

ENSAYO DE INDUCCION DE TOLERANCIA ESPECIFICA A INJERTOS DE PIEL MEDIANTE TRASPLANTE DE CORNEA EN RATONES

Sergio Rivera*, **Humberto Belloso****, **Ricardo Rincón***
y **Bernardo Rodríguez-Iturbe***

* *Servicio de Nefrología. Hospital Universitario de Maracaibo, Apartado Postal 1430. Maracaibo 4001-A. Venezuela.* ** *Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario. Maracaibo. Venezuela.*

RESUMEN

Estudios realizados en cepas de ratones con diferencias menores en antígenos de histocompatibilidad señalan que antígenos presentados en la cámara anterior del ojo generan una tolerancia específica. Se estudiaron ratones con diferencias antigénicas mayores en los antígenos de histocompatibilidad para evaluar si trasplantes corneales inducían una mejoría en el tiempo de supervivencia del injerto de piel. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimental y control.

INTRODUCCION

Streilein y colaboradores han reportado recientemente (3) que los ratones de la cepa Balb/c inyectados en la cámara anterior del ojo con células del tumor P815 proveniente de ratones de la cepa DBA₂ toleran en forma específica injertos de piel de la cepa DBA₂ mientras las células tumorales se mantengan viables. Este fenómeno ha sido también observado en ratas utilizando células alogénicas (5, 6). El tumor P815 tiene en su superficie los antígenos de histocompatibilidad propios del tumor y

de la cepa de ratones correspondientes; se presume que la inducción de tolerancia tiene lugar por un mecanismo no establecido que implica el reconocimiento de estos antígenos a nivel de la cámara anterior del ojo (3).

El trasplante de córnea es un procedimiento establecido en el humano, y por cuanto la córnea está constituida por un conjunto de capas celulares portadora de antígenos de histocompatibilidad, se decidió estudiar la posibilidad de que el trasplante de córnea pudiera inducir tolerancia específica. A tal efecto, se estudió la reacción a injertos cutáneos realizados en ratones previamente trasplantados con la córnea de ratones de la cepa donante.

MATERIAL Y METODOS

Animales de experimentación.

Se utilizaron ratones de la C₃H y Balb/c obtenidos del bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (generosamente donados por la Dra. Inés Malavé). La pureza de estos últimos fué estudiada utilizando el mieloma SP₂ el cual se desarrolló en la cavidad peritoneal matando a los ratones en 4 días luego de producir ascitis. Este mieloma SP₂ es originario de la línea Balb/c y fué gentilmente donado por el Dr. J. Brochier del laboratorio de Inmunología del Pavillon P. del Hospital Claude Bernard en Lyon, Francia.

Estos ratones se reprodujeron posteriormente en nuestro laboratorio. Los trasplantes de piel fueron realizados 15 días después del trasplante de la córnea previa comprobación de que no existía rechazo de ésta. Se utilizaron ratones de la cepa Balb/c como donantes de córnea y piel, y se utilizaron 10 ratones de la cepa C₃H como receptores de los injertos. Como grupo control se estudiaron 10 ratones de la cepa C₃H que recibieron injerto de piel de ratones de la cepa Balb/c pero que no recibieron trasplante de córnea.

Todos los ratones utilizados en el grupo experimental y en el grupo control eran animales adultos de más de 3 meses de edad.

Técnica de trasplante de córnea.

Los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal con nembútal sódico en dosis de 0.08 mg/gr de peso diluído en solución de ClNa a 0.09%.

La cirugía ocular se realizó con ayuda de microscopio y se procedió de la siguiente manera: En primer término se realizó una marca circular

de 1 mm de diámetro sobre la córnea para delimitar el área del trasplante. Con ayuda de bisturí se incidió sobre la marca llegando en profundidad hasta la cámara anterior del ojo y se completó la incisión con ayuda de pinzas y tijeras. La córnea extraída se colocó en solución salina y se suturó posteriormente en el espacio preparado de igual manera en el receptor y fué fijada mediante puntos separados en cruz atravesando el estroma corneal del donante. La sutura se realizó con catgut 11-0 y al final se aplicó unguento de Gentamicina.

Criterios de evaluación del rechazo de córnea.

Se consideró la córnea rechazada cuando se presentó el edema progresivo del trasplante después de haber estado de aspecto claro. En el momento de la aparición de vascularización del trasplante y cuando ocurrió opacificación definitiva.

No se tomaron en cuenta líneas de rechazo endotelial debido al pequeño diámetro del trasplante, las cuales podían confundirse con la sutura.

Técnica del injerto de piel.

Se utilizó piel de la cola del animal donante y el injerto se realizó por técnicas establecidas (2). Después de sacrificado el animal donante, la cola se limpió con alcohol y se practicó una incisión a lo largo de la superficie ventral de la misma. Seguidamente la piel de cola se desfundó y se cortó en trozos de 0.5 mm² que fueron colocados en solución de ClNa al 0.09% con antibióticos (Penicilina 100/ml y Estreptomicina 100 µg/ml).

El trasplante fué realizado en la zona dorso lateral izquierda del animal receptor anestesiado como se indicó anteriormente. A tal efecto el área correspondiente fué afeitada y cubierta de una delgada capa de colodión, la cual proporciona la firmeza adecuada para preparar la cama del injerto a la profundidad correspondiente al *paniculus carnosus*. De esta manera se preparó una superficie de 1 cm² sobre el cual se colocó el injerto manteniendo la orientación de los pelos en sentido contrario a los de la piel del receptor y asegurándose que el injerto quedara extendido y sin contacto con los bordes de la herida. El injerto se cubrió con una banda de adhesivo microporo y éste a su vez con un corset de yeso. Siete días después del injerto, el yeso y el adhesivo se retiraron para observar la evolución y las observaciones se realizaron cada dos días hasta que se detectaron signos inequívocos de rechazo.

Criterios de evaluación del rechazo de piel.

El injerto de color rosado, textura blanda con renacimiento del pelo indica una aceptación por parte del receptor del órgano injertado. La

descamación epitelial total o la formación de costra con reabsorción del injerto corresponde al rechazo. El tiempo de duración del injerto se tomó hasta el momento cuando ocurrió el rechazo.

Análisis estadísticos.

La determinación del tiempo medio de sobrevivencia del injerto (TMS) se realizó mediante cálculos de "probit" (1) y fué expresado como sobrevivencia media y error estándar (TMS \pm es).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el experimento se expresan en la Tabla I, El trasplante de córnea fué rechazado a los 7 días en 2 ratones (Fig. 1),

TABLA I

TIEMPO MEDIO DE SOBREVIVENCIA DE LOS INJERTOS CUTÁNEOS
DE RATONES Balb/c EN RECIPIENTES C₃H CON Y SIN
TRANSPLANTE DE CORNEA.

Grupo	(cepa)	n	Intervención	TMS \pm es
Control	(C ₃ H)	10	Transplante de piel Balb/c	9.9 \pm 0.3
Experimental	(C ₃ H)	10	Día 0: transplante de córnea Balb/c Día 15: transplante de piel Balb/c	8.8 \pm 2

TABLA I. El tiempo medio de sobrevivencia (TMS) expresado en días \pm error estándar (es).

los cuales fueron excluidos de los experimentos de trasplante de piel. Los animales que aparecen en el grupo experimental señalados en la Tabla I. tuvieron la córnea trasplantada en buenas condiciones (Fig. 2) o presentaban edema y prolapso del iris pero sin evidencia de rechazo (Figs. 3 y 4). No se observó diferencia en cuanto al tiempo de duración del injerto de piel entre estos dos grupos. Dos ratones C₃H trasplantados con córnea de ratones Balb/c recibieron, cada uno, dos injertos simultáneos de piel. Uno de los injertos cutáneos provino de Balb/c y el otro de ratones de cepa C57. A los 15 días de realizados los injertos cutáneos, el injerto Balb/c luce bien y el injerto C57 tuvo evidencias claras de rechazo (Fig. 5).



Fig. 1.— Rechazo de córnea evidenciada por área blanquecina que corresponde a la superficie del injerto.

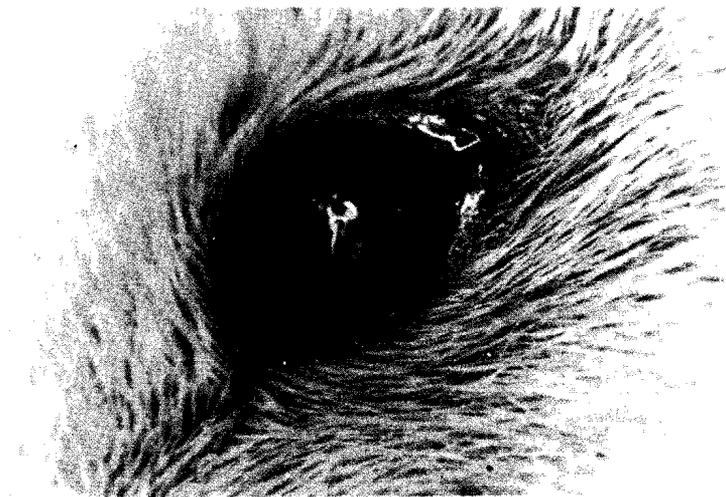


Fig. 2.— Córnea de C₃H trasplantada a Balb/c que está en buenas condiciones al séptimo día del trasplante.

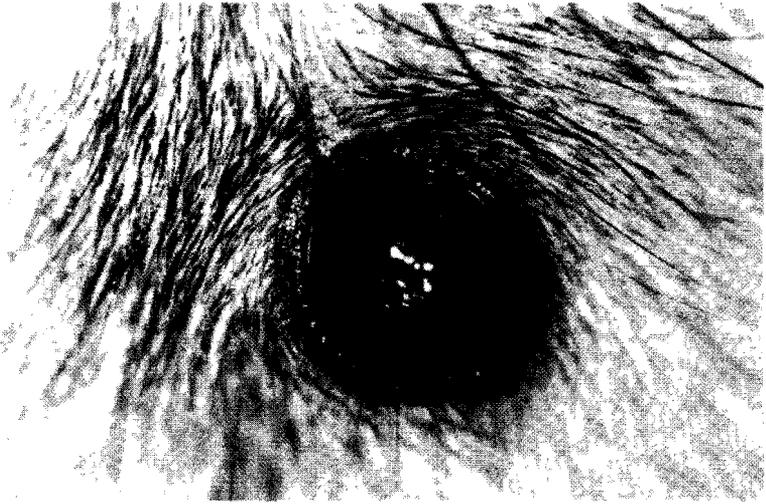


Fig. 3.— Edema se evidencia en córnea trasplantada. No hay signos de rechazo.

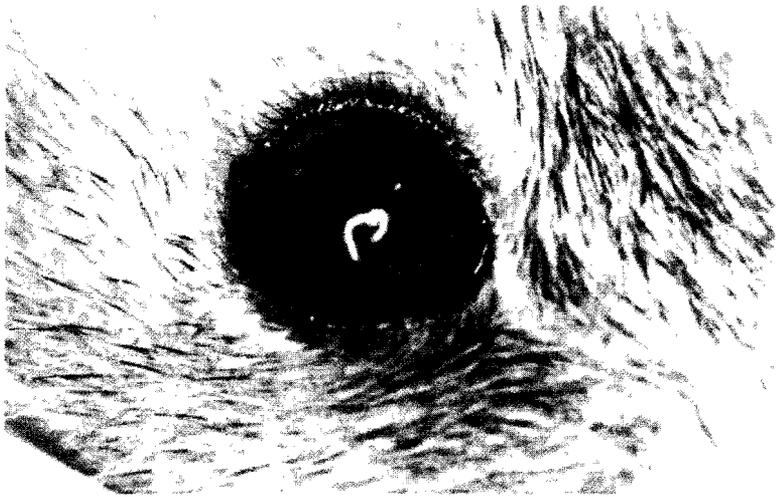


Fig. 4.— Prolapso del injerto evidenciado por las áreas más oscuras hacia el fondo del ojo. No hay signos de rechazo.



Fig. 5.— Piel de Balb/c en buen estado y piel de C57 rechazada, injertadas simultáneamente de ratones C₃H que recibió trasplante de córnea de ratón Balb/c.

Evolución: 15 días después del injerto.

DISCUSION

La cámara anterior del ojo es un lugar privilegiado para el crecimiento de ciertos tumores: por ejemplo, el tumor P815 crece en la cámara anterior del ojo pero no es viable si se hace una inoculación subcutánea. Este fenómeno es debido probablemente a mecanismos inmunológicos porque el tumor no crece en la cámara anterior si el ratón ha recibido previamente un injerto de piel antigénicamente idéntico al tumor. Más aún, la influencia de la cámara anterior en la inducción de tolerancia específica la ponen de relieve dos hechos: 1) La inyección intracameral del tumor permite que éste pueda crecer posteriormente en localización subcutánea, y 2) La inyección intracameral del tumor permite la tolerancia de injertos de piel antigénicamente idénticos por más de 30 días, lo cual es tres veces más del tiempo de sobrevivencia de injertos cutáneos control (3).

En nuestros experimentos la sobrevivencia de la piel de ratones de la cepa Balb/c trasplantada a ratones de la cepa C₃H no fué modificada significativamente por trasplantes de córnea practicados 15 días antes. Debe señalarse que los resultados negativos obtenidos por nosotros pueden deberse a diferencias demasiado grandes en los antígenos de histocompatibilidad entre las cepas de ratones utilizados. En efecto, las experiencias ya citadas

de Streilein y Col(3) se realizaron utilizando ratones de la cepa Balb/c y DBA₂, las cuales son ambas H-2^d y difieren solamente de antígenos menores de histocompatibilidad. Los ratones de la cepa C₃H son H-2^k (4) y por tanto presentan antígenos mayores de histocompatibilidad diferentes a los ratones de la cepa Balb/c.

La experiencia realizada en los ratones C₃H en los cuales se practicaron dos trasplantes simultáneos, uno de Balb/c (donante de córnea) y otro de ratón de cepa C57, se pudo observar que aún el día 15 el injerto de Balb/c permanecía en buen estado mientras que el injerto del C57 presentaba evidencias de rechazo (Fig. 5). Este resultado, sin embargo, no es concluyente.

Es probable que el estímulo antigénico aportado por las células de la córnea no sea suficiente para inducir en el receptor ni tolerancia ni sensibilización, al contrario de lo que sucede cuando se inocula una célula tumoral, la cual por su rápido crecimiento y abundante vascularización, permite un aporte mayor de determinantes antigénicos y mayor contacto con los mismos por parte del receptor.

La inducción de tolerancia mediante trasplante de córnea en ratones que no presenten diferencia en los antígenos mayores de histocompatibilidad debe ser definida en el futuro.

ABSTRACT

Attempts to induce specific tolerance to skin grafts by corneal transplant in mice. Rivera S. (*Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de Maracaibo. Apartado Postal 1430. Maracaibo 4001-A. Venezuela y Servicio de Oftalmología, Hospital Universitario, Maracaibo*), Belloso H., Rincón R., Rodríguez Iturbe B. *Invest Clín* 24(3): 99-107, 1983.— Specific tolerance may be induced post antigens present in the anterior chamber of the eye, is demonstrated in mice with minor differences in histocompatibility antigens. We studied the survival of skin graft in mice with mayor histocompatibility differences after attempts to induce tolerance with corneal transplantation. We did not dilect any significant difference in survival.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- BILLINGHAM RE., BRENT L., MEDAWAR PB., SPARROW EM.: Quantitative studies on the tissue transplantation immunity. In: The survival of skin homografts exchanged between numbers of different inbred strains of mice. *Pro Roy Soc B* 143B, 43-45, 1954.

- 2- BILLINGHAM RE., MEDAWAR PB.: The technique of free skin grafting in mammals. *J Exp Biol* 28: 385-390, 1951.
 - 3- KAPLAN HJ., STREILEIN JW.: immune response to immunization via the anterior chamber of the eye. II. An analysis of F₁ lymphocyte-induced immune deviation. *J Immunol* 120(3): 689-693, 1978.
 - 4- KLEIN J.: Genetic polymorphism of the histocompatibility - 2 loci of the mouse. *Annu Rev Genet* 8: 63-77, 1974.
 - 5- STREILEIN JW., KAPLAN HJ.: Immune privilege in the anterior chamber. *Immunology and immunopathology of the eye*. A.M. Silverstein and G. R. O'Cooner editors, Masson Publishing, USA, Inc New York 174-179, 1979.
 - 6- STREILEIN JW., NIEDERKORN JY., SHADDUCI JA.: Systemic immune unresponsiveness induced in adult mice by anterior chamber presentation of minor histocompatibility antigens. *J Exp Med* 152, 1121-1125, 1980.
-