

TIPAJE HLA DE CLASE I POR LA TÉCNICA DE MICROLINFOTOXICIDAD

Al finalizar la práctica, el alumno debe ser capaz de:

- Distinguir entre células viables y lisadas en un ensayo de citotoxicidad.
- Identificar los alelos HLA-I expresados según los patrones de reacción.
- Identificar los haplotipos en un estudio familiar.
- Seleccionar el mejor emparejamiento donante-receptor.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS: *(Se recomienda revisar la teoría de clase)*

Para los trasplantes de progenitores hematopoyéticos, antes llamados de médula ósea, se requiere una alta **compatibilidad HLA entre donante y receptor**. Esto quiere decir que ambos deben tener el mayor número posible de alelos HLA idénticos. Cuando una persona necesita un trasplante de este tipo, lo normal es comenzar a buscar al donante entre sus hermanos. Se debe a que la probabilidad de que dos hermanos biológicos hayan heredado los mismos haplotipos HLA, y tengan entonces las mismas moléculas HLA en sus células, es 1/4. Si así no se encuentra un donante adecuado se busca en bases de datos de donantes voluntarios. Estas bases de datos deben contener miles de donantes ya que el grado de polimorfismo (número de alelos distintos) es muy grande (Tabla 1). El paso inicial, en todos los casos, es identificar las moléculas HLA del receptor y de los donantes potenciales. Como ejemplo, en esta práctica se van a identificar las moléculas HLA de clase I de una persona que necesita un trasplante de progenitores hematopoyéticos, a quien llamaremos Fuensanta. Utilizaremos el método de microlinfotoxidad (Figura 1).

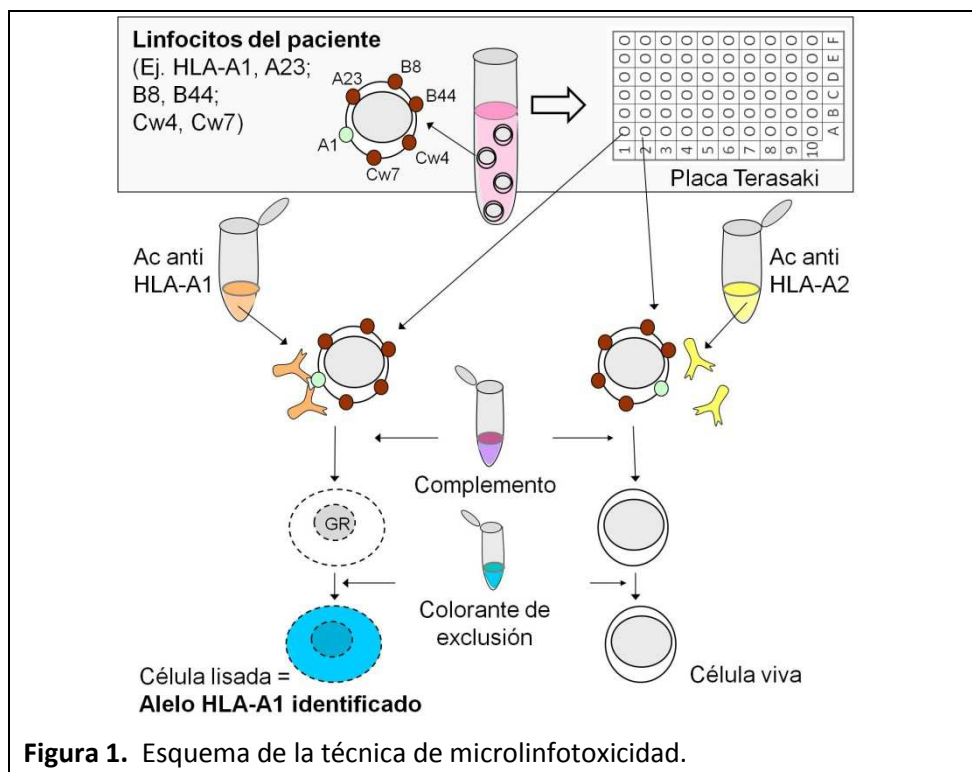


Tabla 1. Listado de alelos HLA-A, B, C y DRB1 más frecuentes en Caucasianos. HLA de clase I determinados por método de microlinfotoxicidad. HLA-DRB1 determinados por PCR-SSP.

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1
1	7	1	01:01
2	8	2	01:02
3	13	3	01:03
11	18	4	03:01
23	27	5	04:01
24	35	6	07:01
25	38	7	08:01
26	39	8	09:01
29	44	12	10:01
30	45	14	11:01
31	49	15	11:04
32	50	16	12:01
33	51		13:01
66	52		14:01
68	57		15:01
74	60		15:02
	62		16:01
	65		

El fundamento de la técnica es: en una placa con múltiples pocillos (placa Terasaki) incubaremos **linfocitos** del paciente a tipar (en este caso Fuensanta), con un **panel de anticuerpos frente a moléculas HLA específicas** (Figura 1). Los Ac se unirán a las moléculas HLA de la superficie de las células, en caso de reacción positiva. En un paso posterior, se añade **complemento** a todos los pocillos. En aquellos pocillos donde se haya producido reacción entre anticuerpos y moléculas HLA se activará el complemento sobre la membrana de las células y éstas se lisarán. Para determinar si las células están **lisadas** (reacción +) o **vivas** (reacción -), se añade un **colorante de exclusión**, denominado Azul Tripiano, que sólo es capaz de penetrar en las células muertas. Al observar los pocillos con un microscopio de contraste de fase, se podrá determinar en cada caso si las células están lisadas (coloreadas de azul = reacción positiva) o vivas (claras y refringentes = reacción negativa).

Las células que se emplean habitualmente en los estudios de histocompatibilidad son los linfocitos. La razón es que se aíslan fácilmente de sangre periférica, o de bazo y ganglios linfáticos si se trata de donantes cadáveres, y mantienen su viabilidad varios días in vitro. Los Ac para el tipaje son monoclonales o proceden de sueros de multíparas y con frecuencia son una **mezcla de Ac** que reconocen más de una especificidad HLA (ver las plantillas de la última página). Debido al alto polimorfismo alélico de las moléculas de histocompatibilidad, para determinar el tipaje HLA de un individuo, se suelen utilizar 200 Ac distintos o incluso más, empleando siempre más de un Ac para cada especificidad. A la hora de interpretar los resultados, hay que tener en cuenta que algunas moléculas comparten epítomos con otras, formando grupos de **reactividad cruzada**. Así, por ejemplo, los anticuerpos anti HLA-A3, pueden reconocer también epítomos en HLA-A11 (Figura 2).

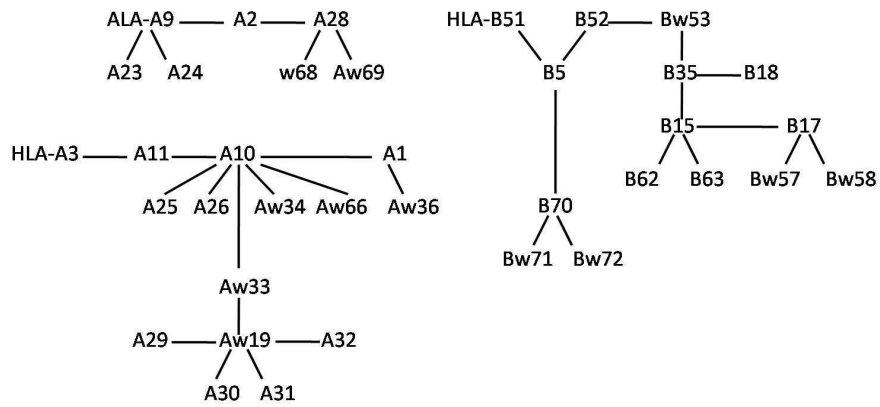


Figura 2. Ejemplos de grupos importantes de reactividad cruzada en los loci HLA A (izquierda) y B (derecha).

EQUIPAMIENTO, REACTIVOS Y MUESTRAS:

- Linfocitos a tipar aislados por Ficoll-Hypaque.
- Tubos de poliestireno de 5ml y gradilla.
- Centrífuga para tubos Eppendorff
- Placas Terasaki
- Pipetas de 2-20µl y puntas (alternativamente, dispensador Hamilton)
- Aceite mineral (Merck 7174)
- Batería de anticuerpos anti moléculas HLA de clase I, control negativo (suero AB diluido en medio de cultivo) y control positivo poliespecífico.
- Complemento.
- Azul tripano 1/5 en PBS.
- Microscopio invertido.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (por parejas):

Las plantillas de más abajo representan tres placas Terasaki con los Ac a pipetear. Cada pareja utilizará una, la que le asigne el profesor. En las columnas vacías anotarán, al final de la práctica, sus resultados y los de sus compañeros.

Ac anti productos alélicos HLA-A

1	Control -					
2	Control +					
3	A1					
4	A2					
5	A3					
6	A11					
7	A23					
8	A23+24					
9	A25					
10	A30+31+74					
11	A34+66					
12	A68+69					

Ac anti productos alélicos HLA-B

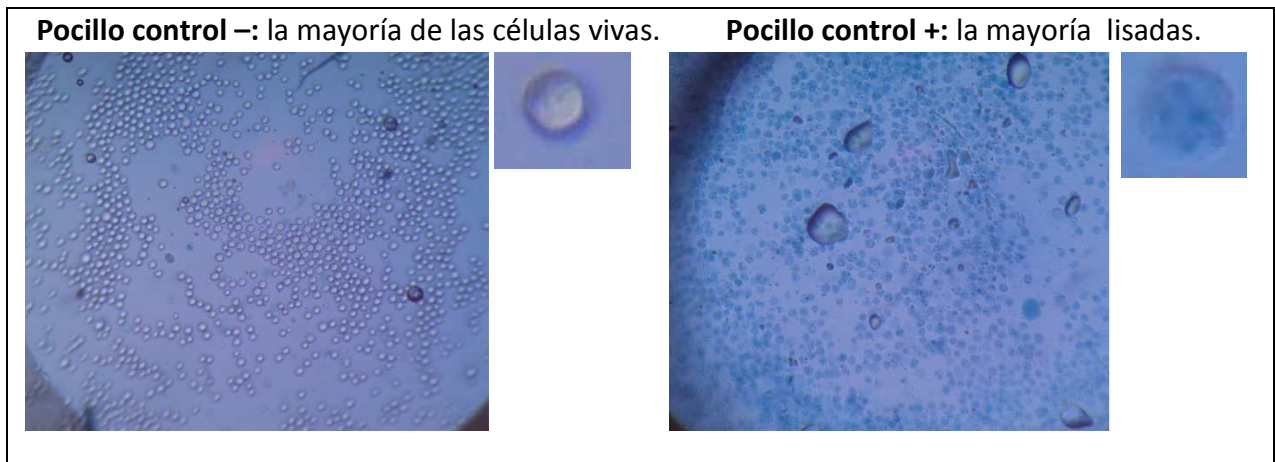
1	Control -					
2	Control +					
3	B7					
4	B8+59					
5	B13					
6	B18					
7	B27+57+A3					
8	B35					
9	B44+45					
10	B51+52					
11	B57+58					
12	B60+61+48					

Ac anti productos alélicos HLA-C

1	Control -					
2	Control +					
3	Cw1					
4	Cw2+B70					
5	Cw2+4					
6	Cw2+6					
7	Cw3					
8	Cw4					
9	Cw5					
10	Cw6+4					
11	Cw7+A1					
12	Cw5+8					

1) Comprueben que tiene todos los Ac necesarios para completar la plantilla asignada.

- 2) En una placa Terasaki, seleccionar una columna limpia de 12 pocillos y pipetear 6µl de parafina líquida en cada uno de ellos.
- 3) Pipetear 3.5 µl (*) de cada Ac en su pocillo respectivo. La punta de la pipeta debe tocar el fondo del pocillo. Si cambian el orden de los Ac con respecto a lo indicado en la plantilla, anótenlo claramente.
(*) Nota: Este pipeteo y los siguientes se realizan hasta el primer tope para evitar burbujas.
- 4) Pipetear 4 µl de las células de Fuensanta por pocillo cuidando de que se mezclen con la "gota" de Ac pipeteada antes.
- 5) Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Pipetear 6 µl de complemento por pocillo, cerciorándose de que se mezcla con las células y Ac.
- 7) Incubar 1 hora a temperatura ambiente o 20 minutos a 37°C.
- 8) Pipetear 6 µl/pocillo de Azul Tripano, previamente diluido a 1/5 (preguntar si está ya diluido).
- 9) Dejar sedimentar las células 10 minutos y leer en el microscopio invertido a 200x.
- 10) Lectura al microscopio: si la técnica se ha realizado correctamente, observaremos:



Ahora leeremos el resto de los pocillos y les anotaremos un resultado – o + según el criterio anterior. Cuando observemos cantidades similares de vivas y muertas, anotaremos +↓.

- 11) Anote sus resultados en la pizarra y copie los de sus compañeros. Con los datos de todo el grupo, obtenga el **Tipaje HLA-I completo** de las células tipadas:

HLA-A ,	B ,	Cw ,
---------	-----	------

Para finalizar, descarte en el contenedor el material sucio, deje el lugar de trabajo ordenado y complete los ejercicios de emparejamiento donante-receptor que les proporcione el profesor.