

3.MATERIAL I MÈTODES

3.1 ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ.

En els allotrasplantaments es van utilitzar com a donants dues soques diferents de rates (*Rattus norvegicus*) mascles de 200-250 grams de pes. En els grups d'allotrasplantament, que es van sacrificar els animals als 7 o 30 dies utilitzarem com a soca donant les rates Dark Agoutí (RT1A) i en el grup de llarga supervivència rates de la soca Brown Norway (RT1N). En els xenotrasplantaments es van utilitzar com a animals donants d'empelts hepàtics hámsters mascles adults Golden Syrian (*Mesocricetus auratus*).

En tots els casos, tant en allotrasplantament com en xenotrasplantament els animals receptors van ser rates mascle (*Rattus norvegicus*) de 200-250 grams de pes de la soca Lewis (RT1L). Tots els animals van ser adquirits a Harlan UK *limited* (Shaw's Farm, Blackthorn, Bicester, Oxon, OX6 OTP England).

Durant el temps de l'estudi els animals van estar sota control veterinari. Tots els animals van rebre una dieta estàndard (A04Panlab SL, Barcelona) i aigua corrent *ad libitum*. Les condicions d'estabulació van ser controlades diàriament: temperatura (20-22°C), humitat (60-70%), cicle horari de 12 hores de llum-12 hores de fosc.

Aquestes condicions d'estabulació es van mantenir abans de la intervenció quirúrgica i durant tot el període postoperatori.

Durant tot el període de desenvolupament d'aquesta tesi es va complir la normativa vigent referent als animals d'experimentació. Els diferents projectes van estar aprovats pel comitè ètic de la Divisió IV de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona i es va complir la normativa de la Unió Europea (directiva 86/609 CEE), relativa a l'aproximació de les disposicions legals, reglamentàries i administratives dels animals utilitzats per experimentació científica, així com la llei 5/1995 de la Generalitat de Catalunya respecte a la protecció dels animals utilitzats per experimentació i altres finalitats científiques.

3.2 FÀRMACS ADMINISTRATS.

3.2.1 Immunosupressió.

El tractament immunosupressor administrat en tots els casos fou la mateixa combinació de fàrmacs canviant-ne només les dosis o el període d'administració. Es va administrar el fàrmac antiproliferatiu Micofenolat Mofetil (MMF) i l'anticalcineurínic FK506 o Tacrolimus.

3.2.1.1 Administració i dosi de Micofenolat Mofetil.

En aquests estudis utilitzarem MMF en comprimits de 500 mg comercialitzats pels laboratoris Roche amb la marca CellCept™. El fàrmac es van preparar diàriament dissolent-lo en una solució glucosada al 5%. La solució s'administrà diàriament per instil·lació gàstrica.

A l'estudi de subpoblacions limfocitàries i del sistema de la coagulació o estudi 1 l'administrarem a una dosi de 50 mg/kg des del dia 0 al dia 7 després del trasplantament. El grup control també va rebre aquest fàrmac durant 8 dies.

A l'estudi que hem realitzat amb l'antagonista del PAF UR-12670 o estudi 2, el Micofenolat Mofetil l'administrarem a una dosi de 25 mg/kg/dia des del dia 0 del trasplantament al dia 7 després del trasplantament.

3.2.1.2 Administració i dosi de Tacrolimus.

Tots els animals trasplantats van rebre una formulació sintetitzada especialment per a usos experimentals que va ser cedida per Fujisawa Pharmaceuticals GmbH. El fàrmac va ser preparat dissolent-lo en solució salina fisiològica, en condicions estèrils, i emmagatzemat a 4°C. S'administrà per via intramuscular, a les potes posteriors de l'animal, amb una xeringa amb agulla de 26G. La concentració i els dies d'administració del fàrmac varià depenent de l'estudi.

A l'estudi de subpoblacions limfocitàries i de la cascada de la coagulació els animals van rebre el fàrmac des del dia 0 de l'estudi o dia del trasplantament fins al dia +30 a una dosi de 0,5 mg/kg/dia. Des del dia +31 fins al dia 100 la dosi diària administrada va ser de 0,2 mg/kg/dia. Cal tenir en compte que alguns animals foren sacrificats al dia 7 després del trasplantament i altres al dia 30 després de la intervenció.

A l'estudi que vam realitzar amb l'antagonista del PAF UR-12670 tots els animals reberen Tacrolimus a una dosi de 0,2 mg/kg/dia, des del dia del trasplantament fins al dia 30 després del trasplantament.

3.2.2 Antagonista del PAF: UR-12670.

Administració i dosi:

L'UR-12670 va ser cedit pels Laboratoris J.Uriach, Barcelona. El fàrmac es va preparar diàriament dissolent-lo amb solució glucosada al 5% i es va administrar per instil·lació gàstrica a una dosi de 20mg/kg/dia a dos dels tres grups integrants d'aquest estudi.

3.3 INTERVENCIÓ QUIRÚRGICA.

La primera tècnica de trasplantament hepàtic en la rata va ser descrita per Sun Lee al 1973²²⁵. Aquest primer model va ser posteriorment modificat per Kamada¹³⁴.

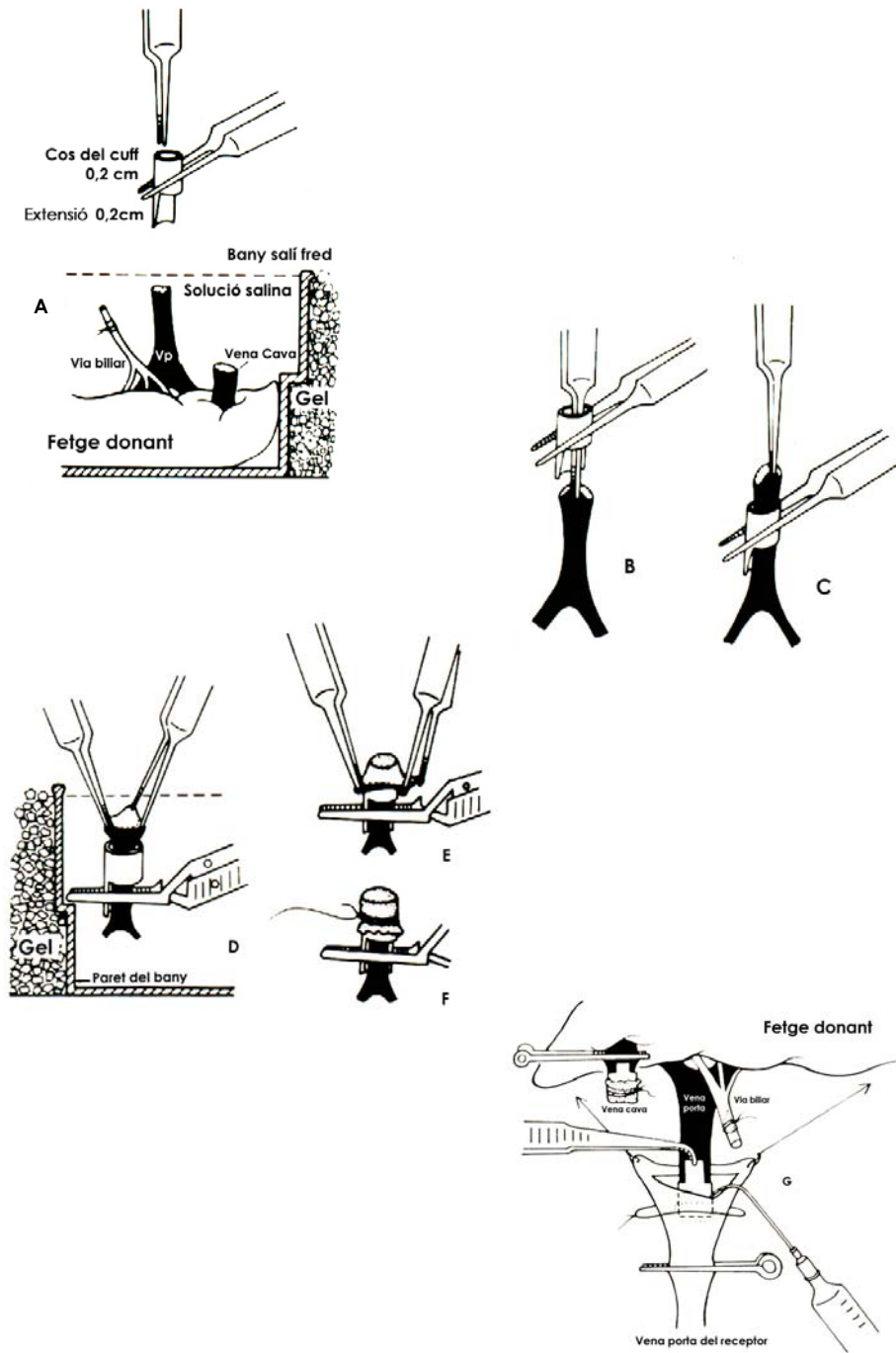
En aquests estudis hem utilitzat bàsicament la tècnica descrita per Kamada, i a les intervencions de xenotrasplantament, amb adaptacions a les peculiaritats del model hámster-

rata. A més hem utilitzat, per a la reconstrucció de la via biliar, la modificació descrita per Zimmermann¹³³ que es caracteritza per la utilització d'un únic tutor per l'anastomosi biliar.

3.3.1 Intervenció en el donant.

S'anestesia l'animal donant amb isofluorà. Realitzem una laparotomia transversal i es desplaça tot el paquet intestinal, quedant exposades tant la vena Cava inferior com l'artèria Aorta. Per visualitzar adequadament el pedicle hepàtic, s'aixequen els lòbuls del fetge. En primer lloc es realitza una colecistectomia amb una lligadura de seda 7/0 (Mersilk™, Ethicon, Johnson&Johnson). A continuació es cànula la via biliar amb un tub de polietilè de 5mm de longitud i diàmetre extern de 0.11cm que es fixa amb una lligadura de seda de 6/0 (figura 20). Posteriorment es secciona el lligament falciforme i la resta de lligaments i adherències del fetge. Seguidament, es dissequen la vena Cava Inferior i l'artèria Aorta a l'alçada de les venes renals, i s'administren 300 U d'heparina per la vena dorsal del penis. Per la perfusió del fetge s'utilitzen 15cc de solució Ringer-lactat a 4°C amb una xeringa acoblada a una extensió de 45cm de longitud, que presenta a l'extrem un catèter (Abbocath™) de 20G. Es lliga l'artèria Aorta a nivell de les venes lumbars amb una lligadura de seda 6/0 i es clampa amb un clamp vascular a nivell de la vena renal esquerra. S'obre la llum de l'aorta i es canula l'equip de perfusió. A continuació es realitza un hemitòrax esquerre i es clampa l'Aorta amb un mosquit a nivell intratoràctic. Alhora es desclampa l'Aorta a nivell de les renals i s'inicia la perfusió lentament. Es secciona la vena Cava inferior suprahepàtica a nivell intratoràctic i es continua amb la perfusió lenta (figura 21). Un cop acabada la perfusió es continua l'extracció de l'òrgan lligant i seccionant l'artèria hepàtica i les branques de la vena Porta (venes pilòrica i esplènica) amb lligadures de seda 7/0. Es lliguen també les dues venes renals i vena suprarenal dreta. Per finalitzar l'extracció es cauteritza una branca arterial de la hepàtica esquerra que es dirigeix cap al plexe esofàgic i es secciona entre les lligadures de la vena diafragmàtica del costat esquerre. Es secciona la vena Cava Inferior suprahepàtica, el més a prop possible del diafragma, així com la vena Cava Inferior i la vena Porta procurant obtenir la major longitud possible d'aquests vasos. Es col·loquen uns punts fiadors en els extrems de la vena Cava suprahepàtica amb Prolene™ de 7/0, que ens serviran posteriorment per realitzar l'anastomosi termino-terminal de la vena Cava Inferior Suprahepàtica, i es deixa l'òrgan en sèrum lactat fred, durant el període de cirurgia de banc. En aquesta fase es col·loquen els "cuffs" en la vena Porta (16G) i en la vena Cava (14G), com es mostra en les figures 19 i 22.

Figura 19: Esquema de com es realitza l'anastomosi amb el mètode de cuff.



3.3.2 Intervenció en el receptor.

S'anestesia l'animal receptor amb isofluorà. L'operació en el receptor comença amb una laparotomia transversal subxifoidea. A continuació es desplaça el paquet intestinal i s'inicia l'hepatectomia dissecant la vena Cava inferior, lligant i seccionant les glàndules adrenals dretes. A continuació es secciona l'artèria hepàtica mitjançant dues lligadures de seda 7/0. Es lliga i es secciona el plexe esofàgic i les venes diafragmàtiques esquerres. Es col·loquen uns punts fiadors de Prolene™ 7/0 (Ethicon) en els extrems de la vena Porta i de la vena Cava inferior el més proper possible al parènquima hepàtic, que ens serviran per exposar els dos vasos i facilitar les anastomosis.

Es clampen les venes Porta i Cava Inferior amb clamps vasculars i la vena Cava Inferior Suprahepàtica amb un clamp Satinsky. S'allibera el fetge (figura 23) i es col·loca el xenoempelt en posició ortotòpica. S'inicia l'implant per l'anastomosi de la vena Cava Suprahepàtica mitjançant sutura continua aprofitant el punts fiadors que havíem col·locat prèviament (Prolene™ 7/0) (figura 24). El següent pas és l'anastomosi de la vena Porta per la tècnica del "cuff". Hem de procurar de purgar tots els vasos per evitar embòlies gasoses. La fase anhepàtica no ha de superar els 20 minuts. Es desclampa la vena Porta i es reperfon el fetge (figura 25). A continuació s'anastomosa la vena Cava Inferior també per la tècnica del "cuff" (figura 26) i finalment la via biliar utilitzant la cànula de polietilè com a tutor. Es tanca la laparotomia en dues capes amb sutura absorbible de 3/0. A continuació administrem per la vena dorsal del penis una solució que consisteix en 1ml de l'antibiòtic Ciprofloxacino (200U), 0.5ml de bicarbonat i 1ml de Ringer lactat.

Figura 20: Canulació de la via biliar del donant.

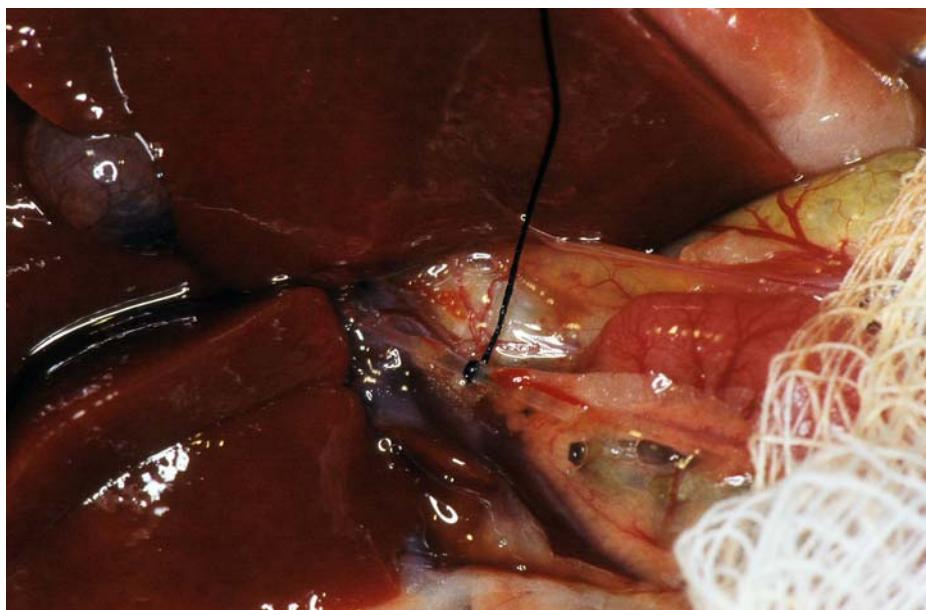


Figura 21: Perfusió de l'òrgan donant.

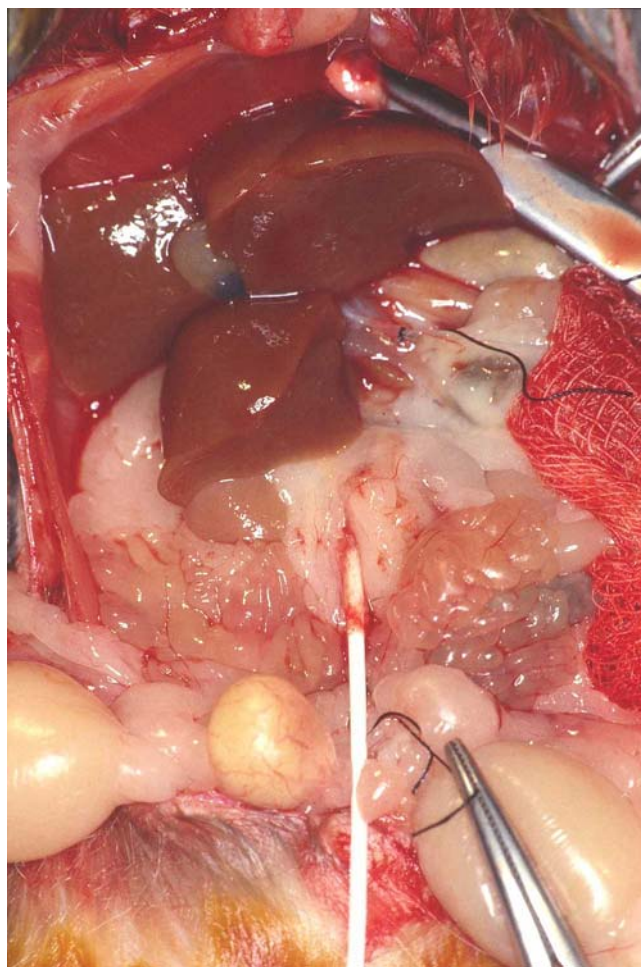


Figura 22: Col·locació dels cuffs a l'empelt hepàtic

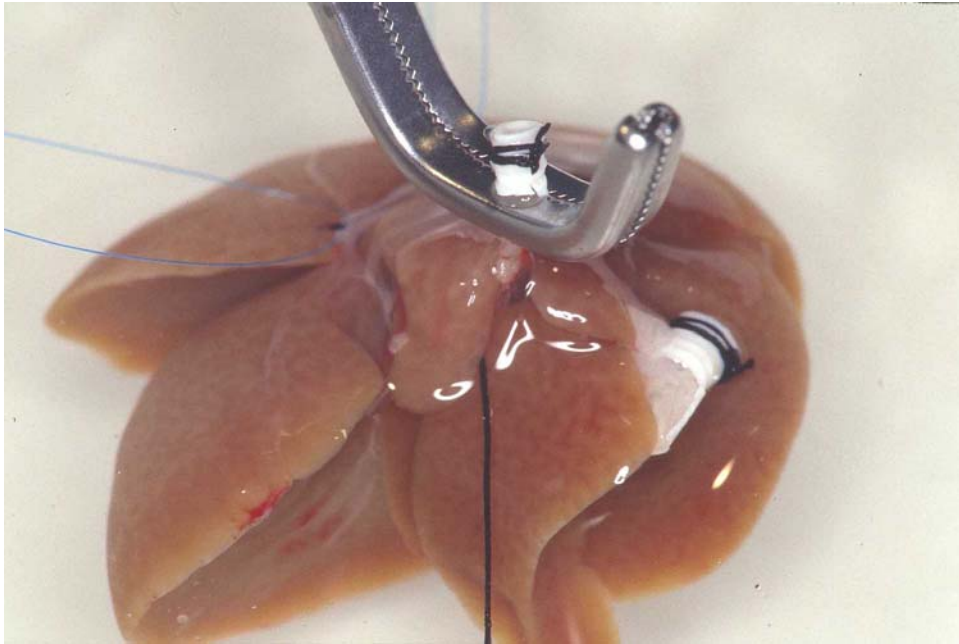


Figura 23: Receptor un cop tret el seu òrgan

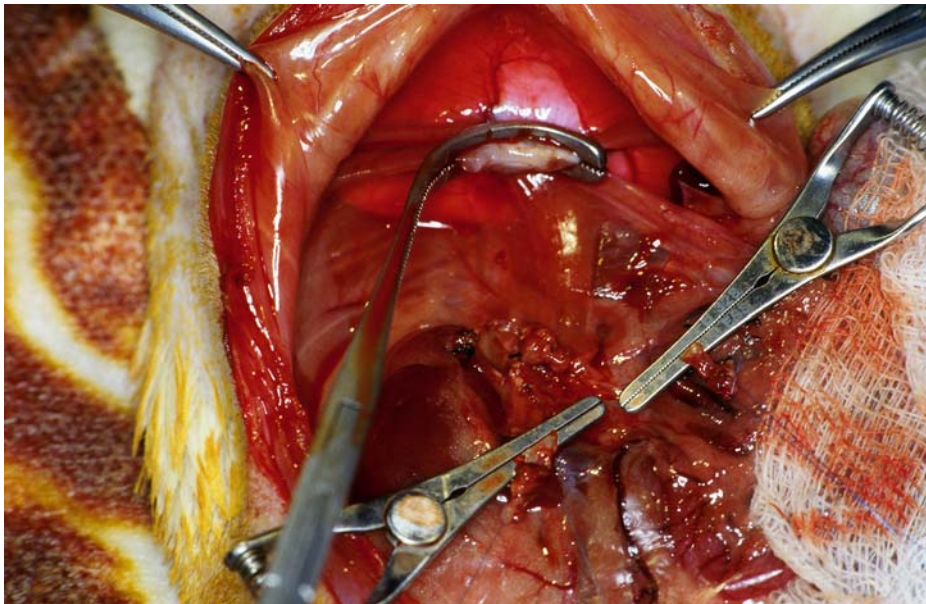


Figura24: Anastomosi de la vena cava inferior suprahepàtica.

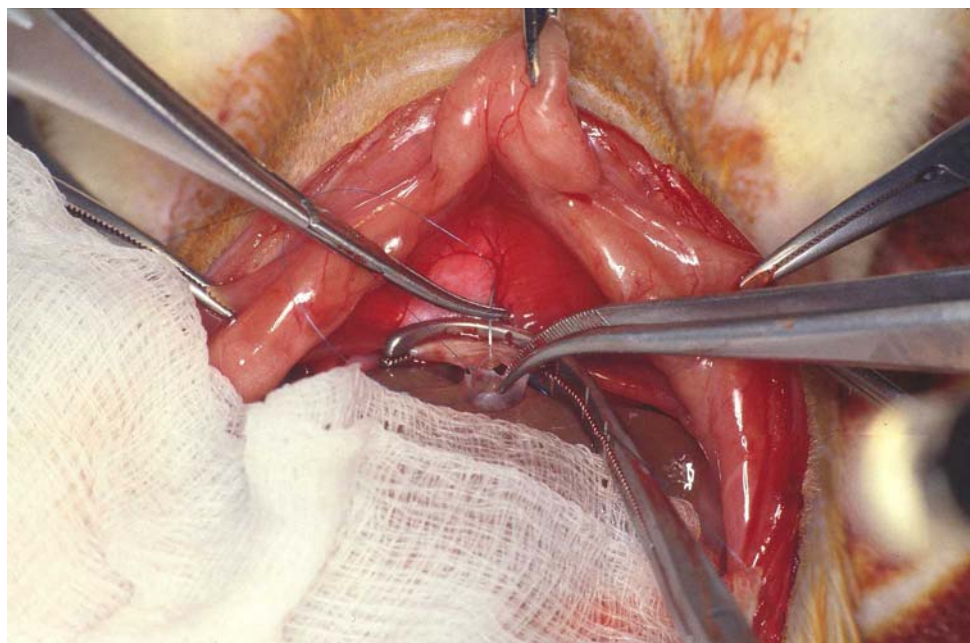


Figura 25: Anastomosi de la vena cava infrahepàtica utilitzant un cuff.

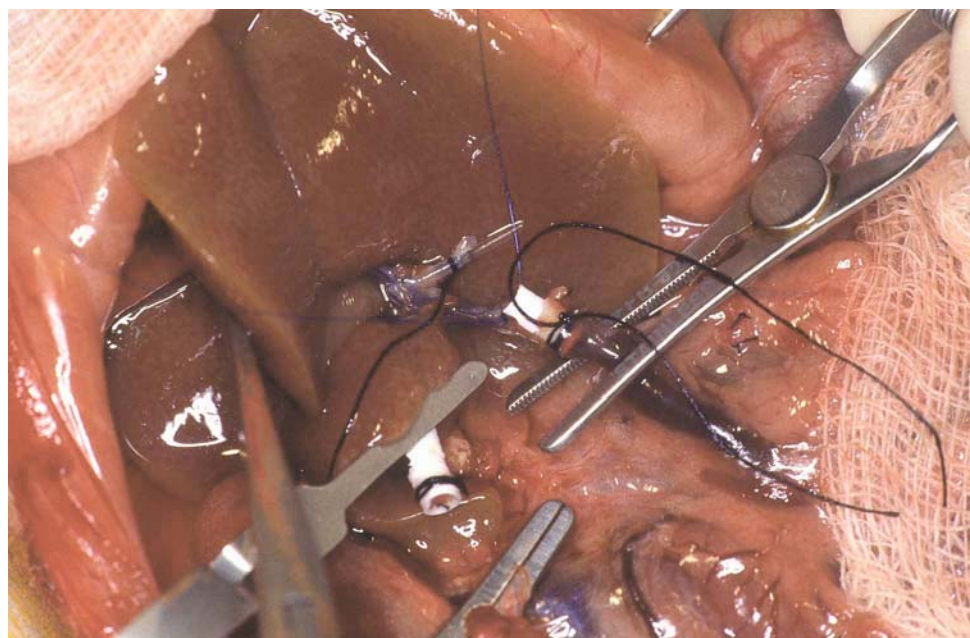


Figura 26: Referfusió de l'empelt.

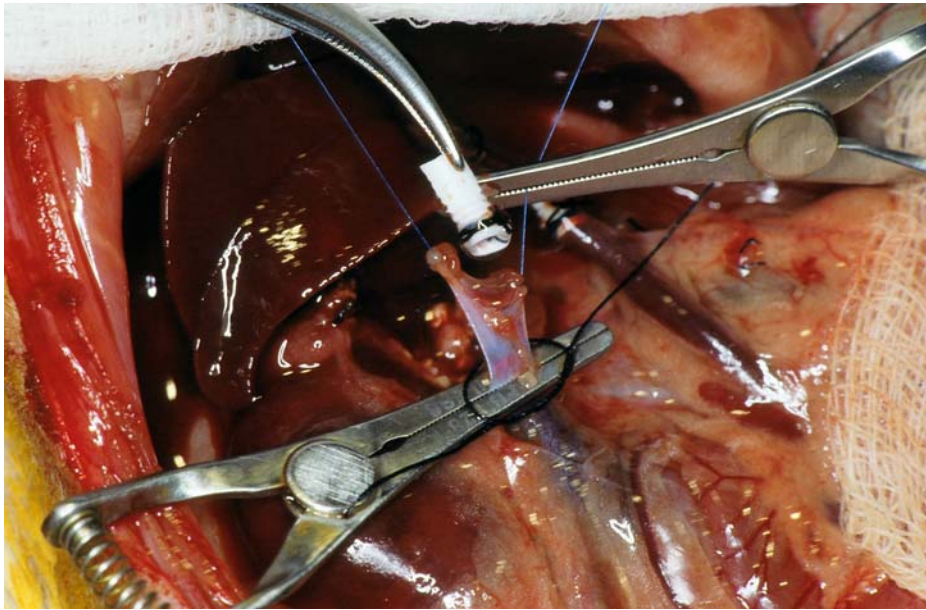
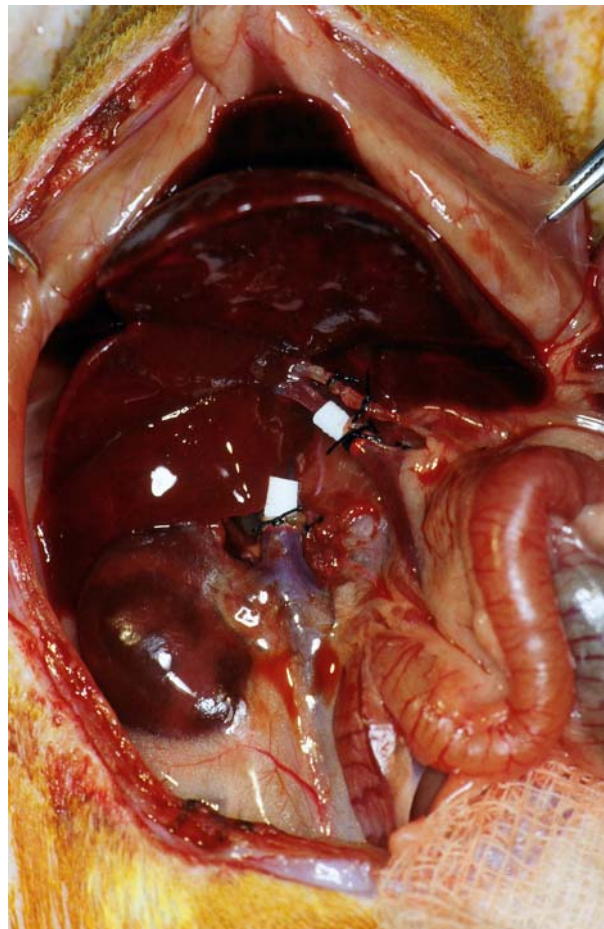


Figura 27: Detall de l'empelt un com finalitzat el trasplantament.



3.4 DISSENY EXPERIMENTAL

3.4.1 Disseny de l'estudi 1

En aquest estudi es van fer nou grups: grups control, grups d'al·lotrasplantament i de xenotrasplantament. El tractament immunosupressor va ser igual en tots els grups

Grups control:

Grup 1: Rates Lewis control (n= 7)

Grup 2: Rates Lewis control amb tractament immunosupressor (n=6)

Grup 3: Hámsters *Golden Syrian* control (n=6)

Grups d'al·lotrasplantament hepàtic ortotòpic

Grup 4: rates Dark Agoutí com a donants i rates Lewis com a receptors (n=6).
Sacrificades als 7 dies postrasplantament.

Grup 5: rates Dark Agoutí com a donants i rates Lewis com a receptors (n=6).
Sacrificades als 30 dies postrasplantament.

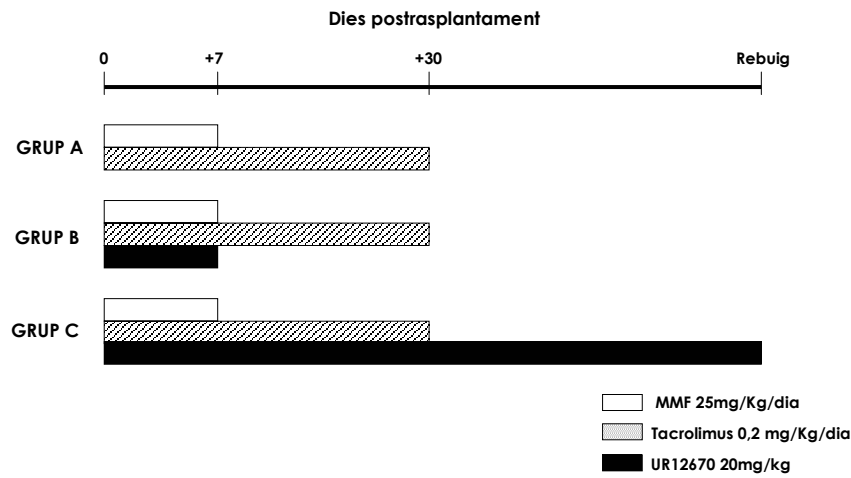
Grup 6: rates Brown Norway com a donants i rates Lewis com a receptors (n=7).
Sacrificades als 100 dies postrasplantament.

Grups de xenotrasplantament hepàtic ortotòpic on en tots els grups els donants són hámsters *Golden Syrian* i els receptors rates de la soca Lewis:

Grup 7: sacrificades als 7 dies de la intervenció (n=6).

Grup 8: sacrificades als 30 dies de la intervenció (n=7).

Grup 9: sacrificades als 100 dies de la intervenció (n=6).

Figura 29: Esquema dels grups experimentals de l'estudi 2 i el tractament farmacològic que reben.

3.5 OBTENCIÓ DE MOSTRES.

3.5.1 Obtenció de sèrum.

En ambdós estudis s'obtingueren mostres de sèrum de forma continuada fent extraccions sanguínies per la vena de la cua. Es tallava l'extrem de la cua i es recollia la sang amb Microtainers™ amb gel separador (Becton Dickinson). Es mantenien a 4°C un mínim de 30 minuts i es centrifugaven a 8000g durant 10 minuts. El sèrum s'aliquotava i congelava a -80°C fins al moment de la seva utilització.

La pauta d'extraccions a l'estudi 1 va ser: al dia de la intervenció, el dia 7 després del trasplantament, o el dia 7 després de l'inici de l'estudi en els grups control, el dia 15, el dia 30, el 50, el dia 75 i el dia 100 posttrasplantament.

La pauta seguida a l'estudi 2 va ser: al dia del trasplantament, el dia 3 després de la intervenció, el dia 7, el dia 15, el dia 30 posttrasplantament i cada 10 dies fins la mort de l'animal, que correspon amb el rebuig de l'òrgan.

3.5.2 Obtenció de sang total.

Les mostres de sang total s'obtenen en els animals de l'estudi 1. S'anestesiaren els animals amb Isoflurà i es practicà una laparotomia vertical, canulant l'artèria aorta amb un Abbocath™ de 20G per tal de poder realitzar l'extracció del volum idoni de sang total i sense problemes de coagulació .

La sang es repartí en tubs que contenien EDTA 3K⁺ , per poder fer la valoració de les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica i realitzar els hemogrames, i dels hemogrames, i amb tubs amb 100 µl de citrat a una concentració del 3,2% on s'afegien 900 µl de sang total per obtenir plasma i poder fer les determinacions de la cascada de la coagulació que contempla l'estudi 1. La sang amb EDTA 3K⁺ es conservà a temperatura ambient fins al moment de processar-la el mateix dia de l'extracció. Les determinacions de les subpoblacions limfocitàries i dels hemogrames es realitzaren el mateix dia. La fracció de mostra destinada a l'obtenció de plasma, després de ser degudament agitada amb suavitat, per tal d'evitar la formació de coàguls, es guardà com a mínim una hora a 4°C. Després es centrifugava en fred a 1000g durant 10 minuts. Es va separar el plasma i es va distribuir en aliquotes de 300µl i es va mantenir a -80°C fins al moment de realitzar les diferents determinacions.

3.5.3 Obtenció de mostres de teixit hepàtic.

De cada empelt es recolliren mostres de teixit de dos punts diferents per realitzar l'estudi histològic i les diferents tincions immunohistoquímiques, una mostra s'agafà del lòbul medial i l'altra de l'*hiliu* hepàtic i es van fixar en formol al 10% per incloure-les en parafina. De cadascuna d'aquestes parts també se'n va agafar una mostra per incloure-la amb OCT i congelar-la amb nitrogen líquid i es guardaren a -80°C. La resta de l'empelt va ser congelat directament amb nitrogen líquid.

3.6 ESTUDI HISTOLÒGIC.

Per tal de realitzar un exhaustiu estudi histològic realitzarem dues tincions diferents la d'Hematoxilina-Eosina, per valorar l'estat de l'empelt, i la tricròmica de Masson, per tal de poder valorar millor la formació de fibrosi.

De cada mostra inclosa en parafina, tant de l'estudi 1 com de l'estudi 2, se'n van fer talls de 3 µm de gruix, es van desparafinar amb el protocol pertinent, i es van tenyir amb les dues tincions citades.

Valorarem els paràmetres detallats a continuació assignant-los-hi un número del 0 al 3 depenent del grau de la lesió tenint en compte que: 0 indicava absència, 1 lesió lleu, 2 moderada i 3 abundant.

Paràmetres valorats fixant-nos en diferents parts de l'empelt:

- Canvis portals i periportals o zona 1:
 - Infiltrat limfocitari portal
 - Infiltrat mixt (infiltrat limfocitari i de leucits polimorfonucleares).
 - Endotelitis
 - Infiltrat periportal
 - Proliferació colangiolar
 - Dany ductal
- Canvis lobel·lars o zona 2:
 - Infiltrat limfocitari
 - Infiltrat mixt (infiltrat limfocitari i leucòcits polimorfonuclears)
 - Necrosi hepatocitària
 - Absència d'hepatòcits
 - Hemorràgia
 - Dilatació sinusoïdal
 - Congestió sinusoïdal
- Canvis centrelobel·lars o zona 3:
 - Infiltrat limfocitàri
 - Infiltrat mixt (infiltrat limfocitari i leucòcits polimorfonuclears)
 - Necrosi hepatocitària
 - Absència d'hepatòcits
 - Endotelitis

- Fibrosi:
 - Expansió fibrosa portal
 - Ponts de fibrosi porto-portal
 - Fibrosi porto-central

3.7 PROVES DE FUNCIO HEPÀTICA.

De totes les rates es van fer determinacions de transaminases, Aspartat aminotransferasa (AST) i de Alanina aminotrasferasa (ALT) i d'albumina en sèrum per mètodes espectrofotomètrics (Laboratoris Echevarne, Barcelona). Aquestes determinacions es van fer en mostres seriadades. A l'estudi 1 els dies: 0, +7, +15, +30, +50, +75, +100 postrasplantament, i a l'estudi 2 els dies: 0, 3, 7, 15, 30 després del trasplantament i cada deu dies fins la mort de l'animal.

3.8 TINCIONS IMMUNOHISTOQUÍMIQUES.

Les diferents tincions immunohistoquímiques tot i tenir passos comuns els protocols es van haver d'adaptar a cadascun dels anticossos utilitzats.

3.8.1 Dipòsits d'anticossos IgM, IgG i molècula C3 del complement.

Vàrem utilitzar mostres congelades incloses en OCT i tallades a 5µm de gruix. Es van fixar amb acetona freda i es van incubar amb sèrum de cabra a temperatura ambient i després amb l'anticòs primari. Les mostres a les que es valoraven els dipòsits de IgM i de IgG es van incubar 1 hora a temperatura ambient i a la foscor amb els corresponents anticossos primaris monoclonals marcats amb fluorescència (anti IgM a una concentració de 1:100 i anti IgG a 1:50) i a les que es valorà els dipòsits de C3 la incubació amb l'anticòs primari era tota la nit a 4°C a una concentració de 1:400. Per aquesta determinació, donat que utilitzarem un anticòs

primari sense marcar vam incubar les mostres amb un anticòs secundari marcat amb fluorescència a una concentració de 1:100. Per últim es van muntar les mostres amb medi de muntatge per fluorescència (DAKO, Glostrup, Alemanya). Es guardaren a -20°C preservades de la llum fins al moment de la seva observació amb el microscopi de fluorescència utilitzant els filtres pertinents en cada cas.

Els anticossos utilitzats van ser:

Per a la determinació dels dipòsits de IgM: Mouse anti-rat IgM, clon MARM-4, marcat amb ficoeritrina o bé amb FITC d'Immunotech, Marsella, França.

Per a la determinació dels dipòsits de IgG: Mouse anti-rat IgG, clon MARG1-2, marcat amb tiocianat de fluoresceïna (FITC) d'Immunotech, Marsella, França.

Per a la determinació de C3: Mouse anti-rat C3 i cèl·lules reticulars, clon ED11 de Serotec, Oxford, UK, i com a anticòs secundari Goat anti-mouse IgG marcat amb tiocianat de fluoresceïna, Jackson ImmunoResearch, Baltimore PA.

Els resultats s'obtingueren de valorar cada mostra amb una escala del 0 al 3, on el 0 és absència, l'1 dipòsits lleus, el 2 dipòsits moderats i el 3 dipòsits abundants.

3.8.2 Determinació de Cèl·lules de Kupffer i Natural Killer.

Per aquesta valoració també és van utilitzar mostres congelades, incloses en OCT, tallades a 5µm de gruix. La fixació va ser amb formol al 10% durant 10 minuts a temperatura ambient. Vam bloquejar les peroxidases endògenes amb peròxid d'hidrogen al 3% durant 15 minuts (preparat amb una solució de 70% PBS i 30% metanol). Aquest és un pas important ja que el fetge és molt ric amb aquests enzims i ens podrien emascarar el resultat ja que l'anticòs secundari està marcat amb peroxidasa. Per tal d'evitar les unions inespecífiques dels anticossos bloquejàrem les mostres amb sèrum de cabra durant una hora a temperatura ambient. La incubació amb els anticossos primaris monoclonals va ser de tota la nit a 4°C, a una concentració de 1:100. Com a anticòs secundari vam utilitzar-ne un de cabra dirigit contra molècules IgG de ratolí marcat amb peroxidasa. Els resultats es van obtenir revelant les preparacions amb Diaminobenzidina, DAB, i diferenciant-les amb hematoxilina de Harris diluïda.

Anticossos utilitzats:

Per a la determinació de les cèl·lules de Kupffer: *mouse anti-rat macrophages*, clon ED2 de Labgen, Barcelona.

Per a la determinació de les cèl·lules NK: *mouse anti-rat* CD161, clon 10/7, de Labgen, Barcelona.

Com a anticòs secundari: *goat anti-mouse* IgG marcat amb peroxidasa i absorbit per rata, Labgen, Barcelona.

3.8.3 Determinació de limfòcits CD8⁺ i CD45RC⁺.

Per tal de determinar aquest tipus de limfòcits utilitzarem mostres incloses amb parafina que vam tallar a 3µm de gruix. El pretractament utilitzat va ser amb calor i tampó citrat a pH6. Un cop les mostres s'havien refredat bloquejarem les peroxidases endògenes amb peròxid d'hidrogen al 3% durant 15 minuts (diluït amb PBS) i les unions inespecífiques les vam bloquejar amb sèrum de cavall diluït 1/5. La incubació amb els anticossos primaris es va realitzar tota la nit a 4°C a una concentració de 1:100 per a la determinació de cèl·lules CD8⁺ i de 1:200 per a la determinació de cèl·lules CD45RC⁺. Per tal d'amplificar el senyal vam utilitzar complexos avidina-biotina, l'anticòs secundari que utilitzarem era marcat amb biotina i posteriorment ho vam incubar amb els complexos avidina-biotina, on la biotina va marcada amb peroxidasa. Ho rebel·larem amb DAB i ho diferenciarem amb hematoxilina de Harris diluïda.

Els anticossos utilitzats van ser:

Per determinar els limfòcits CD8⁺: *mouse anti-rat* CD8, clon MRC OX-8, de Labgen, Barcelona.

Per determinar els limfòcits CD45RC⁺: *mouse anti-rat* CD45RC, clon MRC OX-22, de Labgen, Barcelona.

Com a anticòs secundari: *Goat anti-mouse* IgG marcat amb biotina, Kit ImmunoPure ABC, Pierce, Rockford, IL, (USA).

3.8.4 Determinació de cèl·lules B.

Aquesta tinció immunohistoquímica també es va realitzar amb mostres incloses amb parafina tallades a 3µm de gruix. El pretractament utilitzat també va ser amb calor i amb tampó citrat a pH6 però es va incrementar el temps d'ebullició. Un cop les mostres s'havien refredat es bloquejaren les peroxidases endògenes. Les unions inespecífiques es van bloquejar amb una solució d'albúmina sèrica bovina a l'1% durant 30 minuts a temperatura ambient i fent un rentat ràpid abans de la incubació amb l'anticòs primari que el preparàvem a una

concentració de 1:20. Després de la incubació de tota la nit a 4°C s'atempaven les mostres més temps del que ho fèiem en un protocol estàndard, 1 hora. L'anticòs secundari utilitzat en aquest protocol, i que ens va servir per amplificar el senyal, anava dirigit contra immunoglobulines de ratolí i portava associat un esquelet polimèric conjugat amb enzims peroxidasa. Revelarem amb DAB i es van diferenciar les preparacions amb hematoxilina de Harris diluïda.

Els anticossos utilitzats van ser:

Anticòs primari: *mouse anti-rat*CD45RA, clon OX-33, de Pharmingen, Heidelberg, Alemanya.

Anticòs secundari: EnVision™ *anti-mouse*, DAKO, Carpinteria, CA.

3.8.5 Determinació de Macròfags.

Com en els protocols anteriors les mostres utilitzades eren incloses amb parafina i tallades a 3µm de gruix. El pretractament utilitzat en aquest cas també va ser amb calor però amb tampó EDTA 2Na⁺ a pH 8. Un cop les mostres s'havien refredat es bloquejaven les peroxidases endògenes amb peròxid d'hidrogen al 3% durant 15 minuts i les unions inespecífiques amb sèrum de cabra diluït 1/5. La incubació amb l'anticòs primari a una concentració de 1:50, va ser de tota la nit a 4°C. Com a anticòs secundari es va utilitzar el mateix que per al marcatge de cèl·lules B, un anticòs dirigit contra ratolí i associat a un polímer marcat a diferents punts amb peroxidasa, que com en els protocols anteriors es revela amb DAB i es diferencien les mostres amb Hematoxilina de Harris diluïda.

Anticossos utilitzats:

Anticòs primari: *mouse anti-rat* macròfags i monòcits, clon ED1, Serotec, Oxford, UK.

Anticòs secundari: EnVision™ *anti-mouse*, DAKO, Carpinteria, CA.

3.8.6 Recompte de limfòcits infiltrants al teixit hepàtic.

Per tal de comptar el número de cèl·lules infiltrants al parènquima hepàtic es van comptar amb l'ajuda d'una reixeta i a 400 augments. Quan la distribució de les cèl·lules a comptar era uniforme es comptaven 10 camps de cada preparació i expressàvem el resultat en cèl·lules/mm². Quan valoràvem cèl·lules infiltrants als espais porta comptàvem de 8 a 10

espais porta, sempre que era possible, i de cadascun 5 o 6 grups de 100 cèl·lules o bé totes les cèl·lules quan els nombre de cèl·lules infiltrants no era molt gran. De les cèl·lules infiltrants es comptava quantes eren positives i quantes negatives. Els resultats els expressàvem amb percentatges.

3.9 REALITZACIÓ D'HEMOGRAMES.

Amb mostres de sang total amb EDTA 3K⁺, el mateix dia de la seva extracció, es van realitzar hemogrames de totes les rates contemplades a l'estudi 1. Es van dur a terme amb els analitzadors automatitzats ABX Pentra-120 (França) del servei d'Hematologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge.

3.10 DETERMINACIÓ DE SUBPOBLACIONS LIMFOCITÀRIES EN SANG PERIFÈRICA.

Aquesta tècnica ens va permetre diferenciar diferents tipus de limfòcits presents en sang perifèrica. Ho vam aconseguir utilitzant tres anticossos a la vegada dirigits contra epítops característics dels diferents tipus de limfòcits i amb cadascun dels anticossos marcats amb un fluorocrom diferent.

Protocol:

Diluírem cadascun dels anticossos 1/4 i vam posar 5 µl de cadascun dels anticossos diluïts a cada mostra de sang perifèrica a valorar (50µl), la sang total es va extreure amb EDTA 3K⁺, el mateix dia de la determinació. S'agità i es deixà incubant-se de 15 a 20 minuts a temperatura ambient i preservant-ho de la llum. Per tal d'eliminar els eritròcits s'afegí solució lisant i s'incubà durant 10 minuts, també protegint-ho de la llum. Posteriorment es rentà amb PBS i finalment es resuspengueren les cèl·lules amb 200 µl de PBS i es va llegir en un citòmetre de flux FacScan, Becton Dickinson.

Anticossos utilitzats, tots tres anticossos són de Pharmingen, Heidelberg, Alemanya:

- Mouse anti-ratCD3 marcat amb tiocianat de fluoresceïna (FITC), clon G4.18
- Mouse anti-ratCD4 marcat amb Cy-Chrome, clon OX-35
- Mouse anti-ratCD45RC marcat amb ficoeritrina (PE), clon OX-22

Amb els anticossos utilitzats vam poder determinar les proporcions de: limfòcits T totals, limfòcits T CD4⁺, limfòcits T CD8⁺, Cèl·lules B i NK. De les cèl·lules CD4⁺ en podem distingir les subpoblacions CD4⁺CD45RC⁺ o Th1 i CD4⁺CD45RC⁻ o Th2.

Per aconseguir aquestes determinacions primer vam seleccionar els limfòcits presents a la mostra diferenciant les cèl·lules per mida i rugositat realitzant una *gate* posant la mida de les cèl·lules, *Forward Scattering*, a l'eix de les X i la rugositat, *Side Scattering*, a l'eix de les Y. Coneixent les característiques pròpies dels limfòcits vàrem diferenciar-los dels altres tipus cel·lulars. Un cop seleccionats vam fer un gràfic enfrontant FL1 (Flow laser 1), que llegeix la fluorescència del FITC amb la que anava marcat l'anticòs anti-CD3, i el FL3 que llegeix la fluorescència del CyChrome™, fluorocrom amb que anava marcat l'anticòs anti-CD4. Amb aquests gràfics vam poder obtenir el nombre total de limfòcits T, el de limfòcits T CD4⁺ i els limfòcits T CD8⁺. Per poder obtenir la proporció de cèl·lules B i NK amb la selecció feta amb aquesta primera *gate* enfrontàrem els eixos del canal de fluorescència corresponent a la Ficoeritrina i el corresponent al FITC. Així doncs com que les cèl·lules B i NK són CD45RC⁺ i CD3⁻ vam poder determinar aquesta subpoblació.

A continuació vam realitzar una segona *gate* on l'eix de les X corresponia al canal de fluorescència corresponent al FITC i el de les Y la selecció per la rugositat de les cèl·lules, SSC (Side Scattering) i vam seleccionar les cèl·lules CD3⁺. Un cop seleccionades aquestes cèl·lules vam enfrontar els eixos eren els corresponents al fluorocrom CyChrome™ a l'eix de les X i el corresponent a la Ficoeritrina a l'eix de les Y ja que l'anticòs que reconeix els CD4 va marcat amb CyChrome™ i el que reconeix el CD45RC amb Ficoeritrina. Amb aquesta gràfica vam obtenir les proporcions de limfòcits T CD4⁺CD45RC⁺ o Th1 i els CD4CD45RC⁻ o Th2.

Utilitzant els valors del nombre de limfòcits totals obtinguts amb la realització dels hemogrames i el percentatge obtingut de la determinació per citometria de flux vam poder calcular els valors absoluts de les diferents subpoblacions limfocitàries: Cèl·lules B i NK, limfòcits T, limfòcits T CD8⁺, limfòcits T CD4⁺, limfòcits T CD4⁺CD45RC⁺ o Th1 i limfòcits T CD4⁺CD45RC⁻ o Th2.

3.11 VALORACIÓ DE DIFERENTS PARÀMETRES DE LA CASCADA DE LA COAGULACIÓ.

Amb les alíquotes de plasma es van valorar diferents paràmetres de la cascada de la coagulació com el temps de protrombina, el temps de tromboplastina parcial activada o TTPA, l'antitrombina III, els factors V i VIII, la proteïna C i S i els complexos trombina-anritrombina o complexos TAT. Tots aquests paràmetres menys els complexos TAT és van valorar amb mètodes espectrofotomètrics automatitzats al servei d'Hemostàsia de l'Hospital Universitari de Bellvitge, utilitzant els kits de la casa comercial *Instrumentation Laboratory IL, Milà, Itàlia*. Els complexos TAT es van valorar amb la tècnica d'ELISA.

3.12 QUANTIFICACIÓ DE NIVELLS DE XENOANTICOSSOS EN SÈRUM.

Es van determinar els títols de xenoanticossos IgM i IgG específics de hámster mitjançant una tècnica de citometria de flux que consisteix en enfrontar les mostres de sèrum a limfòcits de hámster, que s'extreuen dels ganglis cervicals d'aquests animals, i marcar amb fluorescència els anticossos que hi queden retinguts. Es van mesurar mostres seriades de sèrum de les rates de l'estudi 2.

Protocol:

S'anestesiaren els hámsters i se'ls hi va extreure els ganglis cervicals i es van conservar amb PBS. A continuació es van extreure els limfòcits infont-hi PBS amb una xeringa amb una agulla de 25G. El PBS que conté els limfòcits es recollí amb un pipeta Pasteur prou gran per no trencar-los. Aquesta solució es centrifugà i es rentaren les cèl·lules tres cops amb PBS. Per eliminar els eritròcits que haguessin pogut quedar en aquesta solució es van incubar les cèl·lules amb solució llsant durant 10 minuts. Després de dos rentats amb PBS, amb una cambra de Neubauer es va comptar el número de cèl·lules que hi havia i s'ajustà la solució a una concentració de 5×10^6 cel/ml. A continuació s'incubaren 50 μ l ($2,5 \times 10^5$ cèl·lules) d'aquesta solució amb 50 μ l d'una dilució 1/25 de cadascun dels sèrums a valorar (30 minuts a 4°C). Després de rentar les cèl·lules s'incubà amb els anticossos monoclonals anti IgM i anti IgG de rata marcats amb fluorescència, 20 minuts a 4°C i preservats de la llum. Es feren els últims rentats i es van resuspendre les cèl·lules amb 200 μ l de PBS i s'analitzaren en un citòmetre de flux FacScan, Becton Dickinson.

Anticossos utilitzats:

Per a la determinació de IgM: mouse anti-rat IgM F(ab') marcat amb ficoeritrina (PE) de Immunotech, Marsella, França.

Per a la determinació de IgG: mouse anti-rat IgG (H+L) marcat amb tiocianat de fluoresceïna (FITC) de Immunotech, Marsella, França.

3.13 VALORACIÓ DE LA MOLÈCULA DEL COMPLEMENT C3 EN SÈRUM.

Per tal de dur a terme aquesta determinació vam utilitzar la tècnica anomenada *Rockett immunoelectrophoresis*.

Vam preparar, per cada rata a determinar els nivells sèrics de C3 un gel d'agarosa a l'1% al que just abans de posar-lo sobre un vidre, de 11 cm x 9 cm, li vàrem afegir l'anticòs anti-C3 (IgG goat anti-rat C3, Cappel, Organon Teknika Corp., West Chester, PA,USA) perquè quedés a una concentració de 1: 375 i homogèniament repartit. Un cop solidificat en un dels extrems hi férem un pou per cada mostra a determinar. Vàrem carregar una mostra de sèrum de la rata a determinar el dia 0 (abans del trasplantament), una de sèrum de hámster normal, sèrums de diferents dies postrasplantament i sèrum d'una rata normal a diferents dilucions per tal de tenir una recta patró. Vam fer córrer el gel, aplicant un corrent elèctric de 80V, 20 hores a 4°C. Posteriorment tenyírem els gels amb Blau de metilè i els vam eixugar aplicant aire calent.

Els resultats els obtinguérem escanejant els gels i mesurant la distància del centre del pou de càrrega fins a l'extrem del *rockett*. La llargada del *rockett* és un indicador de la quantitat d'antígen, en aquest cas de C3. Cadascun dels resultats obtinguts s'extrapolava amb la recta obtinguda en cada placa amb els valors de les diferents dilucions del sèrum control. Així doncs els valors obtinguts eren quantitat de la molècula del complement en sèrum en comparació a la quantitat que presenta una rata normal.

Donat que no totes les rectes patró es van poder fer amb el sèrum de la mateixa rata i eliminar les petites variacions de cada electroforesi, per tal de poder comparar els resultats vam calcular els valors relatius considerant 1 el valor del dia 0 de cada animal.

3.14 DETERMINACIÓ ANTIGÈNICA DELS ANTICOSSOS.

3.14.1 Immunoblot.

Hem utilitzat la tècnica d'immunoblot per tal d'intentar determinar si els anticossos antihàmster que veiem en sèrum anaven tots dirigits contra el mateix antigen o bé tenien diferent especificitat antigènica. Es transfereixen a una membrana les proteïnes de membrana aïllades d'un homogenat de fetge de hàamster normal i s'hi enfronta sèrum de diferents dies postrasplantament.

Protocol d'extracció de proteïnes de membrana de cèl·lules hepatocitàries:

Damunt de gel i utilitzant un *potter* vam preparar un homogenat amb fetge de rata normal de la soca Lewis (tampó d'homogenització: Tris HCl 10mM, Sacarosa 0,25M, Aprotinina 1µg/ml PMSF 50 µg/ml). Per tal de separar les proteïnes de membrana primer vam trencar les membranes cel·lulars amb tampó de lisi (TRIS 25 mM, EDTA 2,5 mM, Na Cl 50 mM, Deoxicolat Na 12 mM, Aprotinina 1 µg/ml, PMSF 50 µg/ml) i ho vam centrifugar a 3000g 10 minuts a 4°C i ens quedàrem amb el sobrenedant ja que era la fracció que contenia el citosol i la membrana. Després es va fer una segona centrifugació, aquest cop a 20000g a 4°C durant 30 minuts. D'aquesta centrifugació en vàrem reservar el pellet que el vam resuspendre amb 3ml de tampó de lisi (25mM Tris HCl pH<7.5, 2.5mM EDTA, 50mM NaCl, 12mM Sodium Deoxycholate, 1µg/ml Aprotinin, 50 µg/ml PMSF). Després de centrifugar a 11200g durant 30 minuts a 4°C el sobrenedant, enriquit amb proteïnes de membrana va ser aliquotat i guardat a -80°C fins al dia de la seva utilització.

Protocol de l'immunoblot:

L'extracte de proteïnes de membrana de cèl·lules hepatocitàries va ser sotmès a una electroforesi SDS-PAGE amb un gel d'acrilamida del 12,5% (37,5:1 mono:bis-acrilamida). Les proteïnes van ser transferides a una membrana de polivinil: *polyvinylidene fluoride*, Immobilon-P Millipore, amb el sistema *Trans-Blot semidry blotting*, Biorad (15 V 30 minuts). Prèviament a la incubació amb els sèrums de les rates trasplantades es van incubar tires de membrana amb tampó de bloqueig (Tween 20 0.05%, BSA 1%, PBS pH 7.2) durant 1 hora a temperatura ambient damunt d'una plataforma d'agitació. Després es van incubar les diferents tires amb els sèrums de rata diluïdes 1:150 en tampó de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient, també en agitació. Després de rentats amb PBS vam incubar amb l'anticòs secundari mouse anti-rat IgM marcat amb fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch, Baltimore PA, USA) a una concentració de 1:5000. La visualització dels anticossos retinguts a les proteïnes es va dur

a terme incubant les tires de membrana amb la solució amb el substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate / nitroblue tetrazolium phosphatase (BCIP-NBT) (Sigma, Alcobendas, Madrid).

3.14.2 Immunohistoquímica indirecta.

Per tal de veure la localització dels antígens contra els que anaven dirigits aquests xenoanticossos vàrem enfrontar sèrum de diferents dies postrasplantament de rates de l'estudi 1 a talls de fetge de hámster control. Per intentar esbrinar si eren anticossos específics d'espècie o d'alguna molècula específica del fetge vam dur a terme el mateix procés amb mostres d'esòfag de mona i de hámster, mostres de xenoempelt cardíac de hámster i amb talls de fetge de rata Lewis control.

Vam fer talls de 5µm de gruix de mostres de teixit hepàtic de hámster normal congelades incloses en OCT. Aquests talls els vam incubar durant una hora a temperatura ambient amb sèrum de rata de diferents dies postrasplantament. Per veure on havien quedat retinguts els xenoanticossos vàrem incubar les mostres amb un segon anticòs dirigit contra les IgM de rata i marcat amb fluorescència, amb ficoeritrina concretament (Goat anti-rat IgM, clon MARM-4 de Immunotech, Marsella, França) durant 30 minuts protegint-ho de la llum. Després de muntar-ho amb medi de muntatge per fluorescència ho vam observar al microscopi de fluorescència.

3.15 METODOLOGIA ESTADÍSTICA.

L'anàlisi estadística s'ha fet amb el paquet estadístic SPSS versió 10.0.

Totes les dades s'han expressat com a mediana. Per tal de veure si existien diferències entre grups es va utilitzar el test de Kruskal Wallis, que es va considerar positiu amb $p < 0,05$. Tots els paràmetres que presentaven diferències entre grups aplicant aquest test es van analitzar amb el test no paramètric per dues mostres independents U de Mann Withney, igual que l'anterior vam considerar que presentaven diferències estadísticament significatives quan la $p < 0,05$.