría de las células leucémicas reflejan los fenotipos de las células linfoides T y B normales. Ninguno de los marcadores de superficie identificados en este trabajo son específicos para las células leucémicas, pueden ser reconocidos en las células sanguíneas normales.
- De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir, que el conjugado anti-LAL posee una alta especificidad para identificar a la LAL común y a la LGC/CB de otras hemopatías malignas, pues produjo

una positividad mayor del 80% de los casos de LAL y pudo predecir la crisis blástica linfoide de la LGC; la baja positividad encontrada en casos de LAM, LLC, LGC, linfoma no Hodgkin, leucemia de células peludas y leucemia crónica de megacariocitos sólo indica la bifenotipicidad de éstos padecimientos.

- Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que diferentes cantidades y subpoblaciones de células linfoides que soportan los Ag definidos por los conjugados anti-linfocito B, anti-linfocito T y anti-LAL pueden predominar en la circulación sanguínea durante el curso de una enfermedad o trastorno linfoproliferativo.
- Los 8 grupos diferentes encontrados en la clasificación inmunológica de la LAL, indican que ésta estuvo limitada por la variabilidad de los conjugados usados para definir a los diferentes marcadores antigénicos.
- En este trabajo se encontró, que de los diferentes casos de LAL estudiados, el grupo inmunológico que se presenta más frecuentemente, es el de LAL, tipo no-T, no-B, AgCLAL<sup>+</sup> y los restantes en una proporción menor.

## A B R E V I A T U R A S

<b>AAL</b>	antígeno(s) asociado(s) a la leucemia
<b>Ac</b>	anticuerpo(s)
<b>AcGRB</b>	anticuerpo-glóbulo rojo de bovino
<b>AcGRC</b>	anticuerpo-glóbulo rojo de carnero
<b>Ag</b>	antígeno(s)
<b>AgCLAL</b>	antígeno común asociado a la leucemia aguda linfoblástica
<b>AgTHL</b>	antígeno tímico humano asociado a la leucemia
<b>B</b>	antígeno celular B
<b>C</b>	complemento
<b>C3</b>	tercer componente del complemento
<b>C3b</b>	fragmento del tercer componente del complemento
<b>E</b>	rosetas espontáneas
<b>EA</b>	eritrocito-anticuerpo
<b>EAC</b>	eritrocito-amboceptor-complemento
<b>EFE</b>	enfermedad de Fisher-Evans
<b>ES</b>	rosetas espontáneas a 37°C
<b>FAB</b>	grupo Franco-Americano-Británico
<b>GR</b>	glóbulos rojos
<b>GRC</b>	glóbulos rojos de carnero
<b>Hb</b>	hemoglobina
<b>Ht</b>	hematocrito
<b>Ia</b>	antígeno(s) inmuno-asociado(s)
<b>Ig</b>	inmunoglobulina(s)
<b>IgIC</b>	inmunoglobulina(s) intracitoplasmática(s)
<b>IgS</b>	inmunoglobulina(s) de superficie
<b>ITCF</b>	isotiocianato de fluoresceína
<b>LAL</b>	leucemia aguda linfoblástica
<b>LAL-L1</b>	leucemia aguda linfoblástica, tipo L1 (clasificación FAB)
<b>LAL-L2</b>	leucemia aguda linfoblástica, tipo L2 (clasificación FAB)
<b>LAL-L3</b>	leucemia aguda linfoblástica, tipo L3 (clasificación FAB)

<b>LAM</b>	leucemia aguda mieloblástica
<b>LAM-M1</b>	leucemia aguda mieloblástica, tipo M1 (clasificación FAB)
<b>LAM-M2</b>	leucemia aguda mieloblástica, tipo M2 (clasificación FAB)
<b>LAM-M4</b>	leucemia aguda mieloblástica, tipo M4 (clasificación FAB)
<b>LAM-M5</b>	leucemia aguda mieloblástica, tipo M5 (clasificación FAB)
<b>LAM-M6</b>	leucemia aguda mieloblástica, tipo M6 (clasificación FAB)
<b>LCM</b>	leucemia crónica de megacariocitos
<b>LCP</b>	leucemia de células peludas
<b>LGC</b>	leucemia granulocítica crónica
<b>LGC/CB</b>	leucemia granulocítica crónica en crisis blástica
<b>LLC</b>	leucemia linfocítica crónica
<b>M</b>	rosetas espontáneas con eritrocitos de ratón
<b>MI</b>	mononucleosis infecciosa
<b>RC</b>	receptor para complemento
<b>RFc</b>	receptor Fc
<b>RFcIgG</b>	receptor Fc para IgG
<b>RFcIgM</b>	receptor Fc para IgM
<b>RGR</b>	receptor para glóbulos rojos
<b>RIE</b>	radioinmunoensayo
<b>T</b>	antígeno celular T

## B I B L I O G R A F I A

1. Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, N.H., Ginsberg, S.H., Wood, B.W.: Tratado de Microbiología, 2a. ed., Salvat, Barcelona, 1978, pp.470-531.
2. Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H., Wells, J.V.: Inmunología Básica y Clínica, 4a. ed., El Manual Moderno, México,D.F., 1983, pp. 67-98,334-393,471-509.
3. WHO/IARC: Special technical report: Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. Scand. J. Immunol. 3:521-532, 1974.
4. Maheu, M., Baker, M.A., Falk, A.J., Taub, M.R.: Immunologic diagnosis and monitoring of human acute leukemias (A Review). Am. J. Pathol. 103:139-158, 1981.
5. Gathings, W.E., Lawton, A.R., Cooper, M.D.: Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans. Eur. J. Immunol. 7:804-810, 1977.
6. Mandet, P., Greaves, M., Horvitz, D.: Phenotypes of "null" lymphoid cells in human blood. Scand. J. Immunol. 2:387-393, 1979.
7. Cantor, H., Simpson, E., Sato, V.L., Fathman, C.G., Herzenberg, L.A.: Characterization of subpopulations of T lymphocytes. I. Separation and functional studies of peripheral T cells binding different amounts of fluorescent anti-Thy 1:2 (theta) antibody using a fluorescence activated cell sorter (FACS). Cell Immunol. 15:180-196, 1975.
8. Chechick, B.E., Percy, M.E., Gelfand, E.W.: Human thymus-leukemia associated antigen: isolation and partial characterization. J. Natl. Cancer Inst. 60:69-75, 1978.
9. Royston, I., Majda, J., Baird, S., Meserve, B., Griffith, J.: Monoclonal antibody specific for human T-lymphocytes: Identification of normal and malignant T-cells (Abstr). Blood. 54, 5 (Suppl 1): 106a, 1979.

10. Nakahara, K., Ohashi, T., Oda, T., Hirano, T., Kasai, M., Okumura, K., Tada, T.: Asialo GM<sub>1</sub>, as a cell-surface marker detected in acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 302:674-677, 1980.
11. Shumak, K.H., Ruckewich, R.A., Beldotti, L.E.: Diagnosis of haematological disease using anti-i: II. Distinction between acute myeloblastic and acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 41: 407-411, 1979.
12. Balch, C.M., Dougherty, P.A., Vogler, L.B., Ades, E.W., Ferrone, S.: 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.* 121:2322-2328, 1978.
13. Winchester, R.J., Hoffman, T., Ferrarini, M., Ross, G.D., Kunkel, H.G.: Comparison of various tests for Fc receptors on different human lymphocyte subpopulations. *Clin. Exp. Immunol.* 37:126-133, 1979.
14. Ross, G.D., Polly, M.J.: Specificity of human lymphocyte complement receptors. *J. Exp. Med.* 141:1163-1180, 1975.
15. Pandolfi, F., Kurnick, J.T., Nilsson, K., Forsbeck, K., Wigzell, H.: Rosette formation with goat erythrocytes: A marker for human T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 32:504-509, 1978.
16. Humphrey, G.A., Richie, E., Palletta, J.M., Crist, W.M., Ragab, A. H., Pullen, J.D.: The spectrum of the E receptor on bone marrow blast in acute lymphoblastic leukemia (ALL) of childhood (Abstr). *Blood*. 54 (Suppl):189a, 1979.
17. Greaves, M.P., Brown, G., Rapson, M.T., Lister, T.A.: Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 4: 67-84, 1975.
18. Ritz, J., Pesando, J.M., Notis-McConarty, J., Lazarus, H., Schlossman, S.P.: A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. *Nature*. 283:583-585, 1980.
19. Chechick, B.E., Schroder, W.P., Daddona, P.E.: Identification of human thymus leukemia-associated antigen as a low-molecular-weight form of adenosine deaminase. *J. Natl. Cancer Inst.* 64:1077-1083, 1980.

20. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, G. A., Gralnick, H.R., Sultan, C.: Proposals for the classification of the acute leukaemias. *Br. J. Haematol.* 33:451-458, 1976.
21. Coccia, P.F., Miller, O.R., Kersey, J.H., Bleyer, W.A., Gross, S., Siegel, S.E., Sather, H.N., Hammond, G.D.: Relationship of blast cell surface markers and morphology (FAB classification) in childhood acute lymphocytic leukemia (ALL) (Abstr). *Blood.* 54 (Suppl 1): 182a, 1979.
22. Chessells, J.M., Hardisty, R.M., Rapson, M.T., Greaves, M.F.: Acute lymphoblastic leukaemia in children: Classification and prognosis. *Lancet.* 2:1307-1309, 1977.
23. Brouet, J.C., Preud'homme, J.L., Penit, C., Valensi, F., Rouget, P., Seligmann, M.: Acute lymphoblastic leukemia with pre-B-cell characteristics. *Blood.* 54:269-273, 1979.
24. Reaman, G.H., Pichler, W.J., Broder, S., Poplack, D.G.: Characterization of lymphoblasts Fc receptor expression in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 54:285-289, 1979.
25. Pesando, J.M., Ritz, J., Lazarus, H., Castello, S.B., Sallan, S., Schlossman, S.F.: Leukemia-associated antigens in ALL. *Blood.* 54: 1240-1248, 1979.
26. Weir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology, 3a. ed., 3 vols. Blackwell Scientific Publications, London, 1978, caps. 7,15,23,24, 34,47.
27. Campbell, D.H., Garvey, S., Cremer, E., Sussdorf, D.: Methods in Immunology, 2a. ed., W. A. Benjamin, Inc., New York, 1970, pp. 104-353.
28. Kabat, E.A.: Structural concepts in Immunology and Immunochemistry, 2a. ed., Reinhart and Wiston, New York, 1976, pp. 30,89,750,766.
29. Kawanura, A.: Fluorescent Antibody Techniques and their Applications. University of Tokyo Press, Tokyo, 1969.
30. Wilson, G.S., Ashley, M.A.: Topley and Wilson's principles of Bacteriology and Immunity, 5a. ed., vol. II. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, Great Britain, 1968, pp. 2429-2430.
31. Humphrey, J.H., White, R.G.: Immunology for Medicine Students, 3a.

- ed., Blackwell Scientific Publications. Bristol, England, 1973, pag. 389.
32. Frankel, S.R., Reitman, S., Sonen, W., Aley, C.: Gradwohl's Clinical Methods and Diagnosis, 7a. ed., The C.V. Mosby Company, St. Louis, USA, 1970, pag. 1060.
  33. Kuypinski, J.B.G.: Research in Immunochemistry and Immunobiology, United Park Press, New York, 1972, pag. 137.
  34. Greaves, M.F., Brown, G.: Purification of human T and B lymphocytes. *J. Immunol.* 112:420-423, 1974.
  35. Kaplan, J., Ravindranath, Y., Peterson, W.D. Jr.: T and B lymphocyte antigen-positive null cell leukemias. *Blood.* 49:371-378, 1977.
  36. Takada, A., Takada, Y., Ito, U., Minovada, J.: Shared antigenic determinants between human brain and human T-cell line. *Clin. Exp. Immunol.* 18:491-498, 1974.
  37. Whiteside, T.L.: Reactivity of anti-human brain serum with human lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 86:1-12, 1977.
  38. Garb, S., Stein, A.A., Seins, G.: The production of anti-human leukemic serum in rabbits. *J. Immunol.* 88:142, 1962.
  39. Metzgar, R.S., Mohanakumar, T., Miller, D.S.: Antigens specific for human lymphocytic and myeloid leukemia cells: Detection by nonhuman primate antisera. *Science.* 178:986, 1972.
  40. Greaves, M.F., Janossy, G., Roberts, M., Rapson, M.T., Ellis, R.B., Chessels, J., Lister, T.A., Catovsky, D.: Membrane phenotyping: Diagnosis, monitoring, and classification of acute "lymphoid" leukemias. *Haematol. Blood Transf.* 20:61, 1977.
  41. Humphreys, R.E., McCune, J.M., Chess, L., Herrman, H.C., Malenka, B.J., Mann, D.L., Parham, P., Schlossman, S.F. and Strominger, J.L.: Isolation and immunologic characterization of a human B-lymphocyte specific cell surface antigen. *J. Exp. Med.* 144:98, 1976.
  42. Umhoe, E.R., Dorf, M.E., David, C.S., Benacerraf, B.: The presence of I-region-associated antigens on B cells on molecules distinct from immunoglobulin and H-2K and H-2D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:5014, 1974.

43. Hammerling, G.I., Mauve, G., Goldberg, E., McDevitt, H.O.: Tissue distribution of Ia-antigens: Ia on spermatozoa, macrophages, and epidermal cells. *Immunogenetics*. 1:428, 1974.
44. Billing, R.J., Terasaki, P.I.: Human leukemia antigen. I. Production and characterization of antisera. *J. Natl. Cancer Inst.* 53:1635, 1974.
45. Billing, R., Rafizadeh, B., Drew, I., Hartman, G., Galli, R., Terasaki, P.: Human B-lymphocyte antigens expressed by lymphocytic and myelocytic leukemia cells. I. Detection by rabbit antisera. *J. Exp. Med.* 144:167-178, 1976.
46. Sen, L., Borella, L.: Clinical importance of lymphoblasts with T markers in childhood acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 292:828, 1975.
47. Brown, G., Greaves, M.F., Lister, T.A., Rapson, N., Papanicolaou, M.: Expression of human T and B lymphocyte cell-surface markers on leukemic cells. *Lancet*. 2:753, 1974.
48. Fu, S.M., Winchester, R.J., Kunkel, H.G.: The occurrence of HL-B alloantigens on the cells of unclassified acute lymphoblastic leukemias. *J. Exp. Med.* 142:1334-1337, 1975.
49. Wilson, J.D., Nossal, J.V.: Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet*. 2:788, 1971.
50. Ablin, R.J., Morris, A.J.: Immunofluorescent identification of a human thymic specific antigen. *Blut*. 29:32-36, 1974.
51. Smith, R.W., Terry, W.D., Buell, D.N., Sell, K.W.: An antigenic marker for human thymic lymphocytes. *J. Immunol.* 110:884-887, 1973.
52. Williams, R.C. Jr., DeBoard, J.R., Mellbye, O.J., Messner, R.P., Lindstrom, F.D.: Studies of T- and B-lymphocytes in patients with connective tissue diseases. *J. Clin. Invest.* 52:283-295, 1973.
53. Woody, J.M., Ahmed, A., Knudsen, R.C., Strong, D.M., Sell, K.W.: Human T-cell heterogeneity as delineated with a specific human thymus lymphocyte antiserum: In vitro effects on mitogen response, mixed lymphocyte culture, cell-mediated lymphocytotoxicity and lymphokine production. *J. Clin. Invest.* 55:956-966, 1975.
54. Rodt, H., Thierfelder, S., Thiel, E., Götze, D., Netzel, B., Huhn,

- D., Eulitz, M.: Identification and quantitation of human T-cell antigen by antisera purified from antibodies crossreacting with hemopoietic progenitors and other blood cells. *Immunogenetics*. 2:411-430, 1975.
55. Reif, A.E., Allen, J.M.V.: The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *J. Exp. Med.* 120:413, 1964.
56. Leckband, E., Boyse, E.A.: Immunocompetent cells among mouse thymocytes: A minor population. *Science*. 172:1258-1260, 1971.
57. Golub, E.S.: Brain-associated theta antigen. Reactivity of rabbit anti-mouse brain with mouse lymphoid cells. *Cell Immunol.* 2:353-361, 1971.
58. Brown, G., Greaves, M.F.: Cell surface markers for human T and B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 4:302-310, 1974.
59. Schlesinger, M., Galili, U.: Antigenic differences between T and B lymphocytes in man. *Isr. J. Med. Sci.* 10:715-724, 1974.
60. Thiele, H.G., Stark, R., Keeser, D., Zimpel, H.: Lack of antigenic correlations between brain and thymus. *Lancet*. 2:1447, 1973.
61. Kongsharn, P.A.L., Gold, P., Shuster, J., Colquhoun, B., Freedman, S.O.: Ability of anti-brain heteroantisera to distinguish thymus-derived lymphocytes in various species. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 3:1-15, 1974.
62. Aiuti, F., Cerrotini, J.-C., Coombs, R.R.A., Cooper, M., Dickler, Hb., Froland, S.S., Fudenberg, H.H., Greaves, M.F., Grey, H.M., Kunkel, H.G., Natvig, J.B., Preud'homme, J.-L., Rabellino, E., Ritz, R.E., Rowe, D.S., Seligmann, M., Siegal, F.P., Stjernsward, J., Terry, W.D., Wybran, J.: Special technical report: Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. *Scand. J. Immunol.* 3:521-532, 1974.
63. Whiteside, T.L., Rabin, B.S.: Surface immunoglobulin on activated human peripheral blood thymus-derived cells. *J. Clin. Invest.* 57:762-771, 1976.
64. Yashida, T.O., Anderson, B.: Evidence for a receptor recognizing antigen complexed immunoglobulin on the surface of activated mouse

- thymus lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 1:401-408, 1972.
65. Greaves, M.F., Janosy, G.: Patterns of gene expression and the cellular origins of human leukaemias. *Biochim. Biophys. Acta.* 516: 193-230, 1978.
66. Greaves, M., Delia, D., Janosy, G., Rapson, N., Chessells, J., Woods, M., Pretince, G.: Acute lymphoblastic leukemia associated antigen. IV. Expression on nonleukemic lymphoid cells. *Leuk. Res.* 4:15, 1980.
67. Janosy, G., Francis, G.E., Capellaro, D., Goldstone, A.H., Greaves, M.F.: Cell sorter analysis of leukemia associated antigens on human myeloid precursors. *Nature (Lond).* 276:176, 1978.
68. Newman, R.A., Sutherland, R., Greaves, M.F.: The biochemical characterization of a cell surface antigen associated with lymphoblastic leukemia and lymphocyte precursors. *J. Immunol.* 126:2024, 1981.
69. Thiel, E., Rodt, H., Huhn, D., Netzel, B., Grosse-Wilde, H., Ganeshaguru, K., Thierfelder, S.: Multimarker classification of acute lymphoblastic leukemia: Evidence for further T subgroups and evaluation of their clinical significance. *Blood.* 56:759-772, 1980.
70. Hsu, C.C.S., Morgan, E.R.: Indirect immunofluorescent assays for acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell-associated antigen. *Am. J. Clin. Pathol.* 73:633-638, 1980.