

17
20je



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

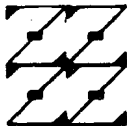
OBTENCION, TIPIFICACION Y CONSERVACION
DE SUEROS ANTI-HLA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
RAQUEL CRUZ SANTOS

Asesor Externo: Q.B.P. Dolores Delgado Ochoa

Asesor Interno: Dr. Rubén Marroquín Segura



LO MURANO

DE

DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1994

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.

Al principio. . . .

crecer, impulsa conocer

crear es una búsqueda constante,

consuetudinariamente al inicio

y alguna vez agobiante.

Para llegar

a una obra que siempre será inconclusa, .

el aprendizaje.

escenario de nuestras vidas

camino futuro.

Este trabajo, se realizó:

**En el Hospital Juárez de México
en la División de Investigación y Enseñanza
en el Laboratorio de Inmunología
bajo la Dirección de:
Q.B.P. Dolores Delgado Ochoa.**

JURADO:

PRESIDENTE	Q.F.B. Ma. Mercedes Zamudio Durán
VOCAL	Dr. Rubén Marroquín Segura
SECRETARIO	Q.F.B. Rosalinda Escalante Pliego
SUPLENTE	Q.F.B. Cesar O. Jiménez Pierre
SUPLENTE	Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera

ASESORES DEL TEMA:

Q.B.P.	Dolores Delgado Ochoa
Dr.	Rubén Marroquín Segura

DEDICATORIAS

La presente tesis se la dedico a:

Mi Mamá y a mis Hermanos:

**Juan, Rubén, Olga, Maribel y Alejandro,
por el apoyo que siempre me han brindado.**

Gracias.

INDEX

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
II.	FUNDAMENTACION DEL TEMA	2
	A. FUNCION DEL SISTEMA INMUNE	2
	B. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD	9
	C. ANTECEDENTES HISTORICOS DEL SISTEMA HLA	13
	D. CLASIFICACION, ESTRUCTURA Y DISTRIBUCION DEL SISTEMA HLA.	16
	E. FUNCION E IMPORTANCIA DEL SISTEMA HLA	21
	F. METODOS DE OBTENCION DE SUEROS ANTI HLA	28
	G. METODOS DE TIPIFICACION DEL SISTEMA HLA	32
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	36
IV.	OBJETIVOS.	37
V.	HIPOTESIS.	38
VI.	CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION	39
VII.	MATERIAL Y METODO	40
VIII.	RESULTADOS.	49
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS	55
X.	CONCLUSIONES	59
XI.	PROPUESTAS Y O RECOMENDACIONES	60
	GLOSARIO	
	ANEXO	
	BIBLIOGRAFIA.	

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

En el presente trabajo se obtuvieron 75 sueros anti-HLA a partir de placentas. Se empleó la técnica de microlinfocitotoxicidad para tipificarlos y la técnica de absorción con plaquetas para mono-especificarlos.

La importancia de la obtención de los sueros reside en que los podemos utilizar para diagnosticar compatibilidad en trasplantes, en estudios de enfermedades, de paternidad y antropológicos mediante la determinación de los antígenos HLA.

El contenido de la tesis presenta generalidades del sistema inmune; características del sistema HLA y sus antecedentes históricos, su relación con la influencia de algunas enfermedades y sus métodos de determinación. Posteriormente se describen las técnicas empleadas, en la obtención, tipificación y conservación de los sueros. Finalmente se dan resultados y conclusiones, incluyéndose un apéndice con preparación de reactivos, y un glosario.

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

A. FUNCION DEL SISTEMA INMUNE.

La habilidad para distinguir lo propio de lo no propio es una característica protectora virtualmente de todos los organismos multicelulares, asegurando su mecanismo de defensa dirigido hacia microorganismos invasores que causen daño al tejido hospedero (Boehmer, 1991; Male, 1987).

El sistema inmune puede definirse como el conjunto de mecanismos fisiológicos de los que está dotado el organismo para reconocer materiales como propios o extraños, neutralizarlos, metabolizarlos y eliminarlos. El sistema inmune combina tres características: primero, es altamente específico, propiedad que facilita el reconocimiento de lo propio y responde ante algunos microorganismos o moléculas extrañas (antígenos). La segunda característica, es la heterogeneidad que origina gran número de tipos y productos celulares que interactúan con una gran diversidad de respuestas correspondiendo a la gran variedad de tipos celulares. Finalmente el sistema inmune tiene memoria: después de la exposición inicial con el antígeno, se realizan varios cambios en el sistema inmune, es capaz de responder más rápido y vigorosamente a las reexposiciones. (Amos, 1969; Smith, 1990; Boehmer, 1991).

Hay dos clases de respuesta inmune: Inespecífica y Específica (Figura 1). La inmunidad inespecífica, se refiere al primer encuentro del huésped

con el cuerpo extraño que origina una respuesta la cual consiste en movilizar elementos fagocíticos (macrófagos, eosinófilos y neutrófilos) que se dirigen a la zona donde se ha introducido el cuerpo extraño. Este proceso requiere las siguientes etapas: reconocimiento del material que debe ser ingerido, movimiento hacia el mismo (quimiotaxia), fijación, ingestión y digestión intracelular. A todo este mecanismo se le denomina Endocitosis, término más general que incluye tanto la fagocitosis (ingestión de partículas) como la pinocitosis (captación de elementos que no son partículas (p.ej. gotitas de líquido) (Albert, 1989).

La respuesta inmune específica tiene a su cargo el reconocimiento y tratamiento último al que están sometidos elementos extraños. Hay dos tipos de mecanismos que median la respuesta inmune: 1) Respuesta por anticuerpos (Inmunidad Humoral) y 2) Respuesta inmune mediada por células (figura 1). La primera involucra la producción de anticuerpos que son proteínas llamadas Inmunoglobulinas. Los anticuerpos circulan en el torrente sanguíneo y están difundidos en los fluidos del cuerpo donde se unen específicamente con los antígenos e inician así toda una gama de fenómenos secundarios como la fijación del complemento o para facilitar la ingestión de las células fagocíticas (Albert, 1989).

La segunda clase de respuesta inmune específica involucra la producción de células especializadas, éstas reaccionan con antígenos extraños en la superficie de otras células huésped. La reacción celular puede matar a virus que infectan a las células hospederas, éstas tienen proteínas virales en su superficie, de ese modo eliminan la célula infectada (Albert, 1989).

ESTIMULO (INMUNOGENO)



RESPUESTA INMUNITARIA



CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENO



ACTIVACION DE LINFOCITOS E INTERACCION CELULA A CELULA



PROLIFERACION Y DIFERENCIACION



INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS

LINFOCITOS T

INMUNIDAD HUMORAL

LINFOCITOS B

Figura 1.
Mecanismos efectores que median la respuesta inmunitaria.

El sistema inmune está compuesto en gran parte de millones de células sanguíneas blancas (hay aprox. 2×10^{12} linfocitos en el cuerpo humano). Estos se encuentran en la sangre, la linfa (fluido incoloro en los vasos linfáticos que conectan los nodulos linfoides del cuerpo), y en órganos los linfoides especializados; tales como el timo, nódulos linfoides, bazo, etc. (Figura 2). Las células linfoides tienen su origen en una célula madre pluripotencial que en el feto se encuentra dentro del saco vitelino, la médula ósea y el hígado; y en el adulto en la médula ósea. Estas células producen dos clases de células progenitoras: 1) Una célula progenitora hematopoyética que da origen a elementos eritroides, granulocitos o megacariocitos y 2) Una célula progenitora linfoide precursora, que da origen a células de la serie linfoide. (Albert, 1989; Golde, 1991)

Los linfocitos periféricos humanos consisten en dos diferentes subclases de células, los linfocitos T y los linfocitos B, los cuales se definen principalmente por sus marcadores de superficie diferentes (Tabla 1). Las células T se desarrollan en el timo y son responsables de la inmunidad mediada por células efectuando dos tipos de funciones inmunológicas: efectora y reguladora. Las células B que se reproducen en la médula ósea expresan moléculas de anticuerpos en su superficie y cuando son estimuladas por un antígeno específico secretan anticuerpos con una especificidad (Schrempf, 1980; Albert, 1989; Smith, 1990).

Tabla No. 1
 MARCADORES DE SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS

Marcadores de superficie.	Células T.	Células B.
Receptor para fijación de antígeno	Región V Idiotipo	Inmunoglobulina
Receptor SRBC (E-Roseta)	+	-
Receptor IgGfc (EA-Roseta)	+ (T8)	+
Receptor IgM (EA-Rosetas)	+ (T4)	-
Receptor C3B (EAC-Rosetas)	-	+
Virus del sarampión	+	-
Virus de Epstein-Bar	-	+
Aloantígenos.		
HLA: A, B y C	+	+
HLA: D/DR	+/-	+

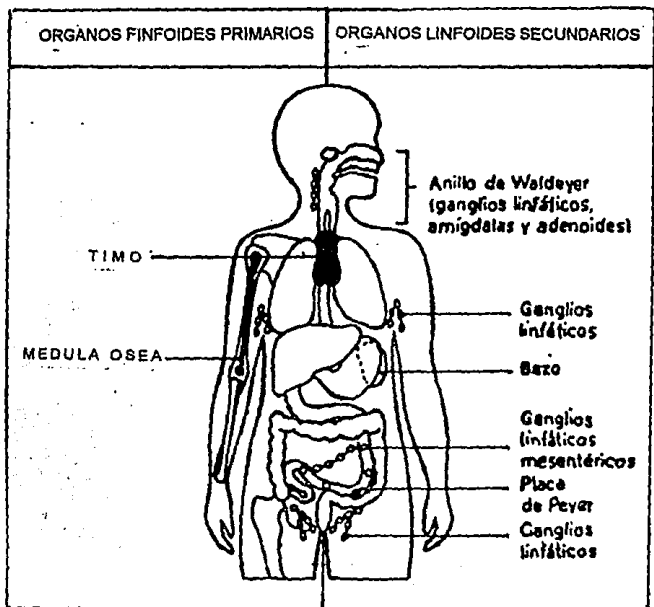
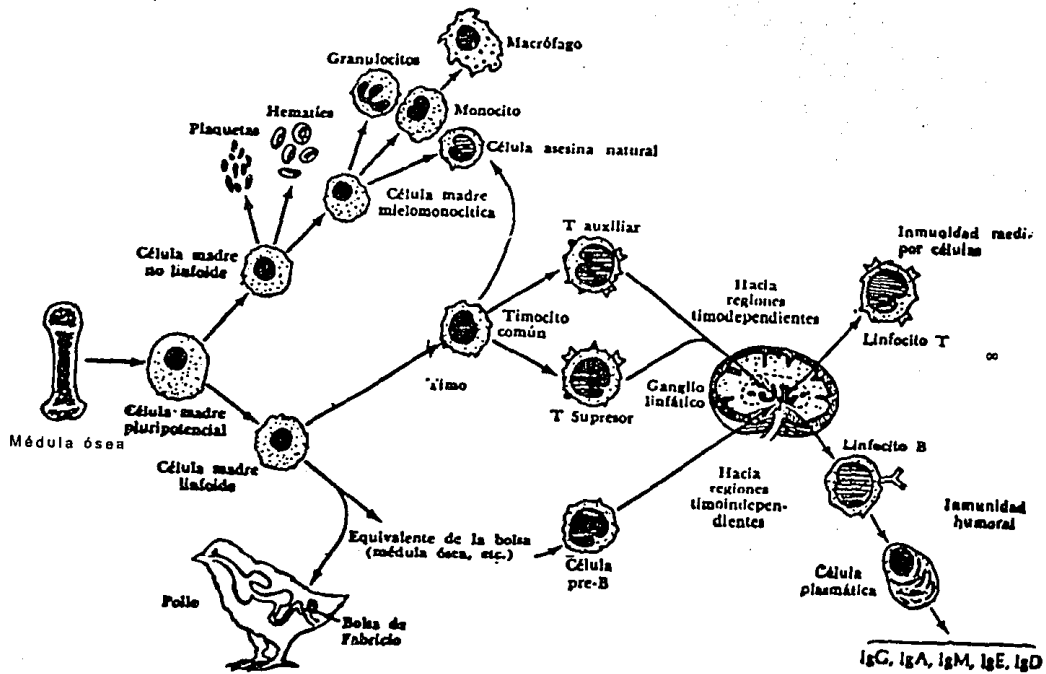


Figura No. 2.

Organos Linfoides Humanos. Los linfocitos maduran en el timo y médula ósea (de color oscuro) a los cuales se les denomina órganos linfoides primarios. Los linfocitos formados migran de estos órganos primarios hacia los órganos linfoides secundarios (de color clara), donde éstos pueden reaccionar con el antígeno.

Tomado de: Roitt, 1991 (42).

Figura No. 3.
 Diferenciación de células progenitoras en células hematopoyéticas y células inmunocompetentes;
 Sites, 1993 (49).



B. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Las moléculas de histocompatibilidad, una familia de glucoproteínas codificadas por un complejo de genes llamados el Complejo Mayor de Histocompatibilidad es conocido en el humano como Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA).

Este sistema conduce a la individualización o caracterización del tejido humano por varias razones. Primero, por que es uno de los marcadores genéticos característicos de la transmisión hereditaria debido a su alto polimorfismo, siendo difícil que dos personas posean los mismos alotipos. En segundo lugar, su variabilidad, cada órgano tiene una diferente especie de antígenos los cuales tienen un componente exclusivo. La mayoría de los organismos tienen múltiples antígenos, muchos de ellos existen en otro tejido, pero algunos son específicos de cada órgano (Basch and Stetson, 1962). Finalmente, retienen la integridad antigénica que podrá provocar la degradación de otras moléculas biológicas (Amos, 1969; Bishara, 1988).

El sistema HLA tiene múltiples formas alternativas o alelos del gen en cada locus conocido (tabla 2), estos genes se heredan por unidades denominadas haplotipos. Ya que los individuos heredan un cromosoma de cada padre, cada individuo tiene dos haplotipos HLA. Todos los genes HLA son codominantes, de manera que se expresan ambos alelos de un locus determinado HLA y se puede detectar dos grupos completos de antígenos HLA sobre las células, uno de cada padre. Basado en la herencia mendeliana, existe un 25% de oportunidad de que dos descendientes

TABLA No. 2. LISTA COMPLETA DE HLA ESPECIFICOS (1991)

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	HLA-D	HLA-DQ	HLA-DP	
A1	B5	B50(21)	Cw1	DR1	Dw1	DQ1	DPw1
A2	B7	B51(5)	Cw2	DR103	Dw2	DQ2	DPw2
A203	B703	B5102	Cw3	DR2	Dw3	DQ3	DPW3
A210	B8	B5103	Cw4	DR3	Dw4	DQ4	DPw4
A3	B12	B52(5)	Cw5	DR4	Dw5	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B53	Cw6	DR5	Dw6	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B54(22)	Cw7	DR6	Dw7	DQ7(3)	
A11	B15	B55(22)	Cw8	DR7	Dw8	DQ8(3)	
A19	B16	B56(22)	Cw9(w3)	DR8	Dw9	DQ9(3)	
A23(9)	B17	B57(17)	Cw10(w3)	DR9	Dw10		
A24(9)	B18	B58(17)		DR10	Dw11(w7)		
A2403	B21	B59		DR11(5)	Dw12		
A25(10)	B22	B60(40)		DR12(5)	Dw13		
A26(10)	B27	B61(40)		DR13(6)	Dw14		
A28	B35	B62(15)		DR14(6)	Dw15		
A29(19)	B37	B63(15)		DR1403	Dw16		
A30(19)	B38(16)	B64(14)		DR1404	Dw17(w7)		
A31(19)	B39(16)	B65(14)		DR15(2)	Dw18(w6)		
A32(19)	B3901	B67		DR16(2)	Dw19(w6)		
A33(19)	B3902	B70		DR17(3)	Dw20		
A34(10)	B40	B71(70)		DR18(3)	Dw21		
A36	B4005	B72(70)			Dw22		
A43	B41	B73			Dw23		
A66(10)	B42	B75(15)		DR51			
A68(28)	B44(12)	B76(15)		DR52			
A69(28)	B45(12)	B77(15)		DR53	Dw24		
A74(19)	B46	B7801			Dw25		
	B47				Dw26		
	B48						
	B49(21)						
		Bw4					
		Bw6					

Tomado de: Tsuji, 1991 (53).

compartan ambos haplotipos, 50% de que compartan sólo un haplotipo y 25% de que no compartan ningún haplotipo y sean HLA-incompatibles (Figura No. 4).

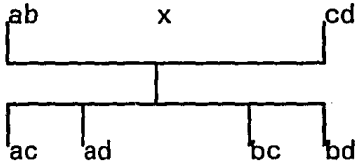


Figura No. 4.

Herencia de Haplotipos. Los haplotipos maternos son a y b y los paternos son c y d. La descendencia de esta unión (ab x cd), heredan uno de dos haplotipos posibles de cada padre y, por lo tanto, tendrá haplotipos ad, ab, bc y bd.

MECANISMO DE RESPUESTA DEL CMH

Las moléculas HLA en la superficie de las células fagocíticas (llamadas células presentadoras de antígeno) se unen con el antígeno, y este complejo HLA-péptido es reconocido por los linfocitos T determinando la existencia y magnitud de la respuesta inmune para el antígeno (Golstein, 1990).

El reconocimiento de los antígenos por las células T consiste de pequeños péptidos extraños asociados con productos genéticos del CMH clase I ó II.

El precursor de los linfocitos T citotóxicos (pTc) reconoce primeramente aloantígenos de clase I por medio de su receptor T- celular (TCR), ésta es

la señal 1 para el pTc. Esta señal, tal vez junto con otra estimulación, dirige el pTc hacia una etapa en la cual el receptor para interleucina 2 (IL-2R) es expresado y la célula es preparada para recibir ayuda, por el linfocito T citotóxico regulador (pOTc). El precursor del linfocito T auxiliador (pTh) responde a los aloantígenos clase II e interleucina 1 (producida por macrófagos) y son activadas para estimular a los linfocitos T auxiliares (eTh), estas células producen varias linfocinas, tal como interleucina 2 e interferon gama. El linfocito T citotóxico utiliza la interleucina 2 (señal 2) para ejercer su efecto (eTc). (figura 3)

Las células B reconocen al antígeno directamente con su receptor para inmunoglobulina, las células T pueden únicamente reconocer al antígeno cuando estos son expresados en la membrana celular en unión con moléculas CMH. El receptor de antígenos de las células T reconocen epitopes en conjunto con partes de moléculas CMH propias (Dasgupta, 1987; Bach, 1987; Male, 1987).

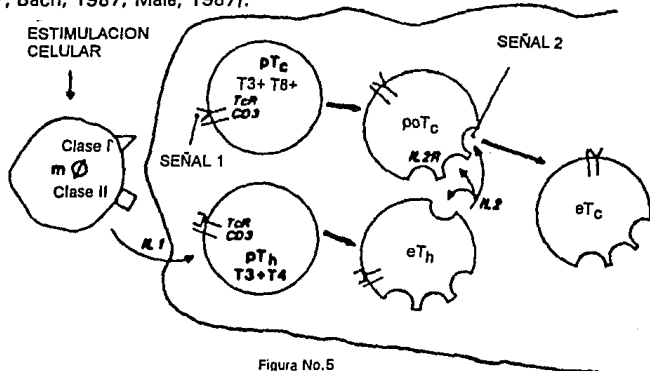


Figura No.5

Respuesta de linfocitos T citotóxicos y Linfocitos T auxiliares para aloantígenos clase I y clase II y mediación funcional de los linfocitos T citotóxicos. Tomada de: Bach, 1987 (7).

C. ANTECEDENTES HISTORICOS

Los genes que codifican para el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) fueron descritos por primera vez en 1936 por Gorer y colaboradores quienes describieron los isoantígenos de el ratón y en 1948 el locus mayor H-2. (Röttschke, 1991)).

Este complejo tomó importancia décadas después por codificar genes para la presentación de antígenos cuando en los años 50's el Dr. Dausset, Moeschlin y Schmid en trabajos independientes descubrieron que el suero de algunos pacientes politrasfundidos contenían anticuerpos que provocaban la leucoaglutinación de algunos linfocitos de otras personas, lo cual permitió la identificación del primer Antígeno Leucocitario del Humano (HLA). Este descubrimiento propició el inicio de una serie de estudios que han permitido en años posteriores llegar a la individualización del sistema HLA (Dausset, 1970).

1955 Amos y Allen reportaron el primer recombinante del sistema H-2. La primera información importante acerca del tejido humano y aloantígenos leucocitarios fue obtenida de estudios de autoinmunidad para leucocitos por Rose Payne en 1956, cuando demostró la presencia de leucoaglutininas en distintos estados patológicos: embarazo, enfermedades del hígado, hernia hiatus, mielofibrosis, neoblastoma, anemia refractaria y anemia por pérdida de sangre, demostrando que las leucoaglutininas son más frecuentes en sujetos quienes recibieron muchas transfusiones.

En 1958 Van Root y colaboradores también demostraron que los anticuerpos antileucocitarios eran producidos en el suero de las mujeres

embarazadas.

En 1959 Gorer y Mikulka mostraron la región H-2 de un grupo de 9 eslabones del ratón que ocupaba una longitud del extremo del cromosoma.

En los años 60's el Dr. Van Root y colaboradores, observaron que la supervivencia de los trasplantes de piel eran significativamente más alta y prolongada en los individuos con configuración de hermandad idénticas de HLA a diferencia de los no idénticos.

En 1964 Kissmeyer-Nielsen implementaron la técnica NIH para determinar los antígenos HLA, y en 1967 Terasaki y Mc. Clelland le hicieron algunas modificaciones a esta técnica, siendo la que se realiza actualmente.

En la siguiente década hubo notables avances en el esfuerzo para aislar los componentes individuales de el sistema HLA. Payne y Bodmen descubrieron cinco alelos en el humano. Posteriormente Van Root y Lan Leeuwen describieron dos alelos. Dausset e Ivanyi propusieron en 1965 que estos antígenos forman parte de un sistema complejo de histocompatibilidad.

Fue hasta noviembre de 1967 en Williams Burg, Virginia que se le dió el nombre de HLA por aceptación general de los investigadores que integraban el World Health Organization (WHO) y que actualmente es denominado International Histocompatibility Testing Workshop. (Amos, 1968).

Los estudios del material genético de este sistema iniciaron hasta la década de los 80's cuando fueron obtenidas las primeras clonas de cDNA simultáneamente en el humano por Ploegh et al. y Soon et al; en el sistema

murino por Kvist et al. (Jordan, 1985).

Redman C.W: G., en 1984 usando técnicas inmunológicas demostró en la placenta del humano (trofoblasto veloso superficial) productos de el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de la clase I.

Pamela J. Borkman y Don C. Wiley demostraron la unión de péptidos del MHC dentro de la célula por cristalografía mostrando dos tipos: MHC clase I que muestra péptidos de proteínas sintetizados dentro de la célula y MHC clase II que sintetiza sus péptidos extracelularmente (Boehmer, 1991).

D. CLASIFICACION, ESTRUCTURA Y DISTRIBUCION DEL SISTEMA HLA.

El sistema de histocompatibilidad es un grupo de genes que se encuentran en el brazo corto del cromosoma No.6 del humano. Estos antígenos de trasplante en general son glucoproteínas que existen en la superficie de la mayor parte de las células. El MHC contiene más de 30 genes que controlan la expresión de la superficie celular (Kappes, 1988; Jordan, 1985).

Los antígenos HLA son clasificados en tres grupos:

Antígenos de Clase I: HLA A, B, C.....G

Antígenos de Clase II: HLA D, DR, DQ y DP.

Antígenos de Clase III: Factores de complemento. C2a,

C2b, C4A y BF.

ANTIGENOS DE CLASE I.

Consisten en dos cadenas de polipéptidos, una cadena pesada (alfa) de 45 KD y una cadena ligera de 12 KD (beta 2 microglobulina). La cadena alfa es codificada por los genes de HLA, la cadena beta es codificada por el cromosoma No.15. La cadena pesada se divide en en cinco regiones distintas: tres dominios extracelular, una región transmembranal hidrofóbica y un dominio citoplásmico hidrofílico. Los tres dominios extracelulares alfa 1, alfa 2 y alfa 3 están formados por cerca de 90 Aa. El dominio alfa 3 se encuentra en el pliegue unido a la región constante, esta región

trasmembranal está formada por aproximadamente 25 residuos hidrofóbicos constantes, el cual tiene una conformación alfa-helicoidal y atraviesa la membrana.

La función de la beta 2 microglobulina es la de estabilizar la molécula e integridad de la estructura. Evolutivamente el locus B es el más desarrollado en tanto que el C parece estar en proceso de formación (figura 6) (Male, 1987; Thorsby, 1987; Schiebl, 1986).

ANTIGENOS DE CLASE II.

Están constituidos por glucoproteínas que contienen dímeros de cadenas alfa-beta unidas de manera no covalente. La cadena alfa tiene un peso molecular de 30 a 34 KD y la cadena beta de 26 a 29 KD. La molécula consta de 4 dominios: dos dominios extracelulares de aproximadamente 90 aa. cada una, alfa 1 y alfa 2 o beta 1 y beta 2 y una región trasmembranal de cerca de 30 residuos, seguidos por un corto dominio citoplásmico.

Contienen 5 subregiones llamadas DP, DN/DO, DQ y DR. (Esquema 6), las subregiones DP y DQ contienen 2 genes para la cadena alfa y 2 para cadenas beta, pero una molécula de clase II sólo usará una alfa y una beta por cada subregión. Los genes alfa 1/ beta 1 son expresados para formar el heterodímero de la molécula clase II, los alfa 2/ beta 2 al igual que la subregión DN/DO son pseudogenes (no funcionales), por lo que no se conoce algún producto derivado. La subregión DR contiene sólo un gen para cadena alfa y cuatro genes para la cadenas beta, designados éstos como: DRBI, DRBII, DRBIII, DRBIV. Los dímeros formados por los genes

DRBI/DRA contienen especificidades DRI hasta DR18; el dímero DRIII/DRA contienen las especificidades DRW53. La asociación de los genes DRBII y DRA no se traduce por que es un pseudogen (Male, 1987; Thorsby, 1987)





























ANTIGENOS DE CLASE III.




Estos antígenos son solubles por lo que no sirven como antígenos de trasplante. Incluyen los factores del complemento C2a, C2b, C4A, C4b y Bf, son importantes para la activación del complemento.

DISTRIBUCION CELULAR DEL CMH

Las molécula HLA clase I están presentes en todas las células nucleadas. Las moléculas HLA clase II tienen distribución celular limitada; se encuentran principalmente sobre las células inmunocompetentes, linfocitos B, células presentadoras de antígeno macrófagos y células dendríticas) y, en células T activadas. Aparte de estas, se pueden inducir para que lo expresen, a las células que normalmente no expresan moléculas clase II (tales como linfocitos T en reposo, células endoteliales y células tiroideas) (ver tabla No. 3) (Groenewegen 1985; Gabbianelli, 1990; Male, 1987).

TABLA No 3. DISTRIBUCION DE MHC CLASE I Y II EN TEJIDO HUMANO

TEJIDO	CLASE I	CLASE II
CELULAS DEL SISTEMA INMUNE		
Cél. T (Cél. activadas)		
Células B		
Macrofagos		
Células Dendríticas		
SISTEMA NERVIOSO		
Periférico		
Central		
SISTEMA RESPIRATORIO		
Epiglotis		
Traquea		
SISTEMA UROGENITAL		
Glomérulos renales		
Tubulos renales		
HIGADO		
Cél. envuelven los sinusoides		
Hepatocitos		
TRACTO GASTROINTESTINAL (Epitelio)		
Lengua		
Esófago		

 Fuertemente positivo.
  Variable, dependiendo del edo. de activación.
  Positivo bajo algunas condiciones patológicas.

 Negativo.
 Tomado de: Malo, 1987 (34)

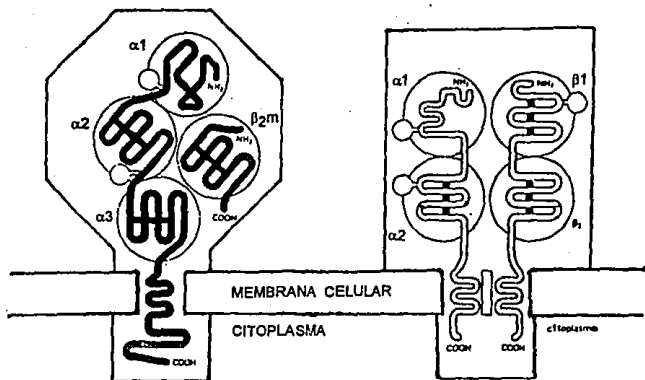


Figura No. 6.
Representación esquemática de la estructura HLA antígenos de clase I (a) y clase II (b).

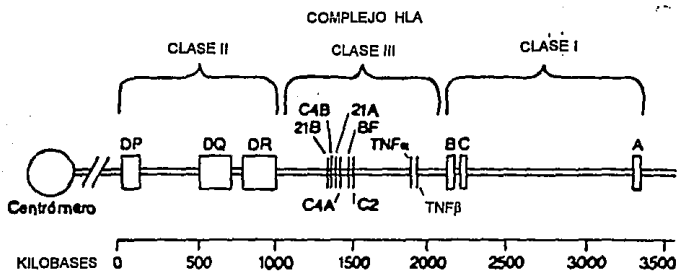


Figura No. 7
Subregiones de HLA D.
Tomado de: Male, 1987 (34).

E. FUNCION E IMPORTANCIA DEL SISTEMA HLA

Los antígenos de histocompatibilidad están involucrados directamente en las siguientes funciones:

1. Respuesta inmune
2. Trasplante
3. Transfusiones
4. Enfermedades
5. Pruebas de paternidad
6. Asociado a estudios antropológicos

1. HLA ASOCIADO A RESPUESTA INMUNE

Su función primordial es de relevancia para procesos fundamentales involucrados en defensa del huésped contra microorganismos y células neoplásicas ya que representan una serie compleja de determinantes de superficie celular, intervienen en la inmunorregulación e interacción celular en la respuesta inmune debido a que controlan la interacción entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos responsables para la generación de la respuesta inmune. (Daar, 1984; Dausset, 1970).

Los antígenos de clase I actúan principalmente como presentador primario para linfocitos T citotóxico, su función principal es la de reconocimiento individual. Cada antígeno se reconoce por las células T sólo en unión con moléculas del CMH. Así las células T CD4, reconocen antígenos en unión a moléculas clase II del CMH, mientras que las células T CD8 reconocen antígenos en unión a moléculas de clase I del CMH.

Los antígenos de la clase II actúan en la producción de anticuerpos gracias a su colaboración en el desarrollo inmunológico reconociendo y produciendo dichos anticuerpos. Su función es la de recibir y servir de mediador transportando la estimulación primaria determinada por los linfocitos T auxiliares. Los antígenos de la clase I y II pueden funcionar como indicador del efecto modulador de antígenos HLA, en la proliferación de las células T por varios mitógenos.

Los antígenos de la clase III intervienen en la activación del complemento, opsonización y generación de factor quimiotáctico.

2. HLA Y TRASPLANTE.

El sistema de histocompatibilidad determina por medio de la respuesta inmune el rechazo o tolerancia del órgano trasplantado, por lo que deberá considerarse cuidadosamente la inmunocompetencia del tejido del donador y del receptor, debido a que no sólo puede el huésped rechazar al injerto, si no también puede el injerto rechazar a su huésped (por ejemplo, en médula ósea) (Pääbo, 1985; Groenewegen, 1985; Bach, 1987; Amar, 1987).

Se ha demostrado una asociación entre el periodo de supervivencia del trasplante y el grado de compatibilidad de HLA.

En general se puede decir que el trasplante con donadores relacionados (padres o hermanos) que son idénticos con el receptor en uno o en ambos haplotipos son más satisfactorios. Existe una multitud de antígenos en la población humana siendo muy difícil hallar un donador y un receptor que tengan los mismos antígenos, asegurando así el periodo de

supervivencia del trasplante. Este hallazgo deriva del hecho de que la identidad para determinantes HLA conocidos en una familia siempre asegura la compatibilidad para todos los productos genéticos del complejo HLA total.

3. HLA Y TRASFUSIONES

Las plaquetas y granulocitos son ricos en antígenos de tipo HLA y la tipificación adecuada del donante puede asegurar una supervivencia mayor a la que comúnmente se obtiene. En el caso del receptor con anticuerpos antitrombocitos o granulocitos acepta la transfusión de sangre HLA compatible, lo que constituye una ventaja para el tiempo de supervivencia del receptor. En el caso de transfusiones a largo plazo debe desde un principio identificarse la compatibilidad de HLA Clase I entre donadores y receptores (Brochier, 1979).

Las transfusiones sanguíneas entre pacientes que esperan trasplante es asociada con los efectos beneficiosos de la prolongación de supervivencia del injerto comparado con los no transfundidos (Colombe, 1988; Conell, 1992; Johnnsen) Tabla No. 4.

4. HLA Y ENFERMEDAD.

Un campo que ha merecido gran atención, es la asociación de algunos antígenos HLA con diversas enfermedades (Arellano, 1987; Segall, 1990).

Las características de estas enfermedades son:

- a. De causas y mecanismos fisiopatológicos desconocidos, con un

patrón hereditario en cuanto a su distribución, pero de penetración débil.

b. Están asociados con enfermedades inmunológicas.

c. Tienen poco o ningún efecto sobre la reproducción (Stites, 1993).

La susceptibilidad para enfermedades son asociadas con antígenos de clase II como por ejemplo HLA-DR3 asociado con absceso amibiano hepático o enfermedades del hígado en general DR2 con esclerosis múltiple y es útil en el diagnóstico de narcolepcias, DR3 y/o DR4 en diabetes mellitus tipo I insulina dependientes, DR4 en artritis reumatoide (29, 42), HLA D/DR3 con dermatitis herpetiforme (Hashimoto, 1990).

Aunque también, algunas enfermedades están asociadas con antígenos HLA tipo I, el caso más notorio es el de espondiliasis anquilosante, en el cual el Ag HLA-B27 está presente en más del 90% de las personas que sufren la enfermedad. Por otra parte, este Ag sólo se presenta en el 5% de las personas normales. Este antígeno también se encuentra presente en pacientes que experimentaron secuelas de artritis después de infección enterobacteriana con *Shigella*, *Salmonella* y *Campylobacter*. HLA-B8 y DR3 con mínimo nueve enfermedades incluyendo Síndrome Sjögren, miastenia gravis, y escleroma. HLA-B27 asociado con Cw6 en Psoriasis vulgaris. (Hashimoto, 1990; Williams, 1990). Ver tablas 5 y 6.

Tabla No. 4.
Influencia de las transfusiones sanguíneas en el período
de supervivencia en trasplante de riñón.

No. de Trasmisiones	F1	NF2	Un año de supervivencia de el trasplante (%)
0	3	15	17
1-4	22	11	67
5-10	23	4	85
11-20	26	9	74
21-40	24	6	80
40	20	9	69

F1: Número de pacientes con trasplante funcional después de un año.

NF2: Número de pacientes con trasplante no funcional después de un año.

Tabla No. 5. HLA y Enfermedades infecciosas.

ENFERMEDAD	ASOCIACION
MALARIA	A2, A30, B17
SCHISTOSOMIASIS	A1, B5
FIEBRE AMARILLA (TIFO)	HLA-B, C3
HERPES SIMPLE RECURRENTE: TIPO 1	DR3
TIPO 2	DR7

Tomado de Johanssen (30).

5. HLA Y PATERNIDAD.

El polimorfismo del sistema HLA y la posibilidad de reproducir los análisis hacen que sea ideal para estudiar la herencia. Una de las áreas es el estudio de la paternidad. Si el producto no tiene ninguno de los haplotipos HLA del hombre, que aparece en la cuarta parte aproximadamente de los casos, entonces puede excluir la paternidad. El empleo de este sistema permite descartar la paternidad en el 90% de los casos, y su empleo junto con la determinación de los grupos y subgrupos sanguíneos permite descartar hasta el 98% de los casos.

6. HLA ASOCIADO A ESTUDIOS ANTROPOLOGICOS.

La presencia de los distintos genes del complejo HLA varía con los distintos grupos étnicos. Así por ejemplo, el HLA-Bw54 se encuentra únicamente en los japoneses, el HLA-Bw46 en los chinos y el HLA-A1 en la raza caucásica.

Los genes de frecuencia pueden aparecer como consecuencia de la mezcla de varios genes entre asociación geográfica, sin embargo distintos grupos étnicos pueden ser sugeridos por migración de grupos fuera de su área (Arellano, 1981; Lee, 1988; Fefelova, 1990).

Tabla No. 6.
EJEMPLOS DE VARIAS ASOCIACIONES
ENTRE HLA Y ENFERMEDADES.

GRUPO	ENFERMEDAD	MARCADORES	R.R. (%)
ENFERMEDAD CRONICA	Deficiencia de 21 hidroxilasa	Bw47	15
	Hemocromatosis Idiopática.	A 3	8
ENFERMEDAD AUTOINMUNE	Espondilitis anquilosante	B 27	90-350
	Artritis Reumatoide	DR4/Dw4	9-6
	Insulina dependientes	B8/DR3/DQw2	3-6
	Diabetes mellitus	B15/DR4/DQw3	2-3
		B7/DR2	0.25-0.5
	Sindrome de Goodpasture.	DR2	13
	Esclerosante múltiple en judíos.	DR4	13
	Dermatitis Herpetiforme	DR3	16
	Herpes recurrente	A1	3
	Enfermedad de Hashimoto	DR5	3.2

R.R. = Riesgo relativo.

Tomado de Johansen (30).

F. METODOS DE OBTENCION DE SUEROS ANTI HLA.

Los antígenos HLA se determinan por reacciones serológicas, y por tanto, su tipificación se realiza empleando antisueros que se han preparado a partir de las siguientes fuentes:

1. Placenta de mujeres multíparas.
2. Sueros de pacientes que se trasplantaron y presentaron rechazo hiperagudo.
3. Individuos multitransfundidos.
4. Anticuerpos monoclonales.

1. Placenta de mujeres multíparas. Los sueros de mujeres multíparas tienden a tener títulos elevados de anticuerpos dirigidos contra un número limitado de determinantes HLA, puesto que en la mayor parte de los casos la mujer ha sido inmunizada repetidamente con los antígenos HLA de un sólo individuo los cuales están presentes en los sueros de las placentas. (Payne, 1959; Van Rood, 1958; Dausset, 1970).

2. SUEROS DE PACIENTES QUE SE TRASPLANTARON Y PRESENTARON RECHAZO HIPERAGUDO. Los anticuerpos contra las especificidades HLA suelen descubrirse en individuos que recibieron trasplante de un órgano, injerto de piel, ésto fue observado por Batchelor (1965)

3. **INDIVIDUOS MULTITRANSFUNDIDOS.** La obtención de anticuerpos puede ser por inmunización deliberada. El par ideal donador-receptor para inmunización puede ser quienes difieren de un haplotipo HLA, frecuentemente sujetos no emparentados. Se tipifican el par donador-receptor para que el donador tenga los anticuerpos que le faltan al receptor y así obtener anticuerpos completamente nuevos. Una suspensión de linfocitos purificados son inyectados intradérmicamente en múltiples sitios del antebrazo. Desarrolla reacciones inflamatorias en el sitio de la inyección, alcanza su máximo dentro de 48 hrs. y después de esto disminuye lentamente, quedando manchas café que persisten por dos meses (Payne, 1957).
4. **ANTICUERPOS MONOCLONALES.** La producción de anticuerpos monoclonales mediante la hibridación de células somáticas con células formadoras de anticuerpos y la replicación continua de células permite preparar grandes cantidades de anticuerpos que son completamente homogéneos química, física e inmunológicamente. Estas moléculas se libran entonces de reacciones cruzadas y de inespecificidad (Parham, 1982).
- Los híbridos o híbridos de células somáticas pueden formarse por fusión de una suspensión que contienen células separadas de bazo o linfocitos de ratones o de ratas inmunizadas con células tumorales, como los mielomas o linfomas. La línea celular en división activa selecciona de acuerdo a dos propiedades: (1) Falta

de producción o de secreción de inmunoglobulina y (2) carencia de actividad de la hipoxantina fosforribosil transferasa (HFRT). Las células se fusionan por exposición rápida al polietilenglicol. Por lo tanto, en el cultivo permanecen tres poblaciones celulares: células de bazo, células del mieloma e híbridos. Los híbridos tienen el genoma combinado de las dos líneas paternas y finalmente dejan salir cromosomas y adquieren un estado diploide. La selección para los híbridos se realiza después de la muerte de las células sensibles a HAT y de las células normales que mueren después de un tiempo en el medio de cultivo. La línea de células del mieloma se destruyen debido a que en el medio HAT que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina, las células HFRT no pueden usar hipoxantina exógena para producir purinas. La aminopterina bloquea la síntesis endógena de purinas y pirimidinas y las células mueren. Los híbridos comienzan a duplicarse cada 24 a 48 hrs. y las colonias se desarrollan con rapidez. Las células de hibridoma son entonces clonadas por métodos de dilución limitante y en el sobrenadante se analiza la producción de anticuerpo. Para asegurar la monoclonalidad se hace una nueva clonación y de este modo crecen las células productoras de anticuerpo (Figura 7)

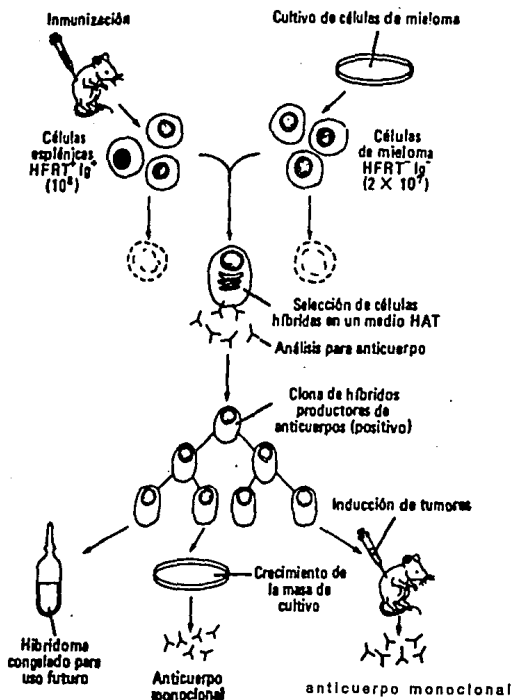


Figura No. 8.

Formación de híbrido entre células de ratón y células de mieloma. Las células de mieloma de ratón que no producen sus propias inmunoglobulinas y carecen de hipoxantina fosforribosil transferasa (HFRT) se fusionan con células de bazo de ratón inmunizado con polietilenglicol. Las células híbridas se seleccionan en un medio con hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT). El medio destruye a las células del mieloma que no se fusionaron y los esplénocitos mueren en forma natural. Los híbridos son clonados y en anticuerpo se produce en un cultivo de tejido o por formación de ascitis;

Sites, 1993 (49).

G. METODOS DE TIPIFICACION DEL SISTEMA HLA

El estudio de histocompatibilidad es la determinación de los marcadores genéticos (HLA) que se encuentran en la membrana celular por medio de las técnicas de Microlinfocitotoxicidad, ELISA, Inmunofluorescencia, Tipificación de linfocitos principales, Fenotipificación Dw, Tipificación de proteínas por IEF, Tipificación por RFLP y por PCR.

Para tipificar con la mayor precisión posible, los antígenos tisulares del donador y el receptor, la tipificación se inicia con la determinación de los antígenos ABO y Rh. Después, el donador al igual que el receptor son tipificados para el sistema HLA. Cuando se ha determinado el par donador-receptor más idóneo, se ejecuta una prueba cruzada directa, usando el suero del receptor y los linfocitos del donador, para detectar anticuerpos citotóxicos circulantes producidos por el receptor.

Como prueba complementaria se puede realizar cultivo mixto de linfocitos, en la cual los linfocitos del receptor se mezclan con los linfocitos del donador; estos últimos han sido bloqueados con mitomicina C de manera que no pueden dividirse. En estas condiciones el cultivo es unidireccional, las células del donador sirven únicamente como estimulante ya que son incapaces de proliferar. Durante la incubación de cinco a siete días las células que responden son las del receptor, sufren transformación blástica y manifiestan división celular que pueden medirse por la incorporación de timidina tritriada en el nuevo DNA. En estas circunstancias las células estimuladoras expresan antígenos de clase II en su superficie, que son reconocidas por las células que responden (Beatty, 1991).

La prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), implica la utilización de un conjugado (de inmunoglobulina ligada a una enzima) y un sustrato el cual es transformado en un cromógeno (Bishara, 1988; D.Catty, 1989).

Otro método empleado es el de inmunofluorescencia en donde utiliza fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína e isotiocianato de tetrametil), el cual se une a restos de aminoácidos (tiene afinidad por proteínas), en presencia de gama globulina; este método es empleado principalmente para determinar DR en muestras pequeñas. Esta misma técnica se puede utilizar empleando los dos colores simultáneos para discriminar entre las dos clases de anticuerpos I y II. La superficie de las células B son premarcadas con isotiocianato de fluoresceína conjugado con anti gama globulina de ratón. Las células muertas son teñidas con bromuro de etilo y la preparación es examinada en un microscopio fluorescente invertido.

FENOTIFICACION Dw CON CELULAS HOMOCIGOTOS TIPIFICADAS.

En esta técnica se usan células de individuos conocidos por ser homocigotos para HLA-D en un ensayo modificado de la técnica de cultivo mixto de linfocitos (CML). Este método permite la identificación de subtipos DR que no pueden ser identificados únicamente por antisueros. Un ejemplo es DR4 que tiene un mínimo de 5 distintos antígenos HLA-Dw definidos en células T: Dw4, Dw10, Dw13, Dw14 y Dw15. Cada una de las variantes DR4 fueron analizadas a nivel molecular y ahora son conocidas estas diferencias en una mínima variante en la secuencia en el gen DR4 DRB1.

TIPIFICACION DE LINFOCITOS PRINCIPALES (PLT). Es usado para caracterizar especificidades de los antígenos HLA clase II. En esta técnica, las células son estimuladas por CML (respondiendo contra determinantes DR, DQ y DP). Estas células principales pueden responder únicamente contra células que expresen los antígenos de clase II específicos contra los cuales fueron originados. Por clonación de estas células proliferadas y su recubrimiento específico, un panel de locus específicos, es un medio para identificar algunos de los alelos DR, DQ y DP.

TIPIFICACION DE PROTEINAS POR IEF (ELECTROFORESIS EN GEL POR PUNTO ISOELECTRICO). Esta técnica separa proteínas moleculares en base al punto isoelectrico que es determinado por su composición de aminoácidos. Un IEF-unidimensional es usado para subtipos de proteínas de clase I y bi-dimensional para proteínas de clase II.

TIPIFICACION MOLECULAR POR ANALISIS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN POLIMORFOS (RFLP). Se utilizan enzimas de restricción que reconocen secuencias de nucleótidos específicos para digerir DNA genómico. Los fragmentos digeridos de DNA son separados por electroforesis en gel de agarosa.

ANALISIS MOLECULAR POR HIBRIDACION SSOP PARA AMPLIFICAR DNA. La tipificación molecular por hibridación de SSOP en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificada es un método directo para determinar la secuencia del polimorfismo. En esta técnica el DNA es

amplificado por PCR usando principalmente oligonucleótidos diseñados por ser complementarios de la secuencia de 5' y 3'. La PCR es una reacción en tres pasos. Primero, la cadena doble de DNA es desnaturalizada por calentamiento, posteriormente la temperatura es disminuida para permitir la alineación del primer oligonucleótido de una sola hebra de DNA y finalmente la temperatura es aumentada para promover la extensión de la nueva cadena, se adiciona trifosfato desoxinucleótido por vía terminal estable Taq-polimerasa. Después de 35 a 40 ciclos de desnaturalización-alineación-extensión, la cantidad original de DNA (en ug) es aumentada a 1 millón de plieges. La ampliación del DNA es posteriormente colocada sobre papel secante de membrana de nylon en forma de punto o mancha. Los oligonucleótidos probados los cuales son radioactivos o no radioactivos son entonces hibridizados en la membrana. La hibridación es detectada por autoradiografía en el primer caso y por visualización colorimétrica en el segundo caso (Beatty, 1991).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El suero anti-HLA tiene una amplia utilidad en:

- Diagnóstico de histocompatibilidad en el trasplante de órganos
- Como marcador genético de algunas enfermedades
- En pruebas asociadas a estudios antropológicos de paternidad y de transfusiones.

El uso en México del suero anti-HLA es limitado, debido a que su método de obtención es costoso y a que se tiene que importar. Para disminuir el costo de la prueba se obtuvo un banco de sueros anti-HLA, utilizando como materia prima placentas humanas, que es un material de desecho.

En México sólo dos instituciones lo obtienen, uno de estos es el Departamento de Inmunogenética del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia (INDRE), SSA, cargo de la Dra. Clara Gorodezki y el otro en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), SSA, cargo del Dr. Luis Terán, ambas instituciones a nivel de Investigación.

Debido a los elevados costos de importación y a la gran demanda, ocasionada por el aumento de trasplante de órganos, es necesario disminuir el costo de la prueba, para así poder implementarla en otras determinaciones.

IV. OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Obtener un banco de sueros anti-HLA a partir de placentas de mujeres multigestas para utilizarlos en la prueba de histocompatibilidad y poder disminuir el costo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Tipificación de los sueros anti-HLA por medio de la prueba de microlinfocitotoxicidad.
2. Monoespecificar los sueros por medio de la técnica de absorción con plaquetas.
3. Formación de una colección de linfocitos T y B, conservándolos en nitrógeno líquido, para obtener la especificidad de los sueros.
4. Determinar la frecuencia de gen y antígeno de la población que acude al Hospital Juárez de México (HJM).

V. HIPOTESIS

V. HIPOTESIS

Debido a que el Distrito Federal es una ciudad cosmopolita y la oportunidad de casamiento entre individuos no emparentados es alta, se obtendrá una diversidad de sueros anti HLA a partir de mujeres multíparas.

VI. CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION

VI. CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION

CRITERIOS DE INCLUSION.

Todos los sueros de mujeres sanas, multigestas, con un rango de edad de 20 a 30 años y con una sola pareja sexual.

Personas donadoras de sangre sanas, no trasfundidas y que no se están administrando medicamentos.

CRITERIOS DE EXCLUSION.

Placentas de mujeres enfermas, placentas sépticas y con meconio,

Placentas de mujeres con más de una pareja sexual.

VII. MATERIAL Y METODOS

VII. MATERIAL Y METODO

A. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

Tubos de ensaye con tapón de rosca (13 x 100, 16 x 150)
 Pipetas graduadas y Pasteur
 Mechero Fisher
 Placas de Terasaki
 Tubos Fisher de 1 ml
 Microjeringas (50/1,250/5,100/2ul múltiple), Hamilton
 Termómetro
 Cubreobjetos de 50 x 75 mm
 Camara de Neubauer

EQUIPO

Balanza granataria	Mettler PJ300
Centrifuga de Pie	Mac. Sorvall RT6000B, DUPONT
Congelador Horizontal	Revco Mod. ULT 7120-5-D-V-A
Congelador Vertical	Revco Mod. ULT 2186A-O-E
Incubadora	NAPCO Mod. 302
Microscopio Invertido de	
Contraste de Fases	Zeiss, Axiovert 10.
Microscopio	OLYMPUS CH-2
Microcentrífuga	IEC Micro-MB
Potenciómetro	CORNING pH meter 220
Rotator Clínico	Fisher Scientific
Termo Baño	Felisa
Tanque de Nitrógeno líquido	

REACTIVOS

Sueros anti HLA	Biotest Diagnostics
Complemento	Biotest Diagnostics
Eosina al 5%	Sigma
Formaldehído a pH 7.2	Merck
Alcohol etílico	
Suero Fetal de Ternera	HyClone, Laboratories Inc.
Ficoll-Hypaque	Lymphoprep, Nycomed
Medio de cultivo	
celular RPMI 1610	Sigma
Dimetil sulfoxido al 10%	Sigma
Azida de sodio al 0.1%	Sigma

B. METODO

Los estudios se realizaron en la Unidad de Investigación del Hospital Juárez de México, SSA; utilizando la técnica de microlinfocitotoxicidad (Terasaki 1964). El principio de esta determinación consiste en la incubación de linfocitos humanos con anti sueros HLA específicos en presencia de complemento. La activación del complemento inducida por la reacción antígeno-anticuerpo produjo la ruptura de la membrana celular y por consiguiente su destrucción.

PREPARACION DE PLACAS DE TERASAKI PARA LA DETERMINACION DE HLA-ABC Y DR. Se colocó sobre las placas de Terasaki de 60 pozos una o dos gotas de aceite mineral, para lo cual se auxilió de una pipeta Pasteur. Se introdujo 1 ul de suero anti HLA estándar de diferentes especificidades, 15 sueros anti-A, 22 sueros anti B (Tabla No. 7) y un control positivo y un negativo auxiliándose de una microjeringa múltiple. La preparación de las placas de Terasaki para los determinantes de la clase II se realizó de igual forma, cambiando únicamente los sueros anti HLA, utilizándose DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, DR7, DRw11, DRW52, DQw1 y DQw3. Estas placas se conservaron a -65°C y se descongelaron 15 min. antes de su utilización (ver diagrama de flujo de la metodología).

PREPARACION DE LA SUSPENSION DE LINFOCITOS. Se extrajeron 20 ml de muestra de sangre periférica a 110 pacientes que acudieron a la unidad de Investigación, se desfibrinó por rotación perpendicular durante 5 min. con perlas de vidrio. La sangre se diluyó con un volumen igual de medio RPMI 1640. Se colocaron en tubos de ensayo 3 ml de solución de Ficoll-Hypaque, se estratificó cuidadosamente 7 ml de sangre diluida sobre la solución de Ficoll-Hypaque. Se centrifugó a 2000 rpm, durante 20 min. Después de la centrifugación se aspiraron los linfocitos que formaban un anillo blanco sobre la interfase, con una pipeta Pasteur y se colocaron en tubos fisher lavándose dos veces con solución RPMI a 1200 rpm durante 10 min. (ver diagrama de flujo de la metodología).

SEPARACION DE LINFOCITOS T Y B POR COLUMNA DE NYLON. Se tomó la mezcla de linfocitos T y B obtenida anteriormente y se ajustó a 1.5×10^6 células por ml. Por otro lado se cerraron popotes a la flama en angulo de 45° empacando uniformemente con lana de nylon previamente humedecida con medio RPMI haciendo una horadación en el popote para permiti la salida del líquido, enseguida se lavó con medio RPMI precalentado a 37°C con 20% de SFT y se incubó a 37°C durante 30 min. en forma horizontal. Se sacó la columna y se eliminó todo el medio. Enseguida se pasó por la columna la suspensión de linfocitos incubando nuevamente a 37°C durante 30 min. Después de este tiempo se agregaron 10 ml de medio RPMI precalentado a 37°C para obtener los linfocitos T.

Para obtener los linfocitos B absorbidos en la lana de nylon se lavó con 10 ml de medio RPMI 1640 con 20% de SFT apretando el popote durante la operacion para colectar la mayor cantidad de células. Finalmente para separar las células, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. (ver diagrama de flujo de la metodología).

CONSERVACION DE LINFOCITOS Los linfocitos aislados anteriormente se almacenaron en nitrógeno líquido para lo cual se colocó hielo picado en un vaso de precipitados y se enfriaron dos tubos de ensayo por muestra colocando 1 ml de células previamente contadas (de 2 a 8×10^6 celulas por ml).

Por otro lado se preparó la mezcla de congelación (ver anexo) y se enfrió . Se adicionó cuidadosamente 1 ml de mezcla de congelación por cada ml de suspensión celular formándose una interfase. Los niveles

formados se invirtieron cuidadosamente para que ambas capas se mezclen y se introdujeron en alcohol frío (4°C) dejando este sistema durante 2 hrs. Después de este tiempo se pasaron al tanque de nitrógeno líquido para almacenarlos hasta su uso.

Para descongelar los linfocitos contenidos en la suspensión se sumergen en baño maría a 37°C con agitación. Una vez descongelados se lavaron dos veces con medio RPMI al 20% de SFT. Para ver la viabilidad de las células se utilizó eosina. Se preparó una suspensión 1:5 con medio de cultivo RPMI. Se transfirió 0.5 ml. de eosina a un tubo de ensaye, se adicionó 0.3 ml. de medio de cultivo y 0.2 de suspensión celular, se agito y espero de 5 a 10 min. para posteriormente realizar el conteo del número de células viables, al microscopio y con la cámara de Neubauer (ver diagrama de flujo de la metodología).

TECNICA DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD. Se colocó 1 µl de suspensión de linfocitos de concentración 1.5×10^6 /ml a cada una de las excavaciones de la placa de prueba que previamente fue llenada con los antisueros correspondientes, se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Después se adicionó 2 µl de complemento a cada uno de los pocillos incubando nuevamente a temperatura ambiente durante 60 min. Finalmente se agregó 5 µl de eosina al 5% y 2 min. después 5 µl de formaldehído. Las placas se cubrieron con cubreobjetos de 50 X 75 mm cuidadosamente para evitar la formación de burbujas, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 min. permitiendo el asentamiento de los linfocitos y se leyó en el microscopio invertido de contraste de fases acuerdo al patrón de reacción (Tabla No. 8). Las células lisadas aparecen

oscuras e hinchadas (reacción positiva); las células no lisadas se observaron luminosas y pequeñas (reacción negativa).

La realización de la técnica HLA-DR fue la misma que la utilizada para las placas HLA-ABC, con excepción de:

- * el tipo de placa utilizada debe de ser para tipo HLA-DR
- * el tiempo de incubación de los linfocitos B con los sueros es de 1 hr.
- * el tiempo de incubación después de la adición del complemento es de 2 hrs.(ver diagrama de flujo de la metodología a seguir).

OBTENCION DE SUEROS ANTI HLA POR EXTRACCION APARTIR DE PLACENTAS. Obtener sueros de placenta de mujeres sanas, multiparas en edad reproductiva que acudan al servicio de Ginecobstetricia.

Se desprendió la membrana amniótica que cubre la placenta se pinzó con el cordón umbilical y con el bisturí se cortaron los cotiledones en forma de cuadrícula. Se despinzó y se cortaron las venas y arterias de la cara fetal de la placenta. Se dejó escurrir durante 24 hrs. a temperatura ambiente dentro de un tamiz de plástico que se colocó sobre un vaso de precipitado cubriéndose todo con una bolsa de nylon. El suero recolectado en el vaso se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min. Se separó el sobrenadante y se centrifugó una vez más. Se agregó azida de sodio de tal forma que quedó a una concentración final de 0.1% (por cada 100 ml se agrego un mililitro de azida de sodio). El suero se almacenó a -60°C.(ver diagrama de flujo de la metodología a seguir).

ABSORCION DE SUEROS ANTI HLA. La absorción de los sueros anti HLA obtenidos de las placentas se llevó a cabo con plaquetas, las cuales fueron obtenidas del Banco de Sangre del Hospital. Se mezcló cuidadosamente cinco partes de suero puesto previamente a temperatura ambiente con una parte de plaquetas incubándose durante 20 min. a temperatura ambiente con agitación lenta. Después de este tiempo se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. Se repitió este procedimiento dos veces más (ver diagrama de flujo de la metodología).

PRUEBA DE MICROTOXICIDAD PARA LOS SUEROS OBTENIDOS DE PLACENTA. Las placas se prepararon de manera similar a la ya descrita anteriormente, variando únicamente la utilización de los sueros estandar anti-HLA, colando en su lugar los sueros obtenidos de las placentas y conservados con azida de sodio. Esta determinación se realizó para comprobar la actividad anti-HLA de los sueros obtenidos.

TABLA No. 7.
Esquema que muestra la forma en que se colocaron
los 37 sueros anti HLA en las placas de Terasaki.

	A	B	C	D	E	F
1	CP	CN	A1	A1	A2	A2
2	A23	A8	A9	A2,A28	A3	A3
3	A24	A25	A26,A25,Aw34	A26	A10	A29
4	A32	A28,A2	A11	B35,Bw53,Cw4	B35,Bw53	B5
5	B5,B35,Bw53	B7	B7,Bw42	B7,B27	B27	B12
6	B12,B49,Bw41	B13	B14	B15	B16	B17
7	B18	B21	B8	Bw4	B40	Bw42
8	Bw6	B37	B49,Bw52	Bw73	B35,Bw53	B21
9	B40	B5	B7,Bw42	B27	B18	A28,A2
10	A10	B35,Bw53	B12	A29	A32	A32,A25, Aw34,Aw66

CP= Control Positivo, CN= Control Negativo

Tabla No. 8.

**CRITERIO DE EVALUACION DE LA PRUEBA
DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD.**

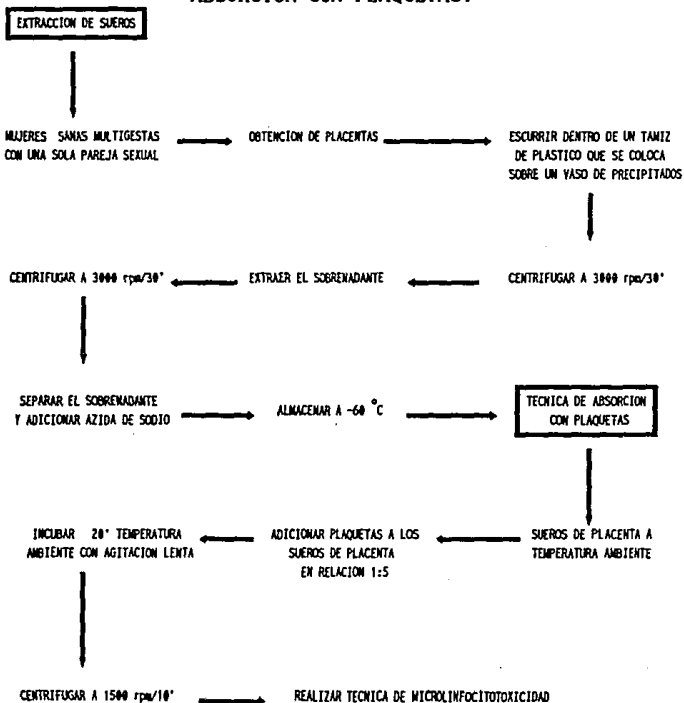
La reacción es designada por estimación del porcentaje de células muertas (teñidas) y células vivas (no teñidas).

INTERPRETACION:

ESCALA	% DE CITOTOXICIDAD	INTERPRETACION
1	0 - 10	Negativa
2	11 - 20	Negativa dudosa
4	21 - 40	Positiva, poco convincente
6	41 - 80	Positiva
8	81 - 100	Muy positiva

Tomado de Ray T.

TECNICAS DE EXTRACCION DE SUEROS Y ABSORCION CON PLAQUETAS.



PREPARACION DE PLACAS DE TERASAKI Y TECNICA DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD

PREPARACION DE PLACAS DE TERASAKI

ACEITE MINERAL + 1 μ L DE SUEROS
ESTANDAR :
A(15), B(22), DR(8), DQ(2)
O SUEROS DE PLACENTA ANTES Y
DESPUES DE ABSORBERSE

INCLUBAR A -60 °C

DESCONGELAR 15' ANTES
DE USAR

TECNICA DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD

ADICIONAR 2 μ L DE COMPLEMENTO

INCLUBAR A TEMPERATURA
AMBIENTE 30' (o 60')

ADICIONAR 1 μ L DE LINFOCITOS T (o B)

INCLUBAR A TEMPERATURA
AMBIENTE 60' (o 120')

AGREGAR 5 μ L DE EOSINA

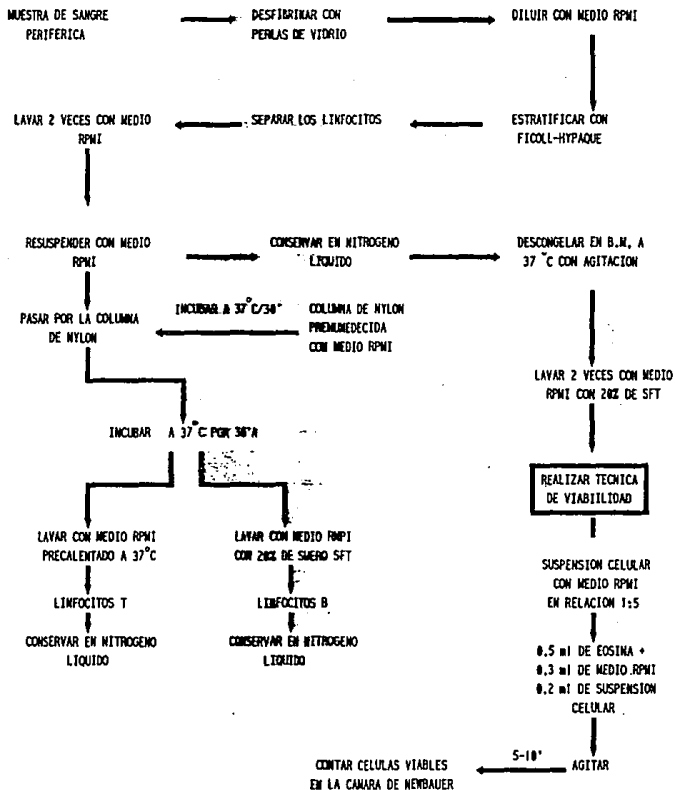
(2')

AGREGAR 5 μ L DE
FORMALDEHIDO

15' A 24h

LEER EN MICROSCOPIO
INVERTIDO, DE ACUERDO
AL PATRON DE REACCION
(VER TABLA B)

OBTENCION DE CELULAS Y TECNICA DE VIABILIDAD



VIII. RESULTADOS

VIII. RESULTADOS.

Para el presente trabajo se obtuvieron del Servicio de Ginec Obstetricia del HJM 75 placentas de mujeres sanas, multigestas, con una sola pareja sexual y con un rango de edad de 20 a 30 años. Las placentas fueron obtenidas por parto normal (40.7%) y cesárea (59.3%). EL 31.3% de las placentas registraron pesos menores a 500 grs. y el 68.5 % mayores a 500 grs.

Se obtuvo un promedio de 200 ml de suero por muestra de placenta, siendo de 80 ml. la de menor cantidad obtenida y de 300 ml. la de mayor. Esta variabilidad en la cantidad de suero obtenido depende del tiempo de almacenamiento en refrigeración de la muestra, ya que a mayor tiempo de refrigeración la cantidad de suero obtenido fue menor. Estos sueros se conservaron a -60°C agregando azida de sodio como conservador.

En la tipificación de los sueros con 110 muestras de células de fenotipo conocido se observó reacción en todos los sueros en presencia de las células, indicando esto, que los sueros reconocían los antígenos específicos presentes en las células (Tablas 9 y 10).

En la monoespecificación se obtuvo que un 60 % de los sueros tuvieron reacción positiva con las células especificadas, el 31 % disminuyó ligeramente la reacción y en un 9 % no hubo reacción (Tabla 12).

Se logró obtener linfocitos T y B de muestras de sangre de donadores, pero su conservación en nitrógeno líquido no funcionó, porque al descongelar las células para su uso, estas se observaron lisadas al realizar la técnica de viabilidad.

La gráfica 1 nos muestra, la frecuencia de antígenos HLA-A y se puede observar que la frecuencia más alta la tiene el antígeno HLA-A2 (0.62 %), el HLA-A28 (0.43 %) y el HLA-A9 con una frecuencia de 0.31 %. Mientras que los más raros fueron los HLA A10 y A23 con una frecuencia de 0.06 %.

En la gráfica 2 observamos la frecuencia de antígenos HLA-B y la frecuencia mayor la presenta el HLA-B35 con un 0.33 %, seguido del HLA-B16 con un 0.27 %, mientras que la frecuencia menor la tiene el HLA-B7.

La gráfica 3 nos muestra la frecuencia de los HLA-DR (Clase II), encontrándose que el que se expresa con mayor frecuencia es el HLA-DR7 con un 0.37 % y el HLA-DR1 con un 0.36 %. Mientras que el menos frecuente son el HLA-DR3 y el HLA-DRw10 ambos con 0.13 %.

En las gráficas 4 y 5 podemos observar la frecuencia de haplotipos. El haplotipo HLA-A2,28 es el que presenta la frecuencia real y esperada mayor (36.36%), mientras que los haplotipos HLA-A1,9 presentaron las menores frecuencias (3.63%). En estas mismas gráficas podemos observar los diferentes desequilibrios de unión, el cual cuantifica la diferencia entre la frecuencia observada y esperada, en donde se observa que los antígenos B35 y Bw53 se encuentra en una frecuencia tres veces mayor que la esperada y el haplotipo A1,A2 muestra una frecuencia de cuatro veces menor que la esperada.

TABLA No. 9.
FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA A, B Y GEN
EN LOS PACIENTES QUE ACUDEN AL HJM
A LOS SERVICIOS DE GINECOLOGIA Y NEFROLOGIA
EN EL PERIODO DE 1991 A 1992.

HLA	No. DE SUEROS N= 110	FRECUENCIA DE ALELOS	FRECUENCIA DEL GEN
A1	19	0.17	0.09
A2	70	0.62	0.38
A3	12	0.10	0.05
A9	35	0.31	0.17
A10	7	0.06	0.03
A11	8	0.07	0.03
A23	7	0.06	0.03
A28	49	0.43	0.24
A29	8	0.07	0.03
B5	27	0.24	0.13
Bw6	16	0.14	0.07
B7	8	0.07	0.03
B12	19	0.17	0.09
B15	18	.016	0.08
B16	30	0.27	0.15
B35	37	0.33	0.18
B40	23	0.20	0.10
Bw53	9	0.08	0.04

Frecuencia del gen (P) se obtuvo por :

* $P = 1 - \sqrt{1 - A}$ A = Frecuencia del antígeno

* Tomada de: Schiebl, 1986 (44)

TABLA No.10.

HLA DR Y DQ, GEN Y FRECUENCIA DE ANTIGENOS
EN LOS PACIENTES QUE ACUDEN AL HJM.

HLA	No. DE SUEROS N = 67	FRECUENCIA DE ALELOS	FRECUENCIA DEL GEN
DR1	24	0.36	0.20
DR2	23	0.34	0.19
DR3	9	0.13	0.07
DR7	25	0.37	0.21
DRw10	9	0.13	0.07
DRw11	13	0.19	0.10
DRw52	19	0.28	0.15
DQw1	29	0.43	0.25

Frecuencia del gen (P) se obtuvo por:

- * $P = 1 - \sqrt{1 - A}$ A = Frecuencia del antígeno
- * Tomada de: Schiebl, 1986 (44)

TABLA No. 11.
 FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS (HF) Y DESEQUILIBRIO DE UNION (LD)
 DE LA POBLACION ESTUDIADA.

HAPLOTIPO	HF (%) ESPERADA	HF (%) OBSERVADA	LD $\times 10^3$
A 2,28	28.34	36.36	8.02
A 2,9	20.24	13.36	6.68
A 1,11	1.25	4.54	3.29
A 1,9	5.49	3.63	1.86
A 9,28	14.16	3.63	10.53
A 9,29	2.31	6.36	4.05
A 1,2	10.98	2.72	8.26
B 35,W53	2.75	8.81	6.06
B 16,35	9.17	6.36	2.81
B 5,12	4.23	5.45	1.22
B 5,16	6.69	4.54	2.15
B 15,16	4.46	3.36	1.1

Frecuencia del alelo a en el locus 1 = p

Frecuencia del alelo b en el locus 2 = q

Frecuencia observada de ab = F obs.

LD (%) = (F obs. - pq) x 100

Tabla No. 12.
DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS
DE LOS SUEROS DESPUES DE LA MONOESPECIFICACION.

SUEROS		DILUCION					
N= 52		A	B	C	D	E	F
No.	%	c	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
31	60	+	+	+	+	+	+
14	27	+	+	+	+	+	-
2	4	+	+	+	+	-	-
5	9	-	-	-	-	-	-

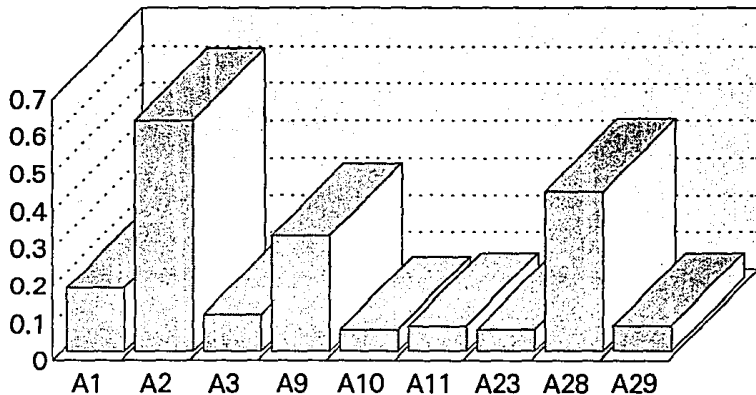
N= 52 : Número de sueros trabajados

(+) Reacción positiva

(-) Reacción negativa

ANTIGENOS HLA A

DETERMINADOS POR MICROLINFOCITOTOXICIDAD



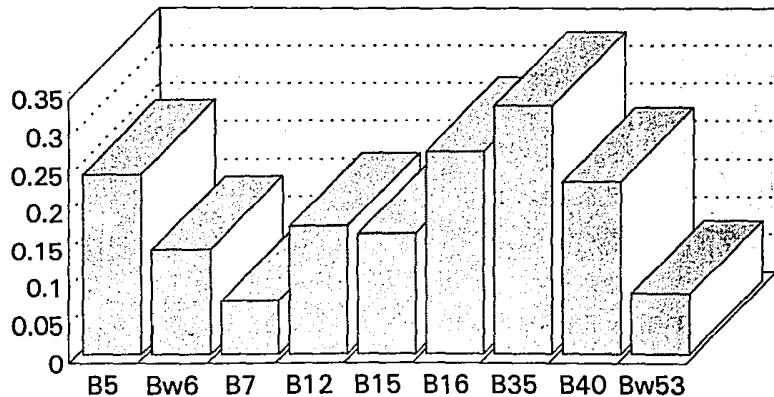
F. del Ag	0.17	0.62	0.1	0.31	0.06	0.07	0.06	0.43	0.07
-----------	------	------	-----	------	------	------	------	------	------

F. del Ag. = Frecuencia del Antígeno

Gráfica No. 1

ANTIGENOS HLA B

DETERMINADOS POR MICROLINFOCITOTOXICIDAD



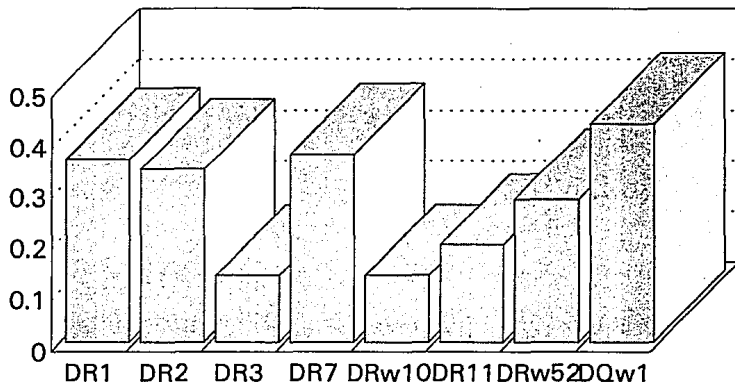
F. del Ag	0.24	0.14	0.07	0.17	0.16	0.27	0.33	0.23	0.08
-----------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

F. del Ag. = Frecuencia del Antígeno

Gráfica No. 2

ANTIGENOS HLA DR Y DQ

DETERMINADOS POR MICROLINFOCITOTOXICIDAD

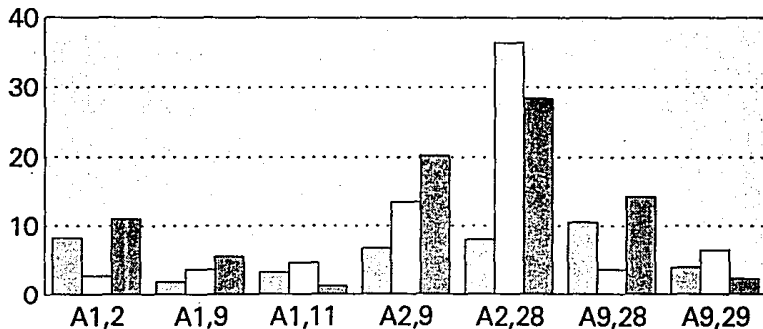





F. del Ag	0.36	0.34	0.13	0.37	0.13	0.19	0.28	0.43
-----------	------	------	------	------	------	------	------	------

F. del Ag. = Frecuencia del Antígeno

Gráfica No. 3

FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS (HF) Y DESEQUILIBRIO DE UNION (LD)



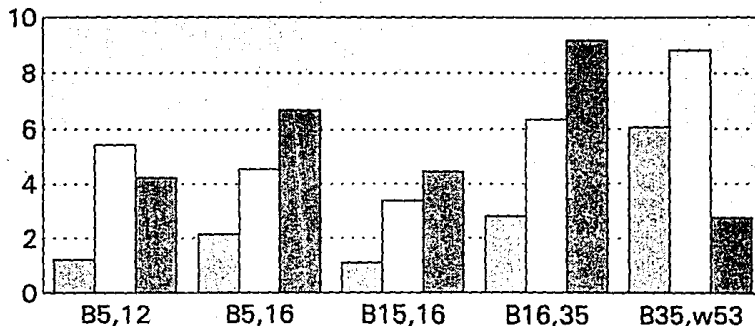
LD		8.26	1.86	3.29	6.68	8.02	10.53	4.01
HF Obs		2.72	3.63	4.54	13.36	36.36	3.63	6.36
HF Esp		10.98	5.49	1.25	20.24	28.34	14.16	2.31




HF Obs. = Frecuencia de haplotipos observada

HF Esp. = Frecuencia de haplotipos esperada

Gráfica No. 4

FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS (HF) Y DESEQUILIBRIO DE UNION (LD)



LD		1.22	2.15	1.1	2.81	6.06
HF Obs		5.45	4.54	3.36	6.36	8.81
HF Esp		4.23	6.69	4.46	9.17	2.75

HF Obs. = Frecuencia de haplotipos observada

HF Esp. = Frecuencia de haplotipos esperada

Gráfica No. 5

XI. DISCUSION DE RESULTADOS

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

El rendimiento de la obtención de sueros es bueno y aunque las cantidades fueron variables, el volumen mínimo obtenido fue suficiente para su tipificación y monoespecificación.

Con respecto al método de conservación de los sueros, éste fue adecuado, debido a que a un año de almacenamiento estos aún se observan viables. Con respecto a la fuente de obtención ésta es muy accesible, debido a que todos los hospitales cuentan con área de Ginecobstetricia siendo uno de los requisitos que la mujer sea multigesta ya que la investigación de la mujer en su primer embarazo no es costosa porque el rendimiento en términos de utilidad de anticuerpos es generalmente bajo, con respecto a otras fuentes de obtención como son los pacientes politransfundidos no son buena fuente debido a que sus anticuerpos probablemente son poliespecíficos.

La obtención de linfocitos T y B fue correcta, sin embargo no se lograron conservar en nitrógeno líquido debido a que presentan lisis celular después de la congelación, pudiendo deberse a que la concentración del DMSO fue inadecuada y el tiempo de enfriamiento fue poco para un cambio tan brusco de temperatura por lo que se recomienda utilizar el DMSO al 7% seguido por un enfriamiento de 2 hrs. con hielo y almacenarlos a -70°C durante 24 hrs. antes de almacenarlos en nitrógeno (Drive B., 1989). Debido a lo anterior, se obtuvieron los linfocitos T y B el mismo día en que se efectuaron las tipificaciones de los sueros de las placentas.

Por medio de la tipificación de los linfocitos se obtuvo la frecuencia de antígenos presentes en la población que acude al HJM (ver tablas 9, 10 Y 11).

Con respecto a la elevada frecuencia del antígeno A2, este se encuentra en la mayoría de la poblaciones por lo que algunos lo denominan antígeno universal (Stites, 1993; Lee, 1988). Ahora con la implementación de nuevas técnicas (PCR, PLT, IEF y RFLP) se ha podido especificar subtipos de un alelo, como es el caso del alelo A2, el cual tiene 12 variantes, de A201, A202...A212, los cuales difieren en la secuencia de algunos aminoácidos. La determinación de estos subgenes implica la utilización de técnicas mucho más laboriosas y no pueden ser subdivididas serológicamente (Tsuji, 1991).

El desequilibrio de eslabonamiento observado en la tabla 11 se debe probablemente a la ventaja selectiva para cierto haplotipo, mezcla y migración de dos poblaciones, a la reproducción dentro de un núcleo cerrado de gentes o a que los alelos HLA son usualmente heredados en bloques como un haplotipo completo, así si alguno evoluciona por selectividad, puede probablemente ser para el haplotipo HLA entero que por los alelos individuales. Como resultado, algunos alelos HLA codificados por diferentes loci son heredados juntos en el mismo haplotipo en un fenómeno de desequilibrio de unión, estos antígenos están muy juntos y se heredan por haplotipos.

En la absorción de los sueros con las plaquetas, disminuyó la cantidad de anticuerpos, y por lo tanto la intensidad de la reacción debido a que estos reaccionan con los antígenos de las plaquetas, eliminando así los

anticuerpos presentes en el suero. Aunque se logró una disminución en la cantidad de anticuerpos, no se alcanzó la completa monoespecificación, debido a que se requiere mayor cantidad de plaquetas, el tiempo de absorción fue insuficiente por lo que se recomienda la incubación de dos horas. Otra causa probable fue no tener la tipificación de las personas que donaron las plaquetas, ya que estas muestras fueron obtenidas del Banco de Sangre a las cuales se les había cumplido su fecha de caducidad (su promedio de vida es de tres días) por lo que se deduce que no todas las plaquetas eran viables, además de que las plaquetas tienen la tendencia a adherirse unas con otras disminuyendo así más su efectividad de absorción.

Por medio de la frecuencia de los antígenos presentes en los linfocitos utilizados para la tipificación se infirió la presencia de algunos anticuerpos específicos en los sueros (Tablas 9 y 10).

Debido a que la frecuencia más alta en los linfocitos fue para el antígeno A2 y los sueros reaccionaron en presencia de éstos, se infiere que los sueros tienen este anticuerpo. Esta forma de determinar la monoespecificidad de los sueros no es muy confiable, debido a que la reacción antígeno-anticuerpo pudo deberse a la presencia de otros antígenos para lo cual es necesario determinar los antígenos de los donadores.

Si se realiza la tipificación de la donadora de la placenta y de su pareja, entonces se sabrá que anticuerpos se encuentran presentes en el suero de la placenta y entonces se buscará a un donador de plaquetas que tenga al menos la presencia de un antígeno que contiene el suero y así poder monoespecificar los sueros de placentas. Así también, ya no sería

necesario tipificar los sueros de las placentas antes de su monoespecificación.

Tipificando a los donadores de la placenta, la monoespecificación sería más fácil y confiable; y podríamos utilizar los sueros como reactivo en pruebas de histocompatibilidad. Esto reduciría el costo de estudio, aunque el inconveniente sería la disponibilidad de los donadores.

X. CONCLUSIONES

X. CONCLUSIONES

Los objetivos planteados fueron parcialmente cubiertos:

- ♦ Se obtuvieron los sueros de las placentas de mujeres multigestas.
- ♦ Se obtuvieron linfocitos T y B para obtener la especificidad de los sueros, aunque no se lograron conservar.
- ♦ Se determinó la frecuencia del gen y antígeno de la población que acude al HJM.
- ♦ Se tipificaron los sueros por la prueba de microlinfocitotoxicidad.
- ♦ No se logró la monoespecificación de los sueros con la absorción con plaquetas, sin embargo se infirió la presencia del alelo A2 en la mayoría de los sueros en base a la frecuencia presentada en los linfocitos.
- ♦ De los resultados de la tabla 9 y 10 podemos deducir que los habitantes de la Cd. de México tiene antecedentes orientales (A9, A23, B35, DQw1) y españoles (DR11) los cuales se encuentran presentes en la población estudiada (Kimiyoishi, 1992). De acuerdo a estos resultados, podemos decir que la diversidad étnica ocurrió por la migración que ha sucedido en diferentes tiempos en el pasado y de lugares muy distintos de Asia a América.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

XI. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

XI. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.

- Continuar con el estudio ya que sugiere un método de obtención de sueros barato y sencillo, aunque laborioso, ya que se debe realizar tipificación tanto de la persona que dona las plaquetas, como de los sueros, además de buscar más variedad de muestras.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en la utilización de la técnica de microlinfocitotoxicidad, esta fue fácil de realizar teniendo únicamente algunas precauciones, como son: al preparar las placas evitar la contaminación de sueros con otros, revisar que las células y el suero se mezclen, purgar la jeringa para no inyectar aire y por lo tanto la formación de burbujas, las cuales interfieren al momento de leer las placas, otra causa de la interferencia en la lectura es la presencia de células no viables, para lo cual fue necesario la presencia de un control positivo y un negativo en cada placa, en donde si se observa una muestra de débil citotoxicidad o células muertas en más de un 70%, se descarta el resultado, evitar la evaporación de las placas, para lo cual se adicionó aceite y se cubrieron al final de la reacción.
- Deberan purificarse los sueros por filtración en gel y por cromatografía. Recomendando esta técnica ya que emplea columnas con anticuerpos MHC específicos, permitiendo aislar los

antígenos en un solo paso. Otra técnica sugerida es la que se realiza en diferentes estadios: en la primera fase, son lisadas las células y separados los componentes subcelulares mediante ultracentrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa. La fracción que contiene la membrana plasmática (rica en complejo principal de histocompatibilidad así como en otra clase de proteínas) es tratada con una solución detergente (por lo común desoxicolato sódico) para liberar las proteínas, las cuales son filtradas en gel. Esta fracción es purificada en columnas de lectina de lenteja, que fijan antígenos HLA. Estos son eluidos mediante adición de azúcar, que se une competitivamente a la lectina. Estas técnicas recomendadas tienen la desventaja de ser laboriosas y emplean tiempos largos, lo que complica y aumenta el costo de obtención de la muestra.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Alberts B., et al. Molecular Biology of the Cell, 2a. ed. Garland Publishing, Inc., New York, NK, 1989, 1-253 pp.
2. Amos D.B.: Human Histocompatibility Locus HLA-A Science 1968; 159: 659.
3. Amos D.B.: Genetic and Antigenetic Aspects of Human Histocompatibility Systems. Advances in Immunology 1969; 10: 251- 290
4. Amar Auraham, Nepom Cerard: HLA-DP and HLA-DO Genes Impresuntive HLA-Identical Siblings Structural and Funtional Identification of Allelic Variation. The Journal of Immunology 1987; 138:1947-1953
5. Arrellano J.; Vallejo M.; Gomez E.H.: HLA Profile of the Mexican Mestizo Population.; Tissue Antigens 1987; 9: 757-760
6. Arellano J., Isibasi A., Miranda R.: HLA Antigens Associated to Amoebic Abscess of the Liver in Mexican Mestizos. Parasite Immunology 1987; 9:757-760
7. Bach F.H.; M.A. Sachs D.H.; Current Concepts: Immunology; The New England Journal of Medicine; 1987; 317(8): 489-492
8. Beatty et al.; Histocompatibility; Transfusión; 1991; 31(9): 847-856
9. Belvedere M., Richiardi T., Pellegrino M.F.: Fab 2 Fragments from HLA Xenoantisera Specificalli, Blokc Cytolysis Mediated by HLA-A, -B Alloantisera; Journal of Immunogenetics 1980; 7(3): 215-219
10. Bishara A. Brautbar Ch: Detection and Identification of HLA Antigens in Dried Spleens by Means of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA); Forensic Science International 1990; 45: 97-105

11. Boehmer Haral Von and Kisielow Pauer: How the Immune System Learns about Self; Scientific American; Vol.2. 1991; 50-59
12. Brochier J., Bonneau M., Robert M., Samorut C.: Anti HLA-DR Alloantibodies Eluted from Human Placental Tissue. Transplant. Proc., 1979; 11(1): 779-782
13. Colombe B., Juster R. P., Salvatierra O.: Prediction of Donor-Specific Transfusion Sensitization.; Transplantation, 1988; 45(1): 101-105
14. Committee on Keokocyte Antigen on N.Y., 1989 Nomenclature.
15. Conell B.A.O., Lee E.J.: Selection of Histocompatible Apheresis Platelet.; Blood, 1992; 79(2): 527-531
16. Crumpton M.J. HLA in Medicine British Medical Bulletin, vol.43, Churchill Livingstone Melbourne and N.y. Edinburgh, London (1987).
17. Daar A.S., Fuggle S.V., Fabre J.W.: The Detailed Distribution of MHC Class II Antigens in Normal Human Organs.; Transplantation , 38(3): 293-297. (1986)
18. Dasgupta J.D., Cemach K., Dubey D.P., Yunis E.J., Amos D.B. The Role of Class I Histocompatibility Antigens in the Regulation of T-Cell Activation.; Proc. Natl. Acad. Sci. 1987; 84:1094-1098
19. Dausset J., Colombani J., Legrand L., Fergold N. and Rapaport F.T. : Genetic and Biological Aspects of the HLA System of Human Histocompatibility; Blood. 1970; 35(5): 591-612
20. Dobberstein Bernhard: Who Needs Peptide Transporters. Nature 1992; 355:109-110
21. Drive Birmingham Vince. : Antibodies vol. II, Ed. D. Catty Birimigham (1989)

22. Fefelova V.V.; Participation of Indo-European Tribes in Etnnogeny of the Mongoloid Population of Siberia: Analysis of the HLA Antigen Distribution in Mongoloids of Siberia.; Am. J. Hum. Genet 1990; 47: 294-301
23. Gabbianelli M.et al.: Testau and HLA Expression in Hemopoyetic Development.; The Journal of Immunology 1990; 144(9): 3354-3360
24. Golde D.W.: The Stem Cell. Scientific American 1991; 265: 36-43
25. Groenewegen G. et al.: Effect of Cyclosporine on MHC Class II Antigen Expression on Arterial.; Trasplantation 1985; 40(1): 21-25 26. Hackett C.J. Cell-mediated processing and presentation of T cell antigenic determinants. Current Science 1989; 2: 117-122
27. Hashimoto S., Micharski J.P. et al.; Mechanism of a Lymphocyte Abnormality Associated with HLA-B8/DR3: Role of Interleukin 1. Clin. Exp. Immunol. 1990; 79: 227-232 26.
28. Healther M. Dick. Histocompatibility Techniques.; Kissmeyer-Messen Editores. Elsevier/North Holland. (1979).
29. Jourdan B.R., et al: HLA Class I Genes: From Structure to Expression, Serology and Function. Immunological Reviews. 1985; 84: 73-92
30. Johannsen R. and Teuter Chr. HLA-System, 3rd. English Edition Behringwerke AG, Germany
31. Kappes d. and Strominger J.L.: Human Class II. Mayor Histocompatibility Complex Genes and Proteins.; Ann. Rev. Biochem. 1988; 57:991-1028
32. Klein Jan. Immunology Ed. Blackwell Scientific Publications. U.S.A. 1990
33. Lee T.D., Zhao T.M.; The Plimorphismo of HLA Antigens in the Chinese.; Tissue Antigens, 1988; 32:188-208

34. Male D, Champion B, Cooke A: Advanced in Immunology J.B. Lippincott Company Philadelphia, Gower Medical Publishing London. New York 1987.
35. Murray S. and Dewar P.J.: Incidence of Lymphocytotoxic Antibody in Maternal Serum at Delivery in Cord Serum and Placental Fluid.; Vox Sang 1976; 30:291-294
36. Parham P., Androlewicz M.J., Brodsk F.M.: Monoclonal Antibodies Purification, Fragmentation and Application to Structural and Functional Studies of Class I MHC Antigens. Journal of Immunological Methodos 1983; 53:133-173
37. Payne Rose; Leukocyte Agglutinins in Human Sera: Correlation Between Blood. AMA Arch. Intern. Med. 1957; 94:587-606
38. Payne Rose and Rolfs May.: Fetomaternal Leucocyte Incompatibility.; J. Clin. Invest. 1958; 1756-1763
39. Paabo Suante, Kampe O., Severnsson L.: The Association between Class I Trasplantation Antigens and Adenovirus Membrane Protein.; Prog. Allergy 1985; 36:114-134
40. Redman C.W.G., et al.: Class I Mayor Histocompatibility Complex Antigens of Human Extra-Villous Trophobast.; Immunology 1984; 52:457-468
41. Reinsmoen N.L., et al.: Diferentiation of Class I and Class II Directed Donor-Specific Alloreactivity in Brochoalveolar Lavage Lymphocytes from long trasplant recipients., Trasplantation 1992; 57(1): 181-189
42. Roitt Ivan. Essential Immunology 7a. ed. BlackWell Scientific ublications. Massachusset, 1991.

43. Rötzschke Olaf and Falk Kirsten.; Naturally-Occurring Peptide Antigens Derived from the MHC Class I Restricted Processing Pathway.; Immunology Today 1991; 12(12): 447-455
44. Schiebl Beates.: HLA Typing Problems and solutions. Ed. for Laboratory Fol. Immunogenetics Munch (1986)
45. Schrempf-Decker G.E., Baron D. and Wernet P.; Helix Pomatia Agglutinin (HpA) Affinity Chromatography. The Isolation of Pure and T Cell Populations and their Use for the Routrie HLA-DR (Ia) Serology.; Journal of Immunological Methods. 1980; 32(2): 285-296
46. Segall M., Fritz PHD., Bach M.D.; HLA and Disease.; The New England Journal of Medicine 1990; 32(26): 1876-1880
47. Simonns M.F., Tait B.D.; Detection of Immune-Associated Genetic Markers of Human A. Churchill Livingstone Edinburgh London Melbourne and New York (1984)
48. Smith Kendall A.; Interleukin 2. Scientific American 1990; 26-33
49. Stites DP: Imunología Básica y Clínica Ed. El Manual Moderno. México, 7a. ed. 1993.
50. Sunderland Ch., et al; HLA -A,B,C Antigens are Expressed on Nonvillous Trophoblast of the Early Human Placenta.; The Journal of Immunology 1981; 127(6): 2614-2515
51. Tariff H., et al: The Benefit and Underutilization of Sharing Kidneys for better Histocompatibility Transplantation 1989; 47(1): 102-105
52. Thorsby E.: Structure and Function of HLA Molecule. Transplantation Proceeding 1987; 19(1): 29-35

53. Tsuji Kimiyoshi , Aizawa Miki and Sasazuki Takehiko : HLA 1991. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Held in Yokohama, Japan, November, 1991. Vol 1. Oxford New York Tokyo.
54. Turco M.C., et al.: Regulatory Role of a Monomorphic Determinant of HLA Class I Antigens in T Cell Proliferation. The Journal of Immunology 1985; 135(4): 2268-2273
55. Van Rood J.J., Eernisse J.G., Van Leewen A.W.: Leucocyte Antibodies in Sera from Pregnant Women.; Nature 1958; 1735-1736
56. Williams K.M., and Raybourne R.B.: Demonstration of Cross-Reactivity between Bacterial Antigens and Class I Human Leukocyte Antigens by Using Monoclonal Antibodies to *Shigella flexneri*. American Society for Microbiology. 1990; 58(6): 1774-1781.
57. William E. Paul. Fundamental Immunology Ed. Raven Press; 2a. ed.; U.S.A., 1989

A N E X O

ANEXO

PREPARACION DE REACTIVOS

EOSINA:

Pesar 50 grs. de eosina por cada litro de agua destilada. Filtrar el colorante en papel filtro del No. 1. Almacenarla en refrigeración.

FORMALINA:

Adicionar 2 ml de rojo de fenol al 0.5 % a 500 ml de formaldehído.

SOLUCION DE FICOLL-HYPAQUE:

9 g de Ficoll en 100 ml de agua destilada, 28 ml de Hypaque al 50 % y 13 ml de agua destilada con un IR de 1. 3570 a 1. 3580

MEZCLA DE CONGELACION

Por cada ml de suspensión de células a almacenar se prepara 1 ml de mezcla que contiene:

0.6 ml de medio RPMI 1640

0.2 ml de suero AB o fetal de ternero

0.2 ml de dimetilsulfoxido (DMS)

Debe de estar a 4°C para disminuir su toxicidad.

SUERO FETAL DE TERNERO (SFT) AL 20 %

Colocar 20 ml. de SFT en un matraz aforado de 100 ml y aforar.

GLOSARIO

GLOSARIO

ALELO. Formas diferentes de un gen heredado.

ALOANTIGENOS. Antígenos presentes en las células de individuos de una misma especie.

EPITOPOS. Determinantes antigénicos. Sitio de unión del antígeno con el anticuerpo.

GENE. Información hereditaria, localizada en el cromosoma de la células.

HAPLOTIPO. La porción del fenotipo determinada por genes intimamente ligados de un solo cromosoma heredado de un solo progenitor.

ISOANTIGENOS. La diferencia antigenica entre los individuos de una especie.

ISOTIPO. Características antigenicas de determinada clase o subclase de cadenas H y L de inmunoglobulina.

LOCUS GENETICO. Lugar del cromosoma donde el gen es presentado. Porque cada célula tiene un doble cromosoma complementario (diploide), un cromosoma de la madre y otro del padre, cada locus es representado doblemente.