

R EPRODUÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE ENXERTO DE CORAÇÃO EM ORELHA DE CAMUNDONGO

Autores

Ana Paula Simões Ferreira¹
Raimunda Violante C. de Assis²
Marcus Gomes Bastos³

RESUMO

A transplantação de órgãos é uma modalidade terapêutica bem estabelecida no tratamento da falência de órgãos. Os avanços neste campo deveu-se muitas vezes, aos estudos de imunobiologia de transplante e da ação dos vários imunossuppressores em modelos experimentais de transplante em animais. Objetivo: Desenvolver um modelo experimental de transplante de órgão sólido (coração) a ser utilizado nos estudos de imunobiologia, para análise da reação de rejeição para testar novos imunossuppressores. Material e métodos: Oito animais recém-nascidos submetidos à toracotomia, tiveram os corações extraídos e, posteriormente, implantados em lobos auriculares de quatro camundongos adultos isogênicos. A avaliação da "pega" dos enxertos foi definida pela sensação tátil dos batimentos dos corações implantados e pela análise histopatológica dos mesmos. Resultados: Quatro dias após os transplantes, constatou-se movimentos contráteis em 06 dos 08 enxertos, o que não foi percebido nos outros dois. Em 06 enxertos, a macroscopia e a microscopia foram sugestivas de "pega" dos transplantes, enquanto a análise de 2 enxertos, em um mesmo receptor, evidenciou processo compatível com rejeição aguda dos mesmos. Discussão: A explicação para a rejeição encontrada em dois dos enxertos, seria a histoincompatibilidade Hy entre os doadores e o receptor. Conclusão: O modelo experimental descrito mostrou-se viável para o estudo de imunobiologia de transplante, podendo ser utilizado com reprodutividade na avaliação da ação "in vivo" dos imunossuppressores.

UNITERMOS

Orelha de camundongo, transplante, coração.

Correspondência:
Marcus Gomes Bastos
Rua 21 de Abril, 289
Cep: 36.025-090
Juiz de Fora/MG
Brasil

1 - Bolsista de Iniciação Científica da FAPEMIG.

2 - Professora Adjunta do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina/UFJF.

3 - Responsável pela Disciplina de Nefrologia, Faculdade de Medicina e Chefe do Serviço de Nefrologia do Hospital Universitário e Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina/UFJF.

A transplantação de órgãos é uma modalidade terapêutica bem estabelecida no tratamento da falência de órgãos. Os avanços neste campo decorreram, muitas das vezes, dos estudos da imunobiologia de transplante e da ação dos vários imunossuppressores em modelos experimentais de transplante em animais.

Existem vários modelos de transplante de órgãos em camundongos, sendo alguns de técnica cirúrgica difícil, como o

transplante de rim^(10, 11, 13) e coração^(2, 6, 8, 12) e outros que empregaram produtos químicos caros e de difícil conservação, como por exemplo a colagenase, empregada na digestão de pâncreas nos transplantes de illhotas pancreáticas^(5,7).

Neste estudo, os autores reproduzem um modelo de transplante de coração em orelha de camundongo⁽⁴⁾, o qual poderá ser empregado em protocolos de estudos da imunologia do transplante e avaliação de novos agentes imunossuppressores.

MATERIAL E MÉTODOS

Oito doadores isogênicos: Camundongos BALB/c recém-natos, de ambos os sexos, com até 24h de vida.

Quatro receptores isogênicos: Camundongos BALB/c adultos, fêmeas com aproximadamente 6 semanas de vida.

Técnica de enxertia de coração no lobo auricular de camundongos.

Os camundongos receptores do enxerto foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 1ml hidrato de cloral a 4% (75,0 mg/ml de cloral hidratado; 60,0 mg/ml de sulfato de magnésio; 50,0 mg/ml de glicose anidra; 8,0 mg/ml de cloreto de sódio e água destilada QSP 50ml), diluído em soro fisiológico 0.9% na proporção de 1:1. Sob anestesia, os animais foram submetidos a tricotomia da base da orelha, utilizando-se lâmina de bisturi. Com auxílio de um cotonete, realizava-se a anti-sepsia com álcool iodado em sentido distal à base da orelha.

Em seguida, com uma lâmina de bisturi, realizava-se uma pequena incisão anterior entre a transição da pele com a cartilagem do lobo auricular, poupando-se os vasos auriculares principais. A partir do local de incisão, confeccionava-se um túnel subcutâneo até o sítio de implantação do enxerto, através de movimentos rotatórios com auxílio de uma

ponteira de pipeta automática, sempre em sentido paralelo à base da orelha do animal receptor.

O camundongo recém-nascido doador era acondicionado em recipiente de isopor, contendo gelo e, após tornar-se cianótico, era submetido a uma incisão transversal e longitudinal em região tóraco-abdominal anterior, ao que se seguia a exposição do coração por leve compressão do corpo do animal. O coração era então retirado com uma pinça de ponta delicada, tomando-se o cuidado de não perfurá-lo. O enxerto era, em seguida, transferido para uma placa de Petri, contendo gaze embebida em soro fisiológico.

Finalmente, os enxertos cardíacos eram cuidadosamente conduzidos por uma pinça e acondicionados no interior da porção plástica de um abocate número 16, utilizando-se o seu guia. Seguia-se a introdução da porção plástica do abocate através do túnel confeccionado sob a pele da orelha do camundongo e já no sítio ou "bolsa" de implantação do enxerto, procedia-se à enxertia do coração. O procedimento era concluído após o local de incisão do lobo auricular do animal receptor ser brevemente comprimido por uma pinça anatômica, sendo o seu fechamento realizado por segunda intenção.

Foi sistematizado realizar os transplantes em ambas as orelhas do receptor, o que permitiu duplicar a amostragem e utilizar um dos enxertos como controle do contralateral.

Avaliação dos enxertos cardíacos

Macroscopicamente, o processo de "pega" do enxerto foi avaliado, diariamente, até o quarto dia pós-transplante, através de método visual e/ou tátil dos batimentos do coração enxertado. A seguir, os animais receptores foram anestesiados com éter etílico por via inalatória e extraiu-se ambos os lobos auriculares, con-

tendo os enxertos, pelas suas bases com auxílio de uma tesoura. A comprovação dos movimentos dos implantes foi então obtida através do estudo histopatológico dos mesmos.

Para tal, a orelha contendo o transplante cardíaco foi fixada em solução de Formol a 10%. Após fixação, todas as orelhas foram seccionadas transversalmente através do enxerto em intervalos de 2 mm, incluídas em parafina, seccionadas, coradas com hematoxilina-eosina e posteriormente avaliadas pela microscopia óptica em um microscópio Olympus (CBA).

RESULTADOS

Do total de 51 camundongos transplantados, 4 receberam enxertia de coração de doadores com até 24h de vida e constituem o nosso material de estudo. Os demais 47 experimentos foram realizados durante o período de aprendizagem e implementação da técnica experimental, não seguindo portanto uma metodologia uniforme que permitisse a análise dos resultados.

Seis dos 8 corações enxertados apresentaram batimentos cardíacos comprovados pelo método visual e/ou tátil, até o quarto dia após a cirurgia. Em um animal receptor, não se observou movimentos contráteis dos enxertos.

A análise dos transplantes com batimentos cardíacos evidenciou, à macros-

copia, presença de área nodular, macia, pardacenta em relação ao tecido claro e elástico do pavilhão auricular e o estudo histopatológico caracterizou-se por discreta organização periférica do tecido cardíaco no tecido de orelha. As fibras apresentavam estriações preservadas e ausência de processo inflamatório perimisial ou intersticial (figuras 1 e 2). Houve "pega" dos enxertos.

No animal receptor em que não se observou movimentos dos enxertos, o aspecto macroscópico escurecido e as alterações histológicas de processo inflamatório misto (mononuclear e polimorfonuclear) intersticial e perimicótico nos sugeriram rejeição dos enxertos (figuras 3 e 4). Caracterizou-se rejeição aguda dos enxertos.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a transplantação de órgãos e tecidos se firmaram como uma alternativa terapêutica importante em várias situações clínicas. Muitos dos conhecimentos que se aplicam em transplantação clínica advém de estudos realizados em animais de experimentação. Vários modelos experimentais de enxertos foram desenvolvidos, contudo alguns se associam com limitações técnicas impor-

tantes. Por exemplo, o modelo de transplante renal em camundongos impõe uma destreza cirúrgica dificilmente observada na maioria dos pesquisadores^(10,11,13). Já o transplante de ilhotas pancreáticas, embora simples tecnicamente, exige o emprego de produtos químicos (colagenase, por exemplo) caros e de difícil acondicionamento^(5,7).

No presente trabalho, os autores re-

produzem o modelo de transplante de tecido cardíaco na orelha de camundongos, técnica inicialmente descrita por FULMER e colaboradores ⁽⁴⁾ e implementada em nosso meio por SANTOS e colaboradores ⁽⁹⁾. Contudo, houve a necessidade de se fazer algumas adaptações no modelo no transcorrer dos experimentos. Inicialmente, tentamos o transplante de coração obtido de doadores com até 4 dias de vida, seguindo o protocolo de SANTOS e colaboradores ⁽⁹⁾.

A inconstância de presença de batimentos cardíacos (dados não apresentados) nos levou a utilizar apenas animais com até 24 horas de vida. Também optamos em trabalhar com enxerto de massa cardíaca total e não de fragmentos de coração ⁽⁴⁾, pela impossibilidade de uniformização do tamanho e qualidade de tecido atrial ou ventricular, o que poderia prejudicar os resultados.

Dos 8 corações transplantados, em 6 se observou "pega" do enxerto, como observado nas figuras 1 e 2. Em um animal, 2 enxertos, observou-se a presença de um processo inflamatório misto, composto de células mononucleares e polimorfonucleares no interstício e perimicótico, compatível com quadro de rejeição descrito por BILLINGHAM e colaboradores ⁽³⁾. Como trabalhamos com doadores e receptores isogênicos, a única explicação possível para este achado se-

ria uma histoincompatibilidade ao nível do sistema Hy do camundongo. Esta possibilidade baseia-se no fato da não determinação do sexo dos animais doadores, que é difícil no recém nascido. Assim, é possível que um camundongo receptor fêmea tenha recebido um coração de doador masculino, determinando o processo de rejeição. Essa observação nos leva a sugerir o emprego de doadores do sexo masculino no estudo dos fenômenos imunobiológicos envolvidos no processo de rejeição de aloenxertos.

Finalmente, a realização de transplantes em ambas as orelhas dos camundongos permitiu duplicar a amostragem de tecido para estudo e usar um dos enxertos como controle do contralateral. Em conclusão, o transplante de coração no lobo de orelha é um modelo experimental tecnicamente simples, facilmente reproduzível e de baixo custo. Para realização, dispensa técnica cirúrgica refinada e/ou o emprego de material de alto custo. No nosso meio, este modelo poderá ser empregado no estudo dos fenômenos imunológicos do transplante e no desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras, como por exemplo a GTP II ⁽¹⁾, a qual estamos atualmente testando.



FIGURAS

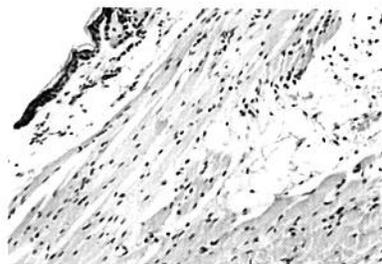


Figura 1

Coração transplantado de camundongo. Fibras cardíacas íntegras, sem reação inflamatória. HE X20

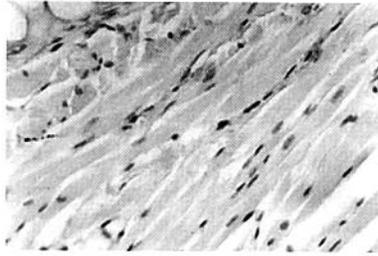


Figura 2

Enxerto de coração em orelha de camundongo. Fibras de padrão normal, sem agressão, sem rejeição. HE X40

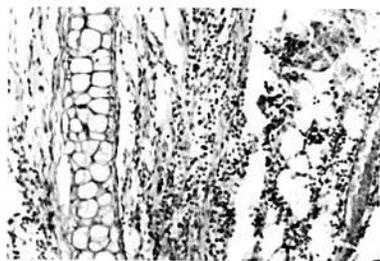


Figura 3

Enxerto de coração em orelha de camundongo. Rejeição celular e humoral (?). Processo inflamatório mononuclear e polimorfonuclear com hemorragia. HE X20

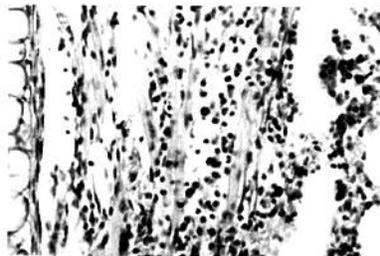


figura 4

Enxerto de coração em orelha de camundongo. Rejeição aguda celular. Agressão de fibras por mononucleares. HE X4

SUMMARY

REPRODUCTION OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF HEART ALLOGRAFT IN THE MOUSE EAR

Most of the current understanding in organ transplantation was obtained from studies in animal models. In this work, the authors reproduce a model of heart transplant in the mouse's ear. The simplicity of the technique and the reproductibility of the results are aspects that will establish this model in future studies of the immunobiological phenomenon involved in organ allograft, as well as, will allow us to assess new immunosuppressive agents.

KEY WORDS: *Mouse's ear, transplantation, heart.*

BIBLIOGRAFIA

- 1- ANDRADE, L C. O estudo da ação imunobiológica de um novo derivado 6-mercapto- purínico: GTPII. Tese de doutorado. UNIFESP - EPM, 1997.
- 2- ARMSTRONG, A; STRAUCH A R; STARLING R C; SEDMAK D D; OROSZ C G. Morphometric analysis of neointimal formation in murine cardiac allografts: II. Rate and location of lesion development. *Transplantation*. v.64, n.2, p.322-8, 1997.
- 3- BILLINGHAM, M E; CARY, R N B; HAMMOND, M E. A working formalation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: heart rejection study group. *J Heart Transplant*. v.9, p.587-593, 1990.
- 4- FULMER, R I; CRAMER, A T; LIEBELT, R A; and LIEBELT, A G. Transplantation of cardiac tissue into the mouse ear. *Am J Anat*. v.113, p.273-279, 1963.
- 5- GROTOH, M; MAKI, T; KIYOIZUMI, T; SATONI, S; MONACO, A P. An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation*. v.40, p.437-40, 1985.
- 6- ISOBE, M; SUZUKI, J; YAMASAKI S; HORIE S; OKUBO Y; SEKIGUCHI, M. Assessment of tolerance to cardiac allograft by anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies. *J Heart Lung Transplantation*. v.16, p.1149-56, 1997.
- 7- MACKIE, J D; PANKEWYCZ, O G; BASTOS, M G; KELLEY, V E; STOM, T B. Dose-related mechanisms of immunosuppression mediated by murine anti-CD3 monoclonal antibody in pancreatic islet cell transplantation and delayed-type hypersensitivity. *Transplantation*. v.49, n.6, p.1150-1154, 1990.
- 8- RAISANEM-SOKOLOWSKI, A; GLYSING-JENSEN, T; MOTTRAM, P L; RUSSEL, M E. Sustained anti-CD4/CD8 treatment blocks inflammatory activation and intimal thickening in mouse allografts. *Ather Thrombosis Vascular Biology*. v.17, n.10, p.2115-2122, 1997.
- 9- SANTOS, R R; ROSSI, M A; LAUS, J L; SILVA, J S; SAVINO, W; MENGEL, J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*. v.175, p.29-39, 1992.
- 10- SHARMA, L C; MUIRHEAD, N; LAZAROVITS, AI. Human mouse chimeric CD7 monoclonal antibody (SDZCHH380) prophylaxis of kidney transplant rejection: analysis beyond 4 years. *Transplant Proc*. v.29, p.323-4, 1997.
- 11- SUZUKI, K; BONNER-WEIR, S; HOLLISTER-LOCK, J; COLTON, C K; WEIR, G C. Number and volume of islet transplanted in immunobarrier. *Cell transplant*. v.7, p.47-52, 1998.
- 12- VAN BUSKIRK, A M; WAKELY M E; OROSZ C G. Transfusion of polarized TH2-like populations into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection. *Transplantation*. v.62, n.2, p.229-38, 1996.
- 13- ZHANG, Z; ZHONG, R; GRANT D; GARCIA, B; MRITE, M; STILLER, C; LAZAROVITZ, A. Prevention and reversal of renal allograft rejection by monoclonal antibody to CD45RB in the mouse model. *Transplant Proc*. v.27, n.1, p.389, 1995.