

## APLICACION DE CULTIVOS MIXTOS DE LINFOCITOS HUMANOS EN LA SELECCION DE DONANTES DE ORGANOS

González L., Sáenz E. y Gamboa F. \*

### RESUMEN

Se presenta en este reporte los resultados obtenidos de la comparación de las respuestas mitogénicas absolutas y relativas en una serie de cultivos mixtos de linfocitos. Se utilizó, por un lado, una o varias células no relacionadas en forma individual, y por el otro, una mezcla de células de individuos sanos no relacionados (MDNR) congelada en nitrógeno líquido por medios no automatizados.

Al evaluar un grupo de posibles receptores de órganos, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las respuestas absolutas en los cultivos mixtos estimulados con células no relacionadas individuales y la MDNR. Tampoco se encontró en las respuestas de 41 posibles donadores utilizando uno u otro valor de los anteriores para calcular los respectivos índices de respuestas relativas.

Se comenta, además, algunos aspectos técnicos que en relación con estos resultados deben tomarse en cuenta para la estandarización del procedimiento y para expresar lo más adecuadamente posible las respuestas individuales en los CML. Estos continúan siendo de gran utilidad para la selección de mejores donadores de órganos, en particular en grupos familiares.

---

\* Unidad de Inmunología y Radioinmunoanálisis, Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA). Apdo # 4. Tres Ríos. Costa Rica.

### INTRODUCCION

Las llamadas técnicas celulares (CML y microcitotoxicidad) han jugado un importante papel en la definición de varios componentes codificados en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Ello ha contribuido, a su vez, a mejorar el conocimiento del papel de estas moléculas en el control y desarrollo de diversos fenómenos inmunobiológicos, incluyendo el rechazo de órganos y tejidos alogénicos (1,2,3).

El cultivo mixto de linfocitos (CML) fue desarrollado inicialmente para evaluar la similitud o disparidad entre hermanos u otros miembros de una familia, en cuanto a factores de histocompatibilidad del locus D que podían ser separados por recombinación de aquellos factores capaces de ser detectados por métodos serológicos (los de los loci HLA A, B y C) <sup>(4)</sup>.

A pesar del avance logrado con el desarrollo de técnicas serológicas y de genética molecular, el CML sigue siendo considerado un predictor adecuado, y en algunos casos indispensable, para medir la respuesta de los receptores hacia los órganos o tejidos trasplantados, especialmente en estudios familiares. <sup>(4,5,6,7)</sup>

El uso del CML, que requiere linfocitos de al menos dos individuos, el receptor (respondedor) y el posible donador (estimulador), estuvo originalmente restringido por limitaciones prácticas propias de la metodología no automatizada. Algunas de ellas fueron luego supe-

radas gracias a innovaciones importantes, como el uso de precursores de ADN (timidina tritiada) para la medición de las respuestas proliferativas, el tratamiento químico o radioactivo para la inactivación de la células estimuladoras y el desarrollo de técnicas de microcultivo y microcosechado rápido.<sup>(2)</sup>

A pesar de esos avances, algunos autores siguen considerando el CML un procedimiento técnicamente complicado con resultados muchas veces difíciles de interpretar. Esto ocurre como consecuencia, fundamentalmente, de la gran variedad biológica individual involucrada en muchas de estas pruebas funcionales.<sup>(1)</sup>

No obstante, para obviar estos inconvenientes, se ha propuesto diferentes métodos de expresión de los resultados del CML, incluyendo, entre otros, el cálculo del índice de estimulación (el valor de prueba en cuentas por minuto(cpm) dividido por las cpm del cultivo autólogo) y la respuesta relativa, que involucra la definición de un valor de referencia respecto al cual puede interpretarse la respuesta obtenida con cualquiera otras células en estudi.<sup>(8)</sup>

A su vez, este valor de referencia puede obtenerse de varias maneras; ya sea midiendo la máxima respuesta a un panel de células estimuladoras o mediante la determinación de la respuesta a una mezcla de células no relacionadas.

En el presente estudio se presentan los resultados obtenidos con la comparación de las respuestas en una serie de CML utilizando, por un lado, una o varias células no relacionadas, y por el otro una mezcla de individuos sanos no relacionados congelada en nitrógeno líquido por medios no automatizados. Igualmente se discuten las implicaciones de estos resultados en la estandarización, la interpretación y la

aplicación clínica de estos procedimientos en la selección de donadores de órganos y tejidos en el país.

## **MATERIALES Y METODOS**

Rutinariamente los CML realizados en el Laboratorio de Inmunología del INCIENSA para los programas de trasplante de riñón y médula ósea de la Caja Costarricense del Seguro Social se estandarizaron utilizando uno o varios donadores no relacionados<sup>(1,5)</sup>. Para efectos de este estudio, se evaluó paralelamente la respuesta de los mismos receptores (n=29) estudiados entre setiembre de 1992 y mayo de 1993, a una mezcla de células no relacionadas (MDNR) preparado como se indica más adelante. Posteriormente, se determinaron las respuestas relativas de 41 posibles donadores con diferentes grados de compatibilidad en relación con esas respuestas máximas para obtener en cada individuo dos índices relativos, uno con referencia a la respuesta del no relacionado individual de cada prueba y el otro con la respuesta a la MDNR.

### **MEZCLA DE CELULAS MONONUCLEARES NO RELACIONADAS (MDNR)**

Se extrajo 20 ml de sangre heparinizada (1 UI/ml) a cada uno de 13 individuos sanos (7 hombres y 6 mujeres) y se obtuvo las CMN utilizando un gradiente de ficol-hypaque según se ha descrito<sup>(9)</sup>. Las CMN fueron luego lavadas 3 veces con medio Hank's, homogenizadas por agitación y la suspensión final ajustada a una concentración de  $1 \times 10^7$  CMN/ml. Cada mililitro de esa suspensión fue depositado en un tubo aparte y centrifugado a 1500 rpm/ 5 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, cada botón de CMN fue colocado en un bario de hielo y

resuspendido gota a gota y muy cuidadosamente, en 1 ml de medio de congelación frío (0. ml de medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos, y vitaminas) + 0.1 ml de dimetil sulfóxido). La mezcla fue transferida a un provial de congelación, éste de inmediato a un congelador de -70°C y el día siguiente a un tanque de nitrógeno líquido hasta su uso.

Para la descongelación, el provial fue sumergido directamente en un baño a 37°C. Inmediatamente después de licuada la suspensión, la misma fue diluida gota a gota con 8-10 ml de medio RPMI completo y centrifugada a 1500 rpm/5 minutos. Por último, el botón fue resuspendido en el mismo medio y su concentración ajustada para el tratamiento con mitomicina y su posterior uso como MDNR en los cultivos mixtos.

#### **CULTIVOS MIXTOS DE LINFOCITOS (CML)**

Los CML practicados por el INCIENSA se realizan desde hace 8 años utilizando métodos estándar, con algunas modificaciones realizadas en nuestro laboratorio según se indica adelante<sup>(1)</sup>. En todos los casos, las CMN fueron obtenidas a partir de sangre venosa heparinizada, como se indicó antes, y fueron resuspendidas en medio RPMI completo.

Las células a ser probadas como estimuladoras fueron tratadas con mitomicina C (25-30 ug/ml suspensión CMN 5-10 x 10<sup>6</sup> / ml) durante 30 minutos a 37°C y lavadas 3 veces con 10 ml de medio Hank's, centrifugando 5 minutos a 4°C cada vez. Una vez lavadas, la concentración de las CMN tratadas con mitomicina fue ajustada a 2x10<sup>6</sup> CMN/ ml en el mismo medio. En todos los casos la viabilidad de las suspensiones, determinada mediante la exclusión de azul tripán, fue mayor del 95%.

Los CML se montaron, por triplicado, en volúmenes totales de 0.2 ml (0.1 ml CMN respondedor 1x10<sup>6</sup> ml + 0.1 ml CMN estimulador 2x10<sup>6</sup> / ml tratadas con mitomicina C) en placas de 96 pozos incluyendo siempre lo siguiente: un cultivo autólogo, los cultivos de prueba, uno o varios cultivos con CMN de individuos no relacionados, un cultivo de prueba con la MDNR y un control de las células tratadas con mitomicina. Para evaluar las condiciones de cultivo, se incluyó siempre otro control de CMN respondedoras estimuladas con concentraciones óptimas de fitohemaglutinina.

Una vez montado el ensayo, la placa fue mantenida durante 120 horas a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad. Al cabo de este tiempo, cada cultivo fue marcado con 1 uCi de timidina tritiada, para ser cosechados sobre papel de fibra de vidrio 18 horas más tarde utilizando un microcosechador Bellco.

Finalmente, la radioactividad de los cultivos fue cuantificada utilizando líquido de centelleo y un contador Beckman LS 8100.

Los resultados fueron expresados como índice de estimulación (IE), es decir:

$$IE = \frac{\text{cpm cultivo de prueba}}{\text{cpm cultivo autólogo}}$$

o como índice de respuesta relativa (RR):

$$RR = \frac{\text{cpm CMN respondedoras} - \text{cpm fondo} \times 100}{\text{cpm células con máxima respuesta} - \text{cpm fondo}}$$

Con base en la experiencia de nuestro laboratorio y de otros<sup>(10)</sup>, se consideró el 20% de RR como punto de corte para la compatibilidad en el CML, entre 20 y 30% los resultados dudosos y mayor de 30% un CML incompatible.

A menos que se haya indicado lo con-

trario, todos los reactivos fueron adquiridos de SIGMA CHEMICAL.

## RESULTADOS

Como se indicó antes, para efectos de este estudio, la respuesta a una MDNR preparada por medios no automatizados, fue evaluada en 29 posibles receptores de órganos estudiados en un período de 9 meses. Los resultados obtenidos en comparación con las células no relacionadas frescas evaluadas paralelamente en cada uno de estos ensayos, se resumen en el Cuadro 1 y la Figura 1.

La diferencia entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$  calculada por *t* de Student).

Seguidamente para evaluar la diferencia que pudiera encontrarse al calcular las respuestas con el no relacionado individual, por un lado, y por el otro con la MDNR, se procedió a comparar las respuestas relativas de 46 CML calculado con uno u otro valor como referencia. Los resultados de esta comparación se presentan en la Figura 2.

**CUADRO 1**  
Respuesta de posibles receptores de órganos a CMN no relacionadas frescas y a una MDNR, en cultivos mixtos de linfocitos.

	Cuentas por minuto	Índice de Estimulación Blástica
No relacionadas (n=29)	12527±4222	6.2±3.8
MDNR (n=29)	12322±5979	6.4±5.3

Además de que la diferencia entre los resultados mostró no ser estadísticamente significativa, se pudo establecer una correlación positiva ( $r=0.539$ ) entre los valores comparativos de los dos grupos y en la decisión (CML compatible, dudoso o incompatible) derivada de los mismos.

## DISCUSION

Puesto que el CML continúa siendo una prueba valiosa para la selección de donadores de órganos, principalmente a partir de grupos familiares, su estandarización se considera indispen-

sable para una adecuada aplicación clínica de sus resultados<sup>(1,2,5)</sup>.

Diferentes métodos se han utilizado para expresar la magnitud de las respuestas en el CML. El índice de respuesta relativo es, sin embargo, el que desde el punto de vista práctico no sólo ha demostrado la menor variancia, sino en el cual la dispersión de los resultados puede atribuirse más a la variabilidad genética que a los errores técnicos<sup>(1)</sup>.

Puesto que para su estandarización pueden utilizarse varios procedimientos que varían en su factibilidad, costo, etc; se evaluó en este estudio el uso de CMN frescas de uno o varios donadores

no relacionados y de una MDNR congelada para la determinación de compatibilidad en el CML. Nuestros resultados señalan, en primer lugar, que al evaluar en un grupo de individuos en el CML utilizando paralelamente ambos métodos, las respuestas promedio resultaron ser muy similares y sin una diferencia estadísticamente significativa. Las respuestas absolutas promedio mostraron ser los suficientemente altas (12322 cpm y 12526 cpm, respectivamente) respecto de los cultivos autólogos como para que sólo en unos pocos casos los resultados fueran ambiguos (Fig 1).

A su vez, la comparación de las respuestas obtenidas con posibles donadores calculando la respuesta relativa referida, en un caso al no relacionado individual y en el otro a la MDNR, dio como resultado una buena correlación en los valores. También se obtuvo una excelente concordancia, al definir la compatibilidad o no con el valor de 20% de respuesta relativa como punto de corte, de acuerdo a la experiencia de este y de otros laboratorios<sup>(10)</sup>.

Estos hallazgos confirman lo descrito (1) respecto de la conveniencia de expresar los resultados de las respuestas en el CML en estudios familiares utilizando índices relativos. Los índices de estimulación absolutos se ven más significativamente afectados por las respuestas de fondo, producto de la variabilidad biológica individual y otros factores relacionados.

No obstante, algunos autores<sup>(11)</sup> han señalado que el índice de estimulación estadísticamente evaluado podría resultar mejor que la respuesta relativa en la selección de donadores de médula ósea de individuos sin nexos familiares. En estos procedimientos en especial, el CML sigue siendo considerado, hasta la fecha, una de las pruebas fundamen-

tales para mejorar la tasa de éxito<sup>(2,12)</sup>. De acuerdo a los lineamientos de la Asociación Norteamericana de Histocompatibilidad e Inmunogenética (ASHI)<sup>(5)</sup>, en el caso de los trasplantes de médula ósea, se debe considerar como el donador de elección a aquel que comparte con el receptor los antígenos HLA A, B, C y DR y la compatibilidad en el CML en dos direcciones. Por su parte, se recomienda que en trasplantes que involucran donadores que no sean HLA idénticos y que muestren una compatibilidad fenotípica potencial, el CML debe ser repetido para confirmar la no reactividad. Idealmente, y de acuerdo a las mismas normas definidas por la ASHI, cada CML debe entonces incluir: un control autólogo, tres o más células estimuladoras no relacionadas o en su defecto, dos células no relacionadas y una mezcla de al menos tres células no relacionadas diferentes para cada célula respondedora a ser probada.

En resumen, los resultados de este estudio muestran que es posible utilizar confiablemente una mezcla de células no relacionadas congeladas por medios no automatizados y guardados en nitrógeno líquido, en la evaluación de las respuestas de los CML practicados para la selección de donadores de órganos. Los valores relativos obtenidos en un grupo de posibles donadores en comparación con células de uno o varios donadores no relacionados frescas, sugiere que es posible utilizar cualquiera de estos dos métodos, o de ser posible ambos simultáneamente, para la estandarización de este procedimiento inmunológico. El mismo, a pesar de las controversias seguirá siendo importante para los programas de trasplantes, especialmente para los de médula ósea, hasta tanto no resulte exitoso el intento por encontrar una prueba funcional más adecuada.

## **ABSTRACT**

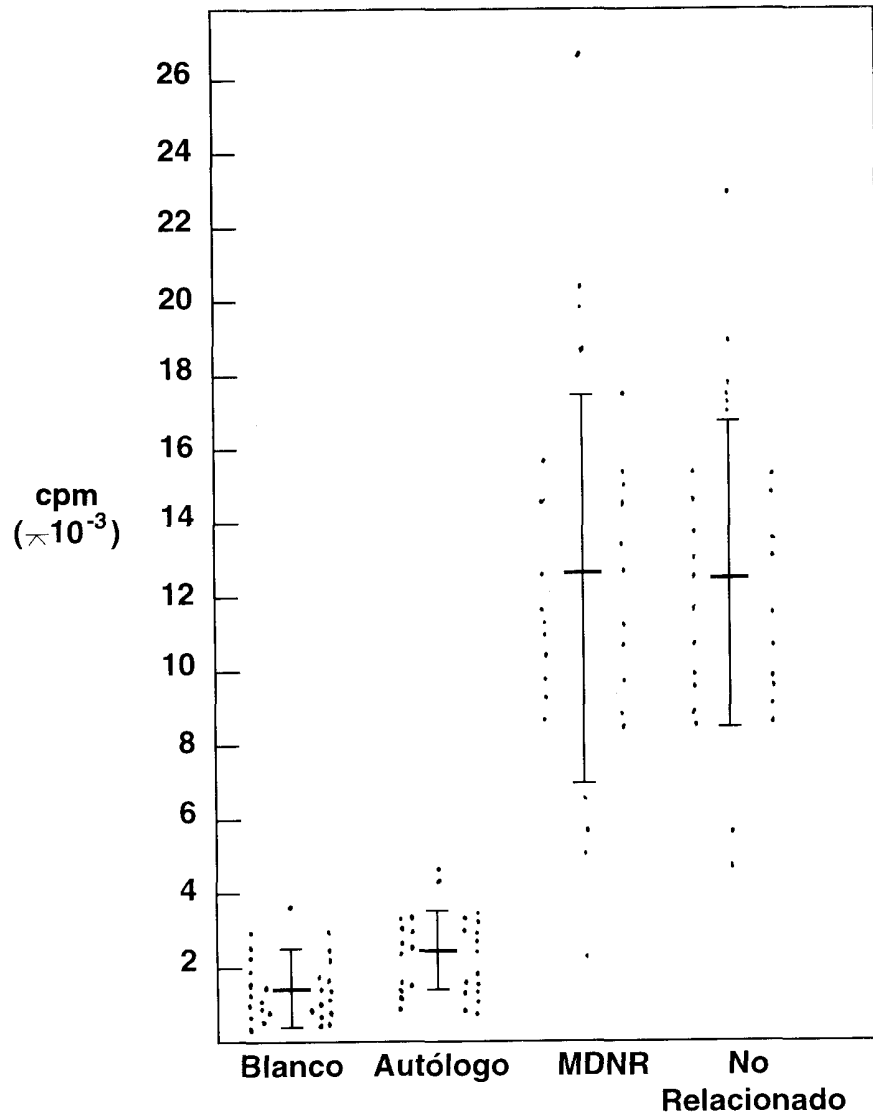
This study shows the results obtained by comparing the absolute and relative mitogenic responses in mixed lymphocyte cultures (MLC) using cells of both individual unrelated donors and a pool of 13 healthy unrelated donors preserved in liquid nitrogen employing manual procedures.

Non significant statistic difference was found between the absolute and relative mitogenic responses in MLC of a group of potential organ receptors stimulated by either of the two types of unrelated cells. Similar results were obtained when the relative response index of a group of potential donors was calculated simultaneously by using the two sets of stimulating cells as reference.

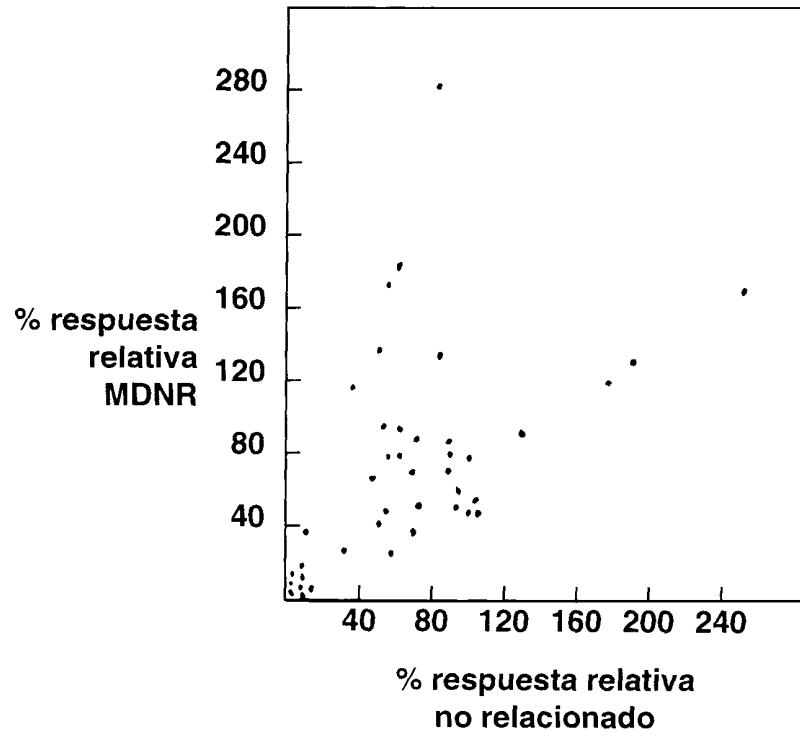
Some technical details related to these results, with special mention to standardization procedures, are also discussed.

**FIGURA 1**

Respuesta mitogénica de un grupo de receptores potenciales a células no relacionadas, en cultivos mixtos de linfocitos



**FIGURA 2**  
Correlación de las respuestas relativas  
en 41 cultivos mixtos utilizando como  
referencia una MDNR y no relacionados  
individuales





## BIBLIOGRAFIA

- (1) Dubey DP; Yunis I and Yunis EJ. Cellular typing: mixed lymphocyte response and cell-mediated lympholysis. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology* Edited by Rose N; Friedman H and Fahey JL. Third Edition. Washington: American Society for Microbiology 1986; Capítulo 131:847-858.
- (2) Frestenstein H and Ollier B. Cellular typing and functional heterogeneity of MHC-encoded products. *Brit Med Bull* 1987; 43(1): 122-155.
- (3) Hall BM. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 1991; 51(6): 1141-1151.
- (4) Pollack MS and Nikaein A. The MLC test: is it still needed? Why not and why? *BSHI Newsletter* 1992;10:3-4.
- (5) American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Standards for histocompatibility testing. *ASHI Quarterly* 1990; 14(1):122-128.
- (6) Morris PJ; Fuggle SV; Ting A et al. HLA and organ transplantation. *Brit Med Bull* 1987; 43(1):184-202.
- (7) Kaminsky ER. How important is histocompatibility in bone marrow transplantation? *Bone Marrow Transpl* 1989; 4:43 9-44.
- (8) Jorgensen F; Lamm LU and Kissmeyer Nielsen F. Mixed lymphocyte cultures with inbred individuals: an approach to MLC typing. *Tissue Antigens* 1973; 3:323-329.
- (9) González L; Frajman M; Sáenz E et al. Effect of tinidazole on the cellular immune response. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18: 499-502.
- (10) Radvany RM and Vaisrub N. HLA-Dr typing as a predictor of MLC compatibility. *Transplantation* 1984;38(4): 347-351.
- (11) Hobbs JR; Truman L and Abdul Abad A. Using volunteer unrelated donors (VUD) the relative response index (RRI) has been a relative rubbish index. In: BTS, BSHI. Royal Post Graduate Medical School. Wolfson Conference Centre London, 21 st and 22nd October 1991. p. 18.
- (12) León-Rodríguez E. Transplante de médula ósea alogéneico. *Rev Inv Clin* 1993; 45: 77-84.