

50
deje.



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

**Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLAN**



**El Cultivo Mixto de Linfocitos (MLC): Cinética de Proliferación
Celular y su Capacidad Predictiva de una Futura Reacción
Inmunológica Hacia Aloantígenos HLA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
PATRICIA RAMIREZ NOGUERA

Directores de Tesis:
M. en C. MARIA EUGENIA GONSEBATT B.
DR. LUIS ANGEL TERAN O.

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
AVENIDA LLANES
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JACKE KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N. Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
"El cultivo Mixto de Linfocitos (MLC) : Cinética de proliferación celular y su capacidad predictiva de una futura reacción inmuno-lógica hacia antígenos HLA".

que presenta la pasante: Patricia Ramírez Neguera
con número de cuenta: 9508592-1 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica Biotecnológica.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.. a 1° de Diciembre de 1975

PRESIDENTE M. en C. María Eugenia Gensebatt Bonanarte [Firma]
VOCAL O. F. E. Idalia Avila Nivazawa [Firma]
SECRETARIO Dr. Marco Antonio Vaya López [Firma]
PRIMER SUPLENTE O. F. E. María Esther Revuelta Miranda [Firma]
SEGUNDO SUPLENTE O. F. E. Víctor Manuel Tendejas Buitrón [Firma]

A MIS PADRES:

Por todo el amor, cariño y tenacidad que siempre me han
alentado.

Gracias Betty y Pedro

A MIS HERMANOS:

Beatriz Carolina y Rodrigo

A quienes quiero y de los que he aprendido tanto.

A ROBERTO:

Por todo el cariño y amor brindado.

AGRADECIMIENTOS

A Maricha por tu entusiasmo y apoyo incondicional en todo momento que fructificó en éste trabajo.

A la Dra. Patricia Ostrosky Wegman por haber permitido realizar la mayor parte de éste trabajo en su laboratorio y por su apoyo.

Al Dr. Luis A. Terán O. por los consejos, comentarios y sugerencias recibidas que fueron tan valiosas en la realización de éste trabajo.

Al Q.F.B. Angel E. Camarena y a la Bióloga Armida por su colaboración en la tipificación de los antígenos HLA.

A la Q.F.B. Diana Lezcano por su apoyo en el análisis citométrico.

A mis compañeros de laboratorio por los buenos momentos.

C O N T E N I D O

ABREVIATURAS

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

RESUMEN

INDICE GENERAL	HOJA
<u>I. ANTECEDENTES</u>	1-2
<u>II. INTRODUCCION</u>	3-33
2.0 LINFOCITOS	3-4
2.1 RECONOCIMIENTO ANTIGENICO	5-6
2.2 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD	8-17
2.2.1 Estructuras	
2.2.2 Tipificación moléculas clase I y clase II	
2.3 CICLO CELULAR	18-23
2.3.1 Fases del ciclo celular	
2.4 METODOS PARA LA EVALUACION DE LA PROLIFERACION CELULAR	24-26
2.5 CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS	27-33
2.6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
<u>III. HIPOTESIS</u>	35
<u>IV. OBJETIVOS</u>	36
<u>V. MATERIAL Y METODOS</u>	37-45
5.0 MATERIAL	37
5.1 EQUIPOS Y APARATOS	37
5.2 REACTIVOS Y SOLUCIONES	38
5.3 METODOLOGIA	39-47
5.3.1 Toma de muestras	
5.3.2 Separación de células	
5.3.3 Cultivo Mixto de Linfocitos	
5.3.4 Citometría de flujo	
5.3.5 Análisis al microscopio	
i) Cinética celular	
ii) Índice mitótico	
5.3.6 Tipificación de antígenos clase I y II.	
5.3.7 Análisis estadístico	
<u>VI. RESULTADOS</u>	48-60
<u>VII. DISCUSION</u>	61-66
<u>VIII. CONCLUSIONES</u>	67-68
<u>IX. REFERENCIAS</u>	68-76

ABREVIATURAS

APC	Célula presentadora de antígeno
BrdU	Bromodesoxiuridina
CC	Ciclo celular
CHO	Cadena lateral carbohidratos
COOH	Carboxilo terminal
CPC	Cinética de proliferación celular
CYT	Región corta citoplásmica
DNA	Acido desoxirribonucleico
HEPES	Acido (N-<2-hidroxiethyl>)piperazina etanosulfónico
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
J-HT	Timidina tritiada
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-2r	Receptor de interleucina 2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IFN	Interferón
I.M.	Indice mitótico
I.R.	Indice de replicación
LT	Linfocito T
LTC	Linfocito T citotóxico
LTH	Linfocito T cooperador
M1	Metafase de primera división
M2	Metafase de segunda división
M3	Metafase de tercera división o subsecuente.
M	Mitosis
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MLC	Cultivo mixto de linfocitos
MLI	Interacción mixta de linfocitos
MLR	Reacción mixta de linfocitos
-NH ₂	Amino terminal
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PHA	Fitoheماغلوتينina
-PO ₄	Fosfato
RNA	Acido ribonucleico
S-S	Enlaces disulfuro
TCR	Receptor de células T
TM	Región transmembranal hidrofóbica

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	HOJA
Figura 1 Reconocimiento antigénico	7
Figura 2 Mapa génico del MHC	9
Figura 3 Estructura de antígenos clase I y II	14
Figura 4 Ciclo celular de los linfocitos	23
Figura 5 Modelo para el análisis de proliferación celular	26
Figura 6 Promedios de los índices de replicación a los 8 y 10 días cultivo	54
Figura 7 Promedios de los índices mitóticos a los 8 y 10 días de cultivo	56
Figura 8 Subpoblaciones linfocitarias CD4+ a los 8 y 10 días de cultivo	59
Figura 9 Subpoblaciones linfocitarias CD8+ a los 8 y 10 días de cultivo	60
Tabla 1 Transplantes realizados a la fecha en México	28
Tabla 2 Haplotipos HLA	48
Tabla 3 Proporciones metafásicas, índice mitótico e índice de replicación en MLC a los 8 días de cultivo	51
Tabla 4 Proporciones metafásicas, índice mitótico e índice de replicación en MLC a los 10 días de cultivo	52
Tabla 5 Subpoblaciones iniciales CD4+ y CD8+	57

RESUMEN

El cultivo mixto de linfocitos (MLC), es un ensayo útil en el estudio de la respuesta inmune mediada por células y que está controlado por moléculas de clase II (HLA-DP, -DQ, -DR) del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en el humano (HLA).

Este ensayo se usa clínicamente para la determinación de compatibilidad en el transplante de órganos (riñón, médula ósea, entre otros), especialmente entre miembros de una familia. Idealmente el donador y el receptor no deben estimularse mutuamente de tal manera que la respuesta proliferativa de los linfocitos sea "insignificante" o nula.

El MLC puede ser realizado de manera unidireccional o bidireccional. En el primer caso las células de uno de los individuos son tratadas con mitomicina C o radiación y la proliferación existente es debida al estímulo generado por el otro individuo (células respondedoras). En el MLC bidireccional ambos grupos celulares actúan como estimuladoras y respondedoras.

Las células involucradas en esta reacción, son principalmente los linfocitos T (LT), cuya proliferación puede ser determinada mediante la incorporación de timidina tritiada o por el método de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) que en este caso fué el elegido.

Se realizaron cultivos mixtos bidireccionales de linfocitos entre individuos emparentados y no emparentados cultivados durante 8 y 10 días. Los resultados revelaron una cinética de proliferación celular incrementada en aquellos MLC en los que participaban individuos no emparentados, en comparación con la que se encontró en los MLC de individuos emparentados y que se determinó mediante el índice mitótico (I.M.) y proporciones metafásicas de primera (M1), segunda (M2) y tercera (M3) división (diferenciadas por la tinción específica para cromátidas).

Por otro lado se determinaron las subpoblaciones linfocitarias predominantes en cada cultivo mediante citometría de flujo. En los MLC con 100% de compatibilidad hacia los antígenos HLA de clase I y II las proporciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ no variaron entre sí de manera significativa en ninguno de los períodos de cultivo, mientras que en los que existía un 50% de compatibilidad para estos antígenos, la proporción de LT CD8+ tendían ligeramente en promedio a incrementarse conforme transcurría el período de cultivo; presentándose la misma tendencia en aquellos MLC entre individuos no emparentados.

I. ANTECEDENTES.

La respuesta inmune es resultado de la interacción del antígeno con células efectoras y reguladoras, cuyo objetivo principal es el de defender al organismo de los diversos agentes infecciosos y aquellos potencialmente patógenos.

Dentro de las células involucradas en la respuesta inmune se encuentran los linfocitos T que son los mediadores de la respuesta inmune celular en colaboración con otras células fagocíticas.

Tanto el desarrollo de técnicas de cultivo así como el establecimiento de métodos "in vitro" que simulen procesos de inmunización "in vivo", han provisto de herramientas para el estudio de la inmunidad mediada por células.

Uno de estos ensayos de monitoreo inmunológico, con potencial predictivo de una reacción humana hacia aloantígenos es el cultivo mixto de linfocitos (MLC).

En 1961 R. Schreck y W. J. Donnelly, en un estudio sobre las diferencias entre cultivos de leucocitos normales y de individuos leucémicos, observaron, en un cultivo de 5 días, un número pequeño de "células grandes" con núcleo prominente y algunas de ellas en mitosis. Los investigadores notaron que los cultivos habían sido realizados con sangre de 2 individuos, sin imaginarse que la respuesta proliferativa

era debida a la reacción mixta de linfocitos (MLR) descrita tiempo después (1).

El descubrimiento se realizó más tarde por dos grupos de investigadores Barbara Bain y Col. y Fritz H. Bach con Kurt Hirschhorn; quienes demostraron que cocultivando leucocitos de individuos no relacionados, éstos se transformaban en blastos y proliferaban de manera similar a aquellos a los que se les adicionaban mitógenos (2,3).

Dos años después el grupo de Fritz H. Bach describió un método en el cual, a diferencia del anterior, existía un grupo de "células respondedoras" frente a otro grupo celular estimulador que se trataba con Mitomicina C para evitar la replicación de su DNA y, por lo tanto, la respuesta proliferativa existente era debida las células respondedoras (4).

En general, el cocultivo de linfocitos provenientes de dos individuos es referido como cultivo mixto de linfocitos (MLC), y la reacción dada en el cultivo se conoce como reacción mixta de linfocitos (MLR) o bien interacción mixta de linfocitos (MLI). Ahora se sabe que el cultivo mixto de linfocitos (MLC) constituye una forma especial de estimulación antigénica producida por antígenos HLA alogénicos en los linfocitos (5).

II. INTRODUCCION

2.0 LINFOCITOS

Los linfocitos son producidos en los órganos linfoides primarios o centrales (timo y médula ósea) en elevada cantidad (10^9 /día). Estas células median dos tipos generales de funciones inmunológicas: la efectora y la reguladora (5).

Dentro de las funciones efectoras están incluidas, las reacciones de hipersensibilidad tardía, el rechazo de aloinjertos, la inmunidad humoral y la reactividad de injerto contra huésped (5).

Las funciones reguladoras de las células T están representadas por su capacidad para controlar la citotoxicidad mediada por células T y la producción de inmunoglobulinas por linfocitos B (5).

Los linfocitos T y B son activados por estimulación antigénica. Para que esto ocurra el antígeno debe ser "presentado" a los linfocitos por células accesorias. Esta interacción involucra el reconocimiento de moléculas específicas en la superficie de ambas células. Esta activación trae consigo un incremento en la síntesis de proteínas y en la expresión de un gran número de moléculas de superficie induciendo la aparición de marcadores adicionales (marcadores de activación), como la interleucina

2 (IL-2) y su receptor (IL-2r), moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase II, receptores de transferrina, entre otras (5).

Existen dos subpoblaciones de células T, que pueden ser distinguidas de acuerdo a su expresión de glicoproteínas de membrana llamadas CD4 y CD8, que pueden ser definidas con anticuerpos monoclonales. El grupo de células CD4+, expresan una glicoproteína de 62 kD; mientras que el de células CD8+ expresan una glicoproteína de 76kD. Estas moléculas actúan como receptores para moléculas del MHC clase I y de clase II, respectivamente, y ambas contribuyen al reconocimiento de antígenos por parte de la célula T (reconocimiento inmune) y a su activación (6,7). Las subpoblaciones de células T no solamente difieren en sus marcadores de superficie, sino que también presentan funciones efectoras específicas dentro de la cooperación celular. Dentro de las células CD4+ existen las inductoras o efectoras y las de ayuda o cooperadoras (LTH) mientras que dentro de las CD8+ existen las supresoras y las citotóxicas (LTC) (7).

El período de reconocimiento antigénico, involucra la respuesta de las células T por la síntesis y secreción de citocinas y de los receptores correspondientes de alta afinidad con la subsecuente expansión clonal (5,7).

2.1 RECONOCIMIENTO ANTIGENICO

Las células T reconocen directamente al antígeno sobre la superficie de células presentadoras de antígeno (APC). La gran mayoría de antígenos requieren procesamiento intracelular antes de que puedan ser presentados a las células T en forma inmunogénica siendo ésto un rasgo común de las reacciones inmunes involucradas con células T (8). Si por cualquier caso la degradación interna del antígeno es bloqueada, las APC son incapaces de presentar el antígeno (1,8).

Los LTH, reconocen el antígeno sobre APC con restricción genética por el MHC, es decir, el haplotipo que deberá presentar la APC deberá ser el propio, ésto implica que las células T pueden de alguna manera reconocer el antígeno y el MHC sobre otras células (8), dicho proceso se describirá más ampliamente.

La mayoría de las células T que expresan moléculas CD4+ reconocen al antígeno en asociación con moléculas de clase II en la APC. Mientras que las células CD8+ reconocen al antígeno en asociación con moléculas de clase I (5,6) (Fig. 1) y se conocen como células T citotóxicas. Principalmente pertenecen al grupo de linfocitos CD8+. Sin embargo una minoría de LTC (menor del 10%) son CD4+ (6).

Los LTC son una subpoblación de linfocitos pequeños, los cuales son importantes en la destrucción de células infectadas por virus, tumorales, células de trasplante alogénico y xenogénico (6).

La importancia de las células T cooperadoras CD4+ es la provision de citocinas. Tal es el caso de la IL-2 y la interleucina 4 (IL-4) que promueven el crecimiento dependiente de antígeno y la diferenciación de las células efectoras "in vitro" (6).

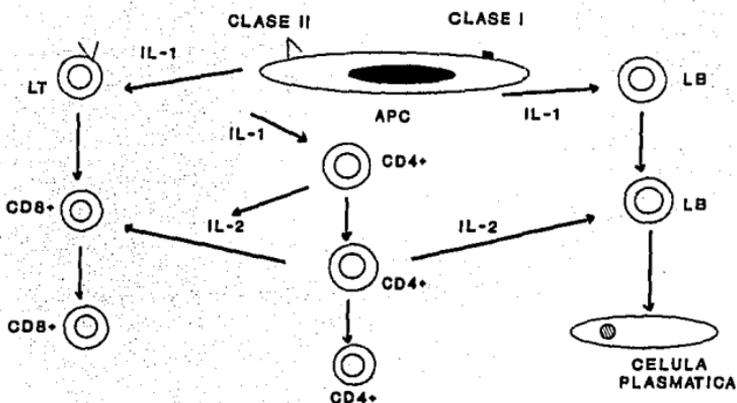


Fig. 1 Reconocimiento antigénico

Reconocimiento del LT al antígeno Δ procesado por las APC en asociación con moléculas clase II y clase I que induce la secreción de citocinas reguladoras de la respuesta inmune celular y humoral.

2.2 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I Y II

En 1931 Landsteiner, sugirió que de manera similar a los grupos sanguíneos, podía haber antígenos involucrados en la aceptación o rechazo de tejidos a transplantar, al encontrarse, por primera vez, anticuerpos leucoaglutinantes en los sueros de pacientes politransfundidos y en los sueros de 20-30% de las mujeres multíparas. El análisis de los patrones de reacción de estos antisueros indicó que cada uno de éstos daba reacción positiva con las células de algunos, pero no de todos los individuos y que antisueros diferentes reaccionaban de manera cruzada con las células de diferentes poblaciones de individuos. Este patrón de reacciones sugirió que los antisueros estaban identificando aloantígenos, es decir, antígenos presentes en las células de individuos de una misma especie los cuales eran producto de un locus genético polimórfico (5).

El nombre de antígenos de histocompatibilidad se adoptó para estos antígenos involucrados en el rechazo a un injerto. Están codificados por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (Fig.2), (8). Se reconoce ahora que las proteínas codificadas en esta región están involucradas en muchos aspectos del reconocimiento inmunológico, incluyendo interacciones entre diferentes células linfoides, y en las que se ven involucrados linfocitos y APC (9,10).

Con base a su distribución tisular y estructural los antígenos HLA (antígenos de leucocitos humanos), se han dividido en 2 clases:

Antígenos de clase I, llamados también antígenos típicos de histocompatibilidad, incluyen a los antígenos HLA-A, HLA-B y HLA-C. Su función principal es la de mediar el reconocimiento de antígenos nominales por los LTC con fenotipo CD8+ (9,10), (Fig. 2).

Los antígenos de clase II, incluyen a los antígenos HLA-D, HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Esta moléculas presentan una distribución más restringida, se encuentran en algunos componentes del sistema inmune, incluyendo células B, células del linaje monocito/macrófago (células epiteliales, de Langerhans y células dendríticas), epitelio tímico y células T activadas. Así mismo, pueden expresarse sobre algunas células tumorales (11,12), (Fig. 2)

Cromosoma 6

D	Clase III	B	C	A
CLASE II	CLASE III	CLASE I		
<u>CLASE II</u>				
-DP	-DQ	-DR		
-DZ	-DO	-DX		

Figura 2. Mapa génico del MHC. Se esquematiza el brazo corto del cromosoma 6 en el cuál se encuentran los genes que codifican para los antígenos clase I (HLA-A, -B, -C), clase II (HLA-DP, -DQ, -DR) y clase III. También se detallan los genes que codifican para la región D (8).

El papel principal de los antígenos clase de II del MHC, parece ser la mediación de interacciones entre las células del sistema inmune (células T-macrófagos-Linfocitos B) y otras células presentadoras de antígeno que son necesarias para la regulación de la respuesta inmune (7,8,9).

Los antígenos del MHC de clase II son co-reconocidos por células CD4+ junto con antígenos presentados por la APC. Un reconocimiento similar de antígenos y productos del gen MHC existe para LTC, ellos reconocen epítomos de antígenos junto con epítomos de moléculas clase I del MHC. Este reconocimiento dual es la base de la restricción inmunológica de los LTC. Las moléculas CD4 y CD8 determinan cuando los antígenos clase II y clase I, respectivamente, están involucrados en el reconocimiento antigénico (13,14,15,8) (Fig. 1).

La generación de una respuesta inmune efectiva usualmente involucra la activación y la expansión clonal de linfocitos-antígeno específicos. La activación de linfocitos T requiere de dos señales: La primera involucra la interacción del antígeno en el contexto de una molécula del MHC con el receptor antigénico de células T (TCR); y la segunda señal, la estimulación del TCR causa la expresión del receptor para (IL-2r) y la producción de linfocinas, las cuales usualmente incluyen IL-2 (14). Esta estimulación antigénica conduce al incremento en la síntesis de proteínas

y a la transición de G0 a G1. Posteriormente, para que continúe el ciclo celular, a partir de G1 se requiere de una segunda señal (16,17,18,19).

Los linfocitos T estimulados con el antígeno y que aún no han proliferado intensamente, pueden ser diferenciados de los linfocitos T sin activar mediante la presencia de receptores para IL-2 y la habilidad para proliferar en respuesta a IL-2 (20).

2.2.1 Estructuras

Molécula de clase I.

Son moléculas bicatenerias. Una de ellas está constituida por una glicoproteína polimórfica (44,000 D) codificada por genes en el HLA, que se asocia en forma no covalente con una proteína no polimórfica de peso molecular 12,000 conocida como Beta 2-microglobulina, codificada por un gen en el cromosoma 15. La molécula está insertada en la membrana celular mediante la cadena glicoproteica de peso molecular 44,000 que está dividida en 3 regiones. Si comenzamos con el extremo $-NH_2$ terminal existe: Una porción extracelular hidrofílica, una porción transmembranal hidrófoba y una porción intracelular hidrofílica. Los determinantes antigénicos HLA residen en la porción hidrofílica extracelular. La región intracelular hidrofílica puede fosforilarse y se ha postulado que esta reacción

permite la transmisión de las señales extracelulares al interior de la célula (5) (Fig.3).

Moléculas de clase II.

Consisten en 2 cadenas polipeptídicas (alfa y beta). Estos péptidos están unidos por fuerzas no covalentes y ambas cadenas atraviesan la membrana plasmática. Las cadenas alfa y beta están compuestas de 229 y 237 aminoácidos respectivamente.

Cada cadena está dividida en 4 regiones principales: Dos regiones globulares extracelulares (alfa 1, beta 1, alfa 2, beta 2); una región corta transmembranal hidrofóbica (TM) y una región corta citoplásmica hidrofílica (CYT) (5,6) (Fig.3).

Las moléculas de clase I y clase II son estructuras altamente polimórficas, existiendo múltiples alelos diferentes en cada locus conocido. Este polimorfismo se definió originalmente a través del uso de aloantisueros, poblaciones linfocitarias alorreactivas y, más recientemente, por anticuerpos monoclonales. Así, un alelo reconocido puede presentar diferentes especificidades aloantigénicas, por ejemplo, se puede tener el antígeno HLA-A con diferentes alelos: A 0202, A 0203, A 0204, etc, todos ellos con una especificidad aloantigénica hacia el HLA-A2 (6).

A causa de su eslabonamiento íntimo, la combinación de alelos en un solo cromosoma se hereda, por lo general, como una unidad, la que se conoce como el haplotipo. Puesto que nosotros heredamos un cromosoma de cada progenitor tenemos dos haplotipos HLA. Debido a que todos los genes HLA son codominantes, ambos alelos se expresan y en la superficie de las células pueden identificarse 2 grupos completos de antígenos HLA. Por herencia mendeliana simple, hay 25% de probabilidad de que 2 hermanos compartan los dos haplotipos, 25% de que no compartan ninguno de los dos haplotipos y 50% de que compartan uno de los dos haplotipos (5). Esto asumiendo que durante la meiosis en las gónadas paternas no se generen nuevas variantes por el entrecruzamiento que ocurre en la profase meiótica.

2.2.2 Tipificación de moléculas de clase I y II

El propósito primario de la tipificación, es la identificación de determinantes aloespecíficos de moléculas de clase I y clase II del MHC.

El método más común y accesible de tipificación, es el serológico. Este método de tipificación se desarrolla por el enfrentamiento de las células a tipificar (usualmente linfocitos), con antisueros de especificidad definida (por ejemplo, HLA-B8) durante cierto tiempo, los anticuerpos se unirán solo a antígenos específicos. Cuando el complejo antígeno-anticuerpo está formado sobre la superficie en presencia del complemento, la actividad del complemento provoca la lisis celular siendo posible evaluar la microcitotoxicidad generada en el pozo correspondiente con ayuda de colorantes vitales como la eosina o azul tripan (5).

Los linfocitos son las células preferidas para la tipificación HLA dada su fácil obtención. Estos son generalmente aislados a partir de sangre periférica completa y separados mediante la centrifugación en un gradiente de densidad. También se pueden obtener a partir de ganglios linfáticos o del bazo. La suspensión celular debe tener una viabilidad mayor al 90% y estar exenta de eritrocitos y plaquetas como contaminantes. Excepcionalmente otros tipos

celulares se han utilizado tal es el caso de las plaquetas, amniocitos y fibroblastos (5).

Los sueros para tipificar se obtienen principalmente de mujeres multíparas y de preferencia recién paridas. Estos sueros tienen títulos relativamente altos de anticuerpos dirigidos contra determinantes HLA, producto de la estimulación contra los antígenos de histocompatibilidad paternos presentes en sus hijos (5,6).

Para la tipificación de antígenos de clase II, se recomienda el uso de suspensiones enriquecidas en linfocitos B debido a la distribución casi exclusiva de los antígenos en dichas células (5,6).

Un segundo método de tipificación aprovecha el hecho de que los linfocitos T son estimulados a proliferar en presencia de células portadoras de antígenos de histocompatibilidad clase II como son los mismos linfocitos T. La prueba es conocida como reacción mixta de linfocitos (MLR) y es útil solo en la tipificación de antígenos clase II sustituyendo a la serología para la tipificación de estos antígenos. En esta prueba los linfocitos a tipificar son mezclados con células tipificadoras homocigóticas o de especificidad definida. En el cultivo, las células no específicas reconocen a las células tipificadoras como extrañas y son estimuladas a la transformación y

estimulación. La proliferación puede ser cuantificada por diversos métodos (6).

La tipificación de los antígenos HLA se emplea primariamente para determinar la compatibilidad HLA antes de un trasplante, para pruebas de paternidad, para estudios antropológicos y para establecer asociaciones de los HLA con diversas enfermedades (5).

En nuestro país se han identificado 24 laboratorios dedicados a diferentes aspectos relacionados a la histocompatibilidad, de los cuáles, el 83.3% realiza tipificación de antígenos HLA clase I y II mientras que el 41.7% efectúa cultivos mixtos de linfocitos (21).

2.3 CICLO CELULAR

Se llama ciclo celular (CC) al intervalo de tiempo que transcurre entre una división celular (mitosis) y la subsecuente e incluye los procesos de crecimiento, replicación del DNA y citocinesis.

El ciclo de un linfocito se divide como se muestra en la Figura 4, y es una forma un tanto arbitraria, de ordenar los diferentes eventos conocidos del mismo (22,23).

Las fases del ciclo celular entre dos divisiones sucesivas, fueron denominadas por Howard y Pelc como G1 y G2, ya que descubrieron que la síntesis de DNA (que ocurre en la llamada fase S) no es continua entre dos divisiones consecutivas (24). Lajtha, a su vez, demostró que existían células que no se dividían sino que estaban en reposo. Este estado se conoce como fase G0, y ahora su inclusión como etapa del ciclo celular es discutida (25).

La mayoría de las líneas celulares en cultivo tienen un ciclo que dura entre 10 y 30 horas (23). De tal manera que, mientras la fase de mitosis dura aproximadamente una hora, G2 varía de 2 a 4 hs, la fase S de 7 a 8 hs y la fase G1, que es la más variable puede tener de 1 a 9 horas de duración (26).

2.3.1 Fases del ciclo celular

FASE G₀: se considera como una fase de reposo, en donde el contenido de RNA es bajo, el cual se incrementa cuando la célula se induce a proliferar. Se ha demostrado que los niveles de calmodulina (proteína reguladora de enzimas intracelulares sensibles al calcio), se incrementan cuando la célula entra en G₀, mientras que los niveles disminuyen cuando la célula es inducida a proliferar y sale de dicha fase para entrar a G₁ (27).

FASE G₁: las variaciones de tiempo observadas en el ciclo celular, entre diferentes tipos celulares, se deben principalmente, a esta fase, ya que las restantes tienen un tiempo relativamente constante. En esta fase como en la anterior, se sintetizan en pequeñas cantidades las histonas constituyentes de la cromatina (25). También en este momento los linfocitos T activados incrementan sus antígenos de diferenciación CD3, CD4, y CD8, así como los de clase I del MHC, aunque su relación con los procesos de proliferación y su significado sean aún oscuros (28).

Al final de este período, nuevamente se incrementan los niveles de calmodulina, considerándose que esta proteína (y por lo tanto el calcio) es importante en la regulación de la síntesis de DNA. Aparentemente, los eventos cruciales que controlan la regulación del crecimiento

celular ocurren en esta fase, cuya duración puede ser de 1 a 9 horas (27).

FASE S: los sucesos sobresalientes son la síntesis de DNA e histonas, que duran aproximadamente de 6 a 8 horas. La replicación del material genético se realiza simultáneamente en diferentes cromosomas y en segmentos de un mismo cromosoma. Cada segmento o unidad de replicación se conoce como replicón. Este período puede dividirse en tres subestadios, en el primero se duplica el 15% del DNA y el restante en los dos subsiguientes. Durante los dos primeros se replican las bandas G negativas (claras), mientras que las G positivas (oscuras), se replican en el último. La síntesis de histonas, se sabe que esta acoplada a la síntesis de DNA (29).

FASE G2: el tiempo de duración de G2 es de 2 a 6 horas, aquí la célula se prepara para la mitosis, por lo cual se produce una gran condensación cromosómica (30).

En esta fase del ciclo celular los linfocitos T activados incrementan en su superficie los antígenos de clase II del MHC, ignorándose su significado (28).

MITOSIS: tiene un tiempo de duración de aproximadamente una hora y corresponde a la división celular propiamente dicha. Consta de varias etapas: profase, metafase, anafase, y telofase, caracterizándose cada una de

ellas por los diversos eventos que ocurren en las mismas (30).

Los linfocitos circulantes están normalmente en reposo (G0) y para hacerlos proliferar "in vitro", se utilizan una serie de mitógenos, de los cuales el más común es la fitohemaglutinina (PHA), una glucoproteína extraída de *Phaseolus vulgaris*. Se considera que la PHA induce la producción en los linfocitos T (humanos y de otras especies de mamíferos) de IL-2, en presencia de macrófagos, y la expresión de IL-2r en las células T correspondientes. (6)

Estos procesos ocurren en G1, mientras que el progreso hacia S involucra el consumo de IL-2. La mayoría de la líneas de células T de prolongado tiempo de cultivo, requieren de IL-2 exógena para su continua proliferación (6).

En resumen, la evidencia existente, indica que la estimulación de las células T por antígenos o lectinas puede ser dividida en dos estadios. El primero manifestado por la expresión de IL-2r y la producción de IL-2, que normalmente requiere de un antígeno específico y células accesorias y representa la transición del estado de reposo a G1. El segundo involucra la IL-2 que permite a las células progresar hacia S. Lo que no está claro es el papel del antígeno en el segundo y subsecuentes ciclos de división (31,8) (Fig. 4).

Se ha demostrado que las células T en reposo no producen IL-2 y tampoco son capaces de responder a IL-2 cuando ésta es añadida de manera exógena (32).

Las señales derivadas de la interacción de la célula T con el antígeno, coordina la activación transcripcional del gen IL-2 y de los genes codificadores para IL-2r (33). La concentración de IL-2 producida durante la interacción célula T-antígeno así como el periodo durante el cuál está disponible son determinantes en la magnitud y extensión de la proliferación de las células T. La expresión del IL-2r se dá después de la estimulación al complejo receptor de la célula T (34,35).

En la expansión clonal de las células T, los IL-2r aparecen asincrónicamente y se requieren 3 días para que la población completa los exprese. Conforme transcurre el tiempo el nivel de IL-2r declina progresivamente, la proliferación eventualmente cesa y la mayoría de las células se encuentra en las fases de G₀ o G₁ temprana para los días 12-14 de iniciado el cultivo. Es evidente que la interacción IL-2 con su receptor es responsable de las señales necesarias para la replicación del DNA y mitosis, sin embargo no es claro como es que él complejo célula T-antígeno promueve la progresión del ciclo celular desde G₁ y la transición a la fase S. (36)

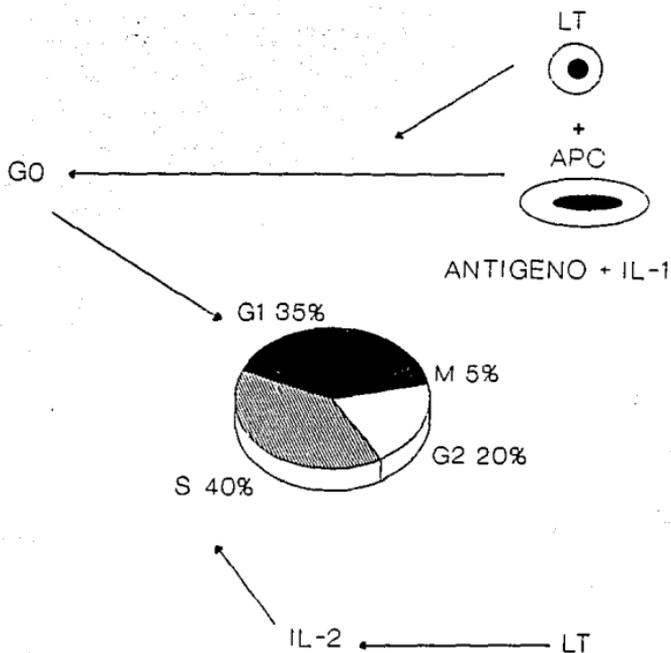


Figura 4. Ciclo celular de los linfocitos.

Los linfocitos en G0 reciben un estímulo antigénico y pasan a G1 donde sintetizan IL-2 e inducen la síntesis de DNA, previa a la división celular.

NOTA:

% = Proporción de células en cada fase.

2.4 METODOS PARA LA EVALUACION DE LA PROLIFERACION CELULAR

Existen diversos métodos para medir la proporción de células que proliferan como lo son la incorporación de un análogo de base del DNA como lo es la timidina tritiada ($^3\text{H-T}$), en donde la cantidad de radioactividad incorporada al material genético es proporcional a la proliferación celular. Este método evalúa un instante dentro del proceso proliferativo al momento de la cosecha y no es posible conocer el número de divisiones que han llevado a cabo las células a menos que la radioactividad sea revelada por autoradiografía .

Otra técnica más simple es la que utiliza un análogo de base del DNA, la 5-Bromodesoxiuridina (BrdU) que se incorpora al DNA de las células. Los cultivos se arrestan con un inhibidor mitótico (la colchicina o el colcemid) y se cuentan las metafases al microscopio después de haber realizado una tinción diferencial. Esto permite determinar el índice mitótico (I.M.), e identificar metafases de células que han completado uno o más ciclos de división "in vitro". Esta técnica descrita por Perry y Wolff , se basa en que la BrdU, en una metafase de primera división, sustituirá una sola de las cadenas de la doble hélice en las cromátidas hermanas de un cromosoma. Los cromosomas en esa metafase adquieren una tinción homogénea (22).

En la división consecutiva (segunda división), una cromátida de cada cromosoma metafásico tiene una sola cadena de DNA sustituida bifilarmente (en las dos cadenas) con BrdU, dando como resultado una proporción de 50% de diferencias en la coloración de los cromosomas. En las divisiones subsecuentes, y a consecuencia de la duplicación semiconservativa del DNA, la proporción de coloración clara con respecto de la oscura, se va haciendo mayor conforme transcurren las divisiones celulares (22) (Fig. 5).

Esta técnica permite entonces, determinar la proporción de las células que se han dividido una, dos o más veces en un determinado período de cultivo, lo cual nos sirve para conocer no solo la velocidad de proliferación sino también calcular la duración del ciclo celular "in vitro" (37).

El fenómeno de tinción diferencial es producido por la fotólisis que sufre el DNA en las cromátidas bisustituidas. La fotólisis ocurre cuando la preparación se expone a la luz ultravioleta después de la tinción con fluorocromos como el Hoechst 33258, que sensibilizan al DNA que ha incorporado BrdU, aumentando el nivel de fotólisis (38).

M1



M2



M3



Figura 6. Modelo para el análisis de proliferación celular.
Primera división (M1), Segunda división (M2), Tercera
división (M3).

2,5 CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS

La respuesta inmune mediada por células tiene dos importantes fases: a) Reconocimiento, cuando las células del hospedero reconocen antígenos solubles o particulados en el contexto del MHC y b) Destrucción, cuando las células del hospedero responden a antígenos extraños. Un pequeño número de células respondedoras adquieren citotoxicidad y proliferan. Así, la inmunidad mediada por células puede ser descrita en términos de 2 funciones medibles: actividad proliferativa (4) y citotóxica (39). Se ha demostrado ampliamente que la actividad citotóxica generada durante la aloestimulación es específica a antígenos MHC (42).

Un ensayo útil para la evaluación de estas fases de la respuesta inmune es el cultivo mixto de linfocitos (MLC).

En este ensayo, las células generadas son citotóxicas a células alogénicas y se ha considerado predictivo de la respuesta del huésped hacia transplantes (40). Las evidencias sugieren que las pruebas de MLC predicen episodios de reacciones agudas de rechazo a transplantes y la sobrevida de un injerto en receptores vivos cuando los donadores del transplante están relacionados o no al receptor o cuando se trata de una donación cadavérica (42).

Así el uso clínico primario para el ensayo del MLC es la selección de un donador compatible de un órgano a transplantarse (riñón, médula ósea, hígado, etc), especialmente entre miembros de la familia (41,42).

Los registros en nuestro país indican que el transplante de riñón es uno de los que se realiza con mayor frecuencia y éxito, mientras que el de pulmón es uno de los que escasamente se realizan en nuestro país Tabla 1.

Tabla 1. Números de transplantes realizados a la fecha en México (21).

Organo	Año					Total [^]
	1989	1990	1991	1992	1993	
Riñón	384	480	562	625	488	4777
Cornea*	547	712	468	678	149	4230
Piel	0	350	320	605	186	3871
M. ósea	0	11	11	17	19	97
Hígado	3	1	4	8	1	24
Corazón	3	3	5	1	1	19
Páncreas	3	4	1	0	0	12
Pulmón	0	0	2	0	0	3
Total acumulado						<u>12963</u>

Nota:

*Para realizar este transplante no es necesaria la compatibilidad en los antígenos HLA.

[^]El total correspondiente a cada año involucra al número de transplantes realizados en años anteriores.

Para prevenir las reacciones del injerto o injerto contra huésped, el donador y el receptor debe ser mutuamente no estimulados en el MLC, es decir, no debe existir respuesta proliferativa alguna o ésta debe ser "insignificante" (41,42).

Existen algunas variantes entre los laboratorios que lo realizan en cuanto al método empleado. Algunas de ellas son: la fuente de células, que pueden provenir de sangre periférica, bazo, ganglios linfáticos y raras veces del timo; el número de células, el que puede variar en varios ordenes de magnitud; la inactivación celular de la población estimuladora (cuando se dá el caso) mediante radiación o tratamiento con Mitomicina C; el medio de cultivo y los suplementos utilizados; el período de cultivo y entre otras el grado de estimulación, que puede ser determinado por incorporación de $^3\text{H-T}$, de aminoácidos marcados radioactivamente o bien de BrdU (41,42).

El MLC puede ser realizado de manera unidireccional o bidireccional. En cada caso se ven involucrados linfocitos T principalmente, de dos individuos diferentes, determinándose la proliferación de las células involucradas por cualquiera de los métodos mencionados, siendo la incorporación de BrdU el método utilizado en el presente trabajo (5).

En el ensayo unidireccional, descrito por primera vez por Fritz. H. Bach en el año de 1966 (4), las células de uno de los individuos involucrados en el cultivo son pretratadas por radiación o Mitomicina C previniendo la síntesis de DNA sin alterar la función de las células presentadoras de antígeno; mientras que la otra población celular, las células respondedoras o no tratadas, proliferan en respuesta a aloantígenos MHC expresados en la población estimuladora (células tratadas). En éste caso la respuesta proliferativa existente es debida al estímulo recibido por parte del grupo celular estimulador correspondiente hacia las células respondedoras (4,5).

En el caso del cultivo mixto de linfocitos bidireccional, los linfocitos no tratados, provenientes de dos individuos A y B, son cocultivados teniendo como respuesta proliferativa total la contribución de ambas poblaciones A y B, en donde las células A responden a aloantígenos MHC presentes en la población B y éstas a su vez responden a los aloantígenos HLA presentes en la población A (5).

Hay evidencias de que la máxima estimulación en cultivos mixtos aparece aproximadamente entre el 3° y 5° día de cultivo, determinándose en éstos cultivos la proliferación por incorporación de $^3\text{H-T}$ (3).

La mayoría de las células que responden en la reacción mixta de linfocitos son linfocitos T. Se sabe que los macrófagos desempeñan una función importante como APC, ellos proveen algunos factores solubles necesarios para la activación de la célula T, tal es el caso de la interleucina-1 (IL-1) (41).

Las células CD4+ presentan claramente una elevada respuesta primaria anti-MHC, la cuál es predominantemente hacia determinantes de clase II (Ia) mientras que las APC participantes deben ser Ia+. Estas respuestas son fácilmente inhibidas con anticuerpos monoclonales anti-CD4+ y anti-Ia (41).

Estudios realizados "in vitro" han demostrado que las respuestas por parte de los LTH de sangre periférica hacia aloantígenos HLA puede estar mediada por 3 distintas vías de interacción con las APC:

1) Células CD4+ que reconocen aloantígenos presentados por APC propias (propia restringido); 2) Células CD4+ que reconocen a APC alogénicas directamente (alo-restringido); 3) Células CD8+ que reconocen APC alogénicas directamente (alo-restringido) (41).

Se ha reportado que los linfocitos B, cuando están presentes en el MLC pueden ser estimulados y proliferar, contribuyendo así a la MLR. Sin embargo la naturaleza de

éste fenómeno para los linfocitos B es probablemente diferente de la que presentan los linfocitos T. Las células B no son estimuladas a menos de que los linfocitos T hayan sido estimulados primero y así producir linfocinas útiles en estimulación de los linfocitos B como IL-2, interferon gama (IFN-gama), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), entre otros. Estos factores, proveen una segunda señal a aquellas células B que se unen vía receptores de inmunoglobulina, a los aloantígenos de las células estimuladoras. Así, las células B estimuladas se diferencian a células plasmáticas y secretan anticuerpos contra aloantígenos (5).

Los experimentos originales del grupo de Barbara Bain y de Fritz Bach en 1964, demostraron que cocultivando leucocitos de individuos no relacionados se transformaban en blastos y proliferaban de manera similar a aquellos a los que se les adicionaba mitógenos (2,42).

Esta MLR está controlada por la región HLA-D del MHC, HLA en humanos (43). En 1971, Edmond J. Yunis y Bernard Amos, trabajando con células humanas y Fritz, H. Bach trabajando con células de ratón; demostraron que contrariamente con las expectativas, ocurrían reacciones mixtas linfocitarias "fuertes" en mezclas de células respondedoras y estimuladoras que presentaban antígenos clase I. Estas observaciones sugirieron que la MLR estaba gobernada por un loci separado del de clase I. Así varios

investigadores mapearon el loci MLR estimulante fuera del loci A y B en el humano donde serológicamente detectaban el mapa loci clase II (44). Este locus está separado del loci HLA-A y HLA-B en el cromosoma 6, la región HLA-D está identificada como una región análoga al gen responsable en el ratón. Una disparidad en el locus HLA-D (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) entre 2 células causa una respuesta estimuladora, sin embargo, una identidad puede generar una estimulación mutua débil de linfocitos. (45)

Ahora se sabe que la mayoría, si no es que todos los MLC reactivos son causados por diferencias en las moléculas clase II del HLA; esto se ha comprobado en varios estudios, uno de ellos señala la respuesta proliferativa inducida por HLA-DP incompatibles en individuos compatibles para HLA-A, -B, -DR y -DQ, considerándose que las moléculas HLA-DP actúan como antígenos convencionales de transplante (46,47).

En particular, las moléculas DR y DQ están implicadas en la activación primaria de los linfocitos (41,46), aunque se discute la participación de las moléculas DP en la respuesta primaria y en el desarrollo de una respuesta severa de injerto contra huésped (46-52).

2.6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Considerando la utilidad del cultivo mixto de linfocitos así como la naturaleza de las moléculas involucradas en la reacción que se genera, es importante evaluar la capacidad de dicho sistema para determinar mediante el análisis de proliferación celular e índice mitótico, las incompatibilidades en los antígenos HLA clase II (principalmente) entre ciertos individuos. Realizando para ello, cultivos mixtos de linfocitos bidireccionales entre individuos emparentados y no emparentados, determinando los parámetros antes mencionados mediante la incorporación de BrdU.

III. HIPOTESIS

El MLC está controlado por los antígenos HLA del MHC y en especial por los de clase II, entonces al realizar MLC entre individuos emparentados y no emparentados se presentará una proliferación celular más significativa en aquellos MLC en los que exista menor similitud aloantigénica y que podrá ser evaluada por incorporación de BrdU mediante el análisis de proporciones metafásicas e índice mitótico en cada cultivo.

IV. OBJETIVOS

1.-Conocer la cinética de proliferación celular en el MLC, mediante el análisis de índice mitótico y proporciones metafásicas de primera, segunda, tercera o subsecuentes divisiones

2.-Evaluar la capacidad del MLC como ensayo predictivo de una futura reacción inmunológica hacia aloantígenos HLA mediante el análisis del índice mitótico y la cinética de proliferación celular

3.-Determinar mediante citometría de flujo las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ en el MLC.

4.-Comparar el método de incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-T}$) descrito en la literatura y el de bromodesoxiuridina (BrdU), como métodos para la evaluación de la proliferación celular en el MLC.

V. MATERIAL Y METODOS.

5.0 MATERIAL

*Placas de cultivo celular 24 pozos (Costar, Cambridge USA)

*Microplacas de 96 pozos (Costar)

*Pipetas estériles 1, 5 y 10 ml

*Tubos cónicos estériles de 15 ml

*Jeringas 10 y 20 ml

*Pipetas Pasteur

*Tubos de plástico 5 ml

*Portaobjetos

*Cubreobjetos

*Filtros micropore 0.02 y 0.45 μ m

*Micropipetas

*Copleing

*Lámpara de luz negra

*Cámara de Neubauer

5.1 EQUIPO Y APARATOS

*Centrifuga (Beeckman modelo TJ-6)

*Microscopio de luz e invertido

*Citómetro de Flujo (FAC Scan Becton and Dickinson, San José California)

5.2 REACTIVOS Y SOLUCIONES

- *Ficoll-Hypaque
- *Cloruro de Potasio
- *Metanol absoluto
- *Fosfato de potasio monobásico
- *Fosfato de sodio dibásico
- *Acido acético glacial
- *Etanol
- *Azul de tripan
- *Azul de metileno
- *Colcemid (Microlab)
- *Bromo desoxiuridina
- *Solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.0
- *Heparina 10 UI/ml
- *Formaldehído
- *Hoechst 33258
- *Anticuerpos monoclonales OKT8+ y OKT4+ fluorescentes (Becton & Dickinson)
- *Antisueros específicos MHC clase I y clase II
- *RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, St. Louis MO. U.S.A.)
- *HEPES (GIBCO, Grand Island, N.Y. U. S. A.)
- *L-glutamina (GIBCO)
- *Aminoácidos no esenciales (GIBCO)
- *Bicarbonato de sodio (Grado cultivo de tejidos)
- *Formalina
- *Eosina amarillenta

5.3 METODOLOGIA

Se seleccionaron 4 individuos aparentemente sanos en donde como requisito indispensable para ingresar al estudio los individuos seleccionados no debían haber recibido transfusiones sanguíneas. Tres de los individuos involucrados en el estudio guardan relación familiar: X es madre de Y y Z, mientras que A no guarda relación alguna de parentesco.

5.3.1 Colección de muestras

Para cada cultivo celular, se extrajeron 20 ml de sangre periférica a cada individuo con jeringa heparinizada, bajo condiciones de esterilidad adecuadas.

5.3.2 Obtención de células

Cada muestra sanguínea fué colocada sobre Ficoll-Hypaque con una densidad de 1.077 g/ml, éstas se centrifugaron a 600 x g por 30 min, enseguida las células mononucleares se extrajeron de la fase intermedia del gradiente. Las células así obtenidas se lavaron 2 veces con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con: HEPES 25mM, L-glutamina 2mM, aminoácidos no esenciales 0.1mM y Bicarbonato de sodio 10g/l) a 350 x g durante 10 min. Posteriormente se

determinó la viabilidad celular en una alícuota con azul de tripan (mayor al 95%) y se ajustó cada grupo celular a la concentración deseada con medio de cultivo suplementado.

5.3.3 Cultivo Mixto de Linfocitos

Los cultivos se realizaron en una placa estéril de 24 pozos de fondo plano.

En los pozos correspondientes se mezclaron 3.0×10^5 células de cada individuo, 10% de plasma autólogo obtenido del gradiente Ficoll-Hypaque (correspondiente a cada individuo involucrado en el cultivo), teniendo como volumen total por pozo 1 ml; todo lo anterior en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado.

Las combinaciones realizadas para cada cultivo fueron:

AX

AY

AZ

XY

XZ

YZ

La combinación de las respuestas estimuladoras para cada cultivo se hizo por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, por 8 y 10 días con humedad relativa.

Al quinto día se agregó 45ul de BrdU 32uM preparada en medio de cultivo sin suplementar a cada cultivo, así como 500ul de medio RPMI-1640 suplementado para mantener las condiciones óptimas de crecimiento (nutrientes).

Como controles negativos para cada individuo, se tuvieron pozos que se componían de células propias, 10% de plasma autólogo obtenido del gradiente y medio de cultivo suplementado; teniendo para cada pozo el mismo tratamiento dado a los cultivos mixtos.

Se realizaron ensayos previos los cuales reflejaron que la proporción más alta de células en división se encontraba entre el 5° y 10° día de iniciado el cultivo lo que, coincide con lo reportado por incorporación de timidina tritiada, obteniendo así, mediciones adecuadas para el índice mitótico y la cinética de proliferación celular (CPC) en cada cultivo. Eligiendo los periodos de cultivo de 8 y 10 días para realizar la evaluación de los parámetros en estudio para cada periodo.

5.3.4 Citometría de flujo

El análisis de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ (OKT4+) y CD8+ (OKT8+) se realizó al inicio de cada cultivo determinando las proporciones de cada subpoblación para cada individuo involucrado en el sistema así como también a los 8 y días de haber realizado el cultivo

El marcaje y procesamiento de las muestras correspondientes por pozo para cada combinación se describe a continuación: el contenido de cada pozo se lavó con PBS a 4°C a 300 x g durante 10 min, posteriormente el paquete celular se resuspendió en aproximadamente 100ul de PBS y se procedió al marcaje directo con anticuerpos monoclonales OKT4+ y OKT8+ acoplados a fluoresceína y rodamina respectivamente. A cada suspensión celular se le adicionó 5ul de cada anticuerpo monoclonal en dilución 1:8 y 1:4 respectivamente para el análisis de inmunofluorescencia simultáneo. La mezcla obtenida se incubó durante 15 min a 4°C e inmediatamente después las muestras se lavaron 2 veces con PBS pH= 7.0 frío para finalmente fijar las células marcadas con 500ul de PBS-3% de formaldehído pH=7.0. Las muestras se conservaron a 4°C hasta el análisis citométrico.

El análisis se realizó en un citómetro FACScan contando 10,000 células por muestra. Se calibró el aparato con microesferas recubiertas con los fluorocromos

correspondientes, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.3.5 Análisis al microscopio

i) Ciclo celular

Las muestras de cada cultivo celular fueron cosechadas a los 8 y 10 días de iniciado el cultivo. A cada una de ellas se les agregó 40ul de una solución de colcemid 10ug/ml (para detener las células en metafase) 4 horas antes de ser cosechadas. Las células fueron cosechadas por centrifugación para después resuspenderlas en KCl 0.075M por 15-20 min a 37°C y posteriormente se fijaron en una solución de metanol absoluto-ácido acético glacial 3:1 por 30 min. Después de 2 lavados con el mismo fijador, las preparaciones se colocaron en portaobjetos por medio de goteo y se secaron al aire.

Las preparaciones cromosómicas se trataron para la tinción diferencial de las cromátidas, por la técnica FPG de Perry y Wolff (19) que consiste en poner en contacto a las láminas con las preparaciones cromosómicas con una solución 0.5ug/ml de solución Hoechst 33258 durante 20-30 min y luego lavarlas con amortiguador de fosfatos pH= 7.0 para después exponerlas a la luz negra durante 1.0-1.5 hs.

Transcurrido el tiempo se secan y se tiñen con colorante Giemsa 1:10 en solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.0 durante 2-5 min.

Para determinar la cinética de proliferación celular en cada uno de los cultivos, en 100 metafases consecutivas se contaron las proporciones de primera, segunda, tercera y subsecuentes divisiones para cada uno de los cultivos (8 y 10 días). Reportando la cinética de proliferación celular en porcentaje de cada una de las proporciones. Se calculó también el índice de replicación (I.R.):

$$I.R. = 1as + 2(2as) + 3(3as) / 100$$

La clasificación de dichas metafases se realizó de acuerdo a su patrón de tinción: Metafase de 1ª división cuando ambas cromátidas se observaron de color oscuro, metafase de 2ª división cuando una cromátida se tenía de oscuro y la otra pálida, metafase de tercera o subsecuentes divisiones cuando un cuarto o menos de sus cromátidas se teñían de oscuro, tal como se puede observar en la figura 5.

ii) Índice Mitótico

El análisis de los índices mitóticos (I.M.) se llevó a cabo tomando el promedio de cada ensayo de MLC realizado por duplicado, contando el número de metafases encontradas en el análisis de 2000 núcleos consecutivos en las laminillas de

cada cultivo mixto de linfocitos. Este parámetro permitió determinar el porcentaje de células que estaban en mitosis.

5.3.6 Tipificación de antígenos clase I y II.

La tipificación de antígenos clase I y II se realizó de la siguiente manera: Se extrajeron 10 ml de sangre para desfibrinarse, ésta se diluyó 1:1 (v/v) con PBS pH= 7.0 para después separar los linfocitos mediante el método Ficoll-Hypaque. Las muestras se centrifugaron 30 min a 600 x g, separando de la interfase los linfocitos. Una vez separados, los linfocitos se lavaron 3 veces con PBS pH =7.0. Se ajustó la suspensión celular a la concentración de 4000 células/ul.

Por otra parte, se dispuso de una microplaca de 96 pozos que contenía los antisueros específicos para cada antígeno HLA clase I y clase II según el caso. Agregando 1ul de la suspensión celular anterior a cada pozo.

La placa se agitó suavemente y se incubó 1 hr a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo de incubación, se agregó 5ul de complemento de conejo a cada pozo y se incubó nuevamente 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 5ul/pozo de eosina amarillenta 5% y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó 5ul/pozo de formalina neutralizada 40%.

Las placas se guardaron en el refrigerador hasta la evaluación de microcitotoxicidad al microscopio invertido o 2 horas antes de efectuar la evaluación.

Para la tipificación de antígenos clase II, se utilizaron linfocitos B. Estos se separaron por la formación de rosetas y la suspensión utilizada para la tipificación se ajustó a la concentración de 4 000 células/ul y se llevó a cabo el procedimiento descrito para la tipificación de los antígenos clase I en presencia de los antisueros específicos para los antígenos de clase II.

5.3.7 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Tukey con una P menor de 0.05 para evaluar la significancia estadística de los datos obtenidos en los índices mitóticos y de replicación así como para los de las subpoblaciones linfocitarias en cada uno de los ensayos realizados previo análisis de varianza (ANOVA).

VI. RESULTADOS

Haplotipos HLA

Los resultados de la tipificación para los antígenos HLA de clase I y II de cada individuo involucrado en el estudio, se muestran en la tabla 2.

Se puede observar que los individuos Y y Z son iguales en los antígenos clase I y II tipificados, es decir, los haplotipos tipificados para cada uno corresponden entre sí. Por otra parte, ambos portan el 50% de los antígenos clase I y II del individuo X (-A2, -B14, -DR2, -DQ). Mientras que el individuo A (no emparentado), no comparte haplotipo HLA-A alguno de los 3 individuos emparentados. Sin embargo, con el individuo Y comparte todos haplotipos clase II tipificados con excepción de los haplotipos -DR6 y -DQ3. Mientras que con los individuos Y y Z comparte los haplotipos -B35, -DR2, -DQ1.

Tabla 2. Haplotipos HLA.

Individuo	HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A	-24, -3	-35, -4	-2, -5	-1, -3
X	-2, -30	-39 (16)*, -14	-2, -3	-1, -3
Y	-2, -23	-35, -14	-2, -11	-1, -2
Z	-2, -23	-35, -14	-2, -11	-1, -2

Nota:

* Subtipo del antígeno 16.

Cinética de proliferación celular.

En las tablas 3 y 4 se pueden observar los I.M. y las proporciones de M1, M2 y M3, así como también los I.R., correspondientes a cada MLC realizado entre individuos emparentados (X, Y, Z) y no emparentados (A) a los 8 y 10 días de iniciado el cultivo para cada uno.

Las proporciones de M1, M2 y M3 mostraron diferencias entre los diversos períodos de cultivo para los MLC de individuos emparentados respecto a los no emparentados, observándose que en los cultivos de individuos emparentados las metafases registradas (menos de 100) fueron primordialmente de primera división (M1) manteniéndose dicha proporción en los cultivos que las presentaron a los 8 y 10 días de iniciado el cultivo.

Lo anterior contrasta con los resultados observados en los cultivos AX, AY y AZ (individuos no emparentados) en los que existió una proporción de hasta 27% de terceras divisiones entre el 5° y 8° día de cultivo y de hasta 51% de terceras divisiones a los 10 días de iniciado el cultivo.

Cabe mencionar que la velocidad del ciclo celular fué diferente entre experimento y experimento en los MLC entre individuos no emparentados, pero en cada experimento las proporciones metafásicas registradas generalmente seguían el patrón de comportamiento descrito.

Tabla 3. Proporciones metafásicas, índice mitótico e índice de replicación en MLC a los 8 días de cultivo.

MLC	M1	M2	M3	I.M.	I.R.
AX	45 26	31 39	24 45	1.4 1.0	1.790 2.390
AY	40 40 33	37 42 40	23 18 27	2.1 2.3 2.2	1.830 1.780 1.940
AZ	68 60 12	17 31 35	15 9 53	2.3 1.8 2.1	1.470 1.490 2.410
XY	0 0	0 0	0 0	---* ---*	---* ---*
XZ	10 1	3 2	3 1	0.5 ---*	---* ---*
YZ	0 0	0 0	0 0	---* ---*	---* ---*

Nota:

* Las metafases registradas no fueron suficientes.

Tabla 4. Proporciones metafásicas, índice mitótico e índice de replicación en MLC a los 10 días de cultivo.

MLC	M1	M2	M3	I.M.	I.R.
AX	47 17	41 32	12 51	1.6 2.8	1.650 2.340
AY	17 53 31 31	40 20 57 28	43 27 12 41	3.5 4.3 3.5 3.1	2.260 1.740 1.810 2.100
AZ	65 55 21	24 35 35	11 10 44	1.8 2.6 3.1	1.460 1.550 2.230
XY	11 3	6 3	0 1	0.8 ---*	---* ---*
XZ	8 2	4 0	0 0	0.6 ---*	---* ---*
YZ	3 4	2 0	1 0	---* ---*	---* ---*

Nota:

* Las metafases registradas no fueron suficientes.

Los MLC realizados con las combinaciones X, Y y Z, (individuos emparentados) mostraron entre sí patrones de cinética similares con la excepción de los cultivos con la combinación YZ en donde la proliferación fue ligeramente menor en comparación con las combinaciones XY y XZ en donde se registraron índices mitóticos de 0 a 0.8% (tabla 3 y 4). Por otra parte la totalidad de los MLC entre individuos emparentados fueron diferentes de los cultivos AX, AY, y AZ que presentaron una cinética de proliferación mucho más rápida.

El análisis de varianza realizado entre los índices de replicación obtenidos en cada MLC, demuestra que los valores obtenidos en los individuos emparentados fueron significativamente menores respecto a los obtenidos en los MLC de individuos no emparentados ($p < 0.05$). Los rangos de los valores se encuentran entre 0 (YZ) hasta 1.761 (AY), a los 8 días de iniciado el cultivo. En lo que respecta al análisis realizado entre los índices obtenidos en los cultivos de 10 días entre individuos emparentados y no emparentados, las diferencias mostraron significancia, de manera similar que para los cultivos a los 8 días, encontrándose que éstos iban desde 0 (YZ) hasta 1.977 (AY) (Tablas 3, 4, Figura 6)

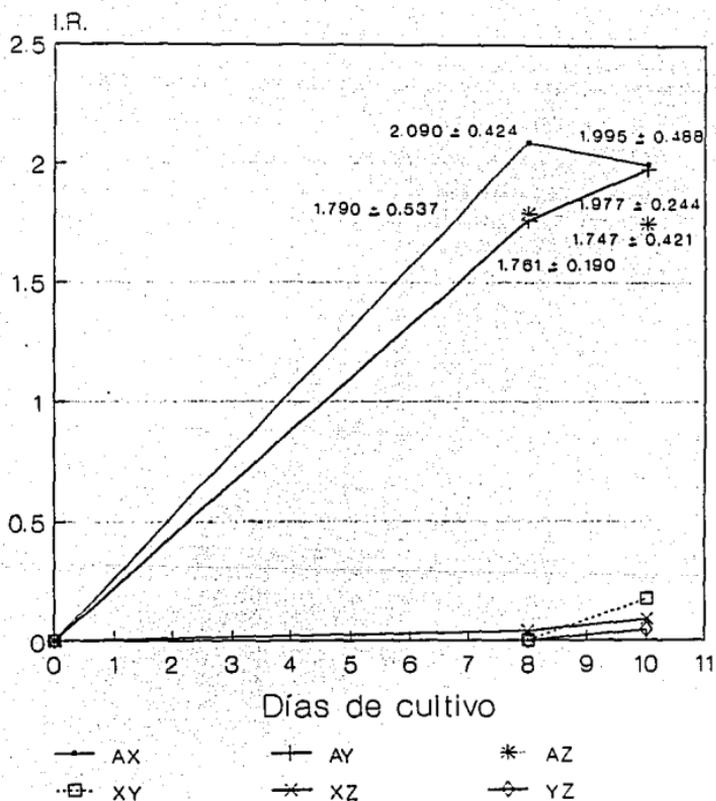


Figura 6. Promedios de los Indices de replicación a los 8 y 10 días de cultivo.

Indices mitóticos

En lo que respecta a los índices mitóticos, éstos difirieron de manera significativa ($p < 0.05$) entre los cultivos de individuos emparentados y no emparentados siendo mayores éstos últimos. Por otra parte no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el I.M. entre experimento y experimento para los MLC de individuos emparentados ni para los MLC entre individuos no emparentados.

En los cultivos de 8 días de individuos emparentados se encontraron índices mitóticos menores de 1% (XY) mientras que en los MLC entre individuos no emparentados los índices registrados llegaron a ser de hasta del 2%.

A los 10 días de iniciados los cultivos se encontraron índices mitóticos desde 0% (XY) en los emparentados hasta del 3-4% en los MLC entre individuos no emparentados (Tabla 4, Figura 7).

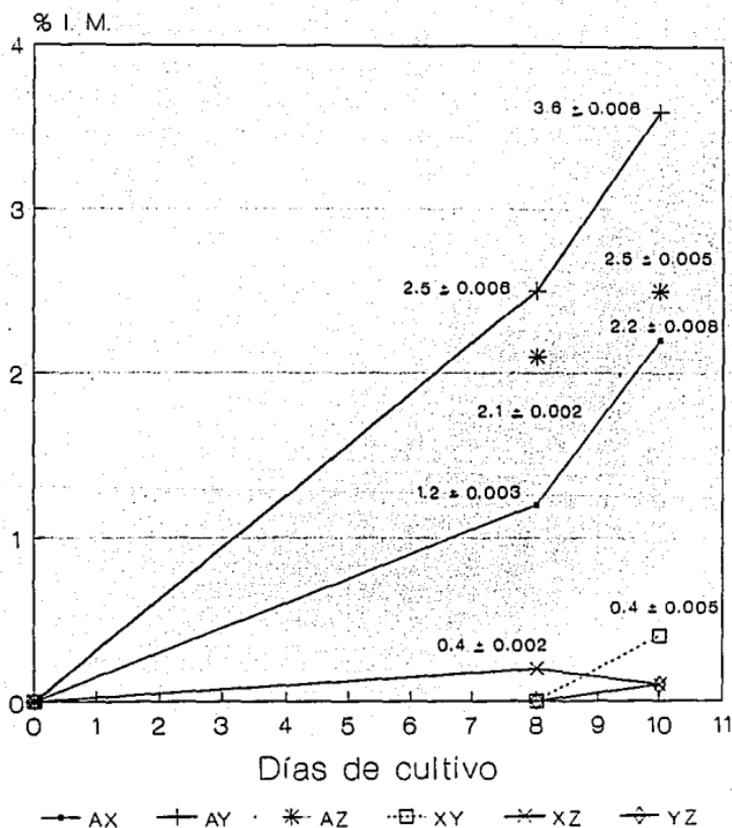


Figura 7. Promedios de los índices mitóticos a lo 8 y 10 días de cultivo.

Subpoblaciones linfocitarias.

La determinación inicial de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ para cada uno de los individuos involucrados en cada experimento, resultaron dentro de los porcentajes normales (Tabla 5).

Tabla 5. Subpoblaciones iniciales CD4+ y CD8+

Individuo	CD4+ %	CD8+ %
A	46	53
	44	55
	34	65
	52	48
X	55	44
	60	40
Y	40	60
	61	38
	36	64
Z	67	33
	50	50

Nota: Rango de referencia

CD4+ 33-67%

CD8+ 28-71%

En lo que respecta a las subpoblaciones linfocitarias encontradas en cada periodo de cultivo, podemos observar en la figura 8 y 9, que en promedio, en los cultivos de individuos con los antígenos HLA tipificados, las proporciones de LT CD4+ y CD8+ no variaron entre sí de manera significativa en ninguno de los periodos de cultivo manejados.

Cabe señalar que, en aquellos cultivos en los que existía un 50% de compatibilidad en los antígenos HLA clase I y II tipificados, la proporción de LT CD8+ tendía a incrementarse ligeramente conforme transcurría el periodo de cultivo ($p < 0.05$).

Por otra parte, en los MLC de individuos no emparentados, las proporciones de LT CD8+ variaron entre sí a los 8 días de iniciado el MLC, de igual manera que para los cultivos con un 50% de compatibilidad, éstas proporciones tendían a incrementarse conforme transcurría el periodo de cultivo llegando a encontrarse a los 10 días de iniciado el cultivo proporciones de LT CD8+ hasta del 65% (Figura 8 y 9).

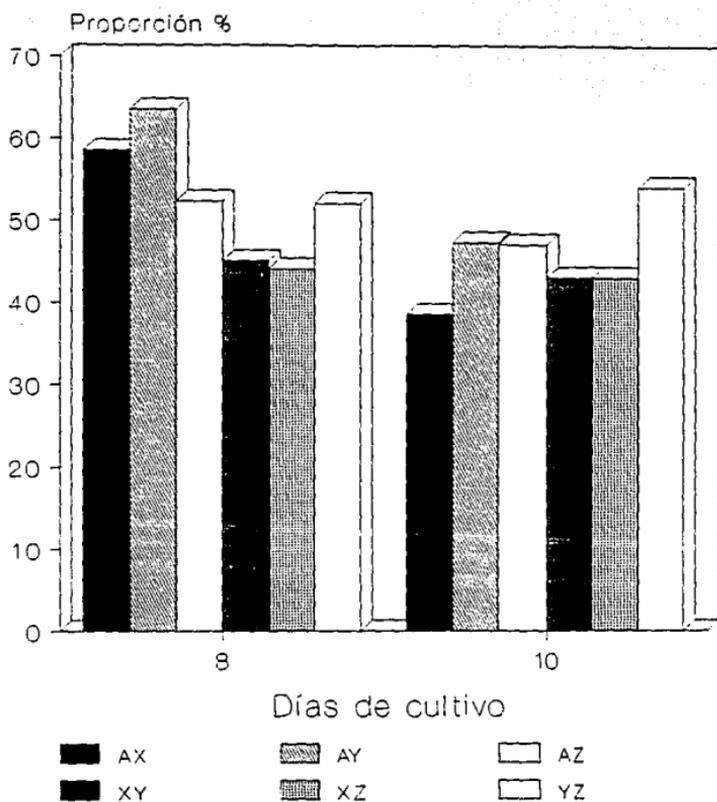


Figura 8. Subpoblaciones linfocitarias CD4+ a los 8 y 10 días de cultivo.

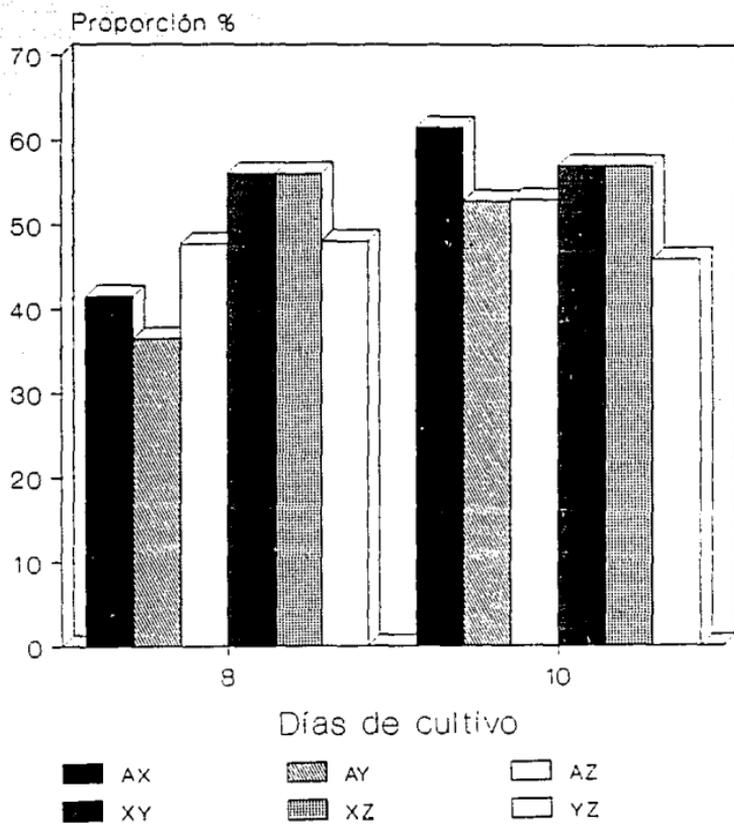


Figura 9. Subpoblaciones linfocitarias CD8⁺ a los 8 y 10 días de cultivo.

VII. DISCUSION

Los resultados obtenidos, demuestran que la proliferación celular entre MLC de individuos emparentados y no emparentados varía considerablemente. Este hecho es evidente si observamos los índices mitóticos y la cinética de proliferación celular a los 8 y 10 días de iniciado el cultivo para cada uno de los MLC en estudio.

Si consideramos el reconocimiento aloantigénico generado en la reacción mixta linfocitaria así como el control genético que involucra, las diferencias observadas en la proliferación de los cultivos mixtos de linfocitos en estudio, coincide con el hecho que en los MLC entre individuos emparentados la división celular fué escasa o inexistente o bien la estimulación en cada caso no era la suficiente para desencadenar una respuesta proliferativa considerable al punto tal que no fué posible la determinación de los índices mitóticos, en contraste con los obtenidos para los cultivos mixtos de linfocitos de individuos no emparentados en donde se observaron índices hasta de 3%.

En el MLC, se da una activación policlonal de las células T y la asincronía con la que las células responden resulta importante considerarla. Cuando observamos la progresión del ciclo a través del tiempo, es evidente con los resultados, que en los MLC las clonas involucradas CD4+

(al inicio) y CD8+ (en el transcurso de la proliferación) se modificaron conforme las primeras reconocían a los aloantígenos con restricción del MHC y los linfocitos CD8+ respondían a ese estímulo significativo y suficiente (MLC individuos no emparentados).

Estas clonas respondieron de acuerdo al estímulo inicial, el cual por la presencia continua del antígeno en el cultivo, propició la proliferación celular y la progresión del ciclo con el transcurso del tiempo; obteniéndose una proliferación celular considerable, atribuible a la complejidad de los aloantígenos involucrados en los MLC entre individuos no emparentados en contraste a los aloantígenos encontrados en los MLC entre individuos emparentados.

Tomando en cuenta que la activación de los diversos grupos celulares involucrados en el MLC (LT y APC principalmente macrófagos ya sean propios o alogénicos) (41) es atribuida al reconocimiento antigénico de las moléculas -DR y -DQ consideradas como antígenos convencionales responsables de la reacción mixta linfocitaria (46-49), podemos decir entonces, que el reconocimiento aloantigénico y por consiguiente la respuesta proliferativa en los MLC entre individuos emparentados coincide con lo esperado, o sea fue escasa en comparación a la que existió en los MLC de individuos no emparentados, ya que la restricción genética en el reconocimiento de los antígenos HLA clase I y II por

parte de los linfocitos T y el reconocimiento de moléculas aloantigénicas propias (control negativo), secuencialmente similares ó iguales (individuos emparentados), impide de alguna manera que se desencadene el procesamiento antigénico (41). Esto es evidente si observamos los índices mitóticos para los individuos no emparentados los cuales muestran de alguna manera el estímulo aloantigénico generado en estos cultivos.

Por otro lado si tomamos en cuenta en las proporciones de metafases registradas a los 8 días, las de primera división son predominantes en los MLC de individuos no emparentados modificándose la proporción a los 10 días de iniciado el cultivo, siendo ahora mayor la de metafases de tercera división. Ello demuestra que la progresión del ciclo celular respecto al tiempo fué mayor en los MLC de individuos no emparentados.

Existen evidencias que demuestran que la proliferación observada en los MLC, en los que se presentaba compatibilidad total con respecto a los antígenos HLA-A, -B, -DR y -DQ, puede ser atribuida a los antígenos HLA-DP (43,44,45), los cuales, inducen una respuesta proliferativa significativa, la cual estaría relacionada de manera importante en la incidencia de severas reacciones injerto contra huésped, en el transplante de médula ósea entre individuos no relacionados y con una compatibilidad total o

parcial hacia los antígenos HLA-A, -B, -C, -DQ, -DR e incompatibilidades hacia los antígenos HLA-DP. (50,51,52)

En los cultivos realizados, dichas moléculas pudieron ser las responsables de la proliferación celular encontrada a los 8 y 10 días de iniciado el cultivo, en particular para los MLC de YZ (100% de histocompatibilidad para los antígenos HLA tipificados) y así también proveer un estímulo proliferativo adicional en el MLC en presencia de disparidades en las moléculas HLA-A, -B, -DR, -DQ involucradas en cada uno de los cultivos.

Consideramos que para descartar la posibilidad arriba mencionada hubiese sido conveniente evaluar, el hecho de que las moléculas -DP hayan sido las responsables o no de la proliferación en los cultivos estudiados, mediante la tipificación de dichas moléculas. Sin embargo, esta prueba no se realiza en las tipificaciones de rutina, dado su elevado costo puesto que involucra el análisis molecular de las cadenas polimórficas (53, 54).

Los resultados obtenidos son comparables con lo reportado por el método tradicional de incorporación de timidina tritiada para el análisis de la proliferación en el cultivo mixto de linfocitos. En dicho método se reporta que la incorporación de éste análogo se inicia entre el tercer y quinto día (3,4) de iniciado el cultivo correlacionando esto con lo encontrado por el método de incorporación de BrdU.

Por otra parte, resulta interesante considerar que la sensibilidad mostrada por el método de incorporación de BrdU para evaluar la proliferación celular en el MLC es aceptable dado que los resultados son confiables, reproducibles y ofrecen mayor información para la valoración de la respuesta proliferativa en el MLC, porque al evaluar la cinética de proliferación celular en el MLC permite conocer la evolución de las clonas involucradas durante la MLR como ya se ha realizado en cultivos de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (55) (las células que se encontraban en primera división y que progresaron hasta llegar a segundas divisiones e incluso a terceras divisiones mitóticas) y lo cual representa una gran utilidad cuando se pretende conocer los mecanismos de activación clonal en la MLR dependiente de los aloantígenos HLA (-A, -B, -C, -DQ, -DR y -DP posiblemente), así como marcadores característicos de una población celular (CD4+ y CD8+), y la evolución de la proliferación celular observada en el presente trabajo.

Finalmente, el haber logrado reproducir el MLC con las técnicas citogenéticas y que son utilizadas ampliamente en la toxicología genética, amplía las posibilidades de uso para esta prueba ya que se le puede utilizar en el monitoreo biológico de individuos o poblaciones expuestas que pudieran sufrir daño directo o indirecto al DNA. La importancia de utilizar ensayos que permitan caracterizar la respuesta inmune de individuos en riesgo por exposición aguda o crónica a agentes tóxicos, radica en la necesidad de

caracterizar los cambios biológicos que sufren estos individuos para establecer el riesgo que tienen de sufrir enfermedades.

La caracterización de la respuesta inmune frente a la exposición de agentes tóxicos, es relevante por lo esencial que el sistema inmune resulta en el mantenimiento de la salud humana.

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo muestran que:

1. La cinética de proliferación celular y el índice mitótico en el MLC entre individuos no emparentados están incrementados en comparación a los MLC entre individuos ~~(X)~~ emparentados.

2. La evaluación del índice mitótico y la cinética de proliferación celular en el MLC permite predecir una reacción inmune hacia aloantígenos HLA "in vivo".

3. La progresión del ciclo celular en el MLC es dependiente de la histocompatibilidad existente en cada grupo celular involucrado (cultivo mixto de linfocitos bidireccional).

4. La evaluación de la proliferación celular en el MLC mediante el método de incorporación de BrdU es comparable a lo reportado para el método de incorporación de timidina tritiada.

5. El análisis de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ por citometría de flujo en el MLC bidireccional no se modificaron considerablemente entre individuos emparentados y no emparentados.

6. La implementación del MLC con técnicas citogenéticas tradicionales de citogenética permite incorporarlo a la gama de pruebas utilizadas en la toxicología genética.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

IX. REFERENCIAS

1. Klein, J. (1982) Immunology. John Wiley & Sons, In. E.U.A. pp 453-459.
2. Bain, B., Vas, M.R., y Lowenstein, L. (1964) The development of large immature mononuclear cells in mixed leokocyte cultures. Blood 23: 108-116.
3. Bach, F. H. y Hirschorz, K. (1964) Lymphocyte interaction: A potential histocompatibility test in vitro. Science 143: 813-814.
4. Bach, F. H. y Voynow, N. K. (1966) One way stimulation in mixed leokocyte cultures. Science 153: 545-547.
5. Stites, F. D. y Stobo, D. J. (1988) Inmunología Básica y Clínica. El Manual Moderno, S. A. de C. V. pp 46-58.
6. Male, D. y Champion, B., Cooke, A., Owen, M. (1987) Advanced Immunology. Gower Medical Publishing. New, York. p 17.0.
7. Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., Schlossman, S. F. (1979) Separation of funtional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 4061-4065.

8. Roitt, I. M., Bronstoff, J. y Male, D. K. (1989) Immunology. C.V. Mosby, Missouri. p. 2.2
9. Benacerraf, B. (1972) Histocompatibility linked immune responses genes. Science 175: 273-275.
10. Daar, A. S., Fuggle, S. V., Fabre, J. V., Ting, A. y Morris, P. J. (1984) The detailed distribution of HLA-ABC antigens in normal human organs. Transplantation 38: 287-290.
11. Vanky, F. (1986) Membrane structures involved in autotumor recognition. Biochimica et Biophysica acta. 865: 253-265.
12. Forman, J. (1984) T cells, the MHC, and functions Immunol. Rev. 81: 203-219.
13. Accola, R. S. (1991) The molecular biology of MHC genes. Immunol. Today 12: 97-99.
14. Lancki, D. W., Hsielt, C. S. y Fitch, F. W. (1991) Mechanisms of lysis by cytotoxic clones, J of Immunol. 146: 3242-3249.
15. De-Vries, J. E., Yssel, H. y Spits, H. (1989) Interplay between the TCR/CD3 complex and CD4 or CD8 in the activation of cytotoxic T lymphocytes. Immunol. Rev. 109: 119-141.

16. Kahn, M., Sugawara, H., McGowan, P., Okuno, K., Nagoya, S., Hellstrom, K. E., Hellstrom, I. y Greenber, P. (1991) CD4+ T cell clones specific for the human p97 melanoma associated antigen can eradicate pulmonar y metafases from a murine tumor expressing the p97 antigen. J. Immunol. 148: 3235-3241.
17. Mukherji, B., Chakraborty, N. G. y Sivanandham, M. (1990) T cell clones that react against human tumors. Immunol. Rev. 116: 33-62.
18. Tompkins, M. B., Pang, V. F., Micheley, P. A., Feinmehl, R. I., Basgall, E. J., Baslezer, T. V., Zazhary, J. F. y Tompkins, W. A. A. (1989) Feline cytotoxic large granular lymphocytes induced by recombinant human IL-2. J. Immunol. 143: 749-754.
19. Vanky, F., Gorsky, T., Gorsky, Y., Masucci, M. G. y Klein, E. (1982) lysis of tumor biopsy cells by autologous Y lymphocytes activated in mixed cultures and propagated with T cell growth factor. J. Exp. Med. 155: 83-88.
20. Chem, B. P. (198) Selective lysis of target cells by interleukin-2 expanded peripheral blood mononuclear leukocyte clones. Cell. Immunol. 118: 458-469.
21. Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA). (1993). Registro Nacional de transplantes. México, D. F.

22. Wolff, S., Afzal, V y Lindquists, P. B. (1984) Cultured human lymphocytes proliferate faster in medium lacking fetal calf serum and antibiotics. *Mut. Res.* 70: 343-350.
23. Pardee, A. B., Dubrow, R., Hamlin, J. L. y Kletzein, R. F. (1978) Animal cell cycle. *Ann Rev. Biochem.* 47: 715-750.
24. Andref, M. (1986) Cell kinetics of leukemia. *Semin. Haematol.* 23: 300-314.
25. Lathja, L. G., Oliver, R. y Gurney, G.W. (1982) Kinetics model of a bone-marrow stem-cell population. *Bri. J. Haematol.* 8: 442-460.
26. Prescott, D. M. (1976) Reproduction of the use eucaryotic cells. Academic. Press, New York.
27. Means, A. R., Tash, J. S. y Chafouleas, J. G. (1982) Physiological implications of the presence distribution and regulation of the calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol. Rev.* 62: 1-39.
28. Matsui, Y., Shapiro, H. M., Sheehy, M. J., Christenson, L., Satauton, D. E., Eynon, E. E. y Yunis, E. J. (1986) Differential expression of T cell differentiation antigens and major histocompatibility antigens on activated T cell during the cell cycle. *Eur. J. Immunol.* 16: 248-251.

29. Deledane, A. M. y Lee, A. S. (1982) Coupling of histone and DNA synthesis in the somatic cell cycle. *Science* 215 79-81.
30. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K y Watson, J. D. (1983) *Molecular Biology of the cell*. Garland Publishing Inc, New York.
31. Klaus, G. B. y Hawrylowicz, C. M. (1984) Cell cycle control in lymphocyte stimulation. *Immunology Today* 5: 15-19.
32. Gillis, S., Ferm, M. M., Ou, W. y Smith, J. A. (1978) T cell growth factor. Parameters of reproduction and quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* 120: 2027-2032.
33. Meuer, S. C., Hussey, R. E. Cantrell, D. D., Hodgdon, J. C., Schlossman, S. F., Smith, K. A. y Reinherz, E. L. (1984) Triggering of the T3-T antigen receptor complex results in clonal T cell proliferation through an interleukin 2 dependent autocrine pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
34. Cantrell, D. A. (1983) Transient expression of inteleukin 2 receptors. *J. Exp. Med.* 158: 1895.1911.
35. Gullberg, M. y Smith, KL. A. *J. Exp. Med.* 163. 270 (1986).

36. Cantrell, D. A. (1984) The interleukin-2 T cell system: A new cell growth model. *Science* 224:1323-1326.
37. Mc Carthy, M., Michalski, J., Searo, E., Mc Combs, C. (1990) Inhibition of polyamine synthesis supresses human lymphocyte proliferation without decreasing cytokine production or interleukine 2 receptor expressin. *Immunopharmacology* 20: 11-20.
38. Kalus, G. y Hawrylowidz, O. (1984) Cell cycle control in lymphocyte stimulation. *Immunology Today* 5: 15-19.
39. Hardy, D. A., Ling, N. R., Wallin, J. M. y Aviet, T. (1970) Destruction of lymphoid cells by activated human lymphocytes. *Nature (London)* 227: 723-725.
40. Harmon, W. E., Parkman, R., Gavin, P. T., Ingelfunger, J. R., Yunis, E. J. y Levey, R. H. (1982) Comparison of cell mediated lympholysis and mixed lymphocyte culture for renal transplantation. *J Immunol.* 129: 1573-1577.
42. Klein, J. (1987) *Immunology*. John Wileg & Sons, In. E.U.A.
43. Bach, F. H. y Amos, D. B. (1987) Hu-1: major histocompatibility locus in man. *Science* 156: 1506-1508.

44. Rose, N. R., Friedman, H. y Fahey, J. L. (1986) Manual of Clinical Laboratory Immunology. American Society for Microbiology. Washington, D. C.

45. Olerup., Möller, E. y Persson. U. (1990) HLA-DP incompatibilities induce significant proliferation in primary mixed lymphocyte cultures in HLA-A, -B, -DR, AND -DQ compatible individuals: Implications for allogenic bone marrow transplantation. Tissue Antigens 36: 194-202.

46. Sell, T. W. y Eckels, D. D. (1990) Primary Mixed Lymphocyte Responses to HLA-DP. Human Immunology 29: 23-30.

47. Schoeijers, W. E. M., De Koster, H. S., Van Rood, J. J. Y Termijtelen. A. (1988) HLA-DRBIII and HLA-DP induce comparable proliferation in primary mixed lymphocyte culture. Tissue Antigens 32: 145-149.

48. Baxter. lowe, L. A., Eckel's, D. D., Ash, R., Casper, J., Hunter, J. B. y Gorski, J. (1992) The predictive value of HLA-DR oligotyping for MLC response. Transplantation 53: 1352-1357.

49. Jong, J. Y., Hsia, S., Parris, G. L. et al (1993) . Molecular compatibility and renal graft survival- The HLA-DQB1 genotyping. Transplantation 55: 390-395.

50. Kato, Y., Mitsuishi, Y., Cecka, M., Hopfield, J., Hunt, L., Champlin, R., Terasaki, P. I., Gajewski, J. L. (1991) HLA-DP incompatibilities and severe graft-versus-host disease in unrelated bone marrow transplants. Transplantation 52: 374-386.

51. Odum, N., Plate, P., Dakobsen, B. K., et al (1987) HLA-DP and bone marrow transplantation: DP incompatibility and severe graft versus host disease. Tissue Antigens 30: 213.

52. Pawelec, G., Ehninger, G., Schmidt, H., Wernet, P. (1986) HLA-DP matching and graft versus disease in allogeneic bone marrow allogeneic marrow transplantation 558.

53. Olerup, O., Aldener, A., Fodgell, A. (1993) HLA-DBQ1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primer (PCR-SSP) in 2 hours Tissue Antigens 41: 119-134.

54. Olerup, O. y Zeherquist. H. (1992) HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical paractive including donor recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens 39: 225-235.

55. Sánchez, A. F. J. (1987). Intercambio de cromátidas hermanas y ciclo celular en diferentes subpoblaciones de linfocitos T humanos. TESIS MAESTRIA.