

14
ze



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OTROS SISTEMAS ALOANTIGENICOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL HOMBRE DIFERENTES AL HLA.

T E S I S

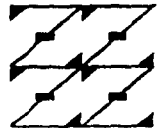
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA DE LOURDES CERON GUTIERREZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1995.

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.

JURADO

PRESIDENTE

Dr. Rubén Marroquín Segura

VOCAL

Dr. Luis Angel Terán Ortiz

SECRETARIO

Q.F.B. Luz Margarita Chávez Martínez

SINODALES SUPLENTE

Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera

Q.F.B. Fco. Javier Parada González

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología a cargo del Dr. Luis Angel Terán Ortiz en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (I.N.E.R.).

A Blanca

Mehr Licht!
¡Más luz!

- Goethe.

*¿ Alguien verá otra vez la desdicha ?,
¿ Alguien ha de ver cesar la amargura, la angustia del mundo ?
Solamente se viene a vivir la angustia y el dolor
de los que en el mundo viven...*

-Nezahualcóyotl

*Onen Tacico,
tonquizaco in tlalticpac
¿ Zan ca iohquin onyaz
in o ompopoliohxochitla ?
¿ An tle notleyo yez in quenmanian ?
¿ An tle nitauhca yez in tlalticpac?
¡ Manel xochitl, manel cuicatl !
¿ Ah yn amo zanio nican
iontiximatico in tlalticpac ?...*

En vano hemos llegado,
hemos brotado de la tierra.
¿ Sólo así he de irme
como las flores que perecieron ?
¿ Nada quedará de mi nombre ?
¿ Nada de mi fama aquí en la tierra ?
¡ Al menos flores, al menos cantos !
¿ O sólo aquí en la tierra
hemos venido a conocer nuestros rostros ?...

- Anónimo

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION

FUNDAMENTACION

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. MARCO TEORICO

- 1.1 Historia del trasplante.
- 1.2 Generalidades del trasplante.
- 1.3 Anticuerpos y trasplante.
- 1.4 Antígenos del CMH.
- 1.5 Evidencias de la existencia de antígenos no-HLA relacionados con el rechazo al injerto.
- 1.6 Generalidades de la piel.

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y METODOS

- 3.1 Purificación de linfocitos.
- 3.2 Prueba de viabilidad.
- 3.3 Microcitotoxicidad.
- 3.4 Inmunofluorescencia indirecta.
- 3.5 Materiale y equipo.

4. ANALISIS ESTADISTICO

- 4.1 Prueba Kruskal-Wallis.
- 4.2 Tabla de contingencia de 2 X 2.

5. RESULTADOS

6. DISCUSION DE RESULTADOS

7. CONCLUSIONES

APENDICES

GLOSARIO

REFERENCIAS

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

Los antígenos HLA constituyen la principal barrera al libre intercambio de tejidos entre humanos, y por tal motivo son un criterio para establecer la compatibilidad, sin embargo no explican la totalidad de los rechazos que se observan, por lo que se piensa que existen otros sistemas antigénicos.

En el presente trabajo se determinaron anticuerpos contra antígenos epidérmicos presentes en 262 sueros de pacientes politransfundidos, y por tanto potencialmente sensibilizados a aloantígenos de histocompatibilidad que pudieran estar asociados a rechazo de injertos, fueron obtenidos del Registro Nacional de Transplantes y se les practicaron pruebas de microcitotoxicidad de Terasaki contra un panel de linfocitos de 22 individuos sanos, a los cuales previamente se les tipificaron sus HLA-A,B. Posteriormente se seleccionaron aquellos sueros que no mostraron citotoxicidad. Así entonces, se redujo el número de sueros a 35, es decir, 13 % del total. De igual forma se eliminaron los que presentaron anticuerpos antinucleares en las células epidérmicas. Se procedió a realizar con ellos los ensayos sobre cortes de piel de 20 personas diferentes y se organizaron los resultados de tal forma que se dividieron en tres grupos según el número de transfusiones, se analizaron estadísticamente y se llegó a la conclusión que no existe relación alguna entre el número de transfusiones y la sensibilización hacia los antígenos estudiados. Así mismo se ratificó la existencia de polimorfismo en este grupo antigénico.

INTRODUCCION

El transplante de órganos y tejidos implica un intercambio entre dos individuos diferentes genéticamente, que cuando son de la misma especie se denominan trasplantes alogénicos. Dichas diferencias genéticas provocan la destrucción del tejido injertado a través de respuestas de naturaleza inmunológica; los factores responsables de este fenómeno se conocen como antígenos de histocompatibilidad. En los trasplantes alogénicos tanto en modelos animales como en humanos, los antígenos de histocompatibilidad están constituidos en varios sistemas. El parecido entre el donador y el receptor en estos antígenos es una condición para el éxito del transplante. Sin embargo, no en todos los casos se tiene una respuesta satisfactoria, lo que ha hecho pensar en la existencia de otros sistemas antigénicos que eventualmente provocan rechazo. Se ha propuesto otros sistemas antigénicos y en este trabajo se exploró el presente en los queratinocitos de piel en la población mestiza mexicana.

FUNDAMENTACION

Aunque existen numerosos factores de éxito en el transplante de órganos y tejidos como la cirugía misma, las infecciones por la inmunosupresión, etc., se ha intentado estudiar la magnitud de la aportación por la histocompatibilidad. El sistema HLA en el humano es capaz de explicar el curso en el transplante en el 95 % de los casos, quedando un 5% por resolver; otro hecho es que aunque se igualen en casi todas las condiciones, el porcentaje de éxito al transplantar diferentes órganos no se tienen resultados uniformes, lo que plantea, entre otras cosas, que exista diferente composición antigénica. El estudio de rechazos ocurridos con HLA idénticos, por ejemplo eluyendo los anticuerpos en el órgano no aceptado, han dilucidado que no tienen especificidad contra HLA, por lo que es importante su estudio.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los pacientes politransfundidos se obtienen resultados más pobres en trasplantes de órganos y tejidos, lo que nos hace suponer la existencia de una presensibilización hacia antígenos HLA y probablemente otros. Por tanto estudiaremos la presencia, en sueros de pacientes politransfundidos, anticuerpos a) anti HLA y b) anti piel humana.

1. MARCO TEORICO

1.1. HISTORIA DEL TRANSPLANTE

El descubrimiento de las moléculas de histocompatibilidad y de su función fisiológica provino de dos campos diferentes: el trasplante y la inmunogenética. Los primeros intentos de trasplantes fueron las células tumorales en el ratón, con la intención de estudiar la biología del cáncer. Se advirtió que un tumor espontáneo en ratón no podía ser transplantado a un ratón de diferente cepa, pero estas células podían crecer si se transplantaban en las mismas cepas de ratones. Peter Gorer, empleando cepas endogámicas de ratones identificó antígenos en los eritrocitos de diferentes cepas murinas y observa que el trasplante de células tumorales obtenidas de una cepa de ratón endogámica a ratones de una línea endogámica diferente rechazaban el tumor y producían anticuerpos no específicos para el tumor sino contra todos los tejidos de la cepa murina de la que se obtuvo el tumor. Gorer también comprobó que la primera generación filial entre las dos cepas endogámicas diferentes no rechazaban el tumor de una de ellas (1). De esta manera quedaron establecidas las leyes básicas de la inmunidad de trasplante (Fig 1.1.1).









DONADOR	RECEPTOR	RESULTADO
 A	 A	ACEPTADO
 B	 A	RECHAZADO
 B	 B	ACEPTADO
 AXB	 B	RECHAZADO

Fig 1.1.1. Leyes del trasplante

Posteriormente Medawar extiende estas observaciones a los injertos de piel en 1944 y 1946 demostrando que el rechazo de un injerto entre individuos no emparentados se realiza a través de la respuesta inmune, iniciándose así, la investigación de la inmunología del trasplante. Mitchison (1953) pone en claro que la sensibilización podía ser transferida por las células linfoides a animales "virgenes" de la misma especie, comprobando la predominancia celular en la respuesta inmune a los antígenos de los tejidos y que la sensibilización vía suero no es fácilmente transferible (2). Más adelante se observó que los determinantes antigénicos de histocompatibilidad estaban presentes en proporciones variables en todos los tejidos del organismo.

A mediados de ésta misma década se descubre el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) al encontrarse por vez primera los anticuerpos leucoaglutinantes en los sueros de pacientes politransfundidos y en el 20-30% de los sueros de mujeres multíparas. Las reacciones de reconocimiento sugirieron que los antisueros identifican aloantígenos que participan en la aceptación de los trasplantes de tejidos por el organismo. Desde entonces se conocen como los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA) (3).

Posteriormente en 1954 en el hospital Bent Brigham de Boston, Massachusetts se tiene el primer trasplante renal con éxito. A finales de los 60's Singal, Mickey y Terasaki tipifican con antisueros antígenos leucocitarios de donadores y receptores de injertos que pertenecían a una misma familia, demostrando que aquellos en los que las reacciones eran compatibles el injerto tenía una sobrevida mayor (2).

Los 70's fueron testigos de los efectos benéficos de las globulinas antilinfocitos como tratamiento para mejorar el curso clínico del injerto.

En los 80's, la ciclosporina, un agente inmunosupresor, mejoró de manera tan importante el índice de éxito de los trasplantes renales que hizo posible también transplantar otros órganos a partir de donadores cadavéricos y frecuentemente casi nulas compatibilidades, con buenos resultados.

El pronóstico de los trasplantes es hoy en día tan alentador que se está proponiendo como medida terapéutica desde el inicio del cuidado de muchos pacientes con enfermedades crónicas y progresivas (4).

1.2. GENERALIDADES DEL TRASPLANTE

La inmunobiología del trasplante es importante por su aplicación clínica y porque pueden estudiarse a través de ella todos los aspectos de la función inmunitaria.

En la práctica clínica se transplantan órganos para suplir el déficit funcional y a menos que el donador y el receptor sean idénticos genéticamente, los antígenos del injerto provocarán una respuesta de rechazo inmunológico (5). Las barreras para el trasplante pueden ser descritas bajo estas diferencias genéticas, las cuales van a estar determinadas por la relación donante receptor (Fig.1.2.1).

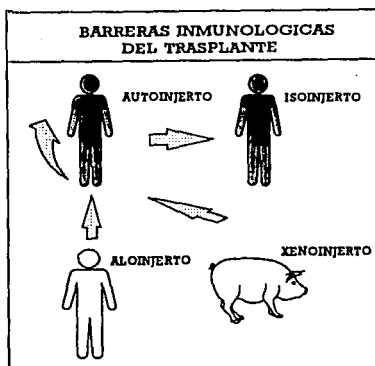


Fig 1.2.1. Relación donante receptor.

En los autoinjertos no existe lo extraño por lo que no inducen el rechazo. De igual manera, los isoinjertos, es decir, entre individuos genéticamente idénticos (isogénicos) no expresan antígenos extraños al receptor por lo que no activan ninguna respuesta de rechazo.

El aloinjerto es el trasplante clínico habitual realizándose entre miembros de la misma especie que tienen variantes alélicas de ciertos genes, esto ocasiona que las células del aloinjerto puedan ser reconocidas como extrañas y despertar alguna respuesta inmune. La más alta disparidad genética es la encontrada entre individuos de diferentes especies, el xenoinjerto. Es a través de esta barrera xenogénica que un injerto suele ser rápidamente rechazado ya sea por los anticuerpos naturales existentes o por un rechazo rápido mediado por células (5).

Además de las diferencias genéticas entre donador y receptor, la condición inmune del receptor y la inmunosupresión pueden afectar la supervivencia del injerto (6) (Fig 1.2.2).

CONDICION INMUNE DEL RECEPTOR	
ANTES DEL TRASPLANTE	<ul style="list-style-type: none"> -Compatibilidad ABO -Anticuerpos anti-HLA y otros antígenos -Presensibilización <ul style="list-style-type: none"> *Injertos previos *Transfusiones sanguíneas *Embarazos
DESPUES DEL TRASPLANTE	<ul style="list-style-type: none"> -Rechazo/no respuesta (Tolerancia) -Genes Ir
INMUNOSUPRESION	
DROGAS	<ul style="list-style-type: none"> -Esteroides -Ciclosporina -FK 526 -Azatioprina
ANTICUERPOS	<ul style="list-style-type: none"> -Policlonales (Globulina antitímocito) -Monoclonales (Anti-CD3, CD25(IL-2R), CD4)
IRRADIACION LINFOIDE	

Fig 1.2.2. Conjunto de características que determina la condición inmune del receptor.

El rechazo puede llevarse a cabo a diferentes tiempos, y mediante la observación de la rapidez de la lesión del injerto puede obtenerse una buena información acerca de los diferentes mecanismos involucrados. El llamado rechazo hiperagudo ocurre durante los primeros minutos u horas de que se ha reestablecido la circulación del receptor en el injerto y es causado por una presensibilización contra antígenos de histocompatibilidad del donador. Tal sensibilización se induce ya sea por transfusiones sanguíneas previas, embarazos múltiples, rechazo de trasplantes anteriores o en algunos casos experimentales por la inmunización deliberada con células extrañas.

Los anticuerpos preformados fijan complemento y lesionan las paredes de células endoteliales de los vasos sanguíneos, permitiendo la salida de líquidos y células, agrupando plaquetas y privando al injerto de aporte sanguíneo. Este rechazo puede evitarse realizando una prueba cruzada para investigar la presencia de anticuerpos citotóxicos antidonante. El rechazo agudo tarda días o semanas en manifestarse y se debe a la activación primaria de los linfocitos T.

Si existe presensibilización a los antígenos del injerto tendrá lugar una reactivación secundaria de los linfocitos T, lo que induce a un rechazo acelerado mediado por células. El rechazo crónico es un proceso lento que dura meses o años y esto depende de la disparidad genética entre el donante y el receptor así como del tratamiento supresor. La causa puede ser un rechazo ligero mediado por células o por depósitos de complejos antígeno-anticuerpo en el tejido injertado (5); recientemente se ha identificado que la reinstalación del padecimiento que originalmente dañó al órgano es más frecuente que el rechazo crónico (Comunicación personal del Dr. Luis Terán).

1.3. ANTICUERPOS Y TRANSPLANTE

Se ha descrito la presencia de anticuerpos del receptor contra el injerto, como un factor muy importante de riesgo para el rechazo, por lo que es importante observar que tipo y que efecto tienen éstos sobre el órgano injertado.

a) Grupo sanguíneo ABO.

Los estudios ABO de los eritrocitos se llevan a cabo en todos los receptores y posibles donadores, ya que éste sistema se encuentra no solo en los eritrocitos sino también en el endotelio vascular del injerto, dando por resultado que los trasplantes renales y de otros órganos, solo se practiquen considerando la compatibilidad ABO.

El peligro de trasplantes en los que no se considera la barrera ABO es el rechazo rápido del injerto por hisohemaglutininas preformadas que lesionan el endotelio vascular y despiertan una reacción de coagulación "in situ". Las reglas que se aplican a la transfusión sanguínea corresponden a las de trasplante renal (3).

b) Transfusiones sanguíneas.

Las anemias severas son comunes en enfermedades renales, la introducción de la eritropoyetina recombinante ha dado una terapéutica útil para el manejo de estos pacientes o bien las transfusiones, que en algunos casos han mostrado una ayuda en la sobrevida del injerto. Este fenómeno recibe el nombre de refuerzo activo de la supervivencia del injerto. Desgraciadamente, cerca del 20% de los pacientes que reciben transfusiones de donante específico desarrollan anticuerpos antidonante. Sin embargo en el 80% restante el porcentaje de éxito es del 95 al 100% (5).

El efecto benéfico de la transfusión sanguínea, previa al trasplante, conocido como "efecto transfusión", se ha observado en pacientes que reciben al azar transfusiones como terapéutica para reducir el riesgo de rechazo al recibir un órgano de cadáver (7, 8). De hecho, los efectos de transfusión aumentan con el número de transfusiones al azar. Sin embargo, siempre hay riesgo de sensibilizar al paciente.

Se ha postulado que el mecanismo de este efecto podría ser a través de la inducción de anergia. Alternativamente este mecanismo podría consistir en la producción de anticuerpos "facilitadores" específicos para un antígeno donante, que interfirieran en el proceso de rechazo al injerto al enmascarar los antígenos del injerto, previniendo así su reconocimiento por células T o bien destruyendo los linfocitos pasajeros altamente inmunogénicos, dentro del injerto. Se puede hablar también de la presentación del antígeno de forma que las células TH2 y Ts sean selectivamente activadas después del trasplante.

c) Presensibilización por trasplantes previos.

La exposición anterior a antígenos del injerto puede originar sensibilización manifestada por el desarrollo de anticuerpos citotóxicos contra antígenos HLA y otros menores. En pacientes con anticuerpos contra HLA el resultado final puede ser malo y en enfermos sensibilizados que reciben un segundo trasplante subsecuente, es más probable que lo rechacen que quienes reciben un injerto primario. Esta posibilidad aumenta en pacientes que han rechazado su primer injerto rápidamente (menos de 3 meses).

Este rechazo repetido puede depender de una sensibilización específica a antígenos de transplante o a una alta reactividad inmunológica al receptor. Para prevenir éste tipo de problemas se realiza, antes del transplante, la prueba de compatibilidad cruzada, la cual determina la presencia de cualquier anticuerpo preformado contra los antígenos HLA del donador. Si el suero del paciente destruye las células del donador, hay compatibilidad cruzada positiva e indica presencia de anticuerpos preformados que generalmente acompañan episodios de rechazo muy tempranos e incontrolables, lo que conducen a la pérdida irreversible del injerto. En las células del paciente también se realiza esta prueba para descubrir autoanticuerpos linfocitotóxicos inespecíficos, pudiendo ser eliminado erróneamente un posible donador por una prueba cruzada positiva debida a estos autoanticuerpos. La absorción con linfocitos propios del suero aclara los resultados (3).

Para una mayor claridad de la relación del rechazo y la presencia de los diferentes anticuerpos que pueden estar presentes en un receptor ver la fig. 1.3.1.

ANTICUERPOS Y TRASPLANTE		
SISTEMA ANTIGENICO	ANTICUERPOS PRESENTES	EFFECTO EN EL INJERTO
ABO	Ocurre naturalmente	Rechazo inmediato
HLA	Resultado de: *Transplantes Previos *Transfusiones *Embarazos	Clase I Rechazo hiperagudo y acelerado Clase II No asociado con rechazo hiperagudo
AUTOANTICUERPOS	Hallados luego de infecciones por virus y en L.E.S.	Efectos no dañinos
ANTICUERPOS ANTI MONOCITO/ CEL. ENDOTELIALES	Inicialmente descrito solo después de injertos previos	Asociado a rechazo hiperagudo

Fig 1.3.1. Anticuerpos y Transplante

1.4. ANTIGENOS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Los antígenos presentes en tejidos genéticamente diferentes y que desencadenan el rechazo de injertos se conocen como antígenos de histocompatibilidad. Existen más de 30 loci génicos de histocompatibilidad. Aquellos que son muy inmunogénicos se agrupan en el Complejo Mayor o Principal de Histocompatibilidad (CMH). Los productos de otros genes que generan respuestas de rechazo más débiles se conocen como antígenos menores de histocompatibilidad. No obstante, la combinación de estos antígenos pueden llegar a provocar potentes respuestas de rechazo.

Los antígenos del CMH se caracterizaron experimentalmente por medio de aloanticuerpos producidos en ratones inmunizados con células de otras cepas que difieran en el CMH, después los anticuerpos específicos contra moléculas codificadas en subregiones del CMH, definidos a partir de cruzamientos en cepas endogámicas, se utilizaron para trazar el mapa de CMH. Con estos conocimientos, se tuvieron pistas firmes para buscar el equivalente en el humano, conocido en la actualidad como sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Se han identificado 3 clases de moléculas (I, II, y III) codificadas dentro del CMH murino y humano. Las moléculas de clase I y II representan entidades estructurales diferentes, es decir, aún cuando existen múltiples genes de ambas clases dentro del CMH todos sus productos tienen globalmente la misma estructura. En cambio la región de clase III contiene un cúmulo de más de 20 genes, incluidos los que codifican los componentes de la vía clásica del sistema del complemento (C2, C4), así como el Factor B de la vía alterna. Hasta el momento no se ha demostrado similitudes funcionales o estructurales entre los productos de los genes de la clase III y las moléculas de I y II.

La estructura de los antígenos del CMH clase I están constituidas de una cadena pesada glucosilada asociada de manera no covalente con la $\beta 2$ microglobulina, dicha cadena consta de tres dominios extracelulares $\alpha 1$ (N-terminal) $\alpha 2$ y $\alpha 3$, una región transmembranal y una cola citoplásmica. Cada dominio consta de 90 aminoácidos aproximadamente (Fig 1.4.1).

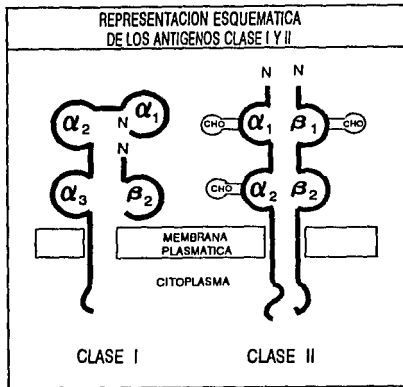


Fig 1.4.1. Moléculas de HLA Clase I y II.

Las moléculas clase II, A y E en el ratón; DR, DQ Y DP en el humano, son heterodímeros de cadenas pesadas (α) y ligeras (β), con pesos moleculares variables según el locus que los codifique. De manera general la estructura de ambas cadenas son similares. La porción extracelular está unida a la región transmembranal mediante una corta secuencia. Posee también un dominio citoplásmico de unos 10-15 residuos aminoacídicos (9, 10, 11).

1.5. EVIDENCIAS DE LA EXISTENCIA DE ANTIGENOS NO HLA RELACIONADOS CON EL RECHAZO AL INJERTO

Aunque se desconoce con precisión el mecanismo de rechazo rápido al injerto, se ha establecido que la preexistencia en el receptor de anticuerpos circulantes contra antígenos del donador ocasionan un rechazo del órgano transplantado. Se han utilizado varios métodos con alta sensibilidad para detectar estas proteínas ayudando a aumentar la supervivencia postransplante, siendo los linfocitos las células blanco en todos los casos.

Los primeros trabajos con células endoteliales y su relación con leucocitos, se realizaron por Vetto y Burger (12) al inmunizar conejos con células endoteliales de

perro y encontrar que los antígenos expresados en dicha línea celular no son detectados en linfocitos.

Las evidencias de la existencia de antígenos no HLA relacionados con la histocompatibilidad se registraron en 1971 cuando Rosenberg y col.,(13) mostraron que las células endoteliales son la primera interacción antígeno-anticuerpo con el complemento en los procesos de rechazo hiperagudo . Para 1972 Cerilli y col.,(14) evaluaron, a través de inmunofluorescencia indirecta, la presencia y significancia clínica de anticuerpos IgG del receptor contra endotelio vascular del órgano donado, correlacionándolo con las reacciones de linfocitotoxicidad. Los hallazgos demostraron que aparentemente dichos anticuerpos son diferentes a los linfocitotóxicos y no dependen del complemento. También se demostró una relación del curso clínico con la presencia de estos anticuerpos, esto sugirió que la técnica es un buen método para detectar presensibilización y predecir el éxito del trasplante renal. En 1977 estos datos se confirmaron y se pensó que las Células del Endotelio Vascular (CEV) humanas poseen antígenos que no están presentes en los linfocitos, los cuales juegan un papel importante en los procesos de rechazo (15). En el mismo año se observó la posibilidad de que los monocitos de sangre periférica humana, comparten este mismo sistema antigénico (16). Estos anticuerpos aparentemente dirigidos contra antígenos no HLA y sin reacción cruzada con células tubulares renales o antígenos de linfocitos T y B tomaron gran interés por algunos grupos de investigadores como el de Cerilli y col.(17), los cuales verificaron la especificidad de éstos a través de absorciones; poco después se hizo más clara la relación monocito-CEV (18, 19), dando como resultado una fuente de células blanco más fácil de obtener para una reacción cruzada pretrasplante (17).

Los estudios prospectivos y retrospectivos confirmaron la existencia del sistema antigénico CEV asociando a diferentes enfermedades tales como aterosclerosis y vasculitis, así como su importancia inmunogénica en la patogénesis de rechazo en trasplantes con HLA idéntico no solo de riñón sino también cardíaco. Es importante hacer notar la vinculación tan importante entre los genes que codifican para antígenos CEV y el CMH, según algunos estudios realizados en familias. Este nexo propone la localización de los genes que codifican para el sistema antigénico CEV, en el cromosoma 6 en el humano como una parte del CMH (20, 21, 22, 23, 24).

El hallazgo de que el monocito expresaba antígenos CEV, brindó la oportunidad de identificar anticuerpos anti-CEV con mayor facilidad, dada la importancia demostrada en el rechazo de trasplantes (25).

Otros investigadores han descrito anticuerpos que reconocen antígenos del endotelio vascular pero no de monocitos (26, 27). Estos hallazgos dieron origen a una interpretación serológica altamente complicada.

Hay otros estudios con anticuerpos eluidos de injertos rechazados que reconocen antígenos no HLA órgano-específicos, y que sugieren un polimorfismo antigénico (28,29).

Con lo que respecta a la caracterización bioquímica de estos antígenos, hasta 1988 se habían descrito tres tipos de moléculas distintas, definidas por anticuerpos monoclonales, las cuales son diferentes a la clases I y II del CMH (30). Sin embargo cabe mencionar que la expresión de antígenos clase II en células epiteliales puede inducirse en cultivos con gamma interferón y otras citocinas (31, 32, 33).

Recientemente se demostró, a través de inmunofluorescencia en cortes de piel, que sueros de los receptores contenían anticuerpos anti-endotelio vascular, que se unieron fuertemente a células epidérmicas; la correlación que se determinó fue altamente significativa, entre la presencia se anticuerpos contra la epidermis y el rechazo temprano tanto de transplantes primarios como de retransplantes (34). Estudios por citometría de flujo demostraron que estos antígenos son hallados en la superficie de la epidermis y células endoteliales, y modulados por gamma interferón. Cuando se probaron contra un panel de pieles donadas, los aloanticuerpos dieron patrones positivos diferentes y reacciones negativas, lo que sugiere nuevamente la presencia de polimorfismo (35).

Por otra parte, las absorciones con plaquetas de los sueros con reacción en piel positiva no removieron los anticuerpos responsables de la fluorescencia. Esto llevó a pensar que no se trataban de anticuerpos dirigidos hacia HLA A,B,C. También se puede descartar la clase II pues, con excepción de las células de Langerhans, estos antígenos no se encuentran expresados en ninguna otra línea celular de la epidermis (36). La observación inicial de que muchos de los sueros de receptores trasplantados contenían anticuerpos que se unían a células epidérmicas, queratinocitos, fue primero realizada con sueros citotóxicos específicos para endotelio vascular. Posteriormente se encontraron sueros

reactivos a queratinocitos, absorbidos con plaquetas, que tenían afinidad a células endoteliales (36). En síntesis, la relación con el proceso de rechazo y la presencia de anticuerpos contra antígenos epidérmicos fue altamente significativa, lo que indica asociación aparente al rechazo de órganos con HLA idéntico (37).

1.6. GENERALIDADES DE LA PIEL

La piel es el órgano de mayor tamaño del cuerpo, posee dos capas de origen diferente que están unidas firmemente. La más externa es el epitelio queratinizado, plano estratificado sin vascularización y que deriva del ectodermo, llamada epidermis, la segunda y más profunda es la dermis, formada por tejido conectivo de disposición irregular, de origen mesenquimatoso y que posee vasos sanguíneos. Entre la dermis y la epidermis existe una membrana basal perfectamente desarrollada, de espesor variable según la zona corpórea (38).

En la dermis hay cuatro tipos de células, variando su proporción según la especie y el sitio del cuerpo (39). En el ratón existen en promedio el 85% de queratinocitos provenientes del ectodermo, siendo la línea celular más abundante también para el humano; le siguen en número los melanocitos, células productoras de melanina. Según Montagna conforman el 10 al 25% de las células de la capa basal humana. Las otras dos líneas son las más escasas y corresponden a las células de Langerhans y las células de Merkel, éstas últimas corresponden a los receptores sensitivos.

En el estudio epidérmico hay que advertir que la queratina constituyente de la capa más externa, no es una secreción celular, sino el resultado final de la transformación de las células epiteliales en material escamoso. Por lo tanto cuando las escamas de queratina se desprenden de la superficie pueden ser sustituidas únicamente por células vivas subyacentes que se queratinizan y ello significa que se necesita el mismo grado de multiplicación celular en la capa profunda de la epidermis que compense la pérdida de las células queratinizadas, por tal razón ocurren diversos procesos en la epidermis:

- a) división celular en la capa profunda;
- b) desplazamiento de las células hacia la superficie;
- c) las células más alejadas de la dermis se transforman en células queratinizadas; y
- d) la queratina se descama de la superficie.

El hecho de que se observen estos procesos refleja que la epidermis está compuesta de diferentes capas o planos (Fig 1.6.1).

1) **Estrato germinativo.** Es la capa más profunda que se apoya en la membrana basal y es generadora de nuevas células que contienen ribosomas libres y polirribosomas, que se ocupan de la síntesis, el crecimiento y la formación de filamentos intermedios que finalmente se transformarán en partes de queratina. Cuando las células pasan a las capas superiores los haces de filamento se han ensanchado y representan las llamadas tonofibrillas, características de la siguiente capa.

2) **Estrato espinoso.** Las células de esta capa no son cilíndricas como las de la basal, sino poliédricas. Sus bordes están separados entre sí por prolongaciones "espinosas" citoplásmicas que al salir de la célula las vecinas se aproximan y quedan en íntimo y firme contacto por medio de un desmosoma. La mayor parte de estas prolongaciones contienen una importante cantidad de filamentos o tonofibrillas que siempre están contenidas en citoplasma.

3) **Estrato granuloso.** Esta capa en la piel gruesa tiene un espesor de 2 a 4 células y está situada en la superficie del estrato espinoso; en la piel delgada puede formar una capa continua y neta o también se pueden presentar numerosas células con gránulos de queratohialina dispersas en lugar de dicho estrato. Las células son romboides y los gránulos dispuestos en el citoplasma captan intensamente la hematoxilina.

4) **Estrato lúcido.** Esta capa no existe en pieles delgadas, ni se observa nitidamente en la gruesa; consiste en una sustancia llamada eleidina, un producto de transformación de la queratohialina.

5) **Estrato córneo.** A medida que las células son desplazadas hacia la superficie, en esta última capa. Los núcleos y organelos citoplásmicos al parecer desaparecen. Incluso los gránulos de queratohialina desaparecen. Así, cada célula se transforma en una de las escamas de queratina que constituyen la capa del estrato córneo. Ahora bien, no toda la célula se transforma en queratina, porque persisten proteínas diferentes y otros materiales que son reutilizados (38, 39).

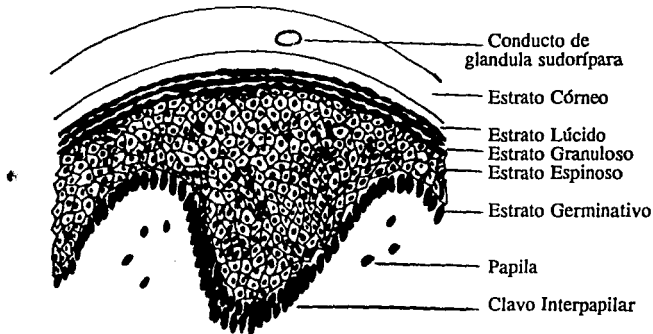


Fig 1.6.1. Esquema de un corte de piel que ilustra las diversas capas de la epidermis.

La dermis está constituida por dos capas de tejidos conectivos fusionados íntimamente: una capa papilar compuesta de tejido conectivo laxo, denominada así porque las papilas que constituyen el tejido conectivo que se extienden en el interior de la epidermis comprenden la mayor parte de ella. La otra capa es la denominada reticular más gruesa que la anterior y que consiste en tejido conectivo denso de disposición irregular. Hay que hacer notar que en ambas capas existen grupos de capilares, uno de los cuales se extiende en asas hasta los llamados bordes o papilas, llevan nutrientes a la epidermis y actúan como elementos termorreguladores. Otro grupo de capilares forman un lecho plano por debajo de las bases de las papilas; los capilares son escasos en la capa reticular. Por su parte en las células de la dermis de piel gruesa en su mayoría fibroblastos, también aparecen macrófagos, células adiposas solas o formando acúmulos (38).

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evidenciar la presencia de anticuerpos séricos en pacientes politransfundidos, dirigidos contra antígenos no HLA.

OBJETIVOS PARTICULARES

Montar un método útil, a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, que permita evidenciar anticuerpos dirigidos contra antígenos no-HLA en piel.

Proporcionar una herramienta que permita predecir con mayor seguridad un rechazo al injerto.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. PURIFICACION DE LINFOCITOS

Los linfocitos son células mononucleares que pueden ser separadas de los demás componentes sanguíneos a través de técnicas que utilizan gradiente de densidad como es el percol y el Ficoll-Hypaque.

El Ficoll-Hypaque es una mezcla preparada con Ficoll 400 e Hypaque con densidad entre 1.076 y 1.078 la cual separa las células mononucleares manteniendolas suspendidas entre la interfase de Ficoll-Hypaque y plasma con un botón de glóbulos rojos y otras células sanguíneas al fondo (1).

PROCEDIMIENTO

Obtener 20 ml. de sangre periférica por punción venosa y colocarla en un tubo estéril con tapón de rosca y perlas de vidrio, agitar suavemente por inversión hasta desfibrinar mecánicamente. Diluir 1:2 con PBS (pH 7.2) y estratificar cada 10 ml. de esta dilución sobre 2.5 ml. de Ficoll-Hypaque, centrifugar a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos. Separar la capa celular entre el Ficoll-Hypaque y el plasma. Lavar 3 veces con PBS (pH 7.2) centrifugando cada vez a 1200 rpm por 10 minutos, contar y comprobar viabilidad. Ajustar a una suspensión de 4×10^5 cel/ml.

PANEL DE LINFOCITOS PURIFICADOS

Los linfocitos purificados fueron de 22 individuos previamente tipificados su HLA-A,B, representando el 90 % de las especificidades más frecuentes en la población mestiza mexicana (Apéndice I). Las especificidades se enuncian en la Tabla I:

TABLA I

INDIVIDUO	ESPECIFICIDAD	INDIVIDUO	ESPECIFICIDAD
1	A3 A19 B3 B17	12	A23 A19 B13 BX
2	A1 A2 B14 B35	13	A26 A28 B12B14
3	A9 A30 B12 B39	14	A2 A3 B5 B21
4	A2 A9 B51 BX	15	A1 A10 B44 BX
5	A2 A23 B7 B40	16	A9 AX BX BX
6	A2 A26 B51 BX	17	A3 A11 B7 BX
7	A2 A9 B51 B12	18	A2 A3 B17 BX
8	A24 A53 B49 B61	19	A2 A10 B8 B14
9	A2 A19 B44 BX	20	A1 A9 B8 B48
10	A1 A3 B8 B15	21	A2 A11 B35 B40
11	A9 A10 B12 B14	22	A23 A26 B44 BX

3.2. PRUEBA DE VIABILIDAD

Debido a que las pruebas de histocompatibilidad requieren de linfocitos vivos, es necesario vigilar su viabilidad determinándola por exclusión de un colorante vital como el Azul Tripan. El porcentaje de viabilidad que se considera adecuado debe ser superior al 90% (2).

PROCEDIMIENTO

Mezclar 100 µl de la suspensión de linfocitos con 100 µl de Azul Tripan. Incubar 2 minutos a temperatura ambiente y contar en cámara de Neubauer con la ayuda de un microscopio. Las células muertas incorporan el colorante y se tiñen de azul mientras que las vivas se observan refringentes y de menor tamaño. Contar 100 células o más y calcular el porcentaje de viabilidad.

3.3. MICROCITOTOXICIDAD

La prueba de microcitotoxicidad, también llamada linfocitotoxicidad, fue descrita por Gorer y O'Gorman en 1956 y modificada por Terasaki y McClelland en 1964 (41), ésta modificación, que es la que hasta ahora se usa, consiste básicamente en incubar una suspensión de linfocitos con diferentes antisueros, si éstos contienen anticuerpos (Ac) contra algún antígeno (Ag) HLA de los mononucleares, se llevará a cabo una reacción Ag-Ac. Si posteriormente se adiciona suero de conejo como fuente de complemento (C'), éste será fijado y activado por el complejo antígeno-anticuerpo formado, provocando lisis parcial celular (2,8). La alteración en la permeabilidad de membrana se visualiza mediante el empleo de colorantes vitales como la eosina o el azul tripan, los cuales penetran a través de las células que han sido dañadas, mientras que las vivas lo excluyen (Fig 3.3.1).

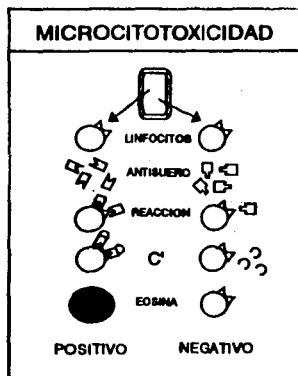


Fig 3.3.1. Representación esquemática de la prueba de Microcitotoxicidad, modificación Terasaki.

PREPARACION DE PLACAS

En placas Terasaki comerciales, colocar 50 μ l de aceite mineral a cada pozo. Después agregar 1 μ l de antisero a cada pozo, así como los controles negativo y positivo. Congelar a -70 °C hasta su uso.

CONTROLES: Como control positivo se utilizó una mezcla de sueros linfocitotóxicos, previamente probados en el laboratorio. El control negativo fueron sueros de individuos AB positivos y con antecedentes negativos de transfusiones, trasplantes o embarazos.

SUEROS PROBADOS: Los sueros probados fueron en su totalidad 262 extraídos de pacientes politransfundidos incluidos en el Registro Nacional de Transplantes.

PROCEDIMIENTO

Descongelar las placas Terasaki preparadas de la manera antes señalada y dejar que tomen temperatura ambiente. Con ayuda de una multipipeta Hamilton colocar 1 μ l de la suspensión celular obtenida en el método 3.1. Agitar con un Vórtex e incubar a temperatura ambiente 30 minutos. Agregar 5 μ l de suero de conejo como fuente de complemento y nuevamente mezclar perfectamente. Incubar a temperatura ambiente 1 hora y teñir con 5 μ l de eosina amarillenta al 5% incubando 5 minutos. Adicionar 5 μ l de Formalina neutralizada al 40% . Montar y evaluar las reacciones con la ayuda de un microscopio invertido con base al siguiente criterio (40):

% DE CELULAS MUERTAS	CALIFICACION	INTERPRETACION
0--10	1	NEGATIVO
11--20	2	NEGATIVO
21--40	4	DUDOSO
41--80	6	POSITIVO
81--100	8	POSITIVO

3.4. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Esta técnica permite la identificación de anticuerpos en sueros no marcados, eliminando la necesidad de purificar y conjugar de manera individual cada muestra de suero. El método es la adaptación de la reacción antiglobulínica (prueba de Coombs) o de la técnica del doble anticuerpo, originalmente descrita por Weller y Coons, la Inmunofluorescencia Indirecta detecta anticuerpos circulantes con alto valor de discriminación. Los métodos para la identificación de anticuerpos por inmunofluorescencia incluyen: 1) el método antiglobulina, 2) la inhibición de la reacción antígeno-anticuerpo marcado por anticuerpo en el suero de prueba y 3) el método anticomplemento (42,43,44). El método de inmunofluorescencia indirecta se ilustra en la figura 3.4.1.

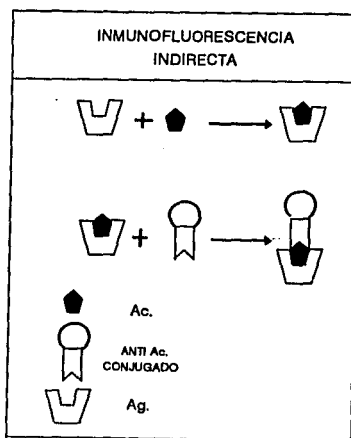


Fig 3.4.1. Esquema del método indirecto de Inmunofluorescencia.

MANEJO DE BIOPSIAS

Una vez obtenidas las biopsias de piel humana, se colocan en solución salina fisiológica para su traslado. En una canastilla de papel aluminio se coloca la biopsia y se cubre con Tissue-tek (MILES) congelando instantáneamente en nitrógeno líquido por 30 minutos, conservar a -70°C hasta su uso (46).

PREPARACION DE CORTES HISTOLOGICOS

Las biopsias se descongelan dejando que alcancen temperatura ambiente, se colocan en la plancha de corte previamente enfriada a -30°C y se embebe en Tissue-tek congelando perfectamente. Realizar los cortes regulando el espesor del corte a 3 micras aproximadamente. La secciones se recuperan en portaobjetos desengrasados. Dejar secar al aire y conservar a -70°C . Los cortes así conservados pueden ser utilizados durante los siguientes 2 meses (46,47).

PROCEDIMIENTO

Descongelar los cortes 20 minutos antes de utilizarlos en una cámara húmeda y a temperatura ambiente. Sobre los cortes colocar los sueros seleccionados y controles en una dilución 1:10. Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos en cámara húmeda. Lavar perfectamente con PBS pH 7.2, eliminar el exceso de amortiguador del corte y cubrirlo con antigamma humano conjugado con FICT (Kirkegaard and Perry Inc) previamente titulado a una dilución 1:60. Incubar a temperatura ambiente 30 minutos, en cámara húmeda y oscuridad. Lavar profusamente con PBS pH 7.2 para eliminar por completo el conjugado que no reaccionó. Colocar una gota de solución de contraste (Azul de Evans al 0.01 % en PBS pH 7.2) e incubar 5 minutos. Lavar con PBS pH 7.2 y eliminar la humedad excedente. Entre el cubreobjetos y la preparación adicionar una gota de la solución de montaje y conservar a 4°C hasta su lectura en un microscopio de epifluorescencia con un filtro adecuado.

Una reacción positiva se observa cuando existe fluorescencia en el citoplasma de los queratinocitos, mientras que la negativa carece de fluorescencia en esta región.

Como control positivo se utilizó una mezcla de sueros reactivos que fue gentilmente donada por el Dr. Peter Statsny. El control negativo fueron sueros de individuos sanos de grupo sanguíneo AB positivos y con antecedentes negativos de transfusiones, transplantes o embarazos.

Los sueros probados se seleccionaron de acuerdo a la reacción de linfocitotoxicidad mostrada ante el panel de linfocitos. Aquellos que resultaron citotóxicos al menos a uno de los 22 individuos donantes de linfocitos, se eliminaron y únicamente se probaron los negativos.

Para globalizar el procedimiento general, se realizó el siguiente esquema de trabajo:

ESQUEMA DE TRABAJO

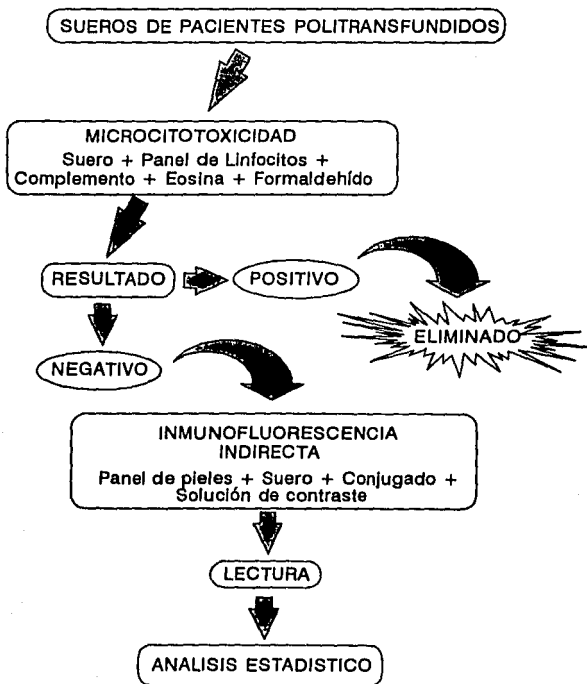


Diagrama de flujo que esquematiza el procedimiento general de este trabajo.

3.5. MATERIAL Y EQUIPO

- Jeringas desechables.
- Tubos de vidrio con rosca y perlas de vidrio estériles.
- Placas de Terasaki (Nunc).
- Pipetas semiautomáticas de 10 y 100 μ l (Labsystems).
- Cámara húmeda protegida de la luz.
- Hemocitómetro Neubauer (Bight Line).
- Pipetas Pasteur.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Tubos de ensaye.
- Vasos de precipitado.
- Pipetas serológicas de 5 y 10 ml.
- Papel de aluminio.
- Gasas y papel higiénico.
- Gradillas.
- Cronómetro.
- Centrifuga refrigerada (Beckman).
- Microscopio de luz visible (Carl-Zeiss).
- Microscopio de fluorescencia (Carl-Zeiss).
- Microscopio invertido (American Optical)
- Criostato modelo Jung CM 18 DO (Leica).
- Multipipeta Hamilton (A.H. Robins).
- Refrigerador a 4 °C (American).
- Congelador a - 20 °C (American).
- Ultracongelador a - 70 °C (Revco).
- Tanque de Nitrógeno Líquido (Nunc).
- Agitador magnético Vórtex (Termo Line).

4. ANALISIS ESTADISTICO

4.1. PRUEBA KRUSKAL-WALLIS

La prueba estadística no-paramétrica de Kruskal Wallis (48,49), es un análisis de varianza con un sólo criterio de clasificación por rangos. Se utiliza para decidir si K grupos o muestras independientes son de poblaciones diferentes o se comportan de una forma similar. La técnica de Kruskal-Wallis examina la hipótesis de nulidad que supone que los K grupos proceden de la misma población o de poblaciones idénticas con respecto al promedio.

Al calcular la prueba de Kruskal-Wallis, cada una de las N observaciones se reemplaza por rangos. El puntaje más pequeño es reemplazado por 1, el siguiente tamaño por el rango 2 y así sucesivamente. Una vez hecho esto se suman los rangos de cada columna o grupo.

Puede demostrarse si K grupos proceden de la misma población, es decir si H_0 es verdadera, o dicho de otra manera si no existe diferencia entre grupos. H está distribuida como Chi cuadrada con $g-1 = K-1$.

Esto es,

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^K \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)$$

donde

- K= Número de grupos
- n_j = No. de casos en grupo de orden j
- N= El No. de casos de todos los grupos combinados
- R_j = Suma de rangos en el grupo de orden j
- $\sum_{j=1}^K$ = Sumar los K grupos (columnas)

Ahora bien cuando hay ligas, es decir, cuando un puntaje se repite 2 o más veces, a cada uno se le dá la media de los rangos con los que está ligado. Ya que el valor de H es influido en cierto grado por las ligas es deseable corregir al calcular H. Para corregir el efecto de las ligas, H es calculada y dividida por

$$1 - \frac{\sum T}{N^3 - N}$$

Donde $T = t^3 - t$ (cuando t es el número de observaciones ligadas).

N= Número de observaciones en las K muestras juntas esto es, $N = \sum n_j$.

$\sum T$ = Indica sumar todos los grupos de ligas.

Para determinar si la diferencia entre grupos es debida al azar o significativa, se fija el nivel de significancia, generalmente igual a 0.05 y se busca el valor de p en la tabla adecuada (Apendice II); si H corresponde a una p menor al nivel de significancia, entonces se concluye que no existe diferencia entre grupos, o que ésta es debida al azar.

4.2. TABLA DE CONTINGENCIA 2 X 2

La información principal necesaria para la determinación de la especificidad de un suero, proviene de la comparación de su patrón de reacciones positivas y negativas contra un determinado grupo de individuos no emparentados y el de otro suero. Esto se hace analizando las reacciones de cada par de antisueros mediante un cuadro 2 X 2, llamado también tabla de contingencia de 2 X 2 (2,48,49,50).

En el cuadro 2 X 2, n es el número total de individuos probados con ambos sueros; M1 y M2 son el número de individuos que reaccionaron positiva o negativamente, respectivamente, con el suero I; M3 y M4 son los mismos números pero para el suero II; el número de individuos que no reaccionaron con ninguno de los dos sueros es d, a el número de los que reaccionaron con ambos, b los que reaccionaron con I pero no con II, y c el de los que reaccionaron con II pero no con I. La similitud o disparidad de los patrones de reacción de ambos sueros se llama asociación (Fig 4.2.1).

		Suero II		
		Pos	Neg	
Suero I	Pos	a	b	M1
	Neg	c	d	M2
		M3	M4	n

Fig. 4.2.1. Comparación estadística entre reacciones con dos sueros: Tabla de contingencia 2 X 2 *.

Los dos cuestionamientos importantes de cualquier asociación observada son :

- 1.- ¿ Se debe al azar o es significativa ?
- 2.- ¿Cuál es el grado de asociación ?

La primera pregunta se contesta mediante el valor estadístico X^2 obtenido a partir del cuadro o tabla de contingencia 2 X 2, según la siguiente fórmula (48):

$$X^2 = \frac{(ad-bc)^2 n}{M1 M2 M3 M4}$$

El valor de X^2 tiene un grado de libertad, por lo tanto valores de 3.84 o mayores tienen una p menor o igual a 0.05 (Apendice II). P nos dá la probabilidad que la asociación sea debida al azar. Esto es, mientras menor sea p, mayor es la significancia de la asociación observada y mayor es X^2 .

La segunda cuestión se resuelve por medio del coeficiente de correlación (r). Su valor a partir de X^2 se calcula de la siguiente manera:

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

donde

n= número total de individuos

El valor de "r" va de -1 a +1. Un $r = 1$ significa concordancia total de reacciones entre los dos sueros, mientras $r = -1$ significa discordancia total entre ellos $r = 0$ significa no asociación.

Así a partir de los valores de "r", se puede buscar grupos de sueros que mutuamente tienen alta correlación. Estos sueros tendrán pues, anticuerpos de especificidades iguales o muy parecidas.

Es importante tomar en consideración la diferencia entre asociaciones de antígenos y asociaciones de antisueros. En el caso de que dos sueros no sean monoespecíficos, pero compartan algún anticuerpo, las reacciones pueden dar asociación positiva, aunque los antígenos contra los que reaccionan no la den. Lo mismo puede suceder si algún antisuero contiene un anticuerpo que dé una reacción cruzada con un antígeno detectado por medio del segundo suero (2).

5. RESULTADOS

Los 262 sueros de pacientes politransfundidos de Registro Nacional de Transplante que fueron ensayados contra linfocitos de 22 individuos sanos, arrojaron un total de 5764 pruebas de linfocitotoxicidad; de estos ensayos se obtuvieron 35 (13%) muestras que resultaron claramente negativas a la prueba contra las células del panel y por lo tanto seleccionados para el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en piel (Fig 5.1).

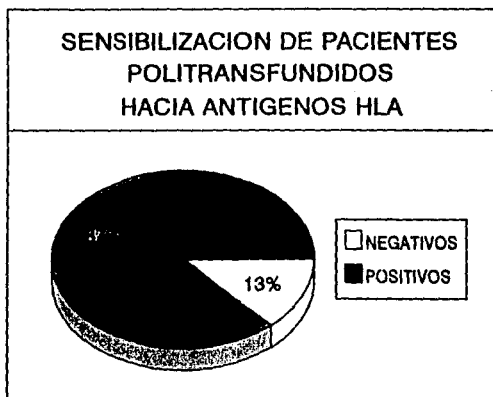


Fig 5.1.- Gráfico que muestra el grado de sensibilización hacia antígenos HLA.

El ensayo de IFI se realizó en cortes de piel congelados de aproximadamente 3 u, lo suficientemente delgados para poder distinguir las células de la epidermis (Fig 5.2).



Fig 5.2.- Aspecto de un corte histológico de piel con tinción Hematoxilina-Eosina.

Para revelar los anticuerpos contra queratinocitos se utilizó un anticuerpo policlonal anti-gamaglobulina humana conjugado con FICT (Kirkegaard and Perry laboratories) el cual, después de probar varias diluciones se eligió aquella que permitía ver claramente una fluorescencia citoplásmica en queratinocitos sin inespecificidad que pudiera inducir a error, es decir de 1:60.

Para considerar una muestra positiva, se tomo como referencia la fluorescencia encontrada con el control positivo gentilmente donado por el Dr. Peter Stansny. (Fig 5.3 y 5.4).



Fig 5.3.- En este corte la inmunofluorescencia permite revelar la presencia de anticuerpos contra citoplasma de queratinocitos en piel humana.



Fig 5.4.- Imagen en la que se puede observar la ausencia de anticuerpos contra células epidérmicas.

Al observar al microscopio los primeros ensayos, en dos de las 35 muestras seleccionadas se descubrió la presencia de anticuerpos antinucleares, por lo que se excluyeron de las pruebas posteriores (Fig 5.5).



Fig 5.5.- Corte histológico de piel que presenta tinción nuclear en células epidérmicas.

El resto de los sueros (33) se probaron en 20 pieles de individuos diferentes, dando un total de 660 ensayos de los cuales 108 (16.4 %) resultaron positivos (Tabla II).

TABLA II

No. Muestra	Clave	No. Trans.	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	No.+	
1	TL4	+20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0	
2	TL6	+20	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	4
3	TL10	+20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
4	TL12	+20	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	4
5	TL15	+20	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N	4
6	TL16	+20	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	4
7	TL17	+20	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	3
8	TL18	+20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
9	TL20	+20	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	P	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	7
10	TL22	+20	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	2
11	TL27	+20	P	N	N	P	N	N	N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	5
12	TL31	+20	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	4
13	TL40	5-10	P	N	N	N	P	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	7
14	TL43	5-10	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	3
15	TL46	+20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	2
16	TL57	5-10	P	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	3
17	TL58	11-20	N	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	5
18	TL83	5-10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	3
19	TL85	11-20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	3
20	TL99	+20	N	P	N	N	P	N	P	P	N	N	P	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	7
21	TL100	11-20	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	2
22	TL110	5-10	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	4
23	TL113	+20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1
24	TL114	11-20	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	2
25	TL140	+20	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	3
26	TL143	11-20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	2
27	TL152	11-20	P	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	5
28	TL195	+20	P	P	N	P	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	8
29	TL199	5-10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
30	TL201	11-20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
31	TL205	11-20	P	N	N	N	N	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	5
32	TL224	11-20	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	2
33	TL238	11-20	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	4
No. de positivos			12	4	5	5	5	4	3	5	4	4	16	3	17	2	0	4	4	0	5	6		

P = POSITIVO; N = NEGATIVO.

También se observó que 28 de los 33 sueros (84.8 %) fueron positivos al menos a una determinación, el resto (5) fueron negativos a todos los ensayos (Fig 5.6).

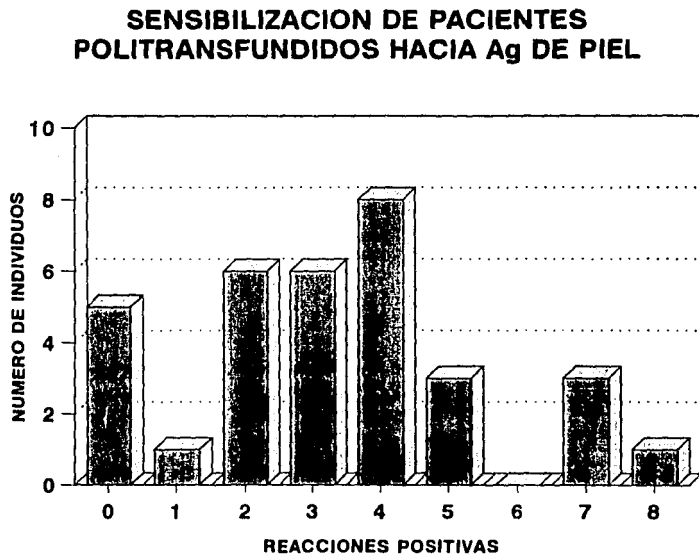


Fig 5.6.- Gráfico que muestra el grado de sensibilización de pacientes politransfundidos hacia antígenos epidérmicos.

La clasificación de los sueros en 3 grupos, según el número de transfusiones demostró que difirieron entre sí en cuanto número de muestras (Fig 5.7), pero su comportamiento fue homogéneo al comparar su sensibilización hacia antígenos de la epidermis (Fig 5.8).

**PORCENTAJE SENSIBILIZACION
VERSUS
No. DE TRANSFUSIONES**

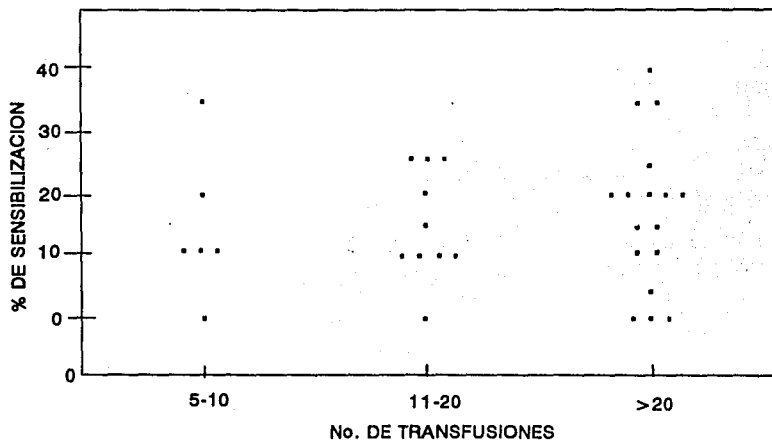


Fig 5.7.- Gráfico que muestra el porcentaje de sensibilización de cada uno de los sueros seleccionados agrupados según el número de transfusiones.

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO EN EPIDERMIS

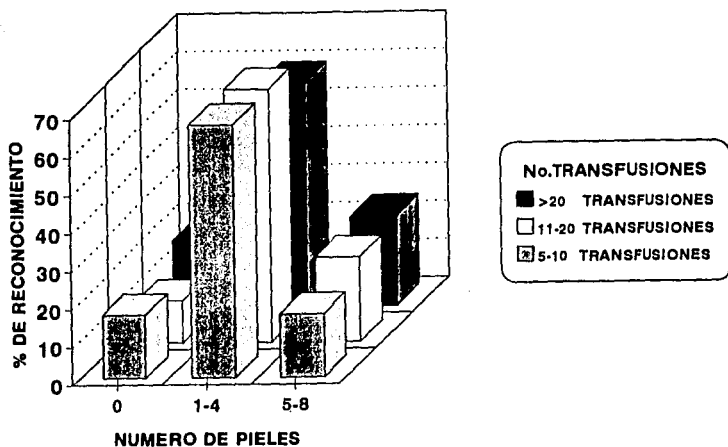


Fig 5.8.- En este gráfico se observa que la sensibilización hacia antígenos epidérmicos se comporta de manera similar en los tres grupos formados a partir del número de transfusiones.

Al graficar los porcentajes de reconocimiento, en una observación inmediata, se encontró que no había discordancia entre grupos (Fig 5.9), esto se comprobó con la técnica estadística de Kruskal-Wallis fijando una $p < 0.05$ con dos grados de libertad, mediante la cual se obtuvo $0.95 > p > 0.9$.

Ya que p fue mayor que el nivel de significancia fijado, se aceptó H_0 concluyendo que no hay diferencia en el comportamiento de los grupos con respecto a la media; así mismo se realizó una tabla de contingencia con dos grados de libertad y un nivel de significancia igual a 0.05 tomando los datos de cada columna (biopsia) según el número de transfusiones (tabla III).

TABLA III

RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO POR COLUMNA Y SU SIGNIFICANCIA RESPECTO AL NUMERO DE TRANSFUSIONES

COLUMNA	% NEGATIVOS	% POSITIVOS	X ²	SIGNIFICANCIA
B1	63.63	36.36	0.67493	0.7136
B2	87.90	12.10	1.41237	0.4935
B3	84.80	15.20	2.20601	0.3319
B4	84.80	15.20	2.20601	0.3319
B5	84.80	15.20	3.41092	0.1817
B6	87.90	12.10	1.32033	0.5168
B7	90.90	9.10	0.63843	0.7267
B8	84.80	15.20	0.29950	0.8609
B9	87.90	12.10	1.32033	0.5168
B10	87.90	12.10	1.41237	0.4935
B11	54.50	45.50	2.54438	0.2802
B12	90.90	9.10	1.56373	0.4576
B13	51.50	48.50	0.02855	0.9858
B14	93.90	6.10	2.00380	0.3672
B15	100.00	0.00	No det.	No det.
B16	87.90	12.10	5.46207	0.0652
B17	87.90	12.10	1.35715	0.5073
B18	100.00	0.00	No det.	No det.
B19	84.80	15.20	3.41092	0.1817
B20	81.80	18.20	0.03475	0.9828

RELACION NUMERO DE TRANSFUSIONES VS PORCENTAJE DE RECONOCIMIENTO

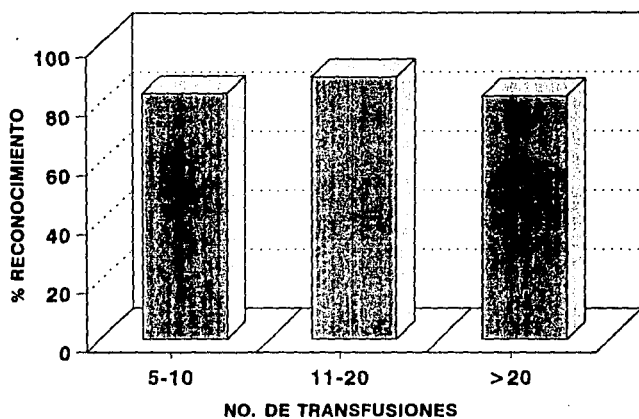


Fig 5.9.- Gráfico que muestra el porcentaje de sueros que reconocieron al menos un antígeno epidérmico versus No. de transfusiones.

El estudio de la relación entre los sueros estudiados se realizó a través de una tabla de contingencia de 2 X 2 con una p menor o igual a 0.05 y un grado de libertad. En total se calcularon 528 asociaciones, de los cuales se obtuvieron 64 con Chi-cuadrada mayores de 3.84 y coeficientes de relación (r) superiores o iguales a 0.4, lo que determinó similitudes arriba del 40 %, entre algunos sueros (tabla IV).

TABLA IV

ASOCIACIONES ENTRE SUEROS, REALIZADAS MEDIANTE UNA
 TABLA DE CONTINGENCIA DE 2 X 2
 Y EL CALCULO DE COEFICIENTES DE CORRELACION

SUERO 1	vs	SUERO 2	X ²	"r"
TL4		TL43	4.80	0.489
TL4		TL46	8.88	0.666
TL4		TL58	6.66	0.577
TL4		TL110	9.45	0.687
TL4		TL113	4.21	0.458
TL4		TL140	4.80	0.489
TL4		TL143	8.88	0.666
TL12		TL17	4.80	0.489
TL15		TL17	4.80	0.489
TL15		TL22	8.88	0.666
TL15		TL43	4.80	0.489
TL15		TL46	8.88	0.666
TL15		TL113	4.21	0.458
TL15		TL143	8.88	0.666
TL16		TL57	4.80	0.489
TL16		TL100	8.88	0.666
TL16		TL110	9.45	0.687
TL16		TL113	4.21	0.458
TL16		TL140	4.80	0.489
TL16		TL205	6.66	0.577
TL20		TL27	5.93	0.545
TL20		TL46	4.12	0.453
TL20		TL100	4.12	0.453
TL20		TL143	4.12	0.453
TL20		TL195	4.43	0.471
TL22		TL46	3.95	0.444
TL22		TL100	3.95	0.444
TL22		TL113	9.47	0.688
TL22		TL143	3.95	0.444
TL27		TL100	6.66	0.577
TL31		TL43	14.11	0.839
TL31		TL46	8.88	0.666
TL31		TL113	4.21	0.458
TL31		TL143	8.88	0.666
TL40		TL100	4.12	0.453

Cont...

TL43	TL46	12.59	0.793
TL43	TL99	6.66	0.577
TL43	TL110	4.80	0.489
TL43	TL113	5.96	0.545
TL43	TL143	12.59	0.793
TL46	TL99	4.12	0.453
TL46	TL100	3.93	0.444
TL46	TL110	8.88	0.666
TL46	TL113	9.47	0.688
TL46	TL143	20.00	1.000
TL46	TL205	6.66	0.577
TL83	TL85	7.38	0.607
TL99	TL143	4.12	0.453
TL100	TL110	8.88	0.666
TL100	TL113	9.47	0.688
TL100	TL143	3.95	0.444
TL100	TL205	6.66	0.577
TL110	TL113	4.21	0.458
TL110	TL140	14.11	0.839
TL110	TL143	8.88	0.666
TL110	TL152	6.66	0.577
TL110	TL205	6.66	0.577
TL113	TL143	9.47	0.688
TL114	TL224	3.95	0.444
TL140	TL152	10.58	0.727
TL143	TL205	6.66	0.577
TL152	TL195	4.44	0.471
TL195	TL238	7.50	0.612

6. DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados demostraron la existencia de anticuerpos contra antígenos no-HLA que pudieran estar relacionados con la histocompatibilidad, en sueros de pacientes politransfundidos. Identificados a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando como célula blanco los queratinocitos de la epidermis en cortes congelados de piel de individuos sanos. Esta técnica ofrece ventajas con respecto a otras como la citometría de flujo con células epidérmicas tripsinizadas, monocitos o CEV, ya que no en todos los centros existe la infraestructura de equipo de alta tecnología o el personal capacitado, y los recursos económicos suficientes. La estandarización de esta técnica, se ofrece como una herramienta para determinar la existencia de dichos anticuerpos en pacientes que estén esperando un trasplante, mejorando su manejo.

Un trasplante 100 % seguro no se ha logrado ni en los mejores centros de atención a la salud y con el empleo de ésta prueba tal vez tampoco sea suficiente pues existen antígenos como los órgano-específicos que favorecen la aparición de otros anticuerpos involucrados en el rechazo (51).

Los anticuerpos anti CEV, que poseen reacción cruzada con queratinocitos en piel se describieron en sueros de pacientes que habían rechazado algún órgano (34), pero no en otro tipo de presensibilización como la politransfusión, la cual es un factor de riesgo para el paciente que va a recibir el injerto, por el posible desarrollo de anticuerpos anti-HLA del donador, no obstante el efecto benéfico descrito por Opelz y col.(7), esta sensibilización aumenta proporcionalmente con el número de transfusiones, comportamiento esperado también con otros antígenos menores de histocompatibilidad. Partiendo de esta hipótesis, los sueros seleccionados se clasificaron en tres grupos según el número de transfusiones (Fig 5.7); la observación inicial (Fig 5.8) no fue la esperada, y se procedió a realizar el análisis estadístico de todos los grupos en su conjunto y columna por columna, proponiendo la hipótesis de nulidad como: "Existe independencia entre los criterios de clasificación" o dicho de otra forma " No existe asociación entre las variables de estudio".

En el primer caso, para el análisis global, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, de la cual se obtuvo una p mayor al nivel de significancia fijado (0.05) por lo que la hipótesis nula no se rechazó, concluyéndose que no existe relación entre el número de transfusiones y la positividad o negatividad encontrada; dicho en otras palabras, el número de transfusiones es independiente a la presencia de reacciones positivas o negativas en queratinocitos.

El análisis por columnas, representando a la biopsia probada, fue llevado a cabo para ratificar lo encontrado con la prueba Kruskal-Wallis y contar con la certeza de que ningún grupo de resultados se comportaba de manera contraria a este análisis. Las tablas de contingencia de cada columna fueron comparadas al mismo nivel de significancia, con los mismos grados de libertad, obteniendo una " p " mayor de 0.05 en todos los casos (Tabla III). Estos resultados indicaron la no asociación negativa ni positiva de cada columna con respecto al número de transfusiones, confirmando lo ya observado globalmente.

La no asociación, negativa o positiva, del número de transfusiones y la presencia de anticuerpos anti-queratinocitos, indujo a pensar que es factible se trate de anticuerpos cuyo origen radique, como en el caso de los grupos sanguíneos, en algún cruce antigénico durante etapas tempranas de la vida; debido a esto se incorporó un grupo de sueros de sujetos normales, no reportados por no ser de un número suficiente para un tratamiento estadístico, de los cuales algunos presentaron anticuerpos con afinidad hacia estos antígenos epidérmicos, con lo que podría pensarse que tal hipótesis es correcta. Sin embargo, debería ser corroborado con más pruebas en individuos "normales" y con técnicas de mayor sensibilidad como la citometría de flujo.

La especificidad de un suero con respecto a anticuerpos anti-HLA proviene de la comparación de su patrón de reacciones positivas y negativas contra un determinado grupo de individuos no emparentados (2). Esto se realiza analizando las reacciones de cada par de antisueros mediante un cuadro de 2×2 (48) -descrito en el apartado correspondiente- para obtener la correlación y especificidad del suero problema. En el caso de los HLA esto es relativamente sencillo pues se conocen los antígenos, y se cuenta con controles y antisueros específicos.

Para un complejo antigénico sin estas características, el análisis se hace más complicado y los únicos datos que se pueden captar del análisis es si existen diferentes patrones de positividad o negatividad que se repitan entre los sueros estudiados; es decir, si la asociación observada es debida al azar y cual es el grado de similitud entre las muestras.

En la tabla IV se presenta un listado de las asociaciones significativas entre los sueros probados, señalando que existen patrones de positividad y negatividad que se repiten, no únicamente en pares de sueros sino en un número mayor, lo cual indica polimorfismo. Esto es consistente con lo reportado en estudios previos (28,29,35).

Para determinar el número de patrones y predecir el de antígenos en este sistema, evaluar su impacto en la sobrevida de los trasplantes de diferentes órganos, ubicarlo en el complejo principal o secundario de histocompatibilidad, conocer su estructura, localizar en que cromosoma está codificada su información y conocer más su función, se necesitarían sueros monoespecíficos, un tratamiento de datos más complejo, un número mayor de muestras incluyendo individuos sanos y el empleo de técnicas más sensibles, como la de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De esta manera el presente trabajo puede servir de referencia para investigaciones posteriores en este campo.

7. CONCLUSIONES

Existen anticuerpos contra antígenos no-HLA en queratinocitos de piel humana relacionados con la histocompatibilidad en sueros de pacientes politransfundidos.

Los anticuerpos contra antígenos epidérmicos fueron evidenciados a través de técnicas sencillas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI).

La técnica de IFI apoyada con más estudios de carácter prospectivo, puede ser usada como una herramienta para lograr un transplante más seguro.

No hay relación alguna entre el número de transfusiones y la presencia de anticuerpos contra antígenos epidérmicos.

Posiblemente los anticuerpos contra el complejo estudiado tengan su origen en un cruce antigénico ocurrido en etapas tempranas de la vida.

El complejo antigénico evidenciado, es polimórfico.

APENDICE I

FRECUENCIA DE ANTIGENOS CLASE I DEL CMH EN POBLACION MESTIZA MEXICANA (52).

ANTIGENOS MAS FRECUENTES EN RAZA MESTIZA

ANTIGENO	PORCENTAJE	ANTIGENO	PORCENTAJE
A1	5.2	B7	6.2
A2	24.1	B8	4.6
A3	7.7	B14	6.5
A11	3.4	B18	4.0
A24	14.5	B35	15.4
A28	11.1	B39	6.2
A30	4.3	B41	3.4
A31	5.7	B44	9.2
A32	3.4	B48	1.9
A33	5.9	B51	4.0
ABL	3.4	B52	3.1
		B58	2.2
		B61	5.2
		B62	1.5
		BBL	0.1

APENDICE II

TABLA DE VALORES CRITICOS DE CHI-CUADRADA (48).

		Probabilidad conforme a H_0 de que $\chi^2 \geq$ chi cuadrada													
g^1	.99	.98	.95	.90	.80	.70	.60	.50	.30	.20	.10	.05	.02	.01	.001
1	.00016	.00063	.0039	.016	.064	.15	.46	1.07	1.64	2.71	3.84	5.41	6.64	10.83	
2	.02	.04	.10	.21	.45	.71	1.39	2.41	3.22	4.60	5.99	7.82	9.21	13.82	
3	.12	.18	.35	.58	1.00	1.42	2.37	3.66	4.64	6.25	7.82	9.84	11.34	16.27	
4	.30	.43	.71	1.06	1.65	2.20	3.36	4.88	5.99	7.78	9.49	11.67	13.28	18.46	
5	.55	.75	1.14	1.61	2.34	3.00	4.35	6.06	7.29	9.24	11.07	13.39	15.09	20.52	
6	.87	1.13	1.64	2.20	3.07	3.83	5.35	7.23	8.56	10.64	12.59	15.03	16.81	22.46	
7	1.24	1.56	2.17	2.83	3.82	4.67	6.35	8.38	9.80	12.02	14.07	16.62	18.48	24.32	
8	1.65	2.03	2.73	3.49	4.59	5.53	7.34	9.52	11.03	13.36	15.51	18.17	20.09	26.12	
9	2.09	2.53	3.32	4.17	5.38	6.39	8.34	10.66	12.24	14.68	16.92	19.68	21.67	27.88	
10	2.58	3.06	3.94	4.86	6.18	7.27	9.34	11.78	13.44	15.99	18.31	21.16	23.21	29.59	
11	3.05	3.61	4.58	5.58	6.99	8.15	10.34	12.90	14.63	17.28	19.68	22.62	24.72	31.26	
12	3.57	4.18	5.23	6.30	7.81	9.03	11.34	14.01	15.81	18.55	21.03	24.05	26.22	32.91	
13	4.11	4.76	5.89	7.04	8.63	9.93	12.36	15.12	16.98	19.81	22.36	25.47	27.69	34.53	
14	4.66	5.37	6.57	7.79	9.47	10.82	13.36	16.22	18.15	21.06	23.68	26.87	29.14	36.12	
15	5.23	5.98	7.26	8.55	10.31	11.72	14.34	17.32	19.31	22.31	25.00	28.26	30.58	37.70	
16	5.81	6.61	7.96	9.31	11.15	12.62	15.34	18.42	20.46	23.54	26.30	29.63	32.00	39.29	
17	6.41	7.26	8.67	10.08	12.00	13.53	16.34	19.51	21.62	24.77	27.59	31.00	33.41	40.75	
18	7.03	7.91	9.39	10.86	12.86	14.44	17.34	20.60	22.76	25.99	28.87	32.35	34.80	42.31	
19	7.63	8.57	10.12	11.65	13.72	15.35	18.34	21.69	23.90	27.20	30.14	33.69	36.19	43.82	
20	8.26	9.24	10.85	12.44	14.58	16.27	19.34	22.78	25.04	28.41	31.41	35.02	37.57	45.39	
21	8.90	9.92	11.59	13.24	15.44	17.18	20.34	23.86	26.17	29.62	32.67	36.34	38.93	46.80	
22	9.54	10.60	12.34	14.04	16.31	18.10	21.24	24.94	27.30	30.81	33.92	37.66	40.29	48.27	
23	10.30	11.29	13.09	14.85	17.19	19.02	22.34	26.02	28.43	32.01	35.17	38.97	41.64	49.73	
24	10.96	11.99	13.85	15.66	18.06	19.94	23.34	27.10	29.55	33.20	36.42	40.27	42.98	51.18	
25	11.53	12.70	14.61	16.47	18.94	20.87	24.34	28.17	30.68	34.38	37.65	41.57	44.31	52.62	
26	12.20	13.41	15.38	17.29	19.82	21.79	25.34	29.25	31.80	35.56	38.88	42.86	45.84	54.05	
27	12.86	14.12	16.15	18.11	20.70	22.72	26.34	30.32	32.91	36.74	40.11	44.14	46.96	55.48	
28	13.56	14.85	16.93	18.94	21.59	23.65	27.34	31.39	34.03	37.92	41.34	45.42	48.28	56.89	
29	14.26	15.57	17.71	19.77	22.48	24.58	28.34	32.46	35.14	39.09	42.58	46.69	49.59	58.30	
30	14.95	16.31	18.49	20.60	23.36	25.51	29.34	33.53	36.25	40.26	43.77	47.96	50.89	59.70	

APENDICE III

PREPARACION DE SOLUCIONES

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) 10X

Mezclar 80 g de NaCl, 2 g de KH_2PO_4 , 21.7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 2 g de KCl, hasta su disolución total en 1000 ml. de agua destilada y ajustar a pH 7.2.

COLORANTE AZUL TRIPAN

Mezclar 3 partes de Azul Tripán al 1% en agua destilada con 7 partes de EDTA al 2% en solución salina, quedando a una concentración final de 0.3 %.

PREPARACION DE FORMALINA NEUTRALIZADA AL 40%

A 100 ml. de Formaldehído adicionar y disolver 0.3 g de Na_2HPO_4 y 0.1 g de NaH_2PO_4 . Ajustar a pH 7.2 y añadir una gota de eosina amarillenta al 5%. Filtrar y conservar a temperatura ambiente.

PREPARACION DE SOLUCION DE MONTAJE

A 1 ml. de PBS (pH 7.2) agregar 10 mg de *p*-fenilendiamina y homogeneizar. Después agregar 9 ml. de glicerol mezclando perfectamente. Conservar en pequeños volúmenes a -20°C . La solución adquiere una coloración café con el tiempo sin que esto afecta su utilidad durante los siguientes 3 meses. La *p*-fenilendiamina incrementa la fluorescencia y retarda el decaimiento de la fluorescencia (45).

GLOSARIO

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
C'	Complemento
CEV	Células del Endotelio Vascular
Cel/ml	Células por cada mililitro
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Col.	Colaboradores
FICT	Isotiocianato de Fluoresceína
g	Gramos
HLA	Antígenos de Leucocitos Humanos
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IgG	Inmunoglobulina clase "G"
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
ml	Mililitro
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
rpm	Revoluciones Por Minuto
TH2	Linfocitos TH2
Ts	Linfocitos T supresores
vs	Versus

REFERENCIAS

- 1.- Banacerraf B., Unanue E.R. (1986). Histocompatibilidad, en *Inmunología*. Panamericana. Argentina: 99-111.
- 2.- Festenstein H., Démant D. (1981). Inmunogenética Fundamental, Biología y aplicaciones clínicas de HLA y H-2. El manual moderno. México: 1-229.
- 3.- Schwartz B.D. (1988). Complejo Principal de Histocompatibilidad HLA Humano, en *Inmunología Básica y clínica*. (Stites D.P., Stobo J.D., Wells J.V., editores). El manual moderno. México: 46-58.
- 4.- Garovoy M.R., Melzer J.S., Gibbs V.C., Bozdech M. (1988). Trasplante Clínico, en *Inmunología Básica y Clínica*. (Stites D.P., Stobo J.D., Wells J.V., editores). El manual moderno, México: 420-434.
- 5.- Hutchinson I. (1994). Transplante y Rechazo, en *Inmunología*. (Roitt I., Brastoff J., Male D., editores). Masson-Salvat. España: 23.1-23.12.
- 6.- Batchelor J.R. (1991). Transplantation, en *Clinical Immunology*. (Brastoff J., Scadding G.K., Male D., Roitt I., editors). Gower Medical Publishing. U.K. 3.1-3.13.
- 7.- Opelez G., Sengar D. P., Mickey M.R. (1973). Effect of Blood Transfusions on Subsequent Kidney Transplants. *Transplantation Proceedings*. 5: 253-259.
- 8.- Opelez G., Terasaki P. J. (1980). Dominant Effect of Transfusions on Kidney Graft Survival. *Transplantation*. 29: 153-158.
- 9.- Malcolm T., Owen M. (1994). Moléculas que reconocen el antígeno, en *Inmunología*. (Roitt I., Brastoff J., Male D., editores). Masson-Salvat. España: 4.1-4.19.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 10.- Lund T., Festenstein H. (1991). HLA and disease, *en* Clinical Immunology. (Brastoff J., Scadding G.K., Male D., Roitt I., editors). Gower Medical Publishing. U.K. 2.1-2.10.
- 11.- Beatty P., Mickleson E., Petersdorf E., Choo Y., Geraghty D. (1991). Histocompatibility 1991. *Transfusion*. 31, 9: 847-856.
- 12.- Vetto R., Burger D. (1971). The Identification and comparison of Transplantation Antigens on Canine Vascular Endothelium and Lymphocytes. *Transplantation*. 11, 4: 374-377.
- 13.- Rosenberg J., Hawkins E., Rector F. (1971). Mechanisms of Immunological Injury During Antibody-Mediated Hyperacute Rejection of Renal Heterografts. *Transplantation*. 11, 2: 151-157.
- 14.- Cerilli J., Josselyn J., Miller A. (1972). The Significance of Antivascular Endothelium Antibody in Renal Transplantation. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*. 135: 246-252.
- 15.- Cerilli J., Holliday J., Fesperman P. (1977). Role of Antivascular Endothelial Antibody in Predicting Renal Allograft Rejection. *Transplantation Proceedings*. IX, 1: 771-773.
- 16.- Stastny P. (1978). Endothelial Monocyte Antigens in Man. *Transplantation Proceedings*. X, 4: 875-877.
- 17.- Cerilli J., Brasile L. (1980). Endothelial Cell Alloantigens. *Transplantation Proceedings*. (Suppl 1) XII, 3: 37-42.
- 18.- Stastny P. (1980). Endothelial-Monocyte Antigens. *Transplantation Proceedings*. (Suppl 1) XII, 3: 32-36.
- 19.- Cerilli J., Brasile L., Galouzis T., De Francis M. (1981). Clinical Significance of Antimonocyte Antibody in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation*. 32, 6: 495-497.

- 20.- Cerilli J., Brasile L., Lempert N., Cerilli G., Drozd N., Clarke J. (1985). Overview of the Vascular Endothelial Cell Antigen System. *Transplantation Proceedings*. XVII, 6: 2314-2317.
- 21.- Cerilli J., Brasile L., Clarke J., Galouzis T. (1985). The Vascular Endothelial Cell-Specific Antigen System: Three Years' Experience in Monocyte Crossmatching. *Transplantation Proceedings*. XVII, 1: 567-570.
- 22.- Brasile L., Clarke J., Galouzis T., Cerilli J. (1985). The Clinical Significance of the Vascular Endothelial Cell Antigen System: Evidence for Genetic Linkage between the Endothelial Cell Antigen System and the Major Histocompatibility Complex. *Transplantation Proceedings*. XVII, 1: 741-743.
- 23.- Brasile L., Galouzis T., Clarke J., Cerilli J. (1985). Clinical Significance of the Vascular Endothelial Cell Antigen System-Evidence for Genetic Linkage between the Endothelial Cell Antigen and the Major Histocompatibility Complex. *Transplantation Proceedings*. XVII, 6: 2318-2321.
- 24.- Brasile L., Clarke J., Cerilli J. (1985). The Ability of the Vascular Endothelial Cell-Specific Antigen to Elicit a Blastogenic Response in an HLA-Identical Combination. *Transplantation Proceedings*. XVII, 6: 2322-2324.
- 25.- Paul L. Baldwin III W., Van Es L. (1985). Vascular Endothelial Alloantigens in Renal Transplantation. *Transplantation*. 40, 2: 117-123.
- 26.- Kaplan K., Weber D., Cookp. (1983). Monoclonal Antibodies to E92, an Endothelial Cell Surface Antigen. *Atherosclerosis*. 3: 403.
- 27.- Jordan S., Yap H., Sakai R., Alfonso P., Fitchman M. (1988). Hyperacute Allograft Rejection Mediated by Anti-Vascular Endothelial Cell Antibodies with a Negative Monocyte Crossmatch. *Transplantation*. 46, 4 : 585-602.
- 28.- Joyce S., Wayne Flye M., Mahanakumar T. (1988). Characterization of Kidney Cell-Specific, Non-Major Histocompatibility Complex Alloantigen Using Antibodies Eluted from Rejected Human Renal Allografts. *Transplantation*. 46, 3: 362-369.

- 29.- Mathew J.M., Joyce S., Lawrence W., Mohanakumar T. (1991). Evidence that Antibodies Eluted from Rejected Kidneys of HLA-Identical Transplants define a non-HLA Alloantigen Expressed on Human Kidneys. *Transplantation*. 52, 3: 559-562.
- 30.- Wood N., Schook L., Studer E., Mohanakumar T. (1988). Biochemical Characterization of human Vascular Endothelial Cell-Monocyte Antigens Defined by Monoclonal Antibodies. *Transplantation*. 45, 4: 787-792.
- 31.- Pober J., Collins T., Gimbrone M., Libby P., Reiss C. (1986). Inducible Expression of Class II Major Histocompatibility Complex Antigens and the Immunogenicity of Vascular Endothelium. *Transplantation*. 41, 2: 141-146.
- 32.- Hayry P., Leszczynski D., Paavone T., Nemlander A., Meide P., Schellekens H. (1987). Leukocyte Binding and Ia-Expression in Vascular Endothelium. *Transplantation Proceedings*. (Suppl 5) XIX, 4: 42-43.
- 33.- Leszczynski D., Schellekens H., Hayry P. (1988). Vascular Endothelium in Allograft Rejection. *Transplantation Proceedings*. XX, 2: 262-263.
- 34.- Moraes J., Pettaway C., Stastny P. (1989). Prediction of Early Kidney Transplant Rejection by a Crossmatch with Donor Skin. *Transplantation*. 48, 6: 951-952.
- 35.- Moraes J.R., Moraes M.E., Lou Y., Stastny P. (1991). Alloantibodies Against Donor Epidermis and Early Kidney Transplant Rejection. *Transplantation*. 51, 2: 370-373.
- 36.- Moraes J.R., Lou Y., Moraes M. E., Stastny P. (1991). Clinical Relevance of Antibodies to Non-HLA Antigens in Organ Transplantation. *Clinics in Laboratory Medicine*. 11, 3: 621-632.
- 37.- Moraes J.R., Moraes M.E., Lou Y., Peters P.C., Sagalowsky A., Dawidson I., Lu C., Stastny P. (1991). Crossmatch with Donor Skin: Characterization of Alloantibodies and Correlation with Early Kidney Rejection. *Transplantation Proceedings*. 23, 1: 471-472.

- 38.- Ham W.A., Cormack D.H. (1985). Tratado de Histología. Interamericana. México: 688-700.
- 39.- Leeson T., Leeson R., Paparo A. (1988). Atlas de Histología. Interamericana-McGraw Hill. México: 363-377.
- 40.- Tait B., Simons M. (1984). Serological Detection of HLA-A,B,C Gene Products, *en* Detection of Immune Associated Genetic Markers of Human Disease. Churchill Livingstone. U.S.A.: 27-36.
- 41.-Terasaki P., McClelland J. (1964). Microdroplet assay of Human Serum Cytotoxins. Nature. 204: 998-1000.
- 42.- Valenzuela R., Deadhar S. (1992). Tissue Immunofluorescence, *en* Manual of Clinical Laboratory for Immunology. (Rose N.R., Conway de Macario E., editors). American Society for Microbiology. U.S.A.: 270-272.
- 43.- Nakamura R., Dita W., Tucker III E. (1979). Immunoassays *en* the Clinical Laboratory. (Nakamura R., Dita W., Tucker III E., editors). U.S.A.: 150-153.
- 44.- Stites D., Rodgers Ch. (1988). Métodos Clínicos de Laboratorio para la detección de Antígenos y Anticuerpos, *en* Inmunología Básica y Clínica. Stites D., Stobo J., Wells J., editores. El Manual Moderno. México: 235-280.
- 45.- Mayer J., Walker J. (1987). Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology. Acodec Press. U.K.: 262.
- 46.- Jordon R. (1984). Inmunohistopatología de la piel, *en* El Laboratorio en Inmunología Clínica.(Rose N.R., Friedman H., editores). Panamericana. Argentina: 990-993.
- 47.- Costa M., Furness B. (1983). Immunohistochemistry on whole Mount Preparation, *en* Immunohistochemistry. (Cuello A., editor). John Wiley and Sons. U.K.: 373-379.

- 48.- Siegel S. (1994). Estadística no Paramétrica. Trillas. México: 215-225, 283.
- 49.- Daniel W. (1985). Bioestadística. Limusa. México: 377.
- 50.- Milford E. (1992). Immunologic Testing for Renal Transplantation, *en* Manual of Clinical Laboratory for Immunology. (Rose N.R., Conway de Macario E., editors). American Society for Microbiology. U.S.A.: 825-831.
- 51.- Cerilli J., Brasile L. (1988). Tissue -Specific Antigens- A Role in Organ Transplantation Theory for the existence of Tissue - Specific Antigens, *en* Organ Transplantation and Replacement. (Cerilli G.J. editor). J.B. Lippincott Co. U.S.A.: 208-222.
- 52.- Gorodezky C., Loon J., et. al., (1992). HLA in some Latin American Populations: Mexicans, Brazilians, Venezuelans and Uruguayans. "Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Held Yokohama, Japan", *en* HLA 1991, (Tsuji K., Aizawa M., and Sasuki T. editors). Oxford University Press. U.K.: 662-665.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Terán por su confianza y asesoría; a Armida y Angel por su ayuda desinteresada y amistad. A la Dra. Ontiveros y todo el departamento de patología del I.N.E.R. A mis compañeros y amigos Mireya, Vicky, Lety, Dra. Faure y Saúl, por sus consejos. A mis cuates de la E.N.E.P., ahora F.E.S., Zaragoza, por el tiempo compartido. A todos mis profesores por sus enseñanzas. A los miembros del Jurado, Q.F.B. Yolanda Flores, Q.F.B. Margarita Chávez, Q.F.B. Fco. Javier Parada y al Dr. Rubén Marroquín, por las valiosas sugerencias y apoyo. Y a mi familia... por todo.