

Sensibilización y depleción inmunospecífica de linfocitos responsables del rechazo de aloinjertos de piel utilizando linfocitos alogénicos

R. Moreno-Palanques*

Resumen

Este artículo describe la inducción de un estado de no respuesta a injertos de piel en ratones machos adultos, utilizando linfocitos alogénicos en el modelo de reclutamiento de la inmunidad mediada por células, para conseguir la depleción de linfocitos efectores de los receptores.

Los resultados obtenidos son similares a los conseguidos con linfocitos T singénicos sensibilizados, prolongando el tiempo de supervivencia medio de injertos BALB/c antígeno-específicos de 11,27 a 23,45 días.

Estos resultados indican que los linfocitos alogénicos pueden ser utilizados para sensibilizar y deprimir inmunospecíficamente a los ratones estudiados.

PALABRAS CLAVE: Tolerancia. Sensibilización. Injerto de piel.

Sensitization and immunospecific depletion of lymphocytes responsible for the rejection of skin allografts using allogenic lymphocytes

This article describes the inducing of a state of non-response to skin grafts on adult male mice, using allogenic lymphocytes in the model of recruiting of immunity measured by cells, to obtain the depletion of the effect lymphocytes of the recipients.

The results obtained are similar to those obtained with sensitized syngenic T lymphocytes, extending the average survival time of antigenic specific BALB/c grafts from 11.27 to 23.45 days.

These results indicate that the allogenic lymphocytes can be used for sensitizing and immunospecifically depressing the mice being studied.

KEY WORDS: Tolerance. Sensitization. Skin graft.

* Departamento de Anatomía Patológica. Hospital "La Fe". Valencia.

Financiado por la Fundación Balaguer Gonel Hermanos. Castellón.

Introducción

Básicamente, se han utilizado dos vías para prevenir el rechazo de un injerto (1). La primera de ellas ha sido la supresión inmunológica de la activación o actividad de las células implicadas en la génesis y desarrollo del rechazo de un injerto. El segundo camino ha sido la manipulación de los propios mecanismos de control inmunológico, para pasar de un estado de respuesta a un injerto, a un estado de supresión de esta respuesta.

Con respecto a los aloinjertos de piel, se han realizado multitud de trabajos experimentales para prolongar la supervivencia de esos injertos.

En el presente trabajo, se ha utilizado el modelo de reclutamiento de inmunidad mediada por células, para eliminar los linfocitos efectores de los receptores específicamente dirigidos contra los antígenos del injerto de piel del donante (2). Así, se presentan los resultados del estudio que pretende ver si los hallazgos de Beldegrün y Cohen sobre injertos de piel (2), con ciertas modificaciones, pueden ser confirmados con las cepas de ratones de nuestro laboratorio.

Explicado brevemente, su trabajo estaba basado en el atrapamiento en un ganglio linfático de linfocitos específicos circulantes tras la inyección en el receptor de linfocitos T singénicos sensibilizados (LTSS). Estos LTSS eran sensibilizados "in vitro" contra fibroblastos obtenidos de ratones de una cepa alogénica específica (2).

En el presente trabajo, han sido utilizados linfocitos del donante para inducir una respuesta de reclutamiento en ambos ganglios linfáticos poplíteos de los ratones receptores. El objetivo del presente trabajo es intentar demostrar que la utilización directa de estos linfocitos puede suplir a la utilización de linfocitos que deben ser sensibilizados previamente "in vitro".

Material y métodos

Animales

Se han utilizado ratones SWISS machos como receptores y BALB/c y OF.1 machos como donantes. Todos ellos fueron obtenidos de fuentes comerciales (PANLAB, Barcelona). Los ratones utilizados pesaban entre 20 y 25 gramos.

Preparación e inyección de linfocitos

La sangre fue obtenida de los ratones donantes por punción de la aorta con una jeringa heparinizada bajo anestesia con éter (3). Los linfocitos fueron separados por centrifugación a 500 g durante 25 minutos de la sangre completa con Lymphoprep (Nyegaard, Oslo) (4). Las células así obtenidas fueron lavadas tres veces en suero fisiológico y resuspendidas en este último en una cantidad de 3.300.000 células contenidas en un volumen de 0,1 ml, que fue dividido en dos partes. Estos linfocitos alogénicos fueron inyectados en ambas patas traseras de los ratones receptores bajo anestesia con éter.

Injerto de piel

La técnica utilizada para el injerto de piel es básicamente la descrita por Billingham y Medavar (5), pero con las modificaciones introducidas por Belldegrün y Cohen (2). Los injertos, de 8 mm de

diámetro, son protegidos por una gasa estéril. Los apósitos se retiran el día 5 del postoperatorio y los injertos se revisan diariamente. Se considera que el injerto es rechazado cuando se produce la pérdida total de éste.

Los resultados han sido expresados como tiempo de supervivencia medio del injerto de piel, \pm desviación estándar (6). Todos los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el test de la t de Student (7, 8).

Resultados

El diseño experimental utilizado para la sensibilización e inmunodepleción de los linfocitos del receptor se muestra en la figura 1. Los ratones SWISS reciben en la almohadilla plantar de cada pata trasera, 1.600.000 linfocitos alogénicos. El sexto día a partir de esta inyección se extraen quirúrgicamente los ganglios linfáticos de ambos huecos poplíteos. La inmunospecificidad de la reacción se comprueba utilizando un test de rechazo de injerto de piel. Así, se hacen simultáneamente dos injertos de piel utilizando ratones OF.1 y BALB/c como donantes y ratones SWISS como receptores.

Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 1 y en la figura 2. Puede observarse como los injertos experimentales (BALB/c) tuvieron una supervivencia mayor que los injertos control (OF.1), con una diferencia significativa ($p < 0,01$).

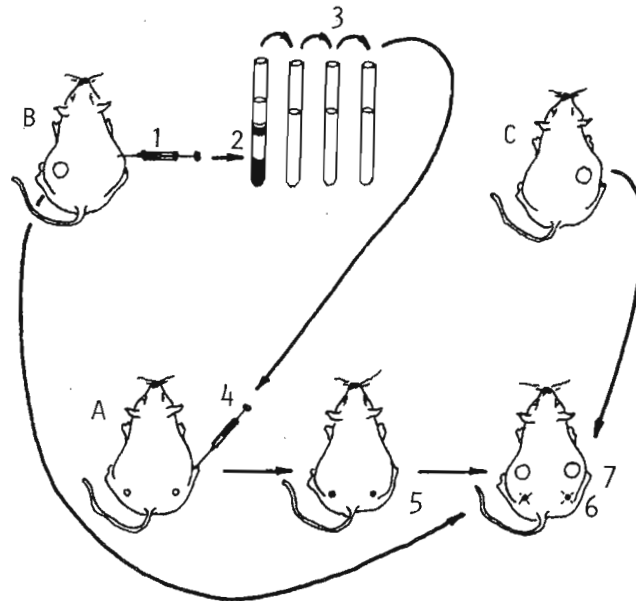


Fig. 1. Diseño experimental.

A, Ratones SWISS. B, Ratones BALB/c. C, Ratones OF.1. - 1, Recogida de sangre. 2, Centrifugación en Lymphoprep. 3, Lavado de linfocitos. 4, Inyección de linfocitos. 5, Reacción de los ganglios linfáticos. 6, Extracción de los ganglios. 7, Injertos de piel.

TABLA 1

Tiempo de supervivencia medio (MST), en días,
de injertos de piel en ratones receptores (SWISS)*

<i>Piel donante</i>	<i>MST ± SD**</i>
BALB/c	23,45 ± 3,85
OF.1	11,27 ± 1,48

* N.º de ratones: 11.

** Desviación estándar.

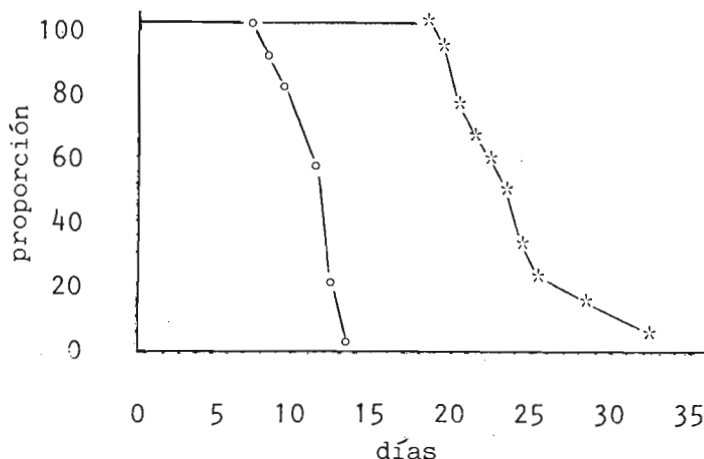


Fig. 2. Curvas de supervivencia de injertos BALB/c (*) y OF.1 (o), aplicados en receptores SWISS.

El rechazo de los injertos BALB/c comenzó después de los 19 días. El tiempo de supervivencia medio (MST) fue de $23,45 \pm 3,85$ días. El comienzo del rechazo de los injertos de OF.1 fue después de los 8 días y el MST fue de $11,27 \pm 1,48$ días.

Discusión

El diseño experimental descrito en este trabajo, se basa en la utilización de un pretratamiento con antígeno del donante para inducir una falta de respuesta específica a un injerto de piel realizado posteriormente.

Este principio es aceptado en trasplante y ha sido aplicado en el ser humano utilizando protocolos de transfusión en trasplantes renales.

El objetivo del trabajo es demostrar que los resultados de Belldegrün y Cohen (2) utilizando linfocitos singénicos sensibilizados pueden obtenerse con linfocitos alogénicos inmunospecíficos.

Con el diseño experimental descrito hemos obtenido resultados similares. Estos representan un modesto, pero estadísticamente significativo aumento en la supervivencia de los injertos de piel procedentes del donante de linfocitos sensibilizantes.

Nosotros sugerimos que este aumento de supervivencia puede ser debido a una depleción de linfocitos específicos dirigidos contra el donante. Y desde este punto de vista, el uso de linfocitos alogénicos inmunospecíficos simplificaría el diseño experimental de Belldegrün y Cohen. No obstante, sabemos que la reacción de los ganglios linfáticos poplíteos tras una inyección de antígenos en las patas traseras del ratón es compleja y, particularmente en este caso, en el que no sabemos si existe una segura inactivación previa de las células inyectadas. Así, creemos de interés ver si las células de los ganglios linfáticos poplíteos son citotóxicas para células de ratón BALB/c (donante). Por otro lado, el aumento de la supervivencia del injerto puede ser debido a otros mecanismos, por

ejemplo, a la inducción de células supresoras o a anticuerpos capaces de suprimir la reacción donante/receptor. Estas posibilidades podrían investigarse en estudios "in vitro". Por último, creemos que pueden hacerse dos recomendaciones más. De un lado, sería interesante aplicar estos diseños experimentales a órganos internos para ver las diferencias entre órganos vascularizados y no vascularizados como la piel. De otro, y teniendo presente los trabajos sobre idiotipos (9-15), es deseable analizar los resultados de estos trabajos, como los de otros, a la luz de la teoría de la red idiotípica del sistema inmunológico.

Bibliografía

1. Wood, P. J.; Streilein, J. W.: Immunogenetic basis of acquired transplantation tolerance. *Transplantation*, 37: 223-226, 1984.
2. Belldegrün, A.; Cohen, I. R.: Immunospecific depletion of lymphocytes rejecting skin allografts using sensitized syngeneic initiator T lymphocytes. *Transplantation*, 30: 40-42, 1980.
3. Jenkins, A. M.; Woodruff, M. F. A.: The effect of prior administration of donor strain blood constituents on the survival of cardiac allografts in rats. *Transplantation*, 12: 57-60, 1971.
4. Adler, L. T.; Regh, J. E.; Cohen, C.; LeBeau, M. M.: Graft-versus-host reactions and abrogation of allotype suppression following histoincompatible lymphoid cell transfers in rabbits. *Transplantation*, 37: 606-611, 1984.
5. Billingham, R. E.; Medawar, P. B.: The technique of free skin grafting in mammals. *J. Exp. Biol.*, 28: 385, 1951.
6. O'Brien, P. C.; Shampo, M. A.: *Statistics for Clinicians. 1. Descriptive Statistics.* Mayo Clinic Proc., 56: 47-49, 1981.
7. O'Brien, P. C.; Shampo, M. A.: *Statistics for Clinicians. 6. Comparing two samples (the two-sample t test).* Mayo Clinic Proc., 56: 393-394, 1981.
8. Gutiérrez, S.: *Estadística Aplicada.* Ed. Facsimil, Valencia, 1976.
9. Kunkel, H. G.; Mannik, M.; Williams, R. C.: Individual antigenic specificity of isolated antibodies. *Science*, 140: 1.218, 1963.
10. Jerne, N. K.: Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.*, 125c: 373, 1974.
11. Oudin, J.; Michel, M.: Une nouvelle forme d'allotypie des globulines du serum de lapin apparemment liée a la fonction et a la spécificité anticorps. *C. R. Acad. Sci.*, 257: 805, 1963.
12. Rodkey, L. S.: Autoregulation of the immune responses via idiotype network interactions. *Microbiol. Rev.*, 44: 631, 1980.
13. Urbain, J.; Wuilmart, C.; Cazenave, P. A.: Idiotypic regulation in immune networks. *Contemp. Top. Mol. Immunol.*, 8: 113, 1981.
14. Bluestone, J. A.; Sharrow, S. O.; Epstein, S. L.; Ozato, K.; Sachs, D. H.: Induction of anti-H2 antibodies without alloantigen exposure by in vivo administration of anti-idiotypic. *Nature*, 291: 233, 1981.
15. Epstein, S. L.; Masokowski, V. R.; Sharrow, S. O.; Bluestone, J. A.; Ozato, K.; Sachs, D. H.: Idiotypes of anti-IA antibodies. II. Effects of in vivo treatment with xenogeneic anti-idiotypic. *J. Immunol.*, 129: 1.541, 1982.