

50
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

DISEÑO DE UN METODO DE CONGELACION DE
PANELES CELULARES EN PLACA Y SU APLICACION
EN LA BUSQUEDA DE SUEROS ANTI-HLA.

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

LETICIA VILLA GARCIA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

Febrero de 1990



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.

C O N T E N I D O

I INTRODUCCION	1
Complejo Principal de Histocompatibilidad.	2
II FUNDAMENTACION DEL TEMA	25
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	30
IV OBJETIVOS	33
V HIPOTESIS	35
VI MATERIAL Y METODOS	37
Extracción de sueros de placentas	39
Purificación de linfocitos	40
Separación de linfocitos T y B	41
Prueba de viabilidad	43
Microcitotoxicidad	44
Método de congelación inicialmente planteado	48
Método de congelación estandarizado.	49
Método de descongelación	50
VII RESULTADOS	52
VIII ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	62
IX CONCLUSIONES	66
X BIBLIOGRAFIA	69
XI APENDICE	79
Preparación de reactivos	79

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

Por mucho tiempo la ambición de los cirujanos ha sido poder transplantar tejidos u órganos de una persona a otra sin tener la preocupación por la posibilidad de rechazo: pero como se sabe en general, los injertos practicados en el mismo individuo son fácilmente aceptados mientras que los realizados entre individuos de la misma especie pero genéticamente diferentes son rápidamente rechazados. La principal barrera para el trasplante lo constituyen los antígenos de histocompatibilidad, los cuales son sustancias de naturaleza proteica presentes en la membrana celular y que inducen a la respuesta inmune de rechazo al injerto (54).

Estos antígenos por su inmunogenicidad se clasifican en dos grandes grupos, los muy inmunogénicos en el Complejo Principal de Histocompatibilidad y los menos inmunogénicos en el Complejo Secundario de Histocompatibilidad, en este trabajo nos referimos exclusivamente a los primeros y que se estudiaron inicialmente en el ratón por Peter Gorer en 1936, al identificar un grupo de antígenos cuya compatibilidad entre el animal donante y receptor mejoraba en forma notoria la capacidad de supervivencia del injerto (59). Posteriormente, realizando injertos de tumores entre diversas cepas, Snell demostró que se trataba de un sistema de antígenos de histocompatibilidad al cual llamó H-2 (23). En el año de 1948, Snell, Gorer y Lyman reconocieron que los genes que determinan la presencia de estos antígenos se encuentran en el cromosoma 17 (fig. 1).

El estudio en humanos se inicia en los años 50's, con Dausset y Rapaport y así se establece que el sistema de histocompatibilidad (MHC) del inglés "Major Histocompatibility Complex" es una serie de genes fuertemente enlazados en el brazo corto del cromosoma 6 (autosómico) normalmente heredados en bloque y llamados "haplotipo HLA", la herencia de este segmento puede seguirse dentro de una familia por tipificación celular (fig. 2). Tenemos que se hereda un cromosoma 6 materno y otro paterno o sea dos haplotipos, si llamamos a los haplotipos paternos a y b,

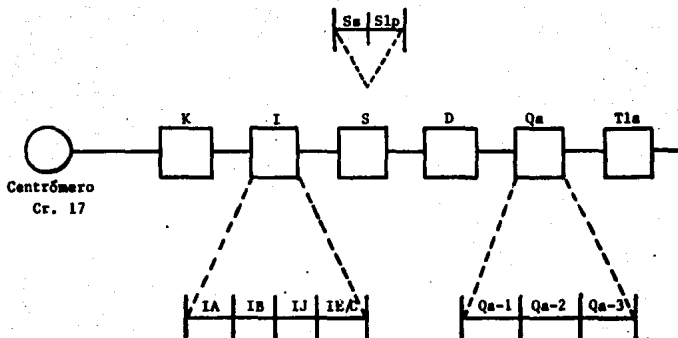


Figura 1. Complejo principal de Histocompatibilidad.

(H-2)

Región

K y D

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

I

En respuesta inmune a antígenos específicos. Susceptibilidad a virus oncogénicos. Reacción mixta de linfocitos. Interacción célula-célula.

Ss , Slp

Controlan la síntesis del complemento.

Tla

Controla la síntesis de los antígenos timoleucémicos.

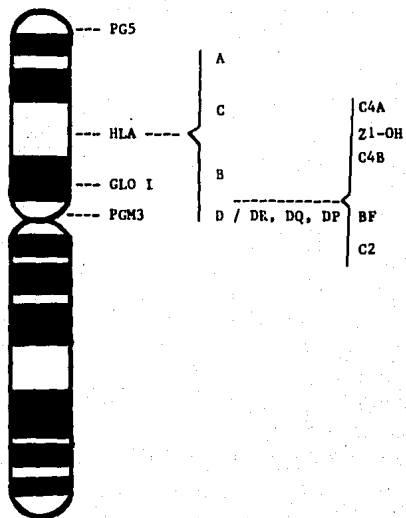


Fig. N^o 2.- Mapa Genético del Cromosoma 6

y a los maternos c y d, los hijos de esta pareja heredan uno de los haplotipos de cada padre, por lo que pueden tener las siguientes posibilidades de combinaciones: ac, ad, bc o bd. Una quinta combinación posible tendría que ser igual a alguno de ellos, de tal manera que existe un 25% de probabilidades de que dos hermanos sean idénticos en su HLA (ac/ac), un 25% de probabilidades de que dos hermanos sean completamente diferentes (ac/bd) y un 50% de ser parcialmente idénticos (Fig. 3). y (Fig. 3a.)

CLASIFICACION DEL SISTEMA HLA.

Los antígenos de histocompatibilidad se clasifican de acuerdo a sus diferencias estructurales y químicas como en la localización o expresión en sus moléculas, de manera general todos están compuestos por varios polipéptidos y son determinantes en el control genético de la respuesta inmune (20)(24).

Antígenos clase I: Pertenecen a las proteínas codificadas por los loci A, B y C del MHC y se expresan en la membrana de todas las células nucleadas, se componen de dos cadenas de polipéptidos: Una glicoproteína (P.M.= 44 000 Daltons) y la β 2-microglobulina (β 2m) (P.M.= 12 000 Daltons). Las moléculas clase I son importantes para que las células T citotóxicas reconozcan antígenos extraños que se expresen en la membrana celular (antígenos HLA o virales), pero su verdadero papel fisiológico está relacionado al fenómeno de restricción HLA (60). Basándose en estudios estructurales, la cadena de 44 000 Daltons puede ser dividida en tres regiones.

Comenzando por la parte amino terminal de la molécula, tenemos una región hidrofílica extracelular, una hidrofóbica transmembranal y la última hidrofílica intracelular (intracitoplasmática). La primera región se divide en tres dominios. El dominio N-terminal presenta el sitio de unión para el oligosacárido, mientras que el segundo y tercero contienen un segmento (loop) semejante a las inmunoglobulinas. El primero y segundo dominio presentan los determinantes antigénicos de la molécula siendo los sitios reconocidos por las células citotóxicas y por los anticuerpos (fig 4). El reconocimiento de células infectadas por virus puede ser uno de los aspectos de la función del MHC en eliminar células extrañas (12).

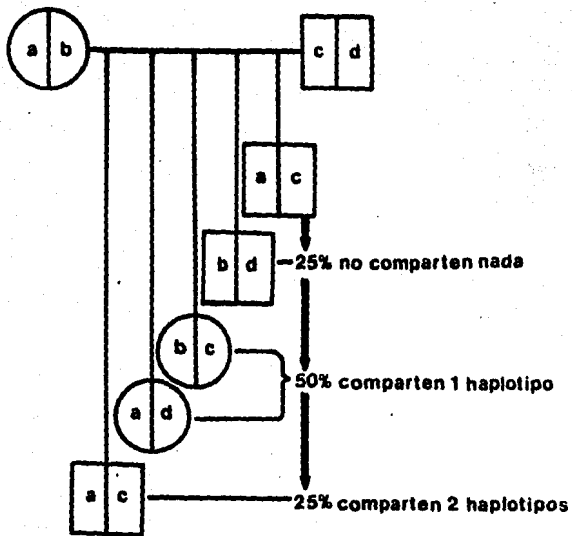


Fig. N^o 3.- Herencia HLA

HERENCIA HLA.

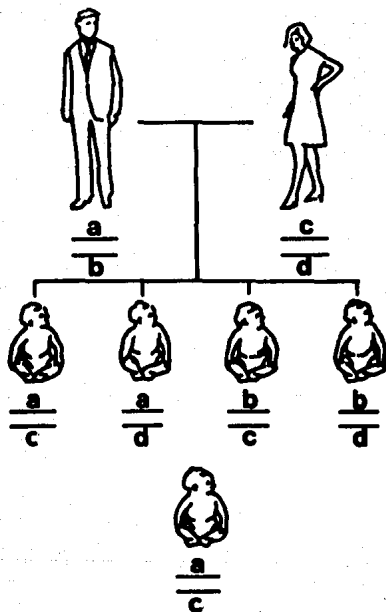


Fig. 3a.- HERENCIA HLA. Pares con 4 haplotipos diferentes (2 de cada uno) tienen hijos con 4 posibles combinaciones, existiendo 25% de probabilidad de compatibilidad total o incompatibilidad total y 50% de compatibilidad parcial.

Antígenos clase II: Pertenecen al locus D del MHC, en el que es posible definir tres loci: DR, DP y DQ (56). Estos antígenos están constituidos por dos glicopéptidos: Uno (con P.M. = 34 000 Daltons) que es el alfa y el beta (con un P.M. = 29 000 Daltons) y se expresan en la membrana de linfocitos-B, linfocitos-T (reguladores) y macrófagos. Cada una de las cadenas consiste de tres regiones: Una hidrofílica extracelular, una hidrofóbica y una hidrofílica intracelular. La región hidrofílica de la cadena alfa contiene dos dominios constantes, uno presenta un sitio de unión para oligosacáridos y el segundo contiene un puente disulfuro intracadenas, mientras que la cadena beta consiste de dos dominios extracelulares siendo uno de ellos variable (polimórfica) y el segundo dominio extracelular de ambas cadenas muestra semejanza a la porción constante de las inmunoglobulinas. En el caso de la HLA-DQ las cadenas alfa y beta tienen regiones variables, pero en el caso de la HLA-DP sólo la cadena beta tiene regiones variables. Las especificidades de HLA -DR, -DQ y -DP se detectan serológicamente sobre poblaciones celulares enriquecidas de linfocitos B. (76). (Fig. 4).

Estos antígenos son importantes porque intervienen en el reconocimiento que llevan a cabo los linfocitos T cooperadores o supresores a los antígenos solubles exhibidos por los macrófagos y son necesarios para la activación de los linfocitos B, el paso esencial de la inducción de la respuesta inmune hacia todos los antígenos, es la activación del linfocito T auxiliar y esta activación no es inducida por antígenos libres sino sólo por antígenos presentados por una célula accesoria y en la que es necesario que despliegue las glicoproteínas de la clase II del MHC (86).

Tanto la clase I como la clase II son conocidas como los antígenos clásicos de histocompatibilidad ya que controlan la expresión polimórfica de antígenos de superficie de gran importancia por su participación en la generación de rechazo.

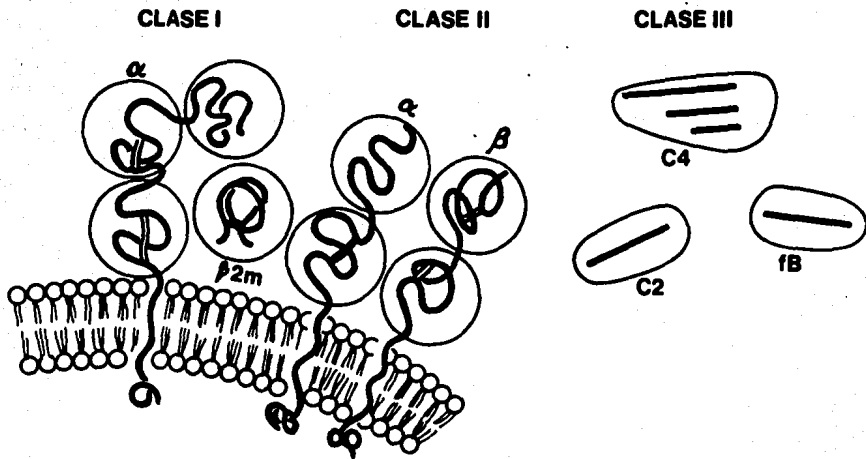


Figura N° 4 .- Estructura de los antígenos HLA.

Antígenos clase III : Comprenden proteínas del sistema del complemento, el cual contiene genes que determinan al segundo y cuarto componente del complemento (C2 y C4) de la vía clásica y el factor B (Bf) de la vía alterna (57,73). A diferencia - de las clases anteriores, estas proteínas no se encuentran integradas a las membranas celulares, sino en estado soluble en el plasma.

NOMENCLATURA:

Con el propósito de desarrollar una nomenclatura estándar, en 1967 se formó un comité bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud, el cual después de considerables debates, decidió llamar HLA-A (human lymphocyte system A) al complejo principal de histocompatibilidad y a los alelos correspondientes con un número como HL-A1, HL-B5, etc. (58).

Actualmente la nomenclatura utilizada para el sistema HLA se designa de la siguiente manera: El HLA-A, -B, -C, etc., se refiere a los loci, los números que siguen indican los alelos de cada locus, por ejemplo: HLA-A1, identifica el complejo HLA, el locus [A] y el alelo específico [1]. A los alelos que no están claramente definidos se les da un estado provisional conteniendo el prefijo w antes del número, como ejemplo tenemos HLA-Aw19 (1,74).

POLIMORFISMO:

Una de las características del HLA que fué rápidamente descubierta, es que los genes que comprenden dicho complejo poseen el polimorfismo más grande conocido en mamíferos, dicho término nos indica la gran variedad de alelos dentro de un mismo locus (20,31).

De todos los genes que cifran el HLA, el más polimórfico es el HLA-B con 52 -- alelos conocidos hasta la fecha (obviamente cada alelo expresa una especificidad diferente), seguido en frecuencia por el HLA-D con 26 alelos, el HLA-A con 24. etc. (1). Una lista completa de especificidades conocidas hasta 1987, se da en la tabla 1 .

ESPECIFICIDADES HLA RECONOCIDAS HASTA LA FECHA.

(1987)

HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-C	HLA-D	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP
A1	B5	B49	Cw1	Dw1	DR1	DQw1	DPw1
A2	B7	Bw50	Cw2	Dw2	DR2	DQw2	DPw2
A3	B8	B51	Cw3	Dw3	DR3	DQw3	DPw3
A9	B12	Bw52	Cw4	Dw4	DR4	DQw4	DPw4
A10	B13	Bw53	Cw5	Dw5	DR5	DQw5	DPw5
A11	B14	Bw54	Cw6	Dw6	DRw6	DQw6	DPw6
Aw19	B15	Bw55	Cw7	Dw7	DR7	DQw7	
A23	B16	Bw56	Cw8	Dw8	DRw8	DQw8	
A24	B17	Bw57	Cw9	Dw9	DR9	DQw9	
A25	B18	Bw58	Cw10	Dw10	DRw10		
A26	B21	Bw59	Cw11	Dw11	DRw11		
A28	Bw22	Bw60		Dw12	DRw12		
A29	B27	Bw61		Dw13	DRw13		
A30	B35	Bw62		Dw14	DRw14		
A31	B37	Bw63		Dw15	DRw15		
A32	B38	Bw64		Dw16	DRw16		
Aw33	B39	Bw65		Dw17	DRw17		
Aw34	B40	Bw67		Dw18	DRw18		
Aw36	Bw41	Bw71		Dw19	DRw52		
Aw43	Bw42	Bw70		Dw20	DRw53		
Aw66	B44	Bw72		Dw21			
Aw68	B45	Bw73		Dw22			
Aw69	Bw46	Bw75		Dw23			
Aw74	Bw47	Bw76		Dw24			
	Bw48	Bw77		Dw25			
		Bw4		Dw26			
		Bw6					

RECOMBINACION O ENTRECruzAMIENTO:

Ocasionalmente ocurre la recombinación genética entre cromosomas homólogos dando lugar a nuevos haplotipos y se ha visto que es menos probable entre genes que están estrechamente unidos que entre los que están más separados. La recombinación ha sido utilizada para la localización relativa dentro del cromosoma y calcular la distancia genética entre los loci (20,68). (fig. 5 y 6).

Los genes que codifican los antígenos HLA se encuentran situados muy próximos unos de otros (aprox. 2cM, es decir 0.08% del genoma humano). La causa de la proximidad de estos genes podría explicarse suponiendo que una función tan especializada como el reconocimiento de las estructuras extrañas y el control de mecanismos específicos de defensa, requiera un mecanismo regulador finamente ajustado, y que sólo podría obtenerse gracias a esa proximidad. (59,63,68).

DESEQUILIBRIO DE ENLACE:

En cada locus génico de la población humana se pueden detectar muchas especificidades diferentes, puesto que prácticamente cualquier antígeno de la región A puede estar unido con el antígeno B, C o D, el número de haplotipos presentes en los seres humanos es muy grande, y con dos cromosomas no idénticos la cantidad total de genotipos posibles es enorme. En condiciones ideales como puede ser una población en equilibrio y con procreación al azar, la teoría genética predice que la frecuencia con que dos especificidades aparecen juntas viene dada por el producto de las frecuencias de los genes individuales (79). Por ejemplo, si el 16% de la población tiene un antígeno HLA-A determinado (A1) y el 10% tiene un antígeno HLA-B particular (B8), la probabilidad de hallar el antígeno A1 unido genéticamente al B8 en el mismo cromosoma viene dada por el producto de sus respectivas frecuencias genéticas ($16\% \times 10\% = 1.6\%$). Sin embargo en la práctica esto no siempre es así, tenemos que éste haplotipo en la población caucásica se encuentra con una frecuencia de 8.8%, son más frecuentes que los valores esperados al azar (59). Este fenómeno es llamado desequilibrio de enlace.

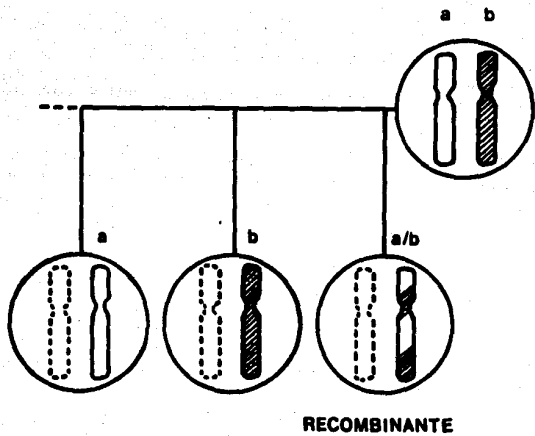


Fig. N^o 5.- ENTRECruzamiento Y RECOMBINACION

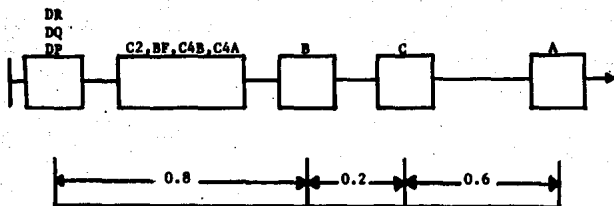
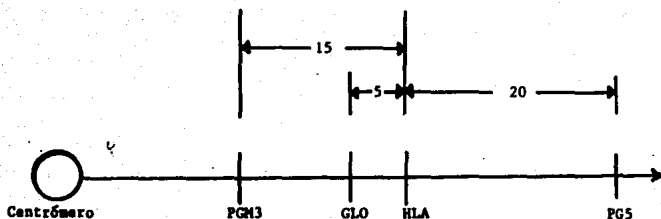


Figura 6.- Distancia entre los genes que comprenden el complejo mayor de histocompatibilidad. En la parte superior, se muestra la posición del complejo HLA relacionado a otros marcadores: PGM3: 3 Fosfoglucomutasa; GLO I: Glioxalasa; Pg5: Pepsinógeno urinario. Las distancias están dadas en centimorgan. En la parte inferior se señalan las distancias genéticas entre los diferentes loci que comprenden el sistema HLA.

La comparación entre individuos de diferentes razas muestran grandes diferencias en la frecuencia de genes (tabla 2), lo cual es de gran utilidad en investigaciones antropológicas (34). Las frecuencias establecidas en una población normal en comparación con algunas patologías en ocasiones presentan desequilibrios - de enlace tal como se muestra en la tabla 3 (3,38,62).

SEROLOGIA:

La definición serológica de los productos genéticos HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ y -DP es uno de los refinamientos continuos en la detección de antígenos HLA. Los - sueros originalmente utilizados detectan especificidades supertípicas (públicas), es decir antígenos compartidos o comunes a varios alelos, por ejemplo: HLA-B38 y HLA-B16. En contraste los antígenos característicos de un sólo alelo (y no otros) son llamados subtípicos (privados) tal como en el caso de HLA-A28.

En varios casos, los antígenos que inicialmente se pensaba que eran subtípicos, se encontró que estaban formados por más de un antígeno, estos últimos denominados "split" (división) de las especificidades originales. En la tabla 4 se encuentran las especificidades originales y entre paréntesis sus "splits" (14,47).

Entre los antígenos supertípicos y los subtípicos se encuentran un grupo de antígenos no denominados que dan lugar a reacciones cruzadas entre grupos determinados de alelos, estos conjuntos perfectamente definidos denominados "Cregs" (cross reaction groups) se encuentran en las tablas 5 y 6 (20,37,47).

Fuentes de antisueros:

1.- Mujeres multiparas.- Una gran cantidad de anticuerpos para el análisis de los antígenos HLA son derivados de mujeres multiparas las cuales son inmunizadas durante la gestación por antígenos paternos presentes sobre las células fetales en la circulación materna (20). Se ha propuesto que las células fetales que llegan a atravesar la placenta son las responsables de inducir la producción de dichos - anticuerpos, los cuales están presentes en la madre en relación directa con el número de embarazos (22).

TABLA 2

FRECUENCIA DE GENES EN DIVERSAS POBLACIONES MESTIZAS

	Carolina del Norte	Perú	México
HLA-A	N= 101	N=33	N=200
A2	30	38	32
A28	2	5	8
A9	13	20	20
Aw19	10	15	6
A1	15	3	6
A3	12	3	8
A10	2	2	6
A11	10	6	8
A29	1	3	1
Aw30	6	6	2
Aw31	1	6	2
Aw32	1	-	1
Aw33	1	-	1
Biancos	6	28	17
HLA-B			
B5	6	5	13
Bw35	7	28	24
B40	2	3	11
B15	4	6	4
Bw16	3	-	4
B7	13	3	6
B8	10	-	6
B12	22	2	4
B13	1	2	1
B14	3	6	4
B17	8	2	5
B18	1	6	3
Bw22	1	-	2
B27	4	-	3
Bw21	4	5	3
Biancos	11	32	12

ASOCIACION HLA-ENFERMEDAD

ENFERMEDAD	HLA	*RR
ARTROPATIAS	Espondilitis Anquilosante	B27 87.4
	Síndrome de Reiter	B27 37.0
	Artritis Reumatoide	DR4 4.2
ENDOCRINAS	Diabetes Insulino dependiente	D/DR3 3.3.
		D/DR4 6.4
	Enfermedad de Graves	D/DR2 0.2
	Enfermedad Idiopática de Addison	D/DR3 3.7 D/DR3 6.3
OCULARES	Uveitis Anterior Aguda	B27 10.4
	Neuritis Óptica	D/DR2 2.4.
INFLAMATORIAS	Tiroiditis Subaguda	B35 13.7
INTESTINALES	Enfermedad Celíaca	D/DR3 10.8
HEPATICAS	Hepatitis Crónica Autoinmune	B8 9.0
NEUROLOGICAS	Esclerosis Múltiple	D/DR2 4.1
CUTANEAS	Psoriasis Vulgaris	Cw6 13.3
	Pemfigo (Judíos)	D/DR4 14.4
	Dermatitis Herpetiforme	D/DR3 15.4
	Enfermedad de Behcet	B5 6.3
	Miastenia Gravis	D/DR3 2.5 B8 2.7
	Síndrome de Sicca	D/DR3 9.7
SISTEMICAS	Lupus Eritematosa Sistémico	D/DR3 5.8
	Hemocromatosis Idiopática	A3 8.2 B14 4.7
	Síndrome de Goodpasture	D/DR2 15.9
	Nefropatía Membranosa Idiopática	D/DR3 12.0

*RR.- Riesgo Relativo. Calculado por $\frac{a \times d}{b \times c}$, en donde a y b son el número de individuos con carácter presente o ausente en el paciente y c y d el carácter presente o ausente en la población control.

TABLA 4

LISTA DE ESPECIFICIDADES QUE HACEN "SPLIT" CON OTRAS ESPECIFICIDADES

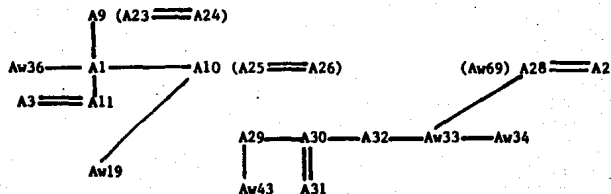
Especificidades originales	"Splita"
A9	A23, A24
A10	A25, A26, Aw34, Aw66
Aw19	A29, A30, A31, A32, Aw33, Aw74.
A28	Aw68, Aw69
B5	B51, Bw52
B12	B44, B45
B14	Bw64, Bw65
B15	Bw62, Bw63, Bw75, Bw76, Bw77
B16	B38, B39
B17	Bw57, Bw58
B21	B49, Bw50
Bw22	Bw54, Bw55, Bw56
B40	Bw60, Bw61
Bw70	Bw71, Bw72
Cw3	Cw9, Cw10
DR2	DRw15, DRw16
DR3	DRw17, DRw18
DR5	DRw11, DRw12
DRw6	DRw13, DRw14
DQw1	DQw5, DQw6
DQw3	DQw7, DQw8, DQw9
Dw6	Dw18, Dw19
Dw7	Dw11, Dw17

LAS SIGUIENTES ESPECIFICIDADES FUERON POSTERIORMENTE AGREGADAS

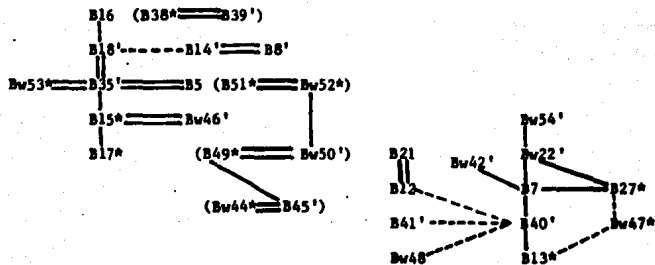
Bw4:	B5, B13, B17, B27, B37, B38(16), B44(12), Bw47, B49(21), B51(5), Bw52(5), Bw(53), Bw57(17), Bw58(17), Bw59, Bw63(15), Bw77(15).
Bw6:	B7, B8, B14, B18, Bw22, B35, B39(16), B40, Bw41, Bw42, B45(12), Bw46, Bw48, Bw50(21), Bw54(w22), Bw55(22), Bw56(w22), Bw60(40), Bw61(40), Bw62(15), Bw64(14), Bw65(14), Bw67, Bw70, Bw71(w70), Bw72(w70), Bw73, Bw75(15), Bw76(15).
DRw52:	DR3, Dr5, DRw6, DRw8, DRw11(5), DRw12(5), DRw13(w6), DRw14(w6), DRw17(3), DRw18(3).
DRw53:	DR4, DR7, DR9.

REACCION CRUZADA

LOCUS A



LOCUS B

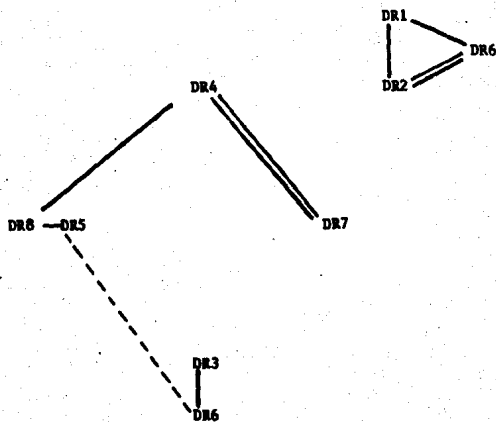


Los patrones de reactividad cruzada de antígenos HLA-A y B son obtenidos por tipificación convencional usando anticuerpos humanos. Fuerte reacción cruzada (====); Reacción cruzada establecida (——) y reacción cruzada ocasional (- - -). La presencia de los antígenos Bw4 y Bw6 sobre antígenos del locus B es indicada por (*) para Bw4 y (') para Bw6.

TABLA 6

REACCIONES CRUZADAS

LOCUS HLA-DR



Es muy probable que con el aumento de embarazos, los fetos lleven antígenos de histocompatibilidad diferentes, por lo que es común que las multíparas tengan sueros que reaccionen con varios antígenos (multiespecíficos). Un porcentaje sustancial (10-30%) de multíparas produce un anticuerpo anti-HLA, sólo cerca del 1 al 2% de ellas, producen un anticuerpo suficientemente específico para ser utilizado como reactivo de tipificación (87). En consecuencia, deberá seleccionarse un gran número de sueros a fin de establecer reactivos de calidad. La absorción placentaria de anticuerpos maternos dirigidos a antígenos de histocompatibilidad fetales, impide la penetración a la circulación fetal y ejercer cualquier efecto dañino (48); por lo que el suero obtenido de la placenta es una buena fuente de antisueros tipificadores (42), (40).

2.- Pacientes transplantados.- Hay varios estudios que demuestran la formación de anticuerpos anti-HLA después del trasplante renal y generalmente son di o poli específicos (36). Aunque la respuesta celular es la forma clásica del rechazo de trasplantes en la práctica médica y para evitar ésto se les administra inmunosupresores lo que da como resultado que una cantidad apreciable de ellos tengan anticuerpos (respuesta humoral) que provoca un deterioro muy lento del injerto (aproximadamente 2 años como en el rechazo crónico) (20), (82).

3.- Pacientes transfundidos.- La sangre contiene linfocitos ricos en antígenos de histocompatibilidad y como al hacer una transfusión no se tiene en cuenta la compatibilidad para HLA entre donador y receptor, la mayoría de los pacientes que son politransfundidos forman anticuerpos que son por lo general multiespecíficos debido a las sensibilizaciones múltiples involucradas (14,20,29).

4.- Pacientes inmunizados intencionalmente.- A veces se pueden lograr transfusiones sanguíneas repetidas a voluntarios, de sangre que contenga un determinado antígeno con el fin de producir anticuerpos capaces de detectar al determinante.

Las inmunizaciones continuas, tienen la desventaja de que conducen a la pérdida del anticuerpo (20).

Las inmunizaciones se llevan a cabo mediante la inyección de leucocitos semanalmente lo que produce una buena respuesta de anticuerpos contra los antígenos HLA incompatibles, por injertos de piel a intervalos de 2 a 3 semanas detectando la formación de anticuerpos después del segundo estímulo o bien por transfusión sanguínea inyectando 20 ml de sangre total continuamente hasta que el individuo responda, los dos primeros no están libres de riesgo por lo que la inmunización por transfusiones es el método más adecuado (60). La mayoría de los sueros en estos casos son polispecíficos y para obtener mejores resultados, conviene tipificar previamente a los donadores para buscar un receptor que tenga mínimas diferencias en los antígenos y aún así la probabilidad de encontrar sueros monoespecíficos es muy pequeña (19), (23).

5.- Inmunización de animales.- Algunos intentos se han realizado para utilizar antisueros producidos en otras especies especialmente primates (60). Aún cuando se ha postulado que los sueros producidos así son más fáciles de obtener, inmunizando a un miembro de una especie en relación filogenética cercana al donador del material inmunizante, se ha visto que el título de antisuero es alto pero las reacciones muy amplias por lo que tienen una aplicación muy limitada, sin embargo utilizando antígenos altamente purificados y absorciones exhaustivas es posible obtener anticuerpos de buena calidad resolutive (67).

6.- Producción de anticuerpos monoclonales.- Se han realizado una gran variedad de experimentos para producir anticuerpos monoclonales que sean utilizados como reactivos de tipificación ya que como hemos visto, la mayoría de las fuentes mencionadas anteriormente producen antisueros polispecíficos. Esta situación ha cambiado radicalmente desde que se demostró que las células de bazo del ratón inmunizado pueden fusionarse a células de mieloma y generar híbridos celulares que secretan anticuerpos específicos (33). Los híbridomas celulares producidos son justamente tan heterogéneos como el anticuerpo en el ratón original, pero es posible seleccionar una o más líneas celulares que secreten anticuerpos específicos para el antígeno de interés (52).

Este método ha sido utilizado para generar anticuerpos monoclonales de antígenos humanos de diferenciación y para glicoproteínas HLA bien definidas (38). En este caso también es necesaria la purificación de los antígenos de histocompatibilidad. Definitivamente de todas las fuentes mencionadas, ésta última es la mejor, ya que permite producir anticuerpos con alto título y adecuada especificidad para ser utilizado en la tipificación, teniendo como inconveniente su complicada elaboración y su alto costo por lo que se ha excluido de algunos laboratorios que realizan tipificaciones en nuestro país (22).

La identificación de los antígenos de histocompatibilidad se realiza por medio de métodos serológicos. Entre los métodos de valoración y detección de antígenos y anticuerpos HLA se encuentran la leucoaglutinación, radio inmuno análisis (R.I.A) enzima linked immuno sorbent assay (E.L.I.S.A.), fijación de complemento, inmunofluorescencia y microcitotoxicidad. Hasta ahora la técnica más ampliamente usada es la de microcitotoxicidad, la cual consiste básicamente en incubar la suspensión de linfocitos con diferentes antisueros tipificadores; si estos contienen anticuerpos contra los antígenos HLA presentes en la membrana celular, se llevará a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, que al adicionar el complemento provoca muerte celular. Así, la alteración de la permeabilidad de la membrana se visualiza mediante el empleo de colorantes vitales tales como la eosina y el azul tripán, los cuales penetran a través de las células que han sido dañadas mientras que las vivas lo excluyen, al final se evalúa la reacción de acuerdo al grado de mortalidad celular. (2, 75). Ya que la preparación de linfocitos frescos y almacenados constituyen un grave problema que se hace evidente en la viabilidad, se ha diseñado un método de congelación y almacenamiento de paneles celulares en placa, que nos proporciona grandes ventajas con respecto al tiempo, costo, gasto de reactivos, viabilidad, productividad y confiabilidad del método. De acuerdo a la literatura en 1970 ya se había descrito un método de congelación programada, el cual utilizaba un equipo altamente costoso, imposible de adquirir en los laboratorios de tipificación (55,85).

En 1984, Baroci S., Constantini M. y col. diseñaron otro método de congelación y almacenamiento de linfocitos, usando un equipo común de laboratorio. (4,6).

El método que hemos diseñado lleva las bases de lo ya existente en la literatura, sólo que se han hecho bastantes modificaciones para lograr su estandarización de acuerdo a los requerimientos del laboratorio y establecerlo como un método confiable, económico y capaz de ser llevado a cabo en cualquier laboratorio que cuente con una unidad de ultra baja temperatura que alcance una temperatura de -80°C . (8), (69).

FUNDAMENTACION DEL TEMA

FUNDAMENTACION DEL TEMA:

El descubrimiento de que la capacidad de sobrevivir de un transplante era mayor si el donante y el receptor eran HLA y ABO idénticos, que si sólo eran similares en uno de los dos, demostró que el HLA era un sistema de histocompatibilidad - importante y su estudio ha tenido como efecto un incremento en la viabilidad de los trasplantes de órganos. El fenómeno de rechazo muestra dos características clave - de la inmunidad: la memoria y la especificidad y solamente resultan susceptibles para experimentar el fenómeno de rechazo del injerto aquellas regiones del organismo receptor que son accesibles para el sistema inmunitario, también se sabe que la capacidad para rechazar los injertos puede transferirse con linfocitos previamente - sensibilizados. Estas y otras observaciones confirman la responsabilidad del sistema inmunitario en el rechazo del injerto. En los trasplantes renales fue en donde primero se observó la importancia de la compatibilidad HLA entre el donante y el receptor. Las cifras sobre la importancia de la identidad HLA en la supervivencia del riñón son claras: Si nos referimos a los loci HLA-B y HLA-DR, si son idénticos entre el donante y el receptor, la supervivencia del injerto al cabo de un año es de 90%, cuando hay total diferencia entre los cuatro loci es de 79% y con respecto a - los loci HLA-A y HLA-B, un 40% si son idénticos y 16% si no son idénticos. Se observa que la identidad HLA es importante incluso en el uso de potentes inmunosupresores.

La importancia del HLA hace que sea necesario establecer un mecanismo en el - cual sea posible encontrar un receptor adecuado para un donante dado, de tal forma que la disparidad HLA sea la mínima posible. Para ello se crean listas de espera - con los enfermos potenciales receptores de un riñón que han sido previamente tipificados y se tiene registrado sus respectivos fenotipos HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-DR. Una vez determinado el fenotipo HLA del donante puede iniciarse la búsqueda de los receptores adecuados (39).

Una vez elegidos los potenciales receptores en función del grupo sanguíneo y compatibilidad HLA, se realiza previo al trasplante, una prueba cruzada (cross-match) en la que se enfrenta el suero del receptor con linfocitos del donante. Si se produce muerte celular (mediada por complemento), el trasplante no se lleva a cabo pues el receptor tiene anticuerpos frente a los determinantes HLA del donante que podrían dar lugar a un rechazo hiperagudo, los cuales están causados por anticuerpos dirigidos contra los grupos sanguíneos o bien contra los antígenos HLA de clase I. En la actualidad se llega a transplantar con pruebas cruzadas positivas, esto es válido en pacientes hiperinmunizados, aún así es más importante el grado de compatibilidad en los antígenos HLA, cuanto mayor sea el número de antígenos que comparten el donante y el receptor, mayor es la probabilidad de que el injerto evolucione favorablemente. En similar situación se encuentran las condiciones para el trasplante de otros órganos como son: médula ósea, córnea, hígado, corazón, pulmón y páncreas. Hay que resaltar la importancia que tiene el sistema HLA en todos los trasplantes ya que todas las células del organismo expresa, en mayor o menor grado, dichos antígenos en su superficie. Es verdad que en algunos tipos de trasplantes (como hígado y corazón) no se toma en cuenta esa compatibilidad HLA, como debe de ser, ya que esto es debido a medios logísticos (tiempo de isquemia fría, etc.) que impiden se búsque una pareja donante/receptor lo más adecuada posible, sin que ello implique un deterioro del órgano a transplantar. Debido a esta causa es muy baja la tasa de éxitos de trasplante, pero se espera que en un futuro la elección de la pareja donante/receptor tenga más en cuenta la compatibilidad HLA en todos los trasplantes que se realicen. (39) (fig. 7)

Dado que la comprensión del HLA aumenta tanto en el número de sus loci y al los, como en su aplicación: la cual va desde trasplantes de órganos, transfusiones, asociación a diversas enfermedades, pruebas de paternidad, producción de anticuerpos monoclonales, mapeo genético hasta investigaciones antropológicas; las necesidades de grandes cantidades de reactivos HLA también deberán aumentar (59).

Aún cuando existen varias fuentes de antisueros-HLA, como son pacientes sometidos a múltiples transfusiones, mujeres multíparas, etc. (anteriormente mencionados) la mayoría de los sueros contienen anticuerpos que reconocen simultáneamente diferentes antígenos HLA (multiespecíficos), los sueros que detectan un sólo antígeno HLA (monoespecífico) son muy raros y difíciles de obtener. En consecuencia no es fácil establecer la composición antigénica de los linfocitos y tienen que utilizarse microtécnicas cuidando de conservar la cantidad limitada de antisueros específicos comerciales, ya que tienen un valor muy elevado por lo que es difícil proveer al laboratorio de los mismos, además tomando en cuenta la situación económica por la que pasa nuestro país, donde la obtención de recursos para el laboratorio se encuentra muy escasa y repercute en el abastecimiento de reactivos y material biológico para el diagnóstico clínico a todos los niveles institucionales y como consecuencia también a los pacientes de bajos recursos económicos. Por tal motivo se tiene un gran interés en obtener antisueros HLA provenientes de placentas y determinar su especificidad.

Se eligió la placenta, como fuente de obtención de antisueros HLA, por las ventajas que representa como son: 1) Es un órgano de desecho, 2) Se obtienen grandes cantidades de suero, 3) No es necesario convencer al paciente para que done la muestra, y 4) Se adquiere en grandes cantidades por la alta tasa de natalidad que hay en nuestro país.

Para tal fin se requiere la formación de un panel celular específico de referencia, con linfocitos de la población mexicana y conservar ese panel por la técnica de congelación y almacenamiento celular en placa. Este sistema daría como ventajas: la reducción de tiempos y costos, mayor acceso a reactivos y a material, y el incremento notable a la confiabilidad de resultados ya que después de la congelación las funciones celulares se mantienen. Se pretende entonces obtener mayor beneficio a bajo costo.

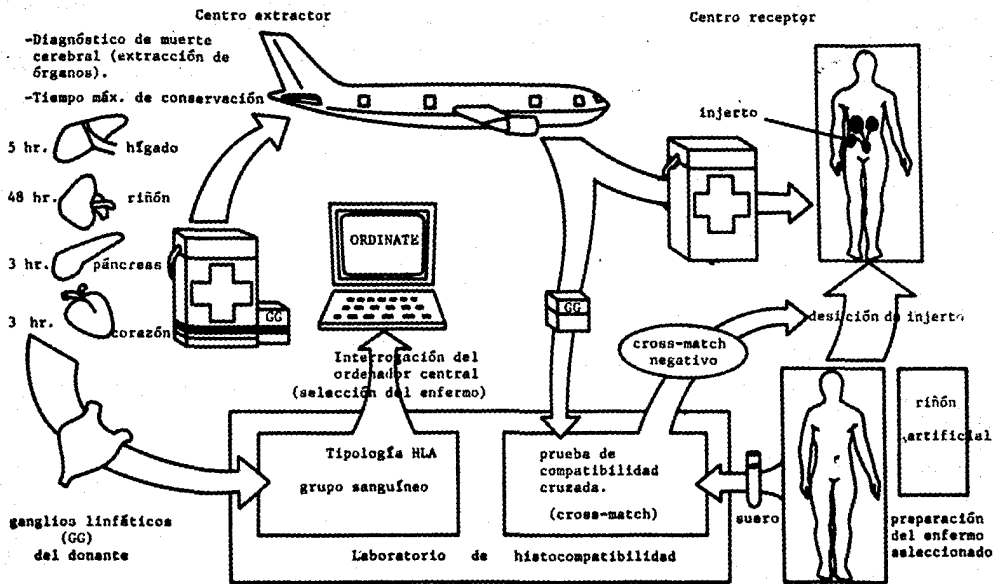


Figura N^o 7.- Papel del Laboratorio de Histocompatibilidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los conocimientos actuales de los antígenos de histocompatibilidad se han establecido en la población caucásica, dado que las frecuencias de alelos como en combinaciones de ellos varían notablemente según la raza nos crea problemas como: -No poder usar tablas de frecuencias extranjeras. -Los marcadores asociados a patologías (salvo B27 con espondilitis anquilosante) no son del todo universales. -Antisueros caracterizados en una población pueden mostrar inexplicable reactividad o estar ausente en otras. -El número de antígenos indeterminados (blancos) en la población mexicana es muy alto, esto pudiera deberse a la ineficacia de los antisueros antes descritos o bien a la existencia de alelos exclusivos de nuestra raza. Lo anterior constituye las razones para establecer un banco de antisueros propio de nuestra población con el fin de tener todas las especificidades reconocidas internacionalmente así como disminuir en gran medida los antígenos indeterminados.

Los antígenos de histocompatibilidad se determinan serológicamente por la técnica de microcitotoxicidad; la principal desventaja de esta técnica es que no se cuenta con un panel de referencia de linfocitos de población mexicana, otra desventaja es que los sueros comerciales reconocen antígenos de poblaciones caucásicas además de que todos son muy caros y su empleo debe ser muy cuidadoso. Por lo tanto el presente trabajo pretende: 1) Estandarizar un método de congelación y almacenamiento de células, que en comparación con el método habitual traerá grandes ventajas, tanto en la reducción de tiempo y gasto de reactivos empleados como la confiabilidad de los resultados, además de que es una técnica que se puede realizar sin la necesidad de un equipo costoso. 2) Formar un panel celular con especificidades de población mexicana. 3) Establecer un programa de búsqueda de antisueros HLA para determinar las especificidades de los antisueros provenientes de las placentas humanas

evaluandolos como reactivos HLA, disminuyendo así el precio de estos sueros en un gran porcentaje con respecto a los sueros comerciales.

4) Implementar la técnica de congelación para diferentes estudios biológicos como son trasplantes de órganos y tejidos, producción de anticuerpos monoclonales, genética poblacional, serología HLA, etc.

5) Intercambio con otros laboratorios para expandir nuestro panel de tipificación. Se pretende así obtener mayor beneficio a bajo costo.

OBJETIVOS

- 1) Diseñar y estandarizar un método de congelación y almacenamiento de células.
- 2) Construir un panel celular con especificidades mexicanas.
- 3) Establecer un programa de búsqueda de antisueros tipificadores del Sistema HLA a partir de placentas humanas.
- 4) Realizar la evaluación de dicha fuente como reactivos HLA.
- 5) Comparar este método con el comúnmente usado.
- 6) Obtener mayor beneficio a bajo costo.
- 7) Seleccionar antisueros para intercambio nacional e internacional.

HIPOTESIS

**Un panel de linfocitos obtenidos en la población mexicana,
seleccionará antisueros más específicos para los marcadores
locales.**

MATERIAL Y METODOS

REACTIVOS:

Linfograd (ficoll-hypaque) Lab. Microlab.

Medio R P M - I (1640) Lab. Microlab.

Dimetilsulfóxido. J.T. Baker, S.A. de C.V.

Aceite mineral (U.S.P.) Lab. Loitz, S.A. de C.V.

SOLUCIONES: (*)

Formalina al 40% con P.B.S.

Eosina amarillenta al 5% con agua destilada

Azul tripán al 3% con EDTA pH= 7.2

E D T A disódico pH = 7.2

Diluyente de complemento

P.B.S. (buffer de fosfatos pH = 7.2)

Solución Hanks (solución salina balanceada).

MATERIAL BIOLÓGICO:

S.F.T. (Suero fetal de ternera)

Complemento de conejo

Sueros de placentas

Sueros de referencia. Química Hoechst y Pel-Freeze.

Suero control negativo

Suero control positivo

Linfocitos purificados .

(*) Ver preparación de soluciones, en apéndice.

MATERIAL DE LABORATORIO:

Coladores de plástico

Recipientes de plástico de 1 lt. para recolectar el suero de placenta.

Guantes de cirujano

Pipetas Pasteur. Robbins Scientific Corp.

Tubos de ensaye 13 X 100 . Pyrex. para separar linfocitos.

Pipetas graduadas de 1 ml, 5 ml y 10 ml. Pyrex.

Tubos con tapón de rosca de 15 X 150 mm. Pyrex.

Perlas de vidrio

Gradillas metálicas para tubos de ensaye

Frascos de cristal de 100 ml.

Microplacas para microcitotoxicidad. Terasaki y Falcon U.S.A.

Tubos para centrifuga de plástico con tapón de rosca. Nunc.

Jeringas Hamilton de 50 ul y 250 ul. Robbins Scientific. Corp.

EQUIPO:

Microcentrifuga Beckman 152

Centrifuga Beckman T J - 6 con unidad de refrigeración.

Agitador tipo Vórtex. Sybron/Thermoline Maxi Mix.

Microscópio óptico Carl ZEISS

Microscópio invertido con condensador de contraste de fases "American optical"

Congelador de ultra baja temperatura "REVCO"

Refrigerador vertical "American"

Congelador vertical "American"

Incubadora "Incubaril"

EXTRACCION DE SUEROS DE PLACENTAS

Se recolectan las placentas de mujeres mexicanas provenientes del servicio de obstetricia del Centro Hospitalario 20 de Noviembre y se procesan de acuerdo al siguiente método:

- 1.- Se recibe la placenta en una bolsa de plástico, inmediatamente después se escurre el suero sobre el tamiz con un recipiente de recolección.
- 2.- La placenta es dividida en varias porciones que se colocan sobre el tamiz, se tapan con un plástico y se comprimen con una prensa de aprox. 2 kg., se deja escurrir durante 30 min.
- 3.- Todo el material extraído se centrifuga a 3 000 r.p.m. durante 30 min. a 4°C.
- 4.- El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 3 000 r.p.m. durante 30 min. a 4°C.
- 5.- El suero obtenido se almacena a -20°C en frascos de cristal de 100 ml, correctamente rotulados.
- 6.- Aparte se preparan unas microfucotas de 400 ul en tubos para microcentrifuga "Nunc" y se almacenan a -20°C., listas para usarse cuando se requieran.

PURIFICACION DE LINFOCITOS:

La purificación de linfocitos de sangre periférica se logra por centrifugación en gradiente de densidad sobre una mezcla de Ficoll-Hypaque (la densidad de la mezcla deberá estar entre 1.076 y 1.078). Después de la centrifugación, los eritrocitos y polimorfonucleares se depositan en el fondo, mientras que los linfocitos permanecen cercanos a la interfase entre el suero y la solución separadora.

Material:

Linfograd (Ficoll-Hypaque) Lab. Microlab; México.

Solución salina balanceada de Hanks. Lab. Microlab; México.

Método:

- 1.- Se toma la muestra de sangre por punción venosa (20 ml)
- 2.- Se coloca la sangre en tubos de rosca (con perlas de vidrio) y se desfibrina mecánicamente por rotación.
- 3.- En un tubo de ensayo se colocan 3 ml de la solución de Ficoll-Hypaque.
- 4.- Se estratifica cuidadosamente la sangre con una pipeta Pasteur sobre el linfograd para evitar que se mezclen ambas fases.
- 5.- Se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 40 minutos.
- 6.- La banda de linfocitos se recupera con la ayuda de una pipeta Pasteur y se coloca en un tubo de ensayo.
- 7.- Se lavan los linfocitos con solución de Hanks centrifugando a 2500 rpm por 10 min. Se repite esta operación 2 veces más.

SEPARACION DE LINFOCITOS T y B.

El método empleado para la separación de los linfocitos T y B, se basa en la capacidad que tienen los linfocitos B y los macrófagos de adherirse a la fibra de nylon. Así cuando la suspensión celular es pasada a través de una columna de lana de nylon se eluyen los linfocitos T, mientras que los linfocitos B son liberados mecánicamente por compresión. Mediante este método, se obtiene una pureza de linfocitos T del 96%, por lo que es recomendable para la separación de subpoblaciones de linfocitos.

Material:

Además del descrito anteriormente:

Medio de Cultivo McCoy 5a modif. Lab.Microlab; México. Se le añade 5% de suero fetal de ternera (SFT).

Fibra de lana de nylon.

Columnas de plástico de 6mm de diámetro y de 12-14 cm de largo.

Preparación de la columna de nylon.

- Sellar con calor un extremo de la columna con ángulo de 45°.
- Pesar 100 mg de fibra de nylon y sumergirla en solución de Hanks.
- Empacar el nylon dentro de la columna, debiendo quedar el relleno de aproximadamente 6 cm de largo.
- Hacer un orificio a la columna por el extremo sellado de manera que permita el flujo de líquidos.
- Llenar la columna con medio de cultivo (5% SFT) y colocarla horizontalmente dentro de una estufa a 37°C durante 30 min; sellando con medio de cultivo.

Material biológico:

Linfocitos totales purificados.

Método:

- 1.- Los linfocitos purificados se resuspenden en 0.5 ml de medio de cultivo.
- 2.- Poner la columna (preincubada) verticalmente y aplicar la suspensión de células con la ayuda de una pipeta Pasteur de tal forma que ocupa la totalidad del espacio relleno de fibra teniendo cuidado de sellarla.
- 3.- Incubar la columna horizontalmente a 37°C por 30 min.
- 4.- Se coloca la columna verticalmente sobre un tubo de ensayo y se lava con 15 ml de medio McCoy (5% SFT), para recuperar los linfocitos T. Las células obtenidas en la primera lavada serán utilizadas para la determinación de especificidades -A, -B.
- 5.- Se centrifuga el tubo de linfocitos T a 1500 rpm durante 10 min.
- 6.- Descartar el sobrenadante y resuspender los linfocitos en medio de cultivo (5% SFT).
- 7.- Contar las células en un hemocitómetro y ajustarlas a una concentración de 4×10^6 células/ml con medio de cultivo.

PRUEBA DE VIABILIDAD.

Debido a que la prueba de microcitotoxicidad requiere de linfocitos vivos, es necesario vigilar su viabilidad, determinándola por la exclusión de un colorante vital como el azul tripán. El porcentaje de viabilidad que se considera adecuado es de 90%, como mínimo.

Material:

- Azul tripán (Hartman London Co. Philadelphia, E.U.A.), diluido al 1% con con agua destilada.
- Solución salina amortiguada, pH = 7.0 - 7.4 (FTA). COPMI 44/45 . Behring Inst.
- EDTA disódico. J.T. Baker Chem. Col, al 2% con solución salina amortiguadora, pH = 7.2
- Colorante: Mezclar 3 partes de azul tripan al 1% con 7 partes de EDTA al 2%, quedando la concentración final al 0.3%

Método:

- 1.- Se mezcla 0.1 ml de la suspensión de linfocitos con 0.1 ml del colorante en un tubo de ensaye.
- 2.- Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 3.- Colocar una gota de la mezcla sobre un portaobjetos, cubrir con un cubreobjetos.
- 4.- Leer usando el objetivo seco fuerte. Las células muertas incorporan el colorante y se tiñen de azul, mientras que las vivas lo excluyen y se observan refringentes.
- 5.- Contar 100 células, calculando el % de viabilidad.

MICROCITOTOXICIDAD.

Hay varias formas de valorar y detectar antígenos y anticuerpos HLA, pero hasta ahora la técnica más ampliamente usada es la citotoxicidad. El método que se empleó es una modificación de Amos a la técnica de Terasaki y Mc Clelland.

La prueba de microcitotoxicidad consiste básicamente en incubar la suspensión de linfocitos con diferentes antisueros; si éstos contienen anticuerpos (Ac) contra antígenos (Ag) HLA se llevará a cabo la reacción Ag-Ac. Si adicionamos suero de conejo como fuente de complemento (C') éste será fijado y activado por el complejo formado lo cual provoca lisis parcial de la célula. La alteración en la permeabilidad de la membrana se visualiza mediante el empleo de un colorante vital - tal 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. 8)

Material:

Además del descrito anteriormente.

Aceite mineral (USP) Sigma de México, S.A.

Colorante azul tripan al 0.3% con EDTA al 2%

Diluyente de complemento.

Material biológico:

Sueros de placentas

Sueros de referencia

Sueros control negativo

Sueros control positivos

Linfocitos T purificados

Complemento de conejo

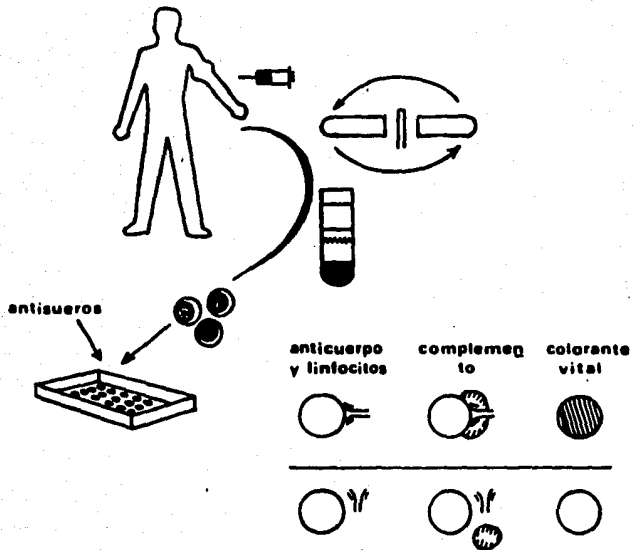


Fig. N° 8.- Prueba de Microcitotoxicidad.

PREPARACION DE PLACAS TERASAXI CON ANTISUEROS

Se añade 5 ul de aceite mineral a cada pozo, para evitar la desecación del antisuero, el cual se coloca en cantidad de 1 ul por pozo y se mantienen en con gelamiento hasta su uso.

METODO DE MICROCITOTOXICIDAD:

- 1.- Descongelar las placas que vayan a usarse dejandolas que alcancen la temperatura ambiente.
- 2.- Añadir 1 ul de la suspensión celular, aprox. 6 000 cels./ ul a cada uno de los pozos de cada placa.
- 3.- Mezclar suavemente empleando un agitador tipo Vórtex.
- 4.- Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 5.- Se pone una gota de solución de Hanks en cada pozo de la placa y se dejan sedimentar las células durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 6.- Sacudir la placa con el fin de eliminar el Hanks y el suero que no reacciona.
- 7.- Se adicionan 5 ul de complemento de conejo a cada pozo y se mezcla suavemente con el agitador.
- 8.- Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 9.- Se deposita en cada pozo colorante azul tripán y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente.
- 10.- La placa se sacude a fin de eliminar el exceso de colorante.

11.- Adicionar una gota de solución de Hanks y dejar que las células sedimenten durante 10 minutos.

12.- Las reacciones son evaluadas en un microscopio óptico en base al siguiente criterio:

Células Muertas (%)	Calificación	Interpretación
0 --- 19	1	Negativo
20 --- 29	2	Negativo
30 --- 49	4	Dudoso
50 --- 79	6	Positivo
80 --- 100	8	Positivo

METODO INICIALMENTE PROPUESTO PARA LA CONGELACION
DE CELULAS EN MICROPLACA.

- 1.- Colocar una microplaca Terasaki en hielo, correctamente rotulada.
- 2.- En cada pozo se colocan 15 ul de mezcla congelante.
Mezcla congelante: 90% de S.F.T. (suero fetal de ternera) y 10%
de D.M.S.O. (dimetilsulfóxido).
Se prepara y se mantiene sumergida en hielo.
- 3.- Se ajusta la concentración de linfocitos a 6×10^6 cels./ml.
Previamente purificados sobre un gradiente de ficoll/hypaque y
resuspendidos en medio de cultivo RPM-I (1640) que tiene 20% de
S.F.T.
- 4.- Se coloca 1 ul de esta concentración celular a la microplaca.
- 5.- Se incuban 10 min. a 4°C
- 6.- Posteriormente se coloca sobre una cama de alcohol al 70% a - 80°C,
durante 24 hrs.
- 7.- Se pasa la microplaca Terasaki al tanque de Nitrógeno líquido (-170°C)
lista para cuando se requiera su uso.

METODO DE CONGELACION CELULAR EN MICROPLACA Y SU ALMACENAMIENTO.**(METODO ESTANDARIZADO)**

- 1.- Se coloca la microplaca sobre un baño de hielo.
- 2.- En cada pozo se colocan 3 μ l de mezcla congelante (90% de suero fetal de ternera [SFT] y 10% de dimetilsulfóxido [DMSO]), la cual se encuentra sumergida en hielo.
- 3.- Se ajusta la concentración de linfocitos a 7×10^6 cels./ml, previamente purificados sobre un gradiente de densidad de Ficoll/hypaque.
- 4.- Los linfocitos se encuentran resuspendidos en medio de cultivo RPMI-1640 (con 20% de SFT); de esta suspensión se coloca 1 μ l en cada pozo.
- 5.- Se agregan 30 μ l de aceite mineral a cada pozo, para evitar deshidratación celular y pérdida celular en los lavados posteriores.
- 6.- Se coloca la microplaca directamente en el congelador REVCO (-80°C), donde se deja de 2 hrs. a toda la noche para posteriormente almacenarla en nitrógeno líquido hasta que se requiera.
- 7.- El almacenamiento puede ser en el REVCO (conservandose hasta un año) ó en nitrógeno líquido, por tiempo indefinido.

METODO DE DESCONGELACION CELULAR EN MICROPLACA.

- 1.- Sacar la microplaca del nitrógeno líquido ó del REVCO, según sea el caso.
- 2.- Transportarla sobre un baño de hielo.
- 3.- Dejarla a temperatura ambiente hasta que se descongele.
- 4.- Inmediatamente después, colocar una gota de SFT frío en cada pozo, utilizando una pipeta pasteur.
- 5.- Se esperan 10 minutos y posteriormente se sacude la placa.
- 6.- Se procede a lavar 2 veces la placa con PBS (solución buffer de fosfatos).
- 7.- La placa se encuentra lista para la tipificación y/o viabilidad; siguiendo la técnica de microcitotoxicidad de Terasaki.

RESULTADOS

TABLA N° 7

RESULTADOS DE LA TECNICA DE CONGELACION CELULAR Y ALMACENAMIENTO.

VARIABLE	DIFERENTES ENSAYOS	EFFECTO POSITIVO	EFFECTO NEGATIVO	SIN ALTERACION ALGUNA
TEMPERATURA	4°C	-	-	*
	-80°C	*	-	-
	-196°C	*	-	-
TIEMPO DE CONGELACION	10 min. a 4°C	-	-	*
	1 año en REVCO	*	-	-
	por años en N ₂ líq.	*	-	-
VOLUMEN DE MEZCLA CONGELANTE	3 ul	*	-	-
	5 ul	-	-	*
	10 ul	-	*	-
	15 ul	-	*	-
VOLUMEN DE ACEITE	sin aceite	-	*	-
	10 ul	-	*	-
	20 ul	-	-	*
	30 ul	*	-	-
	40 ul	-	-	*
CANTIDAD DE CELULAS	6 X 10 ⁶ cels./ml	-	-	*
	7 X 10 ⁶ cels./ml	*	-	-
POSICION DE LAS PLACAS EN EL CONGELADOR	izquierda	-	-	*
	en medio y al fondo	-	-	*
	derecha	-	-	*
CAMA DE ALCOHOL	al 70%	-	-	*
TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	1 día - 1 año (REVCO)	*	-	-
	1 día - años (N ₂ líq.)	*	-	-
VIABILIDAD	REVCO (80%-95%)	*	-	-
	N ₂ líq. (85% - 95%)	*	-	-

* = Reacción que se obtuvo con dicho ensayo.

- = sin reacción.

TABLA N° 8

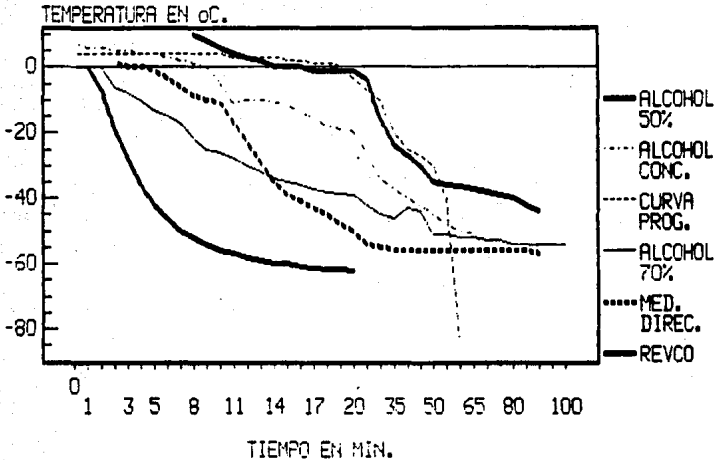
RESULTADOS DE LA TECNICA DE DESCONGELAMIENTO.

VARIABLE	DIFERENTES ENSAYOS	EFFECTO POSITIVO	EFFECTO NEGATIVO	SIN ALTERACION ALGUNA
MEDIO DE CULTIVO PARA LAVADOS	RPM-I 1640	-	-	*
	sol. Hank's	-	-	*
	PBS	*	-	-
NUMERO DE LAVADOS	1 lavado	-	*	-
	2 lavados	*	-	-
TEMPERATURAS DE INCUBACION	10 min - 2 hrs. a temp. ambiente	*	-	-
	10 min.- 2 hrs. a 4°C.	-	-	*
TEMPERATURAS DE DESCONGELACION	37°C	-	-	*
	temperatura ambiente (T.A.)	*	-	-
VIABILIDAD	muy buena con un manejo cuidadoso	*	-	-
CANTIDAD CELULAR	se mantiene al trabajarlas cuidadosamente	*	-	-

* = Reacción que se obtuvo con dicho ensayo.

- = Sin reacción.

GRAFICA N°1



Para determinar las condiciones de congelamiento dentro del REVCO, se probaron las siguientes variantes:

- 1.- Colocar las microplacas en cama de alcohol al 50%
- 2.- Colocar las microplacas en cama de alcohol al 70%
- 3.- Colocar las microplacas en alcohol concentrado.
- 4.- Colocar las microplacas en forma directa.
- 5.- Teniendo como referencia una curva de congelación programada (1°C/min).

Los resultados los encontramos ilustrados en la gráfica N° 1 .

CUADRO N° 1

CONSTRUCCION DE UN PANEL CELULAR CON ESPECIFICIDADES MEXICANAS.

DONADOR CELULAR MEXICANO

ESPECIFICIDAD

1.-CLAUDIA GARCIA	A31 A23(9) B39 BX
2.- DANIEL SALAZAR	A2 A10 B51(5) B35
3.-SOLEDAD RODRIGUEZ	A2 A23(9) B35 BX
4.-IGNACIO PARAMO	A3 Aw19 B8 B17
5.- LETICIA VILLA	A10 Aw19 B5 B35
6.- LUIS A. TERAN	A1 A2 B14 B35
7.- NOEMI RODRIGUEZ	A10 A11 B8 B40
8.- ARMIDA JUAREZ	A2 A10 B8 B14
9.- MARTIN MIRANDA	A2 A28 B5 B35
10.- VERONICA PONCE	A9 A30(w19) B14 B40
11.-JOSE GPE.RODRIGUEZ	A23(9) A29,31(w19) B51(5) BX
12.- OSCAR GALVAN	A2 A9 B51(5) BX
13.- REYNA FLORES CIMA	A2 A23(9) B40 B7
14.- DAVID GARCIA	A2 A26 B51(5) BX
15.- CARLOS SANCHEZ	A1 A10 B7 B8
16.- ERASMO MARTINEZ	A2 A9 B51(5) B12
17.- ANGEL CAMARENA	A9 A10 B5 B21
18.- SIGIFREDO PEDRAZA	A2 Aw19 B5 B21
19.- OLIVIA HERNANDEZ	A2 Aw19 B44(12) BX
20.- RICARDO VAZQUEZ	A1 A3 B8 B15
21.- ANGELES MENDOZA	Aw19 A23(9) B13 BX
22.- GEORGINA MARTINEZ	A9 A10 B12 B14
23.- MA.TERESA HERRERA	A28 A26(10) B12 B14
24.- ELBA VALENCIA M.	A9 A30(w19) B12 B39(16)
25.-MANUEL MIRANDA C.	A2 A3 B5 B21
26.- RITA GONZALEZ	A1 A10 B44(12) BX

PROGRAMA DE BUSQUEDA DE ANTISUEROS HLA.

Selección de sueros para anticuerpos HLA

Laboratorio clínico



Detectar:

Antisueros: clase I
 clase II
 frecuentes
 pac. transplantados
 pac. con rechazo

programa
 de
 trasplantes

Laboratorio de investigación



Definir:

Clase I
 Clase II
 frecuentes
 baja frecuencia
 nuevas especificidades

FASES DEL
PROGRAMA

Fuentes de antisueros
 construcción de un panel de linfocitos
 análisis e interpretación de datos

FUENTES DE
ANTISUEROS

Placentas de mujeres multíparas
 Intercambio

Un gran número de sueros de placenta
 deberán probarse.



Utilizar un panel celular lo más
 completo posible.



Emplear un método estadístico adecuado
 para caracterizar los antisueros.

CONSTRUCCION DEL PANEL CELULAR

Los individuos que constituyan el panel deberán de enterarse del estudio y sus implicaciones.

Recolección de datos:

Nombre _____ Proyecto _____
 Dirección _____ Fenotipo _____
 Telefono _____ Grupo racial: _____
 N° de sangrías _____ Indígena _____ Mestizo _____
 _____ Tiempo de participación _____
 _____ Aceptación de cooperación _____
 _____ Responsable del proyecto _____

El panel de linfocitos debe de tener las siguientes características:

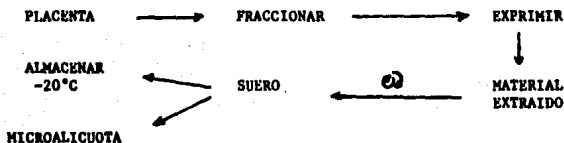
- Tener una adecuada representación de todas las especificidades, así como de antígenos indeterminados.
- Cada antígeno debe estar representado en 2 ó 3 paneles diferentes:
 - a) Un panel que contenga las especificidades más frecuentes en la población mexicana.
 - b) Otro que contenga los antígenos de baja frecuencia.
 Resulta difícil para un laboratorio adquirir tal panel especializado, de ahí que se recomienda usar la ayuda de un laboratorio de referencia, por lo que es importante contar con paneles de grupos raciales al nuestro.
 - c) Debemos incluir un panel en donde se encuentren uno ó más antígenos indeterminados "blancos" con el objeto de identificar nuevos alelos.

Para seleccionar las células del panel, se eliminaron aquellas que:

- presentaban antígenos del mismo grupo de reactividad cruzada.
- las que resultaron homocigotas.
- y las que presentaban la combinación de un antígeno con alguno de sus "splits" (subtipos).

Con dos de los 3 paneles anteriores, se puede aumentar la eficacia sin sacrificar calidad en la caracterización del suero.

COLECCION DE LOS SUEROS



Los sueros deben ser probados con linfocitos provenientes de sangre fresca y ahora con la ventaja de poder probarlos también con células congeladas.

La técnica utilizada para seleccionar a los sueros deberá ser la misma utilizada para la tipificación HLA.

ANALISIS DE DATOS

Para determinar la especificidad de un suero, es mediante la comparación de reactividad entre sueros problema y sueros de referencia de un panel celular. Esto se logra mediante el uso de tablas de 2 X 2 .

		SUERO DE REFERENCIA	
		+	-
SUERO	+	a	b
PROBLEMA	-	c	d

Donde: a = ++ concordantes positivas
 b = +- falsos positivos
 c = -+ Falsos negativos
 d = -- concordantes negativos

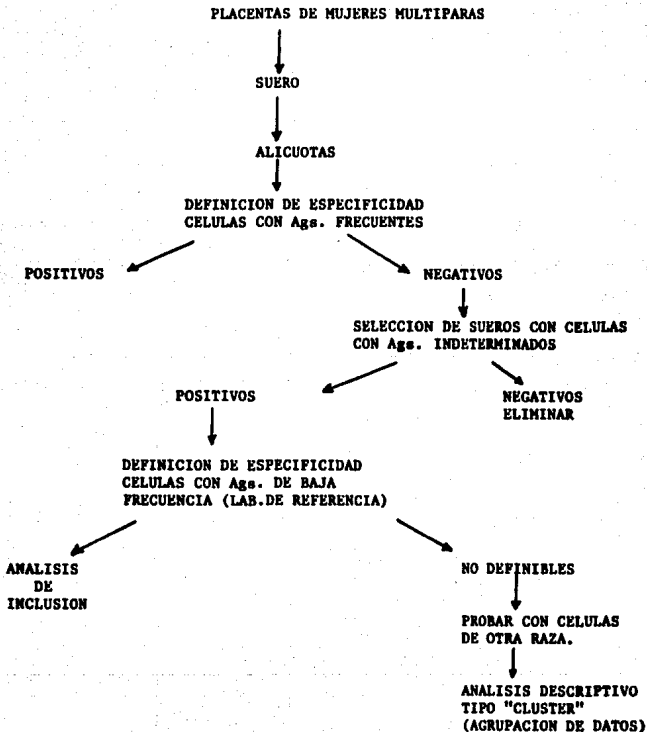
Para examinar un gran número de sueros y para asignar la especificidad adicionales, se puede utilizar el llamado análisis de inclusión.

El programa de computadora para dicho análisis incluye una tabla de 2 X 2 , la X^2 y el coeficiente de correlación (r). Sin embargo este método no reconoce subespecificidades a menos que su existencia haya sido previamente tomada en cuenta, por lo que para un mejor análisis, deberá ser necesario un análisis descriptivo.

La definición de nuevos antígenos ó subespecificidades requiere de probar linfocitos de otras razas.

Cuando una nueva serie de antígenos es explorada, tal como el DQ, en tonces un programa tipo "Cluster" (agrupación) es decir para analizar datos que tienden a agruparse, se puede utilizar.

ESQUEMA GENERAL DE BUSQUEDA DE ANTISUEROS HLA



ANALISIS DE RESULTADOS

La determinación de varios parámetros en diferentes ensayos (ver tabla N^o 7 y N^o 8), permitieron llegar al diseño de una técnica de congelación celular en microplaca. Así, tenemos que:

- 1.- La temperatura de congelación juega un papel muy importante, pues se observó que si se trabaja todo el procedimiento sobre hielo, no es necesario incubar la placa a 4°C, sino que se coloca directamente en la unidad de congelación (REVCO a -80°C) obteniendo resultados satisfactorios.
- 2.- Con respecto al tiempo de congelamiento, se observó que después de dos horas en el REVCO (-80°C) ya se podían pasar al nitrógeno líquido, sin llegar a alterar la membrana celular.
- 3.- El volumen de mezcla congelante se fue variando desde 15 ul hasta 3 ul; se observó que no afectaba a la viabilidad pero sí a la cantidad, pues entre mayor volumen se colocaba, en el momento de los lavados se llegaban a perder más células, en cambio con un volumen de 3 ul se conserva más la cantidad de células.
- 4.- El volumen de aceite mineral se estableció en 30 ul, ya que aparte de conservar hidratadas a las células, permitía que se perdieran menos células.
- 5.- Para ayudar a mantener un buen número de células después de descongelar la placa, se optó por sembrar 7×10^6 cels./ml en lugar de 6×10^6 cels./ml, lo cual resultó muy beneficioso; ya que en efecto se mantuvo una mayor cantidad de células.
- 6.- La posición de las placas en el congelador, no alteró en ningún aspecto los resultados de congelación.
- 7.- Según los resultados de la gráfica N^o 1, la congelación en cama de alcohol al 50% es gradual, comparable a la de un equipo costoso donde la congelación es programada a 1°C/min., la que se supone es ideal.

- 8.- En cama de alcohol al 70%, la temperatura de congelamiento también es gradual aunque es un poco más rápida.
- 9.- En cama de alcohol concentrado, el congelamiento es gradual a una velocidad intermedia entre las dos anteriormente mencionadas.
- 10.- El congelamiento en forma directa, aunque primero es gradual a partir de los 10 minutos donde registra una temperatura de -10°C , sufre una caída rápida y a los 15 minutos ya ha alcanzado -40°C , posteriormente se vuelve a ser lento.
- 11.- La cama de alcohol a cualquier concentración es poco práctica, ya que no es posible apilar varias placas, puede llegar a derramarse, esto provoca la desnaturalización del medio e incluso llega a matar a las células.
- 12.- Se observó que la velocidad de congelamiento celular dentro del REVCO, no afecta la membrana celular, por lo que se optó meter las placas directamente.
- 13.- El tiempo de almacenamiento en el REVCO es amplio, va desde días hasta un año, en este caso se probó hasta 6 meses dando buenos resultados de viabilidad (80% - 95%).
- 14.- El almacenamiento en nitrógeno líquido es por tiempo indefinido, las células se conservan con muy buena viabilidad (85% - 95%), lo cual trae grandes ventajas por ser un método aplicable a otros estudios biológicos.
- 15.- Al descongelar se observó que los 3 medios de cultivo utilizados para hacer los lavados, daban igual resultado, optándose por el PBS con fines prácticos en cuanto a uso, preparación y rendimiento.
- 16.- Se estableció hacer 2 lavados posteriores a la descongelación porque con uno, quedaba residuos de DMSO perjudicando la viabilidad celular.
- 17.- En cuanto a los tiempos de incubación a temperatura ambiente (T.A.), se observó que después de descongeladas las células conservaban una buena via-

bilidad hasta 2 hrs, lo que permite trabajar correctamente la técnica de microcitotoxicidad a T.A. .

18.-La temperatura de descongelación puede ser de 37°C ó de T.A., sin que exista alteración celular y en cuestión de tiempo no es muy grande la diferencia, lo que nos da la ventaja de trabajar a T.A. cuando no se encuentre disponible un baño maría a 37°C ó cuando se trabaje un gran lote de placas.

19.-Se ha comprobado que trabajando adecuadamente esta técnica con todos los cuidados y detalles que ésta implica, se logra conservar una buena cantidad celular, además de una excelente viabilidad.

20.- Con el propósito de obtener sueros anti-HLA de una fuente natural y órgano de desecho como es la placenta humana, se exprimieron mecánicamente 585 placentas, de los sueros obtenidos 252 fueron citotóxicos al ser probados con un panel formado al azar, para observar citotoxicidad. Posteriormente serán enfrentados a un panel selectivo, formado por especificidades representativas de la población mexicana; los resultados obtenidos serán sometidos a un análisis estadístico para establecer su especificidad correspondiente y así finalmente lograr la obtención de sueros anti-HLA específicos, en buena cantidad, calidad y a bajo costo.

21.- Se construyó un panel celular con especificidades conocidas (Cuadro N°1) dicho panel fue sometido a la técnica de congelación diseñada, posteriormente después de la descongelación se determinó nuevamente sus especificidades HLA, los resultados demostraron que aún después de descongeladas, las células no sufren cambio alguno en sus determinantes antigénicos. Se comprobó también que efectivamente la técnica diseñada en comparación con la técnica usual de microcitotoxicidad ahorra tiempo, uso de material y reactivos; y sobre todo abate en gran porcentaje el costo que estas pruebas provocan.

CONCLUSIONES

Los objetivos planteados fueron alcanzados en gran medida, ya que los resultados obtenidos después de un exhaustivo estudio y una amplia experimentación, demostraron ser satisfactorios.

- Se diseñó un método de congelación y almacenamiento celular en microplaca que:

- 1) Sólo requiere como equipo indispensable una unidad de congelación que alcance una temperatura de -80°C , en este caso se utilizó el REVCO, este equipo se encuentra en cualquier laboratorio de investigación, al igual que los reactivos utilizados.
- 2) Después del congelamiento conserva a las células enteras, manteniendo su actividad biológica, lo que da seguridad, calidad y eficacia al método.
- 3) Da la ventaja de congelar en una sola vez un gran lote de paneles celulares.
- 4) Evita el sangrado de pacientes y la separación de una gran cantidad de células, cada vez que se realicen estas pruebas.
- 5) Permite probar un gran número de sueros indeterminados en poco tiempo.
- 6) Conserva el panel celular específico congelado y almacenado hasta el momento que se requiera, (en REVCO hasta un año y en N_2 líquido por tiempo indefinido).
- 7) Comparado con el método comúnmente usado, reduce gasto de reactivos, tiempo, uso de material y costos.

De acuerdo a los puntos anteriormente mencionados se llega a la conclusión de que es un método sencillo, eficaz y seguro; que nos proporciona mayor beneficio a bajo costo, además de ser aplicable a una gran diversidad de estudios biológicos.

- Su aplicación en la búsqueda de antisueros HLA a partir de placentas humanas es muy importante, pues sólo va a ser necesario probar los sueros, inmediatamente después de obtenidos, con el panel específico de la población mexicana congelado y así los resultados positivos someterlos a un análisis estadístico (actualmente programa de computadora) para llegar a la determinación de su especificidad.

- La obtención de sueros a partir de placentas humanas, indican que la extracción mecánica a temperatura ambiente es muy satisfactoria, pues permite una selección previa en cuanto al estado físico (sin putrefacción) y el volumen obtenido (más de 35 ml). Los resultados obtenidos indican que de 585 sueros 252 sueros, aproximadamente la tercera parte, presentan reactividad citotóxica, lo cual es comparable con los datos reportados en la literatura.

- La construcción del panel celular con especificidades mexicanas:

- 1) Nos permite descartar sueros negativos.
- 2) Acelerar el trabajo de búsqueda de antisueros HLA.
- 3) Intercambiar dicho panel además de antisueros específicos, con laboratorios de investigación tanto nacionales como internacionales y así, ampliar más el número de especificidades reconocidas.

- El programa de búsqueda de antisueros HLA planteado, permite procesar los sueros de una manera ordenada, precisa y segura para obtener sueros anti-HLA específicos en poco tiempo y a un bajo costo.

Con el estudio realizado en el presente trabajo se pretende solucionar algunos de los problemas que actualmente enfrentan los laboratorios de inmunogenética en nuestro país y que al continuar con este programa poco a poco irán desapareciendo.

Sólo queda mencionar que en la búsqueda de sueros anti-HLA, se logró llegar hasta la prueba de citotoxicidad, seleccionando los sueros citotóxicos provenientes de placenta; no fue posible determinar a dichos sueros su especificidad, ya que no se contaba con el material necesario debido a la crisis económica que en este momento atraviesa nuestro país, sin embargo este estudio abre las puertas a la investigación de HLA y actualmente se sigue trabajando sobre este protocolo, aplicando los avances adquiridos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Albert, E. Histocompatibility Testing. Ed. Springer-Verlang. Heidelberg. New York. (1984).
- 2.- Amos, D.B., Bashir, H., Boyle, W., MacQueen, M., Tulikainen, A. A simple microcitotoxicity test. Transplantation 7:3, 220-223 (1969).
- 3.- Bach, F.H., Van Rood, J.J. The major histocompatibility complex-genetics and Biology. N. Engl. J. Med. 295, 806-813 (1976).
- 4.- Balachandran, R., Thampatty, P., Rinaldo, CH., and Gupta, Ph. Use of cryopreserved normal peripheral blood lymphocytes for isolation of human immunodeficiency virus from seropositive men. J. Clin. Microbiol. 26 : 595-597 (1988).
- 5.- Barnstable, C.J., Jones, E.A. Isolation, structure and genetics of HLA-A, -B, -C, and -DRw (Ia) antigens. Br. Med. Bull. 34:3, 241-246 (1978).
- 6.- Barocci, S., Constantini, M., and Manca, F. A simple procedure for freezing and storing lymphocyte panel in trays. J. Immunol.Methods. 69, 17-21, (1984).
- 7.- Barth, C.L., Hayashi, H., and Deegan, M.J. Frozen RPM-8402 cells: a reliable source of terminal deoxynucleotidyl transferase positive control material. J. Immunol. Methods. 76 : 205-209 (1985).
- 8.- Bates, J.F., and Snell, K.W.: Preparation of frozen lymphocyte panels in Terasaki trays. In Histocompatibility Testing, 1970, (ed. P. I. Terasaki) Munksgaard, Copenhagen, 633-638 (1970).
- 9.- Behring, A.G. HLA-System. Ia. ed. English, D-3550 Marburg/lahn, West Germany. 6-66 (1982).
- 10.- Benacerraf, B. Role of MHC gene products in immune regulation. Science 212, 1229-1238 (1981).
- 11.- Bodmer, W.F. HLA Today. Human Immunology. 17: 490-503 (1986).
- 12.- Bodmer, W.F. HLA structure and function: A contemporary view. Tissue Antigens 17, 9-20 (1981).

- 13.- Brook, M.A. Seasonal changes in recovery of cryopreserved murine lymphocytes resemble endogenous rhythms of unfrozen cells. *Cryobiology* 24:412-419(1987).
- 14.- Colombani, J., Colombani, M., Benbonan, M. Transplantation antigens studied by complement fixation methods: HLA and non HLA on platelets in relation to platelet transfusion. In Rose, N.R., Friedman, H. (ed.) *Manual of Clinical Immunology*. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C. (1980).
- 15.- Dausset, J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.* 20, 156-158 (1958).
- 16.- Dorf, M. : Major histocompatibility complex in immunobiology. Garland Press. New York (1981).
- 17.- Farrant, J., Knight, S.C., Mc Grann, L.E. and O'Brien, J.: Optimal recovery of lymphocytes and tissue culture cells following rapid cooling. *Nature* 249 : 452-453 (1974).
- 18.- Farrant, J. Walter, C.A. and Knight, S.C.: Cryopreservation and selection of cells. In *Cryoimmunology*, 62 :3-11, INSEEM, Paris. (1976).
- 19.- Ferrara, G.B., Tosi, R.M., Azzolina, G., Carminati, G., Kiesmeyer-Nielsen, F. The production of anti HL-A cytotoxic antisera through planned immunization by intravenous injection of small aliquots of whole blood. *Tissue Antigens* 2 , 359-373 (1972).
- 20.- Festenstein, H., Demant, P. *Inmunogenética Fundamental, Biología y Aplicaciones Clínicas del HLA y H-2*. Ed. El Manual Moderno. México, D.F. (1981).
- 21.- Fritz, H., Bach, M.D. and Van Rood, J.J., M.D. The major histocompatibility complex - genetics and biology. *The New England Journal of Medicine* 295 N^o 17. 927-936 (1976)
- 22.- Gill, T.J. Immunogenetics of spontaneous abortions in humans. *Transplantation* 35 : 1, 1-6 (1983).
- 23.- Golub, E.S. *The cellular basis of the immune response*. Ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland Mass. (1981).
- 24.- Corer, P.A., Lyman, S., Snell, G.D. Studies on the genetic and antigenic basis of tumor transplantation. Linkage between a histocompatibility gene and "fused" in mice. *Proc. Roy. Soc.* 135, 499-505 (1948).

- 25.- Gorodezki, C., Terán, L. and Escobar, A. HLA frequencies in a mexican mestizo population. *Tissue Antigens* 14 : 347-352 (1979).
- 26.- Jewett, M.A.S., Hansen, J.A. and Dupont, B.: Cryopreservation of lymphocytes. In *Clin. Immunol. Am. Soc. Microbiology*, 833-840 (1978).
- 27.- Jutte, N.H. and col. Vitrification of human langerhans islets. *Cryobiology* 24 : 403-411 (1987).
- 28.- Joysey, V.C. HLA-A, -B, -C antigens, their serology and cross-reaction. *Br. Med. Bull.* 34 :3, 217-222 (1978).
- 29.- Kissmeyer-Nielsen, F., Kjerbye, K.E. HL-A antisera and their identification. *Tissue Antigens* 2, 182-188 (1972).
- 30.- Klein J. Origen of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species. *Human Immunology*. 19, 155-162 (1987).
- 31.- Klein, J. The major histocompatibility complex of the mouse. *Science* 203, 516-521 (1979).
- 32.- Knight, S.C., Farrant, J. and Morris, G.J. Separation of populations of human lymphocytes by freezing and thawing. *Nature (New Biol.)* 239 88-89 (1972).
- 33.- Kohler, G., Milstein, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497 (1975).
- 34.- Kostyu, D.D., Amos, D.B. Mysteries of the amerindians. *Tissue Antigens*. 16, 111-123 (1981).
- 35.- Lamm, L.U., Petersen, G.B. The HLA genetics linkage group. *Transp. Proc.* 11:4, 1692-1696 (1979).
- 36.- Lobo, P.I. Development of anti-HLA antibodies following renal transplantation - their characteristics and natural history. *Tissue Antigens* 19, 356-365 (1982).
- 37.- Mazuri, P., Farrant, J., Leibo, S.F. and Chu, E.H.Y.: Survival of hamster tissue culture cells after freezing and thawing. *Cryobiol.* 6, 1-9 (1969).

- 38.- McMichel, A.J., Parham, P., Rust, N. and Brodsky, F. A monoclonal antibody that recognizes antigens determinant shared by HLA A2 and B17. *Human Immunology* 1, 121-129 (1980).
- 39.- MEDICINE Tratado de Medicina Práctica. Inmunología. 2a.ed. 47, 61-76, México, D.F. Nov. (1988).
- 40.- Morris, P.J., Williams, G.M. and Terasaki, P.I. Serotyping for homotransplantation occurrence of cytotoxic antibodies following kidney transplantation in man. *Transplantation* 6, 392-399 (1968).
- 41.- Mundo Científico. La Recherche. Las defensas del cuerpo humano. Barcelona- España, 6, 718-745 (1986).
- 42.- Murray, S., Dewar, P.J. Incidence of lymphocytotoxic antibody in maternal serum at delivery, in cord serum and placental fluid. *Vox Sanguinis* 30, 291-294 (1976).
- 43.- Nagington, J., Greaves, R.I.N. Preservation of tissue culture cells with liquid nitrogen. *Nature* 194: 993 (1962).
- 44.- Nathan, P.: Freeze-thaw-refreeze cycle to prepare lymphocytes for HLA antibody detection or tissue typing. *Cryobiology*. 11, 305-311 (1974).
- 45.- Nepom, G.T., Hansen, J.A. The molecular basis for HLA class II associations with rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Immunology*. 7 : 1, 1-7 (1987).
- 46.- Netsel, B., Grosse-Wilde, H., Bauman, P. and Mempel, W. LD Typing in man using cells frozen and stored in microtiter plates. *Tissue Antigens* 6 : 8-14 (1975).
- 47.- NIAID. Cryopreservation of lymphocytes for use in cytotoxicity testing. *Manual of tissue typing techniques* : 26-27 (1980).
- 48.- OK, J.H., Maclean, L.D. Comparative immunogenicity of HLA antigens: a study in primiparas. *Tissue Antigens* 5, 33-37 (1975).

- 49.- Otto, G.B., Días de Silva, W. Fundamentals of immunology. Ed. Springer -Verlang. Heidelberg. Nueva York (1980).
- 50.- Palutke, M. Transplantation immunology. In Sonnenwirth, A.C., Jarett, L. (Ed.) Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. The C.U. Mosby Co. (1980).
- 51.- Parham, P. Histocompatibility typing -Mac is back in town. Immunology Today, 9:5, 127-130 (1988).
- 52.- Parham, P., Bodmer, W.F. Monoclonal antibody to a human histocompatibility alloantigen HLA-A2. Nature 276 : 23, 131-139 (1980).
- 53.- Parham, P., McClean, J. Characterization, evolution, and molecular basis of a polymorphic antigenic determinant shared by HLA-A and products. Human Immunology 1, 131-139 (1980).
- 54.- Petrov, R.V. Una conversación sobre la nueva inmunología. Ed. Mir Moscú (1978).
- 55.- Prince, H.E. and Lee, C.D. Cryopreservation and short-term storage of human lymphocytes for surface marker analysis. J. Immunol. Methods. 93, 15-18 (1986).
- 56.- Raum, D., Stux, S.V., Awdeh, Z., Yunis, E.J. Major histocompatibility marker in disease. Clinics in Immunology and Allergy 1:2, 305-360, (1981).
- 57.- Raum, D., Stux, S.V., Awdeh, Z., Yunis, E.J., Alper, C.A. Recent advances in immunogenetics of leucocytes, plasma proteins, and blood transfusion. In Fairbank V.F. (Ed). Hematology. John Wiley and Sons. New-York (1982).
- 58.- Rodey, G.E. History and nomenclature of the HLA system. In Dawson, R.B. (Ed). HLA typing: A Technical Workshop. American Association of Blood Banks. San Francisco. Cal. (1976).

- 59.- Roit, I.M., Brostoff, J. y Male, D.K. Inmunología. 1a. ed. traducción española, Gower Medical Publishing Ltd. Suc.Barcelona España. 4.1-24.9 (1986).
- 60.- Russell, P.S., Winn, H.J. Transplantation (second of three parts). Immunogenetics and tissue typing in man. N. Eng. J. Med. 282:15, 848-853 (1970).
- 61.- Sanderson, A.R., Welsh, K.I. HL-A reagents from primates. I.-Antigens preparation, immunization, and preliminary analysis of sera. transplantation 16: 4, 304-312 (1973).
- 62.- Sandler, S., Nilsson, B. and Anderson, A. Cryopreservation of mouse pancreatic islets: Effects of human serum on islet survival. Upsala Med. Sci. 92: 177-184 (1987).
- 63.- Schaller, J.G., Omann, G.S. The histocompatibility system and human disease. The Journal of Pediatrics 88:6, 913-922 (1976).
- 64.- Scheive, M.W. and Körber, C. Quantitative cryomicroscopic analysis of intracellular freezing of granulocytes without cryoadditive. Cryobiology 24, 473-483 (1987).
- 65.- Schreuder, L. Peel-Freez. Clinical systems, Leiden, The Netherlands Copyright. (1988).
- 66.- Shaw, S., Biddison, W.E., Fichler, W.I., Shearer, G.M. HLA restriction of human influenza virus-immune cytotoxic T cells. Transp. Proc. 11:4, 1845-1848 (1979).
- 67.- Shigama, T., Mullen, Y., Klendorf, H. and Clark, W.R. An improved cryopreservation procedure for human fetal pancreas tissues. Transplantation 44, 602-606 (1987).
- 68.- Simmons, M.J., Jait, B.D. Detection of immune-associated genetic markers of human disease. Ed. Churchill Livingstone. New York (1984).

- 69.- Sollman, P.A. and Nathan, P. : An improved method for preparing re-frozen rethawed lymphocytes on plates for microcytotoxicity - studies. *Cryobiology* 16: 118-124, (1979).
- 70.- Stear, M.J., Allen, D. and Spooner, R.L. A method for freezing sheep Lymphocytes prior to cytotoxicity testing. *Tissue Antigens* 19: 134-139 (1982).
- 71- Steven, R., De Goey, S., Moore and Radue, V. The use of frozen-thawed Lymphocytes for DRw typing. *Tissue Antigens* 16, 387-392 (1980).
- 72.- Stromiger, J.L, The human major histocompatibility complex genes and proteins. *Ann. N. Y. Sci.* 458: 262-267 (1985).
- 73.- Terán, L.A. Marcadores genéticos ligados al HLA. (En prensa).
- 74.- Terasaki, P.I. Ed: Histocompatibility testing. UCLA. Tissue typing Laboratory. Los Angeles Cal. (1980).
- 75.- Terasaki, P.I., Bernoco, D., Park, S.M., Osturt, G. and Iwaki, Y. Microdotlet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. *Am. J. Clin. Path.* 69, 103-120, (1978).
- 76.- Thorsky, E., Albrechtsen, B.O., Hirschberg, H., Solheim, B.G. Identification and significance of products of the HLA-D region. *Transp. Proc.* 10:2, 313-318 (1978).
- 77.- Thorsky, E., Bratlie, A. A rapid method for the production of pure lymphocyte suspensions. Terasaki P.I. (Ed.) *Histocompatibility Testing*. Munkgaard, Copenhagen. (1970).
- 78.- Toledo-Pereyra, L.M., Gordon, D.A. and Mac Kensie, G.H. Application of cryopreservation techniques to islet cell allotransplantation. *Cryobiology*. 20, 205-210 (1983).
- 79.- Todd-Sanford-Davidsohn: *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Saunders Co. (Ed). Philadelphia, USA (1979).
- 80.- Tavetkov, TSV.D., Nicolov, TSH.N. Aggregate formation in fresh and - frozen human granulocytes. *Cryobiology* 24, 484-487 (1987).

- 81.- UCLA, Terasaki Laboratory. Nomenclature for factors of HLA System, 1987. 1-9, Feb. (1988).
- 82.- Walford, R.L. Carter, P.K., Anderson, R.E. Leucocyte antibodies following skin homografting in the human. Transp. Bull. 29, 16-18, (1962).
- 83.- Wohlgenuth, A. and Dubey, D. Symbolic reinterpretation of HLA products-impact on interpretation of HLA data at the molecular level. Cabios 1, 233-238 (1987).
- 84.- Wood, N., Bashir, H., Grealley, J., Amos, D.B. and Yunis, E.J. A Simple method of freezing and storing live lymphocytes. Tissue Antigens 2, 27-31 (1972).
- 85.- Yukinori, I. and Takeru, I. Effects of cryopreservation on human lymphocyte functions, comparison of programmed freezing method by a direct control system with a mechanical freezing method. Journal Immunol. Methods. 77, 283-290 (1985).
- 86.- Yunis, E.J., Madrigal, A. Base genética y función del complejo principal de histocompatibilidad (En prensa).
- 87.- Zachary, A.A., DeJelo, C.L., Kayhoe, D.E., Braun, W.E. Screening for HLA antibodies. In Rose, N.R., Fridman, H. (Ed). Manual of Clinical Immunology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. (1980).

A P E N D I C E

A P E N D I C E

FORMALINA AL 40%:

- 1.- Adicionar a 1000 ml de formaldehído aprox. 3.0 gr. de fosfato de sodio dibásico G.R. (Na_2HPO_4) y 1.0 gr. de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), disolver usando agitador magnético.
- 2.- Ajustar el pH. entre 6.8 y 7.2 , con HCL.
- 3.- Añadir 10 gotas de sol. eosina amarillenta.
- 4.- Filtrar antes de usar y almacenar en botella limpia a Temp.ambiente.

EOSINA AMARILLENTO AL 5%:

- 1.- Disolver 25 gr. de Eosina en polvo en 50 ml de agua destilada dentro de un matraz volumétrico de 500 ml.
- 2.- Aforar a 500 ml. con agua destilada.
- 3.- Filtrar antes de usar, se conserva a T. A. (temperatura ambiente).

SOLUCION DILUYENTE DE COMPLEMENTO:

- 1.- Se prepara con: 0.0008% de MgCl_2 , 0.0008% de CaCl_2 y rojo de fenol como indicador, en solución salina de fosfatos y se conserva a 4°C.

COMPLEMENTO DE CONEJO:

- 1.- Se reconstituye el liofilizado, para su uso adicionar por cada ml. del reconstituido, 0.5 ml. de la soln. diluyente de complemento, el pH debe ser entre 7.0 - 7.2 . Nota: Una vez diluido se mantiene a 4°C. máx. 24 hrs.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (P.B.S.)

- 1.- se pesan: NaCl =7.65g, Na_2HPO_4 = 1.268g., $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ = 0.1 g., KH_2PO_4 = 0.2113 g. se afora a 1 lt. con agua destilada y se ajusta el pH = 7.2 .

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