

# CLASIFICACION INMUNOLOGICA Y ESTUDIOS INMUNOGENETICOS EN LA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

ME. PATARROYO, A. MARTINEZ, L. OSPINA, H. CASTRO  
H. ROCHA, O. BRANDO, M. PATARROYO, A. CAMACHO,  
J. MUÑOZ, A. CAMACHO, A. MENESES, F. LEAL

En el presente estudio realizado en Bogotá entre los meses de Enero y Noviembre de 1976, se reunieron 69 nuevos casos de Leucemia Linfóide Aguda (L.L.A.), para hacer estudios de clasificación inmunológica e inmunogenética de los mismos.

Creemos que la frecuencia de la L.L.A. es mayor de la informada en el presente trabajo, por consiguiente consideramos importante realizar un estudio epidemiológico cooperativo a nivel nacional para determinar su frecuencia.

De estos 69 casos 20 fueron utilizados para hacer inmunizaciones y obtener antisueros específicos contra los distintos grupos y subgrupos de L.L.A. En los 49 restantes se encontraron 4 distintos grupos de L.L.A. clasificados como Null, T y con alto o bajo recuento de glóbulos blancos, teniendo en cuenta la edad (infantil o juvenil). Cada subgrupo presenta características antigénicas distintas siendo reconocido por anti-

sueros específicos preparados contra los diferentes antígenos. En ninguno de los casos pudimos detectar L.L.A. con características inmunológicas que las clasifiquen como del tipo B maduro, ya que ninguna de ellas mostró inmunoglobulinas a nivel de membrana.

Se diseñó un sistema de aislamiento de cantidades suficientes de antígenos específicos de las distintas L.L.A., mediante el cual aislamos el antígeno característico de un subgrupo de L.L.A. — T.

Por medio de análisis inmunogenético no encontramos, con 800 sueros de múltiparas, ninguna susceptibilidad genética de la misma ligada a los aloantígenos B o genes de la respuesta inmune; pero identificamos los diferentes aloantígenos B de la población colombiana normal y también identificamos dos sueros de múltiparas que eran capaces de reconocer la susceptibilidad genética a la Artritis Reumatoidea y a la Lepra.

## INTRODUCCION

La Leucemia Linfóide Aguda (L.L.A.) es una enfermedad linfoproliferativa que, por sus características clínicas y por su evolución, se cataloga dentro de las enfermeda-

---

Estudio realizado en la Sección de Inmunología, Centro Hospitalario San Juan de Dios, Bogotá.

Solicitud de separatas al Dr. M.E. Patarroyo.

des malignas. Ataca principalmente a los niños, aún cuando puede presentarse en personas de cualquier edad.

Las células de la línea linfoide producidas por la médula ósea no tienen un grado suficiente de maduración y son todas o en su gran mayoría de tipo blástico, con una acelerada velocidad de proliferación.

Así la L.L.A. se constituye en una enfermedad no autocontrolable, con una gran velocidad de reproducción de las células blásticas, las cuales llegan rápidamente a constituir una forma neoplásica maligna, que en un lapso relativamente corto causa la muerte del individuo, no obstante los notorios avances logrados en las últimas décadas para su manejo y tratamiento.

Su frecuencia en la población colombiana no ha sido establecida ya que las estadísticas disponibles en la actualidad, además incompletas, no discriminan la incidencia según los diferentes tipos celulares de leucemia; criterio que por lo demás dista mucho de estar unificado. Sin embargo, creemos que la incidencia de la L.L.A. en nuestra población no debe diferir ampliamente de la observada en otros países. Mencionemos a este respecto la tasa de mortalidad de la L.L.A. encontrada en Inglaterra y Gales entre 1968 y 1969 que se estimó en 1.72/100.000, en tanto que para todos los tipos de leucemia fue de 6.35/100.000 (1). En los Estados Unidos el índice de mortalidad por leucemia de todos los tipos en personas menores de 15 años, entre 1960 y 1964, se calculó en 3.45/100.000 (2). Por lo tanto, es uno de los propósitos de este trabajo llamar la atención sobre esta enfermedad, no solo por el desconocimiento epidemiológico que tenemos de ella en nuestro país, sino también por la repercusión familiar, social y económica, por cuanto ataca preferentemente a la población infantil y porque el costo de los medicamentos utilizados en su tratamiento es muy elevado; con el agravante de que dichas drogas son frecuentemente de difícil o imposible ob-

tención aún en organismos estatales encargados de su manejo y distribución.

A pesar de los avances logrados en los últimos años, estamos aún muy distantes de obtener un método de tratamiento curativo de la L.L.A.; por otra parte, no existe tampoco un método seguro para su detección temprana y por tanto es de primerísima importancia un estudio concienzudo de la misma, caracterizándola, clasificándola, identificando las proteínas de membrana que la distinguen, aislando las mismas y produciendo reactivos capaces de detectarlas en etapas tempranas cuando podría ser más controlable. Es también imperativo hacer una determinación de las poblaciones genéticamente susceptibles, para tratar de diseñar un sistema de control de las mismas.

Basados en estas consideraciones decidimos estudiar inmunológicamente las L.L.A. desde dos diferentes puntos de vista que a nuestro parecer involucran los aspectos antes mencionados, y para ello nos apoyamos en algunos datos inmunológicos de importancia, que comenzaron a configurarse a mediados de la presente década a partir de las publicaciones de Mohanakumar et al. y Billing et al. (3, 4). Dichos investigadores detectaron y aislaron un antígeno de la membrana de las células leucémicas que, no mostraba especificidad para ninguno de los diferentes tipos de leucemia, a partir del cual produjeron un antisuero capaz de reconocer células leucémicas así fueran mieloides, monocíticas, linfoides, agudas o crónicas.

Posteriormente el grupo de Melvyn Greaves (5) logró producir un antisuero específico contra las L.L.A. de tipo "Null", o sea aquellas que no pueden ser caracterizadas como L.L.A. de tipo T o de tipo B (sobre estos aspectos se encontrarán detalles más adelante).

Para los estudios de inmunogenética y susceptibilidad genética a la L.L.A. que es uno de los motivos de este trabajo, nos apoyamos en los trabajos desarrollados por el

grupo de Henry Kunkel de la Universidad Rockefeller de Nueva York (6) los cuales lograron identificar aloantígenos a nivel de las membranas de las células linfoides B, y comprobaron que las células de la L.L.A. de tipo Null (no T, ni B, que constituyen el 80% de las L.L.A.) llevan tales aloantígenos y por lo tanto pertenecen realmente a la línea B, muy probablemente en una fase anterior de maduración (7).

Se consideró entonces la utilidad práctica de una clasificación de las L.L.A. sobre una base inmunológica (8), logrando la producción de antisueros específicos, para una mejor definición de las mismas (5) aislando y caracterizando cada uno de los antígenos específicos de los diferentes tipos de L.L.A. (9), y se pensó también que se podría obtener una utilidad teórica, identificando aloantígenos B a nivel de la membrana de las células leucémicas con lo cual se podría detectar alguna susceptibilidad ligada a factores genéticos determinados por estos aloantígenos (10).

Ya que las L.L.A. de tipo Null pertenecen a la línea B y constituyen el 80% de todas las L.L.A. (cuya frecuencia es mucho mayor que la de Leucemia Linfóide Crónica, L.L.C.), consideramos que serían el material ideal para estudiar la expresión de los aloantígenos B y su relación con los genes que determinan la susceptibilidad de las enfermedades, incluyendo a la leucemia misma.

Sobre estas bases, el trabajo fué encaminado fundamentalmente hacia dos campos: el primero, la producción de antisueros específicos contra los distintos tipos de L.L.A. para poder de esta manera identificarlas y, colateralmente el aislamiento y caracterización de las proteínas específicas de cada uno de los distintos tipos de L.L.A., para producir antisueros altamente específicos que permitan una detección temprana de las mismas.

El segundo aspecto fué el análisis de las características genéticas que pudieran ex-

presarse a nivel de las membranas de las células de la L.L.A. y su relación con los genes de la respuesta inmune.

Creemos conveniente definir la terminología que utilizamos y las razones por las cuales consideramos que las L.L.A., al expresar a nivel de membrana el sistema de aloantígenos B, son de gran utilidad para el estudio de la susceptibilidad genética a las enfermedades.

Definimos la respuesta inmune como el conjunto de mecanismos fisiológicos que el organismo utiliza para hacer la destrucción de cualquier sustancia extraña y establecemos como premisa que la capacidad de responder inmunológicamente frente a algunos o a todos los tipos de agresión inmunológica, está comandada por las células linfoides y codificada genéticamente en su DNA.

En investigaciones realizadas en animales se ha demostrado la existencia de dos subpoblaciones de células linfoides: una T, de origen Tímico que es denominada Timo-Dependiente y una B, que es originada en la médula ósea de los mamíferos o en la bolsa de Fabricio de los pollos, y que es Timo-Independiente (11). Estos dos tipos de células linfoides pueden distinguirse por varias características morfológicas y funcionales: desde el punto de vista morfológico, la mayoría de las células B llevan en su membrana cantidades fácilmente detectables de inmunoglobulinas (12), mientras que las células T no las llevan; además, las células B tienen receptores para el factor 3 del complemento (C' 3) (13), para inmunoglobulinas agregadas y para el fragmento Fc. de las inmunoglobulinas G. (14), mientras que las células T no tienen tales receptores, pero pueden distinguirse por algunas otras características importantes tales como su capacidad para formar rosetas con eritrocitos de carnero (15). La subpoblación linfóide T requiere para su desarrollo en las etapas tempranas de la vida, de la presencia y funcionalidad del Timo (16) y se encuentra involucrada en la reacción de hipersensibili-

dad retardada, en el rechazo a los transplantes, en la reacción trasplante contra huésped y en la vigilancia inmunológica, entre otras, mientras que la subpoblación B es completamente independiente de la presencia y actividad del Timo y tiene como función la producción de los anticuerpos al originar las células que posteriormente los sintetizarán (17).

Cuando se investigaron las características que definen las células linfoides como T o como B en las L.L.A., diferentes grupos constataron que un 20% de estas leucemias estaba constituido por células que pertenecían a la línea T, mientras que la mayoría (80%) conformaba un grupo que no llenaba los requisitos para ser clasificadas ni como T ni como B (18 - 22). Dicha subpoblación se ha denominado Null. Los estudios hechos en más de 600 Leucemias Linfoides Crónicas (L.L.C.), por el contrario han demostrado que la casi totalidad de ellas pertenecen a la línea B, ya que expresan inmunoglobulinas, especialmente IgM e IgD y presentan receptores, algunas para C'3 y otras para el Fc., en su membrana (23-26). Solamente en dos casos excepcionales se observó que sus células eran capaces de formar rosetas con eritrocitos de carnero (27, 28). En resumen puede decirse que la L.L.C. es una enfermedad linfoproliferativa monoclonal de células B, mientras que el 20% de las L.L.A. tiene característica de células T y el 80% no puede clasificarse ni como T ni como B, es decir pertenecen al subgrupo Null.

Estudiando las leucemias de tipo Null, Greaves (5) logró producir un antisuero capaz de reconocer la mayoría de las leucemias de este tipo. Igualmente Kunkel y su grupo (7) lograron identificar en células de leucemias Null, aloantígenos que se encuentran en células B normales y de L.L.C., y en base a este hallazgo se considera que las células Null son realmente células de la línea B, probablemente en un estadio previo de maduración (o pre - B).

Desde el punto de vista inmunogenético, vale la pena recordar que los estudios realizados desde 1938 (29), se han hecho fundamentalmente con el propósito de comprender mejor los mecanismos genéticos de los transplantes. Se ha definido una serie de proteínas denominadas HLA (Human Lymphocytes Antigens) en la membrana de todas las células (linfoides, hepáticas, etc.), que son las responsables de las características de histocompatibilidad de los individuos. Se ha logrado establecer que su síntesis está determinada por un sistema de genes íntimamente relacionados que conforman el llamado Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), los cuales controlan no solamente la reacción del trasplante, sino también características de diversidad individual y tisular, además de ciertos factores inmunológicos. En el humano, tres locus en este CMH, que codifican para la síntesis de los aloantígenos, pueden detectarse serológicamente (HLA—A,B,C) mientras que un cuarto controla la reacción del cultivo mixto de linfocitos o MLC (HLA-D) (30). Figura 1.

Un sistema genético similar se describió primero en el ratón y en los cobayos, en los cuales, trabajando con cepas completamente puras (31) se observó que algunas de ellas eran incapaces de responder inmunológicamente ante la agresión antigénica y otras daban una respuesta apropiada ante la misma agresión, mientras que los híbridos presentaban una respuesta intermedia contra dichos antígenos. Se pudo establecer entonces que existía una genética de la respuesta inmunológica (32).

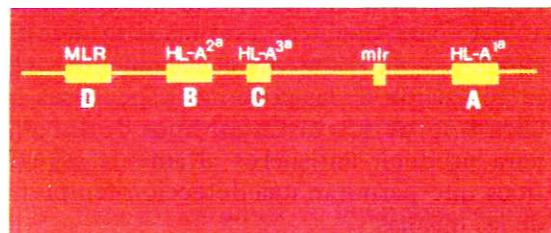


Figura 1— Complejo Mayor de Histocompatibilidad en el humano.

Posteriormente se ha precisado que los genes involucrados en esta respuesta se manifiestan a través de las células B y que es en ellas en donde se codifica y se expresa la información que determina una respuesta inmunológica apropiada contra los diferentes agresores o antígenos (33).

Así surgió la inmunogenética, uno de los más interesantes campos de la inmunología, que se relaciona íntimamente con la capacidad de responder inmunológicamente frente a los diferentes antígenos y con la susceptibilidad a diversas enfermedades.

Los trabajos realizados principalmente por los grupos de Mc Devitt y de Benacerraf (34,35) permitieron aclarar que las células que se encuentran involucradas en la genética de la respuesta inmune, es decir las células B, expresan a nivel de la membrana una serie de proteínas que están íntimamente ligadas con las características de la respuesta inmunológica. Estas proteínas, que son la expresión de los genes que determinan la capacidad de responder inmunológicamente de manera apropiada, se han denominado Ia. ("Immune antigens").

En la actualidad se han identificado en ratones y en humanos mediante antisueros, una serie de estos Ia. (36) y se han logrado aclarar algunas de sus funciones, lo mismo que los cromosomas y las regiones de estos que codifican la información necesaria para ordenar su síntesis. Es ya conocido que tales genes se encuentran localizados en el cromosoma seis del humano y en el diez y siete del ratón en área muy próxima a la que codifica para la síntesis de las proteínas que determinan los productos del CMH (37).

Los HLA se expresan en todas las células del organismo y por consiguiente en el 100% de las células linfoides, mientras que los Ia. se expresan en las células B (el 20% de las células linfoides de la sangre periférica). Se ha observado que la expresión de los Ia. se encuentra íntimamente asociada a la de los HLA y por tal razón se han reunido

en un sistema genético muy próximo al CMH (38).

En el humano, sin embargo, solo hace año y medio que el grupo de Kunkel comenzó a identificar estos genes, al observar que algunos sueros de multíparas eran capaces de bloquear la reacción del MLC, ya que reconocían y reaccionaban con una serie de proteínas localizadas en la membrana de las células B (39).

Posteriormente encontró que, algunos de estos sueros de multíparas reconocían proteínas de membrana que solo estaban presentes en las células de individuos afectados de ciertas enfermedades como la esclerosis múltiple (40).

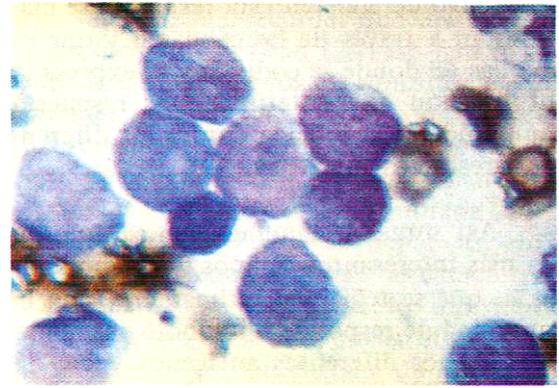
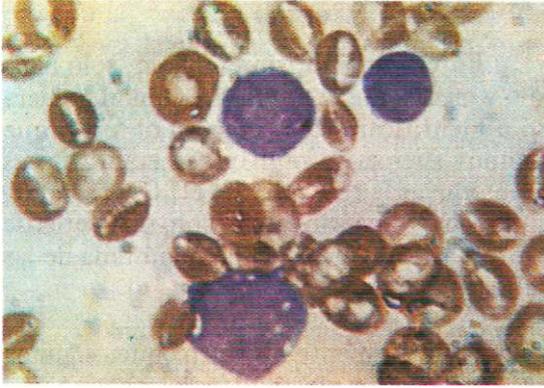
En el presente trabajo informamos sobre los estudios que nos permitieron delinear una serie de aloantígenos B y dentro de ellos, dos que se expresan en un altísimo porcentaje de individuos con Lepra y Artritis Reumatoidea.

Igualmente informamos los datos obtenidos por medio de antisueros preparados en especies animales en relación con la clasificación de la L.L.A., y sobre el aislamiento y caracterización de un antígeno hallado en uno de los tipos de L.L.A.

## MATERIAL Y METODOS

**Clasificación de la Leucemia Linfóide Aguda.** Fue hecha sobre bases fundamentalmente morfológicas, utilizando extendidos de sangre periférica y de médula ósea con las coloraciones convencionales; todos los casos fueron revisados por lo menos por dos examinadores. En la revisión final se tuvieron en cuenta los criterios propuestos por Lee et al. (41) y Huguley (42), según los cuales los citados investigadores han obtenido un acuerdo básico en por lo menos un 90% de los casos.

Dichos criterios para clasificar una Leucemia Aguda como linfóide son: 1.—



Figuras 2 y 3- Extendido de sangre periférica de pacientes con L.L.A.. Nótese el escaso citoplasma, nucléolos aparentes y compárese con la morfología de los linfocitos normales.

Que las células leucémicas no contengan bastoncitos de Auer. 2.— Que los cambios megaloblásticos en la eritropoyesis y los gránulos azurófilos contenidos en el citoplasma de las células leucémicas sean mínimos. 3.— Que las células leucémicas tengan solo una moderada cantidad de citoplasma. 4.— Que el grado de infiltración de la médula ósea y de similitud morfológica de las células leucémicas sean claramente altos.

En un pequeño número de casos se practicaron estudios citoquímicos; fundamentalmente la coloración de PAS, considerándola positiva cuando las células blásticas presentaron gránulos gruesos, aun cuando la proporción de estas células fuese baja (hasta un 5%). Figuras 2 y 3.

**Casuística.** En la primera fase de este estudio se analizaron distintos aspectos inmunológicos de 69 pacientes con Leucemia Linfoide Aguda (L.L.A.) recibidos entre Enero y Noviembre de 1976. En 20 de estas muestras se hicieron estudios de clasificación, y se utilizaron en inmunización de conejos para la producción de antisueros específicos. Estos casos no serán informados ya que los antisueros presentarían fuertes reacciones por anticuerpos contra los antígenos de histocompatibilidad.

Para la segunda fase de este estudio, o sea la identificación de los aloantígenos B,

se incluyeron 22 de los 29 casos de pacientes clasificados como L.L.A. tipo Null; 27 pacientes con Artritis Reumatoidea según los criterios diagnósticos fijados por el Comité de la Asociación Americana de Reumatología (43) provenientes de la consulta de Reumatología del Hospital San Juan de Dios de Bogotá y del Departamento Médico de la Universidad Rockefeller de New York; 20 enfermos de Lepra-Criterios diagnósticos según clasificación de Ridley - Joplin (44), atendidos en la consulta del Instituto Federico Lleras Acosta, y como controles, 30 individuos normales elegidos entre estudiantes de Medicina y personas que no tuvieran ningún defecto físico o antecedentes de enfermedades crónicas.

**Aislamiento de Linfocitos.** Se siguió el método de Ficoll - Hypaque (45). Los criterios de clasificación para las células de la línea B, fueron la presencia de Inmunoglobulinas de membrana (12), receptor Fc. (14) y receptor C' 3(13).

Para la identificación de células linfoides del linaje T, se utilizó la técnica de formación de rosetas con eritrocitos de cerro (15). Figura 4.

**Producción de Antisueros.** Originalmente se usó la técnica de Greaves (5) en la cual se hace primero la producción de suero anti-



Figura 4- Linfocito T, formando roseta con eritrocitos de carnero.

linfocítico, inmunizando conejos con células linfoides normales, una vez por semana durante 4 semanas.

Para la producción de antisueros específicos contra los determinantes antigénicos de L.L.A. tipo Null, se hicieron inoculaciones en conejo con células blásticas de estos pacientes, usando el antisuero antilinfocítico para cubrir los determinantes antigénicos de células normales, que pueden expresarse en la membrana de células leucémicas.

Una vez obtenido el antisuero, se inactivo a 56°C., por 30 minutos y se colocó frente a células linfoides normales para remover cualquier reactividad hacia ellas, quedando en esta forma únicamente los anticuerpos específicos contra la L.L.A. tipo Null.

Para obtener antisueros contra L.L.A. tipo T, se utilizó el método anterior, inoculando células blásticas de este tipo de leucemia.

Para la absorción de los antisueros dirigidos contra L.L.A. tipo T, se colocaron frente a líneas celulares B, o leucemias linfoides crónicas.

La especificidad de estos antisueros se comprobó enfrentándolos a 30 muestras de células linfoides de individuos normales, no

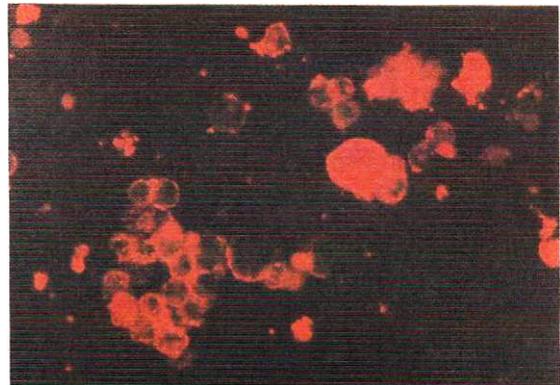


Figura 5- Antígenos de LLA, detectados mediante la técnica de fluorescencia indirecta en células leucémicas.

encontrándose ninguna reactividad por medio de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, utilizando un antisuero específico contra Gammaglobulina G. de conejo obtenido en cabro, F (ab) 2 siguiendo el método de inmunización que se describe a continuación. Figura 5.

**Aislamiento de Gammaglobulina G. de Conejo.** Se hace el aislamiento a partir de suero fresco de conejo, mediante la partición de proteínas con el ácido caprílico en Buffer Acetato 0.06 M., pH 4.6; una vez filtrado el sobrenadante, se dializa contra solución salina al 0.9% durante 12 horas, se concentra por pervaporación, y se determina la cantidad de proteínas (46).

**Inmunización del Cabro.** Se inocula vía subdérmica inmunizando al cabro con 10 mgr. de Gammaglobulina G. de conejo homogenizada en adyuvante de Freund una vez por semana durante 4 semanas; 8 días después de la última inoculación se sangra el animal; con el suero obtenido, se hace nueva precipitación de proteínas con ácido caprílico, para obtener Ig. G. de cabro específica contra Ig. G. de conejo.

**Digestión con Pepsina.** Teniendo el anticuerpo reconocedor de las Ig. G. de conejo en el cabro, se procede a hacer la digestión de esta con Pepsina, partiendo de una concentración de proteínas de 25 mgrs./ml..

en buffer acetato de sodio 0.1M. por 24 horas a 37° C. con el fin de remover el fragmento Fc., con lo cual se pretende impedir la unión del anticuerpo al receptor Fc. de las células, evitando reacciones falsas positivas a la lectura (47).

**Marcación de los Antisueros.** El antisuero digerido con pepsina o anti - Ig. G. de conejo F (ab)<sub>2</sub> se llevó a una concentración de proteínas de 15 a 25 mgrs./ml., en buffer bicarbonato 0.05 M., pH9.7; se marcó con Isotiocianato de Fluoresceína en una relación de 13-mgrs. de Isotiocianato de Fluoresceína por 1.000 mgrs. de proteína, 35 mgrs. de Isotiocianato de Rodamina por 1.000 mgrs. de proteínas. Se continuó la reacción a 37° C. por una hora y se aisló la fracción óptimamente marcada mediante cromatografía en Sephadex G-50 (47).

**Cultivo de Líneas Celulares Linfoblastoides.** Las líneas negroides (18) obtenidas en el Tumor Biology Department del Instituto Karolinska de Estocolmo fueron proporcionadas por el Dr. George Klein, y las caucasoides (16) en la Universidad Rockefeller de Nueva York gentilmente proporcionadas por los Drs. Henry Kunkel y Robert Winchester. Fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 16-40 más 10% de suero fetal bovino, a 37°C. en atmósfera húmeda más 5% CO<sub>2</sub>. Treinta de ellas eran de línea B y 4 eran líneas T (48, 49).

**Aislamiento de Antígenos específicos de la Membrana de Células Leucémicas.** Se marcaron las proteínas de la membrana de las células previamente tipificadas, mediante la técnica de la Lactoperoxidasa con Iodo 125 (50,51). A las proteínas de membrana marcadas y solubilizadas con NP-40 se les hizo el aislamiento y caracterización de su punto Isoeléctrico (pI) mediante la técnica de coprecipitación más Isoelectroenfoque(52).

**Sueros de Multíparas.** Se recolectaron sueros de 800 multíparas en el Instituto Materno Infantil de Bogotá, se inactivaron

a 56°C. por 30 minutos y se mantuvieron congelados a -20°C. hasta su uso. Dichos sueros se obtuvieron de mujeres que hubieran tenido más de 3 hijos o más de 2 abortos. Se intentó hacer una encuesta epidemiológica con respecto de los antecedentes tanto de la paciente como del esposo, con resultados negativos.

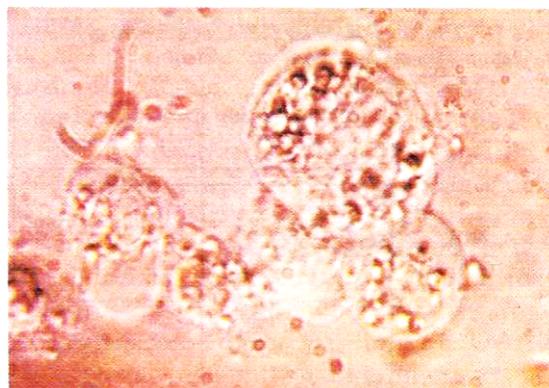
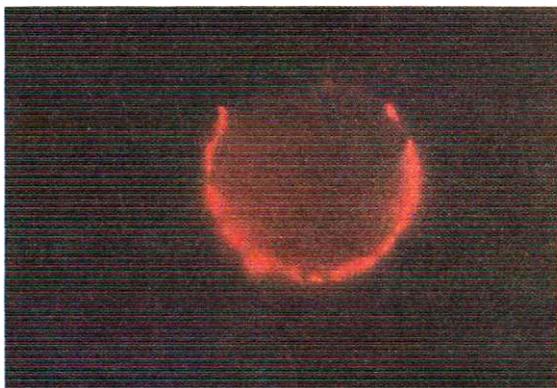
**Producción de Antigammaglobulina G. Humana.** La Ig. G. humana pura, aislada por el método del Acido Caprílico, se inoculó en cabro y posteriormente, cuando este presentó títulos altos de anticuerpos contra Ig.G. humana, se sangró, se aisló esta Ig. G. de cabro específica, se digirió con pepsina para remover el receptor Fc. y se marcó luego con sustancias fluorescentes según las técnicas ya descritas.

Este antisuero marcado, específico contra Gamma G. humana se utilizó en la técnica de Inmunofluorescencia indirecta para la detección de los anticuerpos dirigidos contra los HLA, o los marcadores genéticos que se expresan a nivel de la membrana de los linfocitos B.

**Microscopía de Fluorescencia.** Se utilizó microscopio Leitz Orthoplan equipado con un sistema Opak II, con filtros específicos para longitud de onda de la fluoresceína o de la rodamina.

**Inmunoabsorbentes sólidos.** La Ig. G. presenta reacciones cruzadas con la Ig. M.; para remover esta reactividad en la antigamma G. humana preparada en cabro, se utilizó Gamma M. aislada a partir de una Macroglobulinemia de Waldenström y se adhirió a Sepharosa, con esta Gamma M. insolubilizada, los anticuerpos dirigidos contra ella fueron removidos del antisuero (46).

**Aislamiento de Linfocitos para detección de Marcadores Genéticos en la Población Normal.** Para el análisis de los aloantígenos B, en individuos normales o pacientes con enfermedades tales como Artritis Reumatoidea y Lepra, los linfocitos fueron



**Ht wt cu'8'f'9'/'E<sup>2</sup> nru'fD'gulo wrf cu'eqp'RY O 'gp'ru'u'ewcngu'tg'lf gpvlltecp'iqu'ru'b' gf kcpvg'hwqt guegpek'lpf k'gevc0Ego r<sup>a</sup> t'gug'èqp'' grèeqp'v'cung'f'g'ru'gu'f' 'qdu'f' t'xgug's'wg'luqu'ru'e<sup>2</sup> nru' 'fi t'cpf'g+'d'f' u'lec.'b' wgu't'c'hwqt'guegpek'f'qu'lsk'c0**

aislados bajo condiciones estériles, mediante la técnica del Ficoll-Hypaque, cultivándose a una concentración de  $1 \times 10^6$  por ml. en RPMI 1640 más 10% de suero fetal bovino. Por cada 10 cc. de medio se agregó 0.1 cc. de PWM, y se incubó a 37°C por 5 días; durante este tiempo las células B, estimuladas por el PWM, hacen blastogénesis facilitando su identificación y por consiguiente la detección de los aloantígenos B a nivel de la membrana (36). Figuras 6 y 7.

**O t e c e l e p ' f ' g ' r u ' E <sup>2</sup> n r u c u 0** Las células linfoides obtenidas de las L.L.A., o células normales cultivadas y estimuladas con PWM, se lavaron tres veces con RPMI 1640, más 10% de suero fetal bovino, más NaN3 al 0.1% (6).

Frente a cada suero de múltiparas (25 lambdas) se colocaron  $1 \times 10^5$  células, y se incubaron durante 30 minutos. Se lavaron cuatro veces en el mismo medio de cultivo y luego se agregaron 10 lambdas de anti Gamma G. humana marcada con Rodamina, para el reconocimiento de los anticuerpos dirigidos contra los aloantígenos de las células B (20%), o contra el HLA (100%); se incubaron durante 30 minutos y se lavaron por tres veces para remover el exceso de Rodamina.

**R t w g d c ' f ' g ' E k s q v z l e k f c f 0** Seguimos la técnica de Terasaky con algunas modifica-

ciones. Utilizamos cajas Falcom No. 3012 colocando una lambda de cada suero frente a 20.000 células linfoides de individuos normales, en una solución de buffer Barbital. Se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada muestra se lava con 25 lambdas de buffer Barbital para remover el exceso de suero. Luego se colocan 5 lambdas de suero fresco de conejo que contenga buenos niveles de Complemento previamente absorbidos con eritrocitos A y B humanos, para evitar reacciones cruzadas con estos aloantígenos. Se incuban a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se remueve el exceso de suero de conejo y se colocan luego 10 lambdas de Tripán Azul, un colorante vital, al 1% en una solución 3 a 1 de agua destilada y EDTA pH 7.2.

**H q v q i t c h f c 0** Se utilizó rollo Ektachrome High Speed con tiempos de exposición de 3 y 4 minutos para la fluoresceína y 7 y 8 minutos para la rodamina.

**T G U W N V C F Q U'**

**R t l o g t c ' H c u g 0** En comunicación personal con los Hematólogos de los Hospitales Pediátricos y Generales de Bogotá, nos llamó poderosamente la atención el que no había datos estadísticos comparativos sobre la frecuencia de la L.L.A.. Calculamos un promedio de 30 nuevos casos por año, de acuerdo a la frecuencia observada por cada

Tabla 1- Distribución de las L.L.A. de acuerdo al número de glóbulos blancos por  $\text{mm}^3$ .

	< 30.000 blancos por $\text{mm}^3$	> 30.000 blancos por $\text{mm}^3$
L.L.A. NULL	7.750±5.000 (16)	119.000±90.000 (13)
L.L.A. T	7.142±6.000 (14)	71.800±41.000 (6)

uno de los Hematólogos participantes, pero nos sorprendió el hecho de que esta cifra fuera superada en el primer semestre de 1976 y para Noviembre del mismo año se habían reunido 69 nuevos casos, de los cuales se incluyen en este trabajo 49 ya que los 20 restantes fueron usados para inmunizaciones.

En este grupo, 59% (29 casos) eran clasificables mediante los distintos antisueños preparados contra leucemias Null. El 41% que formaba roseta con eritrocitos de carnero y reaccionaba con alguno de nuestros antisueños preparados contra leucemias T, pertenecían al grupo de las L.L.A. del tipo Timo-dependiente. Este porcentaje de leucemia T es mayor al descrito por otros grupos, pero teniendo en cuenta que nuestra casuística es mayor, probablemente refleje una proporción más ajustada a la realidad (53).

La edad promedio para el grupo fué de 13.5 años, con edades que oscilan entre los 6 meses y los 29 años.

Consideramos que el dato estadístico más importante, se observa cuando se correlacionan la edad, el tipo de L.L.A. y el recuento de glóbulos blancos/ $\text{mm}^3$  al ingreso.

Cuando analizamos los recuentos de glóbulos blancos/ $\text{mm}^3$ , y tomamos como cifra divisoria la de 30.000, observamos que los casos con bajo recuento de glóbulos blancos se encontraban distribuidos uniforme-

Tabla 2- Distribución de las L.L.A. por edad y recuento de glóbulos blancos.

	< 30.000	> 30.000
L.L.A. NULL	7.3±4.0 (16)	13.8±8.1 (13)
L.L.A. T.	5.2±3.0 (14)	14.5±6.0 (6)

mente en ambos grupos. En 16 casos de L.L.A. Null, se encontró un promedio de  $7.750 \pm 5.000$  blancos/ $\text{mm}^3$  y en 14 casos de L.L.A. T se halló un promedio de  $7.142 \pm 6.000$  blancos/ $\text{mm}^3$ . En el grupo con un alto recuento de células blancas se observó un predominio de las L.L.A. Null sobre las T, 13 casos de tipo Null mostraron una cifra promedio de  $119.000 \pm 90.000$  blancos/ $\text{mm}^3$ , mientras que los 6 casos de L.L.A-T dieron un recuento promedio de  $71.800 \pm 41.000$  blancos/ $\text{mm}^3$  (Tabla 1).

Al relacionar estos datos con la edad, observamos que los 16 casos de L.L.A. Null, con recuento de blancos inferior a 30.000, conformaban un grupo diferente en donde la edad promedio era de  $7.5 \pm 5.0$  años, mientras que las L.L.A. del mismo tipo, con cifras de glóbulos blancos superiores a 30.000, configuraban otro grupo con una edad promedio de  $13.8 \pm 8.1$  años presentándose dos casos polares con desviación hacia la edad adulta. Una distribución similar se observó en las L.L.A. T. Los 14 casos con cifras menores de 30.000 glóbulos blancos, tenían una edad promedio de  $5.2 \pm 3.0$  años, mientras que en las L.L.A. con los mismos marcadores, pero con un recuento alto de glóbulos blancos/ $\text{mm}^3$ , se encontró una edad promedio de  $14.5 \pm 6.0$  años constituyendo así un grupo independiente (Tabla 2).

Basados en estos datos, podemos decir que la presentación de las L.L.A. en las dis-

tintas etapas del desarrollo del ser humano, es bimodal, independiente del tipo inmunológico, con un grupo que aparece en edades tempranas de la vida (grupo infantil), que presenta casi siempre recuentos bajos de glóbulos blancos, y un segundo grupo que se encuentra en etapas un poco más tardías (grupo juvenil), que cursa generalmente con cifras altas de glóbulos blancos.

Por las dificultades para conseguir la droga en cantidades apropiadas, según los diferentes protocolos seguidos por los Hematólogos, es difícil hacer una correlación de supervivencia en los distintos grupos. Pero ha sido demostrado por otros autores, que las L.L.A. con recuentos de glóbulos blancos superiores a 30.000, las clasificadas como L.L.A. T, y aquellas que se presentan en edades mayores de 15 años, son las de peor pronóstico y menor supervivencia.

**Rt qf weekp'f g'Cpvluwgt qu0** Trabajando con antisueros que detectaban el grupo de las L.L.A. Null, observamos diferencias en los patrones de fluorescencia, lo que nos hizo pensar en la existencia de subgrupos de este tipo de leucemia, con características antigénicas diferentes. La misma observación, nos llevó a obtener antisueros contra los diferentes subgrupos de las L.L.A. T.

La reactividad de estos antisueros, fue comprobada contra leucemias linfoideas agudas del mismo tipo y contra células linfoideas de sangre periférica de individuos normales.

De los antisueros más importantes, el marcado como Anti H.O., reaccionaba fuertemente con algunas L.L.A. T, pero también reaccionaba fuertemente con el 90% de los linfocitos de sangre periférica de individuos normales, sugiriendo una reactividad equivalente a la del antígeno TETA del ratón; este antisuero cuya especificidad se muestra en la Tabla 3 que no reaccionó con ninguna de las líneas linfoblastoides B, reaccionaba con algunas líneas linfoblastoides T.

Los antisueros marcados como anti 84 y anti 85, sí presentaron reactividad frente

a líneas celulares linfoblastoides T y con L.L.A. T que no reaccionaron con anti H.O. Quedó así establecido, que el anti H.O. reconocía el equivalente al antígeno TETA del ratón, mientras que anti 84 y anti 85, identificaban en L.L.A. T, el equivalente del antígeno Timo-Leucemia del ratón. Comprobando mediante estos antisueros la heterogeneidad antigénica de las L.L.A. T. Estos antisueros anti T y anti Null, no presentaron reactividad con 4 leucemias linfoideas crónicas, dos leucemias mieloides crónicas y una leucemia mielomonocítica aguda, siendo entonces específicos para L.L.A.

El antisuero anti H.O., no reconoce antígenos expresados en timocitos embrionarios y fetales, lo que significa que el antígeno que se expresa a nivel de membrana en algunas L.L.A. T, es el mismo que se expresa en la membrana de linfocitos T normales de sangre periférica, y no un antígeno embrional; esto se comprobó al observar que el antisuero anti H.O., reacciona principalmente con las L.L.A. T de individuos mayores de 15 años y con recuentos de blancos superiores a 30.000/mm<sup>3</sup>. Los antisueros anti 84 y anti 85, reaccionan fuertemente con un 10-20% de timocitos embrionarios y fetales, mostrando especificidad contra una subpoblación de células embrionarias del timo; a su vez reconocen las L.L.A. T que aparecen en las etapas tempranas de la vida (1 mes a 6 años) y con recuentos de glóbulos blancos inferiores a 30.000. Actualmente, se adelantan estudios en este Laboratorio, para determinar la reactividad de los antisueros anti Null con tejidos embrionarios.

No se encontraron L.L.A. que llevaran inmunoglobulinas a nivel de la membrana celular, con antisueros específicos contra inmunoglobulinas.

**Cluro lgpvq'f gnCpvfi gpg'V0** Combinando las técnicas de marcación por medio de Lactoperoxidasa con I125 y coprecipitación por Isoelectroenfoco, aislamos la proteína de membrana de las L.L.A. T identificada por el antisuero anti H.O.. Esta proteína presenta como características físico-

Tabla 3— Características inmunológicas de algunas líneas celulares B y especificidad de nuestro antisuero Anti T.

	Kaplan	Ly 28	Seraphina	Maku	K 562 (Mieloide)	Bjab	Daudi	RD	B 35 M	T 51	7301	CI	4265	1301	HSBT	CEMT	MOLT 4
Anti Ig. D																	
Anti Ig. M						■	■										
Anti Ig.G (fob) <sub>2</sub>																	
Anti B (814)	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■				
Anti T (HO)															■	■	
Receptor C' 3		■	■	■		■	■			ND	ND	ND	ND				
Receptor Fc.				■													■
	LINEAS LINFOBLASTOIDES B													LINEAS T			

Muestra como NO todas las líneas linfoblásticas B (derivadas del linfoma de Burkitt) llevan Ig. a nivel de la membrana o Receptor Fc. o Receptor C' 3. Por tal razón la gran utilidad de antisueros preparados contra proteínas aisladas de la membrana de células B (0814) o células T (HO). Nótese como nuestro anti T (HO) no reacciona con las líneas B ni detecta todas las líneas celulares T, indicando así una heterogeneidad inmunológica de tal subpoblación linfoide.

químicas, punto isoeléctrico de  $4.3 \pm 0.2$  y un contenido alto de carbohidrato, quedando por establecer su peso molecular. Actualmente contamos con un sistema de aislamiento del antígeno, en cantidades suficientes para inmunización y obtención de antisueros (Figura 8).

Debido a problemas recientes en la obtención de muestras, no ha sido posible obtener cantidades suficientes de células de los diversos tipos de L.L.A. Null para el aislamiento de estos antígenos.

De 800 sueros de múltiparas analizados con 22 L.L.A. Null, encontra-

mos que un 16% presentaba reactividad con algunas o todas ellas. Por estudios de citotoxicidad, trabajando con linfocitos de individuos normales, con HLA previamente conocido, determinamos que el 13% de ellos presentaban anticuerpos específicos contra los HLA. Solamente el 3.25% de los 800 sueros presentaban especificidad contra los aloantígenos B. De los 26 sueros de múltiparas que presentaban reactividad contra los aloantígenos B, solamente 14 eran monoespecíficos o presentaban especificidades restringidas y el resto, eran poliespecíficos.

Observamos también que la frecuencia de los aloantígenos B, en las líneas celulares

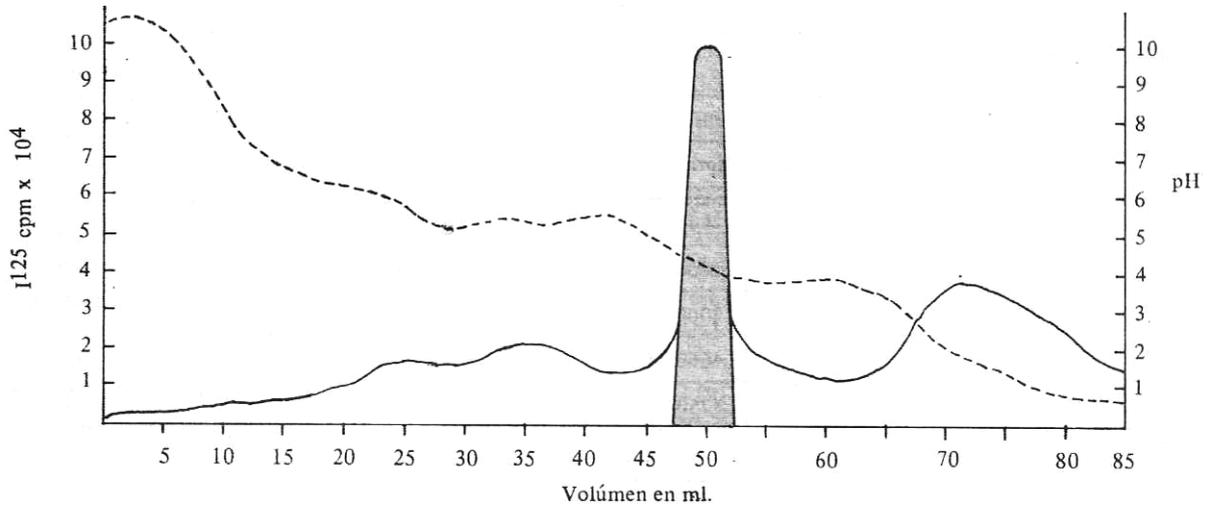


Figura 8— Aislamiento del Antígeno T (HO). Isoelectroenfoque del Antígeno T (HO). Columna LKB110. Se tomaron fracciones de 1 ml. El antígeno T se halló en los tubos 48 a 51, en un punto isoeléctrico comprendido entre 4.2 y 4.5.

Tabla 4— Frecuencia de algunos Aloantígenos B en la Leucemia Linfoide Aguda y su comparación con la población normal.

	A-33	A-32	A-36	A-72	A-56	A-57	A-59	A-60	A-62	A-31	A-38	A-41	A-30	A-53	A-23	A-75	A-73	A-52	A-76	A-78	A-79	A-69	L.L.A. Frecuencia	Frecuencia en Normales
MP 259	■		■		■		■						■										.25272	.2666
368			■			■		■			■							■		ND			.23809	.2000
191			■				■						■							ND	ND		.2000	.2000
121		ND		ND							■		■					ND		■			.3157	.4666
283	■	■	■	■				■				■				■						■	.3809	.3750
135								■					■				■	ND	ND	ND		ND	.2222	.3333
332	■	■	■	■						ND												ND	.2000	.2500

Nótese que no hay desviación estadísticamente significativa entre la presencia de los unos en la L.L.A. y los mismos en las células B de la población normal.

linfoides de origen caucásico o negroide, era diferente a las frecuencias halladas para las L.L.A.Null y las células B de la población nor-

mal colombiana (Tablas 4a 6). Lo que quiere decir que estos sueros están detectando realmente aloantígenos B. Teniendo en cuen-

Tabla 5- Frecuencia de marcadores genéticos entre Líneas Celulares Linfoblastoides B Caucásicas y Negroides, Leucemias Linfoides Agudas y Alonotígenos B en la población colombiana.

	LCL Caucásico	LCL Negroide	LLA Colombiana	Linf. B. Normal
MP 259	.1666	.1666	.2727	.2666
368	.3333	.0833	.2380	.2000
191	.0900	.0900	.2000	.2000
121	.5000	.2500	.3157	.4666
283	.5000	.2500	.3809	.3750
135	.2500	.2500	.2222	.3333
332	.2500	.0900	.2000	.2500
442	.1538	.0900	.1000	.1250
413	.6923	.2500	ND	.3751
609	.5384	.2500	.4000	.5000

Nótese la diferente frecuencia de reactividad entre las LCL caucásicas, negroides con las LLA y los linfocitos B de personas normales colombianas y como la frecuencia de estos dos últimos se aproximan más entre sí, que a los 2 primeros.

ta que los sueros que presentan reactividad contra los aloantígenos B, pueden estar identificando aloantígenos que determinan la reacción del cultivo mixto de linfocitos (MLC), o los Ia. expresados por los genes de respuesta inmune, decidimos analizar cual era la reactividad de estos sueros, y que susceptibilidad genética a enfermedades serían capaces de detectar (37).

Encontramos que el suero MP-259, reaccionaba fuertemente con las células B del 100% de los individuos con Artritis Reumatoidea, mientras que en individuos normales, solamente reaccionaba en una frecuencia del 0.266 (Tabla 7). También al estudiar los distintos tipos de Lepra encontramos que el suero MP - 413 reaccionaba fuertemente con las células B de estos pacientes en una frecuencia del 0.935, mientras que presentaba una reactividad igual, pero con una frecuencia del 0.375, en la población normal (Tabla 8).

F KUEWUKQP''

Rt ko gt c'Hcug0 Por los datos obtenidos en el presente trabajo, creemos que la frecuencia de L.L.A. es mucho mayor de la que se sospecha para la población colombiana. Calculamos que puede alcanzar cifras de 150 a 200 casos nuevos por año en la ciudad de Bogotá, puesto que en este estudio no participaron todos los centros hospitalarios y asistenciales de la ciudad y ya que a partir de Noviembre época hasta la cual incluimos los análisis estadísticos en este trabajo, hemos observado la aparición de un mayor número de casos, en comparación con los meses anteriores.

Tabla 6- Aloantígenos B en individuos normales.

	MP 259	368	191	442	413	121	283	135	332	609
JC										
EA										
AC										
MEP										
ES										
RV										
ET										
HS										
AM										
MP										
FR										
ML										
LM										
MA										
CM										
RO										

Ilustra la reactividad de algunos sueros de múltiparas frente a los linfocitos B de una muestra de población normal. Compárese preferencialmente la frecuencia de reactividad de los sueros MP. 259 y 413 con la de los pacientes de Artritis Reumatoidea (Tabla 7) y Lepra (Tabla 8) La frecuencia de tales aloantígenos en la población normal se encuentra expresada numéricamente en la (Tabla 5).

Tabla 7— Aloantígenos B en pacientes con Artritis Reumatoidea.

	MP 259	368	191	442	413	121	283	135	332	609
S.F.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
M.R.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
O.G.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
E.C.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A.J.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
I.P.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
H.M.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
J.C.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
E.O.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
L.A.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Muestra la reactividad de algunos sueros de múltiparas frente a los linfocitos B de pacientes con Artritis Reumatoidea Clásica. Nótese la positividad del suero MP 259 con todas las AR y compárese con su frecuencia en la población normal (Tabla 5). Tal suero detecta el la. que se encuentra presente en todos los individuos con AR y que probablemente determine la susceptibilidad genética a la misma.

Se hace imperioso entonces, un estudio cooperativo a escala nacional, para conocer su prevalencia y diseñar protocolos que unifiquen los distintos criterios diagnósticos y terapéuticos, tratando además de que los organismos estatales encargados de distribuir las drogas, mantengan cantidades suficientes para que de esta manera los esquemas de terapia y las cifras estadísticas de mortalidad tengan alguna validez científica.

Creemos que tal vez, los criterios de clasificación aquí delineados, pueden llegar a repercutir sobre los, métodos de tratamiento, ya qué como ha sido observado por otros grupos, recuento de glóbulos blancos mayor de  $30.000 \times \text{mm}^3$ , edad superior a los 15 años (que en nuestra estadística vendrían a comprender prácticamente un mismo grupo), y clasificación de la L.L.A. como del tipo T, son factores que empobrecen el pronóstico y que por tales razones los esquemas de tratamiento (al menos desde un pun-

to de vista teórico) deben ser diferentes a los de las L.L.A. con cifras bajas de glóbulos blancos, edad inferior a los 15 años y tipo de leucemia clasificado como Null (54).

La importancia de lograr una clasificación, se hace patente en el sinnúmero de trabajos recientemente publicados, tratando de caracterizarlas inmunológicamente. En nuestra estadística observamos una proporción de Null a T de 59:41, aproximadamente igual a la descrita por otros autores.

En nuestro estudio se esbozan desde el punto de vista antigénico, dos grandes grupos de L.L.A.: el Null y el T, cada uno de ellos con subgrupos con distintas características antigénicas y de presentación. Tenemos así, la L.L.A. Null de la edad infantil (Tablas 1 y 2), con características antigénicas propias, bajo recuento de glóbulos blancos y una edad promedio de  $7.3 \pm 4.0$  años a su presentación; la L.L.A. Null de la edad juvenil, con características antigénicas diferentes, altas cifras de glóbulos blancos y una edad promedio de  $13.8 \pm 8.1$  años a su aparición. Hay una ligera superposición de edades en este grupo, pero tales casos son raros. Cuando analizamos el grupo de las L.L.A. T, observamos un comportamiento similar al de las Null, con un subgrupo, (el infantil), que posee características antigénicas propias, bajas cifras de glóbulos blancos y una edad promedio de  $5.2 \pm 3.0$  años, a diferencia del otro grupo, que presenta características antigénicas distintas, con cifras altas de glóbulos blancos y una edad promedio de  $14.5 \pm 6.0$  años. En este grupo de las T, es mucho más clara la diferencia existente entre los distintos subgrupos.

Creemos que esta clasificación inmunológica, de las L.L.A. permite una clara comprensión de las características clínicas y evolutivas de las L.L.A. y por consiguiente la aplicación de una terapia más racional.

Analizando nuestros subgrupos, por edad y por frecuencia, observamos una clara dicotomía entre el grupo de la edad infantil y el grupo de la edad juvenil, independien-

Tabla 8— Aloantígenos B en pacientes con Lepra.

		MP 259	368	191	442	413	121	283	135	332	609
261	LL										
275	LL										
273	TT										
271	LL										
276	LL										
274	LL										
266	LL										
268	TT										
272	LL										
267	LL										
279	TT										
278	LL										
277	LL										
283	LL										
282	TT										
280	LL										

*Ilustrando la reactividad de algunos sueros de múltiparas frente a la población de células B de una muestra de pacientes con diferentes tipos de Lepra. La frecuencia de reactividad del suero MP 413 con los linfocitos B de los pacientes leproso fue de 0.935 mientras que con la de los individuos normales fue de 0.375.*

temente de su clasificación como Null o T, mostrando diferencias antigénicas y de presentación. Se podría pensar que hay dos épocas del desarrollo del sistema linfoide, que son más susceptibles a la leucemogénesis, (para dar origen a las L.L.A.) y que la frecuencia de cada una de ellas esté más bien reflejando la proporción de células linfoides del mismo tipo de la L.L.A. susceptibles a la transformación neoplásica. Tal vez la proporción de L.L.A. de un tipo determinado, al igual que los mielomas múltiples esté reflejando más bien una proporción de células linfoides en un estadio evolutivo susceptibles a ser transformadas (46). Otra posibilidad sería que durante estos períodos no existiera un apropiado control o vigilancia inmunológica para hacer el rechazo a las neoplasias linfoproliferativas. Basados en es-

tos datos pensamos que cualquiera de estas alternativas puede ser factible.

Al analizar las L.L.A. T de la edad infantil vemos que presentan neoantígenos o antígenos de derepresión que se expresan en un cierto porcentaje en las células T de timos embrionarios y fetales y pensamos que al expresarlos pueden estar siendo detectados por el organismo para montar una respuesta inmunológica apropiada, ejerciendo así un cierto control sobre estas células malignas (el bajo recuento de glóbulos blancos de tipo blástico, podría estar significando un mecanismo de control).

Al no reaccionar el anti HO con timos embrionarios pero sí con L.L.A. T del grupo juvenil y linfocitos normales, pensamos que las L.L.A. T del grupo juvenil no expresan

neoantígenos o antígenos de derepresión en la membrana pero en cambio sí se observa en ellas el mismo antígeno que se encuentra en las células T normales de sangre periférica, indicando que comparten características antigénicas de membrana con las células T normales. Al no expresar neoantígenos o antígenos de derepresión el organismo tal vez no puede reconocerlas como extrañas y en consecuencia montar una respuesta inmunológica contra ellas. Varios datos a favor de esta hipótesis han sido encontrados en este Laboratorio, y también es ampliamente conocido que son estas leucemias las de peor pronóstico.

Se sabe que las L.L.A. tipo Null expresan antígenos de derepresión que se detectan en células hepáticas de embriones con edades gestacionales inferiores a las 12 semanas (5).

Aún no hemos podido precisar si esta hipótesis es aplicable también a las L.L.A. tipo Null de la edad juvenil, ya que hasta ahora comienza a delinearse e identificarse una población de células linfoides Null normales en las distintas especies (incluyendo la humana).

Aplicando métodos inmunoquímicos muy recientes, se obtuvo, además, un método que permite el aislamiento de los antígenos específicos de los distintos tipos de leucemia linfóide aguda (52) en cantidades suficientes para inmunización y obtención de antisueros específicos contra cada una de ellas, con los cuales se puede hacer una detección temprana de los distintos tipos de leucemia, habiendo logrado así un considerable avance en el diagnóstico precoz de estas neoplasias.

La importancia de la identificación, aislamiento y producción de antisueros que caracterizan las distintas subpoblaciones linfoides normales y neoplásicas se refleja en el gran número de publicaciones recientes sobre este mismo tópico (55 - 59).

**U<sup>i</sup> w<sup>pf</sup> c' Hcug<sup>0</sup>** Habiendo analizado la genética de las leucemias linfoides en los ratones (principalmente el grupo de Edward

Boyse y Lloyd Old de Nueva York) sorprende el hecho de que no se hubieran extrapolado tales análisis y estudios a la leucemia linfóide del humano. Estos trabajos han identificado una serie de aloantígenos que se expresan a nivel de la membrana de las leucemias linfoides de los ratones, teniendo así los antígenos Theta, los aloantígenos TL, Ly, G<sub>IX</sub> y E, que han permitido un análisis de la susceptibilidad genética a las leucemias en el ratón y el estudio de las características funcionales de las distintas subpoblaciones linfoides en el mismo (60 - 64).

Estudios semejantes no se han realizado aún en el humano, pero nuestro laboratorio está actualmente encaminado hacia la caracterización de estos antígenos. (Patarroyo M.E. y Col. Manuscrito en preparación).

Los estudios de Old y Boyse con leucemias linfoides murinas permitieron delinear una serie de subpoblaciones linfoides normales de tipo T en el ratón, con características antigénicas y funcionales completamente distintas. Algo semejante estamos buscando en el humano.

Habiendo identificado los aloantígenos B y sabiendo que las L.L.A. del tipo Null pertenecían al linaje de las células B (7) decidimos analizar si había un predominio o ausencia de cualquiera de estos aloantígenos en las leucemias linfoides agudas Null, que nos permitiera esclarecer una susceptibilidad genética a la misma.

Nos sorprendimos al no encontrar ningún predominio, estadísticamente significativo, en la presencia o ausencia de los aloantígenos que hasta el presente han sido identificados. Algo similar sucedió cuando se analizaron los HLA en las leucemias linfoides agudas (65). Por estar íntimamente ligados los HLA los aloantígenos B y los genes de respuesta inmune en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad, creemos que estos aloantígenos no juegan un papel predominante en la susceptibilidad genética a

la L.L.A. y que muy probablemente la susceptibilidad a la misma esté determinada por genes que se encuentran fuera del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

A su vez los análisis genéticos experimentales realizados en el ratón no han podido identificar un gen de respuesta inmune que determine la susceptibilidad a la leucemia linfoide de los mismos.

Lo que se ha observado es que la inducción de leucemia murina experimental es un proceso en el cual se encuentran involucrados múltiples sistemas genéticos, de los cuales solo uno (el de la capacidad de responder inmunológicamente frente a los cambios inducidos en la membrana de las células linfoides por el virus de Gross) está ligado al Complejo Mayor de Histocompatibilidad de los ratones (66 - 68).

Algo análogo podría estar sucediendo en el humano, pero dicha asociación, tal como lo muestran nuestros estudios no existe o no ha sido hallada aún.

Al no encontrar una susceptibilidad genética asociada con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad o a los genes de respuesta inmune, creemos, (Patarroyo M.E. y Col. Observaciones no publicadas) que en la L.L.A. puede estar sucediendo un fenómeno similar al que se observa en el Mieloma Múltiple en el cual la frecuencia de un tipo dado de Mieloma Múltiple es igual a la frecuencia del marcador genético de la proteína del mieloma, multiplicado por la concentración de la misma en la población normal de donde proviene dicho mieloma (46). Extrapolando estos datos a la L.L.A. tendríamos que la frecuencia de un tipo determinado de L.L.A. con un marcador genético dado sería igual a la frecuencia de este marcador genético en la población normal, multiplicado por la concentración de células susceptibles de ser convertidas en leucémicas en la población de donde proviene esta leucemia. Varios hechos a favor de esta hipótesis se encuentran en el presente trabajo al observarse: a) que la frecuencia de los

aloantígenos B es diferente entre las L.L.A. colombianas y las Líneas Linfoblastoides Celulares B de origen caucásico y negroide y b) que la frecuencia de un aloantígeno dado en nuestras L.L.A. del tipo Null se aproxima mucho a la frecuencia de este mismo en la población normal colombiana.

Si tales reglas son confirmadas para todas las enfermedades linfoproliferativas como ya lo ha sido para el Mieloma Múltiple, la macroglobulinemia de Waldenström, y creemos haber presentado evidencia para las L.L.A. (quedando solamente por confirmar en los linfomas) (69) se puede entonces postular que la oncogénesis en el sistema linfoide es en alto grado independiente de los genes de respuesta inmune o del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, siendo probablemente un proceso al azar determinado por factores distintos del inmunológico, mientras que en otras neoplasias se ha observado una susceptibilidad genética asociada a los genes de respuesta inmune o al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (70, 71).

Cabría entonces suponer que la vigilancia inmunológica ejercida por el sistema linfoide (72 - 74) estaría determinada y en cierto grado por los genes de respuesta inmune en aquellas neoplasias distintas a las del sistema inmunológico.

Al no encontrarse una relación entre los aloantígenos B y la susceptibilidad genética a las L.L.A., no por ello pierden su importancia pues hasta el presente son el único método accequible para hacer la identificación de los aloantígenos B y la relación de estos con los genes de la respuesta inmune; ya que al ser estas células de la L.L.A. de tipo Null una proliferación monoclonal de células en un estado previo de maduración, son de gran utilidad para hacer la identificación de sueros que sean capaces de detectar los distintos aloantígenos B y también los genes de respuesta inmune, que como mencionábamos, se encuentran expresados a nivel de la membrana de las células linfoides B.

Se ha ilustrado en detalle su utilidad para hacer la identificación de los aloantígenos B en la población normal (Tablas 4, 5 y 6) y la utilidad para, una vez identificados los sueros que presentan reactividad con las células B, buscar cuales son los que detectan las proteínas Ia. que determinan la susceptibilidad genética a las enfermedades. En las Tablas 6, 7 y 8, observamos como, con estos sueros que detectaban los aloantígenos B, se pudo hacer un análisis de la distribución y frecuencia de estos aloantígenos en la población normal, y la identificación de dos de estos sueros que presentaban reacciones altamente específicas para los aloantígenos B en los individuos con Artritis Reumatoidea y Lepra. Dentro de esta serie de sueros buscamos caracterizar algunos nuevos que identifiquen enfermedades diferentes.

Recientemente hemos identificado un suero, el MP 989 que presenta reactividad con un altísimo porcentaje de individuos con esclerosis múltiple, permitiendo de esta manera confirmar los hallazgos de Kunkel en Nueva York con una población genéticamente diferente.

Es sabido que las células B expresan los antígenos que determinan la reactividad del cultivo mixto de linfocitos (MLC) (o sea aquellos mismos determinados por el sublocus HLA—D) y que a su vez presentan también en la membrana los Ia. o antígenos de respuesta inmune.

Analizando la reactividad del suero que había detectado la susceptibilidad genética a la Artritis Reumatoidea (el MP 259) (75) observamos que los estudios realizados por Stastny (76) habían encontrado que el aloantígeno del MLC o del sublocus HLA—D que se encuentra predominantemente en la Artritis Reumatoidea es el aloantígeno DW4 el cual se presenta en una frecuencia de 0.682 en estos pacientes y 0.186 en los individuos normales (76) y observamos también que cuando utilizamos el suero MP 259 presentaba reactividad con el 100% de los individuos con AR independientemente del

tipo genético de MLC, indicando así que este suero está detectando la proteína Ia. que determina la susceptibilidad a la Artritis Reumatoidea o que se encuentra presente en el 100% de ellos, ya sean norteamericanos o colombianos (77) independiente del aloantígeno HLA—D presente.

Creemos entonces que lo que está detectando realmente el suero MP 259 es la proteína asociada a, o que determina la susceptibilidad genética a la Artritis Reumatoidea.

Algo similar hemos pretendido hacer en los pacientes con Lepra, desafortunadamente por inconvenientes técnicos en nuestro medio para hacer la tipificación de los aloantígenos que determinan el MLC, nos ha sido imposible realizar este estudio. Actualmente no sabemos si lo que estamos detectando con el suero MP 413 sea un aloantígeno o un grupo de aloantígenos del MLC que se encuentra predominantemente en la población con Lepra o si estamos detectando, al igual que con el suero MP 259, una proteína Ia. que esté determinando la susceptibilidad genética a esta enfermedad (77). Cualquier posibilidad es de importancia ya que podríamos identificar un aloantígeno del MLC ligado a la Lepra o alternativamente un Ia. que la determine (78).

Creemos que es éste uno de los más importantes campos de la medicina en la actualidad, ya que si logramos identificar la susceptibilidad genética a las enfermedades podría en el futuro establecerse una serie de políticas para la prevención, especialmente de aquellas en las cuales se conoce el agente desencadenante.

Este campo es tal vez el futuro de la Medicina.

#### SUMMARY

In order to study the immunologic and immunogenetic characteristics of Acute Lymphoid Leukemia (A.L.L.), 69 new cases

were collected in Bogota between January and November 1976.

According to our study, we think the frequency of A.L.L. is higher than the one reported in this paper; thus we consider important an epidemiologic cooperative study at national level in order to determine its real frequency.

Of these 69 cases, 20 were used for immunization and to obtain specific antisera against the different A.L.L. groups and subgroups. In the other 49, four different A.L.L. groups were found and classified as Null or T with a high or low leucocyte count, taking also in consideration the age (infantile or juvenile). Each subgroup presents different antigenic characteristics recognized by specific antisera elaborated against the different antigens. In no case we could detect A.L.L. that might be classified as mature B, since none of them showed immunoglobulins on the membrane.

Through a system of isolation of important quantities of specific antigens of the different A.L.L. we isolated the characteristic antigen of an A.L.L.—T subgroup.

By immunogenetic analysis using 800 sera from multiparous women we could not find genetic susceptibility linked to the B-cell alloantigens or immune response genes; nevertheless we were able to identify the different B-cell alloantigens of the normal Colombian population and also two multiparous sera that were able to recognize the genetic susceptibility to Rheumatoid Arthritis and Leprosy.

#### AGRADECIMIENTO

Agradecemos muy especialmente a los doctores Alberto Vejarano y Fernando Suescun su valiosa colaboración y apoyo para la realización de este trabajo, el cual fue realizado gracias a un aporte financiero del Servicio de Salud de Bogotá.

Damos también las gracias a los doctores Fernando Chalem, Fabio Londoño, Juan Gaitán y Carlos Serrano por su interés en el envío de pacientes.

Al igual que al personal del Laboratorio de Inmunología del Hospital San Juan de Dios de Bogotá, por su eficiente asistencia técnica, y a nuestras secretarias Luisa Londoño y Lucía de Cuenca por su paciencia al transcribir el manuscrito.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.- Stewart, A.M.: Epidemiology of acute (and chronic) leukemias. *Clinics in Haematology* 1: 3-22, 1972.
- 2.- Wolff, J.A.: Acute leukemia in children. *Clinics in Haematology* 1: 189-222, 1972.
- 3.- Mohanakumar, T., Metzgar, R.S. and Miller, D.S.: Human leukemia cell antigens: Serologic characterization with xenoantisera. *J. Nat. Cancer Inst.* 52: 1435, 1974.
- 4.- Billing, R. and Terasaki, P.I.: Human leukemia antigen. I. Production and characterization of antisera. *J. Nat. Cancer Inst.* 53: 1635, 1974.
- 5.- Greaves, M.F. and Brown, G.: Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin. Imm. Immunopath.* 4: 67-84, 1975.
- 6.- Winchester, R.J., Fu, S.M., Wernet, P., Kunkel, H.G., Dupont, B. and Jersild, C.: Recognition by pregnancy serums of Non-HLA Alloantigens selectively expressed on B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 141: 924 - 929, 1975.
- 7.- Fu, S.M., Winchester, R.J. and Kunkel, H.G.: The occurrence of the HLA-B alloantigens on the cells of unclassified acute lymphoblastic leukemias. *J. Exp. Med.* 142: 1334, 1975.
- 8.- Mathé, G. and Belpomme, D.: T and B lymphocytic nature of leukemias and lymphosarcomas: A new but still uncertain parameter for their classification. *Biomedicine* 20: 81 - 85, 1974.
- 9.- Billing, R. et al.: Human B-lymphocyte antigens expressed by lymphocytic and myelocytic leukemia cells. I. Detection by rabbit antisera. *J. Exp. Med.* 144: 167, 1976.
- 10.- Lilly, F. and Pincus, T.: Genetic Control of murine viral leukemogenesis. *Advan. Cancer Res.* 17: 231, 1973.
- 11.- Bentwich, Z. and Kunkel, H.G.: Specific properties of human B and T lymphocytes and alterations in disease. *Transplant. Rev.* 16: 29, 1973.
- 12.- Rabellino, E. et al.: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I. Distribution and quantitation. *J. Exp. Med.* 133: 156, 1971.

- 13.- Bianco, C.R., Patrick, R. and Nussenzweig, V.: A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes. I. Separation and characterization. *J. Exp. Med.* 132: 702, 1970.
- 14.- Dickler, H.B. et al.: *Clin. Exp. Immunol.* 14: 97, 1973.
- 15.- Jondal, M., Holm, G. and Wigzell, H.: Surface markers on human T&B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.* 136: 207, 1972.
- 16.- Komuro, K. and Boyse, E.A.: Induction of T lymphocytes from precursor cells in vitro by a product of the thymus. *J. Exp. Med.* 138: 479, 1973.
- 17.- Catovsky, D. et al.: T-lymphoblastic leukemia: A distinct variant of acute leukemia. *Brit. Med. J.* 2: 643 - 646, 1974.
- 18.- Sen, L. and Borella, L.: Clinical importance of lymphoblasts with T markers in childhood acute leukemia. *New Engl. J. Med.* 292: 828, 1975.
- 19.- Davey, F.R. and Gottlieb, A.J.: Lymphocyte surface markers in acute lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Path.* 62: 818, 1974.
- 20.- Brown, G. et al.: Expression of human T and B lymphocyte cell-surface markers on leukemia cells. *Lancet* 2: 753, 1974.
- 21.- Brouet, J.C. et al.: T and B membrane markers on blast cells in 69 patients with acute lymphoblastic leukemia. *Ann. Immunol. (Paris)* 125: 691 - 696, 1974.
- 22.- Jondal, M., Wigzell, H. and Aiuti F: Human lymphocyte subpopulations: Clasification according to surface markers and/or functional characteristics. *Transplant. Rev.* 16: 163 - 195, 1973.
- 23.- Seligmann, M., Preud'homme, J.L. and Brouet, J.C: B and T cell markers in human proliferative blood diseases and primary immunodeficiencies, with special reference to membrane bound immunoglobulins. *Transplant. Rev.* 16: 85, 1973.
- 24.- Aisemberg, A.C. and Bloch, K.J. immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes. *New Engl. J. Med.* 287: 272, 1972.
- 25.- Fialkow, P.J. et al.: Immunoglobulin and glucose-6-phosphate dehydrogenase as markers of cellular origin in Burkitt lymphoma. *J. Exp. Med.* 138: 89, 1973.
- 26.- Klein, E. et al.: Surface immunoglobulin-moities on lymphoid cells. *Exp. Cell. Res.* 62: 133, 1970.
- 27.- Shevach, E. et al.: A human leukemia cell with both B and T cell surface receptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71: 863- 866, 1974.
- 28.- Hsu Clement, C.S.: Lymphocytes bearing B - and T - cell markers in patient with lymphosarcoma cell leukemia. *Clin. Imm. and Immunopath.* 3: 385-395, 1975.
- 29.- Görer, P.A. and Schutze, H.J.: *Hyg.* 38: 647, 1938.
- 30.- Dupont, B., Hansen, J.A. and Yunis E.J.: Human mixed lymphocyte culture reaction: Genetic, specificity and biological implications. *Adv. Immunol.* 23: 107, 1976.
- 31.- Scheibel, I.F.: *Acta Path. Microb. Scand.* 20: 464, 1969.
- 32.- Biozzi, et al.: *Ann. Inst. Past.* 115: 695, 1968.
- 33.- Shreffler, D.C. and David, C.S.: The H-2 major histocompatibility complex and the immune response region: genetic variation, function and organization. *Adv. Immunol.* 20: 125, 1975.
- 34.- McDevitt, H.O., Bechtol, K.B. and Hammerling, G.J.: In cellular selection and regulation in the immune response. G. Edelman, Editor. Raven Press, New York. 101, 1974.
- 35.- Benacerraf, B.: The genetic mechanisms that control the immune response and antigen recognition. *Ann. Inst. Past.* 125: 143, 1974.
- 36.- David, C.S. et al.: Expression of individual Ia. specificities on T and B cells. I. Studies with mitogen-induced blast cells. *J. Exp. Med.* 143: 218, 1976.
- 37.- Katz, D. and Benacerraf, B.: The role of products of the histocompatibility gene complex in immune response. Edited by David H. Katz and Baruch Benacerraf, New York Academic Press, 1976.
- 38.- Keunung, J.J. et al.: Typing for MLC (LD). *Transplantation Proceedings* 7: Suppl.1: 35, 1975.
- 39.- Mann, D.L. et al.: Detection of antigens specific for B-lymphoid cultured cell lines with human alloantisera. *J. Exp. Med.* 142: 84, 1975.
- 40.- Ryder, L.P. and Svejgaard, A.: Associations between HLA and disease. Report from the HLA and disease registry of Copenhagen, 1976. Publ. by L.P. Ryder and A. Svejgaard, Copenhagen, 1976.
- 41.- Lee, S.L. et al.: Morphologic Clasification of acute Leukemias, 2nd. Conf. Exp. Clinical Cancer Chemotherapy, Nov. 2-3, 1961, Cancer Chemother. Rep. p. 151.

- 42.- Huguley, Jr, Ch.: Acute Leukemia: general considerations and acute granulocytic Leukemia; in Hematology edited by William J. Williams, p.710, Mc.Graw Hill, 1972.
- 43.- Arthritis Foundation. Primer on the rheumatic diseases. Seventh edition, 1973.
- 44.- Immunological problems in leprosy research: 1\*. Bull. O.M.S. 48: 345-354, 1973.
- 45.- Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21: (Suppl. 97) 77, 1968.
- 46.- Patarroyo, M.E. et al.: Clases, subclases y marcadores genéticos en las inmunoglobulinas del mieloma múltiple en Colombia. Acta Med. Col. 1: 3, 1976.
- 47.- Winchester, R.J., Fu, S.M., Hoffman, T. and Kunkel, H.G.: IgG on lymphocyte surfaces: Technical problems and the significance of a third cell population. J. Immunol. 114: 1210- 1212, 1975.
- 48.- Klein, E. et al.: Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. In press.
- 49.- Nilsson, K. and Pontén, J.: Classification and biological nature of established human hematopoietic cell lines. Int. J. Cancer. 15: 321 - 341, 1975.
- 50.- Durda, P.J. and Gottlieb, P.D.: The Ly-3 antigens on mouse thymocytes: immune precipitation and molecular weight characterization. J. Exp. Med. 144: 476, 1976.
- 51.- Hess, M.: Ia. antigens: Isolation, chemical modification and structural characterization. Transplant. Rev. 30: 40, 1976.
- 52.- Patarroyo, M.E. y Corredor, C.: Isolation and characterization of a human T-Cell Antigen present in Acute Lymphatic Leukemias and T-Lymphocytes. (manuscrito en preparación).
- 53.- Tsukimoto, I. et al.: Surface markers and prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. New Engl. J. Med. 294: 245, 1976.
- 54.- Pinkel, D.: Treatment of acute lymphocytic leukemia. London, Leukemia Research Found, pp. 1-51, 1973.
- 55.- Humpheys, R.E. et al.: Isolation and Immunologic Characterization of a Human, B-lymphocyte-Specific, Cell Surface Antigen. J. Exp. Med.: 144, 98, 1976.
- 56.- Winchester, R.J. et al.: Studies with Allo - and Hetero-B-cell Antisera. Scand J. Imm. 5: 745, 1976.
- 57.- Trowbridge, I.S. et al.: Surface Molecules Specific for Human Thymus-Dependent (T) and B Lymphocytes. Eur. J. Immunol. In press.
- 58.- Owen, F. and Fanger, M.: Studies on the Human T-Lymphocyte Population. Immunochemistry 13: 121, 1976.
- 59.- Takada, Y., Takada, A and Minowada, J.: Antigenic determinants common to established human B cell lines, but not shared by human T cell lines. J. Clin. Exp. Immunol. 21: 267, 1975.
- 60.- Boyse, E.A. et al.: Properties of four Antigens Specified by the Tla Locus. International Convocation on Immunology, 353, 1969.
- 61.- Boyse, E.A. et al.: Antigenic properties of experimental leukemias J. Nat. Cancer Inst. 31: 987, 1963.
- 62.- Stockert, E. et al.: The G<sub>IX</sub> System. J. Exp. Med. 133: 1334, 1971.
- 63.- Boyse, E.A. et al.: Ly-A and Ly-B: two systems of lymphocyte isoantigens in the mouse. Proc. Roy. Soc. Exp. Biol. Med. 170: 175, 1968.
- 64.- Aoki, T. et al.: E Antigen: A Cell-Surface Antigen of C57BL Leukemias. Cancer Research 30: 244, 1970.
- 65.- Sveigaard, A. et al.: Transpl. Rev. 22: 3, 1975.
- 66.- Ikeada, H. et al.: Relation of chromosome 4, to murine leukemia virus-associated antigen of AKR mice. J. Exp. Med. 137: 1103, 1973.
- 67.- Obata, Y. et al.: Relation of G<sub>IX</sub> antigen of thymocytes to envelope glycoprotein of murine leukemia virus. J. Exp. Med. 141: 188, 1975.
- 68.- Tung, J.S. et al.: Biochemical evidence linking the G<sub>IX</sub> thymocyte surface antigen to the gp 69/71 envelope glycoprotein of murine leukemia virus. J. Exp. Med. 141: 198, 1975.
- 69.- Hansen, J.A. et al.: HLA and MLC typing in patients with Hodgkin's disease. Submitted to publication.
- 70.- Simons, M.J. et al.: Immunogenetic aspects of NPC. I. Differences in HLA antigen profiles between patients and control groups. Int. J. Cancer. 13: 122, 1974.
- 71.- Simons, M.J. et al.: Histocompatibility Testing 1975, p. 809. Munksgaard, Copenhagen.
- 72.- Klein, G.: EBV-Induced Transformation of Human Lymphoid Cells and Immunosurveillance Against Lymphoma Development. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 124 C: 391, 1973.

- 73.- Klein, G.: Immunological Surveillance Against Neoplasia. Harvey Lecture. 1973.
- 74.- Stutman, O.: Immunodepression and Malignancy. Advances in Cancer Research 22: 261, 1975.
- 75.- Patarroyo, M.E., Chalem, F., Brando, O. y Patarroyo, M.:Manuscrito en preparación.
- 76.- Stastny, P.: MLC reactivity in patients with rheumatoid arthritis. In Histocompatibility testing, 1975. Munksgaard, Copenhagen, p. 797, 1976.
- 77.- Winchester, R.J., Patarroyo, M.E., Halpern, J. and Kunkel, H.G.: Manuscrito en preparación.
- 78.- Patarroyo, M.E. y Londoño, F.: Manuscrito en preparación.