



# Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES, IZTACALA

## OBTENCION DE SUEROS TIPIFICADORES DEL SISTEMA HLA EN MUJERES MULTIPARAS MEXICANAS

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

**Martha Ofelia Salcedo Alvarez**

Los Reyes Tlalnepantla,  
Edo. de México

1981



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.



ESPECIALIDAD DE ESTADÍSTICA  
PROFESIONALES QUÍMICA

Este trabajo fue desarrollado en la Sección de Histo-  
compatibilidad de la División de Inmunología, Unidad  
de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional,  
bajo la dirección del M. en C. JORGE ARELLANO BLANCO.

AL DR. ROBERTO KRETSCHMER S.  
Jefe de la División de Inmunología.

Mi agradecimiento por la oportunidad brindada para la realización de este trabajo y por sus valiosas sugerencias y comentarios.

AL M.en C. JORGE ARELLANO BLANCO  
Mi agradecimiento por su apoyo y valiosas opiniones como Director de este Trabajo.

A TODO EL PERSONAL DE LA  
DIVISION DE INMUNOLOGIA.  
Mi agradecimiento, y especialmente a la Sra. Marta Vallejo C. por su ayuda.

A MI MADRE.

A MIS HERMANOS:

JUAN V.

JOSE L.

IRMA E.

REY A.

MARIA A.

A MANUEL.

A MIS FAMILIARES.

A MIS AMIGOS.

## I N D I C E

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
METODO	24
RESULTADOS	31
DISCUSION	38
GLOSARIO	45
BIBLIOGRAFIA	48



## RESUMEN.

Para la obtención de sueros tipificadores del Sistema HLA - en una población de mujeres mexicanas, se colectaron 250 - sueros de mujeres multíparas derechohabientes del I.M.S.S., durante su estancia postparto en el hospital, y se probaron contra un panel de 40 donadores sanos de linfocitos T y 30 de linfocitos B tomados al azar.

La presencia de anticuerpos en contra de antígenos de histocompatibilidad fue 88 % para linfocitos T y 82 % para linfocitos B. El 4 % de los sueros fueron monoespecíficos. En - contra de especificidades HLA. Y de éste resultaron 4 sueros, 3 con especificidad anti HLA-B5, Bw35 y 1 anti HLA-A2, con títulos suficientes para ser enviados por el Instituto Mexicano del Seguro Social como contribución a los programas oficiales de intercambio de sueros coordinados por la - Organización Mundial de la Salud y el Instituto Nacional - de Salud de los Estados Unidos de Norte América.

## INTRODUCCION.

El estudio de los sistemas de histocompatibilidad en el hombre, ha logrado aplicación práctica de gran importancia en la medicina moderna. La presencia de antígenos leucocitarios humanos (HLA) correlaciona con algunos padecimientos y su concordancia permite la transplatación de órganos.<sup>1</sup>

El reconocimiento de nuevos determinantes antigénicos HLA - ha corrido paralelo al descubrimiento de métodos que discriminan antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad - (MHC) del hombre y de otras especies. Los métodos serológicos detectan antígenos por medio de antisueros, estos antígenos son llamados genéricamente SD (definidos serológicamente), en tanto que los métodos que emplean linfocitos reactivos tales como el cultivo mixto de linfocitos (MLC) - detectan diferencias antigénicas en base a la respuesta proliferativa de las células antigénicamente discrepantes, estos antígenos se denominan genéricamente LD (definidos por linfocitos).<sup>1,2</sup>

La existencia de complejos mayores de histocompatibilidad - se ha demostrado en el hombre y varias especies y es probable que estén presentes aún en los vertebrados más primitivos. Los MHC más conocidos y estudiados son: B del pollo, SL-A del cerdo, DL-A del perro, BoL-A de bovinos, GPL-A - del cobayo, RhL-A del mono Rhesus, RL-A del conejo, ChL-A - del chimpancé, Ag B de la rata, H-2 del ratón y HLA del hombre. La secuencia de las regiones SD y LD parece ser similar en las especies estudiadas y pudieran presentar similitud funcional.<sup>3</sup>

El MHC que más se ha estudiado, es el sistema H-2 del ra - tón, primeramente investigado por Peter Gorer ( 1937 ) y - posteriormente por este autor y George Snell, describiendo al sistema y demostrando su participación en el rechazo de aloinjertos.<sup>4</sup>

En el ratón, la región que codifica la información para los antígenos del sistema H-2 se encuentra localizada en el cro - mosoma número 17 (Fig.1 ). Los productos de los genes de - las regiones H-2K y H-2D son detectados serológicamente en algunos tipos celulares, incluyendo linfocitos, por el uso de aloantisueros que aglutinan leucocitos y causan la lisis del linfocito en una reacción mediada por complemento. Se han descrito al menos diez variantes de genes H-2K y H-2D - en ratones de cepas isogénicas, además la región I ha sido dividida en cinco subregiones: Ia, Ib, Ic, Ij e Ie cada - una de ellas asociada con determinantes antigénicos presentes sobre linfocitos y ó B.<sup>2,4,5</sup>

La capacidad de sintetizar anticuerpos está controlada por genes presentes en la región I, denominados Ir o genes de - respuesta inmune, implicados en el reconocimiento de antígenos extraños. El producto de los genes Ir no se ha identificado, pero se asocia a determinantes protéicos designados antígenos Ia (antígenos asociados a la región I). La re - gión S controla determinantes alotípicos sobre Beta globuli - nas y el componente C4 del Sistema del Complemento.<sup>5</sup>

Se han descrito alrededor de 28 loci de histocompatibilidad No-H2 (H-1, H-3, H-4, H-5) los cuáles pueden ser importan - tes en el rechazo de órganos injertados.<sup>6</sup>

Robert G. Tissot y Carl Cohen (1974) estudiaron el MHC del conejo donde se ve que el control genético del sistema de antígenos celulares está incluido en el sistema 6 de grupos sanguíneos con el locus RL-A (alelos a,b,c ) y el locus He, supuestamente responsable de la reacción en cultivo mixto de linfocitos.<sup>7</sup> En la rata, el MHC se encuentra dividido en 2 regiones: la región A y la región B, la primera lleva el control de antígenos definidos serológicamente como los antígenos de histocompatibilidad Ag-B y H-1, y la segunda controla la respuesta en MLC y CML (linfólisis mediada por células), la respuesta inmune contra algunos polipéptidos y proteínas, la susceptibilidad a enfermedades tales como encefalomielitis alérgica y nefritis autóloga por complejos inmunes.<sup>5</sup> Caldwell, J. (1979) investigó el sistema de antígenos linfocitarios del bovino y detectó por métodos serológicos la existencia de un locus con 6 alelos codominantes.<sup>8</sup>

Vaiman, M. y Garnier, H. (1972) estudiaron el SL-A del cerdo, por pruebas de adsorción detectaron 4 antígenos, el SL-A1, 2, 4 y 3 y establecieron el efecto de compatibilidad de éstos en injertos de riñón e intestino.<sup>9</sup> Uriesindop, H. M. et. al (1972) estudiaron el MHC del perro (DL-A) por métodos inmunogenéticos y propusieron la existencia de 2 loci con 3 alelos cada uno, DL-1, 2, 3 y DL-4-5, respectivamente.<sup>10</sup> Geczy, A.F. et. al (1975) estudiaron el MHC del cobarzo, GPL-A, encontrando 2 loci GPL-AB con 4 antígenos y GPL-AS con un antígeno, todos ellos detectados serológicamente.<sup>11</sup> El MHC del chimpancé, ChL-A, presenta 2 loci el A y el B.<sup>2</sup> Ziegler, A. et. al (1975) estudiaron el sistema B del pollo, encontrándolo asociado a los antígenos del grupo sanguíneo B, sus antígenos fueron caracterizados por preci-

pitación con detergentes y electroforésis en geles de poliacrilamida, demostrándose dos cadenas polipeptídicas con pesos moleculares de 45,000 y 12,000 daltons. Este sistema tiene funciones similares a los de mamíferos, sin embargo, interviene también en procesos de fertilidad y viabilidad.<sup>12</sup>

La existencia de los determinantes antigénicos HLA sobre leucocitos humanos fue reconocida en base a las observaciones de Dausset y Nenna (1952) de la presencia de anticuerpos leucoaglutinantes y la destrucción de células blanco encontrados en pacientes con leucopenia severa y en aquellos con historia de transfusiones frecuentes. En 1958 Dausset demostró la existencia del primer aloantígeno específico de leucocitos, el cual denominó MAC y que actualmente corresponde al antígeno HLA-A2.<sup>13</sup>

En 1965 se efectuó la primera reunión internacional de histocompatibilidad para estandarizar la nomenclatura y reconocer los antígenos descritos, desde entonces se han efectuado 7 reuniones de trabajo. En la segunda reunión (1967) se determinaron 6 antígenos agrupados en 2 loci, el locus LA con los antígenos HL-A1, HL-A2, HL-A3 y el locus cuatro con los antígenos HL-A5, HL-A7 y HL-A8. En la tercera reunión (1970) se incrementó el número de antígenos conocidos a 20, se introdujo la letra "w" para aquellos que son provisionalmente aceptados y se reconocieron 7 antígenos del locus LA y 13 del locus 4. En la cuarta reunión (1972) el número de antígenos ascendió a 31: 16 antígenos para el locus LA y 15 para el locus 4. En la quinta reunión (1975) se reconocieron 51 antígenos y se cambiaron los nombres de los loci, al locus LA se denominó locus HLA-A con 20 antígenos y al locus 4 se le llamó locus HLA-B, también con 20 antígenos y se propusie -

ron 2 nuevos loci, el locus HLA-C con 5 antígenos y el locus HLA-D con 6. En la sexta reunión (1977) se describieron 77 antígenos de los cuales 70 se agruparon en 4 loci, 20 del locus HLA-A, 33 del locus HLA-B, 6 del locus HLA-C, 11 del locus HLA-D y se propuso la existencia del locus HLA-DR con 7 antígenos.<sup>15</sup> En la última reunión de trabajo (1979) se reconocieron 90 especificidades, 20 del locus HLA-A, 40 del locus HLA-B, 8 del locus HLA-C, 12 del locus HLA-D y 10 del locus HLA-DR. Los loci HLA-A, -B, -C y -DR detectados serológicamente (SD) y el locus HLA-D detectado por linfocitos (LD). Tabla I.

El sistema HLA comprende uno de los más interesantes y complejos sistemas genéticos, contiene una variedad de genes que intervienen en diversas funciones inmunológicas como el rechazo de injertos, control de genes de respuesta inmune, interacciones célula-célula, resistencia a agentes infecciosos y a tumores.<sup>2</sup>

El sistema HLA se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma número 6, junto con los genes que controlan el factor B de la properdina, el segundo y cuarto componente del sistema del complemento, la fosfoglucomutasa (PGM3) la glioxidasa, el pepsinógeno urinario (PG5) y los grupos sanguíneos de Chido y Rogers.<sup>2,17,28</sup> (Fig. 2).

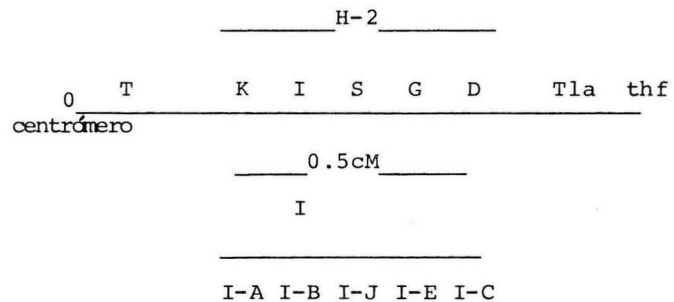


FIGURA 1.- Representación esquemática de la región H-2 del ratón sobre el cromosoma número 17.

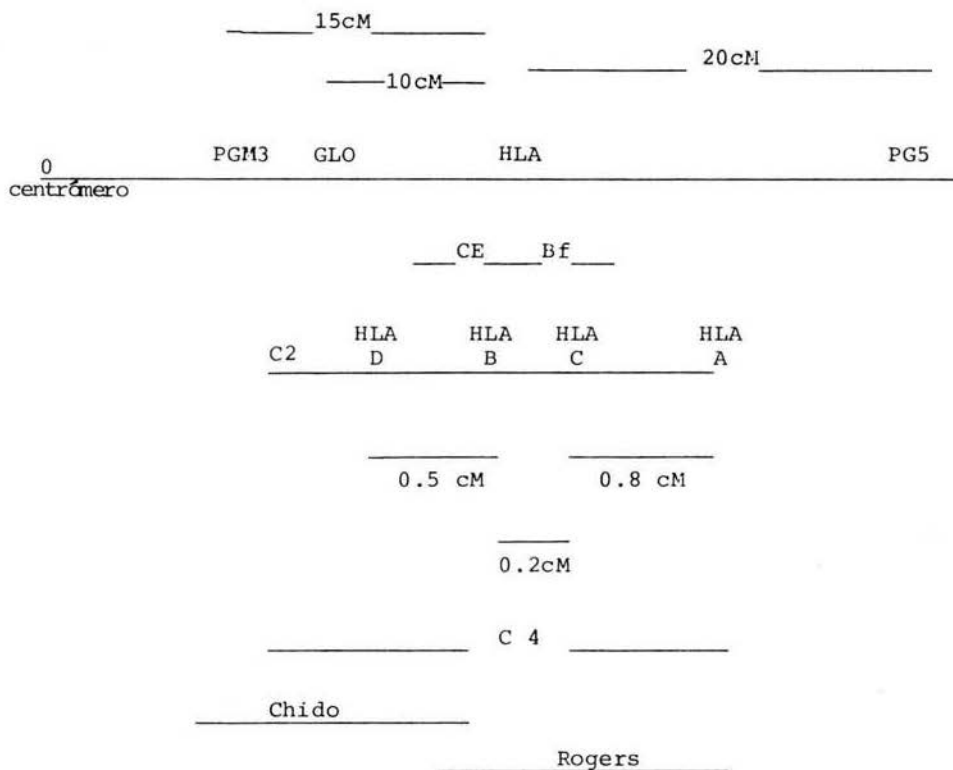


FIGURA 2.- Representación esquemática de la región HLA humana sobre el cromosoma número 6.



TABLA 1.- ANTIGENOS DEL SISTEMA HLA DESCRITOS HASTA 1980

Locus A	Locus B	Locus C	Locus D	Locus DR	
HLA-A1	HLA-B5	Bw44	HLA-Cw1	HLA-Dw1	HLA-DR 1
A2	B7	Bw45	Cw2	Dw2	DR 2
A3	B8	Bw46	Cw3	Dw3	DR 3
A9	B12	Bw47	Cw4	Dw4	DR 4
A10	B13	Bw48	Cw5	Dw5	DR 5
A11	B14	Bw49	Cw6	Dw6	DRw6
A25	B15	Bw50	Cw7	Dw7	DR 7
A26	B17	Bw51	Cw8	Dw8	DRw8
A28	B18	Bw52		Dw9	DRw9
A29	B27	Bw53		Dw10	DRw10
A23	B37	Bw54		Dw11	
A24	B40	Bw55		Dw12	
Aw19	Bw16	Bw56	<u>Bw4</u>		
Aw30	Bw21	Bw57	<u>Bw6</u>		
Aw31	Bw22	Bw58			Locus A = 20 alelos
Aw32	Bw35	Bw59			Locus B = 40 alelos
Aw33	Bw38	Bw60			Locus C = 8 alelos
Aw34	Bw39	Bw61			Locus D = 12 alelos
Aw36	Bw41	Bw62			Locus DR= 10 alelos
Aw43	Bw42	Bw63			Total 90 alelos

El locus de la PGM3 está aproximadamente a 17 centimorgans (cM) de distancia del centrómero, el locus de la glioxidasa a 5 cM del PGM3 y 10 cM después se encuentra la región HLA con los loci A, B, C y D. El factor B de la properdina y los factores C2 y C4 del sistema del complemento están cerca de la región HLA, al igual que los grupos sanguíneos de Chido y Rogers, el locus del pepsinógeno urinario 5 se localiza aproximadamente a 20 cM de la región HLA.<sup>2</sup>

Los antígenos HLA se desarrollan durante la vida fetal y son detectados desde la sexta semana de gestación. Se les ha identificado en todas las células nucleadas del organismo, por ejemplo en placenta, bazo, hígado, pulmón, intestino y riñón, demostrándose la más alta concentración en tejido linfoide.<sup>2,16</sup>

Han sido aislados de la superficie celular de linfocitos - por digestión enzimática y solubilización con detergentes, comprenden del 1 - 2 % de la membrana celular y están constituidos de dos cadenas polipeptídicas, una cadena pesada - con glicoproteína de peso molecular de aproximadamente - 45,000 daltons y una cadena ligera la  $\beta$ -2 microglobulina de aproximadamente 12,000 daltons. La cadena pesada es variable y parece dominar la especificidad antigénica, en tanto que la cadena ligera es constante en todos los antígenos estudiados.<sup>2,4,16</sup>

Bridgen, J. et al (1976) purificaron el antígeno HLA-A2 a partir de linfocitos B en geles de poliacrilamida, encontrando 5 bandas de diferentes pesos moleculares: la primera de 43,000 daltons, la segunda de 39,000 daltons, la ter-

cera de 33,000 daltons, la cuarta de 28,000 daltons y la última de 12,000 daltons, las bandas de 43,000 D y 12,000 D correspondieron a los antígenos HLA.<sup>18</sup>

Springer, T.A. et. al (1977) encontraron que los antígenos HLA-DR están constituidos de 2 cadenas glicoprotéicas de 28,000 y 33,000 D respectivamente, asociados en forma no covalente.<sup>19</sup>

Alhison, J.P. et.al (1977) realizaron un estudio de caracterización química del antígeno HLA-A9 por los métodos de inmunoprecipitación y electroforesis en geles de poliacrilamida, encontraron a los antígenos asociados con los que ellos denominaron HDL (lipoproteínas de alta densidad), embebidas en la parte hidrofóbica de la membrana celular, también determinaron que las moléculas HLA contienen entre 6 - 12 % de carbohidratos.<sup>20</sup>

El sistema HLA es altamente polimórfico, la mayoría de sus componentes presentan baja frecuencia de gene. Dos antígenos pueden aparecer asociados con una frecuencia mayor de la esperada por el azar al encontrarse en desequilibrio de enlace. Las poblaciones humanas parecen estar en equilibrio genético para los genes HLA y a semejanza de otros marcadores genéticos la frecuencia de genes HLA varía grande mente entre los diferentes grupos raciales.<sup>2,24</sup>

Reen, D.J. et.al (1980), describieron que en la población irlandesa el antígeno B8 se presenta con mayor frecuencia que en la población caucásica, a pesar de que los antígenos A3, B7 y B8 son muy frecuentes en esta última.<sup>21</sup> Woimant,F

et. al (1980) en una población de Africa occidental encontraron ausencia de B15, baja frecuencia de A10, B12 y B17 y alta de A2 y B5.<sup>22</sup>

Existen pocos estudios de la frecuencia de antígenos HLA en la población mexicana. Las observaciones de Gorodezky et. al (1979) y Arellano, B.J. et. al muestran la aparente ausencia del antígeno A25 y una alta frecuencia de los antígenos A2, B5 y Bw35.<sup>23</sup>

La función biológica del sistema HLA no está bien definida, su postula confiere al individuo su propia identidad química y con ello la individualidad biológica que permite el reconocimiento y eliminación de células extrañas y células propias que se han modificado por envejecimiento o transformación neoplásica.<sup>2,16,17</sup>

Bodmer, W.F. (1972), considera que el polimorfismo balanceado presentado en el sistema HLA pudo haberse originado por presiones de selección que actuaron en el pasado y dieron al individuo ventajas adaptativas. El estudio del sistema HLA se ha basado en la importancia que tiene al correlacionarse con enfermedades y principalmente el rechazo de injertos, aunque con la posible excepción del embarazo la transplatación no ocurre en forma espontánea en la naturaleza.<sup>24</sup>

El sistema HLA se ha asociado con la mayor resistencia o susceptibilidad a enfermedades, sin embargo, se ha demostrado correlación significativa con pocos padecimientos. Los datos de asociación se obtienen al comparar el fenotipo HLA característico de un grupo de pacientes, contra la frecuen-

cía con que aparece en el grupo control de individuos sanos.

Los estudios familiares muestran en forma clara la correlación entre la presencia del antígeno y la enfermedad, al analizar los patrones de segregación de al menos 3 generaciones. La magnitud de la asociación se determina por el riesgo relativo, definido como la relación del riesgo de desarrollo de la enfermedad en aquellos individuos que presentan el antígeno, dividido entre el riesgo en aquellos que no lo presentan, de acuerdo a la fórmula siguiente:<sup>3</sup>

$$\text{Riesgo relativo} = \frac{a d}{b c}$$

Donde:

- a = número de pacientes positivos al antígeno.
- b = número de pacientes negativos al antígeno.
- c = número de controles positivos al antígeno.
- d = número de controles negativos al antígeno.

Existen varias interpretaciones para estas asociaciones:

Primero: Que la asociación sea un artefacto del muestreo, al analizar una población heterogénea que contiene un subgrupo en el cual la frecuencia del antígeno y la enfermedad es mayor que en el resto de la población.

Segundo: Que la susceptibilidad a la enfermedad sea el resultado directo de la presencia de un antígeno HLA en particular.

Tercero: Que exista desequilibrio de enlace entre los alelos para el antígeno estudiado y los alelos de un loci cercano que realmente confieran susceptibilidad a la enfermedad.<sup>26</sup>

Las enfermedades con que se asocia el sistema HLA se han agrupado en 3 categorías, de acuerdo al grado de asociación con un locus y genes del complejo:

Primera categoría: Enfermedades asociadas con los antígenos del locus B, como la espondilitis anquilosante.

Segunda categoría: Enfermedades asociadas con los antígenos HLA-D y este asociado con el locus B, por ejemplo las enfermedades autoinmunes.

Tercera categoría: Enfermedades relacionadas con defectos genéticos, cercanos al complejo HLA, pero no pertenecientes a los loci del mismo, por ejemplo genes controlados por factores como C2 y C4.

Una relación de antígenos HLA y su asociación con enfermedades se muestra a continuación:<sup>2,25</sup>

Antígeno HLA	Enfermedad.
B-27	Espondilitis anquilosante.
B-27	Síndrome de Reiter.
B-27	Uveítis anterior.
B-27	Artritis por asociación con <u>yer</u> <u>senia</u> .
B-27	Artritis por asociación con <u>sal</u> <u>monella</u> .
B-27	Artritis reumatoide juvenil.
B-15	Lupus eritematoso sistémico.
B- 8	Diabetes juvenil.
Bw35	Síndrome de Behcet.
A- 3	Hemocromatosis idiopática.
Dw 3	Diabetes dependiente de insuli- na.
Dw 3	Enfermedad celfaca.
Dw 3	Dermatitis herpertifforme.
Dw 3	Diabetes juvenil.
Dw 3	Enfermedad de Adison.
Dw 3	Enfermedad de Sjögren.
Dw 3	Miastenia gravis.

La importancia del sistema HLA en el rechazo de órganos injertados, se demostró varios años después de iniciada la práctica de transplatación en el hombre. Los primeros injertos renales se efectuaron incluso entre individuos de especies diferentes, o como en el caso del primer injerto entre humanos (aloinjerto), efectuado por Voronoy (1936), pasando por alto la compatibilidad del sistema ABO.

A mediados de la década de los "50s" se habían efectuado 30 aloinjertos renales y estandarizado las técnicas quirúrgicas. En 1958 se inició el empleo de métodos inmunosupresores, como la irradiación corporal total que tuvo resultados negativos. Para 1962 se emplearon drogas inmunosupresoras de tipo esteroide como la prednisona y análogos sintéticos de las purinas como la azatioprina. A partir de 1963 el uso combinado de azatioprina y prednisona demostró ser de importancia significativa para incrementar la sobrevida del aloinjerto, a tal grado que en la actualidad se sigue empleando como el método inmunosupresor estandar.<sup>27</sup>

Durante la práctica de la transplatación renal se observó que independientemente de la terapia inmunosupresora, cuando el transplante se efectuaba entre gemelos univitelinos, la sobrevida se incrementaba considerablemente, implicando la participación de factores genéticos en el rechazo del aloinjerto posiblemente relacionados con el sistema HLA.<sup>27</sup>

Actualmente se considera que la compatibilidad en el sistema HLA entre donador y receptor es muy importante para la sobrevida del aloinjerto. El locus HLA-D tiene la responsabilidad en la fase de sensibilización y los loci HLA-A y -



HLA-B la actuación como blanco para el rechazo de injerto - 2,16.

El trasplante entre hermanos HLA idénticos tiene una sobrevida a un año del 90 % comparado con el 70% entre individuos relacionados que comparten un haplotipo, el 50 % con donador no relacionado compatible y el 30 % con donador no relacionado incompatible. Similarmente aquellos individuos que son compatibles en el locus HLA-D tienen sobrevida significativamente mayor que la de individuos en los que existen discrepancias en este locus.<sup>29</sup>

En el trasplante renal de donador cadavérico se ha visto que la compatibilidad en el locus HLA-DR además de la compatibilidad para HLA-A o HLA-B tiene efecto en la sobrevida del aloinjerto, como lo demostró el estudio de Albrechtsen, D. et.al (1979).<sup>30</sup> Estos hallazgos son particularmente importantes ya que a nivel mundial, el trasplante de riñón de donador cadavérico es el que se efectúa con mayor frecuencia en la actualidad.

Existen otros sistemas de histocompatibilidad No-HLA denominados genéricamente Sistemas Menores de Histocompatibilidad que aparentemente tienen importancia en el rechazo de injertos. Uno de estos, el Sistema MB ha mostrado ser importante en la sobrevida de aloinjertos renales de donador relacionado.<sup>31</sup> Los Sistemas antigénicos de monocitos y células endoteliales estudiados por Van Rood, J. et.al (1979) podrían tener importancia en el establecimiento del rechazo.<sup>32</sup>

Otros factores en la sobrevida de injertos renales, además de la similitud en antígenos de histocompatibilidad son: la edad del receptor<sup>33</sup> y como fue demostrado por Terasaki, P. y Opelz, G. (1980) en un estudio retrospectivo de 68 centros de trasplante en E.E.U.U. y Canadá de los años 1971 - 1978 que la terapia de transfusiones previas al trasplante in - crementa también significativamente la sobrevida.<sup>34</sup>

El rechazo del injerto renal puede ser de 3 tipos, de acuerdo con el tiempo postrasplante en el que se presenta, y al tipo de respuesta inmunológica. El rechazo hiperagudo - ocurre desde unas horas postrasplante hasta aproximadamente 10 días y la respuesta inmunológica es de tipo humoral. - El rechazo agudo puede ocurrir durante el primer año post - trasplante en el caso de donador relacionado y a dos años para donador cadavérico, la respuesta inmunológica es de - tipo celular. El rechazo crónico puede presentarse de un - año postrasplante en adelante, la respuesta es de tipo humoral.<sup>1</sup>

En la actualidad el trasplante de médula ósea, es una - práctica frecuente para ciertos padecimientos hematológi - cos, tales como aplasia medular y leucemia. Los trasplan - tes de otros órganos, hígado, pulmón, páncreas y corazón - han tenido resultados negativos, sólo el trasplante de co - razón no presenta problemas quirúrgicos y se realiza común - mente desde hace varios años.<sup>27</sup>

Podemos considerar que los pacientes más favorecidos con la transplatación de órganos son los nefrópatas, ya que pue - den retornar a la terapia de diálisis en caso de rechazo -

del injerto. En estos pacientes y en modelos experimentales con animales, se han realizado los estudios sobre factores que incrementen la sobrevivencia del aloinjerto. Con fines de trasplante se realizan pruebas de histocompatibilidad para seleccionar un posible donador genéticamente compatible, por lo que el desarrollo de estas pruebas ha corrido paralelo a la transplatación.

Después que Dausset caracterizó el isoantígeno de leucocitos MAC, hubo hallazgos importantes en el estudio del sistema HLA, como los de Van Rood J. et al (1958) que demostró la presencia de anticuerpos antileucocitarios en el suero de mujeres multíparas embarazadas<sup>35</sup> y la descripción de los grupos 4a y 4b, mediante la técnica de fijación de complemento en plaquetas; los estudios de Rose Payne et al (1958) sobre incompatibilidad fetomaterna y producción de leucoaglutininas en algunas mujeres como respuesta a la estimulación fetal dada por la diferencia antigénica<sup>36</sup>, Walford (1964) introdujo el método de citotoxicidad dependiente de complemento usando suspensiones de leucocitos. Terasaki y Mc Cleland (1964) desarrollaron la técnica de microlinfocitotoxicidad, la cual detecta, con el uso de antisueros específicos, la presencia de antígenos sobre la membrana en una reacción mediada por complemento y medida por la incorporación de un colorante supravital, la prueba tiene aceptación mundial por ser sensible y reproducible.<sup>37</sup>

El Dr. Bach introdujo en ese mismo año el MLC, como una prueba de compatibilidad tisular que mide la respuesta proliferativa de linfocitos de un receptor al ponerse en contacto con los linfocitos de un donador inhibidos en su pro-

liferación por el uso de radiación o mitomicina C.<sup>38</sup> En un principio se creyó que la respuesta en MLC estaba mediada - por los determinantes antigénicos SD, pero al mezclar linfocitos de individuos relacionados con antígenos SD idénticos en ocasiones había respuesta proliferativa, lo cual sugirió que esta era inducida por un locus diferente, el locus - HLA-D.<sup>2</sup>

Walford y Troup (1967) en un estudio sobre producción de - anticuerpos leucocitarios, por inmunización selectiva de voluntarios humanos obtuvieron 3 antisueros linfocitotóxicos, el primero llamado anti 7 menoespecífico, el segundo anti LC-IB y el tercero anti LC-IC sin embargo, esta práctica de inmunización se ha abandonado por sus aspectos éticos.<sup>39</sup>

En transplante de órganos, se ha visto que después del rechazo del injerto hay producción de anticuerpos. Pueden - obtenerse pocos antisueros buenos por este método de inmunización, además por las condiciones de los pacientes es muy difícil obtener donaciones de sueros para que éstos sean - usados como reactivos de tipificación. Dos o tres semanas después de una transfusión pueden detectarse anticuerpos - linfocitotóxicos, pero éstos se producen a títulos bajos y generalmente son de amplia especificidad.<sup>43</sup>

Se pueden producir también heteroantisueros en conejos por la inyección de antígenos HLA purificados, sólo que a la - fecha existen pocos antígenos con estas características, - por lo que estos estudios no tienen aplicación práctica.<sup>40</sup>

De todas las formas de inmunización en contra de antígenos

leucocitarios, la isoimmunización fetomaterna natural es la fuente principal de sueros tipificadores empleados como reactivos en las pruebas de histocompatibilidad con fines de transplante.<sup>42</sup>

Después del parto se puede demostrar la presencia de anticuerpos efectuando la prueba cruzada del suero materno contra linfocitos obtenidos de sangre de cordón umbilical, debiendo estar dirigida la especificidad hacia antígenos paternos presentes en el feto. Se considera que los sueros de mujeres multíparas son la mejor fuente de isoanticuerpos sin embargo, Ahrons, S. (1971) demostró la presencia de anticuerpos en el suero de mujeres primigestas entre las semanas 24 y 34, con un porcentaje de positividad del 20% por leucoaglutinación y 10 % por citotoxicidad, estos valores se incrementaron después del parto.<sup>41</sup>

Distintos centros de investigación mundial, han tenido éxito en programas para obtener antisueros de alta calidad empleados en la tipificación del sistema HLA. Sus protocolos contemplan la obtención de sueros de mujeres multíparas sanas durante su estancia postparto en el hospital y la captación de datos que permitan su identificación y posterior localización como: nombre, edad, dirección, número de embarazos, número de partos, sistema ABO y Rh.

El panel de linfocitos para evaluar la calidad de los sueros, se puede formar por células frescas seleccionadas al azar, o células seleccionadas por sus antígenos de histocompatibilidad y almacenadas en congelación, obtenidas de individuos de diferentes razas con el fin de abarcar todas

las especificidades HLA. El número de células que consti - tuyen el panel pueden ser obtenidas de 20 - 30 donadores sa nos si se encuentran bien caracterizados en antígenos HLA, - debiendo tener al menos 2 o 3 representaciones de todas las especificidades. Si la selección del panel es al azar y no se encuentra bien caracterizado, debe aumentarse el número hasta 40 - 50 donadores.<sup>42,43</sup>

Existen pocos estudios sobre la frecuencia de antígenos HLA en poblaciones mexicanas, además, ninguno de éstos se ha - efectuado tendiente a demostrar la frecuencia de anticuer - pos específicos HLA en el suero de mujeres multíparas.

Los centros de salud donde se realizan pruebas de histocom - patibilidad con fines de transplante, obtienen antisueros - de casas comerciales a precios elevados de aproximadamente \$2,000 por un volumen de 0.5 ml de antisuero o un precio si - milar por cada placa de tipificación. Si a esto añadimos - gastos de reactivos, material de laboratorio, personal espe - cializado, etc., el costo neto de una tipificación para an - tígenos HLA por individuo se incrementa entre \$ 3,000 y - \$5,000.

La reactividad de los sueros puede variar entre individuos de diferentes razas, el antisuero obtenido de una mujer - asiática puede no dar reactividad al probarse en células de un individuo caucásico, a este fenómeno se atribuye en parte la falta de reactividad que ocasionalmente presentan los antisueros de procedencia comercial.<sup>42</sup>

No todos los centros de tipificación se encuentran inscri -

tos en programas oficiales de intercambio de sueros, coordinados por la Organización Mundial de la Salud y el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH). El Instituto Mexicano del Seguro Social se encuentra inscrito en dichos programas desde 1978, recibiendo sueros tipificadores que cubren 31 especificidades distintas, a la fecha el IMSS no ha contribuido con donación de antisueros.

En base a lo expuesto anteriormente el objetivo de este estudio fue: Realizar una encuesta sobre la frecuencia de producción de anticuerpos anti-antígenos de histocompatibilidad en una población de mujeres multíparas mexicanas, con la finalidad de determinar la presencia de sueros con reactividad monoespecífica de alta calidad, que puedan emplearse en los programas internacionales de intercambio de antisueros.

El contribuir con antisueros propios aumenta la posibilidad de que el IMSS reciba del NIH donaciones de un número mayor de sueros que cubran no sólo las especificidades comunes, sino también especificidades nuevas, que por sus características no están disponibles aun en forma comercial.

El contar con un lote de sueros que tipifique un mayor número de especificidades HLA permitirá efectuar una mejor selección de las parejas donador - receptor para la práctica de la transplatación a nivel nacional.

METODO.

Este trabajo se dividió en 3 fases. La primera tendiente a la obtención de un panel de sueros, se realizó en colaboración con el Hospital de Gineco-Obstetricia No. 2 del Centro Médico Nacional y consistió en la colección de 250 muestras de sangre obtenidas de mujeres multíparas sanas con 3 - 5 - gestaciones, anotando en cada caso los datos de: Nombre, - número de afiliación al IMSS, dirección, teléfono, edad, - grupo sanguíneo, número de gestaciones y partos.

Para la obtención de las muestras se procedió de la siguiente manera:

- 1.- Se tomaron 15 ml de sangre venosa periférica con jeringa desechable, sin anticoagulante y se depositaron en tubos de vidrio.
- 2.- Las muestras se dejaron reposar por 60 minutos a temperatura ambiente y después durante 120 minutos a 4°C.
- 3.- Los tubos se centrifugaron a 1500 RPM durante 15 minutos a 4°C en centrífuga Sorvall-RC3.
- 4.- De los sueros obtenidos se hicieron alícuotas de 1 ml. en tubos de plástico Falcon No. 2038.
- 5.- Las muestras se identificaron y almacenaron a -70°C - hasta su uso.

La segunda fase consistió en la preparación de placas para



pruebas de microlinfocitotoxicidad, formándose lotes que -  
contenían los sueros del número 1-250. Como el panel de cé-  
lulas fue formado al azar, se planeó probarlos contra un to-  
tal de 40 donadores de linfocitos T y 30 de linfocitos B.

La preparación de las placas se realizó en la forma siguien-  
te:

- 1.- Los 60 pozos de cada placa de micro cultivo Falcon -  
(3034) se llenaron hasta el borde con aceite mineral -  
petrolatum (Sigma) para evitar la desecación de los -  
sueros, utilizando una jeringa múltiple.
- 2.- Se descongelaron alícuotas de un mililitro de los sue-  
ros por grupos de 29 y se tomó de cada suero 0.25 ml -  
para hacer una dilución 1 : 2 en solución salina.
- 3.- En cada pozo se colocó un microlitro ( $\mu$ l) de suero to-  
tal o diluído 1 : 2, utilizando una micropipeta múlti-  
ple (Hamilton) No. 705 de 50  $\mu$ l, de capacidad, cada -  
placa llevó un suero control positivo y un control ne-  
gativo, en las placas con linfocitos B, se pusieron 2  
sueros anti-HLA-DR, ya que como se sabe, los antígenos  
de este locus son detectados sobre todo en linfocitos  
B<sub>2,48</sub>

Para formar un lote completo con los 250 sueros se ne-  
cesitaron 9 placas preparadas y marcadas con los datos  
presentados en la Tabla No. 2

Se hicieron un total de 45 juegos de placas para célu-

las T y 30 para B.

TABLA 2.- DISTRIBUCION DE LOS SUEROS EN LAS PLACAS DE -  
MICROCITOTOXICIDAD.

Linfocitos T		Linfocitos B	
Placas 1T	Sueros 1 - 29	Placas 1B	Sueros 1 - 28
Placas 2T	Sueros 30 - 58	Placas 2B	Sueros 29 - 57
Placas 3T	Sueros 59 - 87	Placas 3B	Sueros 58 - 86
Placas 4T	Sueros 88 -116	Placas 4B	Sueros 87 -115
Placas 5T	Sueros 117-145	Placas 5B	Sueros 116-144
Placas 6T	Sueros 146-174	Placas 6B	Sueros 145-173
Placas 7T	Sueros 175-203	Placas 7B	Sueros 174-202
Placas 8T	Sueros 204-232	Placas 8B	Sueros 203-231
Placas 9T	Sueros 233-250	Placas 9B	Sueros 232-250

La tercera fase incluyó la obtención de poblaciones T y B - enriquecidas, y su reacción con los sueros problema.

La separación de linfocitos se realizó de acuerdo a la téc-

nica de Boyum (1968) por flotación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (24 partes de Ficoll al 9 % y 10 de Hypaque al 34 % a una densidad de 1.076 y un índice de refracción de 1.3570 ).<sup>44</sup>

- 1.- Veinte mililitros de sangre venosa periférica sin anti coagulante del donador, se desfibrinaron por agitación suave en tubos estériles con perlas de vidrio.
- 2.- Tres mililitros de la sangre desfibrinada diluida 1:2 con solución de Hanks, pH 7.4, se pasaron a tubos de plástico estériles Falcon (2027) que contenían 1.5 ml de Ficoll-Hypaque, procurando no destruir la interfase.
- 3.- Los tubos se centrifugaron por 30 minutos a 650 x g a temperatura ambiente.
- 4.- Después de la centrifugación se separaron las interfaces con pipeta Pasteur y las células fueron lavadas 2 veces con MaCoy 5A (GIBCO ) y se centrifugaron por 10 minutos a 400 x g, y estandarizaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml.

Con el fin de determinar si los sueros presentaban especificidad anti HLA dirigida contra células T o células B, se obtuvieron poblaciones de linfocitos T y B enriquecidos. Debido a la capacidad que tienen las células T para formar rosetas espontáneas con los eritrocitos de carnero (EC), al ser sometidas nuevamente a un gradiente de densidad, se depositan en el fondo del tubo mientras que las células B y una pequeña proporción de células T que no forman rosetas permanecen en la interfase.

necen en la interfase.<sup>45</sup>

El procedimiento de separación de subpoblaciones de linfocitos se detalla a continuación:<sup>45</sup>

- 1.- Las células ya estandarizadas se mezclaron con EC en una proporción de 20 eritrocitos por 1 linfocito y a la suspensión obtenida se adicionó 20 % de suero fetal de ternera absorbido contra EC, antes de depositarse sobre Ficoll-Hypaque e incubarse por 30 minutos a 4°C.
- 2.- Después de la incubación las muestras se centrifugaron por 30 minutos a 400 x g y 4°C.
- 3.- Se colectaron las interfases que contenían entre 60 - 70 % de células B, se lavaron 2 veces con medio MaCoy 5A y centrifugaron a 400 x g, 10 minutos.
- 4.- Los botones que contenían las células T formando rosetas E, fueron sometidos a choque hipotónico con buffer hemolítico para remover los EC y se lavaron 2 veces en medio de cultivo.
- 5.- Las células T y B enriquecidas, se estandarizaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml, y se probaron para obtener la especificidad de los 250 sueros y tipificar los antígenos HLA en las células del panel, procediendo de la siguiente forma:
  - Con micropipeta Hamilton No. 705, se colocó un microlitro de la suspensión celular en cada pozo del

lote completo de placas preparadas 1T-9T y 1B-9B - así como en la placa de tipificación y se incubaron por 60 minutos a temperatura ambiente.

- Después de la incubación se añadieron 5  $\mu$ l con micropipeta múltiple Hamilton No. 725 con capacidad de 250  $\mu$ l. de complemento de conejo en cada pozo y se incubaron durante 120 minutos a temperatura ambiente.
- Al final de la incubación, las placas se tiñeron - agregando 2  $\mu$ l de eosina Y al 5% en agua a cada pozo usando una micropipeta múltiple Hamilton No.710 con 100  $\mu$ l de capacidad. Las placas se dejaron reposar por 5 minutos y se fijaron agregando 5  $\mu$ l por pozo de formol buffer pH 7.

La lectura de las placas se efectuó en microscopio invertido de contraste de fases (Carl Zeiss) a 125 aumentos. La positividad de la reacción en la detección de anticuerpos - linfocitotóxicos presentes en los sueros se midió de acuerdo al porcentaje de células muertas que incorporaron la eosina Y como se muestra en la Tabla No. 3.<sup>45</sup>

TABLA 3.- ESCALA DE TERASAKI PARA REACCIONES DE LINFOCITOTOXICIDAD.<sup>45</sup>

Grado de Positividad	Reacciones linfocitotóxicas
1	Negativa -10% de células muertas.
2	Negativa 10-30% de células muertas.
4	Intermedia 30-50 % de células muertas.
6	Positiva 50-80 % de células muertas.
8	Positiva 80-100 % de células muertas.

## RESULTADOS.

El lote de 250 sueros fue probado contra 39 donadores de -  
 células T y 28 de células B. El panel celular estuvo cons-  
 tituído por donadores sanos no relacionados con distintas -  
 combinaciones de antígenos HLA abarcando las especificida-  
 des presentadas en la Tabla No. 4

TABLA 4.- ESPECIFICIDADES HLA EN EL PANEL CELULAR DE  
 REFERENCIA.

Locus HIA-A	Locus HIA-B	Locus HIA-C	Locus HIA-DR
A1,A2,A3,A9	B5,B7,B8,B12	Cw2,Cw3,Cw4	DRw1,DRw3,DRw7
A10,A11,A25	B13,B14,B15		
A26,A28,A29	B17,Bw21,B27		
Aw30, Aw31	Bw35, B37,B40		

Los resultados de actividad anti HLA, medidos por microcito-  
 toxicidad en el grupo de sueros problema, se anotaron en ho-  
 jas de colección de datos en las cuales se hizo correlación

del número de suero contra las especificidades HLA positi -  
vas en linfocitos T y B purificados.

Los 250 sueros se agruparon por categorías en base a su fre  
cuencia de positividad en contra de los linfocitos del pa -  
nel de referencia:

Categoría I sueros que nunca reaccionaron positivamen  
te.

Categoría II sueros que reaccionaron de 1 - 4 veces.

Categoría III sueros que reaccionaron de 5 - 10 veces.

Categoría IV sueros que reaccionaron de 11 - 20 veces

Categoría V sueros que reaccionaron 21 - 30 veces.

Categoría VI sueros que reaccionaron 31 - 39 veces.

La distribución de la reactividad de los sueros en estas -  
categorías para células T y B se muestra en la Tabla No. 5.  
En las últimas no hubo categoría VI debido al número de do-  
nadores con que los sueros fueron probados.

El porcentaje de positividad de los sueros fue elevado con  
ambos tipos de células encontrándose un 88 % para linfoci -  
tos T y 82 % para linfocitos B.

Se hizo un análisis de los patrones de concordancia de las



reacciones para agrupar aquellos sueros que reaccionaron: - a) con ambos tipos de células (T+ B+), b) únicamente con linfocitos T, (T+ B-), c) únicamente con linfocitos B, (T- B+) y d) sueros que no reaccionaron ( T- B-). El porcentaje de estas reacciones concordantes y discordantes se muestran en la Tabla No.6

TABLA 6.- ACTIVIDAD ANTI-HLA PRESENTADA POR EL PANEL DE SUEROS DE MUJERES MULTIPARAS.

Reacciones	Número de sueros	%
T+ B+	186	74.4
T+ B-	34	13.6
T- B+	19	7.6
T- B-	11	4.4

TABLA 5.- AGRUPACION DE LOS 250 SUEROS POR CATEGORIAS PARA CELULAS T ENRIQUECIDAS Y CELULAS B ENRIQUECIDAS, DEPENDIENDO DE SU REACTIVIDAD

Linfocitos T enriquecidos			Linfocitos B enriquecidos		
Categoría	Sueros	Porcentaje	Categoría	Sueros	Porcentaje
I	30	12.0%	I	45	18.0%
II	130	52.0%	II	138	55.2%
III	52	20.8%	III	47	18.8%
IV	24	9.6%	IV	17	6.8%
V	13	5.2%	V	3	1.2%
VI	1	0.4%			
Sueros Positivos: 220 = 88%			Sueros Positivos: 205 = 82%		
Sueros Negativos: 30 = 12%			Sueros Negativos: 45 = 18%		
N = 250			N = 250		

Al comparar los sueros con el panel de células se delimitaron aquellos que pudieran tener reactividad monoespecífica y se hizo en análisis estadístico de los mismos por  $\chi^2$  en tablas de contingencia de 2 x 2 de acuerdo a la siguiente fórmula:<sup>42</sup>

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

Donde:

a = ( + + ) reacción positiva debiendo ser positiva.

b = ( + - ) reacción positiva debiendo ser negativa.

c = ( - + ) reacción negativa debiendo ser positiva.

d = ( - - ) reacción negativa debiendo ser negativa.

Con los valores de  $\chi^2$  se determinó el coeficiente de correlación definido como  $R = \frac{\chi^2}{N}$  los resultados del análisis estadístico se presentan en la Tabla No. 7.

TABLA 7.- SE MUESTRAN LOS SUEROS QUE TUVIERON UN VALOR DE  $\chi^2$  SIGNIFICATIVO, EL VALOR DE R Y SU ESPECIFICIDAD TENTATIVA.

Suero No.	$\chi^2$	P	R	Especificidad
21	18.7	<0.0005	0.48	Anti-HLA-Bw35
40	11.47	0.001	0.29	Anti-HLA-Bw35
46	17.82	<0.0005	0.45	Anti-HLA-Bw35
104	7.22	0.01	0.18	Anti-HLA-Bw35
150	12.74	0.0005	0.32	Anti-HLA-A9
185	7.42	0.01	0.19	Anti-HLA-A2
192	6.01	0.05	0.15	Anti-HLA-Bw35
202	6.25	0.05	0.16	Anti-HLA-B12
213	10.02	0.005	0.25	Anti-HLA-A3
222	16.13	<0.0005	0.41	Anti-HLA-A2

Una alícuota congelada desde la fase uno de los sueros 21, 40, 46 y 222 con patrones de reactividad significativa se liofilizaron y enviaron al NIH-EEUU, para confirmación de la especificidad perfilada en este trabajo. Los cuatro sueros resultaron con calidad monoespecífica y fueron los números: 21, 40 y 46 con especificidad anti HLA-Bw35 y el número

ro 222 con especificidad anti HLA-A2, estas cuatro mujeres aceptaron donar sangre total para obtener el suero y que éste se enviara al NIH-EEUU.

Los otros sueros de la Tabla No. 7 no obstante de tener un valor de  $X^2$  significativo no fueron considerados como reactivos de tipificación. Las cuatro donaciones de suero aproximadamente 250 ml, por muestra serán enviadas al NIH-EEUU como contribución del IMSS a los programas de intercambio de sueros.

Otro suero que resultó interesante fue el No. 95 formador de la categoría VI de la Tabla No. 5 que reaccionó positivamente 36 de 39 veces, contra células T (92.3 %) y por su reactividad se consideró un suero control positivo, los 5 ml de este suero obtenidos en la fase uno, se usarán en el laboratorio como control positivo en la preparación de placas de tipificación para antígenos HLA. Igualmente 11 sueros (4.4%) nunca reaccionaron positivamente con el panel celular de referencia, se usarán en el futuro como controles negativos.

## DISCUSION.

La colección de muestras para formar el lote de sueros no presentó dificultades al contar con todas las facilidades en el hospital de Gineco-Obstetricia No. 2 del Centro Médico Nacional. El número elevado de pacientes que arriban a este hospital dio oportunidad de seleccionar por sus condiciones de salud postparto así como por el número de embarazos y partos. Sólo se sangraron mujeres de 2 - 6 gestas ya que la frecuencia de producción de anticuerpos en las primigestas es más baja que en las multíparas.<sup>41,43</sup>

En nuestra población frecuentemente se encuentran multíparas de ocho o nueve gestas, evento raro en otros lugares donde se han realizado este tipo de estudios. Sin embargo, en estas personas fuertemente inmunizadas los sueros suelen ser multiespecíficos.<sup>42</sup>

Inicialmente se había planeado un total de 40 donadores para células T y 30 para células B. Al término de los experimentos se descartaron un donador de células T y 2 de células B, por problemas de actividad del complemento. Se conoce que los sueros de conejo recién nacidos pueden tener componentes que incrementen la reactividad de anticuerpos de reacción cruzada mientras que los sueros de conejos maduros pueden presentar bajos títulos de complemento, por lo que se prefieren los sueros de conejos jóvenes entre 8 - 12 semanas, por tener menor reacción cruzada y títulos de complemento más altos.<sup>46</sup>

Se recomienda que el panel de linfocitos esté bien caracte-



rizado para antígenos HLA y de preferencia se tengan células de individuos de diferentes razas con el fin de abarcar un mayor número de especificidades, para esto los laboratorios deben contar con equipo para almacenamiento en nitrógeno líquido de células seleccionadas. Una posibilidad alternativa es formar el panel con células obtenidas de individuos no relacionados tomadas al azar. En nuestro caso las células de referencia se obtuvieron de familiares de nefrópatas y personal del laboratorio por lo que se aumentó el número de donadores a 40 para células T y 30 para células B.<sup>42,43</sup>

Al analizar la Tabla No. 4 se observa que no se encuentran representadas todas las especificidades HLA, debido a que algunas no se pueden tipificar en el laboratorio y otras se presentan con baja frecuencia en la población mexicana como son A26, A29, Bw22, otras especificidades HLA se encuentran fuertemente representadas en el panel como son: A2, B5, Bw35, A9, B40, lo cuál está de acuerdo con los resultados de frecuencia antigénica en la población mexicana obtenidos por Gorodezky, C. et al (1979) y Arellano, J. et al (en preparación).

Con la separación de linfocitos en ficoll-hypaque se obtiene hasta un 90 % de mononucleares los cuáles al someterse a formación de rosetas de acuerdo al método usado por Terasaki, P et al (1978), pueden ser separadas en subpoblaciones T y B. Los porcentajes de rosetación fueron altos aproximadamente 70 % de células T formaron rosetas, en tanto que después de una segunda rosetación la purificación de linfocitos T y B puede llegar hasta un 90 %.<sup>45</sup>

En todos los experimentos se hizo una sola rosetación por - encontrar que la reactividad de los sueros anti-HLA-DR fue adecuada contra la población obtenida de linfocitos B con los tiempos de incubación indicados.

La información obtenida en las hojas de colección de datos para células T y B se condensa en la Tabla No. 5. En el - análisis de reactividad de los sueros contra las células T y B, se observa que en la categoría I el 12% para células - T y el 18% con células B nunca reaccionaron con el panel de donadores probablemente porque se trate de mujeres no inmunizadas o que sus anticuerpos estén dirigidos contra otras especificidades.

Aproximadamente el 50% de los sueros se encuentra en la categoría II, existe la posibilidad que en algunos de estos sueros con 1 o 2 reacciones positivas éstas fueran falsas - positivas. El 20.8 % de los sueros reaccionaron contra células T y 18.8 % contra células B, los sueros incluidos en la categoría III presentaron reacciones multiespecíficas.

En la categoría 4 están incluidos los sueros 40 y 46 que - resultaron adecuados para intercambio con el NIH y que dieron 18 y 14 reacciones positivas respectivamente.

La categoría 5 incluyó sueros que presentaron de 21 - 30 - reacciones positivas lo cual podría indicar multiespecificidad, pero debido a la frecuencia con que las especificidades B5, Bw35 (50%) y A2 (55%) estuvieron representadas en - el panel, hizo posible obtener buenos sueros en esta categoría. Los dos sueros restantes usados para intercambio, el 21 y 222 se encontraron en esta categoría presentando títu-



los altos de anticuerpos aparentemente dirigidos contra una sola especificidad, junto con otros sueros que reaccionaron con una amplia gama de especificidades.

La categoría 6 se formó para linfocitos T enriquecidos en - contrando un sólo suero el # 95 con 92.3 % de reacciones po - sitivas multiespecíficas considerándolo un suero control po - sitivo anti HLA.

La formación de anticuerpos contra antígenos HLA en multípa - ras fue alta 88 % para células T y 82% para células B compa - rándola con la obtenida por Arhons, S del 30% en primiges - tas<sup>41</sup> o el 8 % reportado por Oh, J.H. y Maclean, L.D. - (1975), también en primigestas y más del 50 % obtenido en - estudios con multíparas.<sup>42,43,48</sup>

En las distintas categorías en que se agruparon los sueros los porcentajes de reactividad contra células T son mayores que contra células B, esto puede deberse a que las células B son más resistentes a la lisis y por ello necesitan perío - dos más largos de incubación con antisueros y complemento, o bien, al hecho de estar contaminadas con otras células por haberse efectuado una sola formación de rosetas.

El análisis de los patrones de reacciones concordantes y - discordantes de los sueros con linfocitos T y B muestra que el número de sueros que reaccionaron contra células T y B - fue alto 74.4 % en tanto que el número de sueros que reac - cionaron con células T y no contra células B fue 13.6 % y - el porcentaje de sueros negativos con T y positivos contra células B fue del 7.6 %. Este último porcentaje incluyó a

los 19 sueros con anticuerpos anti HLA dirigidos contra células B, desafortunadamente el número de especificidades - HLA-DR incluido en el panel no permitió su análisis por grupos de reactividad.

Los 11 sueros que nunca reaccionaron positivamente contra - linfocitos T o B representaron el 4.4 % y se les puede considerar como sueros controles negativos.

La comparación de los patrones de reactividad de los sueros con el panel de células T y B puede hacerse de 2 formas: la primera por el uso de computadoras, es empleada en programas de investigación que manejan un número muy grande de sueros, otra forma alternativa es hacerlo manualmente comparando la reacción de los sueros problema con sueros tipificadores o con un panel de linfocitos seleccionados.<sup>42</sup>

En nuestro caso el análisis se efectuó manualmente determinando el número de veces que un suero dio reacción positiva y comparándolo con las especificidades HLA presentadas por las células. En esta forma se analizaron los patrones de reacción de los 250 sueros contra linfocitos T y B y aquellos sueros que presentaron reacción positiva cuando había cierta especificidad HLA fueron seleccionados y sometidos al análisis estadístico de  $X^2$  usando tablas de contingencia de  $2 \times 2$ , teóricamente los sueros debieron presentar sólo reacciones concordantes ++ positivo debiendo ser positivo o-- negativo debiendo ser negativo y no presentar reacciones discordantes +- positivo debiendo ser negativo -+ negativo debiendo ser positivo, porque el incremento de reacciones discordantes implica un suero no monoespecífico en el cual el análisis estadístico se traduce en valores de  $X^2$  no significativos.

De los sueros que resultaron significativos y monoespecíficos sólo el suero 46 no presentó reacciones discordantes - (+-) los otros sueros presentaron menos de 6 reacciones discordantes.

Es importante considerar para este análisis la reactividad cruzada de antígenos HLA debido a que en ocasiones se presentan estas reacciones y al entrar los resultados a la Tabla de 2 x 2 no son consideradas implicando una baja en la significancia estadística, en este caso el suero número 222 anti-HLA-A2 presentó 6 reacciones discordantes, 4 + - y 2 - + sólo que de las + - 3 veces reaccionó contra HLA-A28 y este antígeno cruza con HLA-A2, considerando reacciones de este tipo aquí sólo habría una reacción + - y con ello la significancia estadística se incrementaría. Si bien se considera que el porcentaje de sueros monoespecíficos obtenido de 250 sueros fue bajo (4%) los beneficios de haber logrado obtener estos sueros son grandes, el participar activamente en los programas de intercambio de sueros implicará que el IMSS reciba más sueros tipificadores de especificidades comunes y nuevas.

El valor comercial de estos sueros  $250 \text{ ml} \times 4 = 1000 \text{ ml}$  si se basa uno en el precio del mercado de 0.5 ml que es de \$ 2,000.00 alcanza aproximadamente la cifra de \$ 4'000,000, mientras que la inversión en este trabajo por concepto de material de laboratorio y reactivos es de aproximadamente \$ 250,000

Desde luego que, el trabajo más que contemplar beneficios económicos se encaminó a ampliar las posibilidades del IMSS

de tener acceso a sueros tipificadores que permitan reali -  
zar pruebas de histocompatibilidad de mayor calidad para la  
selección de parejas donador - receptor con fines de trans -  
plante.

El laboratorio se acredita plenamente ante el NIH y recibe  
gratuitamente anualmente del orden de 100 viales de 0.5 ml  
lo que amonta a una cifra comercial de \$ 200,000 amén del -  
amplio grado de calidad de los sueros del NIH.

## GLOSARIO.

MHC — Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Región cromosómica que contiene loci que controlan la síntesis de antígenos de transplante y que juegan un papel fundamental en los procesos inmunes.

Locus — Posición de un gen sobre un cromosoma ( plural: loci ).

HLA — El MHC del hombre, homólogo al Sistema H-2 del ratón.

Alelo — Forma alternativa de un gen que ocurre en un mismo locus.

Haplotipo — La composición genética haploide de una región cromosomal: Una serie de alelos en un segmento definido de un cromosoma que son usualmente transmitidos por los padres como una unidad a los hijos 2 haplotipos uno de cada padre constituyen el genotipo.

Enlace — Dos o más loci del mismo cromosoma suficientemente juntos que tienden a segregarse juntos.

Desequilibrio de enlace — La tendencia en la población de algunos alelos de loci estrechamente enlazados que se presentan juntos en el mismo haplotipo más frecuentemente de lo esperado por el azar.

- Ir — Loci de respuesta inmune que controla la capacidad de un animal para responder inmunológicamente a una gran variedad de antígenos.
- LD — Determinantes del MHC originalmente definidos por respuesta de linfocitos en MLC. Controlados por el locus HLA-D en el hombre y LD-1 en el ratón.
- MLC — Prueba de cultivo mixto de linfocitos del inglés - mixed lymphocyte culture . Método usualmente estudiado por incorporación de timidina tritiada en los linfocitos estimulados por células alogénicas *in vitro* .
- La — Antígenos asociados a la región de respuesta inmune que son controlados por la región H-21 en el ratón y son primeramente expresados sobre linfocitos B, - macrófagos y células epidermales. Aparentemente un sistema antigénico homólogo ha sido descrito en el hombre y son algunas veces referidos como antígenos la-like o antígenos de células B.
- Monoespecífico — Suero con anticuerpos dirigidos en contra de una sola especificidad de antígenos HLA.
- Multiespecífico — Suero con anticuerpos dirigidos a varias especificidades de antígenos HLA.
- EC — Eritrocitos de carnero.

Roseta T — Linfocito T que tiene adheridos 4 o más EC en su superficie celular.

MacCoy 5A — Medio de cultivo suplemento con glutamina y SFT.

Petrolatum — Aceite Mineral.

NIH — Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos de Norteamérica.

OMS — Organización Mundial de la Salud.

IMSS — Instituto Mexicano del Seguro Social.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Fudenberg, H.A. (1978). *Inmunología Clínica*. 1a. Edición. *El Manual Moderno*. México, págs. 128-146, 174-178.
2. Bach, F.H. and Van Rood, J.J. (1977) The Major Histocompatibility Complex. *Genetics and Biology*. N. Engl. J. Med. 295: 806-813, 872-878, 927-936.
3. Dausset, J. and Svejgard, A. eds (1977) *HLA and Disease*. 1a. Edición. Williams & Wilkins Co. Baltimore pp. 20-29, 32-43.
4. Cunningham, B.A. (1977) The Structure and Function of Histocompatibility Antigens. *Sci. Am.* 237: 96-107.
5. Gill, T.J. III. Cramer, V.D. Kunz, W.H. (1978) The Major Histocompatibility Complex. Comparison in the Mouse, Man and Rat. *Am. J. Pathol.* 90: 737-777.
6. Graff, R.J. (1978) Minor Histocompatibility Genes and Their Antigens. *Transplant. Proc.* X: 701-705.
7. Tissot, G.R. and Cohen, C. (1974) Histocompatibility in the Rabbit linkage between RL-A MLC and the He blood Group loci. *Transplantation* 18: 142-150.
8. Caldwell, J. (1979) System. Polimorphism of the BoL-A. *Tissue Antigens*. 13: 319-329.
9. Vaiman, M. and Garnier, H. (1972) The SL-A Histocompatibility System. *Transplantation* 14: 541-550.
10. Vriesendorp, H.M. Epstein, R.B. D'Amaro L. Westbroek, D.L. Van Rood, J.J. (1972) Polymorphism of the DL-A System. *Transplantation* 14: 299-307.



- 11 Geczy, A.F. (1975) The Major Histocompatibility Complex of the Guinea Pig. I Serological and genetics studies. J. Immunol. 115: 705-710. -
- 12 Ziegler, A. Pink, J.R.L. (1975) Characterization of Major Histocompatibility (B) Antigens of the Chicken. Transplantation 20: 523-527. -
- 13 Dick, H.N. and Kissmeyer Nielsen, F. eds (1978) Histocompatibility Techniques. Elsevier North Holland Inc. New York pp. 9-37.
- 14 Bulletin of the World. Health Organization 39: 483 (1968).
- 15 Bulletin of the World. Health Organization 56: 461 465( 1978).
- 16 Fudenberg, H.A. (1980) Basic Clinical Immunology. 3rd. Edition LANGE. Medical Publications USA. pp.181 190.
- 17 Suciu-Foca, N. and Rubinstein, P (1977) Immunogenetics of the HLA System. Genetics fine structure of the HLA regions. Transplant. Proc. 9: 385-391.
- 18 Bridgen, J. Snary, D. Crumpton, J.M. Barnstable, C. - Goodfellow, P. Bodmer, F.W. (1976) Isolation and N-terminal amino acid sequence of membrane bound human HLA-B Antigens. Nature 261: 200-204.
- 19 Springer, T.A. Kaufman, F.J. Terhorst, C. Strominger, L.J. (1977) Purification of human HLA linked B cell antigens. Nature 268: 213-217.
- 20 Allison, J.P. Pellegrino, M.A. Ferrone, S. Callahan G.N. Reisfeld, R.A. Biologic and chemical characterization of HLA antigens in human serum. J.Immunol. 118: 1004-1009.

- 21 Reen, D.J. (1980) HLA Antigens Frecuencies in an Irish population . Tissue Antigens. 15: 369-372. -
- 22 Woimant, F. Lesobre, C.D. Piéron, R. (1980) The distribution of genes HLA and frecuencies of haplotipo African West. Tissue Antigens 15: 216-219.
- 23 Gorodezky, C. Teran, L. Escobar Gutiérrez A. (1979) - HLA frecuencies in a mexican mestizo population. Tissue Antigens. 14: 347-352.
- 24 Bodmer, W.F. (1972) Evolutionary Significance of the HL-A System. Nature 237: 139-144.
25. Rosenberg, L.E. and Kidd, K.K. (1977) HLA and disease susceptibility. N. Engl. J. Med. 297: 1060-1062.
- 26 Dausset. J. (1977) Biologic role of the HLA system. HLA Complex in Human Biology in the light of associations with disease. Transplant Proc. IX: 523-529.
- 27 Starzl, T.E. (1978) Reflexions in Transplantation. - Surg. Clin. North Am. 60: 879-894.
- 28 Morris, P.J. (1978) Histocompatibility Antigens in human organ transplantation. Surg. Clin. North Am. - 58: 233-244.
- 29 Kissmeyer Nielsen, F. (1978) International Forum: - Fifteen years of HL-A. What is the importance of HL-A compatibility for clinical outcome of renal transplantation. Vox Sang. 34: 171-188
- 30 Albrechtsen, D. Bratlie, A. Kiss, E. Solheim, B.G. - Thoresen, B.A., Thorsby, E. (1979) Significance of - HLA Matching in Renal Transplantation. Transplantation 28: 280-283.

- 31 Duquesnoy, J.R. Annen, B.K. Marrari, M.M. Kauffman, M H (1980) Association of MB compatibility with successful intrafamilial Kidney Transplantation. N. Engl. J. Med. 302: 821-824.
- 32 Claas, F.H. Paul, L.C. Van Es, L.A. Van Rood, J.J. - (1980) Antibodies against donor antigens on endothelial cells and monocytes in eluates of rejected kidney allografts. Tissue Antigens. 15: 19-24.
- 33 Opelz, G. Criol, R. Chun, C. Terasaki, I.P. (1980) - Combined effects of HLA Matching and Age in Renal Transplantation. Transplantation 29: 125-126.
- 34 Opelz, G. Terasaki, P.I. (1980) Dominant effect of - transfusions on kidney graft survival. Transplantation 29: 153-158.
- 35 Van Rood, J.J. Eermisse, J.G. Van Leeuwen, A. (1958) - Leukocyte antibodies in sera from pregnant women. Nature 181: 1735-1736.
- 36 Payne, Rose and Rolfs, M.R. (1958) Fetomaternal leukocyte incompatibility. J. Clin. Invest. 37: 1756-1763.
- 37 Terasaki, P.I. and Mc. Clelland, J.P. (1964) Microdroplet assay of human serum cytotoxins. Nature 204: 998-1000.
- 38 Bach, F.I. and Voynov, N.K. (1966) One-Way stimulation in Mixed Leukocyte Cultures. Science 153: 545-547
- 39 Walford, R.L. and Troup, G.M. (1967) Monospecific - Lymphocytotoxic antiserum, an Absorption Study. Vox Sang. 12: 173-185.
- 40 Sanderson, A.R. and Thorsby, E. (1977) Anti MHC Xenoserum and alloterminology. Transplantation 23: 525-526.

- 41 Ahrons, S. (1971) Leukocyte Antibodies: Occurrence in primigravidae. *Tissue Antigens*. 1: 178-183.
- 42 Braun, W.E. and Kayhor, D.E. (1976) Screening Sera - for HLA Antibodies. In: *Manual of Clinical Immunology*. Eds. Rose, N.R. and Friedman, H. Am. Soc. - Microbiol. Washington, D.C. pp. 790-796.
- 43 Castelli, M.C. (1979) Screening and Characterization of New Reagents in: *Histocompatibility Techniques*. Eds. Dick, H.M. and Kissmeyer Nielsen, F. Elsevier North Holland Inc. New York, pp. 51-58.
- 44 Boyum, A. (1968) Separation of the leukocytes from - blood and bone Marrow. *Scand. J. Clin. Lab.* 97: 31-50
- 45 Terasaki, P.I. Bernoco, D. Park, M.S. Ozturk, G. Iwaki Y (1978) Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C, and D antigens. *Am. J. Clin. Pathol.* 69: 103-120.
- 46 Canady, W.G. Martin, S.L., Yunis, F.J. Imbar, M. - (1978) Effects of fresh serum obtained from baby, - young and mature Rabbits on specificity and Cross- - reactivity of HLA reactions. *Clin. Histocompat. Test.* 3: 41-46.
- 47 Oh, J.H. and McClean, L.D. (1975) Comparative Immunogenicity of HL-A antigens: a study in primiparas. *Tissue Antigens*. 5: 33-37.
- 48 Vasalli, P. P. de Moerloose, J. Chardonnens, X. (1979) Screening Program for Anti-DR Typing Reagents. *Tissue Antigens*. 13: 77-80.
- 49 Nomenclature for Factors of the HLA System (1980). - *Tissue Antigens*. 16: 113-117.