



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

BUSQUEDA E IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS  
CONTRA ANTIGENOS DEL SISTEMA HLA

E S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLÓGICO

P E S E N T A

GEORGINA JURROLA BRIONES

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ANGEL TERAN ORTIZ

1 9 8 1



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## C O N T E N I D O

	Pág.
INTRODUCCION.	1
TRABAJO EXPERIMENTAL	16
<i>Material Biológico</i>	18
Reactivos	19
Métodos	21
RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	31
COMENTARIOS Y CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFIA	55

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

## INTRODUCCION.

Desde hace mucho tiempo, el hombre ha intentado la sustitución de un órgano o tejido dañado por uno sano (trasplante). No pudimos entender el proceso que impedía que este órgano o tejido sobreviviera en la persona en que eran sustituidos. Fue Peter Medawar, el que con una serie de experimentos en ratones intentó explicar el tipo de fenómeno por el cual se destruye "rechaza" el órgano o tejido trasplantado.

Haciendo varios trasplantes de piel en ratones, Medawar, observó, que estos eran rechazados mas rápido cuando se les injertaba por segunda vez un pedazo de piel del mismo donador. Se concluyó que el fenómeno de rechazo estaba mediado por un mecanismo inmunológico que no reconocía como propio al tejido extraño. (1)

A las sustancias que destacan en la génesis del rechazo, se les ha denominado "Antígenos de Histocompatibilidad", estos antígenos presentan diferencias estructurales, denominadas polimorfismos.

Medawar, mostró que estos antígenos se encuentran, también en los Leucocitos, ya que el injerto era rechazado mas rápido cuando los animales receptores eran preinoculados con Leucocitos del donador (respuesta secundaria).

En 1938 Gorer y Snell, describen mas explícitamente el sistema de histocompatibilidad en el ratón designado como H2, estableciendo que estos antígenos son relevantes en trasplante. (2) Siguiendo el estudio del H2 se ha llegado a conocer la genética, mapeo, número y funciones de estos antígenos, lo que ha servido para el estudio de este sistema en otras especies incluyendo al hombre.

Jean Dausset, en 1958, hace la descripción de un antígeno de histocompatibilidad en humanos, al que llamó Mac, ahora el HLA-A2, (3) hecho que le valió el premio Nobel en 1980, posteriormente a él muchos investigadores hacen descrip-

otras semejantes creándose la necesidad de la integración de Asociaciones Internacionales que regulen la nomenclatura de este sistema denominándose en hence bajo las siglas HLA (*Human Leucocyte Antigen*). (Tabla 1)

Actualmente se sabe que en el humano, los antígenos del sistema HLA, se encuentran codificados en el cromosoma 6, distribuidos en por lo menos 4 locos los que se han denominado con las letras siguiendo el orden alfabético, A, B, C y D, el locus D recientemente descrito, para algunos autores es el mismo D la diferencia se aflo la técnica para demostrarlo; para el locus D es el cultivo mixto de linfocitos y para el D el microcitotoxicidad mediada por complemento. (4) (Figura 1)

La combinación de antígenos HLA determinada por los genes de un cromosoma forman el haplotipo (haploide + genotipo) y normalmente es heredado de padres a hijos como una unidad, no obstante estudios familiares han demostrado que puede ocurrir entrecruzamiento entre los loci HLA-A, B, C y D, demostrando que éstos son separables. Existen sólo dos haplotipos paternos y dos maternos en una familia, los hijos pueden heredar sólo cuatro posibles combinaciones. Así dos hijos tienen una probabilidad de 25 % de ser idénticos, 50 % de diferir en un haplotipo y 25 % de ser diferentes (5). (Figura 3)

Singal, Mickey y Terasaki, el 1969, aplicaron la determinación de estos antígenos, en trasplante de riñón, demostrando que cuando existen reacciones compatibles entre donador y receptor, el injerto funcionaba mejor. (6) (Figura 3)

Aunque los éxitos confirmaron las esperanzas puestas en el trasplante, los fracasos son los que impulsaron a continuar la búsqueda de nuevos procedimientos de laboratorio para aumentar la seguridad de los pacientes; y así surge el cultivo mixto de linfocitos que además de ser una prueba pronóstica excelente pues se manifiesta el locus D ya mencionado. (6)

Quizá todo hubiera quedado aquí, si no se hubiese relacionado al siste-

TABLA 1

La terminología queda como HLA indicando después de un guión el locus al que se refiere, -A, -B, -C, -D, -DR. Una especificidad completamente identificada y aceptada se le designa por el locus y un número, una letra "v" antes del número indica que la especificidad no está bien definida.

HLA - A	HLA - B	HLA - B	HLA - C	HLA - D	HLA - DR
HLA - A1	HLA - B5	HLA - Bw42	HLA - Cw1	HLA - Dw1	HLA - DR1
HLA - A2	HLA - B7	HLA - Bw44	HLA - Cw2	HLA - Dw2	HLA - DR2
HLA - A3	HLA - B8	HLA - Bw46	HLA - Cw3	HLA - Dw3	HLA - DR3
HLA - A9	HLA - B12	HLA - Bw48	HLA - Cw4	HLA - Dw4	HLA - DR4
HLA - A10	HLA - B13	HLA - Bw47	HLA - Cw5	HLA - Dw5	HLA - DR5
HLA - A11	HLA - B14	HLA - Bw49	HLA - Cw6	HLA - Dw6	HLA - DR6*
HLA - Aw19	HLA - B15	HLA - Bw49	HLA - Cw7	HLA - Dw7	HLA - DR7*
HLA - Aw23	HLA - Bw16	HLA - Bw50	HLA - Cw8	HLA - Dw8	HLA - DR8*
HLA - Aw24	HLA - B17	HLA - Bw51		HLA - Dw9	HLA - DR9*
HLA - A25	HLA - B18	HLA - Bw52		HLA - Dw10	HLA - DR10*
HLA - A26	HLA - Bw21	HLA - Bw53		HLA - Dw11	
HLA - A28	HLA - Bw22	HLA - Bw54		HLA - Dw12	
HLA - A29	HLA - B27	HLA - Bw55			
HLA - Aw30	HLA - Bw35	HLA - Bw56			
HLA - Aw31	HLA - B37	HLA - Bw57			
HLA - Aw32	HLA - Bw38	HLA - Bw58			
HLA - Aw33	HLA - Bw39	HLA - Bw59			
HLA - Aw34	HLA - B40	HLA - Bw60			
HLA - Aw36	HLA - Bw41	HLA - Bw61			
HLA - Aw43		HLA - Bw62			
	HLA - Bw4*	HLA - Bw63			
	HLA - Bw6*				

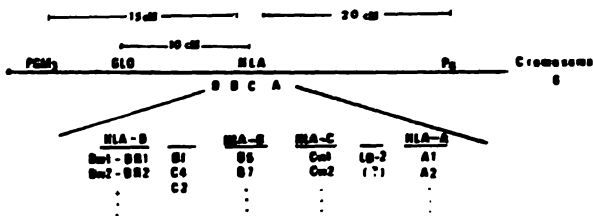
Cada loci tiene carácter polimórfico, siempre se habían identificado con una sola especificidad y ahora se han dividido en varias, ejemplo: HLA-A9 en HLA-Aw19, Aw24, HLA-B1: en HLA-B25, B26, etc.,

\* Bw4 y Bw6 antes 4a y 6b, son los determinantes púlicos de algunas moléculas HLA-B.

Histocompatibility Testing 1980.

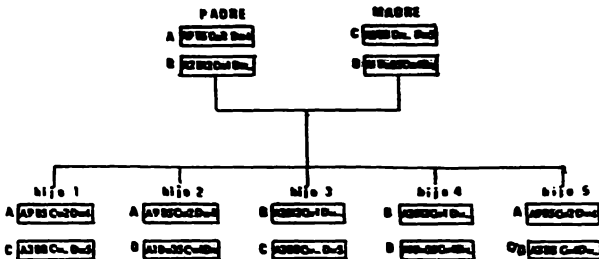


FIGURA 1<sup>(128)</sup>



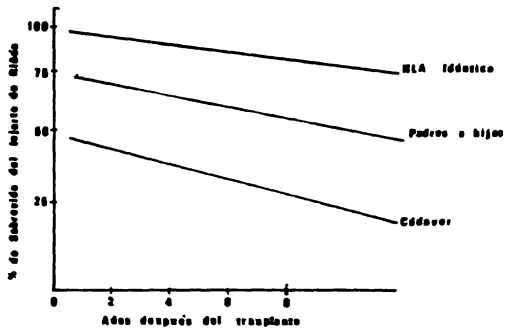
Localización cromosomal del Complejo Principal de Histocompatibilidad Humano.

FIGURA 2<sup>(12)</sup>



Ejemplo de segregación de haplotipos HLA en una familia todos los hijos heredan un haplotipo de cada uno de los padres. Occasionalmente se pueden formar nuevos haplotipos - por entrecruzamiento de los cromosomas (hijo 5).

FIGURA 3



Papel del HLA en la Supervivencia del Aloinjerto.

Histocompatibility Testing 1988.

na de antígenos de histocompatibilidad con la susceptibilidad a tumores malignos, como lo demostró Lilly en el ratón con el virus de leucemia de Gross, hallazgo que motivó una serie de investigaciones en este sentido, lo que dió lugar al establecimiento de una especialidad en Inmunología, la Inmunogenética.

La determinación de los antígenos HLA en poblaciones diversas mostraron que las frecuencias con características étnicas bien establecidas, lo que es denominado "Equilibrio" (Tabla 2), de gran aplicación en estudios antropológicos. Estas frecuencias establecidas en poblaciones normales a veces rompen las reglas de probabilidades, siendo el ejemplo mas notable la asociación de los antígenos A1 y B8 cuyas frecuencias son 0.17 y 0.11 respectivamente en la población europea, se puede predecir que dado un equilibrio el A1 y el B8 pueden encontrarse juntos (en el mismo haplotipo) con una frecuencia alrededor de  $0.17 \times 0.11 = 0.0187$ . De hecho estos antígenos se encuentran juntos con una frecuencia aumentada de 0.4 a 0.138, esta frecuencia aumentada se denomina "Desequilibrio", lo que se aplica a varios haplotipos. (10,11)

Otros desequilibrios importantes son los descritos entre los antígenos HLA y algunos padecimientos, dando oportunidad al estudio de factores genéticos predisponentes en la etiología de algunas enfermedades como las colagenopatías que incluyen el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y la diabetes entre otras. (10,11,12) (Tabla 3)

Los antígenos HLA se sintetizan y crean intracelularmente, son glucoproteínas que forman parte de la membrana plasmática por lo que exponen sus determinantes antigénicos al medio extracelular. Son moléculas separadas como se ha demostrado mediante el empleo de anticuerpos específicos marcados con fluoresceína, las células oñulas que no tienen antígenos HLA, son los eritrocitos maduros. (Tabla 4) (13,14,15)

Además de la aplicación del HLA al trasplante de órganos como de riñón,

TABLA 3

FRECUENCIAS DE LOS ANTIGENOS HLA - A Y -B EN %.

HLA	MEXICANOS (80)	EUROPEOS	INDIOS	MONGOLOIDES	INDIOS AMERICANOS	INDIOS AFRICANOS
A1	18	31	33	4	2	8
A2	63	68	29	33	73	34
A3	14	28	14	2	2	16
A9	36	17	26	65	44	34
A10	19	19	14	14	0	16
A11	16	12	33	24	2	2
A28	16	8	12	4	17	17
A29	1	8	2	2	0	10
As23	-	4	4	4	0	15
As24	-	14	33	65	64	10
A35	0	4	3	4	0	2
A36	1	8	12	10	0	14
As30	4	4	2	4	2	29
As31	3	2	2	-	17	4
As32	1	8	6	-	-	8
As33	8	4	14	14	8	14
B5	24	12	34	17	19	16
B7	1	34	10	4	2	23
B8	1	21	15	2	-	8
B12	7	29	19	6	2	23
B13	3	4	4	8	-	12
B14	8	8	-	-	2	6
B18	6	10	4	6	2	6
B27	5	8	4	6	6	2
B15	7	12	15	29	26	8
Bs16	7	8	2	8	23	2
B17	8	8	16	4	2	38
Bs21	6	4	2	-	8	2
Bs22	4	6	6	24	-	2
Bs35	42	19	33	12	4	12
B40	2	12	12	4	8	14

Histocompatibility Testing 1972.

TABLA 3

ALGUNAS ENFERMEDADES QUE PRESENTAN ASOCIACION  
CON ANTIGENOS HLA. (23)

ENFERMEDAD	ANTIGENO	*RIESGO RELATIVO
<i>Spondylitis Anquilosante</i>	B27	90.1
<i>Síndrome de Reiter</i>	B27	85.9
<i>Uveítis Aguda Anterior</i>	B27	8.4
<i>Artritis Reumatoide</i>	Dw3	3.9
<i>Enfermedad Celíaca</i>	Dw3	73.0
<i>Dermatitis Herpetiformis</i>	Dw3	13.5
<i>Hepatitis Autoinmune Crónica</i>	Dw3	6.8
<i>Enfermedad Idiopática de Addison</i>	Dw3	8.8
<i>Enfermedad de Graves</i>	Dw3	4.4
<i>Diabetes Insulina - Dependiente</i>	Dw3	2.5
	Dw3	3.6
<i>Psoriasis Vulgaris</i>	Cw3	14.9
<i>Neuromatosis Idiopática</i>	A3	7.4
	B14	5.0

\*Riesgo Relativo =  $a/bc$

a - es el número de pacientes positivos para el Ag.

b - es el número de pacientes negativos para el Ag.

c - es el número de controles positivos para el Ag.

d - es el número de controles negativos para el Ag.

Riesgo normal = 1.0

TABLA 4

SISTEMA HLA.

CARACTERÍSTICAS GENEPALES	Sistema proteico altamente polimórfico, con determinantes antigénicos públicos y privados; son cuando menos 4 grupos codificados en el brazo corto del cromosoma 6, su herencia es por segregación Mendeliana.	
LOCI QUE LO CONFORMAN	A, B, C	D/DR (el mismo gene pero difieren su método de detección)
ESTRUCTURA	2 cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente: cadena pesada PM 46 000 glicosilada; cadena ligera PM 16 000-18 2-microglobulina.	2 cadenas polipeptídicas glicosiladas unidas no covalentemente: cadena 1 PM 36 000 cadena 2 PM 29 000
LOCALIZACIÓN	En la membrana de todas las células nucleadas y plaquetas.	En la membrana de linfocitos T, macrófagos, endotelio y espermatozoides.
SÍNTESIS	Se sintetizan y ensamblan intracelularmente, con recambio constante, se pueden encontrar en bajas concentraciones en plasma y orina.	
DETECCIÓN	Serológicamente definibles (SI generalmente por microcitotoxicidad media da por complementos.	D- cuando se determina por método de inmunofluorescencia DR- por microcitotoxicidad.
FUNCIÓN	Como receptores en el reconocimiento e interacción celular muy importante en la respuesta inmune.  Regula a células T citotóxicas ("Killer") en el reconocimiento de antígenos. Mecanismo desconocido.	Mecanismo desconocido, afecta interacciones de células T y macrófagos y determina la manera en que los macrófagos presentan el antígeno a las células T "ayudadoras" o "supresoras".

médula ósea, hígado, páncreas, etc., algunos en forma rutinaria en diversos hospitales del mundo, su estudio ha profundizado en el conocimiento de subpoblaciones celulares involucradas en la respuesta inmune y actualmente gran parte del esfuerzo se dirige al esclarecimiento de su papel biológico, cuya finalidad parece ser el reconocimiento tanto de lo propio como de lo extraño, relacionado con los procesos íntimos de la respuesta inmune y cuyas alteraciones pueden dar lugar desde la no eliminación de procesos malignos hasta el desencadenamiento de autoinmunidad. (17,18,19)

#### Anticuerpos Anti- HLA .

Debido a la importancia que tienen este sistema tanto a nivel clínico (trasplantes, asociación con enfermedad) como en investigación (inmunogenética, papel biológico) su estudio se ha incrementado en los últimos años. Siendo un requisito indispensable el contar con antisueros tipificadores, para cualquiera de las aplicaciones de dicho sistema, ya que es necesario identificar los antígenos y no existe hasta el momento otro método, que la tipificación serológica. (ver métodos).

Ahora bien para que las tipificaciones tengan mejores resultados y por ende los estudios relacionados con ellas, es necesario: que los antisueros sean monoespecíficos, que se cuente con todas las especificidades conocidas, que las especificidades correspondan a los antígenos presentes en la población que se va a estudiar y que se tenga un número extenso de éstos.

Los sueros monoespecíficos, son difíciles de encontrar siendo este uno de los principales problemas en la búsqueda de antisueros. La solución a este problema depende de las fuentes de antisueros y de los métodos de análisis que se usan para la identificación de las especificidades de los anticuerpos presentes en ellos.

*Las fuentes de anticuerpos pueden ser:*

- a) *Mujeres que han tenido embarazos*
- b) *Personas después de varias transfusiones*
- c) *Personas con injertos de tejidos*
- d) *Personas inmunizadas voluntariamente*
- e) *Producción de xenocuerpos*
- f) *Producción de anticuerpos monoclonales*

a) *Mujeres que han tenido embarazos. Formación de anticuerpos contra -  
antígenos de histocompatibilidad por inmunización fetomaterna.*

*Se han realizado numerosos estudios en relación a la formación de anti-  
cuerpos citotóxicos en el embarazo. Estos trabajos coinciden en que una baja pro-  
porción de mujeres primíparas forman anticuerpos contra los antígenos de histocom-  
patibilidad del feto, heredados del padre y que la frecuencia aumenta a partir del  
segundo embarazo. En algunos casos los anticuerpos desaparecen al poco tiempo des-  
pués del nacimiento del niño, en otros dura más tiempo, habiéndose reportado casos  
en los cuales han durado hasta 20 años después del último embarazo. (22,25)*

*Terasaki sugiere que la presencia de estos anticuerpos se debe al paso -  
de leucocitos fetales a la circulación materna o a la inmunización a través del -  
trofoblasto. (24)*

*Se ha demostrado en ratones que la placenta actúa como inmunoadsorvente  
de los anticuerpos que produce la madre contra los antígenos HLA del feto. (26)*

*No obstante, la mayoría de los sueros de multiparas que tienen anticuer-  
pos presentan reacciones débiles, (bajo título) y en algunos casos polispecificos  
el título varía durante y después del embarazo, algunos trabajos indican que el -  
título disminuye a partir del 3er trimestre del embarazo, por lo que la recolec-  
ción de sueros debe hacerse inmediatamente después del parto. (25)*



Debido a que la incidencia en la formación de anticuerpos por embarazo es baja (10 a 30 %) se requiere analizar una gran cantidad de muestras, por ejemplo en algunos laboratorios de EUA se prueban de 3000 a 5000 sueros al año. Los programas de búsqueda de anticuerpos se llevan a cabo en colaboración con los hospitales de ginecoobstetricia, donde se pueda obtener tal cantidad de sueros, además de contar, por supuesto, con el material necesario y la cooperación de las parturientas. (28,29,30)

Otra fuente de suero, es la sangre derramada en el proceso natural del parto, la cantidad puede variar de acuerdo a las características que tenga el proceso: tamaño del producto, placenta, edad de la parturienta etc, obteniéndose en algunos casos cantidades considerables. Los anticuerpos también se pueden extraer de la placenta. (37)

b) Personas que han recibido varias transfusiones.

Aproximadamente el 35 % de las personas que han recibido múltiples transfusiones, forman anticuerpos contra los antígenos de trasplante, como generalmente reciben de diferentes donadores estos sueros frecuentemente son polispecificos. Sin embargo no hay que descartar esta posibilidad, ya que en ocasiones se alcanzan títulos elevados. (37,38)

c) Receptores de trasplante.

De los pacientes trasplantados más del 50 % de quienes rechazan el injerto (generalmente de cadáver) tienen altos títulos de anticuerpos EIA después del rechazo y cuando cesa la terapia inmunosupresora.

A pesar de que el rechazo de injertos es algo no deseable, se presenta. En estos casos, el practicar una plasmaféresis ayuda a bajar el título de anticuerpos y por tanto a controlar un poco el rechazo. (37,38)

*d) Inmunización Voluntaria.*

Los voluntarios son tipificados e inmunizados con células de personas con las que difieren en un mínimo de antígenos, para así obtener sueros mono o disespecíficos, por ejemplo entre parientes: padres e hijos donde se sabe allí existe un haplotipo de diferencia.

Existen varios programas de inmunización planeada, algunos lo hacen - por repetidos injertos de piel, por inyección de una suspensión de leucocitos y plaquetas o por pequeñas transfusiones de 20 ml de sangre. (31)

*e) Producción de Inocuitosueros.*

Aunque los sueros para determinar antígenos HLA se pueden producir con altos títulos por inmunización de animales de varias especies, su producción ha sido limitada ya que requieren de una extensa absorción y es necesaria la purificación química de los antígenos para usarlos como inmunógenos. Estos sueros tienen además una mayor proporción de reacciones cruzadas. (32,33,34)

*f) Antisueros de Histocompatibilidad producidos por líneas de Células Híbridas.*

La fusión entre células de mieloma y células de bazo de donadores inmunizados, se ha usado como método para producir anticuerpos homogéneos, anti-eritrocito de carnero y anti-THF. Por clonación se pueden derivar líneas de células que sintetizan anticuerpos monoclonales usando inmunógenos no purificados. Esto hace que este sistema sea una herramienta útil en el estudio de complejos antígeno-anticuerpo.

Los anticuerpos así producidos son homogéneos químicamente, de una subclase definida de inmunoglobulina y una sola especificidad, se pueden producir grandes cantidades por lo que resulta un suero ideal para la tipificación. (35,36)

De los procedimientos para obtener antisueros el mejor, sin lugar a duda, es el de "Anticuerpos Monoclonales" a partir de híbridomas, ya que son altamente específicos, pero tienen la desventaja de lo complicado de su elaboración requiriéndose material y equipo costoso así como personal altamente calificado, razones que lo excluyen, por el momento, de un gran número de laboratorios de histocompatibilidad.

Las otras fuentes (polítrasfundidos, embarazadas, etc.) son más sencillas de obtener y tienen como ventaja que el método de caracterización de los anticuerpos es el mismo. Se recurre a todas simultáneamente con lo que se compensa su pobre rendimiento individual.

Oviamente estos antisueros se pueden obtener comercialmente, teniendo inconvenientes, como su alto costo, un limitado número de especificidades, especificidades ajenas a nuestra población, por lo que se prefiere su búsqueda y obtención en los laboratorios de histocompatibilidad complementado con el intercambio entre ellos. Existiendo para este fin centros mundiales de referencia donde se reúnen sueros del mundo para distribuirlos a los laboratorios de histocompatibilidad.

Por lo que nos damos cuenta que existe la necesidad de implementar un programa de búsqueda de estos antisueros, principalmente para continuar el Programa de Trasplante Renal; el cual se ha mantenido en este hospital, hasta el momento, con antisueros proporcionados por EUA, así como para otros estudios con EIA-enfermedad, estudios en población abierta, estudios familiares, etc., para lo que se necesita contar con :

- a) antisueros, todas las especificidades conocidas
- b) asegurar el abastecimiento de éstos,
- c) especificidades propias de nuestra población.

Siendo necesario para ello:

a) Valorar algunas fuentes de anticuerpos, principalmente inactivación por embarazo, politrasfundidos y trasplantados, por ser los de más fácil acceso en un laboratorio de histocompatibilidad, para así poder trabajar con la fuente más apropiada.

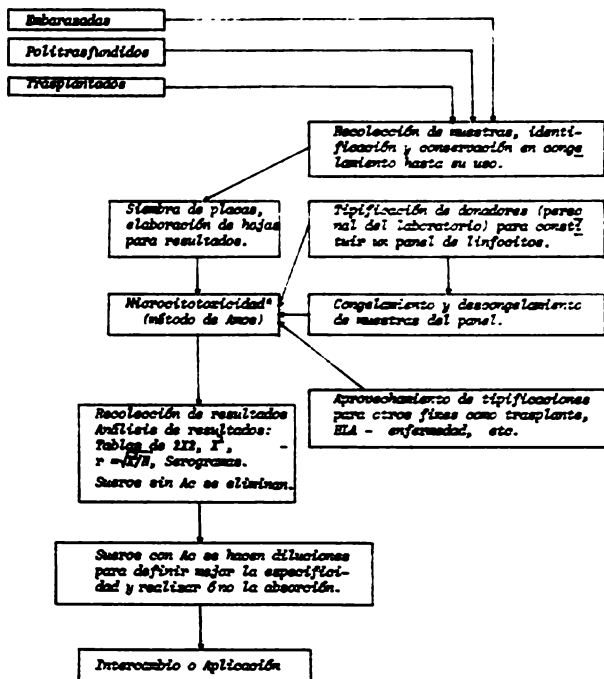
b) Elaborar un programa de búsqueda de anticuerpos, adaptado a nuestros recursos, que sea eficiente y de bajo costo, con respecto a el costo de los anticuerpos adquiridos comercialmente.

c) Implementar un banco de anticuerpos, para establecer contacto con los centros mundiales de referencia, y así contar con un número externo de anticuerpos, y posteriormente distribuirlos a otros hospitales del país interesados en el estudio de este sistema.

Convirtiéndose estos últimos en los objetivos de este trabajo.

**T R A B A J O   E X P E R I M E N T A L**

## DIAGRAMAS DE FLUJO SEGUIDO EN EL TRABAJO.



\* especificidades ABC, sobre linfocitos T.  
especificidades DE, sobre linfocitos B.

**Materia Biológica.**

**Mujeres Embarazadas:** se utilizaron los sueros de las señoras parturientas del servicio de Obstetricia del C.H. "20 de Noviembre", tomándose 30 ml/día de sangre durante su estancia ( $\pm$  3 días), obteniendo un rendimiento total de - aproximadamente 45 ml.

**Politransfundidos:** se obtuvieron a partir de pacientes de la Unidad de Hemodilisis del Hospital "20 de Noviembre", pacientes que acuden al servicio cada tercer día, y de los que cuando es requiere se puede practicar plasmaféresis, obteniéndose hasta 500 ml de suero.

**Trasplantados:** a la fecha viven 40 trasplantados que acuden regularmente a la Unidad de Trasplantes para control, obteniéndose muestras de ellos cuando existe sospecha de rechazo, tanto para establecer diagnóstico como para estudio - estudio. De ellos también es posible hacer plasmaféresis.

Los sueros se estudian por medio de la prueba de microcitotoxicidad - (ver métodos), los linfocitos que se usan en la prueba están ya tipificados, con los cuales se ha integrado un panel de referencia.

Para la búsqueda de anticuerpos contra antígenos de la serie A, B y C se pueden usar linfocitos periféricos, B y T, o solo linfocitos T. Para la detección de anticuerpos contra antígenos HLA-DR, es necesario realizar la prueba sobre linfocitos B; se emplea la técnica de microcitotoxicidad pero con algunas modificaciones.

**Reactivos .**

**1. Mezcla de Picoll-Bypaque.**

*Bypaque: se usa a una concentración de 33.9 %.*

*Picoll (PW 400 000) se usa al 9 % en agua destilada.*

*Mezcla: se mezcla 10 partes de Bypaque al 33.9 % con 24 partes de Picoll al 9 %. La densidad deberá ser de 1.076 ó 1.078.*

**2. Solución Salina Amortiguada (SSA).**

*Preparación comercial de un amortiguador de fosfatos pH 7.2.*

**3. Solución de ABT (2-aminoethylisothiocuronium bromide hydrobromide) 0.14 N.**

*Disolver 0.4 g de ABT en 10 ml. de agua destilada, ajustar a pH 8.0 con una solución de NaOH 5 N.*

**4. Solución Balanceada de Hawk.**

NaCl	- 8.0 g	$KH_2PO_4$	- 0.06 g
KCl	- 0.4 g	$Na_2HPO_4$	- 0.06 g
$CaCl_2$	- 0.14 g	$NaHCO_3$	- 0.28 g
$MgSO_4$	- 0.1 g	Rojo de Fenol	- 0.02 g
$MgCl_2$	- 0.1 g	Agua desionizada	- 1000 ml

**5. Diluyente de Complemento.**

$MgCl_2$  - 0.008 %

$CaCl_2$  - 0.008 %

Rojo de Fenol como indicador

Disolver en SSA.

**6. Preparación del Complemento.**

*El diluyente tiene como finalidad proporcionar iones Ca y Mg para hacer más efectiva la actividad del complemento.*

**A) Presentación Comercial.**



A un frasco de complemento liofilizado se le agrega 1 ml de agua destilada y 0.5 ml de diluyente.

B) Obtención de suero de conejo como fuente de complemento.

Se sangra a un conejo colocando los tubos sobre hielo, separar el suero, absorber con eritrocitos humanos del tipo A o AB. El suero absorbido se separa en alícuotas de 1 ml y se congela.

Antes de usarse se le añade 0.5 ml de diluyente.

7. Azul de Tripano 1 %.

Disolver 1 g de azul de tripano en 100 ml de agua destilada, filtrar.

8. EDTA 3 %.

3 g de EDTA dietico se disuelven en 334 y se ajusta el pH a 7.0 - 7.4 con NaOH concentrado.

9. Colorante para la Técnica de Microcitotoxicidad.

Mezclar 3 partes de azul de tripano al 1 % con 7 partes de EDTA al 3%.

10. Iodoacetamida 0.01%.

Disolver 0.01 g de iodoacetamida en 100 ml de solución de Hanks, guardar en frasco ámbar.

## Métodos .

### I. Purificación de Linfocitos . (39,40,41)

La purificación de linfocitos se realiza a partir de sangre desfibrinada donde se han eliminado las plaquetas, la separación de polímeros moleculares y eritrocitos se logra al centrifugar sobre una mezcla de Ficoll-Hypaque, aprovechando las diferentes densidades de las células entre sí; tanto los glóbulos rojos como los granulocitos se depositan en el fondo del tubo mientras que los linfocitos permanecen cercanos a la interfase entre el suero y la mezcla de separación.

- a) Se desfibrinan 10 ml de sangre fresca con perlas de vidrio, agitando sucesivamente a fin de evitar hemólisis.
- b) Se diluye la sangre con solución salina amortiguada (SSA) o con solución de Banks, volumen a volumen.
- c) Se agregan 6 ml de sangre diluida a un tubo que contenga la mezcla de Ficoll-Hypaque (aprox. 3 ml) cuidando de no alterar la interfase.
- d) Se centrifuga a 423 g por 30 minutos.
- e) Se separa el anillo de linfocitos con pipeta Pasteur.
- f) Se añade igual volumen de SSA, mezclar bien y centrifugar a 183 g por 10 min.
- g) Se lavan los linfocitos con SSA, 2 veces.
- h) Se resuspenden los linfocitos en un ml de SSA.
- i) Contar las células y ajustar a una concentración de  $4 \times 10^6$  células/ml .

### II. Separación de Linfocitos B y T .

Para poder detectar antígenos DE, moléculas de linfocitos B, es necesario purificarlos, dado que son de 10 a 30 % de los linfocitos totales; es conveniente partir de 10-12 millones de linfocitos periféricos para así obtener centi-

*dades suficientes.*

*La separación se puede realizar a partir de linfocitos frescos o congelados.*

*Método A.*

*Por formación de rosetas con eritrocitos de conejito sensibilizados con AET. (42)*

*Los linfocitos T poseen receptores que reaccionan con globulos rojos de conejito, formando agregados que se denominan "rosetas", el AET, agente reductor, modifica de alguna forma estos eritrocitos, con lo que se logra la formación de rosetas en poco tiempo y con una aceptable estabilidad ante cambios menores.*

*Una mezcla de linfocitos y eritrocitos de conejito tratados con AET, se centrifuga sobre una mezcla de Ficoll-Hypaque, quedando en la interfase los linfocitos B y en el fondo del tubo las rosetas, los linfocitos T se recuperan por lisis de los eritrocitos con suero humano fresco.*

*1. Eritrocitos AET (E<sub>AET</sub>).*

- a) Lavar tres veces los eritrocitos de conejito con SSA.*
- b) Incubar los eritrocitos con una solución de AET, 15 min a 37°C (un volumen de eritrocitos más cuatro volúmenes de AET).*
- c) Dejar enfriar, agregar SSA, centrifugar a 413 g por 15 minutos.*
- d) Lavar 5 veces los eritrocitos con SSA.*
- e) Resuspender el paquete en medio de cultivo y centrifugar.*
- f) Llevar los eritrocitos a una concentración del 2 % en medio de cultivo con -- 30 % de suero humano inactivado.*

*2. Separación de Linfocitos T y B.*

- a) Mezclar volúmenes iguales de una suspensión de linfocitos con  $4 \times 10^6$  células por mililitro y de eritrocitos de conejito tratados con AET al 2 %.*

- b) Colocar la mezcla sobre Ficoll-Hypaque, cuidando de no alterar la interfase incubar a 4°C por una hora.
- c) Centrifugar a 413 g por 30 minutos.
- d) Separar de la interfase los linfocitos B y lavar 2 veces con SSA, llevar a una concentración de  $4 \times 10^6$  células / mililitro.
- e) Lavar el botón de rosetas con solución salina.
- f) Agregar 1 ml de suero humano fresco, incubar a 37°C 5 minutos.
- g) Lavar los linfocitos T 2 veces con SSA, llevar a una concentración de  $4 \times 10^6$  células por mililitro.

#### Método B .

##### Separación de Linfocitos T y B por Columnas de Nylon. (41)

Los linfocitos B y los macrófagos tienen la propiedad de adherirse al nylon. Los linfocitos se colocan en una columna de nylon y se incuban a 37°C, - las células T se eluyen de la columna quedando adheridas las células B. Los linfocitos B se desprenden del nylon comprimiendo con los dedos la columna al mismo tiempo que se adiciona medio de cultivo.

- a) Se usan tubos de plástico de 12 a 14 cm de largo, se cierran por un extremo - en ángulo de 45° .
- b) Se pesa 0.01 g de fibra de nylon, se remoja en solución de Hawk y posteriormente se pasa al interior del tubo de plástico con un solo movimiento evitando formar burbujas y comprimiendo de tal forma que el relleno quede de 6 cm de longitud.
- c) Cortar la punta del extremo sellado haciendo un orificio de 2 mm de diámetro.
- d) Colocar verticalmente la columna y agregar 3 ml de medio de cultivo.
- e) Incubar a 37°C por 30 minutos (horizontalmente) .
- f) Colocar sobre la columna de 10 a 20 millones de linfocitos en 0.5 ml de medio

de cultivo, adicionando 0.3 ml mas de medio para evitar que el nylon se seque. Incubar a 37°C por 30 minutos. (horizontalmente) .

- g) Colocar la columna en forma vertical sobre tubos de 15 ml y eluir las células T goteando 15 ml de medio a traves de la columna. Repetir adicionando otros 15 ml de medio.
- h) Recobrar las células B en otro tubo agregando 5 ml de medio y comprimiendo con los dedos la columna mientras el medio va pasando.
- i) Lavar las células.
- j) Resuspender las células B en Iodoacetamida al 0.01 % en solución de Banks y ajustar a  $3 \times 10^6$  células/ml. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- k) Los linfocitos T se resuspenden en solución de Banks en una concentración de  $3 \times 10^6$  células /ml.

Nota.- El medio de cultivo se usa con 5 % de suero humano inactivado.

#### Determinación de la Pureza de Las Poblaciones Celulares.

Una vez separadas las células T y B es necesario comprobar la pureza de estas últimas, pues contaminaciones con células T pueden originar resultados falsos en la tipificación del locus DR. En el caso de la tipificación de antígenos de los Locus A, B y C sobre células T no se requiere esta precaución ya que las dos células comparten estos determinantes.

Se puede usar la técnica de formación de rosetas espontáneas o por medio de inmunoglobulina de superficie de los linfocitos B por fluorescencia en células poblaciones.

#### Formación de Rosetas Espontáneas.

- a) Se mezclan 0.25 ml de suspensión de linfocitos  $4 \times 10^6$  células/ml, más 0.25 ml de eritrocitos de conejo al 2 % .
- b) Incubar a 37°C por 15 minutos.

- c) Centrifugar a 150 g por dos minutos .
- d) Incubar a 4°C por 24 horas.
- e) Se resuspenden las células y se cuentan 100, tomando como rosetas al linfocito que tenga tres o más eritrocitos adheridos.

#### *Inmunoglobulina de Superficie. (43)*

- a) Se lavan 200 microlitros de la suspensión de linfocitos con una solución de suero bovino al 2 % en SSA (ab/saa), se resuspenden en 25 ul de ab/saa.
- b) Se mezcla con 25 ul de inmunoglobulina conjugada con fluoresceína. Incubar a 4°C por 30 minutos.
- c) Lavar las células 3 veces con ab/saa y resuspenderlas en un mínimo de volumen.
- d) Preparar montajes húmedos y contar 200 células al microscopio de fluorescencia.

#### *III. Técnica de Microcitotoxicidad . (39,40,41)*

Se utilizan placas de microprueba de Terasaki a las que se les coloca en cada pozo un microlitro de antisero específico y se mantienen a -20°C. Esto cuando se requiere tipificar los antígenos de los linfocitos o bien con suero - problema cuando se quiere determinar la presencia de anticuerpos citotóxicos y - su posible especificidad.

En este método se usan poblaciones purificadas de linfocitos, se incuban con los antiseros, y si tienen el antígeno contra el cual el anticuerpo está dirigido forman un complejo antígeno-anticuerpo que activa complemento fijándolo, lo que provoca una lisis parcial de las células pudiendo captar colorante vital. La valoración se realiza juzgando el porcentaje de células teñidas.

- a) Colocar un microlitro de suero en cada uno de los pozos de la placa.
- b) Colocar una gota de aceite mineral en cada pozo para evitar su deshidratación.  
Congelar a -20°C hasta su uso.
- c) Sacar las placas y dejar que se descongelen a temperatura ambiente.

- d) Añadir un microlitro de suspensión de linfocitos a cada pozo.
- e) Mezclar empleando un agitador de tubos Vortex.
- f) Incubar a temperatura ambiente 30 minutos.
- g) Colocar una gota de solución salina a cada pozo, dejar reposar 5 minutos, eliminar la solución salina y el exceso de suero.
- h) Añadir 4 microlitros de complemento de conejo con diligente, mezclar nuevamente aplicando la placa al agitador Vortex, e incubar a 37°C por 30 minutos.
- i) Añadir una gota de colorante reposar 15 minutos.
- j) Eliminar el exceso de colorante.
- k) Agregar una gota de solución salina a cada pozo y dejar reposar 10 minutos - antes de leer al microscopio.

La lectura se realiza a 125 aumentos, estimando el porcentaje de células teñidas utilizando la siguiente escala:

Células muertas (%)	Interpretación	Calificación
0 - 10	Negativo	1
20 - 30	Negativo	2
30 - 40	Dudoso	4
50 - 70	Positivo	6
80 - 100	Positivo	8
No legible	No Válido	0

La tipificación de los antígenos DR o la búsqueda de anticuerpos anti-ELA-DR, se realiza con linfocitos B, y la técnica de microcitotoxicidad con algunas modificaciones.

- a) Colocar un microlitro de la suspensión de linfocitos B en cada uno de los pozos de la placa que ya contiene los anticuerpos.

- b) Mezclar empleando el agitador Vortex. Dejar reposar a temperatura ambiente - por 60 minutos.
- c) Colocar una gota de SSA dejar reposar 5 minutos, eliminar el exceso de suero.
- d) Añadir 4 microlitros de complemento de conejo con diluyente. Mezclar empleando el agitador. Incubar a temperatura ambiente 120 minutos.
- e) Añadir una gota de colorante y dejar 5 minutos. Eliminar el exceso de colorante. Agregar una gota de SSA y leer al microscopio.
- f) Se usa la misma escala de lectura que para los antígenos de la serie A, B y C.

#### IV. Congelamiento de Linfocitos. (44,45)

Para la determinación de la especificidad de los antisueros es necesario contar con un panel de linfocitos perfectamente tipificados, y con el fin de mantenerlos por largo tiempo se recurre a su congelamiento utilizando como agente -- crioprotector el Dimetilsulfóxido (DMSO) . (46)

- a) Ajustar los linfocitos a una concentración de  $10 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo con 20 % de suero humano inactivado, colocar en hielo.
- b) Colocar en tubos de polietileno 0.5 ml de la suspensión de células.
- c) Preparar la mezcla congelante en hielo: 20 % de suero humano inactivado, 20 % de DMSO, 60 % de medio de cultivo.
- d) Agregar con agitación y sin retirar del hielo, 0.5 ml de la mezcla anterior a los linfocitos.
- e) Poner los tubos a una cámara de hielo seco, dejarlos hasta que estén congelados
- f) Colocar los tubos en el tanque de nitrógeno líquido.

#### Descongelamiento .

Las células congeladas se descongelan rápidamente ya que el DMSO es letal a los linfocitos a temperatura ambiente. Un vial de células se descongela -



parcialmente a 37°C en baño de agua, e inmediatamente a la solución descongelada se le agrega medio de cultivo para diluir el DMSO, Las primeras gotas se agregan lentamente para evitar el cambio brusco a las células.

- a) Sacar los tubos del tanque de nitrógeno líquido y pasar a hielo seco.
- b) Inmediatamente llevarlos a baño de agua a 37°C, agitando constantemente.
- c) Cuando quede un pequeño trozo de hielo, agregar poco a poco medio de cultivo frío y mezclar (medio de cultivo 5 % de suero 10 % de glucosa).
- d) Centrifugar a 183 g por 10 minutos.
- e) Resuspender los linfocitos y lavarlos nuevamente con medio de cultivo.
- f) Resuspender las células en 0.5 ml de medio de cultivo, contar y ajustar a la concentración deseada.

#### Viabilidad.

Debido a que la microrretotoxicidad tienen como condición el empleo de células vivas es necesario chequear éstas con alguna prueba simple. Para diferenciar células vivas de muertas se usa un colorante vital, el azul de tripano.

- a) Mezclar una gota de azul de tripano al 10 % con una gota de la suspensión de linfocitos.
- b) Colocar una gota de la mezcla sobre un porta objetos, colocar un cubre objetos. Leer usando el objetivo seco fuerte. Las células muertas se tiñen de azul.
- c) Contar 100 células, calcular el porcentaje de viabilidad.

#### V. Panel de Linfocitos .

El conjunto de células (panel), que se va a usar para la identificación de anticuerpos anti-HLA debe constar cuando menos de 30 células diferentes, para tener por lo menos una representación de cada una de las especificidades antigé-

nicas conocidas . (46)

Mientras mas antígenos repetidos existen (un número mayor de células), se podrá realizar una mejor identificación de los anticuerpos encontrados.

Las células que formarán el panel deben pertenecer al mismo grupo racial al que pertenece la población de sueros que se van a estudiar, para evitar la presencia de antígenos diferentes a los anticuerpos que puedan existir en -- los sueros.

Se pueden incluir células de otros grupos étnicos para buscar especificidades poco frecuentes o raras en esa población.

También es posible formar dos tipos de paneles, uno en el que los antígenos estén perfectamente identificados, o sea con haplotipos completos, para poder reconocer los anticuerpos presentes en los sueros. Las células de las -- que no se conocen todos sus antígenos o sea que tienen algún blanco forman el -- otro conjunto de células, y así se detectaran nuevas especificidades.

Las células se pueden congelar o preparar el día que se requieran.

#### VI. Absorción de Antisueros . (47)

Para hacer una buena tipificación es necesario contar con sueros monoespecificos. Es común que los sueros que se han probado no están dirigidos contra un solo antígeno, por lo que es necesario realizar una absorción de los antígenos que no se desean (o que no se han perdido por dilución).

La proporción de suero y células para la absorción difiere de acuerdo al sistema que se esta probando, por lo que se necesita determinar la cantidad -- por un estudio preliminar.

El antisuero se absorbe con diferentes cantidades de antígeno no deseado (plaquetas en el caso de que se desee absorber antígenos de la serie ABC, y -- dejar sólo anticuerpos contra antígenos DE o bien linfocitos adscuados si el an-

titulo que se va a absorber es de la serie ABC pero dejando otro de la misma serie), despues se mide el titulo de anticuerpos que quedan en el suero. - Los resultados se grafican de acuerdo a la ecuación de Von Krogh, modificación de Ref.

Así la cantidad exacta de antígeno no deseado se puede absorber en cantidad suficiente para no ser detectado por el método que se está usando.

Al suero que no está absorbido, se le designa una potencia relativa (P), igual al 100 %. La potencia relativa del suero absorbido, se calcula despues de la absorción por:

$$P = \frac{\text{Título del suero no absorbido}}{\text{Título del suero absorbido}} \times 100$$

Se grafica la cantidad de antígeno (plaquetas o linfocitos) usada por mililitro de suero para la absorción, contra la relación antígeno unido  $--- (100 - P) / \text{antígeno libre } (P)$  durante la absorción o sea  $(100 - P)/P$  en papel logarítmico, obteniendo una línea recta.

Para calcular la cantidad de antígeno requerido para obtener el grado de absorción deseado, se puede extrapolar de la gráfica.(47)

RESULTADOS  
Y  
ANALISIS DE RESULTADOS

## RESULTADOS .

Cada uno de los sueros obtenidos se probó contra un panel aproximadamente de 60 células (por medio de la prueba de microcitotoxicidad con linfocitos T y con linfocitos B por separado), primeramente para detectar aquellos que tienen anticuerpos citotóxicos, encontrándose los siguientes resultados:

Tabla I  
 % de Sueros Citotóxicos Encontrados

Fuente de Sueros	N	Sueros con anticuerpos citotóxicos	
		N	%
Trasplantados	9	1	11.1
Politransfundidos	46	14	30.43
Embarazadas	47	8	17.0

Tabla II

Sueros citotóxicos contra células T y B (posibles anticuerpos anti HLA-A,B,C) y sueros citotóxicos solo contra células B (posible anti-DR)

Fuente de sueros	Sueros citotóxicos contra células T y B		Sueros citotóxicos solo contra células B	
	N	%	N	%
Trasplantados	1	100	-	-
Politransfundidos	14	100	-	-
Embarazadas	7	87.5	1	14.3

Para la determinación de la especificidad de los sueros citotóxicos se recurre a la comparación de reactividad entre los sueros problema y sueros conocidos (de referencia) provenientes del Instituto Nacional de la Salud de - EHA y del Centro Regional de la Cruz Roja del Noroeste, Boston EHA).

Se requiere de tablas de contingencia de 2 X 2, y del cálculo de los parámetros estadísticos ji cuadrada ( $\chi^2$ ) y coeficiente de correlación (r), dependiendo de los valores de éstos, confirmamos a) especificidad del antisuero, b) presencia de otros anticuerpos y c) grado de reacciones cruzadas.

Prueba de  $\chi^2$  y Cálculo de r.

Tablas de Contingencia de 2 X 2.

Estas tablas se hacen para cada uno de los antígenos de los que se sospecha hay anticuerpos en el suero, comparando los resultados obtenidos en el panel de linfocitos, tanto del suero problema como de un antisuero de referencia, - el cual generalmente proviene de un centro de referencia, como el NIE, y la Cruz Roja de Boston.

Las tablas de 2 X 2 consisten en:

	Suero de Referencia		
	+	-	
Suero Problema	+	b	a(+ +) b(+ -) c(- +) d(- -)
Resultados	-	d	
	-	+	E = a + b + c + d

donde (a) es el número de reacciones positivas en ambos sueros, lo que nos indica que los dos sueros reconocen al mismo antígeno, (b) es el número de reacciones positivas en el suero problema pero negativas en el suero de referencia, o sea - que el suero problema está reconociendo un antígeno que no reconoce el suero de referencia o una posible reacción cruzada, (c) es el número de pruebas positivas en el suero de referencia y negativas en el suero problema, o sea que el suero -

problema no reconoce totalmente al antígeno que pensamos y (d) nos indica el número de reacciones negativas en ambos sueros.

De estos datos calculamos el valor de  $X^2$  y el de  $r$ , para estimar el grado de asociación entre los dos antígenos.

$$X^2 = \frac{(ad - bc)^2 N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

La prueba de  $X^2$  establece las hipótesis de dependencia ( $H_1$ ) o de independencia ( $H_0$ ) que se aceptan o se descartan dependiendo del valor que obtenemos al calcularla, en base a un valor ya establecido que varía de acuerdo a los grados de libertad ( $gl$ ) y niveles de significancia ( $\alpha$ ) que se requieren.

En este caso se comparan dos acontecimientos (reacciones de dos sueros) en los que se quiere probar una hipótesis de dependencia ( $H_1$ ), el valor límite de  $X^2$  es de 3.83 (para  $\alpha = 0.05$  y  $gl = 1$ ), valores superiores a éste se acepta  $H_1$ , valores inferiores la rechaza, y se acepta  $H_0$ .

El coeficiente de correlación se ha usado para colocar a los antígenos en grupos de alta correlación positiva así como para detectar las posibles relaciones genéticas de los antígenos.

$$r = \sqrt{\frac{X^2}{N}}$$

Los valores de  $r$  se encuentran entre 0 y 1, un valor de cero nos indica caracteres independientes y 1 con absoluta identidad.

Los valores críticos de " $r$ ", para seleccionar los sueros están sujetos a mucha diversidad, en los primeros trabajos un valor de  $r=0.32$  se consideró significativo aunque muchos de los sueros no fueron monoespecíficos. Ahora se toman valores para " $r$ " de 0.8 o más alto aunque los valores de 0.5 se pueden considerar significativos. (28)

TABLE III  
ESPECIFICIDADES HLA ENCONTRADAS.

Suero	Especificidad	Asociación con Suero/Exp HLA						
		++ (a)	+ - (b)	- + (c)	-- (d)	$\chi^2$	r	P
<b>Transplantados</b>								
No. 8 (SVN)	HLA-B7	8	13	0	48	18.64	0.48	87
	HLA-B40	7	12	6	48	8.48	0.31	87
	HLA-B12	4	16	0	48	10.74	0.40	87
	HLA-(B7, B3, 40)	17	3	5	43	38.53	0.75	87
<b>Faltrasplandidos</b>								
No. 61 (BLCR)	HLA-A9	16	0	3	39	48.19	0.91	57
No. 35 (OCL)	HLA-Bw36	19	14	0	37	22.74	0.61	60
	HLA-B15	15	18	3	34	8.34	0.37	60
	HLA-B5	5	28	0	37	4.48	0.27	60
	HLA-(Bw36, B5)	31	3	3	34	47.48	0.83	60
No. 25 (RRB)	HLA-B12	3	7	1	59	12.77	0.42	70
	HLA-Bw38	3	7	2	58	8.78	0.36	70
	HLA-Bw37	3	8	0	60	13.35	0.43	70
	HLA-(B12, B36, B37)	8	3	3	57	36.40	0.72	70
No. 24 (BNP)	HLA-A9	18	19	0	30	14.32	0.49	57
	HLA-A3	4	33	0	30	2.3	0.20	57
	HLA-(A9, A3)	31	16	0	30	17.97	0.66	57
	Blanco							
No. 27 (MLP)	HLA-B5	3	4	3	51	12.38	0.45	60
	Blanco							
No. 61 (MGS)	HLA-A23	7	18	2	33	5.68	0.30	60
	Blanco							
No. 30 (PRV)	HLA-A9	18	19	0	30	14.32	0.49	57
	HLA-B27	6	31	0	30	3.62	0.25	57
	HLA-(A9, B27)	22	15	0	30	19.36	0.66	57
	Blanco							
No. 31 (VPV)	HLA-A2	31	18	5	16	5.11	0.28	60
	HLA-B12	6	33	0	37	3.58	0.24	60
	HLA-(A2, B12)	36	13	5	16	10.03	0.40	60
	Blanco							
No. 48 (RQJ)	HLA-Bw33	8	31	0	27	4.97	0.28	60
	HLA-A23	8	31	1	20	2.65	0.21	60
	HLA-(Bw33, A23)	15	34	1	20	7.93	0.36	60
	Blanco							

(Continúa)





*Representación por Medio de Serogramas .*

Las tablas de contingencia de 2 X 2 Las podemos representar gráficamente (serogramas) donde se puede apreciar más claramente las diferencias que puedan existir en las reacciones individuales de los sueros.

Así podemos observar en que proporción los resultados son concordantes:  $(a + d)/N$ , en que proporción son discordantes:  $(b + c)/N$ , cuantos de los resultados concordantes son positivos y cuantos negativos:  $a$  y  $d$ , cuantos resultados discordantes corresponden a cada suero  $b$  y  $c$ .

Se puede también calcular los coeficientes,  $S_m$ , que expresa el valor proporcional de las reacciones iguales  $a/N + d/N$ ,  $S_n$ , es el coeficiente que expresa la proporción de las reacciones igualmente negativas  $d/N$ .

La relación de frecuencia (RF) forma parte de la evaluación cualitativa, en términos de la proporción de la fuerza de la reacción sobre el total de reacciones positivas.

$$RF_1 = a/N + c/N = (a + c)/N \quad \text{Suero conocido}$$

$$RF_2 = a/N + b/N = (a + b)/N \quad \text{Suero problema}$$

Por medio del cálculo de los valores de  $S_m$  y  $RF$  permite la representación gráfica de los sueros y se puede ayudar a clasificarlos como:

1. Muestras de Identidad .

Estas no presentan problemas de reconocimiento. Un valor de 1 para  $S_m$  indica que hay una reacción idéntica de la muestra.

2. Muestra de Inclusión .

Cuando todas las reacciones positivas de un suero caen dentro del alcance de un segundo suero, el primero nunca es positivo cuando el segundo es negativo. Para una inclusión los valores  $a/N$  y  $RF$  son iguales,  $x$  indica el

*suero incluido.*

*3. Muestra de Exclusión .*

*Es una muestra donde no hay mutua superposición de las reacciones positivas, pero algunas reacciones son igualmente negativas,  $S_n = S_m$  .*

**TABLA IV**

*Clasificación de los sueros como muestras de inclusión, ó de identidad dependiendo de los valores de:  $\bar{S}_{em}$ ,  $S_n$ ,  $R_{FP}$ , y  $R_{FR}$ .*

Suero Problema	Posible Especificidad	a	b	c	Asociación de Suero			Suero/Rep.			HLA a/B	Muestra
					d	N	$S_n$	$\bar{S}_{em}$	$R_{FP}$	$R_{FR}$		
No. 6 (SYN)	HLA-B7	6	13	0	48	67	0.71	0.80	0.88	0.089	0.089	Inclusión
	HLA-B40	7	12	5	43	67	0.64	0.74	0.88	0.179	0.10	Inclusión
	HLA-B12	4	15	0	48	67	0.71	0.77	0.88	0.059	0.059	Inclusión
	HLA-(B7, 12, 40)	17	2	5	43	67	0.64	0.89	0.88	0.329	0.25	"Identidad"
No. 41 (BLCR)	HLA-A9	16	0	2	39	57	0.88	0.98	0.88	0.31	0.28	Inclusión
No. 35 (GGL)	HLA-Bu35	19	14	0	27	60	0.45	0.78	0.65	0.30	0.31	Inclusión
	HLA-B15	15	18	3	24	60	0.40	0.65	0.65	0.30	0.25	Inclusión
	HLA-B5	5	28	0	27	60	0.45	0.63	0.65	0.08	0.08	Inclusión
	HLA-(Bu35, 15, 5)	31	2	3	24	60	0.40	0.91	0.65	0.68	0.51	Identidad
No. 25 (RRB)	HLA-B12	3	7	1	59	70	0.84	0.88	0.14	0.057	0.048	Inclusión
	HLA-Bu39	3	7	2	59	70	0.83	0.87	0.14	0.071	0.048	Inclusión
	HLA-Bu31	2	8	0	60	70	0.85	0.88	0.14	0.029	0.028	Inclusión
	HLA-(B12, u38, u31)	8	2	3	57	70	0.81	0.92	0.14	0.157	0.110	Identidad
No. 24 (NRP)	HLA-A9	18	19	0	20	57	0.35	0.68	0.64	0.315	0.315	Inclusión
	HLA-A3	4	33	0	20	57	0.35	0.42	0.64	0.070	0.070	Inclusión
	HLA-(A9, 3)	21	16	0	20	57	0.35	0.71	0.64	0.388	0.388	Inclusión
	Blanco											
No. 27 (NEP)	HLA-B5 Blanco	3	4	2	51	60	0.85	0.9	0.11	0.083	0.05	"Inclusión"
No. 61 (NGS)	HLA-A28 Blanco	7	18	2	33	60	0.55	0.68	0.41	0.16	0.108	Inclusión
No. 30 (PRV)	HLA-A9	18	19	0	20	57	0.35	0.68	0.64	0.315	0.315	Inclusión
	HLA-F27	6	31	0	20	57	0.35	0.45	0.64	0.105	0.105	Inclusión
	HLA-(A9, B27) Blanco	22	15	0	20	57	0.35	0.73	0.64	0.385	0.385	Inclusión

(continua)

Suero Problema	Posible Especificidad	Asociación					RIS de Suero/Exp. HLA					Muestra
		a	b	c	d	N	En	Sum	RPr	RPr	a/N	
No. 31 (VPV)	HLA-A2	21	18	5	18	60	0.28	0.61	0.65	0.43	0.25	Inclusión
	HLA-B12	8	33	0	21	60	0.35	0.45	0.65	0.10	0.10	Inclusión
	HLA-(A2, B12)	29	18	5	18	60	0.28	0.77	0.65	0.61	0.43	Inclusión
	Blanco											
No. 48 (RPJJ)	HLA-A23	8	31	0	21	60	0.35	0.48	0.65	0.13	0.13	Inclusión
	HLA-A28	8	31	1	20	60	0.33	0.48	0.65	0.15	0.13	Inclusión
	HLA-(A23, 28)	16	25	1	20	60	0.33	0.58	0.65	0.28	0.25	Inclusión
	Blanco											
No. 68 (PRT)	HLA-A9	15	19	3	23	60	0.38	0.63	0.68	0.30	0.25	Inclusión
No. 32 (TV) <sup>1</sup>	Blanco											
No. 33 (R00N)	Blanco											
No. 81 (AVB)	Blanco											
No. 100 (VT)	Blanco											
No. 8 (CSE)	HLA-DR6	4	25	0	16	44	0.36	0.43	0.65	0.09	0.09	Inclusión
	HLA-DR4	19	10	4	11	44	0.25	0.68	0.65	0.52	0.43	Inclusión
	HLA-(DR6, DR4)	23	8	4	11	44	0.25	0.77	0.65	0.61	0.52	"Identidad"
No. 18 (RGN)	HLA-A2	9	0	0	8	17	0.68	1.0	0.52	0.52	0.52	Identidad
No. 28 (LNN)	HLA-A2	9	3	0	5	17	0.29	0.52	0.78	0.52	0.52	Inclusión
	HLA-B40	4	8	0	5	17	0.29	0.52	0.78	0.23	0.23	Inclusión
	HLA-(A2, B40)	11	1	0	5	17	0.29	0.84	0.78	0.64	0.64	Identidad

RPr = RP del suero de referencia

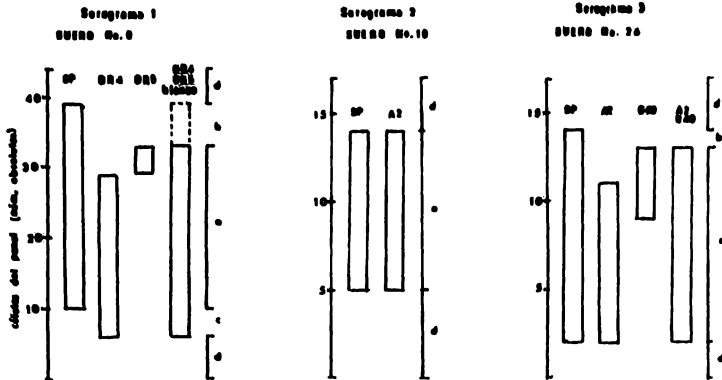
RPr = RP del suero problema.

Inclusión: a/N = RPr

x = suero incluido

Identidad: Sum 1

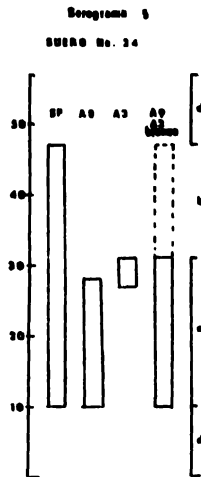
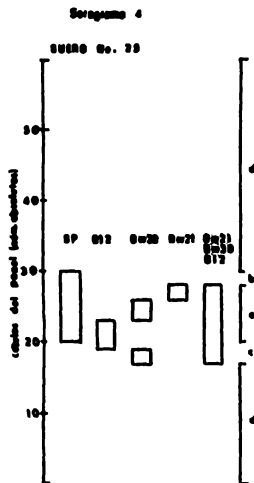
REPRESENTACION GRAFICA DE LAS REACCIONES INDIVIDUALES DE LOS SUEROS



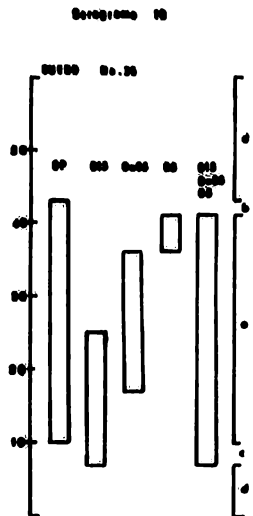
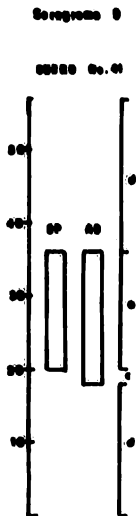
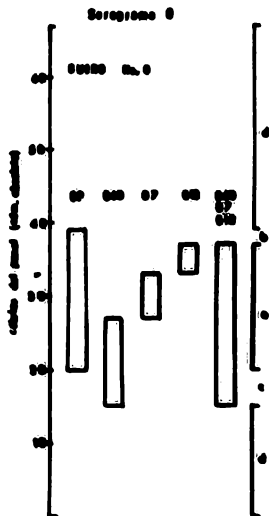
SP= Suero Problema

- a= Reacciones positivas en el suero problema y suero de referencia
- b= Reacciones positivas en el suero problema y negativas en el suero de referencia
- c= Reacciones positivas en el suero de referencia y negativas en el suero problema
- d= Reacciones igualmente negativas

(Continua)



(Continúa)

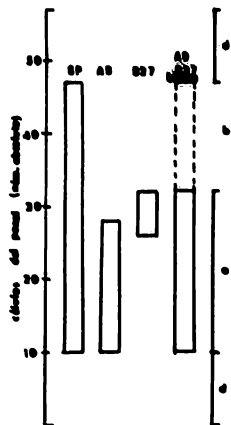


(Continúa)



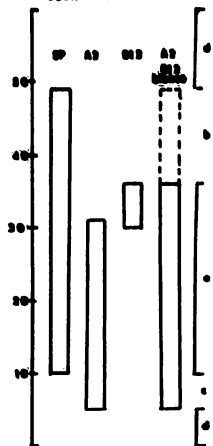
Seriegrano 11

SUERO No. 30



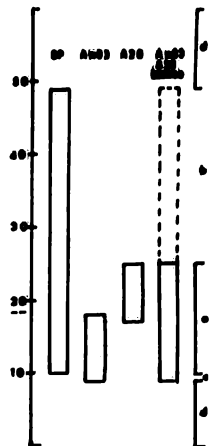
Seriegrano 12

SUERO No. 31



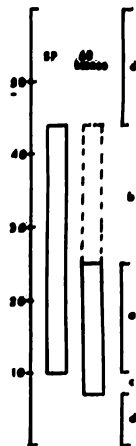
Seriegrano 13

SUERO No. 40



Seriegrano 14

SUERO No. 60



Como se ha mencionado los serogramas son la representación gráfica - de las reacciones de los sueros sobre un panel de células, comparando la reactividad del suero problema con la del suero conocido sobre las mismas células.

El número de reacciones positivas se representa por medio de un rectángulo y las negativas están indicadas por el espacio restante. El rectángulo de la izquierda representa las reacciones positivas del suero problema, enseguida se encuentran los rectángulos que representan las reacciones de los sueros conocidos. El último rectángulo indica las reacciones de los sueros conocidos en conjunto, o sea nos indica que el suero problema es polis específico, reacciona con todas estas especificidades.

En algunos casos aparece una parte del rectángulo en línea punteada, - lo que indica que esta parte de reacciones se desconoce o sea que no presenta una reactividad similar con ninguno de los sueros conocidos con que se cuenta.

En el caso de sueros monoespecíficos (serogramas 2 y 9) se encuentran solo dos rectángulos, el del suero problema y el del suero de referencia, indicando la reactividad igual o casi igual.

Después del análisis estadístico y la representación gráfica de las reacciones de los sueros observamos que en concreto encontramos tres tipos de sueros.

El primer grupo está representado por los sueros monoespecíficos, muestras de identidad (sueros No. 41 y 18) cuyos datos son fáciles de analizar, así como fácilmente se visualiza el tipo de reacción. Estos sueros son útiles para la tipificación, y en él para cualquier estudio relacionado con el sistema HLA.

Se encontraron, anticuerpos contra más de una especificidad en el mismo suero, que pueden clasificarse de la siguiente manera:

- a) Que el anticuerpo sea una mezcla de anticuerpos contra más de una es-

pecificidad, con títulos semejantes (entendiéndose por título la concentración del antisuero).

b) Que el antisuero sea una mezcla como la anterior pero con títulos diferentes.

c) Que los antígenos al poseer dentro de su estructura porciones semejantes son reconocidos por el mismo antisuero aunque la reacción se lleve a cabo con diferente intensidad (reacciones cruzadas).

La reactividad cruzada es una de las características que presentan frecuentemente los antígenos HLA, formando grupos de antígenos parecidos estructuralmente llamados Gco. (38) En la Tabla V se representan las reacciones serológicas cruzadas de los antígenos HLA. Existen especificidades subtipicas y supertipicas, las especificidades supertipicas comprenden dos o más especificidades subtipicas, por ejemplo el HLA-A9 es la especificidad supertipica que comprende al Au23 y al Au24, en esta tabla las especificidades subtipicas estan indicadas entre parentesis.

La coexistencia de anticuerpos contra más de una especificidad puede no interferir en el empleo del antisuero con fines de tipificación, solamente sería necesario el empleo de otros antisueros para definir el fenotipo de la célula a tipificar, en otras ocasiones si la interferencia impide el empleo del suero tal cual, sera necesario diluir el antisuero (cuando los títulos sean diferentes) o bien absorber a éste con linfocitos apropiados.

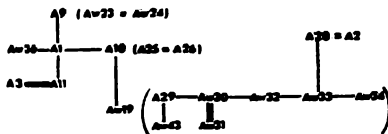
En el caso en que se tenga un anticuerpo contra una especificidad supertipica, se puede absorber con linfocitos que tengan una de las especificidades subtipicas, para que así quede la otra.

El tercer tipo lo comprenden los sueros "blanco", cuya reactividad no coincide con alguno de los sueros de referencia o que solo parte de esta reactividad

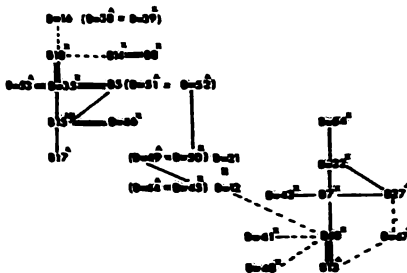
Tabla V

REACCIONES CRUZADAS<sup>(56)</sup>  
(adaptado de Joyney and Wolf)

## Antígenos. Lepra A.



## Antígenos. Lepra B.



- (a) Fuerte reacción cruzada  
 (-) Reacción cruzada en tuberculo  
 (-) Reacción cruzada fraccional  
 (a) Índice de presencia del antígeno B<sub>20</sub>  
 (a) Índice de presencia del antígeno B<sub>21</sub>

vidad coincide; esto puede deberse a :

a) No se detecta la especificidad por la gran cantidad de blancos — (antígenos no determinados) presentes en las células que componen el panel, debido a que no se cuentan con todas las especificidades conocidas.

b) No existencia de estos antisueros, una nueva especificidad, lo que no es poco probable ya que la fuente de antisueros de referencia es EEA, población genéticamente diferente a la muestra.

Estos sueros deben probarse, contra un panel de células, perfectamente tipificado, y con todas las especificidades conocidas, y contra uno que tenga blancos (que no exista el antisuero para detectarlo), para poder así determinar si se trata de una nueva especificidad o no.

Existen otros sueros a los que se les ha clasificado como dudosos, ya que reaccionaron con muy pocas células, no pudiendo concluir si existe o no algún anticuerpo presente, ya que la reacción pudiera ser contra alguna especificidad "rara" que se presenta en muy pocas ocasiones o puede ser una mala tipificación (error de técnica).

Estos sueros deben seguir probándose para confirmar o descartar, la presencia de anticuerpos citotóxicos.

**COMENTARIOS Y CONCLUSIONES**

Comentarios.

La caracterización de antisueros, es algo, que ha ocupado a muchos estudiosos del sistema HLA. Después de su descripción, el siguiente paso era poder identificarlos, y debido a que es un sistema altamente polimórfico, la caracterización de estos antígenos se fue complicando conforme aparecían más especificidades, siendo necesario idear métodos adecuados para la determinación precisa de los antisueros encontrados.

Se han desarrollado numerosos métodos como el de Análisis por Matrices de Michay en 1967, el de Análisis de Referencia Booleana de Michay y Terascaki en 1971, el de Análisis Discriminante de Piazza en 1973, y el de Análisis de Inclusión Estadística (INCLAS) de Piazza en 1975. Estos métodos son bastante finos y se puede sacar gran información de ellos, teniendo inconvenientes de trabajo, ya que con gran cantidad de datos los que se manejan, requiriéndose de computadoras.

Los métodos de  $X^2$  y "r", no son tan finos, pero para nuestros fines son suficientes ya que sólo hacemos una comparación con sueros ya conocidos, esto se complicaría y tal vez necesitaríamos de otros métodos, si quisieramos caracterizar una nueva especificidad o una subdivisión o una variedad de alguna especificidad conocida. Además este tipo de análisis ( $X^2$ , r) es el que se pide en la mayoría de los centros de referencia, con cada suero que se envía.

De los sueros encontrados de los que se conoce todas las especificidades (sueros que no tienen algún blanco), se pueden probar por dilución para saber cual especificidad tiene mayor título, esto se hace por la misma técnica de microtitulación y solo se busca la última dilución en la que se encuentra una mortandad del 80-100 % de las células probadas. Los títulos se dan sólo de

ben presentar uno de los antígenos contra los cuales hay anticuerpos en el suero. Por ejemplo en el caso del suero No. 28 (A2, B40) se prueba a varias diluciones, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, con células que solo tengan el antígeno A2, y con otras que solo tengan el B40, y se observa cual es el anticuerpo que tenga mayor título y el suero se usa a esa dilución, como monoespecífico.

De los sueros obtenidos solo algunos se probaron por dilución, observando que el suero no. 41 (A9) tiene un título de 1:8, el suero No. 35 (B35, 15,5) aparentemente a una dilución 1:4 solo reconoce al B35 (este suero es muy interesante ya que parece ser una variedad del B35 de Los candidatos) el anti suero No. 25 (B12,u38,u31) aparentemente es monoespecífico para el B21 a una dilución de 1:12.

De hecho estos sueros deben seguir probándose para confirmar estos resultados.

La absorción de sueros se realiza incubando a 37°C 1 ml de suero con la cantidad adecuada del antígeno que se desea eliminar (determinada por el método de Reif). Puesto que se trata de antígenos celulares, se presenta el problema de la adquisición de éstos ya que se requiere gran cantidad de células y además con determinados antígenos lo que complica más su obtención. (por ejemplo de plaquetas se requiere aproximadamente 3 ml por ml de suero a absorber; 1 ml de paquete plaquetario se obtiene de 7 unidades de sangre).

Los sueros polispecíficos o sea aquellos que reaccionan con todo o con casi todo, y que no se puede definir una especificidad, no se descartan del todo, pues dado que los linfocitos presentan una variedad de antígenos en su superficie, bien se pueda tener algún anticuerpo, no contra antígenos del sistema HLA, sino contra algún otro antígeno de los linfocitos, estos sueros son por supuesto candidatos a otro tipo de estudios.

Los sueros anti-DR, deben absorberse con plaquetas (puesto que éstas



solo tienen antígenos HLA-ABC) para que el suero quede más puro, pero ya que es difícil conseguir tal cantidad de plaquetas, se han ideado otros métodos para evitar esta absorción, como el del anti  $\mu_2$ -microglobulina. En este método se incuban los linfocitos a tipificar con un antisuero de pavo anti  $\mu_2$ -microglobulina, para bloquear a los antígenos HLA-ABC, ya que el antisuero de pavo no fija complemento de conejo (es el complemento usado en la técnica de microcitotoxicidad) después se realiza la tipificación de los antígenos DR como normalmente se hace.

Como se puede notar, el campo de los anticuerpos anti HLA, es bastante amplio y deja aun mucho que estudiar y que conocer de ellos, en el los puntos anteriores son solo algunos que ayudarían a complementar este trabajo, que dando aun otros aspectos que cubrir relacionados con este sistema antigénico, del cual realmente aun se sabe poco.

*Conclusiones .*

*De las diferentes fuentes analizadas tenemos:*

<i>Punto de Suero</i>	<i>N</i>	<i>% Ao</i>	<i>% Ao útiles*</i>
<i>Beberrazadas</i>	<i>47</i>	<i>17.0</i>	<i>4.16</i>
<i>Poli-trasfundidos</i>	<i>46</i>	<i>30.43</i>	<i>6.53</i>
<i>Trasplantados</i>	<i>9</i>	<i>11.1</i>	<i>11.1</i>

*\*refiriéndose a sueros totalmente identificados útiles para el intercambio o para la tipificación.*

*Teóricamente la mejor fuente debería ser la de mujeres embarazadas, ya que solamente se enfrentan a un haplotipo diferente (el del padre), siendo más probable encontrar sueros monoespecíficos, pero nos encontramos con la falta de cooperación tanto de las parturientas como de los obstetras, por lo que la cantidad de suero que se puede obtener es reducida, y no suficiente para el intercambio ( para intercambio con el H1B se requiere de 160 ml de suero) siendo estos solo para uso local.*

*Debido a que en las personas, que reciben múltiples transfusiones, esto se toma en cuenta el grupo sanguíneo y Rh, se esperaba que estos sueros fueran - poliespecíficos, no obstante se obtuvieron buenos resultados, la explicación es la probabilidad de que la persona reciba varias veces el mismo antígeno al año, esto depende de las frecuencias de los antígenos en la población y del genotipo de la persona. Por lo tanto es una buena fuente, porque de ellos y en especial de los pacientes de la Unidad de Hemodilisis existe cooperación para llevar a cabo plasmaféresis, obteniendo así una buena cantidad de suero, permitiendo el intercambio, además se obtienen datos que pudieron ser útiles, ya que la mayor parte de ellos está en espera de trasplante.*

Se anticipaba que los sueros obtenidos de las personas trasplantadas fueran buenos, ya que estos son inmunizados por un mínimo de antígenos (los antígenos del trasplante) no siendo así ya que los anticuerpos fueron poco frecuentes y polispecíficos. Sin embargo esta fuente no se descarta ya que se obtienen buenos rendimientos.

En vista de que todas las fuentes tienen ventajas y desventajas, y no son del todo eficientes, proponemos, analizar todas a la vez, para aumentar la eficiencia del programa de búsqueda de anticuerpos.

Con los sueros:

Suero	Especificidad	r	Cantidad
No. 41	HLA - A9	0.9	80 ml
No. 18	HLA - A3	1.0	35 ml
No. 35	HLA - (B28,15,5)	0.82	500 ml
No. 26	HLA - (A3,340)	0.87	50 ml

se establece el banco de antisueros, que se incrementará con los sueros recibidos del HIN, y servirán para donación a otros centros nacionales interesados en el estudio del sistema HLA, como el Instituto Nacional de Nutrición.

Puesto que se montó la metodología, se exploraron posibilidades (fuentes) y se realizó el trabajo, se estableció un programa de búsqueda de antisueros anti HLA, de acuerdo a los recursos de este laboratorio.

Tomando en cuenta sólo los antisueros útiles obtenidos en este programa, y el costo de éste (aprox. \$ 4 000.00) y comparado con el precio de 0.5 ml de un antisuero (\$ 1 388.00), el costo de los antisueros obtenidos es de \$6.20.

Por lo que creemos que realmente es un programa eficiente y de bajo costo, que queda implementado en este laboratorio, incrementándose así el banco de antisueros y obviamente las posibilidades de cualquier estudio relacionado con el sistema HLA.

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

## Bibliografía.

1. Petrov. R.V. Una Conferencia sobre la Nueva Inmunología. Ed. Mir Moscú 1978.
2. Cunningham Bruce A. The Structure and Function of Histocompatibility Antigens American Scientific.
3. Bach F. H., Goss J.E., Alter B.J., Soudel P.M. and Bach N.L. Past, Present, -- and Future Aspects of Histocompatibility. Trans. Proc. 11:1 1207-11, 1979.
4. Lamm L.U. and Peterson G.B. The Genetic Linkage Group. Trans. Proc. 11:4 -- 1692-98. 1979.
5. Benacerraf B., Unanue E.R. Textbook of Immunology Ed. The Williams Wilkins Company, Baltimore, 1979.
6. Fersterstein B., Dímant P. Inmunogenética Fundamental, Biología y Aplicaciones Clínicas de HLA y H-2. Ed. Manual Moderno, México D.F. 1981.
7. Thorsby E. The Human Major Histocompatibility Complex HLA: Some Recent Developments. Trans Proc. 11:1, 616-23. 1979
8. Broadwin Moor. HLA. Mayo Clin Proc. 54 346-53, 1979.
9. Histocompatibility Testing 1980. Editor P. Terasaki, Elsevier/North-Holland and U. of Calif. Publ.
10. Thomson N., Morlins N., Plats D. HLA and Disease. Trans Proc. 11:1 633-37 - 1979.
11. Schaller J.G. and Omer G.S. The Histocompatibility System and Human Disease J. Pediatrics. 88:6, 913-22, 1976.
12. Amos Bernard, Paris E.J. An Introduction to HLA and Disease and Disease - Susceptibility. (en prensa).
13. Adgranti F. Studies on Biosynthesis, Assembly and Expression of Human Major Transplantation Antigens, Eur. J. Biochem. 103:1, 197-207, 1980.
14. Ploest C., Bevilard J.P. Characterization of Molecules Bearing HLA determinants in Serum and Urine. Trans Proc. 11:2, 1301-3, 1979.
15. Fuks A., Kaufman J.P., Orr H.T., Purvan P. Structural Aspects of the Products of the Human Major Histocompatibility Complex. Trans. Proc. 9:4 1686-89, 1979.
16. McDermitt E.A. Regulation of the Immune Response by Major Histocompatibility System. N. Engl. J. Med. 307:26 1514-17, 1980.
17. Thorsby E. Biological Function of HLA. Tissue Antigens 11 321-29 1978.
18. Thorsby E., Albrechtson D., Bergholtz B. Identification and Significance of Products of the HLA-D Region. Trans. Proc. 10:2, 313-18, 1978.

19. Degos L. *Rôle du Système HLA en Biologie et en Pathologie*. La Nouvelle - Presse Médicale. 8:89, 3109-11, 1979.
20. Teran L., Gorodensky C., Escobar Quiñones A. *HLA Frequencies in a Mexican - Mastizo Population*. *Tissue Antigens*. 14, 352-47, 1979.
21. Ponderbeg H.B., Stiles D.P., Caldwell J.L. *Basic & Clinical Immunology*, 3a. ed. Ed. Lange Medical Publication 1980.
22. Tongio M.N., Berrebi A., and Mayer S.A. *Study of Lymphocytotoxic Antibodies in Multiparous Women Having Had at Least Four Pregnancies*. *Tissue Antigens*. 2 378-88, 1978.
23. Vives J., Gelabert A. and Castillo R. *HLA antibodies and Period of Gestation Decline in Frequency of Positive Sera During Last Trimester*. *Plasma Antigens*. 2, 209-12, 1978.
24. Terasaki P.I., Mokey M.R., Yamaaki J.N. and Vredevoe D. *Maternal-Fetal Incompatibility*. *Transplantation*. 8:6 538-43, 1970.
25. Eymard G., Baron I., Jensen K. and Lundsgaard A. *Occurrence of Antibodies During Pregnancy*. *Vox Sang.* 21 21-29 1971.
26. Wagnon T.G., Wagnon A.R., Cortison G.A., Aljnyk A. Singh A. *The ability of the Murine Placenta to Absorb Monoclonal Anti-Fetal H-2K from the Maternal Circulation*. *J. Immunology*. 123:2 1020-23, 1979.
27. Brochier J., Bonneau N., Robert M., Samrat C., Bevilard J. *Anti-HLA-DR - Alloantibodies Eluted from Human Placental Tissue*. *Trans. Proc.* 11:1 - 779-82, 1979.
28. Staszny P. *Tissue Typing Antisera from Immunisation by Pregnancy*. *Tissue Antigens*. 3, 121-27, 1978.
29. Shaw J.F. *Preliminary Screening and Tentative Identification of HLA Lymphocytotoxic Antibodies in a Hospital Blood Bank*. University of Alabama Hospitals and Clinics. University of Alabama Medical Center Birmingham, Alabama.
30. Boday G.E., Anderson J. and Aster R.H. *Acquisition of HLA Lymphocytotoxic - Antibodies*. The Milwaukee Blood Center, Inc., Department of Medicine. The Medical College of Wisconsin.
31. Belvedere N., Riolhardi P., Cartoni S., Pellegrino M.A. and Ferrone S. *Sera From Volunteers, Immunised by Planned Blood Transfusions as a Source of DR Cytotoxic Typing Reagents*. *Immunological Communications* 8:1, 93-106, 1978.
32. Allison J.P., Belvedere N., Reisfeld R.A., Pellegrino A. and Ferrone S. *Serologic and Immunohistochemical Characterization of HLA-DR Xenoserum*. *Transplantation*. 121:3, 579-85, 1978.

35. Wilson L.A., Coudery J.S. and Gallanpy G.T. Xenoreactive Directed Against Molecular Components of HLA System. *Transplantation*. 25:3, 78-9, 1978.
36. Wilson B.S., Pellegrino M.A. Reisfeld R.A. and Ferrone S. A Simple Method for Production of Specific Xenoreactive to Human Histocompatibility (HLA-A, -B, -C) Antigens. *Trans. Proc* 10:4, 1978.
37. Parham P., Bodnar U.F. Monoclonal Antibodies to Human Histocompatibility Alloantigens, HLA-A2. *Nature* 276, 397-8, 1978.
38. Galfred G., Huse S.C., Milstein C. Antibodies to Major Histocompatibility Antigens Produced by Hybrid Cell Lines. *Nature* 288, 563, 1977.
39. Klemmeyer Nielsen F. and Kjerbye E.E. Hla Antigena and Their Identification. *Plasma Antigens* 2, 182-88, 1973.
40. Yunis E.J. Base Genética y Función del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (en prensa).
41. Terasaki P.I., Bernoco D., Ostmark G. Microdroplet Testing for HLA-A, -B, -C and -D Antigens. *Am J. Clin. Path.* 69:3, 103-20, 1978.
42. Mittal Kamal E. Standardization of the HLA Typing and Reagents. *Transplantation*. 25:5, 376-78. 1978.
43. American Red Cross Blood Services, Northeast Region, HLA Laboratory.
44. Nielsen M. Klemmeyer Nielsen. Separation of Human T and B Lymphocytes Using AET-Treated Sheep Red Blood Cells. *Trans. Proc.* 11:3. 1381-3, 1978.
45. Gattlinger C. and Wick G. Relationship Between E Receptors and a T-Specific Surface Antigen on T Human Cells. *Immunology*. 33 189 1977.
46. Wood N. Bashir H. Amos D.B. and Davis E.J. A Simple Method of Freezing and Storing Live Lymphocytes. *Plasma Antigens* 2, 27-31, 1973.
47. Ross E. Freidman H. *Manual of Clinical Immunology* American Society for Microbiology. Washington D.C. 1976.
48. Maryman H.T. Cryoprotective Agents. *Criobiology*. 8, 178-83. 1971.
49. Reif A.E. and Robinson C.M. 'Sufficient' Absorption-A Quantitative Method to Replace 'Exhaustive' Absorption. *J. Immunol. Meth.* 8, 107-16, 1975.
50. Selwood Neville, Hedger Alan. *Transplantation Antigens - A Study In Serological Data Analysis*. Ed. John Wiley & Sons. New York 1978
51. Parham P. Characterization, Evolution and Molecular Basis of Polymorphic Antigenic Determinant Shared by HLA-A,B Products. *Human Immunology*. 1 131, 1980.
52. Joyney V.C., Wolf E. HLA-A, -B and -C Antigens, Their Serology and Cross-Reactions. *Br. Med. Bull.* 34:3, 217-22, 1978.
53. Dausset J. and Contu L. Is the MHC a General Self-Recognition System Playing a Major Unifying Role in an Organism? *Human Immunology* 1 6-17, 1980.