



LA INDUCCIÓN DE INMUNOTOLERANCIA FRACASA EN UN MODELO DE TRASPLANTE HEPATOCELULAR

INDUCTION OF IMMUNOTOLERANCE FAILURES IN A HEPATOCELLULAR TRANSPLANT MODEL

Portugal V., Pereira J.G., Alonso A. (1), Bilbao J, García-Alonso I.

Laboratorio de Cirugía Experimental. Dpto. de Biología Celular(1). Universidad del País Vasco. Lejona.

Este trabajo fue financiado por la UPV/EHU (PROYECTO 144.327-EA018/97)

PALABRAS CLAVE

Tolerancia. Timo. Hepatocitos. Rata.

KEY WORDS:

Tolerance. Thymus. Hepatocytes. Rat.

Correspondencia:

PROF. DR. IGNACIO GARCÍA-ALONSO MONTOYA
Lab. de Cirugía Experimental
Fac. de Medicina y Odontología
48940-LEJONA
Tfno.: 94-464.77.00 (ext. 2645)
Fax: 94-464.92.66
E-mail: ocpgamoi@lg.ehu.es

RESUMEN

OBJETIVO: La inoculación de aloantígenos en el timo ha inducido alotolerancia específica frente a posteriores trasplantes cardíacos, renales y de islotes. Se estudia la posibilidad de inducir alotolerancia específica para el trasplante hepático, mediante pre-inoculación de hepatocitos en timo.

DISEÑO EXPERIMENTAL: Los hepatocitos se han obtenido de ratas singénicas (WAG). La inoculación en timo (8×10^6 hepatocitos) precedió dos semanas a la esplénica (200×10^6 células). En el grupo control se utilizaron como receptoras ratas singénicas ($n=20$), y en los demás ratas alogénicas (Sprague-Dawley): sin tratamiento ($n=20$) o con inmunosupresión (dos dosis de Ciclosporina A y una de dexametasona previas al implante tímico; $n=20$). Se ha estudiado la presencia de hepatocitos en timo y bazo, uno y siete días después del implante.

RESULTADOS. Los alo-hepatocitos perviven al menos tres semanas en el timo; en cambio, en el bazo son rechazados antes de siete días. El tratamiento inmunosupresor previo al implante tímico ha permitido encontrar hepatocitos supervivientes en el bazo siete días después de su implante (3/20).

CONCLUSIÓN. Nuestro modelo no ha permitido inducir un estado de alotolerancia específica. Se requieren nuevos estudios para valorar si el hallazgo de hepatocitos en tres alotrasplantes tiene alguna significación.

SUMMARY

BACKGROUND: The inoculation of alloantigens in the thymus has proved to induce specific allotolerance to subsequent cardiac, renal and islet transplants. The possibility of inducing specific allotolerance for hepatic transplants is studied by means of hepatocyte inoculation in thymus.

MATERIAL AND METHODS: The hepatocytes were obtained from syngenic WAG rats. Inoculation in thymus (8×10^6 hepatocytes) was performed two weeks before splenic inoculation (200×10^6 cells). Syngenic rats ($n=20$) were used as recipients in the control group, with allogenic Sprague-Dawley rats being used in the rest, without treatment ($n=20$) or with immunosuppression (Cyclosporine A 20 mg/Kg two days and dexamethasone 6 mg/Kg one day prior to thymic implant; $n=20$). The presence of hepatocytes in thymus and spleen was studied one day and seven days after the implant.

RESULTS. The allohepatocytes survived for at least three weeks in thymus; in spleen, however, they were rejected before the seventh day. Immunosuppressor treatment prior to the thymic implant enabled surviving hepatocytes to be found in spleen seven days after implant (3/20).

CONCLUSION. Our design has failed to induce specific allotolerance for hepatocytes. Further studies are required to assess if the finding of surviving hepatocytes in three animals is relevant.

INTRODUCCION

El trasplante de órganos abdominales es ya una práctica quirúrgica bien asentada. Sin embargo, un análisis detenido de la situación nos muestra la existencia de problemas todavía sin resolver. Todavía hoy día el rechazo es una de las principales causas de disfunción postimplante de los injertos (8), por lo que se necesitan largas e intensivas pautas de inmunosupresión. A pesar de su eficacia cada vez mayor, los fármacos inmunosupresores siguen presentando complicaciones (infecciones, neoplasias) que limitan el pronóstico del paciente trasplantado. Otro de los problemas es la escasez de donantes, que genera una angustiosa lista de espera, más acuciada en algunos grupos poblacionales (pacientes pediátricos). Aunque se han desarrollado nuevas técnicas para obtener más rendimiento de los donantes disponibles (trasplante hepático segmentario (12), trasplante hepatocelular (2)) todavía no se llega a satisfacer la demanda de trasplante hepático.

En los últimos años se ha renovado el interés por la inducción de inmunotolerancia en el trasplante de órganos. Desde los primeros trabajos de Billingham (4), se han sucedido múltiples investigaciones en este campo. Los éxitos más recientes en este campo se centran en la inoculación intratímica de antígenos del donante para inducir alotolerancia específica, previa al trasplante definitivo. Esto ha permitido que el trasplante orgánico realizado en un segundo tiempo no requiera tratamiento inmunosupresor. Así, se han obtenido éxitos parciales en el trasplante de islotes pancreáticos (21), en el trasplante cardíaco (14) y en el renal (22).

El objetivo de nuestro trabajo es tratar de inducir un estado de inmunotolerancia específica hacia un alotrasplante de hepatocitos en el bazo previa inoculación intratímica de hepatocitos.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado ratas singénicas (machos WAG de 250 g) como donantes de todas las suspensiones hepatocitarias, y como receptoras en el grupo control. En el resto de los grupos se han utilizado como receptores ratas Sprague-Dawley (machos de 21 días, 70-80 g). Todas las experiencias se han llevado a cabo siguiendo la normativa vigente sobre utilización y cuidados del animal de experimentación. La histoincompatibilidad de estas especies ha sido comprobada mediante la realización de injertos cutáneos, según la técnica descrita por Billingham (5).

Los hepatocitos se han obtenido mediante la técnica de perfusión enzimática descrita por Seglen (24). En cada aislamiento se obtuvieron 200×10^6 hepatocitos, con una viabilidad del 95% valorada mediante el test de exclusión de azul Tripán.

Bajo anestesia con éter, a través de una cervicotomía media y tras diseccionar la musculatura pretraqueal, se accedió a los polos superiores del timo, inoculando 8×10^6 hepatocitos suspendidos en 0,2 ml de EMEM en cada lóbulo. Catorce días después, se procedió a inocular 20×10^6 hepatocitos a través del polo inferior del bazo, según técnica ya descrita (13). Cuando se asoció inmunosupresión transitoria, los animales recibieron Ciclosporina A (20 mg/kg, i.p.) (22) la víspera y el día de la inoculación intratímica; esta última dosis se acompañó de Dexametasona (6 mg/kg, s.c.) (22).

Se han considerado tres grupos experimentales: control (implante isogénico en bazo; $n = 20$), alogénico ($n = 20$) y alogénico + inmunosupresión ($n = 20$).

Los animales fueron sacrificados a las 24 horas y 7 días posttrasplante para análisis histológico del bazo y del timo. Los órganos fueron incluidos en formol para su procesamiento hasta parafina. Sobre cortes de 5 micras de espesor teñidos con hematoxilina-eosina, tras cegarse las muestras, dos observadores valoraron mediante microscopía óptica la presencia o ausencia de hepatocitos. Para constatar la naturaleza hepatocitaria de las células presentes en el bazo, el séptimo día postimplante se estudió la presencia de riboflavina en las mismas. Para ello, se observaron secciones histológicas desparafinadas y sin teñir, en un microscopio de fluorescencia bajo luz de 488λ .

RESULTADOS

Los hepatocitos inoculados a nivel intratímico se han mantenido morfológicamente normales durante al menos 21 días, independientemente de su grado de histocompatibilidad y de la asociación o no de terapéutica inmunosupresora antes de la inoculación (Fig. 1). Su presencia se ha constatado en todos los animales inoculados.

A nivel esplénico, el isoinjerto hepatocitario ha sido aceptado con normalidad. Siete días después del implante, los hepatocitos transplantados mostraban una morfología normal (Fig. 2).

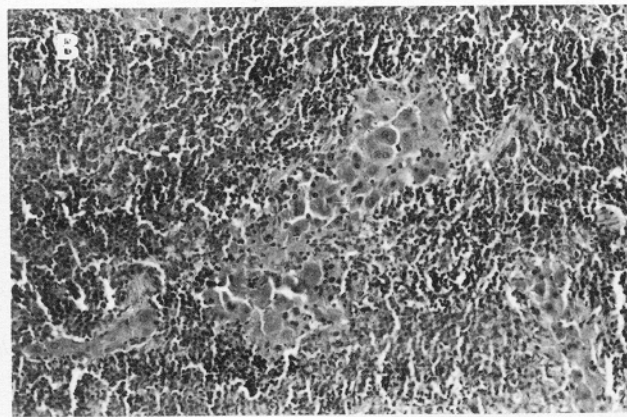
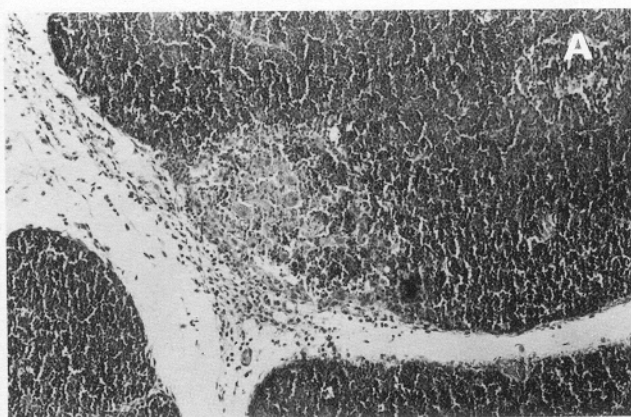


Figura 1. Hepatocitos alogénicos en el timo. (A) 24 horas después de la inoculación se encuentran arracimados en localización subcapsular de un lobulillo (H-E 100x). (B) 21 días después de su inoculación se han organizado en cordones (H-E 200x).

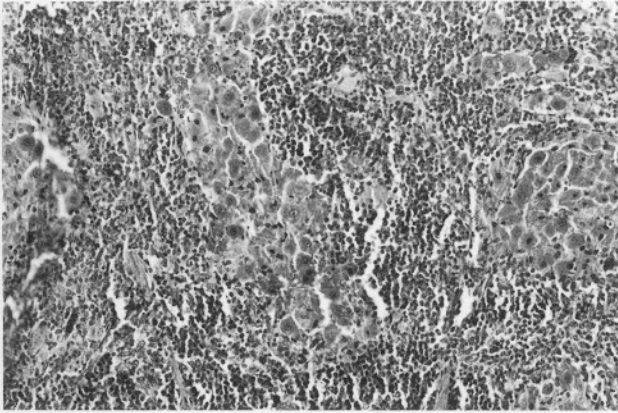


Figura 2. Hepatocitos singénicos en el bazo. Una semana después de su inoculación presentan su característica organización cordonal en el seno de la pulpa esplénica (H-E 200x).

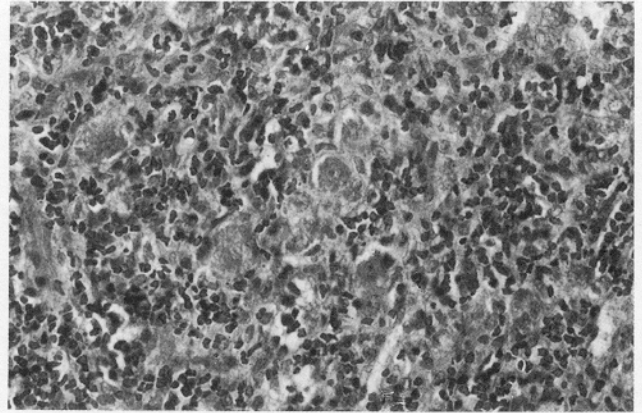


Figura 3. Hepatocitos alogénicos en el bazo. Al día siguiente de su inoculación puede ya apreciarse un infiltrado inflamatorio entre los hepatocitos (H-E 400x).

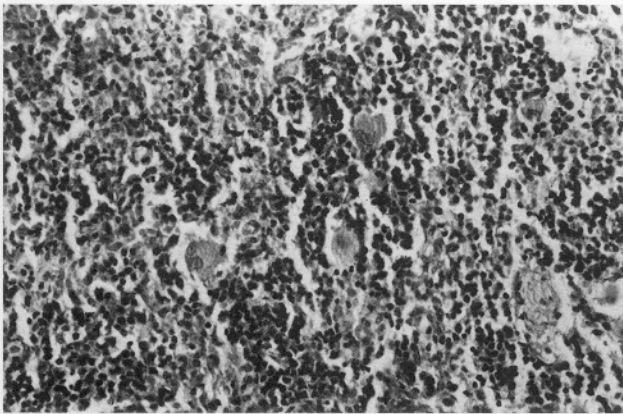


Figura 4. Hepatocitos alogénicos inoculados en el bazo 15 días después de un implante intratímico de hepatocitos asociado a inmunosupresión. Una semana después de la inoculación se encuentran algunos hepatocitos con núcleo bien conservado pero ligeramente distorsionados en su morfología (H-E 200x).



Figura 5. Microscopía de fluorescencia. Hepatocitos alogénicos inoculados en el bazo 15 días después de un implante intratímico de hepatocitos asociado a inmunosupresión. La presencia de riboflavina se manifiesta como una emisión de luz clara, que pone en evidencia la presencia de hepatocitos a nivel parafolicular en el bazo quince días después del implante (200x).

En la serie alogénica, 24 horas después del trasplante todos los animales estudiados presentaban hepatocitos de características normales (Fig. 3). En cambio, al séptimo día no se encontraron hepatocitos en ninguno de los animales, observándose signos evidentes de un fenómeno de destrucción tisular (infiltrado hemorrágico, abundantes células multinucleadas).

Finalmente, en la serie en que la inoculación intratímica de hepatocitos alogénicos se acompañó de un breve tratamiento inmunosupresor, todavía existían hepatocitos en el bazo siete días después del implante en tres de los veinte animales estudiados; si bien sus características morfológicas no eran totalmente normales (ausencia de disposición en cordones, pérdida de la normal relación núcleo-citoplasma, dificultad para la identificación de nucleolos, vacuolización citoplasmática) (Fig. 4). La naturaleza hepatocitaria de estas células se confirmó mediante la detección de riboflavina citoplasmática (Fig. 5).

DISCUSION

El trasplante intraesplénico de hepatocitos es un modelo experimental bien estudiado que permite valorar la respuesta inmunológica del animal receptor. De hecho, el alotrasplante

se comporta como un injerto libre, rechazándose entre el 4º y 5º día postrasplante si no se asocia inmunosupresión (11). Por este motivo hemos elegido el séptimo día para cuantificar la presencia o no de hepatocitos y, por tanto, de rechazo.

La importancia del timo en el desarrollo de tolerancia adquirida ha sido puesta de manifiesto en numerosos modelos. Así, se ha logrado inducir tolerancia donante-específica tras la inoculación en timo de islotes pancreáticos (21), glomérulos renales (22), esplenocitos (18, 19) y linfocitos T (20). En cambio, en nuestro diseño experimental la simple inoculación intratímica de hepatocitos, a pesar de ser bien tolerada a nivel local, no ha sido capaz de inducir tolerancia. Del mismo modo, cuando se ha añadido una pauta de inmunosupresión eficaz tampoco se ha observado una adecuada tolerancia aunque en algunos animales se ha observado la presencia de hepatocitos, lo que parece apoyar la presencia de fenómenos de inmunotolerancia.

Esta diferencia entre las series en que se asocia o no inmunosupresión apoya la teoría de que la génesis de tolerancia tras inoculación intratímica de células requiere un periodo concomitante de inmunosupresión para eliminar o inhibir los

linfocitos del receptor. Este periodo transitorio de inmunosupresión puede lograrse mediante la inoculación de suero antilinfocitario (16) o con una pauta inmunosupresora aguda (22), y permitiría que nuevas poblaciones tímicas, educadas ya en un ambiente que contiene los antígenos del donante, repueblen el receptor (9, 15). Este fenómeno explicaría la presencia de hepatocitos en algunos animales, aunque tampoco podemos descartar que la pauta inmunosupresora por sí sola sea la responsable de esta probable inmunotolerancia. Además, parece que es necesaria la presencia en el inóculo de células presentadoras de antígenos, capaces de expresar en su membrana antígenos de histocompatibilidad tipo II y de interactuar con los timocitos. En nuestro modelo, esta labor la tendrían que llevar a cabo las células de Kupffer. Sin embargo, su presencia se encuentra limitada, ya que tras un aislamiento hepatocitario según la técnica descrita, la concentración de células no parenquimatosas es inferior al 3% (11). Este puede ser uno de los factores que justifique el bajo porcentaje de animales en el que hemos logrado la pervivencia de alo-hepatocitos en el bazo. De hecho, en otros modelos experimentales se ha comprobado que la ausencia de células presentadoras de antígenos en el inóculo intratímico se acompaña de ausencia de inducción de inmunotolerancia (3, 6).

Otros autores han fracasado también en el intento de inducir tolerancia mediante inoculación de hepatocitos en timo, pero lo achacan a la escasa capacidad de los hepatocitos de sobrevivir en el microambiente tímico (7), afirmando que no supera las dos semanas. Sin embargo, en nuestro modelo hemos observado una persistencia más allá de la tercera semana postinoculación. Esto nos permite afirmar que el timo es un lugar inmunológicamente privilegiado también para los hepatocitos.

Según hemos expuesto hasta ahora, la inoculación intratímica de hepatocitos ha podido inducir, en algunos animales, cierto grado de inmunotolerancia. Sin embargo, para que la técnica sea útil requiere unas tasas de inducción próximas al 100%. Para ello, habría que realizar nuevos estudios en los que el inóculo intratímico contenga una mayor número de células presentadoras de antígenos (células de Kupffer). Otras alternativas que se encuentran en estudio sugieren el empleo de otras estirpes celulares del mismo donante que expresen antígenos de clase I y II como los esplenocitos o células de la médula ósea (1). Más recientemente se ha demostrado que no es necesaria la inoculación de células vivas del donante, dado que la sola inoculación de antígenos solubles es capaz de inducir tolerancia sistémica ante islotes pancreáticos (11) e injertos cardiacos (23).

Logrado esto, todavía quedarían otros interrogantes por resolver. Así, debemos preguntarnos si los hepatocitos trasplantados mantienen su funcionalidad. Para ello sería necesario, no sólo prolongar el periodo de seguimiento de los animales trasplantados, sino también la utilización de técnicas de funcionalismo celular como la gammagrafía con Tc99-HIDA10 ó la expresión enzimática (17). También sería interesante valorar si esta disminución de la reactividad inmunológica se muestra eficaz frente a trasplantes de otros órganos, así como si es capaz de inducir fenómenos de quimerismo.

Como resumen podemos concluir que la inoculación intratímica de hepatocitos alógenicos asociada a inmunosupresión temporal no ha sido capaz de inducir inmunotolerancia. Sin embargo, la presencia aislada de hepatocitos a nivel esplénico siete días después del implante permite albergar esperanzas

sobre la posibilidad de haber logrado un cierto efecto en algunos animales. Por tanto, parece obligado un estudio más profundo y pormenorizado antes de poder afirmar con garantías la inutilidad de la técnica ensayada.

BIBLIOGRAFIA

1. Alfrey EJ, Wang WG, Lee L. A comparison of spontaneous versus induced tolerance in an experimental model of rat hepatic allograft transplantation. *J Surg Res* 1995; 58 (6): 611-617.
2. Balladur P, Crema E, Honiger J, Calmus Y, Baudrimont M, Delelo R, Capeau J, Nordlinger B. Transplantation of allogeneic hepatocytes without immunosuppression: long term survival. *Surgery* 1995; 117 (2): 189-194.
3. Battan R, Mordes JP, Abreau S. Evidence that intrathymic islet transplantation does not prevent diabetes or subsequent islet graft destruction in RTG-Depleted, Diabetes-Resistant Biobreeding/Worcester rats. *Transplantation* 1994; 57: 731-736.
4. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172: 603.
5. Billingham RE. Free skin grafting in mammals. In Billingham RE, Silvers WK eds. *Transplantation of tissues and cells*. Philadelphia: Wistar Institute. 1961, p.1.
6. Campos L, Alfrey EJ, Posselt AM. Prolonged survival of rat orthotopic liver allografts after intrathymic inoculation of donor strain cells. *Transplantation* 1993; 55 (4): 866-870.
7. Campos L, Posselt AM, Deli BC. The failure of intrathymic transplantation of nonimmunogenic islet allografts to promote induction of donor specific unresponsiveness. *Transplantation* 1994; 57: 950-953.
8. Charco R, Ruiz C, Allende E, Balsells J, Lazaro JL, Murio E, Bilbao I, Gifre E, Margarit C. Experience in therapy of chronic liver allograft rejection. *Transpl Proc* 1995; 27 (4): 2293-2294.
9. Chowdhury NC, Jin MX, Hardy MA. Donor specific unresponsiveness to murine cardiac allografts induced by intrathymic soluble antigens is dependent on alternative pathway of antigen presentation. *J Surg Res* 1995; 59 (1): 91-96.
10. Cuevas-Mons V, Cienfuegos JA, Maganto P. Long-term evaluation of isolated syngenic hepatocytes transplanted into the normal rat spleen by Tc-99m-HIDA scintigraphy. *Transplantation* 1985; 39: 87.
11. Cuevas-Mons V. Trasplante de hepatocitos aislados. *Gastroenterol Hepatol* 1997; 20 (2): 59-64.
12. Esquivel CO, Nakazato P, Cox K, Concepción W, Berquist W, Russel ThR. The impact of liver reductions in pediatric liver transplantation. *Arch. Surg.* 1991; 126: 1278-1286.
13. García-Alonso I, Barceló P, Portugal V, Bilbao J, López de Tejada I, Méndez J. Estudio de la respuesta regenerativa de hepatocitos implantados en el bazo. *Rev Esp Enf Digest* 1991; 80 (4): 247-251.
14. Goss JA, Nakafusa Y, Wayne M. Intrathymic injection of donor alloantigens induces donor-specific vascularized allograft tolerance without immunosuppression. *Ann Surg* 1992; 216 (4): 409-416.

15. Ketchum RJ, Mayo G, Park DH. Nonimmunogenic perinatal islets transplanted intrathymically to BB/WOR recipients, do not prevent onset of autoimmune diabetes. *Trans Proc* 1994; 26 (6): 3311-3312.
16. Knechtle SJ, Wang J, Jiao S. Induction of specific tolerance by intrathymic injection of recipient muscle cells transfected with donor class I major histocompatibility complex. *Transplantation* 1994; 57: 990-997.
17. Nordlinger B, Bouma ME, Wang SR, Ballet F, Verthier N, Huguet C, Infante R. High-yield preparation of porcine hepatocytes for long survival after transplantation in the spleen. *Eur Sur Res* 1985; 17: 377-382.
18. Odorico JS, Barker CF, Posselt AM. Induction of donor-specific tolerance to rat cardiac allografts by intrathymic inoculation of bone marrow. *Surgery* 1992; 112: 370-377.
19. Ohzato H, Monaco AP. Induction of specific unresponsiveness (tolerance) to skin allografts by intrathymic donor specific splenocyte injection in antilymphocyte serum-treated mice. *Transplantation* 1992; 54: 1090.
20. Oluwole SF, Chowdhury NC, Jin M. Induction of transplantation tolerance in rat cardiac allografts by intrathymic inoculation of allogenic soluble peptides. *Transplantation* 1993; 56: 1523.
21. Posselt AM, Barker CF, Tomaszewski JE. Induction of donor specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. *Science* 1990; 249: 1293-1295.
22. Remuzzi G, Rossini M, Imberti o. Kidney graft survival in rats without immunosuppression after intrathymic glomerular transplantation. *Lancet* 1991; 337: 750-752.
23. Sayegh MH, Perico N, Gallon L. Thymic recognition of immunodominant allo-MHC peptides induces peripheral T cell anergy. *Transplantation* 1994; 58: 125-132.
24. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976; 13:29.