

AÇÃO DO SORO DE CABRA ANTI-SORO DE COELHO IMUNIZADO OU NÃO COM CÉLULAS LINFÓIDES DO DOADOR SOBRE O ALOTRANSPLANTE CARDÍACO EM RATOS¹

CARDIAC ALLOGRAFT IN RATS: IMMUNOSUPPRESSION OF GOAT ANTISERUM AGAINST RABBIT SERUM IMMUNIZED OR NOT WITH DONOR LYMPHOID CELLS.

Haylton Jorge Suaid²
Antonio Carlos Pereira Martins³
Silvio Tucci Jr^{2,4}
Jeova Nina Rocha⁴
Antonio Antunes Rodrigues Júnior⁵
Marco Antonio Gonçalves⁵
Adauto José Cologna⁴

RESUMO

Introdução - A rejeição imunológica é uma das principais causas da perda de órgãos transplantados. A tentativa do controle da reação imunológica é clinicamente feita através da imunossupressão inespecífica e experimentalmente também por bloqueio específico. O alotransplante cardíaco em ratos pela técnica de ONO,K é um bom método para avaliação clínica da rejeição e de estudos voltados para o controle da rejeição. Objetivo : estudar o efeito de um anti-antisoro linfocitário, anti-linfócitos do doador sobre a rejeição do alotransplante cardíaco de ratos Wistar para ratos Holtzman. **Métodos** - o soro anti-linfocitário (SAL) foi obtido através da imunização de coelhos com linfócitos obtidos de gânglios linfáticos da cadeia mesentérica de ratos Wistar, em solução de Tyrode, contendo 3×10^9 células/ ml. A inoculação de 3 coelhos foi feita com 1 ml da suspensão celular e 1 ml de adjuvante completo de Freund. Duas semanas após a primeira inoculação fez-se 4 doses semanais de reforço. Os coelhos foram sangrados na 5ª semana, quando então foram separados os soros. A titulação dos soros foi realizada pelo teste de citotoxicidade, sendo verificado que ambos

apresentaram título de 1:1024. A dosagem de proteínas mostrou albumina com 3,1 e 2,7 g% e globulinas com 3,5 e 2,9 g%, sendo o normal 3,7 e 2,2 g% respectivamente. Os dois SAL foram misturados. Duas cabras foram inoculadas, com 3 ml da mistura desses SAL, associados a 2 ml de adjuvante de Freund. As doses de reforço com 5 ml do SAL foram iniciadas 2 semanas após. A cabra A recebeu 8 doses (1,4 g de globulinas). A cabra B recebeu 4 doses de reforço (0,7 g de globulinas). Uma semana após a última inoculação retirou-se 125 ml de sangue de cada cabra, fazendo a separação dos anti-soro anti-SAL (ASAL). Uma terceira cabra C foi imunizada com soro normal de coelho. A determinação de precipitinas foi feita pelo método de OUCHTERLONY. O ASAL A teve título de 1:64 e B e C título de 1:128. Os ASAL A e B foram capazes de bloquear "in vitro" a atividade citotóxica do SAL até a diluição de 1:2 do SAL. O soro de cabra anti-soro normal de coelho (SCANC) não foi capaz de bloquear a citotoxicidade do SAL. Os animais submetidos a transplante cardíaco foram divididos em 2 grupos controles um normal com 10 ratos (C1) e outro (C2) com 5 ratos que recebeu 1,0 ml endovenoso de SCANC. O grupo de ratos testes A foi composto por 19 ratos

1 Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia e Anatomia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

2 Prof. Assoc. da Disciplina de Urologia do Departamento de Cirurgia e Anatomia – FMRP-USP

3 Prof. Titular da Disciplina de Urologia do Departamento de Cirurgia e Anatomia – FMRP - USP

4 Prof. Dr. da Disciplina de Urologia do Departamento de Cirurgia e anatomia – FMRP - USP

5 Médico Residente da Disciplina de Urologia do Departamento de Cirurgia e Anatomia – FMRP - USP

distribuídos em 3 subgrupos. Subgrupo A1 com 5 ratos recebeu 0,5 ml do ASAL A, via endovenosa, logo após a cirurgia, o subgrupo A2 com 7 ratos recebeu 1.0 ml do ASAL A nas mesmas condições e o subgrupo A3 também com 7 ratos recebeu 1,0 ml no dia da cirurgia e 1,0 ml nos outros 2 dias consecutivos. O grupo de ratos testes B que recebeu o ASAL B foi igual ao grupo A. A avaliação dos corações transplantados foi diária através da palpação abdominal. O tempo máximo de seguimento foi de 243 dias. Os corações considerados rejeitados foram retirados e feito estudos histológicos. **Resultados** - o período de rejeição dos grupos foi : controles C1 e C2 foram 11,9 e 14,6 dias, respectivamente; no subgrupo A1 apenas um rato teve sobrevida cardíaca significativa (153 dias), nos demais ela variou de 9 a 15 dias; no subgrupo A2 a sobrevida do coração foi significativa e variou de 23 a 230 dias; no subgrupo A3 apenas 5 corações tiveram sobrevida significativa que variou de 29 a 190 dias. A sobrevida dos corações transplantados do grupo B foi significativa para um animal de cada subgrupo (120,132 e 129 dias). Os corações com sobrevida longa foram retirados batendo. Os demais corações foram rejeitados dentro do período de variação dos grupos controles. **Conclusões** - O soro de cabra anti-soro anti-linfócitos do doador, com maior período de imunização, foi capaz de bloquear a resposta imune de rejeição dos corações transplantados nas doses de 1,0 e 3,0 ml. Os ratos que não promoveram a rejeição aguda dos corações transplantados não apresentaram anticorpos citotóxicos circulantes. O fator causador do bloqueio parece não estar vinculado aos bloqueios de citotoxicidade “in vitro” e do teor de precepitinas do SAL. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>

Descritores - Transplante cardíaco, soro antilinfocitário, rejeição.

ABSTRACT

Objective - To study the immunosuppression efficacy an specific anti-antilymphocytic serum prepared in goats in a model of cardiac allografts in rats. **Methods** - Three rabbits were immunized with lymphoid cells obtained from mesenteric lymphatic nodes of Wistar rats. Each one received subcutaneously 3×10^9 cells mixed with Freund's adjuvant. After 2 weeks, they were injected with the same amount of cells at weekly intervals for 4 additional times. In the 5th week they were bled and their serum were mixed. This serum, which had a cytotoxic titer of 1:1024, was used to immunize 2 goats that gave rise to the anti-antilymphocytic serum (AAS-1 and AAS-2). As control we immunized 1 additional goat with normal rabbit serum (ANS). The gel diffusion technique (AAS x rabbit serum) showed precipitation bands against till

the following dilution: AAS-1 – 1/64, AAS-2 – 1/128 and ANS 1/124. Both AAS were able to block the in vitro lymphocytotoxicity of goat antilymphocytic serum till dilution of 1:2 while ANS did not. The hearts from Wistar rats (donors) were transplanted in Holtzman rats. The transplanted rats were divide in groups: C1 – 11 animals (control that received no serum); C2 – 5 animals (control that received 1ml of goat normal serum); A-19 animals – A1 with 5 rats injected intravenously in the day of surgery with 0.5ml of AAS-1, A2 with 7 rats injected with 1ml of AAS-1 only in the of surgery, and A3 with 7 rats that received 1ml of AAS-1 in days 0, 1 and 2 postoperatively; and group B with 19 rats (B1, B2 and B3) treated as group A except with the AAS-2 serum. **Results** - Mean heart survival in groups C1 and C2 was respectively 11.9 and 14.6 days Survival range in the subgroups A1 and A2 were respectively 9 to 230 days and 23 to 230 days. In subgroup A3 heart survival was prolonged till 29 to 190 days in 5 animals. In group B only 3 animals had prolonged (120, 130 and 129 days) heart survival in comparison with the control groups. **Conclusion** - Anti-antilymphocytic serum against donor antigen is able to suppress rejection of cardiac allograft in rats.

Key Words - Cardiac allograft, cardiac transplant, antilymphocytic serum, rejection.

INTRODUÇÃO

A história dos transplantes de órgãos mostra que o século passado foi de grande desenvolvimento, sendo o tema gerador de dois prêmios Nobel. O domínio das técnicas cirúrgicas proporcionou grande divulgação do método, que entretanto continua encontrando a barreira imunológica como grande adversário. As drogas e o corticosteróide produzem um bloqueio inespecífico da resposta imune¹. As imunoglobulinas ou frações também promovem uma imunossupressão inespecífica². O bloqueio específico pode ser ativo ou passivo e pode ser conseguido através da imunização dos animais com antígenos específicos do doador ou então por ação de anti-soros específicos³. Existem evidências que em uma resposta imune coexistam o anticorpo e o anti-anticorpo, havendo assim, uma resposta imune auto-reguladora⁴, que promoveria o bloqueio específico da resposta imune. Diante desses fatos, foi objetivo do presente trabalho verificar a ação de um anti-soro de cabra anti-soro de coelho contra linfócitos do doador em alotransplante cardíaco em ratos.

MÉTODOS

Foram realizados 53 alotransplantes cardíacos de ratos Wistar (peso 200 a 300 gramas) para Holtzman

pela técnica de ONO⁵. Os animais foram distribuídos em grupos e subgrupos. Os grupos controles normal e com SCANC contaram com 10 e 5 animais, respectivamente. Os grupos experimentais A e B, que receberam os ASAL, foram subdivididos em três subgrupos. O subgrupo 1 recebeu 0,5 ml de ASAL logo após o transplante, foi constituído por 5 ratos; o subgrupo 2, com 7 animais recebeu a dose de 1,0 ml do ASAL, também após a cirurgia; o subgrupo 3 que recebeu 1,0 ml no dia da cirurgia e 1,0 ml nos dois dias consecutivos após a cirurgia contou com 7 ratos. Os ratos receptores permaneceram somente com hidratação via oral na véspera da cirurgia. Todos os animais foram anestesiados com éter. Nos ratos receptores foi feita a tricotomia abdominal como preparo cirúrgico. Em seguida foram realizados os transplantes.

Preparo dos SAL: os linfócitos do doador foram obtidos de gânglios linfáticos da cadeia mesentérica. Foram suspensos em solução de Tyrode na concentração de 3×10^9 células/ml, e inoculados nas patas de dois coelhos da raça Grande Holandez (peso

2,5 e 2,8 Kg), juntamente com 1,0 ml de adjuvante completo de Freund, por via subcutânea. Duas semanas depois, iniciou-se as doses de reforço com 3×10^9 células/ml, durante 4 semanas nos gânglios regionais. Uma semana após o término do reforço, os animais foram sangrados e obteve-se 88 ml e 90 ml de sangue de cada coelho. Os soros foram separados e estocados a -20°C . A titulação dos SAL foi feita pelos testes de citotoxicidade. Os SAL foram diluídos a 1:2048. As células alvo (linfócitos) obtidas de gânglios mesentéricos de ratos Wistar, na concentração de 2×10^6 /ml em solução de Tyrode enriquecida com 20% de soro de ratos Wistar foram incubadas em volumes iguais com 0,1 ml dos SAL e 0,05 ml de complemento de coelho. No final do período de incubação foi adicionado 0,05 ml de solução de Tyrode com 1,5% de azul de Trypan. A reação foi considerada como positiva quando o percentual de células mortas foi 30% maior que o controle negativo⁶. Isto se deu até a concentração de 1:1024, determinando o título dos SAL. As proteínas foram dosadas pelo método do biureto (Tabela 1). Depois disso os dois SAL foram misturados.

Tabela 1 – Dosagens de proteínas dos SAL I e II e do soro de coelho normal (SCN), em ramas/100 ml.

	SAL I	SAL II	SCN
Albumina	3,1	2,7	3,7
Globulinas	3,5	2,9	2,2
Proteínas totais	6,6	5,6	5,9

Preparo dos anti-SAL: Duas cabras foram inoculadas por via subcutânea com 3 ml da mistura dos SAL emulsionados com 2 ml de adjuvante completo de Freund. Duas semanas depois iniciou-se as doses de reforço com 5 ml de SAL. A cabra A recebeu 8 doses e a cabra B 4 doses. Uma semana após a última dose as cabras foram sangradas em 125 ml, os soros separados e estocados a -20°C . As precipitinas foram determinadas pelo método de OUCHTERLONY⁷ e encontrou-se títulos de 1:64 para o soro A (ASAL A) e 1:128 para o B (ASAL B).

O soro controle (SCANC) foi obtido com a inoculação de uma cabra com soro normal de coelho com 4 doses de reforço, também apresentou título de precipitinas de 1:128.

Teste de bloqueio da citotoxicidade do SAL pelos ASAL A e B. e pelo anti-soro controle revelou que a reação foi positiva até a diluição de 1:1024 para o controle e 1: 2 para os ASAL A e B.

A capacidade de bloqueio da reação imune dos ASAL A e B foi verificada com a sobrevida dos corações transplantados.

O seguimento dos animais transplantados foi feito diariamente através da palpação abdominal do coração transplantado. Considerou-se como rejeitado quando houve a parada dos batimentos.

O estudo histológico dos corações transplantados foi realizado pelo método da hematoxilina-eosina.

O estudo da imunidade humoral dos ratos foi realizado pelo teste da citotoxicidade em 3 ratos de cada grupo C1, A2 e B2.

RESULTADOS

A sobrevida dos corações transplantados de todos os grupos estão relacionadas na tabela 2. Os 10 corações do grupo C1 foram rejeitados no período entre 7 e 17 dias com média de 11,9 dias, com erro padrão de

0,96. No grupo C2 cujos 5 animais receberam 1,0 ml dias com média de 14,6 dias, com erro padrão de 1,39. do SCANC a sobrevida dos corações variou de 10 a 17

Tabela 2 - Sobrevida, em dias, dos corações transplantados dos grupos controles C-I e C-II

Grupos	Animais	Sobrevida individual em dias	Média	ΔT
C-I	10	14, 17, 8, 10, 7, 12, 12, 14, 11, 14	11,9	10 a 14
C-II	5	18, 13, 19, 13, 10	14,6	11 a 18
Grupos	Animais	Sobrevida individual em dias	Corações rejeitados no ΔT	Animais c/ facilitação
A-I	5	15, 9, 9, 13, 153,	4	1
A-II	7	26, 29, 23, 230, 212, 163,143	0	7
A-III	7	8, 32, 12, 29, 174, 188,190	2	5
Grupos	Animais	Sobrevida individual em dias	Corações rejeitados no ΔT	Animais c/ facilitação
B-I	5	9, 12, 10, 9, 120	4	1
B-II	7	15, 19, 16, 11, 11	6	1
B-III	6	14, 15, 15, 12, 13, 129	5	1

ΔT = Período de sobrevida dos corações transplantados para um intervalo de confiança de 95%.

ΔT = Período de tempo fixado pelo intervalo de confiança de 95%, detrmnado pelos grupos controles.

As sobrevidas dos corações transplantados do grupo A são expostos na tabela 2. No subgrupo A1 houve 4 corações rejeitados entre 9 e 15 dias. Um animal não rejeitou o coração e foi sacrificado com 153 dias. No subgrupo A2 3 animais rejeitaram o coração agudamente, mas acima do limite estabelecido para os grupos controles de 18 dias. Os outros 4 animais não rejeitaram os corações e foram sacrificados com os corações batendo, acima de 142 dias. No subgrupo A3 dois corações foram rejeitados no período determinado para os grupos controles. Dos outros 5, dois tiveram rejeição aguda com 32 e 29 dias e os demais foram sacrificados acima de 175 dias com coração batendo.

As sobrevidas dos corações do grupo B estão na tabela 2. No subgrupo B1, 4 animais rejeitaram os corações dentro do período estabelecido para os grupos controles, entre 9 e 15 dias. um animal foi sacrificado com 112 dias com o coração batendo. No subgrupo B2 6 ratos rejeitaram os corações e um foi sacrificado com 132 dias, com o coração batendo. No subgrupo B3 o resultado foi igual aos outros dois subgrupos. Seis corações foram rejeitados entre o 12º e 15º dias e um foi retirado batendo com 129 dias de observação.

O teste de citotoxicidade dos soros de 3 ratos do grupo controle contra linfócitos de ratos Wistar mostrou haver atividade antilinfocitária, enquanto que, aqueles que não apresentaram rejeição (3 do subgrupo A2 e um rato de cada subgrupo B) não apresentaram atividade contra os linfócitos do doador.

O estudo anatomopatológico dos corações rejeitados mostrou aumento de volume, intenso processo inflamatório, degeneração de fibras musculares e trombose das cavidades. Processo inflamatório mononuclear ao redor dos vasos com arteríolo necrose e trombose. Os corações não rejeitados mostravam-se com tamanho normal, com discreto espessamento das paredes. Havia intenso infiltrado inflamatório mononuclear, com predominância de linfócitos, causando um desarranjo na arquitetura das fibras musculares. Em várias áreas existia substituição fibroblástica ou fibrose. Nas arteríolas encontrou-se hiperplasia da camada média, proliferação da íntima e trombose.

DISCUSSÃO

O transplante cardíaco em ratos, apesar das dificuldades técnicas é um modelo adequado para o

estudo da rejeição de órgãos vascularizados. As características clínicas da rejeição de aumento de volume do órgão, arritmia e parada cardíaca são detectados pela palpação abdominal. O período de aparecimento dessas alterações é variável e dependente da histocompatibilidade^{8,9}. Os corações transplantados entre ratos Wistar e Holtzman apresentam rejeição ao redor do 10º dia¹⁰, fato esse observado nos dois grupos controles C1 e C2. No grupo experimental A, 13 animais não rejeitaram os corações transplantados no período determinado pelos grupos controles, enquanto 6 foram rejeitados. Esse fato indica que o ASAL A é capaz de proteger os corações de uma forma global em 68,4%, entretanto quando se analisa os subgrupos separadamente observa-se claramente que a proteção depende da dose do soro administrada, com sobrevida de 20% para o grupo A1, 100% e 71,4% para os subgrupos A2 e A3, respectivamente. Os resultados do grupo B não foram tão satisfatórios quanto aos do grupo A, visto que de 19 ratos operados o bloqueio ocorreu em apenas 3 animais (16,6%). É interessante observar que o soro A, com menor valor de precipitinas deu maior proteção aos corações transplantados. Em relação aos títulos do bloqueio da citotoxicidade, ambos os ASAL foram iguais. Assim, observa-se que tanto o título de precipitinas quanto o bloqueio da citotoxicidade não expressam a capacidade dos ASAL em controlar a reação imune. Outro fato é a diferença dos esquemas de imunização das cabras. A cabra que apresentou menor resposta imune pelo método de OUCHTERLONY foi a que produziu o soro mais efetivo, deixando a interrogação se a imunização prolongada seria a responsável pela produção de alguma substância bloqueadora da resposta, ou se essa resposta é dependente do animal. A variação das respostas dentro do grupo A, além de estar correlacionada com a dose do ASAL, também deve estar ligada ao grau de histocompatibilidade entre os animais. Este fato deve estar relacionado ao que ocorreu com o grupo B, onde não se observou efeito objetivo do ASAL e os animais que apresentaram o bloqueio imune podem ter uma relação de histocompatibilidade que favoreceu, juntamente com o ASAL, o bloqueio imune. Dentro da hipótese lançada no objetivo, seria possível se inferir que a reação do ASAL com os receptores dos anticorpos provocaria o bloqueio. Entretanto isto não ocorreu com o ASAL B, cuja ação pareceu depender de outros fatores como o grau de histocompatibilidade.

Outro aspecto observado foi que o ASAL não promove um bloqueio completo da reação imune, uma vez que os corações transplantados com sobrevida

prolongada apresentaram uma histologia típica de rejeição crônica.

CONCLUSÕES

O soro de cabra anti-soro anti-linfócitos do doador, com maior período de imunização, foi capaz de bloquear a resposta imune de rejeição dos corações transplantados nas doses de 1,0 e 3,0 ml. Os ratos que não promoveram a rejeição aguda dos corações transplantados não apresentaram anticorpos citotóxicos circulantes. O fator causador do bloqueio parece não estar vinculado aos bloqueios de citotoxicidade “in vitro” e do teor de preceptinas do SAL.

REFERÊNCIAS

1. Danton MD, McGee C, Sayegh MH. Immunossuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 1999; 353: 1083.
2. Szezech ÇA, Berlin JA, Feldman HI. The effect of antilymphocyte induction therapy on renal allograft survival: A meta-analysis of individual patient-level data. *Anti-lymphocyte Antibody Induction Therapy Study Group. Am Intern Med* 1998; 128: 817-21.
3. McKearn TJ, Stuart FP, Fitch FW. Anti-idiotypic antibody in rat transplantation immunity. *J Immunology* 1974; 113: 1876-80.
4. Rowley DA, Fitch FW, Stuart FP, Kohler H, Consenza H. Antibody directed against wither antigen or receptor for antigen can suppress immunity specifically. *Science* 1973; 131: 1133-6.
5. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 57: 225-7.
6. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *New Engl J Méd* 1969; 280: 735-8.
7. Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy* 1958; 5: 1-2.
8. Tilney NL. Studies on infiltrating host cells harvested from acutely rejecting rat cardiac allografts. *Surgery* 1976; 27: 209-13.
9. White E, Mullen Y, Hildemann H. Chronic kidney allograft reactions in rats. *Transplantation* 1969; 8: 602-06.
10. Cologna AJ, Martins ACP, Suaid HJ, Velludo MAL. Alotransplante cardíaco em ratos: complicações cirúrgicas e sobrevida do enxerto. *Rev Méd* 1996; 29: 285-89.

Endereço para correspondência

Haylton Jorge Suaid

Departamento de Cirurgia e anatomia - Faculdade de Medicina

Campus Universitário

14048-990 – Ribeirão preto – SP

e-mail – hjsuaid@fmrp.usp.br