

20
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"Zaragoza"

PROTOCOLO DE BUSQUEDA DE ANTISUEROS
HLA-A, -B A PARTIR DE PLACENTAS HUMANAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARIA ARMIDA JUAREZ CISNEROS



México, D. F.

Marzo de 1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pag.
RESUMEN-----	1
INTRODUCCION-----	2
JUSTIFICACION-----	33
OBJETIVOS-----	34
MATERIAL Y METODOS-----	35
Extracción del suero de placentas	
humanas-----	36
Preparación de placas Terasaki-----	39
Purificación de linfocitos totales-----	40
Prueba de viabilidad-----	42
Microcitotoxicidad-----	42
ANALISIS ESTADISTICO-----	46
RESULTADOS-----	48
DISCUSION DE RESULTADOS-----	58
CONCLUSIONES-----	61
BIBLIOGRAFIA-----	62

RESUMEN

Este trabajo se realizó en colaboración con proyectos de investigación del sistema HLA que se llevan a efecto en el Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. En él se buscó definir especificidades del Complejo Principal de Histocompatibilidad Humano (Clase I), para lo cual se procesaron 638 placentas provenientes de mujeres multíparas y mediante la técnica de microcitotoxicidad de Terasaki, se seleccionaron 223 sueros que presentaron reactividad citotóxica. Estos antisueros se enfrentaron con células de dos orígenes étnicos (caucásicos y mestizos mexicanos). A partir de los cuales se determinaron; 45 especificidades internacionalmente establecidas, resultando algunos sueros citotóxicos con linfocitos de individuos mestizos, pero negativos con el panel caucásico.

Para la determinación de la especificidad se emplearon tablas de contingencia de 2 x 2 y los parámetros estadísticos, ji cuadrada (χ^2) y el coeficiente de correlación (r) considerándose solo los sueros que presentaron un coeficiente de correlación mayor de 0.7, resultando 21 sueros útiles para intercambio Nacional e Internacional con otros laboratorios. Con estos mismos antisueros se creó un banco de antisueros que se ampliará al establecer un programa permanente de búsqueda de antisueros HLA. El rendimiento en la obtención de antisueros a partir de placentas humanas fue de 7.0%, lo que es comparable con la literatura (93). El costo en relación con los antisueros comerciales se logró abatir 280 veces.

INTRODUCCION

ANTECEDENTES HISTORICOS

La inmunología del trasplante junto con la inmunogenética, ha tenido un gran auge durante el presente siglo, como resultado del trabajo intenso tanto experimental como clínico llevado a cabo por cirujanos, inmunólogos e investigadores; lo que ha permitido eliminar muchos de los problemas que originalmente obstaculizaban el éxito del trasplante de órganos y tejidos. Todo se inicia con los trabajos de Alexis Carrel -- quién en 1901 establece la técnica operatoria para la anastomosis vascular (10).

Jensen en 1903 realizó trasplantes de tumores en ratones y sugiere que la susceptibilidad al trasplante tumoral y la cepa murina estaban relacionados con alguna forma de control genético. Más adelante, el descubrimiento en 1910 de los grupos sanguíneos por Karl Landstainer; así como la prueba cruzada (para determinar la existencia de anticuerpo) permitió la realización de transfusiones sin peligro, lo cual representó el primer trasplante de un tejido líquido.

Uno de los experimentos que definieron los principios básicos del trasplante fue efectuado por Little en 1916 y utilizando ratones, demuestra que la aceptación de injertos depende de factores comunes entre el donador y el receptor los cuales están determinados por genes independientes. Por ello si los factores presentes no son idénticos a los del injerto éste no sobrevive, ya que el donador expresa un determinante antigénico ausente en el receptor y al ser reconocido por el sistema inmune del huésped provoca el rechazo del injerto (13, 94).

Los descubrimientos de Peter Gorer (1936) dieron la pauta para establecer al sistema responsable de la compatibilidad de tejidos. Así, - Gorer al tratar de diferenciar grupos sanguíneos en ratones endogámicos, observó un antígeno llamado II que se transmitía en forma dominante de - las leyes mendelianas y que además tenía gran relación con el injerto de piel o sea que éste antígeno II era un antígeno de histocompatibilidad. Sin embargo, es Snell quién realizando injerto de tumores entre diversas cepas demostró que ese antígeno correspondía a un antígeno de histocompa- tibilidad al cual denominó H-2 (3, 20, 21).

Posteriormente Snell, Gorer y Lyman en 1948 demostraron que el gen que determina la presencia del antígeno II en el ratón, se localiza en - el par cromosómico número 17, el cual porta además el gen de la braquiur- ria o anomalía de la cola. En ese año, Snell denominó a los genes que determinan el destino de los injertos como genes H o de Histocompatibili- dad y estableció las bases genéticas de su acción (7, 22, 74).

En 1953 Amos reconoce el primer antígeno sobre leucocitos de ratón mediante la técnica de leucoaglutinación (21). Fue Peter Medawer en - 1944 el primero en demostrar que el rechazo de un injerto entre indivi- duos no emparentados se realiza por mecanismos inmunológicos en donde la participación de la respuesta de tipo celular es relevante (94).

En 1956, Gorer y O'Gorman introducen el método de linfocitotoxici- dad para detectar las distintas especificidades, basado en la destruc- ción de célula blanco por acción del complemento y su posterior valora- ción mediante el empleo de colorantes vitales. En 1964, Terasaki y - McClelland miniaturizan la técnica realizando pocas modificaciones dando como resultado el método de microcitotoxicidad actual (6, 45, 81).

El sistema H-2 ha sido el modelo comparativo para el estudio del

sistema HLA humano, ya que permite la utilización de cepas endogámicas para el estudio de cada uno de los locus del sistema implicado en la respuesta inmune e interacciones celulares. En el humano no es posible contar con cepas endogámicas por lo que los estudios se desarrollan analizando familias o poblaciones (13).

El estudio del sistema HLA humano se inicia en los años 50's con Dausset siguiendo la pauta de lo conocido en los murinos. En 1952 describió la existencia de anticuerpos leucoaglutinantes en el suero de sujetos politransfundidos. En 1958 utilizando, tales anticuerpos, establece la primera definición de un antígeno de histocompatibilidad. Esto fue sobre la base de leucoaglutininas formadas por seis receptores - de transfusiones del mismo donador. Los cuales mostraron reactividad frente a un panel de células seleccionadas al azar. El antígeno fue de nominado Mac y actualmente es conocido como HLA-A2 (11, 13).

Hasta aquí, el estudio del sistema HLA y H-2 solo hubiera sido un marcador útil en el transplante y en genética de poblaciones de no haber sido por el hallazgo hecho por Lilly en 1964 el cual encontró que existía una gran correlación entre los antígenos H-2 del ratón y la susceptibilidad al virus de la leucemia de Gross. Por su parte Benacerraf establece que, la capacidad del aparato inmune a responder ante diversos antígenos esta determinada genéticamente por lo que se incrementa - el interés sobre el papel biológico de dichos antígenos (4, 41, 48).

En el año de 1958, Payne y Van Rood demostraron que el suero de mujeres multíparas también contenían anticuerpos contra antígenos de - histocompatibilidad, ya que durante la gestación son inmunizadas por an tígenos paternos presentes sobre las células fetales en la circulación materna. Lo que vino a facilitar el estudio de las especificidades del

sistema puesto que, son provenientes de donadores sanos, pueden ser obtenidos por plasmaféresis y están dirigidos contra un limitado número de antígenos extraños (70, 89).

Van Rood propone métodos estadísticos computarizados para la definición de antisueros (13). Es en el año de 1963 cuando, Van Leewen analizando los patrones de reacción de muchos sueros contra un extenso panel celular y la ayuda de una computadora detectan los antígenos del sistema humano 4a y 4b (ahora Bw4 y Bw6). En 1964, Payne y cols. reportan otro sistema denominado LA (actualmente el locus A) utilizando la técnica de leucoaglutinación. Si bien Dausset pensó que las dos series estaban genéticamente relacionadas, Bodmer las consideró de diferentes regiones genéticas. Ambas suposiciones son correctas ya que -- los antígenos 4 y LA están controlados por loci separados pero situados en el mismo cromosoma (70).

En 1965, se organiza en Leiden el primer Taller Internacional de Histocompatibilidad a partir del cual se establecieron las bases para una Nomenclatura Internacional. En este mismo año, Dausset e Ivany -- postularon que una gran cantidad de antígenos detectados en humanos, -- no eran más que parte de un sistema genético análogo al Complejo Principal de Histocompatibilidad del ratón y lo denominaron Hu-1. Al cual en 1967 el comité de nomenclatura denominó HL-A y más tarde en 1975 se le designó como HLA --del inglés Human Leucocyte Group A-- (70, 81).

En 1970, Sandburg y col. mediante estudios familiares describen el locus -AJ- (hoy HLA-C). En ese mismo año Yunis describe el locus HLA-D y Amos lo asocia con la proliferación linfóide en cultivo mixto estableciéndose en el reporte de nomenclatura de 1975 como HLA-D y dos años después se caracterizaron una serie de antígenos estrechamente

relacionados al locus D y a los que se les conoce como DR (70).

El programa de intercambio de células se inició en 1974. Cerca de 200 laboratorios por mes reciben células nuevas, esto junto con el intercambio de sueros ha sido factor importante para el avance en las tipificaciones de HLA en los años recientes (82).

Thorsby y Piazza en 1975 definen el Dw1 y Dw6 anteriormente conocido como DB y establecido como Dw ya en 1984 por Grosse-Wilde. En el comité de nomenclatura de 1984 se reportan los genes de la región -- HLA-D designados como HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP (1).

Durante la reunión del comité de nomenclatura HLA en el décimo Taller Internacional de Histocompatibilidad organizado en 1987 en Nueva York, se establecen los loci HLA-E (cuyo orden en el mapa aún no ha sido establecido) de la Clase I y los genes HLA-DN y DO de la Clase II (2).

Finalmente en 1989, J. Bodmer y colaboradores reportan tres nuevos genes que incluyen a dos de la Clase I y uno de la Clase II (sus -- posiciones en el mapa aún no se han definido). De los primeros son el HLA-F y HLA-G y de la Clase II se denominó el HLA-DRB5 (5).

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Uno de los adelantos más espectaculares de la medicina actual es sin duda la sustitución de órganos o tejidos en estado terminal. En general los injertos practicados en el mismo individuo son fácilmente aceptados, mientras que los realizados entre individuos de la misma especie pero genéticamente diferentes son rechazados. De todos los sistemas que cifran antígenos de histocompatibilidad solo uno parece tener importancia decisiva en la supervivencia del injerto y sus efectos son difíciles de superar incluso con sustancias inmunosupresoras; por lo que se le conoce como Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC del inglés, Major Histocompatibility Complex). Siendo referido como HLA en el humano, H-2 en el ratón, RhL-A en los Rhesus macacus, Ch1a en el Chimpancé, DLA en el perro, RLA en el conejo, SLA en el cerdo, GPLA en el cobayo y en el pollo B [29, 62].

ORGANIZACION GENETICA

Sistema H-2.

El Complejo Principal de Histocompatibilidad del ratón (H-2) está constituido por una serie de genes multialélicos localizados en un segmento del cromosoma 17 [14]. Este complejo está dividido en 5 loci, que son el H-2K, D, L, I y S, cerca de la región D se encuentra el gen T1a quien controla la síntesis de los antígenos leucémicos pero que no pertenece al complejo H-2 (Figura 1). Las funciones de dichas regiones son las siguientes [46]:

- 1) La región K, D y L controlan los aloantígenos celulares.
- 2) La región I controla la respuesta inmune específica.
- 3) La región S controla la cantidad sérica y es un gen estructural para componentes del complemento [20, 62].

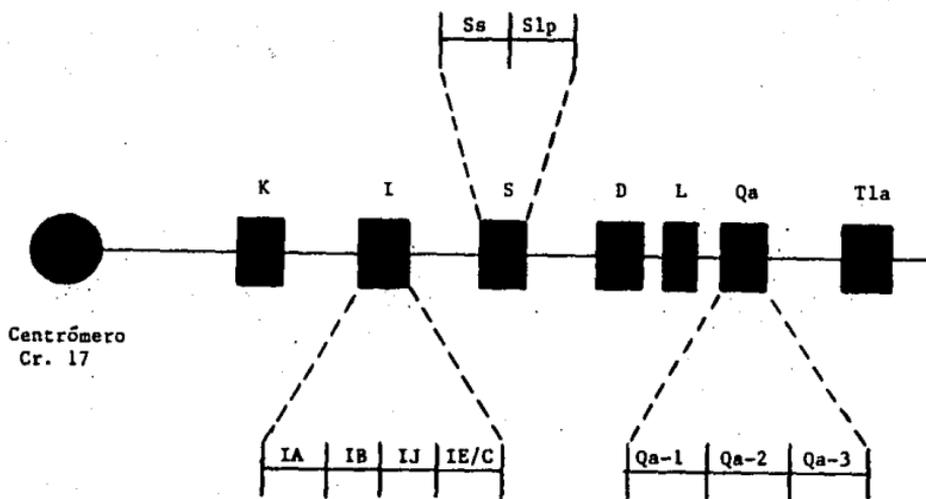


Figura 1. Complejo Principal de Histocompatibilidad (9).
(H-2)

REGION

K, D, y L

Importantes en el fenómeno de restricción de células blanco (virus + célula propia), en reacción injerto contra huésped y en reacción mixta de linfocitos.

I

En respuesta inmune a antígenos específicos. Susceptibilidad a virus ontogénicos. Reacción injerto contra huésped y en reacción mixta de linfocitos. Cooperación celular.

Ss, Slp

Controlan la síntesis de factores del complemento.

T1a

Controlan la síntesis de factores timoleucémicos.

Sistema HLA

Las moléculas del sistema HLA son glicoproteínas integrales de -- membrana, las cuales funcionan para procesar antígenos extraños y además participan en el reconocimiento celular y en el control de la respuesta inmune (6, 33). Los genes que codifican estas proteínas se encuentran en una región genética localizada en el brazo corto del par -- cromosómico número 6. Dicha región, está constituida por lo menos de 15 genes que codifican los loci A, B, C, DN, DO, DP, DQ, DR, C2, C4A, C4B y Bf (26, 90) (Figura 2 y 3).

CLASIFICACION

Según Klein, el sistema HLA se divide en tres clases de moléculas de acuerdo a su distribución, estructura y función (84):

Clase I: Incluye a los productos de los loci HLA-A, -B, -C, los cuales presentan analogía con las regiones K, D y L, reconocidas en el ratón (17).

Distribución y estructura.

Las moléculas de Clase I se expresan en la membrana de todas las células. Estos antígenos consisten de dos cadenas polipeptídicas: la glicoproteína alfa, con un peso molecular de 44 000 daltones, codificada en el cromosoma 6; y la beta 2 microglobulina (B_{2m}), de 12 000 daltones, no glicosilada, (y que por estar codificada en el cromosoma 15, no pertenece al Complejo Principal de Histocompatibilidad). Ambas cadenas se encuentran interactuando por uniones no covalentes (25, 37, 86).

La cadena alfa posee una porción extracelular de aproximadamente 270 aminoácidos, en la que los dos puentes disulfuro demarcan 3 dominios

Antígenos de
histocompatibilidad:

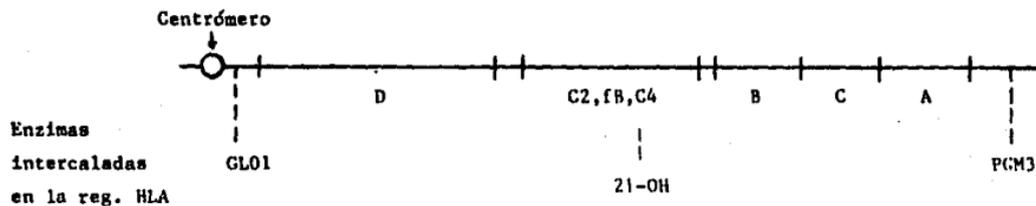
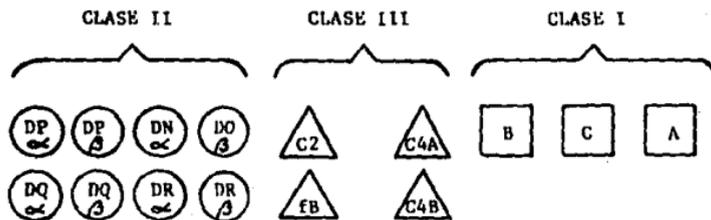


Figura 2. Mapa genético del Complejo Principal de Histocompatibilidad (HLA) (81).

GLO: Glioxalasa

21-OH: 21 Hidroxilasa

PGM3: 3 Fosfoglucomutasa.

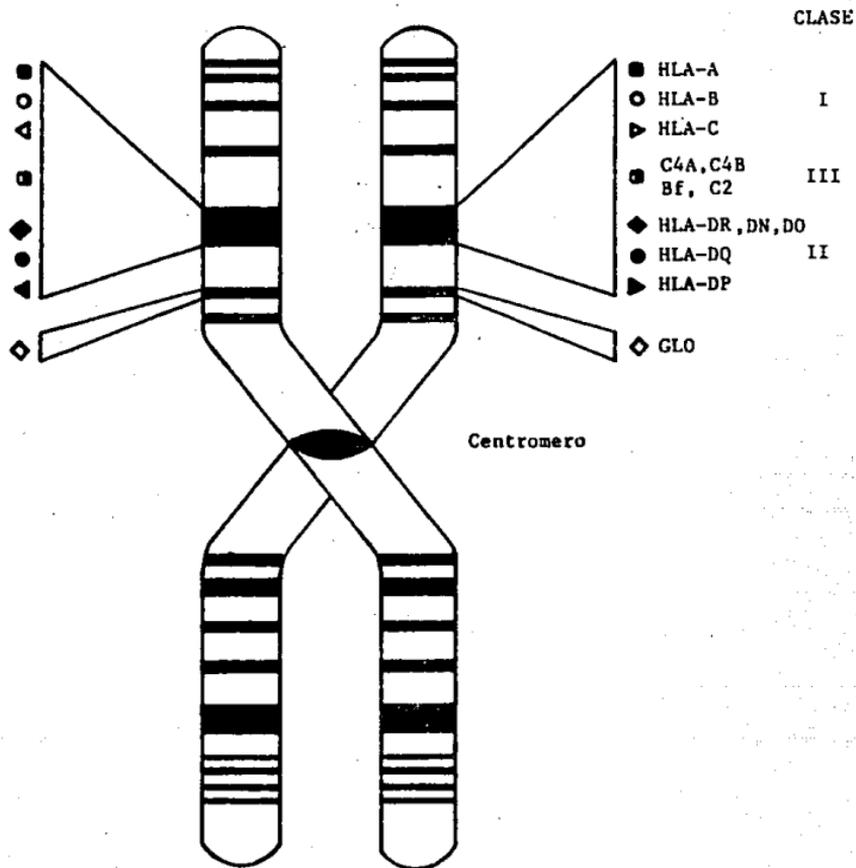


Figura 3. Cromosoma 6, que muestra la localización de los genes que codifican para el sistema HLA (80).

de 90 aminoácidos cada uno, denominados alfa 1, alfa 2 y alfa 3 (figura 4). La secuencia de aminoácidos del dominio alfa 3 presenta cierta homología con los dominios constantes de las inmunoglobulinas; en cambio, los dominios alfa 1 y alfa 2 son muy variables en su secuencia de aminoácidos aun entre individuos de la misma especie, siendo por lo tanto antigénicos (54, 61). El dominio 1 y 2 presentan los determinantes antigénicos de la molécula siendo los sitios reconocidos por las células citotóxicas y por los anticuerpos. También la cadena alfa posee una región hidrofóbica de 25 aminoácidos, que se encuentra introducida en la membrana celular. Finalmente se encuentra en (su extremo carboxilo terminal) la porción intracitoplásmica, con 30 aminoácidos (38, 67, 75).

Clase II: Esta constituida por los loci HLA-DP, -DQ, -DR, -DN, y DO y presentan una estructura y función similar a la región I del ratón (43).

Distribución y estructura.

Originalmente se denominó locus D al grupo de antígenos que sólo podían determinarse mediante el cultivo mixto de linfocitos y no por técnicas serológicas. Conforme se perfeccionaron los métodos para obtener poblaciones enriquecidas en linfocitos T y en linfocitos B, se supo que la expresión de estas moléculas está limitada a linfocitos B, a algunos linfocitos T (activados) y a macrófagos. Hoy en día es posible definir al menos serológicamente tres loci: primeramente, el DR, posteriormente se definieron el DP y el DQ (51, 53, 59).

Estos antígenos están constituidos por dos glicopéptidos: el alfa, con un peso molecular de 34 000 daltones y el beta, con aproximadamente 29 000 daltones. La cadena alfa tiene dos unidades de carbohidra

CLASE I

CLASE II

CLASE III

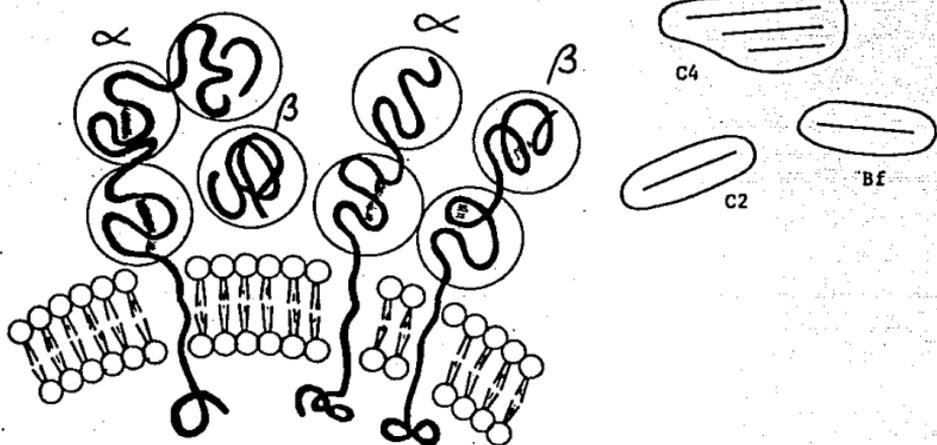


Figura 4. Estructura de las moléculas HLA (81).

to, mientras que la cadena beta sólo posee una por lo que es menos pesada. Ambas cadenas poseen una porción extracelular de cerca de 200 aminoácidos, además de la transmembranal de 23 y un pequeño segmento intracitoplásmico de entre 8 a 15 aminoácidos.

Las dos cadenas se encuentran interactuando por uniones no covalentes, donde los puentes disulfuro también delimitan dominios de cerca de 90 aminoácidos cada uno: la cadena beta con dos dominios (siendo el beta 1 muy variable), donde reside principalmente la aloantigenicidad de estos marcadores genéticos; y la cadena alfa con dos dominios constantes, excepto en los DQ [65, 78, 92].

Clase III: Comprende a la región del complemento, la cual contiene genes que determinan al 2o. y 4o. componentes del complemento (C2 y C4) de la vía clásica y el factor B de properdina (Bf), de la vía alterna.

En este grupo, se encuentran los componentes del complemento. A diferencia de las clases anteriores no se encuentran integradas a las membranas celulares, sino en estado soluble en el plasma [12, 81] (Figura 4).

POLIMORFISMO

Los genes para las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad, son los loci más altamente polimórficos conocidos en mamíferos; siendo para el humano el locus HLA-B el más polimórfico con 52 - alelos definidos hasta la fecha, 24 alelos del HLA-A, 11 del HLA-C y de la Clase II el más polimórfico es el HLA-DR con 20 alelos, seguidos del locus HLA-DQ con 9 alelos y el que menos variedad presenta es el HLA-DP

Tabla 1.

LISTA COMPLETA CON LAS ESPECIFICIDADES HLA RECONOCIDAS HASTA 1989 (5)

A	B	B	C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	Bw50(21)	Cw1	Dw1	DR1	DQw1	DPw1
A2	B7	Bw51(5)	Cw2	Dw2	DR2	DQw2	DPw2
A3	B8	Bw52(5)	Cw3	Dw3	DR3	DQw3	DPw3
A9	B12	Bw53	Cw4	Dw4	DR4	DQw4	DPw4
A10	B13	Bw54(22)	Cw5	Dw5	DR5	DQw5(1)	DPw5
A11	B14	Bw55(22)	Cw6	Dw6	DRw6	DQw6(1)	DPw6
Aw19	B15	Bw56(22)	Cw7	Dw7	DR7	DQw7(3)	
A23(9)	B16	Bw57(17)	Cw8	Dw8	DRw8	DQw8(3)	
A24(9)	B17	Bw58(17)	Cw9(3)	Dw9	DR9	DQw9(3)	
A25(10)	B18	Bw59	Cw10(3)	Dw10	DRw10		
A26(10)	B21	Bw60(40)	Cw11	Dw11(7)	DRw11(5)		
A28	Bw22	Bw61(40)		Dw12	DRw12(5)		
A29(19)	B27	Bw62(15)		Dw13	DRw13(6)		
A30(19)	B35	Bw63(15)		Dw14	DRw14(6)		
A31(19)	B37	Bw64(14)		Dw15	DRw15(2)		
A32(19)	B38(16)	Bw65(14)		Dw16	DRw16(2)		
Aw33(19)	B39(16)	Bw67		Dw17(7)	DRw17(3)		
Aw34(10)	B40	Bw70		Dw18(6)	DRw18(3)		
Aw36	Bw41	Bw71(70)		Dw19(6)			
Aw43	Bw42	Bw72(70)		Dw20	DRw52		
Aw66(10)	B44(12)	Bw73		Dw21	DRw53		
Aw68(28)	B45(12)	Bw75(15)		Dw22			
Aw69(28)	Bw46	Bw76(15)		Dw23			
Aw74(19)	Bw47	Bw77(15)		Dw24			
	Bw48			Dw25			
	B49(21)			Dw26			
		Bw4					
		Bw6					

con sólo 6 alelos conocidos actualmente (15, 55). Una lista completa con las especificidades conocidas hasta el momento se reportan en la tabla 1.

Los loci HLA-A y HLA-B se han caracterizado en tal grado que, es posible tipificar todos sus alelos. En cambio con otros loci no sucede lo mismo porque aun existen muchos alelos que no se han identificado.

El polimorfismo genético es el fenómeno por el cual dos o más alelos se presentan en una población, en frecuencias que no podrían mantenerse por el solo proceso de mutación (71). Uno de los mecanismos que generan polimorfismo es la mutación genética, estos cambios en el genoma pueden ser neutrales si ocurren en una región de la molécula que no afecte su función (mutación neutral), no aportando por lo tanto ventajas selectivas. Otros cambios genéticos pueden afectar la función de las moléculas codificadas por los genes causando así, enfermedad. En tales individuos las fuerzas selectivas operan aumentando o disminuyendo la capacidad de supervivencia y adaptación. Es el polimorfismo del MHC el que ha permitido a los seres vivos enfrentar a un gran número de microorganismos patógenos (45, 58, 63).

NOMENCLATURA

En 1967 fue organizada la primera reunión del Comité de Nomenclatura, bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), este comité lo componen genetistas, inmunólogos y especialistas en tipificación de tejidos, que tienen como finalidad poner al día la nomenclatura de los loci HLA-A, B, C y D estableciendo una nomenclatura para nuevas especificidades detectadas (13).

HLA es el nombre dado a la región completa del MHC humano, mientras que, HLA-A, -B, -C y HLA-DR, -DP y DQ se refiere a los loci individuales dentro de ella. Los números que le siguen se refieren a las especificidades correspondientes a cada locus (por ejemplo HLA-2) y la letra w precediendo a este número indica una especificidad provisionalmente identificada (como el HLA-Bw53).

Las especificidades del locus C se consideran suficientemente bien definidas para satisfacer las calificaciones necesarias para el as censo a pleno status HLA. Sin embargo, se ha decidido que las especifici dades de tal locus seguirán siendo nombradas Cw1, Cw2, Cw3, Cw4, Cw5, Cw6, etc., para evitar, la confusión con los componentes del complemen to C2 y C4 cifrados al menos en parte por genes situados dentro del HLA. Las especificidades que aparecen con otro número entre paréntesis signi fica que son splits (divisiones) dentro de ese mismo alelo, como se observa en la tabla 1, antes mencionada (5).

GENETICA HLA

Por ser el cromosoma 6 autosómico, tenemos doble dotación uno de origen materno; y otro, de origen paterno. Normalmente se heredan como una unidad llamada haplotipo en forma codominante y siguiendo las leyes de segregación mandeliana simple. Así si llamamos a los haplotipos paternos a y b y a los maternos c y d, los hijos de esta pareja heredan uno de los dos haplotipos de cada padre. En una familia de 5 hijos las combinaciones pueden ser ac, ad, bc o bd si estos son los genotipos de los cuatro primeros hijos de esta familia, el hijo número cinco tendría que ser igual a alguno de ellos ya que estas son las únicas combinacio-

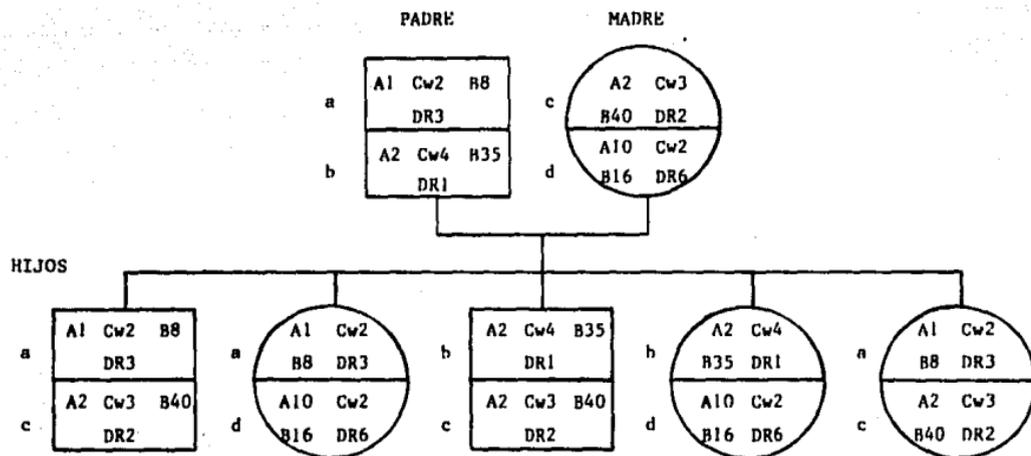


Figura 5. Herencia HLA (80).

nes posibles. De este modo en esta familia habrá solo un par de hermanos idénticos para el MHC (ac/ac), otro par completamente incompatible (ac/bd) y los parcialmente compatibles (ac/ad y ac/bc). En general la probabilidad de que dos hermanos tengan el mismo haplotipo es del 25%, de que los dos sean diferentes, de 25%, y de tener sólo uno igual es de un 50% (Figura 5) (13,36).

DESEQUILIBRIO DE ENLACE

La distribución de los antígenos en una población dada no es completamente al azar. La cercanía de los genes del HLA raramente da lugar a disociaciones por entrecruzamiento durante la meiosis; así la aparición de 2 antígenos sobre el mismo haplotipo es más frecuente de lo esperado al multiplicar sus frecuencias individuales lo que se conoce como desequilibrio de enlace. Se cuantifica como la diferencia (Δ) entre las frecuencias observada y esperada. Un ejemplo de combinaciones de alelos que se presentan con una frecuencia que excede a la esperada es el alelo HLA-B8 y el alelo HLA-DR3 que se encuentra en la población blanca de Norteamérica con frecuencias de 0.09 y 0.12, respectivamente. Así, la frecuencia esperada con la cual el haplotipo HLA-B8-DR3 debería encontrarse es de 0.9×0.12 , o sea 0.018. Sin embargo, este haplotipo se encuentra con una frecuencia de 0.0740, esto es 7 veces -- más la frecuencia esperada (18). Si se comparan individuos de diferentes grupos raciales se encuentra que existen diferencias en la frecuencia de los genes. En la tabla 2 se muestran las frecuencias de diferentes razas (81).

Tabla 2

PORCENTAJE DE FRECUENCIAS DE ANTIGENOS HLA EN DIFERENTES POBLACIONES (81)

HLA	CAUCASICOS	NEGROS	ORIENTALES
A1	26.4	15.5	2.0
A3	24.7	13.0	3.0
A11	12.2	3.8	22.0
A23(9)	2.8	15.4	0.2
A24(9)	19.5	9.4	52.9
A30(w19)	6.9	20.8	4.5
B7	21.7	22.7	9.2
B8	18.3	10.7	0.4
Bw22	5.6	0.6	20.2
Bw42	0.4	11.3	1.0
Bw53	1.0	13.0	0.6
Bw61(40)	4.2	3.0	22.0
Bw70	0.8	15.3	1.8
Cw1	6.5	2.0	29.9
Cw2	8.0	22.4	2.0
Cw5	13.3	5.9	1.2
DR3	22.6	27.6	3.6
DR7	22.6	24.6	5.7
DRw8	5.9	1.6	14.1
DRw9	1.6	3.0	21.7
DRw14(w6)	11.3	20.3	13.1
DQw2	32.9	40.9	9.8

FUNCIÓN BIOLÓGICA

Debido a que muchas interacciones celulares tanto inmunes como no inmunes se producen ya sea autóloga y singénicamente como también alogénicamente entre células con similitudes antigénicas con el sistema HLA. Estas estructuras tienen como papel biológico principal, la discriminación entre lo propio y lo extraño (77, 79).

Diferentes estudios realizados durante los últimos años sugieren que los genes del MHC se han preservado durante la evolución de los vertebrados y están implicados en la defensa de los organismos contra las agresiones del exterior. Sin embargo, el descubrimiento de genes que controlan la respuesta inmune y su localización en el MHC aclaró más su importancia biológica (45, 85) ya que estos productos se expresan principalmente en la membrana de las células responsables de la respuesta específica.

En términos generales el sistema HLA puede ser considerado bidimensional en el sentido molecular y evolutivo puesto que probablemente es el resultado de varias duplicaciones y mutaciones genéticas que se originaron de dos genes ancestrales. Sus moléculas desempeñan un papel relevante en la comunicación celular tanto para reconocerse entre sí como para cooperar con otras células (77).

En este contexto, desde el punto de vista inmunológico, la naturaleza esencial en la presentación de un antígeno no fue comprendida hasta el descubrimiento de la restricción impuesta en la interacción celular entre el macrófago y el linfocito por las moléculas del MHC, en donde la inducción de una respuesta inmune hacia cualquier antígeno es a través de la activación del linfocito T cooperador, la cual no es pro-

ducida por antígenos libres sino por antígenos presentados por una célula accesoria y en la que es indispensable que ésta despliegue las glicoproteínas de la Clase II del sistema HLA [23, 47, 54].

Así los linfocitos T cooperadores solo reconocen antígenos cuando son presentados con moléculas de la Clase II y las células T supresoras y citotóxicas son restringidas por los antígenos de la Clase I [27]. Tales moléculas tienen que ser del mismo código que las del propio linfocito.

El sistema inmune provee al huésped la resistencia contra un amplio espectro de agresiones, pero la operación y el mantenimiento óptimo de éste sistema requiere de la diferenciación, la interacción y la regulación de muchos tipos celulares. Así, es necesaria la actividad coordinada de muchos genes y productos para el desarrollo de una respuesta inmunológica normal. Se ha demostrado [45, 68], que existen por lo menos diez sistemas genéticos polimórficos que influyen en dicha respuesta. A pesar de ello, el Complejo Principal de Histocompatibilidad es el que ejerce la influencia predominante.

El reconocimiento y comprobación de que el sistema HLA es fundamental para establecer lo que es "propio" (individuo especificidad) y lo que es "extraño" (regulación y montaje de la respuesta inmune), le ha dado un lugar cada vez más relevante en la medicina y de hecho permitió la creación de la especialidad de la inmunogenética [34, 45].

APLICACIONES DEL SISTEMA HLA

Las aplicaciones del sistema HLA se pueden clasificar en dos grupos: Clínicos y de Investigación [72].

Aplicaciones Clínicas.

1) Transplante de tejidos u órganos tratando de establecer la me jor compatibilidad posible entre el donador y el receptor.

2) Asociación HLA-Enfermedad, es un marcador útil para conocer la posible susceptibilidad a desarrollar diferentes padecimientos, básicamente aquellos que tienen un fondo inmunopatológico. En la tabla 3 se muestran las enfermedades asociadas al HLA (24).

3) En medicina legal, utilizado para la exclusión de paternidad.

Aplicaciones en la Investigación.

1) Estudios antropológicos, es una herramienta útil en la aporta ción de datos relacionados con los orígenes del hombre.

2) En la construcción de mapas genéticos.

3) En genética de poblaciones, ha permitido demostrar que existe variabilidad en la composición genética de las poblaciones, detectando antígenos frecuentes en una población dada y como varían en los distintos grupos raciales (31).

Tabla 3

ENFERMEDADES ASOCIADAS AL HLA [81]

Enfermedad	HLA	R.R. (X)
Enfermedad de Hodgkin	A1	1.4
Hemocromatosis idiopática	A3	8.2
Enfermedad de Behcet	B5	6.3
Hepatitis crónica autoinmune	B8	9.0
Espondilitis anquilosante	B27	87.4
Enfermedad de Reiter	B27	37.0
Uveitis anterior aguda	B27	10.4
Tiroiditis subaguda	B35	13.7
Hiperplasia adrenal congénita	B47	15.4
Psoriasis vulgaris	Cw6	13.3
Neuritis óptica	DR2	0.2
Esclerosis múltiple	DR2	4.1
Síndrome de Goodpasture	DR2	15.9
Dermatitis herpetiforme	DR3	15.4
Enfermedad celiaca	DR3	10.8
Síndrome de Sjögren	DR3	9.7
Enfermedad de Addison	DR3	6.3
Enfermedad de Graves	DR3	3.7
Diabetes mellitus tipo I	DR3	3.3
Lupus eritematoso sistémico	DR3	5.8
Miastenia gravis	DR3	2.5
Síndrome de Sicco	DR3	9.7
Nefropatía membranosa idiopática	DR3	12.0
Artritis reumatoide	DR4	4.2
Pemfigus	DR4	14.4
Tiroiditis de Hashimoto	DR5	3.2

R.R. = Riesgo Relativo.

SEROLOGIA

Especificidades subtípicas y supertípicas.

La definición serológica de los productos genéticos del HLA es - uno de los refinamientos continuos en la detección de nuevos alelos HLA. Los sueros originalmente utilizados detectaban especificidades supertípicas denominándose así a los antígenos compartidos o bien comunes a varios alelos, como por ejemplo el Bw4 y Bw6. A diferencia de estos antígenos que son característicos de un solo alelo son conocidos como subtípicos tal es el caso del HLA-A1.

Algunos de los antígenos que anteriormente se pensaba que eran subtípicos, se ha encontrado que están formados por más de un antígeno, los cuales se denominan "splits" (división) de las especificidades originales. En las tablas 4 y 5 se muestran las especificidades originales y sus "splits" (13, 72).

Entre los antígenos supertípicos y los subtípicos se encuentra un grupo de antígenos no denominados que dan lugar a reacciones cruzadas - entre grupos determinados de alelos, estos conjuntos perfectamente definidos conocidos como Cregs (Cross reaction groups) como se muestra en las tablas 4 y 5 (28, 54).

FUENTES DE ANTISUEROS

El sistema HLA no solo tiene una gran utilidad pronóstica en la sobrevida del trasplante, sino también una estrecha relación con las características genéticas en la regulación de la respuesta inmune, por

LOCUS HLA-A

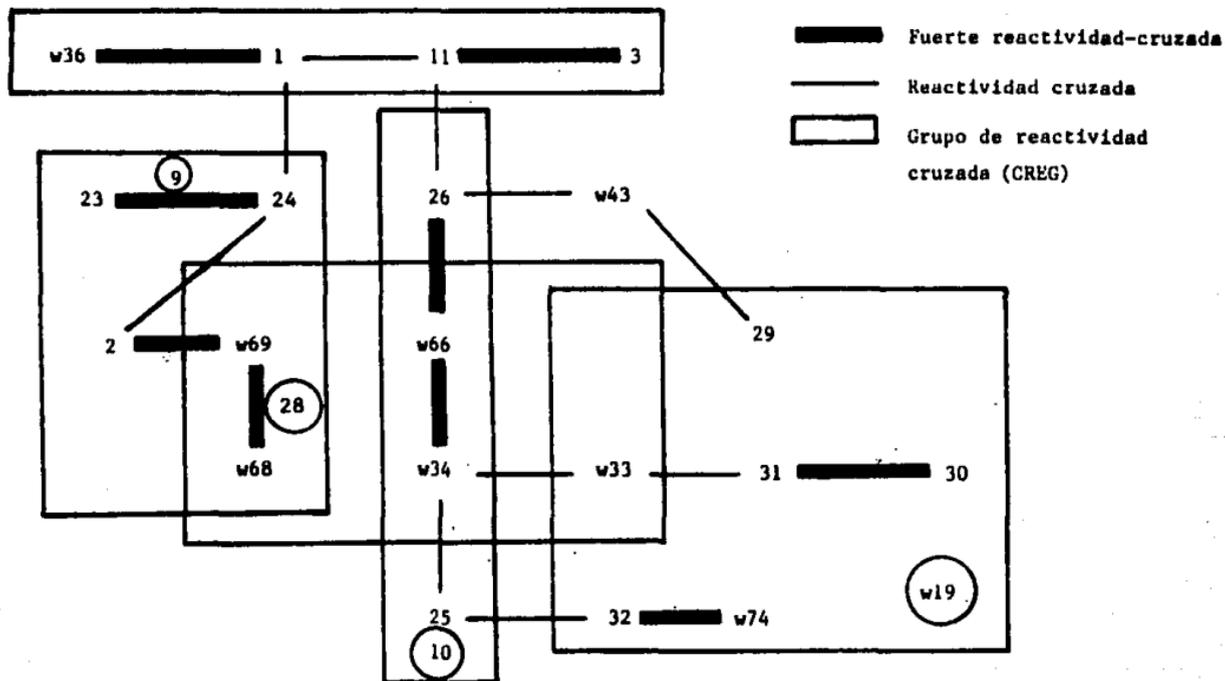


Tabla 4. Reactividad cruzada del locus HLA (60).

LOCUS HLA B

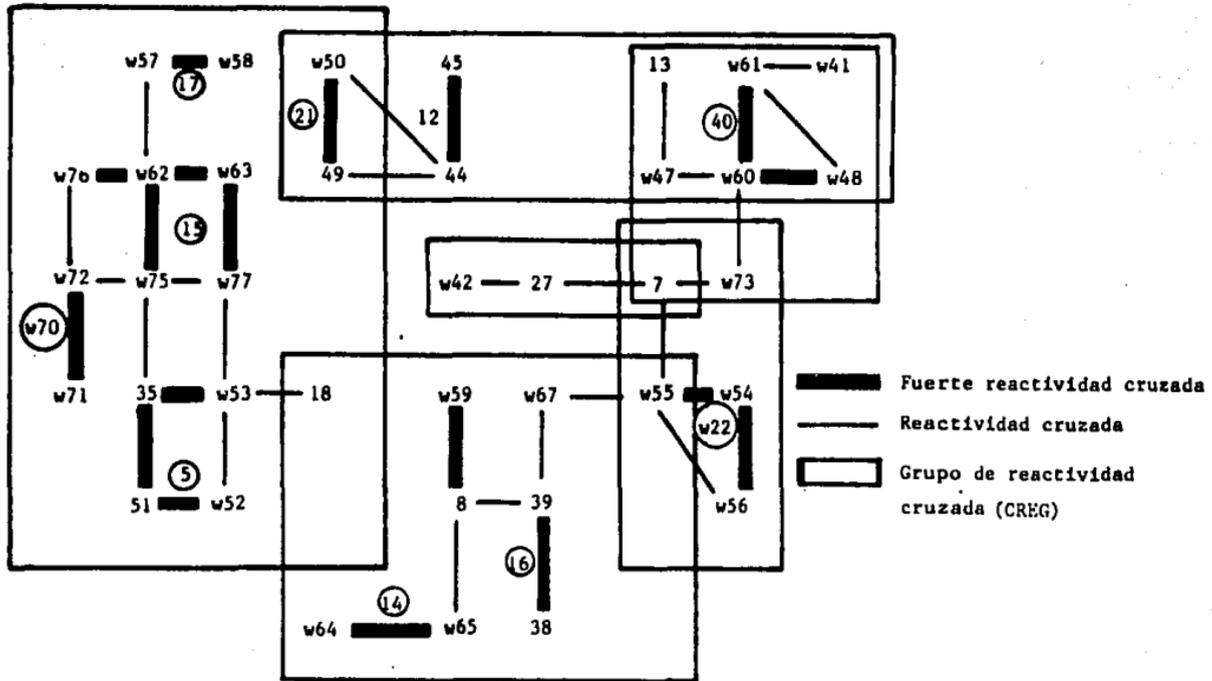


Tabla 5. Reactividad cruzada del locus HLA (60).

lo que, ha aumentado el número de laboratorios de inmunogenética, que tipifican los antígenos HLA para la selección de donadores a transplante, buscando la presencia significativa entre la presencia de alelos, combinaciones de estos con ciertas enfermedades, es decir en la búsqueda de marcadores genéticos de susceptibilidad.

La eficiencia de un laboratorio de inmunogenética se basa fundamentalmente en la variedad de marcadores que puede identificar por lo que uno de los principales problemas es la producción o adquisición de los antisueros. La probabilidad de encontrar antisueros monoespecíficos por inmunización al azar es pequeña, por lo que se requiere de un gran número de sueros con el fin de seleccionar las muestras útiles. La solución de este problema depende de las fuentes de antisueros y de los métodos estadísticos utilizados para caracterizar la especificidad de los mismos (32, 91, 93).

Las fuentes de origen de los antisueros tipificadores son:

1) MUJERES MULTIPARAS

En el humano una gran cantidad de anticuerpos para el análisis de los antígenos HLA, son derivados de mujeres multiparas las cuales son inmunizadas durante la gestación por antígenos paternos presentes sobre las células fetales en la circulación materna (13, 16). Los anticuerpos producidos no cruzan la placenta o reaccionan con ella actuando como inmunoabsorbente, tales anticuerpos están presentes en la madre en relación directa con el número de embarazos (19, 73). Cuando la madre solo ha tenido un embarazo la cantidad de anticuerpos presente en el suero es baja siendo difícil utilizar tal suero para tipificación. Por

otro lado cuando ha tenido muchos embarazos (6 o más), los sueros resultantes son poliespecíficos debido a que, los fetos llevan antígenos de histocompatibilidad diferentes por lo que los sueros reaccionan con varios antígenos (40, 64).

Si bien, un porcentaje sustancial (10-30%) de mujeres multíparas producen un anticuerpos anti-HLA, sólo cerca del 6 al 10% de ellas, hacen un anticuerpo suficientemente específico para ser utilizado como reactivo de tipificación. Por ello debe considerarse un gran número de sueros a fin de establecer reactivos de calidad (52, 88).

La absorción placentaria de anticuerpos maternos dirigidos a antígenos de histocompatibilidad fetales, impide la penetración a la circulación fetal y ejercer cualquier efecto dañino (44); por lo que el suero obtenido de la placenta es una buena fuente de antisueros tipificadores del sistema HLA (8, 39, 69).

2) PACIENTES TRANSPLANTADOS

Hay varios estudios que demuestran la formación de anticuerpos anti-HLA después del trasplante renal y generalmente son di o poliespecíficos (42, 44). Aunque la respuesta celular es la respuesta clásica del rechazo del trasplante, en la práctica médica y para evitar esto se les administra inmunosupresores como la ciclosporina que inhibe la producción de IL-2 con lo que se evita la proliferación celular (66), esto trae como resultado que una cantidad apreciable de pacientes tengan anticuerpos (respuesta humoral) que provoca un deterioro muy lento del injerto (aproximadamente 2 años como en el rechazo crónico) (35, 42, 60).

3) PACIENTES TRANSFUNDIDOS

La sangre contiene linfocitos ricos en antígenos de histocompatibilidad y debido a que, cuando se realiza una transfusión sanguínea no se toma en cuenta la compatibilidad para HLA entre donador y receptor, la mayoría de los pacientes transfundidos por razones terapéuticas, reciben sangre incompatible para HLA y por lo mismo pueden formar anticuerpos que son por lo general multiespecíficos debido a las sensibilizaciones múltiples a las que son sometidos [13, 32, 76].

4) PACIENTES INMUNIZADOS INTENCIONALMENTE

Es posible lograr transfusiones sanguíneas repetidas a voluntarios, de sangre que contenga un determinado antígeno con el fin de producir anticuerpos capaces de detectar al determinante antigénico [13, 95].

Cuando se planea la inmunización deliberada de sujetos se debe tener en cuenta cualquier complicación de tipo legal que puede existir según las leyes sanitarias.

Las inmunizaciones se llevan a cabo mediante la inyección de leucocitos semanalmente lo que provoca una buena respuesta de anticuerpos contra los antígenos HLA incompatibles o por injertos de piel a intervalos de 2-3 semanas detectando la formación de anticuerpos después del segundo estímulo y por transfusión sanguínea inyectando 20 ml. de sangre total continuamente hasta que el individuo responda [13, 93].

Los dos primeros no están libres de riesgo y no son fácilmente adaptables a programas de gran escala por lo que la inmunización por trans

fusiones es el método más adecuado. Debido a que la estimulación de un sujeto resulta de la interacción del individuo con muchas sustancias potencialmente antigénicas, no es sorprendente que la mayoría de los sueros resulten poliespecíficos (9).

5) INMUNIZACION DE ANIMALES

Se han realizado algunos intentos para utilizar sueros producidos en otras especies principalmente primates (13). Aún cuando se ha postulado que los sueros así producidos son más fáciles de obtener inmunizando a un miembro de una especie en relación filogenética cercana al donador del material inmunizante, se ha visto que el título del antisuero es alto pero, las reacciones son muy amplias por lo que su aplicación es limitada (13, 64).

La producción de xenoantisueros con HLA específico requiere al menos purificación parcial de los antígenos. Los sueros preparados reaccionan con determinantes comunes a todos los productos MHC de la especie. A pesar de ello, utilizando antígenos altamente purificados y absorciones extensivas, es posible obtener anticuerpos de buena calidad resolutive (64).

6) PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Una gran variedad de experimentos se han realizado para poder producir anticuerpos monoclonales para ser utilizados como fuentes de tipificación, debido a que la mayoría de las fuentes mencionadas anteriormente producen antisueros poliespecíficos. Esta situación ha cambiado

radicalmente desde que Kuhler y Milstein demostraron que las células de bazo de ratón inmunizado pueden fusionarse a células de mieloma para generar híbridos celulares que secretan anticuerpos específicos (30, 57). Los hibridomas celulares producidos son justamente tan heterogéneos como el anticuerpo de ratón original, pero es posible seleccionar una o más líneas celulares que secretan anticuerpos específicos para el antígeno deseado (49, 56). Este método ha sido utilizado para generar anticuerpos monoclonales de antígenos humanos de diferenciación y para glicoproteínas HLA bien definidas (87, 93). En este caso también es necesaria la purificación de los antígenos de histocompatibilidad.

De todas las fuentes mencionadas, la última es la mejor ya que permite producir anticuerpos con alto título y buena especificidad para ser empleados en la técnica de tipificación, sus inconvenientes son, su complicada elaboración y su alto costo, por ello es que en algunos laboratorios que realizan tipificaciones en nuestro país se ha tenido que excluir. (91).

La identificación de los antígenos de histocompatibilidad se realiza por medio de métodos inmunológicos. Entre los métodos de valoración y detección de antígenos y anticuerpos HLA se encuentran la leucoaglutinación, fijación del complemento, radio inmuno análisis (R.I.A.), ELISA inmunofluorescencia y microcitotoxicidad, siendo ésta última la técnica más ampliamente usada (40, 83).

JUSTIFICACION

La definición de los antígenos de histocompatibilidad en nuestra población es fundamental, para fines de selección de donadores a transplante y tener un marcador útil para establecer asociaciones HLA y diversas patologías. Así mismo, es importante en las pruebas de paternidad, en la respuesta inmune, estudios antropológicos y en genética de poblaciones. Esto trae consigo la necesidad de grandes cantidades de reactivo anti-HLA y contar con diversos antisueros específicos en el laboratorio.

En este sentido la eficiencia de un Departamento de Inmunogenética se basa fundamentalmente en la variedad de marcadores que pueda identificar, siendo uno de los principales problemas la producción o adquisición de los antisueros. Actualmente el costo de los antisueros es muy alto, por lo que resulta necesario establecer un programa de obtención de antisueros HLA con un poco de esfuerzo y un mínimo de equipo adicional. La probabilidad de encontrar antisueros monoespecíficos es pequeña, de ahí que se requiere de un gran número de sueros a partir de los cuales se seleccionan las muestras útiles.

Dado que antígenos frecuentes en una población pueden estar ausentes en otras poblaciones y a que, el sistema HLA presenta un gran polimorfismo genético, es de esperarse, que existan alelos que aun no han sido determinados, por lo que, resulta importante estudiar la serología del sistema HLA.

Es por todo ello que el presente trabajo está enfocado a la obtención de antisueros tipificadores del sistema HLA a partir de placentas humanas.

O B J E T I V O G E N E R A L

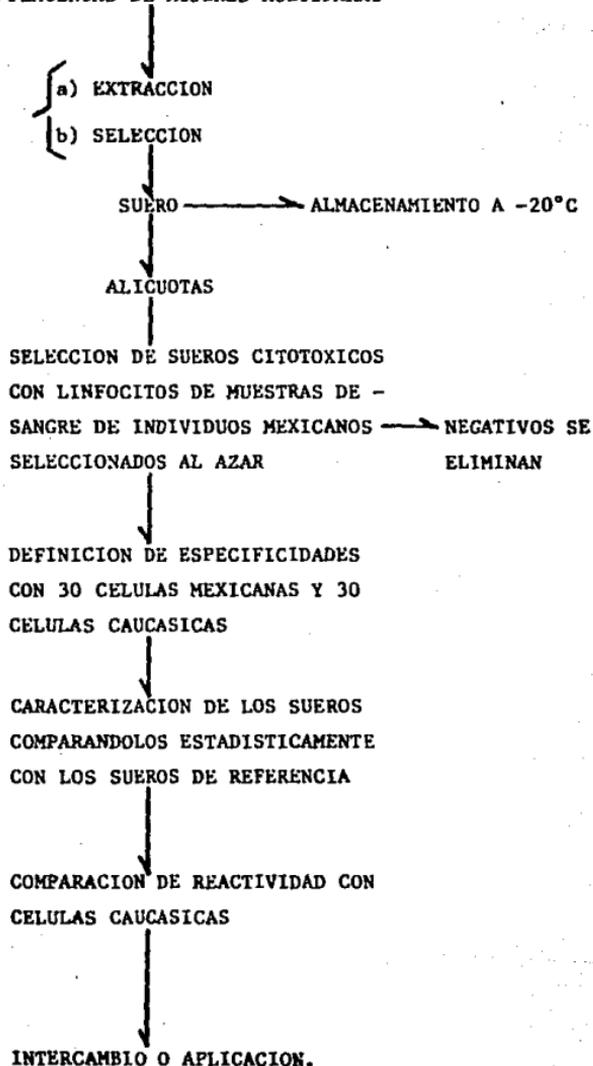
OBTENER ANTISUEROS TIPIFICADORES DEL SISTEMA HLA-A,-B A PARTIR DE PLACENTAS HUMANAS, EMPLEANDO LA TECNICA DE MICROCITOTOXICIDAD DE TERASKI, EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.

O B J E T I V O S P A R T I C U L A R E S

- PROBAR LA CITOTOXICIDAD DE LOS SUEROS CON 30 SUJETOS SELECCIONADOS AL AZAR.
- DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTISUEROS TIPIFICADORES OBTENIDOS DE PLACENTAS HUMANAS.
- SELECCIONAR LOS ANTISUEROS POSITIVOS CON FINES DE INTERCAMBIO, NACIONAL E INTERNACIONAL.
- CREAR UN BANCO DE ANTISUEROS TIPIFICADORES DEL SISTEMA HLA-A,-B.
- REDUCIR EL COSTO COMERCIAL PARA LA ADQUISICION DE LOS ANTISUEROS.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

PLACENTAS DE MUJERES MULTIPARAS



MATERIAL Y METODOS

EXTRACCION DE SUEROS A PARTIR DE PLACENTAS HUMANAS.

Material biológico:

Placentas humanas

Método.

-Se recolectaron placentas de mujeres mexicanas provenientes del Centro Hospitalario 20 de Noviembre, junto con la hemorragia propia del parto, procesandolas en un lapso menor de 24 horas, dada la posibilidad de necrosis y descomposición de la placenta.

-Cada una de las placentas se vaciaron en coladores, dejando caer por gravedad el plasma. Una vez obtenido todo el líquido se fraccionó la placenta; con lo que se tiene mayor cantidad de suero.

-Las fracciones se colocaron en los coladores encima de la cual se colocó una botella compresora.

-Se dejaron escurrir durante dos horas y finalmente se exprimieron manualmente.

Se trató de obtener el volumen máximo debido a que, uno de los requisitos para intercambiar los antisueros, es que se cuente con un volumen promedio de 40 ml. Por ello cuando el material extraído es menor de esta cantidad se desecha.

-Empleando una centrifuga con refrigerante (Beckman) el material que se extrajo se centrifugó a 3 500 rpm durante 30 minutos, con lo que los restos biológicos se depositan y permiten la separación del sobrenadante. La temperatura utilizada fue de 4°C para evitar la contaminación del suero.

-Con el fin de tener un suero más puro se centrifugó nuevamente el sobra

nadante, en las mismas condiciones anteriores.

-Se midió el volumen de los sueros obtenidos, asignandoles una clave y colocandolos en frascos debidamente etiquetados.

-En tubos Fisher se tomaron alícuotas del suero para obtener su citotoxicidad posteriormente. Los frascos y las alícuotas se almacenaron a -20°C ; con la alícuota se evita el congelamiento y descongelamiento del suero que daña su calidad y reactividad citotóxica.

-Antes de la utilización del antisuero se centrifugó en una microcentrifuga (Beckman), para eliminar proteínas agregadas o lípidos que pueden interferir en la lectura de la placa.

-La recolección de datos del donador fue realizado por el servicio de Ginecología y Obstetricia del Centro Hospitalario 20 de Noviembre, ISSSTE.

Los datos que se recolectaron fueron los siguientes:

Nombre: _____ Fecha: _____

Paterno Materno Nombre

Expediente: _____ # de embarazos _____

de Hijos _____ # de parejas _____

ABO _____ Rh' Trans. Sanguíneas _____

-Con los datos anteriores se tuvo un primer criterio de selección, evitando la presencia de sueros poliespecíficos procedentes de mujeres con más de seis embarazos, han recibido varias transfusiones sanguíneas o bien - han tenido más de una pareja.

ELABORACION DEL PANEL DE LINFOCITOS

De 30 donadores voluntarios, se obtuvieron linfocitos mediante centrifugación en un gradiente de Ficoll-hypaque. Estos fueron tipificados utilizando la técnica de microcitotoxicidad de Terasaki, misma técnica con la que se estudiaron los sueros obtenidos. La cual se describe más adelante.

Se buscó que el panel contará con una adecuada representación de todas las especificidades conocidas; resulta difícil para un laboratorio - contar con tal panel especializado por lo que se contó con la ayuda de - un laboratorio de referencia ello también por la importancia de contar con paneles de grupos raciales distintos al nuestro, con el fin de detectar - antisueros que no son reconocidos con células mexicanas, así que los sueros se probaron en el laboratorio donde se trabajó y además fueron enviados a Boston Mass. E.U.A., para ser probados con células caucásicas.

PROCEDENCIA DE LOS SUEROS TIPIFICADORES

Los antisueros utilizados provinieron de dos fuentes:

- 1.- Dana Farber Cancer Institute. Boston, Massachussets, E.U.A., proporcionados gentilmente por el Dr. E.J. Yunis.
- 2.- Los sueros obtenidos mediante el programa permanente de búsqueda de antisueros tipificadores del sistema HLA-A,-B, que se desarrolla en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER, México D.F.

Con nuestro lote de antisueros de referencia, las especificidades que podemos detectar son:

Locus A A1 ,A2 ,A3 ,A9 , A10 ,A11 ,Aw19,A23 ,A24 ,A26 ,A28 ,
A29 ,A30 ,A31 ,A32 .

Locus B Bw4 ,B5 ,Bw6 ,B7 ,B8 ,B12 ,B13 ,B14 ,B15 ,B16 ,B17 ,B18 ,
B21 ,B27 ,B35 ,B37 ,B39 ,B40 ,B42 ,B44 ,B45 ,B50 ,B51 .

Para seleccionar los sueros citotóxicos se siguieron los siguientes pasos:

- a).-Preparación de placas Terasaki con los sueros de placenta no definidos y placas con sueros de referencia para tipificación HLA.
- b).-Purificación de linfocitos totales a partir de sangre periférica.
- b').-Prueba de viabilidad.
- c).-Ensayo de microcitotoxicidad.
- d).-Determinación de la especificidad -Análisis estadístico-

PREPARACION DE PLACAS TERASAKI

Placas con sueros de placenta no definidos y sueros de referencia.

Material biológico:

Sueros de placenta, sueros de referencia, control negativo (suero humano AB), control positivo (suero antilinfocítico obtenido de conejo previamente inmunizado con un panel de linfocitos).

Método.

- A las placas terasaki (de 60 pozos, Microtest) se les añadió con la ayuda de un Jet-Pipet (Robbins Scientific), 5 μ l de aceite mineral al 85% a cada uno de los pozos, para evitar la desecación del antisuero.
- Las alícuotas de los sueros que se habían almacenado se descongelaron y centrifugaron para tener un suero más puro.
- Con una jeringa Hamilton múltiple (Robbins Scientific), se añadió 1 μ l de control negativo (suero humano AB el cual no es citotóxico y mantiene las células vivas) y control positivo (suero antilinfocítico que mata - todas las células).
- Se sembraron 638 sueros obtenidos, distribuidos en orden creciente y en cantidad de 1 μ l por pozo en 678 placas.
- Los sueros de referencia se sembraron en las mismas condiciones anteriores.
- Se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

PURIFICACION DE LINFOCITOS TOTALES

La purificación de linfocitos a partir de sangre periférica se logra aprovechando las diferentes densidades de las células sanguíneas, así, centrifugando sobre un gradiente de Ficoll-hypaque (cuya densidad es muy cercana a la de los linfocitos 1.076-1.078) los eritrocitos y polimorfo nucleares se depositan en el fondo mientras que los linfocitos permanecen cercanos a la interfase entre el suero y la solución separadora. (40,64).

Material biológico:

Sangre periférica fresca.

Método.

- Se tomó la muestra de sangre por punción venosa. La cantidad de sangre dependió del número de células que se necesitaban para probar los sueros (20 ml).
- Se colocó la sangre en tubos de rosca, que contenían 20 perlas de vidrio. Se desfibrina mecánicamente por rotación. Se deja de agitar cuando se observa la formación de coágulo de fibrina en las perlas.
- La sangre se diluye con solución balanceada de Hanks en relación 2:1 con lo que se tiene una mejor separación de las células.
- En tubos de ensaye (13 x 100) se colocaron 3 ml de la solución de Ficoll-hypaque.
- Se estratifica cuidadosamente la sangre con una pipeta Pasteur sobre el linfograd, con lo que se evita que se mezclen ambas fases.
- Se centrifugó a 1 800 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos y se obtiene una banda de linfocitos la cuál se recupera con la ayuda de pipeta Pasteur los que se colocaron en un tubo de ensaye.
- Se lavaron los linfocitos con solución de Hanks centrifugando a 2 000 rpm durante 10 minutos. Esta operación se repitió dos veces más. Todo lo anterior con el objeto de eliminar el Ficoll-hypaque y el suero restante.
- Para contar las células se resuspendió en 1 ml de medio RPMI (Gibco).
- Las células se contaron en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se ajustaron con medio RPMI a 4×10^6 cél/ml. Dicha concentración es la que se considera apropiada para la lectura de los pozos.

PRUEBA DE VIABILIDAD

La prueba de microcitotoxicidad requiere de linfocitos vivos, por lo que es necesario vigilar su viabilidad determinandola por exclusión de un colorante vital como el azul tripán. El porcentaje de viabilidad que se considera adecuado es de 90%.

Método.

- Se mezclaron 0.1 ml de la suspensión de linfocitos con 0.1 ml del colorante azul tripán (Sigma) en un tubo de ensaye.
- Se dejó a temperatura ambiente durante 2 minutos tiempo en el cuál se lleva a cabo la incorporación del colorante en las células muertas.
- Se colocó una gota de la mezcla sobre el hemocitómetro.
- Se observó al microscopio usando el objetivo seco fuerte. Las células muertas incorporan el colorante y se tiñen de azul, mientras que las vivas lo excluyen y se observan refringentes. Mediante el conteo de 100 células se determinó el porcentaje de viabilidad.

MICROCITOTOXICIDAD

Este método serológico desarrollado por Paul Terasaki en 1964, es el de mayor utilidad para valorar y detectar antígenos y anticuerpos HLA, dadas las cantidades tan minúsculas de células y de anticuerpos; así como su gran reproductibilidad y sensibilidad.

La prueba de microcitotoxicidad consiste básicamente en incubar la suspensión de linfocitos con diferentes sueros. Si estos contienen anticuerpos (Ac) que reconozcan al antígeno (Ag) se llevará a cabo la reacción Ag-Ac. Si se adiciona suero de conejo como fuente de complemento (C') éste será fijado y activado por el complejo formado lo cual provoca

lisis parcial de la célula; modificandose la permeabilidad celular. La alteración en la permeabilidad de la membrana se visualiza mediante la incorporación de colorantes vitales como la eosina o el azul tripán que no son citotóxicos ni tiñen las células vivas (40,83).

Material biológico:

Sueros de placentas, sueros de referencia dirigidos a especificidades de Clase I, suero control negativo, suero control positivo, linfocitos totales ajustados a 4×10^6 cél/ml y complemento de conejo.

Método.

-Se descongelaron las placas dejándolas a que alcanzaran la temperatura ambiente.

-Una vez ajustada la concentración de linfocitos a 4×10^6 cél./ml. se sembró 1 µl en cada uno de los pozos de la placa correspondiente usando una jeringa Hamilton sencilla (Robbins Scientific), se mezcló suavemente con un agitador vórtex (Termolyne) con el objeto de poner en contacto el suero con las células.

-Se dejó reposar durante 60 minutos a temperatura ambiente permitiendo con esto que se lleve a cabo la reacción Antígeno-Anticuerpo.

-Con la jeringa múltiple se adicionaron a cada pozo 5 µl de complemento y se mezcló suavemente con el agitador vórtex.

-Se deja la placa durante 60 minutos a temperatura ambiente con el fin de activar al complemento logrando con esto lisis o no lisis parcial de la célula.

-Se adicionó 5 µl de eosina amarillenta y se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

-Se agregó 5 µl de formalina neutralizada y se dejaron fijar durante 5

minutos.

-Se colocaron los cubreobjetos sobre la placa y se guardaron en refrigeración hasta el momento de su lectura (figura 6).

Las reacciones fueron evaluadas en un microscopio invertido (con condensador de contraste de fases). Las células se observan refringentes en tanto que las muertas se tiñen de rojo y se observan muy oscuras. La calificación que se le da a cada pozo es en base al siguiente criterio:

% Células Muertas	Calificación	Interpretación
0-10	1	Negativa
11-20	2	Negativa
21-30	4	Dudosa
31-80	6	Positiva
81-100	8	Positiva

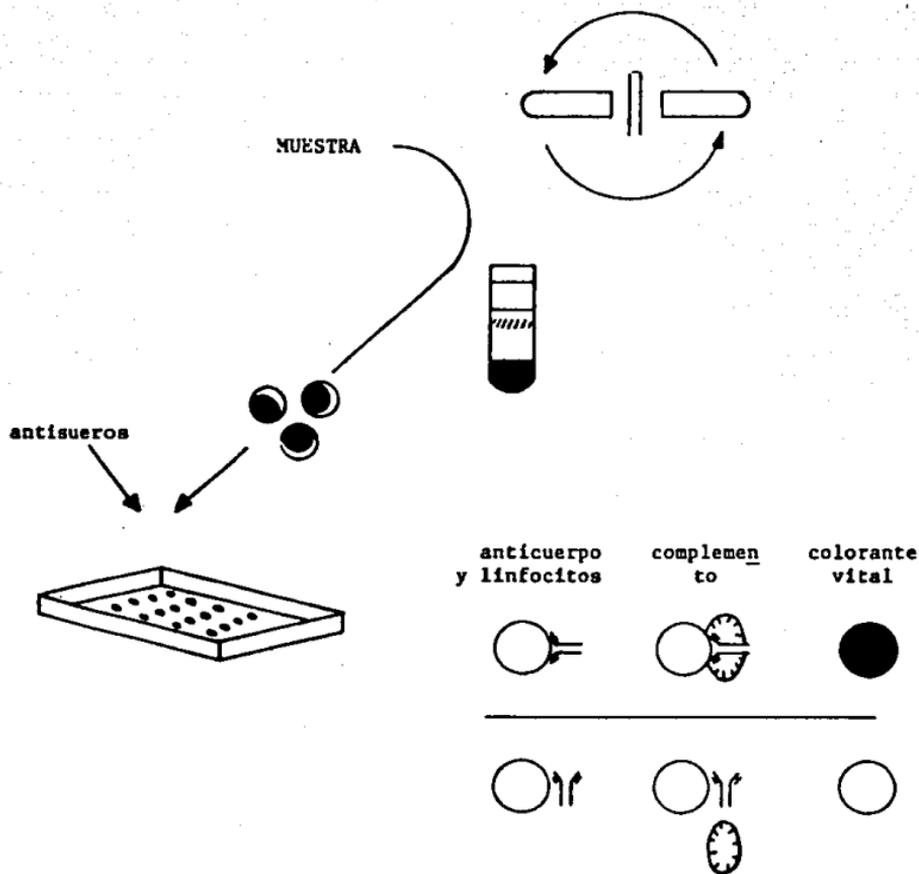


Figura 6. Técnica de Microcitotoxicidad (81).

ANALISIS ESTADISTICODETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD

Una vez probados los antisueros con las 30 células mexicanas y 30 caucásicas, se procedió al análisis de su comportamiento citotóxico y su correlación con los diferentes antígenos de histocompatibilidad previamente identificados en las células con antisueros de referencia. La información se obtiene comparando la reactividad entre sueros problema y sueros de referencia (panel celular). Para ello se elaboraron tablas de contingencia de 2 x 2 como sigue:

Suero de Referencia

		+	-
Suero problema	+	a	b
	-	c	d

De donde:

- a=células en las que ambos sueros resultaron citotóxicos.
- b=células en las que el suero de placenta fue citotóxico pero no el de referencia.
- c=células en las que el suero de referencia fue citotóxico pero no el de placentas.
- d=células en las que ambos antisueros resultaron no citotóxicos

Las reacciones contenidas en las casillas a y d son concordancias en cambio las de b y c son discordancias. Es raro encontrar sueros per-

fectamente concordantes, ya que entre otras cosas, pueden contener anticuerpos contra más de una especificidad. Para valorar si hay más concordancias que discordancias se aplica la ji cuadrada (X^2) y el coeficiente de correlación (r).

La prueba de X^2 valora la posibilidad de que la asociación sea debida al azar o bien sea significativa; se calcula a partir de la tabla de contingencia de 2×2 con la siguiente fórmula:

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

Donde $N = a+b+c+d$

El valor de X^2 siempre es positivo. Su valor límite es de 3.83 para un grado de libertad y tiene una $p \leq 0.05$; la p proporciona la posibilidad de que la asociación observada sea debida al azar por lo que, mientras menor sea su valor mayor es la X^2 y por tanto, mayor la significancia de asociación observada.

Cuando existe concordancia absoluta entre el suero de referencia y el suero problema el valor de X^2 tiende a ser igual al de N , lo que permite expresar la especificidad en términos de coeficiente de correlación aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Coef. de correlación } (r) = \sqrt{\frac{X^2}{N}}$$

El valor de (r) va de 0 a 1; un valor de cero indica que no hay asociación y el de 1 que existe concordancia total entre ambos sueros, los antisueros perfectos dan un valor de 1.0. Anteriormente, un valor de 3.82 se consideraba significativo, si bien la mayoría de los sueros no eran monoespecíficos pero en el Cuarto Taller Internacional de Histo-compatibilidad se establece que para definir grupos de antisueros útiles se considera un valor de $r = 0.8$ o más alto [13,50,91].

RESULTADOS

Selección de muestras citotóxicas.

Para determinar la citotoxicidad de los antisueros obtenidos de - placentas humanas, se probaron contra linfocitos de un grupo de 15 a 33 individuos de la población mexicana seleccionados al azar. De los 638 - sueros colectados, el 34.95% (223 antisueros) mostraron reactividad ci- totóxica, por lo que, solo estas muestras pasaron a la etapa de defini- ción (Tabla I).

Definición de especificidades.

La especificidad de cada antisuero fue determinada por citotoxici- dad utilizando células de 30 donadores mexicanos y confirmada por linfo- citos de 30 individuos seleccionados conformando un panel de referencia caucásico. Los sueros que presentaron un coeficiente de correlación mayor de 0.8 se consideraron útiles para fines de intercambio con otros laborato- rios; con los datos estadísticos se logró definir 45 antisueros (Tabla II).

De los 223 sueros que resultaron citotóxicos al 20.18% (45 sueros) de los antisueros se logró definir sus especificidades correspondientes (Tabla III).

Con las muestras útiles es posible establecer un lote de antisueros que permita detectar algunos de los determinantes antigénicos (Tabla IV).

Debido a su volumen mayor de 40 ml y sus valores de χ^2 y coeficiente de correlación (r) las muestras que resultaron útiles para intercambio Nacional e Internacional con otros laboratorios o bien para su aplicación fueron 21 antisueros (Tabla V).

Tabla I.

SELECCION DE MUESTRAS CITOTOXICAS

FUENTE	N	Citotoxicidad sobre células blanco	
		N	%
Placentas Humanas	638	223	34.95

De las 638 placentas procesadas, 223 fueron citotóxicas lo que representa 34.95% de las muestras totales.

Tabla II.

DEFINICION DE ESPECIFICIDAD

Clave	Especificidad HLA	Suero vs grupo				Asociación 2 x 2		
		++ a	+ b	-+ c	-- d	χ^2	r	N
INER-40	A29(w19)	1	0	1	24	12.48	0.69	26
INER-47	B44(12)	1	0	1	24	12.48	0.69	26
INER-51	A11	1	0	1	24	12.48	0.69	26
INER-64	B15	1	0	0	25	26.00	1.00	26
INER-66	B17	1	0	0	25	26.00	1.00	26
INER-75	A29(w19)	1	0	1	24	12.48	0.69	26
INER-96	A26(10)	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-168	A28	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-180	A26(10)	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-187	B15	1	0	0	32	33.00	1.00	33

Continua....

Tabla II.

DEFINICION DE ESPECIFICIDAD

Clave	Especificidad HLA	Suero vs grupo				Asociación 2 x 2		
		++ a	+ b	-+ c	-- d	χ^2	r	N
INER-202	B13	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-243	A11	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-283	A26(10)	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-290	B13	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-293	B7	2	0	2	29	14.43	0.69	33
INER-328	A11	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-344	B13	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-378	A26(10)	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-380	A11	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-383	A30(w19)	1	0	1	31	15.98	0.70	33

Continua....

Tabla II.

DEFINICION DE ESPECIFICIDAD

Clave	Especificidad HLA	Suero vs grupo				Asociación 2 x 2		
		++ a	+ b	-+ c	-- d	X ²	r	N
INER-386	A26(10)	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-425	B13	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-433	B17	1	0	1	31	15.98	0.70	33
INER-445	B35	1	0	0	14	15.00	1.00	15
INER-449	A29(w19)	2	1	0	12	9.23	0.78	15
INER-473	B35	1	0	0	14	15.00	1.00	15
INER-485	B35	1	0	0	14	15.00	1.00	15
INER-513	A3	1	0	1	13	6.96	0.68	15
INER-539	A3	1	0	1	13	6.96	0.68	15
INER-558	A29(w19)	2	1	0	12	9.23	0.78	15

Continua....

Tabla 11.

DEFINICION DE ESPECIFICIDAD

Clave	Especificidad HLA	Suero vs grupo				Asociación 2 x 2		
		++ a	+ b	+ c	-- d	X ²	r	N
INER-560	B15 (dil. 1:1)	2	0	1	27	19.28	0.80	30
INER-563	A2 (dil. 1:1)	9	0	2	19	22.0	0.86	30
INER-568	A11 (dil. 1:2)	4	0	1	25	23.07	0.87	30
INER-571	Bw42(dil. 1:1)	2	0	0	28	30.00	1.00	30
INER-575	B35+Bw62 (dil. 1:2)	3	0	0	27	30.7	1.00	30
INER-579	B17(57+58)(dil. 1:1)	3	0	0	27	30.00	1.00	30
INER-581	A26 (dil. 1:1)	3	0	1	26	21.66	0.84	30
INER-594	A1 (dil. 1:1)	7	0	2	21	21.30	0.84	30
INER-599	B5+B18+B35(dil. 1:1)	11	2	0	17	22.71	0.87	30
INER-607	A2	10	0	1	19	25.90	0.92	30

Continua...

Tabla II.

DEFINICION DE ESPECIFICIDAD

Clave	Especificidad HLA	Suero vs grupo				Asociación 2 x 2		
		++ a	+ b	-+ c	-- d	X ²	r	N
INER-615	B7 (dil. 1:1)	2	0	0	28	30.00	1.00	30
INER-621	Bw60+Bw48 (dil. 1:4)	4	0	0	26	30.00	1.00	30
INER-626	B12(44+45)(dil. 1:1)	6	0	0	24	30.00	1.00	30
INER-631	A1 (dil. 1:1)	9	0	0	21	30.00	1.00	30
INER-635	A2 (dil. 1:1)	11	0	0	19	30.00	1.00	30

En la tabla se muestran las especificidades de 45 antisueros obtenidas a partir de los datos estadísticos (X²) y (r) considerandose de 15 a 33 células. Solo se presentan los antisueros cuyo coeficiente de correlación fue mayor de 0.69.

Tabla III.

PORCENTAJE DE ANTISUEROS CON ESPECIFICIDADES ASIGNADAS

No. de Sueros Citotóxicos (N)	Sueros anti-HLA-A,-B		Especificidades Reconocidas
	N	Z	
223	45	20.18	22

De los 223 sueros que resultaron citotóxicos a 45 (20.18%) de ellos fue posible asignarles especificidad.

Tabla IV.

LOTE DE ANTISUEROS

A1	A26(10)	B7	B17
A1	A26(10)	B7	B17(57+58)
A2	A26(10)	B5+18+35	B35
A2	A26(10)	B12(44+45)	B35
A2	A26(10)	B13	B35
A3	A26(10)	B13	B35+Bw62
A3	A28	B13	Bw42
A11	A29(w19)	B13	B44(12)
A11	A29(w19)	B15	Bw60+Bw48
A11	A29(w19)	B15	
A11	A29(w19)	B15	
A11	A30(w19)	B17	

Con las muestras útiles es posible detectar 22 antígenos de histocompatibilidad.

Tabla V.

LISTA DE ANTISUEROS PARA INTERCAMBIO O APLICACION

Suero	Especificidad HLA	r	Volumen (ml)
INER-64	B15	1.00	80
INER-66	B17	1.00	90
INER-187	B15	1.00	50
INER-445	B35	1.00	74
INER-473	B35	1.00	130
INER-485	B35	1.00	135
INER-558	A29(w19)	0.78	50
INER-560	B15	0.80	40
INER-563	A2	0.86	40
INER-568	A11	0.87	40
INER-571	Bw42	1.00	50
INER-575	B35+Bw62	1.00	40
INER-579	B17(57+58)	1.00	50
INER-581	A26(10)	0.84	40
INER-594	A1	0.84	40
INER-599	B5+B18+35	0.87	50
INER-607	A2	0.92	40
INER-615	B7	1.00	40
INER-626	B12(44+45)	1.00	50
INER-631	A1	1.00	40
INER-635	A2	1.00	50

Considerando el volumen y el (r) 22 antisueros son útiles para intercambio

DISCUSION DE RESULTADOS

La selección de los antisueros fue hecha en base a la reactividad citotóxica (muerte de al menos 30% de las células). De los resultados obtenidos se puede observar que el 34.95% de todos los sueros probados fueron citotóxicos. Por ello solo éstos pasaron a la etapa de definición. De los 638 sueros más de una tercera parte fueron positivos lo que es comparable con datos reportados en la literatura (42). En esta primera fase, el número de sueros se redujó a un poco menos de la mitad, lo que representó un ahorro considerable en costo y trabajo (Tabla I).

Para la definición de las especificidades, se contó con un panel de células mexicanas, constituido por linfocitos cuyos fenotipos (Clase I) estaban bien definidos y por células con alelos que no fueron bien de terminados; estos últimos representaron un problema a resolver ya que pu diera tratarse de alelos locales no establecidos en nuestra población (8).

Con el fin de verificar nuestros resultados, fueron enviados a un centro de referencia (Dana Farber Cancer Inst. Boston, Mass.). Donde gentilmente determinaron especificidades frente a un panel de células caucásicas. No hubo diferencia en las especificidades asignadas a los antisueros y las establecidas en el laboratorio de trabajo (8).

Es importante mencionar que de los 223 sueros, únicamente 45 (20.18%) se lograron caracterizar a especificidades internacionalmente establecidas, determinándose 22 especificidades HLA-A, -B (Tabla II y III).

En la tabla II, se muestra el resultado de 15 sueros probados a di ferentes diluciones. A pesar de la dilución, el título de anticuerpos -

es suficiente para formar el complejo Ag-Ac y de esta manera aumentará el volumen del suero en cuestión (40).

De los sueros colectados una gran proporción (93.33%) fueron mono-específicos y están dirigidos a los loci A y B en frecuencias similares, el resto (6.67%) fueron sueros que reconocen a más de una especificidad (dispecíficos y trispecíficos) por lo que podemos decir que exhiben un patrón de reactividad muy restringido. Estos antígenos no son muy frecuentes en la población mexicana, de ahí que los sueros que los reconocen adquieren un gran valor en un laboratorio de tipificación (8).

Además, algunos antisueros citotóxicos con células mexicanas (cuyos fenotipos no fue posible definir) no reaccionaron con el panel clásico, e incluso se enviaron células locales congeladas a este laboratorio, para ver si ellos lograban definir los fenotipos pero tuvieron problemas para establecerlos. Esto nos lleva a pensar que este grupo de antisueros, aunque por el momento no tienen ninguna aplicación práctica son de suma importancia debido a que; probablemente sean alelos propios y característicos de nuestra población. Lo que puede ser una de las causas por las cuales no fue posible determinar todos los sueros.

Se obtuvieron dos tipos de sueros; el primero consiste en sueros que contienen solo un anticuerpo, los cuales pueden ser utilizados para fines de tipificación HLA en cualquiera de las aplicaciones del sistema HLA. El segundo tipo, comprende grupos de sueros que reaccionan con más de una especificidad, algunos de los cuales son dispecíficos y otros trispecíficos (como por ejemplo el B5+B18+B35). Las causas de estas últimas especificidades podrían ser; que el suero contenga anticuerpos que reaccionen contra más de un determinante antigénico del mismo locus o de loci diferentes. O bien que el antisuero reaccione en forma cruzada con

tra más de un antígeno formando grupos de reactividad cruzada (CREGS). Estos dos grupos se deben incluir dentro de los trabajos HLA para tener un diseño adecuado de un lote de antisueros Tabla IV (28).

Se utilizaron de 15 a 33 células mexicanas, debido a problemas de localización de los donadores. El volumen promedio obtenido a partir de las placentas fue de 50 ml. (Tabla V), cantidad suficiente para el intercambio con otros centros nacionales (8). Los antisueros presentan un grado de asociación significativa ($r > 0.7$) de ahí que deban seleccionarse (2).

En el trabajo se realizaron 39 324 microcitotoxicidades repartidas en 678 placas Terasaki; considerando el costo de material desechable y reactivos se tiene un global de \$ 6'600,000 M.N. Conforme al número de antisueros útiles y su volumen total, cada mililitro cuesta \$3 000 M.N., equiparando el costo comercial de estos mismos reactivos que es de \$840 000 M.N. por mililitro. Con los 45 que se obtuvieron se abatió en 280 veces el costo de dichos antisueros.

En trabajos previos a este (9), se utilizaron sueros de placentas humanas y pacientes transplantados, encontrando que el rendimiento en volumen de los sueros obtenidos a partir de pacientes transplantados, es mayor que el que resulta de exprimir placentas; sin embargo, un gran porcentaje de sueros son poliespecíficos lo que limita su aplicación en la definición de haplotipos y por lo que gran parte de los laboratorios internacionales utilizan como fuente de antisueros las placentas humanas (1). La frecuencia con la que se presentan sueros anti-HLA en mujeres multíparas es de 6% a 10%, lo que checa con los resultados obtenidos de 7.0% (93).

CONCLUSIONES

- De los 638 sueros de placenta obtenidos, 223 fueron citotóxicos de los cuales se logró determinar la especificidad de 45 de los mismos.
- Con las muestras útiles se creó un banco de antisueros que posteriormente será ampliado al continuar con este tipo de trabajos.
- El volúmen de los sueros con especificidades asignadas es el requerido para intercambio Nacional e Internacional con otros laboratorios.
- El costo comercial de los antisueros se logró abatir 280 veces.

Para continuar con este tipo de trabajos se propone que:

- 1).- Para evitar seleccionar miles de sueros negativos es necesario instituir la prueba cruzada durante el embarazo entre el suero de la madre y las células del padre (función del laboratorio clínico).
- 2).- Para descartar la posibilidad de tener sueros poliespecíficos, hay que considerar el número de embarazos de la madre (menor de seis) y que sean de un solo individuo.
- 3).- Es importante implementar la técnica de congelamiento de células en placa y reunir un panel con todas las especificidades conocidas.
- 4).-Para cubrir las necesidades de reactivo anti-HLA en México y considerando los rendimientos se requieren procesar 20 000 placentas anuales a razón de 2000 por mes.
- 5).- Utilizar poblaciones de diferentes grupos étnicos con el fin de detectar nuevos alelos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Albert, E.D. (1984) Nomenclature for factors of the HLA system 1984, *Tissue Antigens*, 24, 73-78.
- 2.-Albert, E.D. (1987) Nomenclature for factors of the HLA system 1987, 10th. International Histocompatibility Testing Workshop, New York U.S.A. 10.
- 3.-Barret, J.T. (1985) Inmunoquímica e inmunobiología, 4ª Edic., Ed. Nva. Editorial Interamericana S.A. México, 145..
- 4.-Benacerraf, B. (1981) Role of gene products in immune regulation, - *Science*, 212, 1229-1238.
- 5.-Bodmer, J.G., Marsh, G.E., Parham, P., Erlich, A.H. Nomenclature for factors of the HLA system 1989, *Vox Sang.* (En prensa).
- 6.-Bodmer, W.F. (1981) HLA structure and function: a contemporary view, *Tissue Antigens*, 17, 9-20.
- 7.-Bodmer, W.F. (1978) The HLA system introduction, *Br. Med. Bull.* 34:3, 213-216.
- 8.-Camarena, O.A., Lezcano, M.D. (1989) Centro de referencia de antisue-
ros HLA, *Boletín de la Sociedad Panamericana de Diálisis
y Transplantes*, 1:1, 7-8.
- 9.-Camarena, O.A. (1986) Obtención de antisue-
ros tipificadores del sis-
tema HLA-A,-B a partir de placentas humanas y pacientes
transplantados, Tesis de Lic. Q.F.B., FES Cuautitlán,
México D.F.
- 10.-Carrel, A. (1902) The technique for vascular anastomes and transplan-
tation of viscera, *Lyon Medicine*, 98, 859.
- 11.- Dausset, J. (1958) Iso-leuco-anticorps, *Acta Haematol.*, 20, 156-8.

- 12.-Eathallah, D., Abbal, M., Thomsen, A. (1985) A DNA restriction fragment length polymorphism in the complement region of the human MHC shows an absolute correlation with polymorphism of complement factor B (Bf) defined by isoelectric focusing, *Journal of Immunogenetics*, 12, 321-326.
- 13.-Festenstein, H., Demant, P. (1981) *Inmunogenética fundamental, biología y aplicaciones clínicas del HLA y H-2*, Ed. El Manual Moderno, México, 298.
- 14.-Figuroa, F. (1988) Mapping of the sud-2 locus into the complex on mouse chromosome 17, *Immunogenetics*, 28:4, 260-264.
- 15.-Figuroa, F. (1988) MHC polymorphism pre-dating speciation, *Nature*, 15:335, 265-7.
- 16.-Fluit, L., Reekers, P., Claas, H.J. (1989) Are maternal HLA antigens protective for antibody formation?, *Transplantation Proceedings*, 21:1, 689-690.
- 17.-Forman, J. (1987) Determinants on major histocompatibility complex class I molecules recognized by cytotoxic T lymphocytes, *Adv. Immunol.*, 41, 135-179.
- 18.-Fudenberg, H. (1985) *Inmunobiología básica y clínica*, 5ª Edic., Ed. El Manual Moderno, México, pp. 56-68.
- 19.-Gill, T.J. (1983) Immunogenetics of spontaneous abortions in humans, *Transplantation*, 35:1, 1-6.
- 20.-Goulub, E.S. (1981) *The cellular basis of the immune response*, Ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland Mass., 22.
- 21.-Gorer, P.A. (1936) The genetic and antigenic basis of tumor transplantation, *J. Pathol. Bact.*, 44, 691.
- 22.-Gorer, P.A., Lyman, S., Snell, G.D. (1948) *Studies genetic and anti-*

genetic basis of tumor transplantation linkage between a histocompatibility gene and "fused" in mice, Proc. Roy. Soc., 135, 499-505.

- 23.-Hedrick, S.M. (1988) Specificity of the T cell receptor for antigen, Adv. Immunol., 43, 193-234.
- 24.-Hors, J. (1986) Maladies associées à HLA, la situation en 1986, Pathol. Biol., 34:6, 705-706.
- 25.-Hunt, J.S., Fishback, J.L., Andrews, G.K., Wood, G.W. (1988) Expression of class I HLA genes by trophoblast cells, J. Immunol., 15:4, 1293-1299.
- 26.-Inoko, H., Ando, A., Trowsdale, J. (1989) Mapping nucleotide sequence and polymorphism of a new HLA class II light chain gene, Transplantation Proceedings, 21:1, 621-623.
- 27.-Jelachich, M.L. (1989) Class I antigen presentation, Year Immunol., 4, 41-58.
- 28.-Joysey, V.C. (1978) HLA-A,-B,-C antigens, their serology and cross reaction, Br. Med. Bull., 34:3, 217-222.
- 29.-Kasahara, M., Klein, J. (1989) Nucleotide sequence of a chimpanzee DOB cDNA clone, Immunogenetics, 30:1, 66-68.
- 30.-Keneedy, L.J., Bodmer, J.G. (1987) Applications of serology and the ethnic distribution of three locus HLA haplotypes, Br. Med. Bull., 43:1, 94-121.
- 31.-Keneedy, L.J. (1987) A European workshop to investigate technical - problems of using HLA monoclonal antibodies in microcytotoxicity assays, Tissue Antigens, 29:1, 43-54.
- 32.-Kissemeyer, N.F., Kjerbye, K.E. (1972) HL-A antisera and their identification, Tissue Antigens, 2, 182-188.

- 33.- Klein, J. (1986) Natural history of the major histocompatibility - complex, New York, Wiley. 49.
- 34.-Koeller, D., Ozato, K. (1986) Evaluation of structure function relationships of MHC class I antigen by molecular genetic - techniques, Year Immunol., 2, 195-204.
- 35.-Koene, R. (1989) Major histocompatibility antigen expression in rejection: cause or consequence, Transplantation Proceedings, 21:1, 602-604.
- 36.-Lamm, L.U., Petersen, G.B. (1979) The HLA genetic linkage group, Transplantation Proceedings, 11:4, 1692-1696.
- 37.-Lancet, D., Parham, P., Strominger, L.J. (1979) Heavy chain of HLA-A and HLA-B antigens is conformationally labile: a possible role for B₂-microglobulin, Proc. Natl. Acad. Sci., 76:8, 3844-3848.
- 38.-Lanier, L.L., Allison, J.P. (1987) Structure, function and serology of the T-cell antigen receptor complex, Annu. Rev. Immunol., 5, 503-540.
- 39.-Layrisse, Z., Simmone, N., Balbas, D., García, E., Stoikow, Z. (1988) Citotoxic antibodies in sera of Venezuelan multiparous - women of Amerindian and mixed ethnic origin, Tissue Antigens, 23, 117-126.
- 40.-Lezcano, M., Camarena, O.A. (1988) Manual de histocompatibilidad, - Sociedad Mexicana de Histocompatibilidad y Transplante, INER, México D.F., 38.
- 41.-Lilly, F. (1966) The inheritance of susceptibility to the gross leukemia virus in mice, Genetics, 53, 529-530.
- 42.-Lobo, P.I. (1982) Development of anti-HLA antibodies following renal

transplantation their characteristics and natural history, *Tissue Antigens*, 19, 356-365.

- 43.-Mach, B., Gorski, J., Rollini, P., Berte, C., Amaldi, J. (1986) Polymorphism and regulation of HLA class II genes of the major histocompatibility complex, Cold Spring Harbor - Laboratory, 1:1, 67-74.
- 44.-Macpherson, T.A., Kunz, H.W., Gill, T.J. (1987) Localization of the pregnancy-associated and the class I transplantation - antigens on the placenta and fetus, *Transplantation Proceedings*, 19:1, 555-558.
- 45.-Madrigal, J.A., Yunis, J.E. Base genética y función del complejo mayor de histocompatibilidad, *Tissue Antigens*, (En prensa).
- 46.-Maryanski, J., Janet, L., Pala, P., Corradin, G. (1988) Synthetic - peptides as antigens and competitors in recognition by H-2 restricted cytolytic T cells specific for HLA, *Journal Experimental Medical*, 167, 1391-1405.
- 47.-McCluskey, J., Rozanne, B. (1989) The role of major histocompatibility in antigen specific immune responses, *Transplantation - Proceedings*, 21:1, 591-594.
- 48.-McDevitt, H.O. (1980) The role of h-2 I region gene in regulation of the immune response. Furugereau A. and Dausset J., Ed. Fourth International Congress of Immunology 80, Academic Press, París Francia, pp. 503-512.
- 49.-McMichel, A.J., Parham, P., Rust, N., Brodsky, F. (1980) A monoclonal antibody that recognizes and antigens determinant - shared by HLA A2 and B17, *Human Immunology* 1, 121-129.
- 50.-Mendell, N. (1978) Chi square and correlation and their application

- 51.-Mioller, E., Carlsson, B., Wallin, J. (1988) Serologic HLA-DR typing is not sufficient for definition of class II compatibility, *Transplantation Proceedings*, 20:3, 375-376.
- 52.-Morin, L., Tiliainen, A., Hartikainen, A.L. (1984) Maternal HLA immunization during pregnancy: presence of anti HLA antibodies in half of multigravidous women, *Medical Biology*, 62, 323-325.
- 53.-Novotny, J., Bruccoleri, R.E., Kourilsky, P. (1989) On the molecular nature of "restrictive" antigenic elements present on - major histocompatibility complex (MHC) proteins, *Res. Immunol.*, 140:2, 145-158.
- 54.-Parham, P., McClean, J. (1980) Characterization, evolution and molecular basis of a polymorphic antigenic determinant shared by HLA-A and products, *Human Immunology* 1, 131-139.
- 55.- Parham, P. (1988) Function and polymorphism of human leukocyte antigen -A, -B, -C molecules, *The American Journal of Medicine*, 85:23, 2-5.
- 56.-Parham, P. (1988) Histocompatibility typing-Mac is back town, *Immunology today*, 9:5, 127-130.
- 57.-Parham, P., Bodmer, W.F. (1980) Monoclonal antibody to a human histocompatibility alloantigens HLA-A2, *Nature*, 276:23, 397-399.
- 58.-Parham, P., Lomen, C.E., Lawlor, D.A., Ways, J.P., Holmes, N. (1988) Nature of polymorphism in HLA-A,-B,-C molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 4005-4009.
- 59.-Park, S.M., Barbetti, A., Takenouchi, T., Terasaki, P.I. (1989) Analysis of class II RFLP patterns and T-cell clone reactions, *Immunobiology of HLA*, 1; 921-942.

- 60.-Park, S.M., Terasaki, P.I., Barbetti, A., Han, H., Cecka, J.M. (1989) Significance of the HLA molecular structure to transplantation, *Clinical Transplants*, 32, 301-328.
- 61.-Partanen, J. (1986) Molecular genetics of human major histocompatibility complex; clinical applications, *Annals of Clinical Research*, 18, 271-276.
- 62.-Petrov, R.V. (1987) *Inmunologia*, Ed. Moscú URSS, pp.147-155.
- 63.-Reinsmoen, N.L., Bach, F.H. (1987) Immunogenetics and polymorphism of the main histocompatibility complex, *Transplantation Proceedings*, 19:1, 839-841.
- 64.-Richiardi, P., Pellegrino, A.M., Ferrone, S. (1979) Xenoantisera to allotypic specificities of HLA-A and B antigens, *Transplantation*, 28:4, 333-338.
- 65.-Riisom, K., Sorensen, I.L., Moller, B., Kruse, T.A., Lamm, L.U. (1988) HLA-DR typing using restriction fragment length polymorphism (RFLP) with one enzyme and two probes, *Tissue Antigens*, 31:3, 141-150.
- 66.-Sanfilippo, F., Baldwin, W.M. (1989) Antibodies and graft rejection, *Transplantation Proceedings*, 21:1, 605-608.
- 67.-Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Samraoui, W.S. Strominger, J.L. (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2, *Nature*, 14:329, 506-512.
- 68.-Saper, M.A. (1987) The foreign binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens, *Nature*, 14:329, 512-518.
- 69.-Sargent, I.L., Wilkins, T., Redman, C.W. (1988) Maternal immune responses to the fetus in early pregnancy and recurrent mis

- carriage, *Lancet*, 12:2, 1099-1104.
- 70.-Schreuder, T.M. (1989) Serological definition of HLA-DR and DQ polymorphisms, Thesis Leiden Foundation for Medical and Health Research, Alemania, pp. 3-19.
- 71.-Serjeatson, S.W. (1989) The reasons for MHC polymorphism in man, *Transplantation Proceedings*, 21:1, 598-601.
- 72.-Simmons, M.J., Jait, B.D. (1984) Detection of immune-associated genetic markers of human disease, Ed. Churchill Livingstone, New York U.S.A., 135.
- 73.-Smith, J., Bulmer, J.N., Morrison, L., Wells, M. (1988) Maternal and fetal cellular relationships in the human placental basal plate, *Placenta*, 9:3, 237-246.
- 74.-Snell, G.D. (1948) Methods for the study of histocompatibility genes, *Genetics*, 49, 87-103
- 75.-Srivastava, R., Chorney, J.M., Lawrance, K.S., Smith, Z. (1988) Structure, expression and molecular mapping of a divergent member of the class I HLA gene family, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 4224-4228.
- 76.-Stratta, R. (1989) Risk factors for sensitization by blood transfusions, *Transplantation*, 47:1, 140-144.
- 77.-Strominger, J.L. (1986) Biology of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) system and hypothesis regarding the generation of autoimmune diseases, *J. Clin. Invest.*, 77, 1411-1415
- 78.-Strominger, J.L. (1987) Structure of class I and class II HLA antigens, *Br. Med. Bull.*, 43:1, 81-93.
- 79.-Strominger, J.L. (1981) Structure of the major human histocompatibility antigens (HLA-A and HLA-B), evolutionary and functional

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- implications, *Transplantation Proceedings*, 13:1, 902.
- 80.-Tauter, Ch. (1988) HLA-System, Edited by Johansen, behringwerke AG West Germany, 12.
- 81.-Terán, O.L. (1988) Bioquímica e inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, pp. 525-538.
- 82.-Terasaki, P.I., Perdue, S., Loon, J., Park, M.S. (1978) International cell exchange, *Transplantation Proceedings*, 10, 4.
- 83.-Terasaki, P.I., Bernoco, D., Park, S.M., Ozturk, G., Iwaki, Y. (1978) Microdroplet testing for HLA-A,-B,-C and -D antigens, *Am. J. Clin. Path.*, 69, 103-120.
- 84.-Thorsby, E. (1987) Structure and function of HLA molecules, *Transplantation Proceedings*, 19:1, 29-35.
- 85.-Timothy, J.S., Evovold, B., Sueki, H., Yokoyama, A. (1988) Antigenicity of passively acquired major histocompatibility antigens on T cells, *Transplantation*, 46:1, 137-143.
- 86.-Townsend, A., McMichel, A. (1987) MHC protein structure . Those images that yet fresh images beget, *Nature*, 14:329, 482-483.
- 87.-Trapani, J., (1989) Molecular mapping of a new public HLA class I epitope,, shared by all HLA-B and HLA-C antigens and defined by a monoclonal antibody, *Immunogenetics*, 29, 25-32.
- 88.-Vaidya, S., Keesy, J. (1989) A micromethod for absorption of HLA class I antibodies, *Transplantation Proceedings*, 21:1, 726-727.
- 89.-Van Rood, J.J., Van Leeuwen, A., Eermise, J.G. (1959) Leucocyte antibodies in the sera of pregnant women, *Vox Sang.*, 4, 427-444.
- 90.-Widgymar, R.A. (1984) Generalidades sobre el sistema de histocompati-

bilidad, Rev. Invest. Clin., 36, 287-292.

- 91.-Wohlgenuth, A. (1987) Symbolic reinterpretation of HLA gene products impact on interpretation of HLA data at the molecular - level, División de Immunogenetics, Dana Farber Cancer Institute, Boston Mass. U.S.A., 3:3, 223-238.
- 92.-Wood, K.J., Bengham, C.R., Bushell, A., Morris, P.J. (1988) An interactive computer program for the analysis of class II restriction fragment patterns, Human Immunol., 21:2, 125-132.
- 93.-Zachary, A., DeJelo, C.L., Kayhoe, D.E., Braun, E. (1980) Manual of clinical immunology, 2^a Edic. Ed. American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 966-977.
- 94.-Zappacosta, S. (1985) The associations between CAH and HLA in Southern Italy, Ann. NY Acad. Sci., 458, 46-51.
- 95.-Zhao, T.M., Lee, T.D., Daver, R.J., Simmons, T., Lee, G. (1988) A new specificity, SH7 (Bw75), defined by antisera produced by planned immunization, Tissue Antigens, 32:2, 93-99.