

REVISTA ESPAÑOLA DE INVESTIGACIONES QUIRURGICAS

Spanish Journal Surgical Research



Span. J. Surg. Res.

Vol. VI

Num. 1

Año 2003

EDITORIAL

1 GESTIÓN DEL CONOCIMIENTO

Rodríguez Montes JA

TRABAJOS ORIGINALES

3 EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL SÍNDROME DE REVASCULARIZACIÓN EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RECONSTRUCCIÓN VASCULAR DE EXTREMIDAD

De Pedro JA, Vila JM, Domínguez J, Blanco J, Martín P, Amigo L

13 XENOINJERTOS VASCULARES CRIOCONSERVADOS Y DIETAS HIPERLIPÍDICAS. ANÁLISIS DE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN

Vallina MJ, Mateos J, Diago MV, Gutierrez V, Gonzalez-Fajardo JA, Vaquero C

21 INTERACCIÓN RISPERIDONA-NEUROTRANSMISORES EN PREPARACIONES DE ÓRGANO AISLADO DE COBAYA Y DE RATA "IN VITRO"

Velasco A, Nieto FM, Barcenilla A, Pachón JJ, Torrecilla JR, Redondo P

24 ALOTRANSPLANTE DE HEPATOCITOS EN EL BAZO TRAS LA INOCULACIÓN DE HEPATOCITOS Y CÉLULAS DE KUPFFER EN EL TIMO

Ruiz de Gordejuela AG, Portugal V, Pereira JG, Otero B, García-Alonso F

29 HETEROGENEOUS GROWTH OF THE LIVER LOBES IN RATS WITH LONG-TERM PORTAL HYPERTENSION

Aller MA, Diéguez B, Nava MP, Arias JL, López L, Arias J

ARTÍCULOS ESPECIALES

35 HISTORICAL NOTES IN VASCULAR SURGERY

Rich N M, Heatón L and Packard D

37 EL FRAUDE CIENTÍFICO

Velasco Martín A

41 ROBÓTICA APLICADA A LA CIRUGÍA

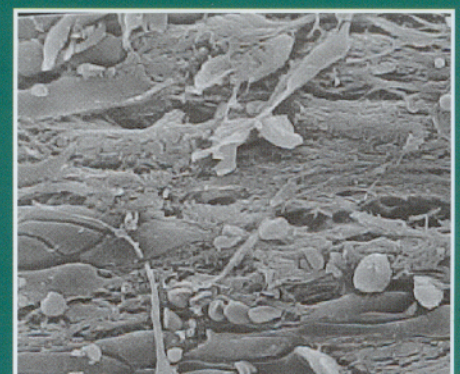
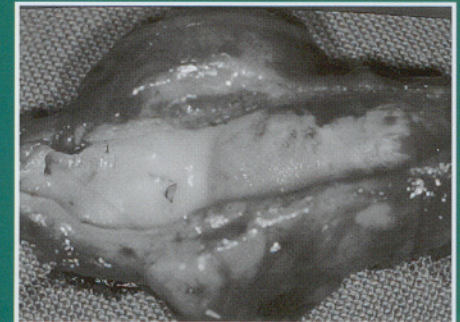
Vaquero Puerta C

46 REANIMACIÓN CARDIOPULMONAR: NUEVAS RECOMENDACIONES EN SOPORTE VITAL BÁSICO Y SOPORTE VITAL AVANZADO

Alonso Ardid O, Buisán Garrido F

NOTICIAS

49 3^{er} CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIRUGÍA LAPAROSCÓPICA (SECLA). (Valladolid, 15-17 de octubre, 2003)





ALOTRANSPLANTE DE HEPATOCITOS EN EL BAZO TRAS LA INOCULACIÓN DE HEPATOCITOS Y CÉLULAS DE KUPFFER EN EL TIMO

ALLOHEPATOCYTES TRANSPLANTED INTO THE SPLEEN AFTER INOCULATION OF HEPATOCYTES PLUS KUPFFER-CELLS IN THE THYMUS

Ruiz de Gordejuela AG, Portugal V, Pereira JG, Otero B, García-Alonso I

Laboratorio de Cirugía Experimental. Universidad del País Vasco. Lejona.

KEY WORDS:

Allotransplants, immunotolerance, hepatocyte, Kupffer cells, thymus, spleen

PALABRAS CLAVE:

Alotransplante, hepatocitos, inmunotolerancia, células de Kupffer, bazo, timo.

Correspondencia:

IGNACIO GARCÍA-ALONSO
Laboratorio de Cirugía Experimental
Facultad de Medicina y Odontología.
Universidad del País Vasco.
Bº Sarriena s/n.
48940 LEJONA (Bizkaia).

SUMMARY:

Some kinds of allo-antigens when inoculated into the thymus have induced specific immunotolerance for subsequent allo-transplants (kidney, heart). However, this technique had failed when using allo-hepatocytes. Assuming that isolated hepatocytes fail to express their antigens, and thus immunotolerance is not achieved, we have incorporated Kupffer cells (which act as antigen presenting cells in the liver) to the thymus inoculum. Hepatocytes and Kupffer cells have been obtained by standard collagenase digestion of the liver from syngeneic male Wag rats weighing 250 g. Through a midline incision, 3×10^6 hepatocytes plus 3×10^5 Kupffer cells were inoculated into each lobe of the thymus (0.2 ml) either on wag or Sprague rats. Fifteen days later, hepatocytes were inoculated into the spleen and the animals were sacrificed on day 7th or 14th. The survival of hepatocytes both in thymus and spleen was assessed by two independent observers on hematoxiline-eosine stained sections. A relevant number of hepatocytes were found in the thymus of every animal. However, in the spleen of allotransplanted rats, though some hepatocytes could be identified in all of the animals, their number was low; only in three animals we could find hepatocytes in numbers similar to those seen after syngeneic inoculation. In any case, cordonal organization of hepatocytes could never be seen.

RESUMEN:

La inoculación de aloantígenos específicos en el timo ha logrado inducir tolerancia frente a algunos alotrasplantes (riñón, corazón). Sin embargo, esta técnica ha fracasado al aplicarla al trasplante de hepatocitos. Asumiendo que esto se deba a que los hepatocitos aislados no expresan sus antígenos de histocompatibilidad, hemos añadido al inóculo tímico células de Kupffer (que actúan como "células presentadoras de antígenos"). Los hepatocitos y células de Kupffer se han obtenido mediante digestión con colagenasa a partir de ratas singénicas wag (machos, 250 g.). A través de una incisión cervical media, se han inoculado 3×10^6 hepatocitos y 3×10^5 células de kupffer en cada lóbulo tímico (0,2 ml) de ratas wag o sprague. Quince días después se han inoculado los hepatocitos en el bazo, y se han sacrificado los animales tras siete o catorce días. Dos observadores independientes han valorado la supervivencia de los hepatocitos en el bazo y el timo, mediante secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina. En todos los timos se ha encontrado un número significativo de hepatocitos. Sin embargo, en el bazo de los alotrasplantes, si bien se han encontrado hepatocitos en todos los casos, su número ha sido escaso; sólo en tres animales se encontró un número de hepatocitos similar al de los trasplantes singénicos, pero en ningún caso presentaron la característica organización cordonal.

INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre el trasplante hepatocelular se iniciaron con Rugstad¹, Matas² y Groth³, mediante la infusión intraportal de hepatocitos o la implantación subcutánea de células de

hepatoma en ratas Gunn hiperbilirrubinémicas. La primera demostración de la utilidad clínica de esta nueva técnica, vino de la mano de Sutherland⁴, que ensayó el trasplante hepatocelular en un modelo de fallo hepático agudo en ratas.

GRUPOS DE LA EXPERIENCIA

| | SERIE 1 | SERIE 2 | SERIE 3 | SERIE 4 |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Pretratamiento CsA+DxM (días -2 y -1) | NO | NO | SI | SI |
| Timo (día 0) | Hepatocitos singénicos | Hepatocitos alogénicos | Hepatocitos alogénicos | Htos. +Kupffer alogénicos |
| Bazo (día 14) | Hepatocitos singénicos | Hepatocitos alogénicos | Hepatocitos alogénicos | Hepatocitos alogénicos |

En humanos el trasplante había empezado ya hace mucho tiempo, existiendo incluso noticias acerca del infructuoso intento por parte del doctor Hans Popper en 1937 de trasplantar hepatocitos en la cámara anterior del ojo⁵. En 1992, Mito et al.^{6,7}, probaron en 10 enfermos y obtuvieron un caso de recuperación completa y permanente de un paciente con cirrosis. Un año más tarde, Habibullah y su grupo en la India realizaron trasplantes en casos de fallo hepático agudo con encefalopatía grado III-IV⁸. Su estudio reveló un aumento significativo de la supervivencia en el grupo trasplantado, siendo mucho mejor el resultado en los casos con grado III. A partir del año 97 y hasta enero de este año se han realizado varias decenas de trasplantes en EE.UU. En todos estos casos existen claros indicios de mejoría gracias al trasplante de hepatocitos.

Pero el problema fundamental de todo trasplante es el rechazo. Para solventar este rechazo se han propuesto y se han llevado a cabo múltiples estrategias de inmunosupresión. Esta terapia, a parte de no ser eficaz al 100%, obliga a tratamiento de por vida.

Una de las alternativas planteadas es la inducción de inmunotolerancia por inoculación de células o antígenos del donante en el timo del receptor. Esta técnica ha mostrado resultados muy positivos en la inducción de tolerancia allo-específica en los trasplantes de riñón^{9,10} y corazón¹¹⁻¹⁷. También, pero a nivel experimental, se han obtenidos resultados positivos en el alo-trasplante de islotes pancreáticos¹⁸⁻²³.

Por el contrario, no se han obtenido resultados tan positivos en los intentos que se han realizado de allo-trasplante de hepatocitos^{24,25}. Tras la experiencia de otros grupos, se ha intentado mejorar los resultados con tratamiento inmunosupresor previo a la inoculación tímica, pero esta maniobra no ha mejorado mucho los resultados^{26,27}. Se ha sugerido que los hepatocitos solos podrían ser insuficientes para expresar sus antígenos, por lo que con su inoculación no se lograría la inmunotolerancia^{23,28}. El objetivo de este trabajo es estudiar si la adición de células de Kupffer, que actúan como células presentadoras de antígenos en el hígado, al inóculo tímico mejora el proceso de inducción de la inmunotolerancia en el timo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizan como donantes ratas singénicas WAG, machos de 250gr de peso. Como receptores se usan ratas Sprague-Dawley o WAG, machos de cuatro semanas de edad.

La obtención de hepatocitos se realiza mediante protocolo de digestión enzimática con colagenasa²⁹. Para la inocula-

ción en bazo la solución extraída se purifica mediante tres centrifugaciones consecutivas, ajustándola a una concentración de 24x10⁶ hepatocitos/ml.

Para la inoculación en el timo de las células de Kupffer se sigue el procedimiento habitual de obtención de hepatocitos, pero se realiza sólo una centrifugación, obteniéndose una suspensión con 15x10⁶ hepatocitos y 1,5x10⁶ células de Kupffer por mililitro. Mientras que para la inoculación en bazo se sigue la técnica estándar²⁷.

La inoculación tímica se realiza bajo anestesia general inducida por éter etílico. Mediante una aguja 27G, y utilizando una bomba de perfusión a un ritmo de 1ml/min, se inoculan 0,2 ml de suspensión celular en cada lóbulo tímico. A los 15 días de la inoculación tímica se inoculan los hepatocitos en el bazo²⁷. Los animales se sacrifican 7 ó 14 días después de la inoculación esplénica, obteniéndose muestras del timo y del bazo, que se tiñen con hematoxilina-eosina y son estudiadas mediante microscopía óptica de 400 aumentos. El examen de las muestras se realiza sobre preparaciones "cegadas".

El tratamiento inmunosupresor ha consistido en dos dosis de 20 mg/kg de Ciclosporina A por vía intraperitoneal y dos dosis de 6 mg/kg de Dexametasona por vía subcutánea, administrados los dos días previos a la inoculación en el timo.

Se distinguen cuatro grupos en nuestra experiencia: los tres primeros con inoculaciones en timo de hepatocitos y el cuarto incorporando células de Kupffer (ver **Tabla I**)

RESULTADOS

HEPATOCITOS EN EL TIMO

En todos los animales de esta experiencia se han encontrado hepatocitos supervivientes en el timo. No se aprecian diferencias entre los timos inoculados con hepatocitos singénicos y aquellos que recibieron allo-trasplantes (**Fig 1**).

HEPATOCITOS EN EL BAZO

En el grupo de trasplante singénico, se encuentran hepatocitos en el bazo de todos los animales tras 7 y 14 días del implante. En todas las muestras analizadas se observa un gran número de hepatocitos bien preservados (**Fig. 2**).

En la primera serie de alotrasplante (sin refuerzo inmunosupresor) no pudieron encontrarse hepatocitos en el bazo de ninguno de los animales.

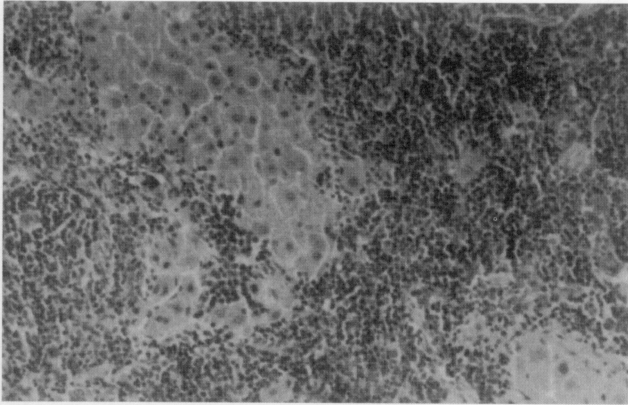


Figura 1.- Cordón de hepatocitos en un lobulillo tímico (H-E, 400X).

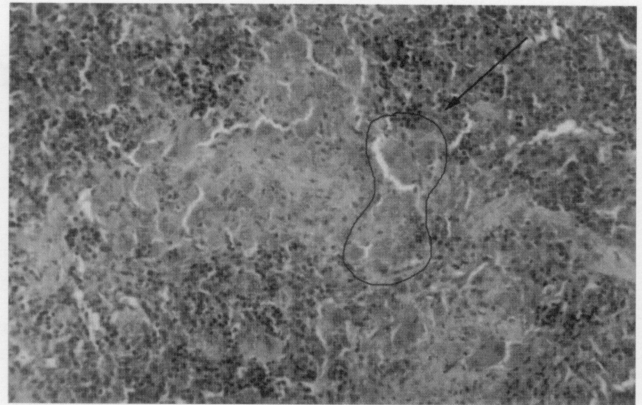


Figura 2.- Abundantes hepatocitos en el bazo (implante singénico), algunos comenzando a constituir un cordón (H-E, 400X).

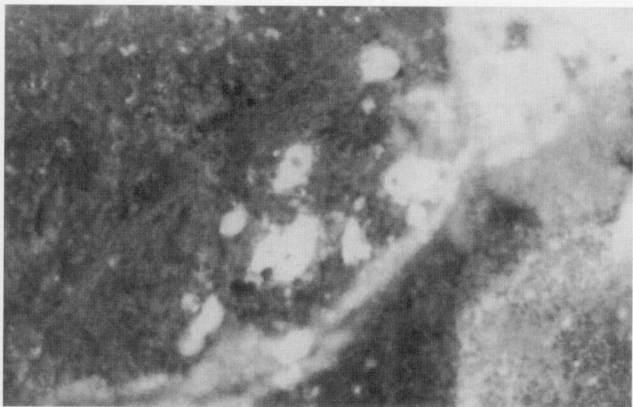


Figura 3.- Sección histológica de bazo sin teñir, observada en microscopio de fluorescencia con luz ultravioleta monocroma. Los hepatocitos se observan en blanco.

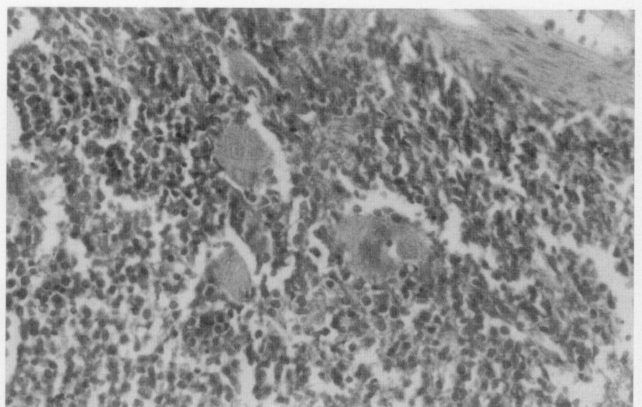


Figura 4.- En un implante alogénico pueden verse hepatocitos aislados en el seno de la pulpa esplénica (H-E, 400X).

En el segundo grupo de transplante alogénico, que añade dos dosis de terapia inmunosupresora tras la inoculación tímica, se encuentran hepatocitos en el bazo de 3 de los 20 animales sacrificados siete días después del implante. Sin embargo, su número es muy escaso, y sus características morfológicas no eran totalmente normales. La naturaleza hepatocitaria de estas células quedó confirmada por la presencia de Riboflavina, que emite fluorescencia al ser estimulada con un haz de luz ultravioleta monocroma de 488 nanómetros (Fig. 3); esta sustancia presente en los hepatocitos, no existe en las células del parénquima esplénico.

En el tercer grupo alogénico, con inmunosupresión e inoculación de células de Kupffer, es posible observar hepatocitos en el bazo de todos los animales. Pese a que la morfología está claramente preservada, el número es escaso; sólo en 3 de los animales se encuentra un número de hepatocitos similar al observado en el grupo singénico. En cualquier caso, no se observa nunca organización cordonal (Fig.4).

La supervivencia de los animales inoculados ha sido del 100% en todas las series de la experimentación (Tabla II).

Tabla II

NÚMERO DE ANIMALES EN LOS QUE SE HAN HALLADO HEPATOCITOS VIABLES EN TIMO Y BAZO

| | SINGÉNICO | ALOGÉNICO | PRE-TRATADO ALOGÉNICO | PRE-TRAT.+KUPFFER ALOGÉNICO |
|---------|-----------|-----------|-----------------------|-----------------------------|
| 7° DÍA | | | | |
| Tímo | 10/10 | 10/10 | 20/20 | 20/20 |
| Bazo | 10/10 | 0/10 | 3/20 | 20/20 |
| 14° DÍA | | | | |
| Tímo | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| Bazo | 10/10 | 0/10 | 3/10 | 10/10 |

DISCUSIÓN

El aporte exógeno de hepatocitos para compensar una pérdida de masa hepática funcionante o el déficit congénito de uno o varios enzimas, es un planteamiento terapéutico atractivo y prometedor.

La inducción de tolerancia aloespecífica mediante inoculación de células renales o cardíacas en el timo despertó un gran interés entre los investigadores del trasplante hepatocelular. La necesidad de un plazo de tiempo amplio entre la inoculación tímica y el trasplante hacen que esta técnica no tenga utilidad en el trasplante clínico de órganos (salvo en el caso de donante vivo). En cambio, en el trasplante hepatocelular, en el que cabe la criopreservación de las células transplantadas hasta haber logrado la tolerancia, esta técnica reviste su principal interés.

Sin embargo, los diferentes ensayos de inoculación tímica de hepatocitos aislados llevados a cabo han concluido en rotundos fracasos²⁴⁻²⁷. Una posible explicación podría encontrarse en la observación publicada por Russel en *Hepatology*, que llevaba a calificar el trasplante de hígado como un injerto inmunológicamente privilegiado³⁰. En él se describe la baja intensidad del rechazo en el alotrasplante clásico; incluso se refieren casos en los que fue posible retirar completamente la inmunosupresión. Tan llamativos fueron estos hallazgos que llevaron a propugnar la realización de un trasplante de hígado en asociación al trasplante de otras vísceras como medida para proteger a éstos frente al rechazo^{31,32}. El fracaso de estos ensayos puso en evidencia que el trasplante de hígado más que frenar el rechazo, lo que hacía era no inducirlo. Es decir, por algún motivo las células del órgano transplantado no expresaban adecuadamente sus antígenos.

Quizás este fenómeno era el responsable del fracaso de la inoculación tímica de hepatocitos. Si el hepatocito no expresa antígenos, éstos no pueden ser reconocidos en el timo, y no se logra tolerancia. En este sentido, el asociar las células de Kupffer (que actúan como "células presentadoras de antígenos"³³) ofrecía una esperanza. Los resultados obtenidos en otras experiencias parecen apoyar nuestra hipótesis. De hecho, el salto de la pérdida completa y sistemática de los hepatocitos implantados en el bazo a la presencia de estas células en todos los animales no puede atribuirse al azar.

Sin embargo, el número y grado de organización de los hepatocitos alotransplantados no alcanza los niveles típicos de un trasplante entre animales singénicos. Esto parece indicar que no hemos obtenido un nivel suficiente de tolerancia, y que es necesario seguir mejorando la técnica.

Esto no debería extrañar, ya que está en consonancia con la baja tasa de expresión de antígenos observada en hígados transplantados. Por eso, una medida que podría ayudar sería una expresión más intensa de los antígenos en el timo. En este sentido, podrían añadirse al inoculo tímico alguna otra estirpe celular del mismo donante, cuyos antígenos contribuyan a forzar la tolerancia aloespecífica^{10,26,37,34}.

Otra cuestión que quizás habría que revisar es la utilización de suero antilinfocitario para "retirar" del organismo aquellos linfocitos que pudieran reconocer los antígenos del injerto. De hecho, las primeras experiencias incluían este tratamiento, hasta que Remuzzi⁹ probó que era previsible obtener la tolerancia sin necesidad de eliminar los linfocitos periféricos. Sería interesante estudiar si, en el caso de los hepato-

citos, el uso del suero antilinfocitario sería suficiente para obtener una tolerancia para el alotrasplante idéntica a la que vemos con el uso de animales singénicos.

Por último, sería necesario reproducir de nuevo toda la serie de experiencias que permitieron probar la utilidad clínico-biológica del trasplante de hepatocitos aislados: pruebas funcionales, enzimopatías, fracaso hepático.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rugstad HE, Robinson SH, Yannoni C, Tashjian AH Fr. Transfer of bilirubin uridine-5-diphosphate-glucuronyl transferase to enzyme-deficient rats. *Science* 1970; 170:553-5
2. Matas AJ, Sutherland DER, Steffes MW, Mauer SM, Lawe A, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science* 1976; 192:892-4
3. Groth CG, Lundgren G. Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyl-transferase-deficient rats by intraportal hepatocyte transplantation. *Transplant Proc* 1977; 9:313-6
4. Sutherland DER, Numata M, Matas AJ, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation in acute liver failure. *Surgery* 1977; 82, 82:124-32
5. Bock I, Popper H. Über lebertransplantation in die Vorderkammer des Auges. *Virchows ARCH [A]* 1937; 299:219-34
6. Mito M, Kusano M, Kawura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* 1992 Dec; 24(6):3052-3
7. Mito M, Sawa M. Hepatocyte transplantation: past, present and future. *Wiad Lek* 1997; 50 Suppl 1Pt1:416-9
8. Habibullah CM, Qamer A. Hepatocyte transplantation. *Indian J. Gastroenterol* 1996 Jan; 15(1):16-9
9. Remuzzi G, Rossini M, Imberti O, et al. Kidney graft survival in rats without immunosuppression after intrathymic glomerular transplantation. *Lancet* 1991; 337: 750-752.
10. Sayegh H. Thymic recognition of immunodominant allo-HMC peptides includes peripheral T cell anergy. *Transplantation* 1994; 58:125-32
11. Goss JA. Intrathymic injection of donor alloantigens induces donor-specific vascularized allograft tolerance without immunosuppression. *Ann Surg* 1992 OCT; 216:409-16
12. Oluwole SF. Induction of donor specific unresponsiveness to rat cardiac allografts by intrathymic injection of w-b-irradiated donor spleen cells. *Transplantation* 1993; 55:1396
13. Odorico JS. Induction of donor-specific tolerance to rat cardiac allografts by intrathymic inoculation of bone marrow. *Surgery* 1992; 112:370-377
14. Hamashima T. Induction of transplantation tolerance by a single intrathymic injection of 3M KCl-extracted donor histocompatibility antigens combined with two doses of anti-rat T cell receptor monoclonal antibodies. *Transplantation* 1994; 58:105-107 94
15. Tahara H. Mixed chimerism demonstrated in rats which have accepted heart allografts by intrathymic adminis-

- tration of bone marrow cells. *Transplantation Proceedings* 1994; 26: 1969
16. Matsuura T. Organ-specific tolerance induced by intrathymic injection of donor bone marrow cells and FK-506 or antilymphocyte serum in rat heart transplantation. *Transplantation Proceedings* 1994; 26: 1962-63
 17. Imanishi M. Induction of tolerance by intrathymic injection of donor bone marrow cells in the rat: simultaneous heart and skin allograft model. *Transplantation Proceedings* 1994; 26:1958-1959
 18. Posselt AM. Induction of donor unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. *Science* 1990; 249: 1293-1295
 19. Barker CF. Studies of privileged sites of islet transplantation. *Transplant. Proc* 1991; 4:2138-2142
 20. Posselt Am. Successful islet transplantation in the thymus of spontaneously diabetic BB rats. *Transplantation proceedings* 1992; 24:1023-1024
 21. Brayman KL. Evaluation of intrathymic islet transplantation in the prediabetic period. *Surgery* 1992; 112:319-326
 22. Quian T. Induction of donor-specific tolerance to rat islet allografts by intrathymic inoculation of solubilized spleen cell membrane antigens. *Diabetes* 1993; 42:1544
 23. Campos L. The failure of intrathymic transplantation of nonimmunogenic islets allografts to promote induction of donor-specific unresponsiveness. *Transplantation* 1994; 57:959-53
 24. Campos L. Prolonged Survival of rat orthotopic liver allografts after intrathymic inoculation of donor strain cells. *Transplantation* 1993; 55: 866-870
 25. Lautenschlager I. Expression of the major histocompatibility complex antigens on different liver cellular components in rat and man. *Scand J Immunol* 1981; 14:421
 26. Alfrey EJ. A comparison of spontaneous versus induced tolerance in an experimental model of rat hepatic allograft transplantation. *J Surg Res* 1995; 58:611-617
 27. Portugal V., Pereira J.G., Alonso A., Bilbao J., García-Alonso I. La inducción de inmunotolerancia fracasa en un modelo de trasplante hepatocelular. *Span. J. Surg. Res.* 1999; Vol.II(4) 50-54
 28. 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: 731-6
 29. Seglen PO. Preparation of rat liver cells. Enzymatic for tissue dispersion. *Experimental Cell Research* 1973; 82:391-8
 30. Russell PS. Some immunological considerations in liver transplantation. *Hepatology* 1984; 4(1):768-788.
 31. Lie TS, Lee KS, Hohnke C, Muranyi M, Hoffer M. Graft own regenerative potencial suppress the rejection of the hepatic transplantation. *Eur Sur Res* 1986; 18(S1):35-39.
 32. Calmus Y, Weill B, Amar J, Houssin D. La tolerance des allogreffes hepatiques. *Gastroenterol Clin Biol* 1986; 10:804-816.
 33. Sato K, Yabuki K, Haba T, Maekawa T. Role fo Kupffer cells in the induction of tolerance after liver transplantation. *J Surg Res* 1996; 63(2) 433- 438.
 34. Cuervas-Mons V. Trasplante de hepatocitos aislados. *Gastroenterol Hepatol* 1997;20(2): 247-51