

## **4.RESULTATS**



## 4.1 RESULTATS DE L'ESTUDI 1.

Mitjançant la pauta immunosupressora administrada en aquest estudi, Micofenolat Mofetil i Tacrolimus, hem aconseguit supervivències de fins a 100 dies en combinacions d'al·lotrasplantament i de xenotrasplantament tal i com havíem previst en el plantejament de l'estudi. Cal remarcar que la idea inicial de l'estudi era dur a terme tots els grups d'al·lotrasplantament amb la mateixa combinació de soques. En el grup 5, rates al·lotrasplantades amb la combinació de soques de Dark Agoutí a Lewis sacrificades als 30 dies, vam observar alguns problemes d'icterícia i algun empelt tenia alguna zona de l'empelt necròtic tot i que la resta de l'empelt no mostrava signes de rebuig. Al iniciar el grup de 100 dies vam comprovar que amb aquesta combinació de soques amb el tractament immunosupressor administrat no aconseguíem frenar l'aparició del rebuig. Ens vam plantejar dues alternatives o bé canviar la combinació de soques o bé canviar el tractament immunosupressor. Donat que en els grups de xenotrasplantament no estàvem experimentant cap tipus de problema i era el centre del nostre estudi vam decidir de canviar a una combinació de soques menys agressiva, la combinació Brown Norway–Lewis i continuar

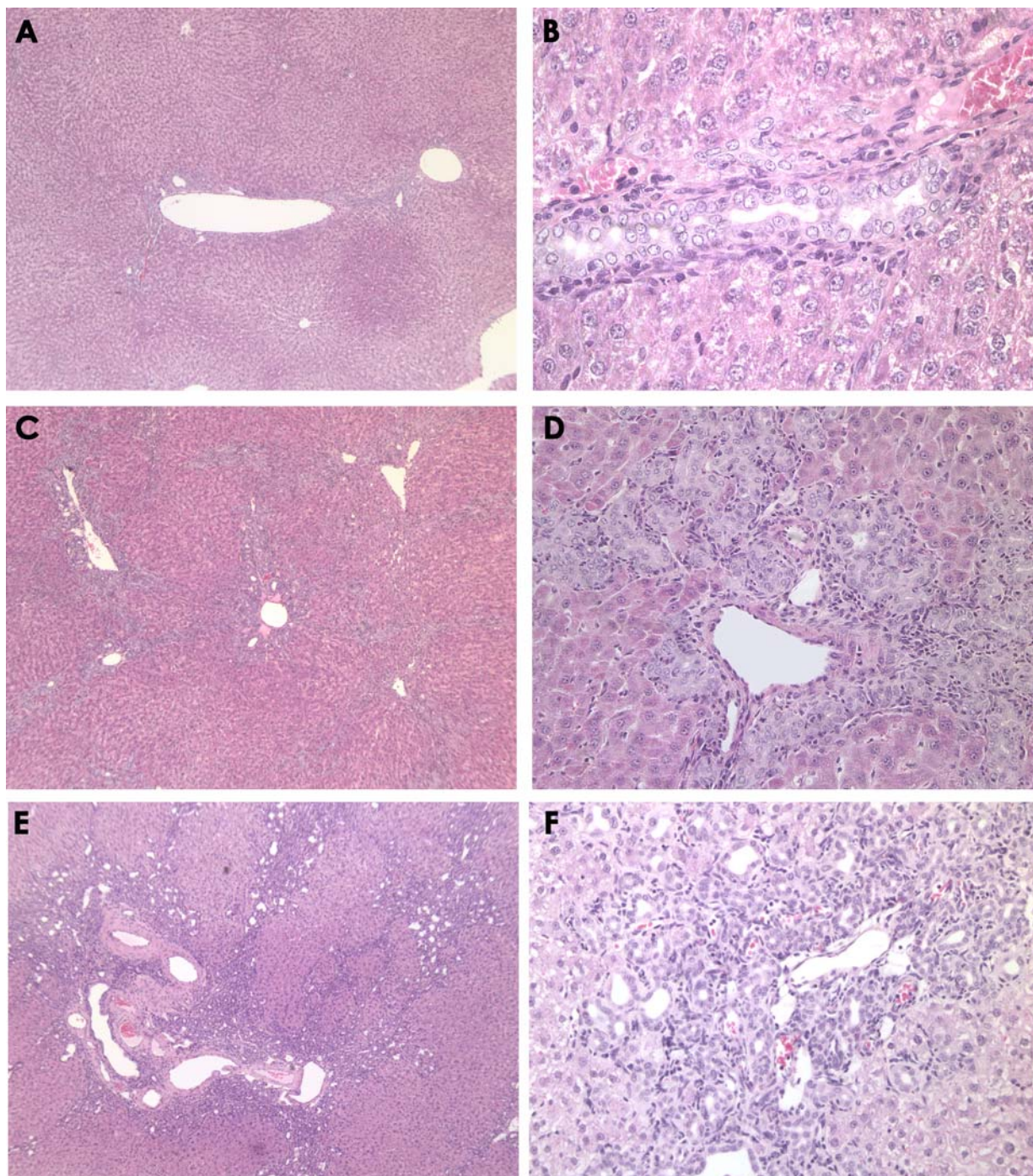
administrant la mateixa pauta immunosupressora, que va ser suficient per aconseguir supervivències de 100 dies.

### 4.1.1 Estudi histològic.

Mitjançant la tinció d'hematoxilina-eosina vam poder comprovar l'estat de l'empelt de cadascun dels grups de l'estudi. Als grups d'al·lotrasplantament (figura 30) vam observar com al dia 7 postrasplantament els empelts presentaven un aspecte pràcticament normal, sense infiltrats inflamatoris als espais porta ni al lobulet hepàtic, sense dany ductal ni endotelitis. No s'observà dilatació ni congestió sinusoidal. Únicament presentaven una proliferació colangiolar periportal lleu que no desestructurava el parènquima. Al grup d'al·lotrasplantament als 30 dies el canvi que s'observava era proliferació colangiolar moderada, acompanyada d'un increment de la fibrosis i d'un inici de desestructuració del parènquima hepàtic. En canvi al grup 6, als 100 dies postrasplantament, la proliferació colangiolar va augmentar considerablement podent-se valorar com a severa acompanyada per fibrosi i fent-se evident una desestructuració del parènquima. No s'observava colestasis canalicular ni lesions dels ductes biliars primaris.

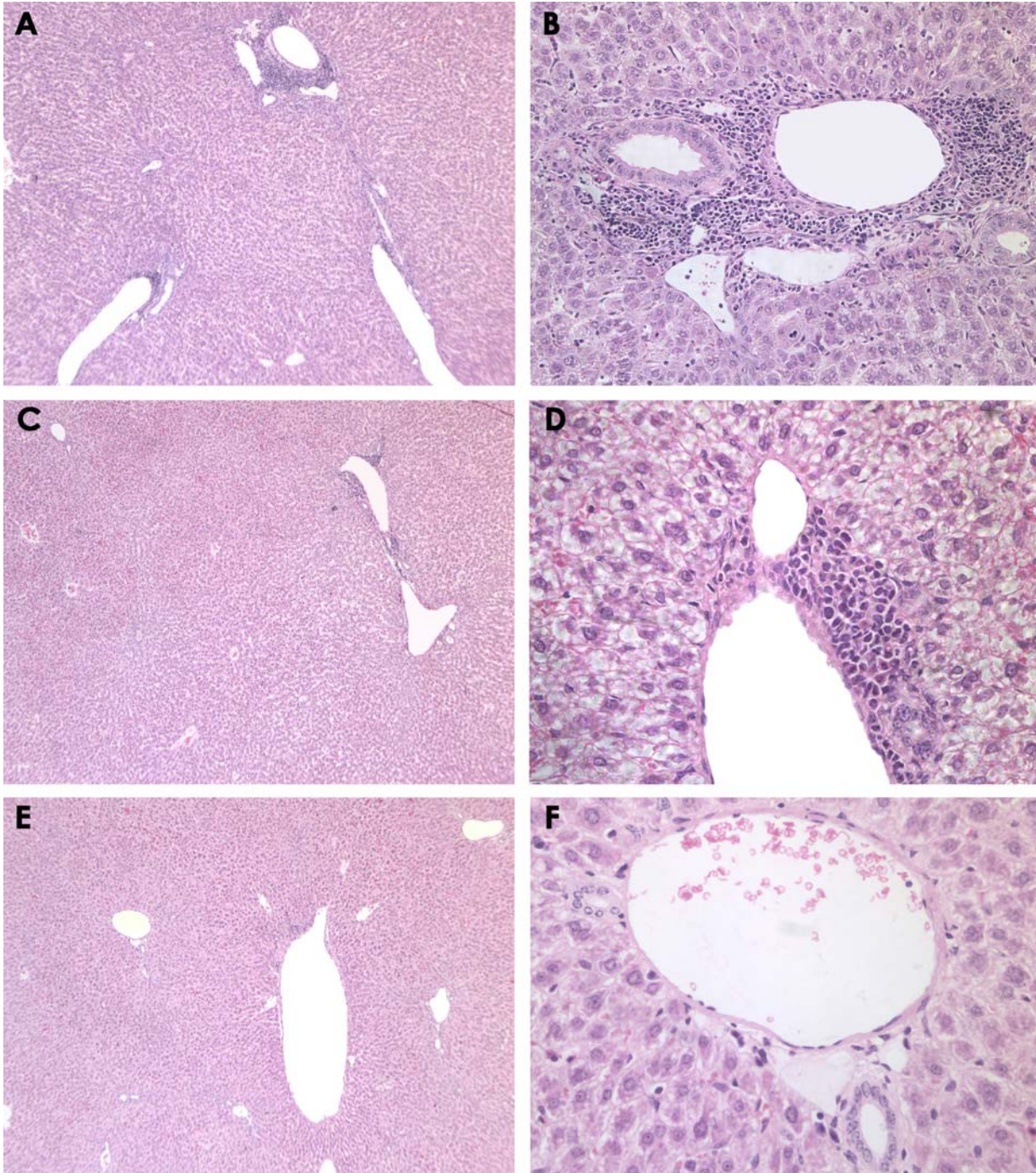
En referència als grups de xenotrasplantament (figura 31) no s'observà en cap cas endotelitis a les venes portals ni centrolobulillars ni lesions als conductes biliars primaris. No es van identificar lesions d'isquèmia. Al grup 7 calia destacar un infiltrat inflamatori per cèl·lules mononucleades moderat en la majoria dels espais porta sense sobrepasar la seva àrea limitant. Estava constituït per limfòcits activats i per limfòcits madurs, sense cèl·lules polimorfonucleades ni cèl·lules plasmàtiques. Els limfòcits activats és caracteritzen per ser més grans, amb la cromatina laxa i amb un o més nucleols clarament visibles. Aquest infiltrat es veié disminuït als 30 dies postrasplantament. Als 100 dies el parènquima presenta un aspecte totalment conservat, només en destacàvem proliferació colangiolar lleu i infiltrat molt lleuger per limfòcits no activats, que presenten un nucli amb la cromatina condensada i per tant són més petits i amb un color blau més intens.

Figura 30: Mostra l'estat dels al·loempelts als diferents dies posttrasplantament: als 7 dies presenten un estat conservat i s'inicia la proliferació colangiolar (A: 50x; B: 650x); als 30 dies, s'observa un increment de la proliferació colangiolar (C: 50x, D: 200x); als 100 dies hi ha una abundant proliferació colangiolar arribant a desestructurar el parènquima (E: 50x, F: 200x).



#### 4. Resultats

Figura 31: Mostra l'estat dels xenoempelts als diferents dies postrasplantament: als 7 dies postrasplantament observem el parènquima hepàtic molt ben conservat i només en destaquem infiltrats moderats als espais porta (A: 50x, B: 200x), progressivament els infiltrats van disminuint arribant a ser molt reduïts al dia 100 postrasplantament. El parènquima continua molt ben preservat. (30 dies: C, 50x; D, 400x; 100 dies: E: 50x; F: 400x).



### 4.1.2 Proves de funció hepàtica.

La majoria de les determinacions de transaminases, AST i ALT, mesurades a diferents dies postrasplantament (taula 2) es trobaren dins el rang de valors normals en rata malgrat que en vam poder observar alguns, dels grups d'al·lotrasplantament, un mica més alts però en cap cas es van considerar indicadors d'una disfunció hepàtica si tenim en compte que el rang de valors normals de transaminases en rata i hámster que vam obtenir al nostre laboratori són els que podem observar a la taula següent (taula 1):

Taula 1: Nivells sèrics de transaminases i albúmina de rates Lewis i Hámsters control. Valors expressats en medianes. Unitats de ALT i AST: UI/l i de l'albúmina g/l.

|                        | ALT     | AST       | Albúmina |
|------------------------|---------|-----------|----------|
| <b>Rata control</b>    | 45 - 57 | 93 - 131  | 36-42    |
| <b>Hámster control</b> | 100-117 | 115 - 220 | 33-37    |

Taula 2: Nivells sèrics de transaminases, ALT i AST, dels grups d'al·lotrasplantament i xenotrasplantament. Valors expressats en medianes. Unitats de ALT i AST: UI/l.

|                     | Al·lotrasplantament |         |          | Xenotrasplantament |         |          |
|---------------------|---------------------|---------|----------|--------------------|---------|----------|
|                     | 7 dies              | 30 dies | 100 dies | 7 dies             | 30 dies | 100 dies |
| <b>ALT dia 0</b>    | 43                  | 46,5    | 44       | 48                 | 49,5    | 40,5     |
| <b>ALT dia +7</b>   | 63,5                | 157,5   | 23       | 43                 | 40      | 63       |
| <b>ALT dia +15</b>  | -                   | 42      | 52       | -                  | 51,5    | 58,5     |
| <b>ALT dia +30</b>  | -                   | 48      | 51       | -                  | 62      | 68       |
| <b>ALT dia +50</b>  | -                   | -       | 42       | -                  | -       | 75,5     |
| <b>ALT dia +75</b>  | -                   | -       | 32       | -                  | -       | 72       |
| <b>ALT dia +100</b> | -                   | -       | 22,5     | -                  | -       | 35       |
| <b>AST dia 0</b>    | 81                  | 75      | 79       | 84                 | 87      | 82,5     |
| <b>AST dia +7</b>   | 142,5               | 235     | 76       | 113,5              | 120     | 91,5     |
| <b>AST dia +15</b>  | -                   | 199     | 136      | -                  | 128     | 109      |
| <b>AST dia +30</b>  | -                   | 143     | 224      | -                  | 100     | 148      |
| <b>AST dia +50</b>  | -                   | -       | 186      | -                  | -       | 94,5     |
| <b>AST dia +75</b>  | -                   | -       | 173,5    | -                  | -       | 115      |
| <b>AST dia +100</b> | -                   | -       | 80       | -                  | -       | 58       |

D'altra banda s'observaren els nivells sèrics d'albumina (g/l), que eren en tots els casos, significativament inferiors als valors del grup de rates Lewis control amb immunosupressió i que els de hamster normal tal i com ho podem observar a la taula 3. Cal remarcar que eren valors estables, fet que ens feu descartar una disfunció hepàtica. Aquesta disminució era més acusada en els grups de xenotrasplantament i es reflectia en les diferències estadístiques que es van trobar.

Taula 3: Nivells sèrics d'albumina dels grups d'al·lotrasplantament i xenotrasplantament, expressat amb la mediana de cada grup, unitats: g/l.

|                          | Al·lotrasplantament |          |           | Xenotrasplantament |          |           |
|--------------------------|---------------------|----------|-----------|--------------------|----------|-----------|
|                          | 7 dies*             | 30 dies* | 100 dies* | 7 dies*            | 30 dies* | 100 dies* |
| <b>Albumina dia 0</b>    | 43,5                | 42       | 43        | 42                 | 41,5     | 44        |
| <b>Albumina dia +7</b>   | 32,5                | 34       | 33        | 24*                | 30**     | 27,5***   |
| <b>Albumina dia +15</b>  | -                   | 30       | 35        | -                  | 27**     | 26***     |
| <b>Albumina dia +30</b>  | -                   | 22,5     | 37        | -                  | 23       | 26***     |
| <b>Albumina dia +50</b>  | -                   | -        | 35        | -                  | -        | 24,5***   |
| <b>Albumina dia +75</b>  | -                   | -        | 34        | -                  | -        | 26***     |
| <b>Albumina dia +100</b> | -                   | -        | 30        | -                  | -        | 23***     |

Test estadístic: U Mat-Whitney

\*p<0,05 tots els grups respecte els control amb immunosupressió

\*p<0,05 Al·lo 7 dies vs Xeno 7 dies

\*\*p<0,05 Al·lo 30 dies vs Xeno 30 dies

\*\*\*p<0,05 Al·lo 100 dies vs Xeno 100 dies

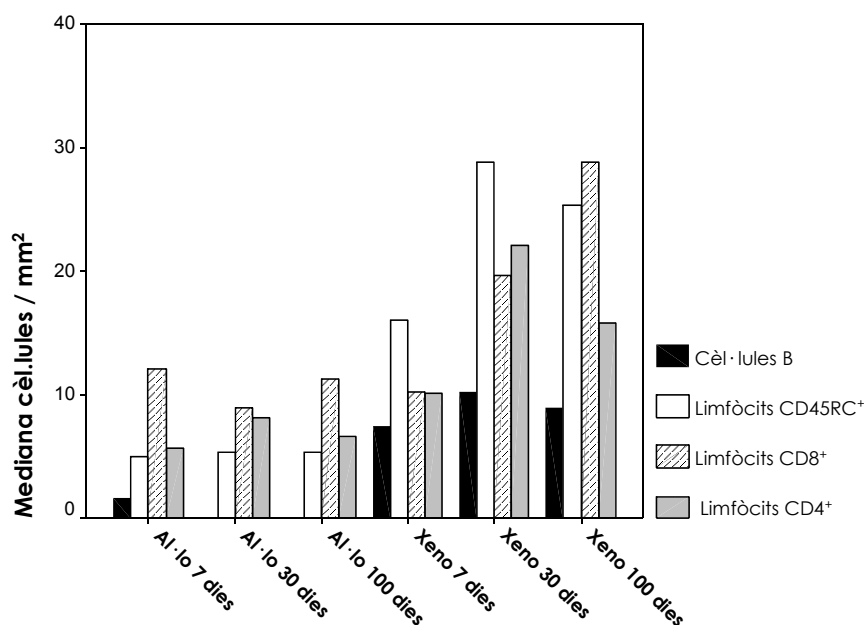
### 4.1.3 Estudi immunohistoquímic.

Per tal de valorar les tincions immunohistoquímiques vam diferenciar entre l'infiltrat limfocitari a la zona del parènquima hepàtic i als espais porta. Els resultats obtinguts de les tincions immunohistoquímiques els podem observar a la figura 32. En els grups control les mostres no presentaven cap tipus de marcatge limfocitari. En els grups d'al·lotrasplantament els infiltrats al parènquima hepàtic eren molt lleus i de morfologia pròpia de limfòcits inactivats, amb la cromatina condensada, i no presentaven diferències entre els tres grups en cap dels anticossos utilitzats (figures 32, 33 i 34). En els grups de xenotrasplantament els infiltrats al parènquima (figura 32) eren superiors als dels grups d'al·lotrasplantament, alguns estaven



activats i altres presentaven la morfologia típica de limfòcits inactivats. Presentaven més cèl·lules B i limfòcits CD45RC<sup>+</sup> que infiltraven al parènquima, que es van mantenir similars als tres grups de xenotrasplantament. La quantitat de cèl·lules CD8<sup>+</sup> incrementaren a mesura que passà el temps, als set dies del trasplantament tenien quantitats equivalents a les dels tres grups d'al·lotrasplantament i al dia 30 i 100 presentaven un increment estadísticament significatiu. Pel que fa als infiltrats de limfòcits CD4<sup>+</sup> eren significativament superiors als grups de xenotrasplantament que als d'al·lotrasplantament i els dies +30 i +100 la quantitat de cèl·lules d'aquesta subpoblació limfocitària era superior a les del dia +7 presentant diferències estadístiques. Cal remarcar que malgrat haver caracteritzat els limfòcits, la quantitat de cèl·lules infiltrants al parènquima eren molt poques; en estudis de rebuig es parla de quantitats de fins a 4000 cel/mm<sup>2</sup> als espais porta<sup>226</sup>. En els espais porta de les mostres del dia 7 i 30 postrasplantament, l'infiltrat limfocitària era moderat i lleu respectivament i observarem una disminució progressiva de la quantitat d'infiltrats sent pràcticament inexistent al dia 100 després de la intervenció quirúrgica. Tanmateix, en els espais portals no observarem un canvi en les proporcions de cadascun dels tipus de limfòcits valorats: limfòcits T CD8<sup>+</sup>, limfòcits CD45RC<sup>+</sup>, limfòcits CD4<sup>+</sup> i cèl·lules B (figura 35).

Figura 32: Mediana dels diferents subtipus d'infiltrats limfocitaris al parènquima hepàtic expressat en cèl·lules/mm<sup>2</sup>.



#### 4. Resultats

---

Figura 33: Marcatge de diferents subpoblacions limfocitàries infiltrants als al·loempelts(x100). Limfòcits CD45RC+: A, 7 dies postrasplantament; B, 30 dies postrasplantament. Cèl·lules CD8+: C, 7 dies postrasplantament; D, 30 dies postrasplantament. Cèl·lules CD4+: E, 7 dies postrasplantament; F, 30 dies postrasplantament.

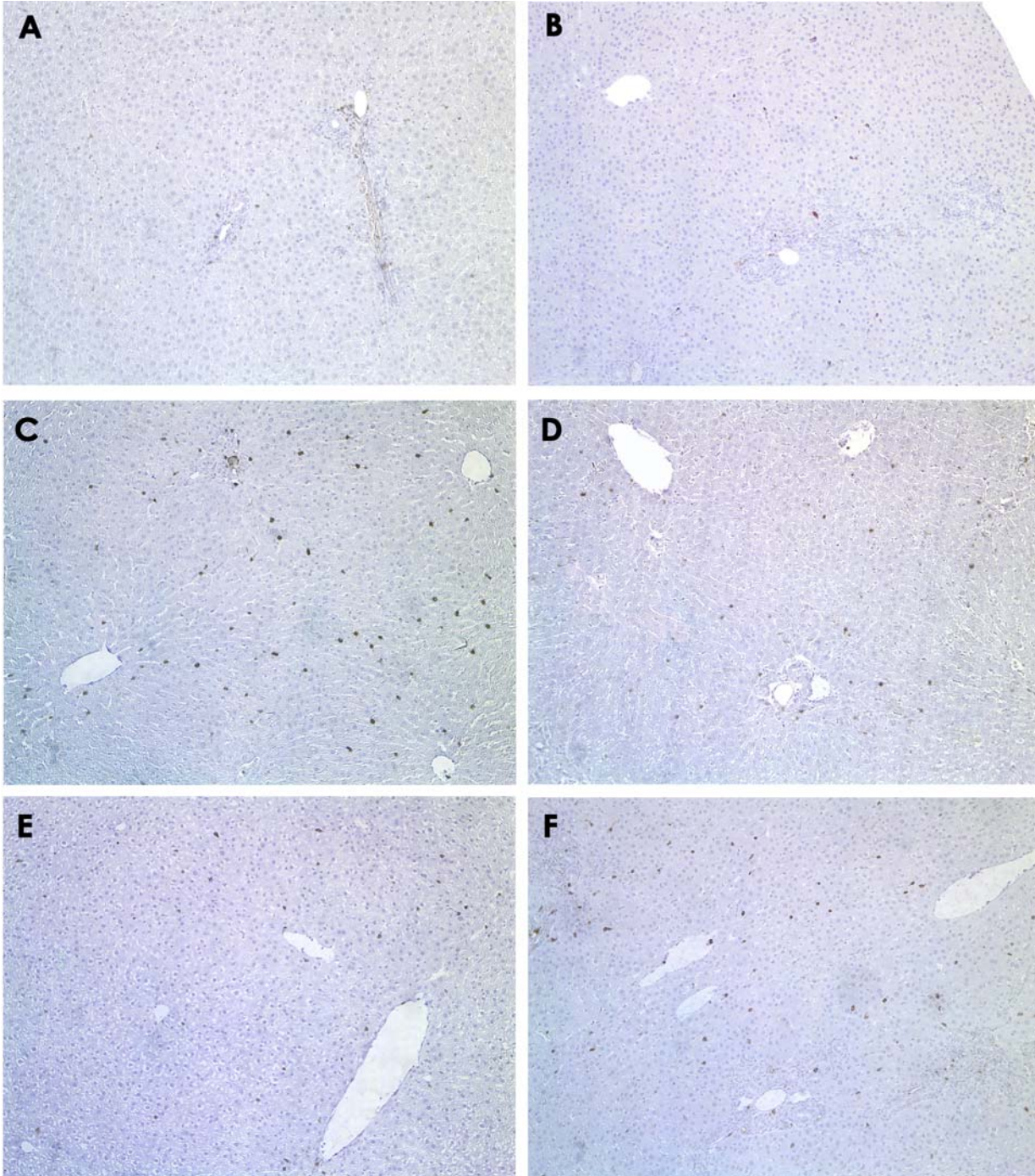
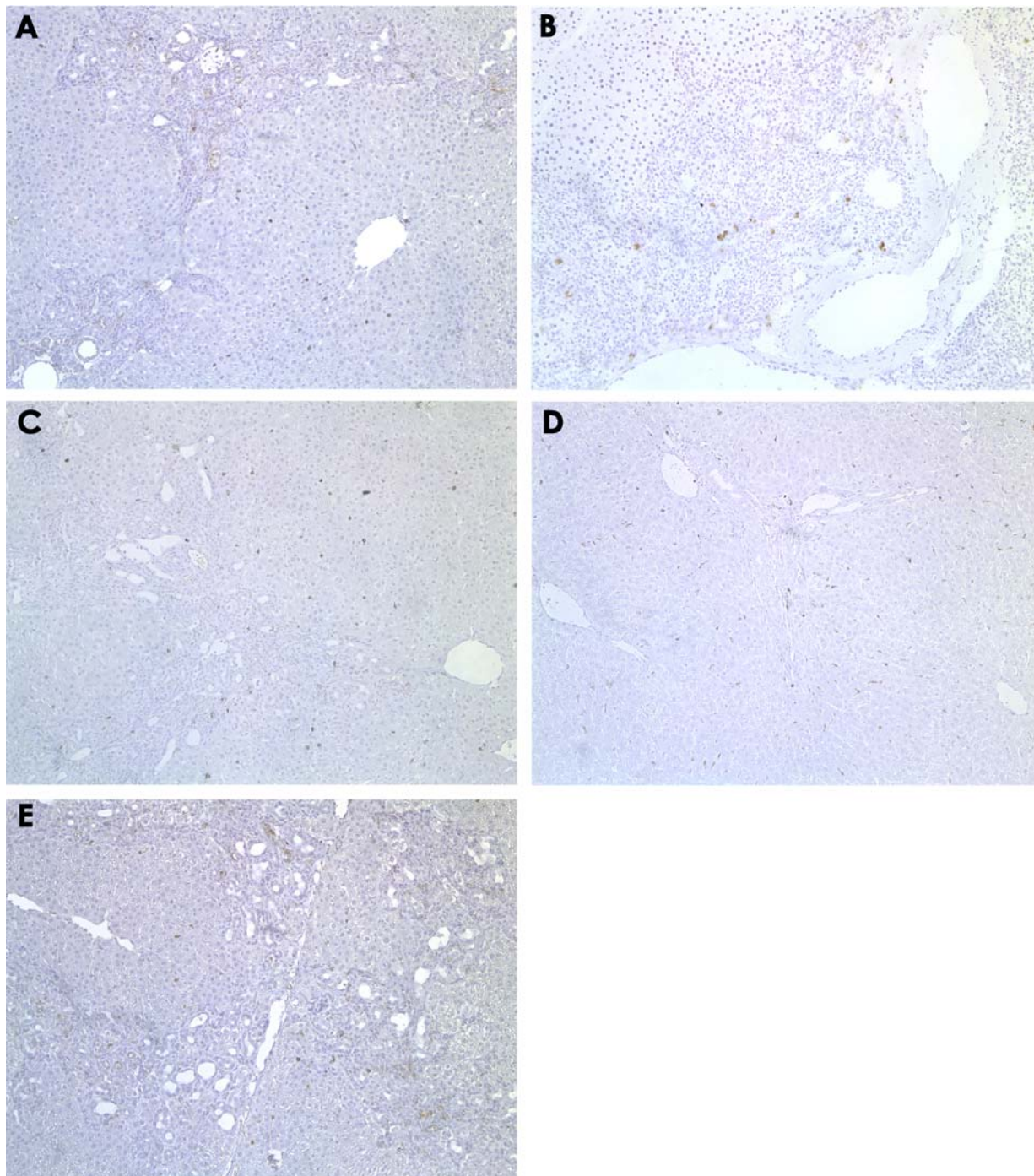
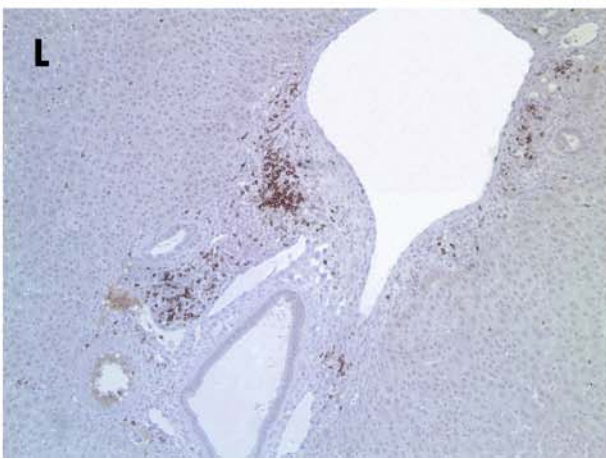
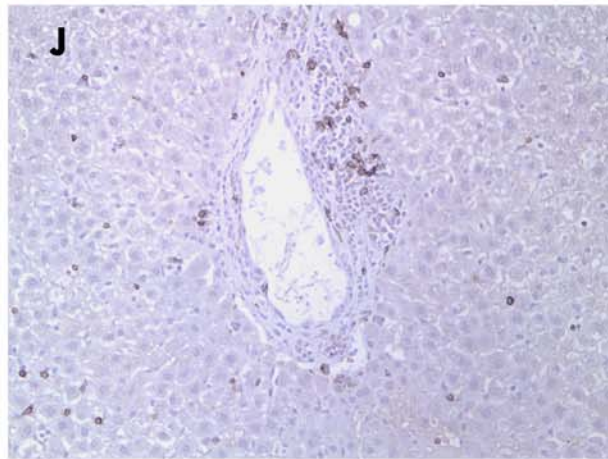
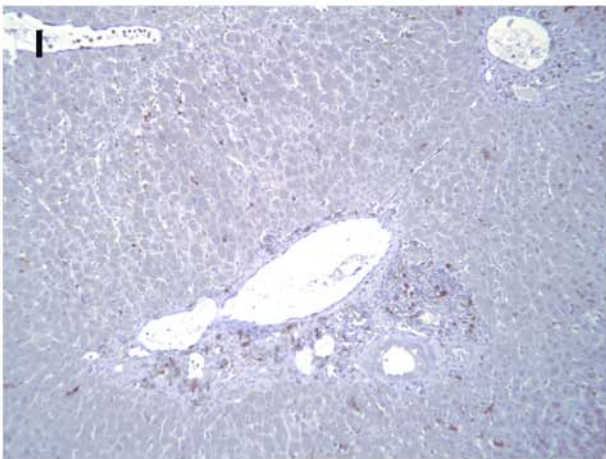
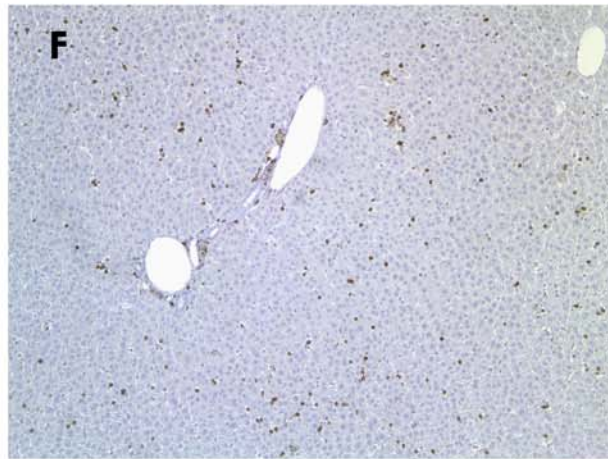
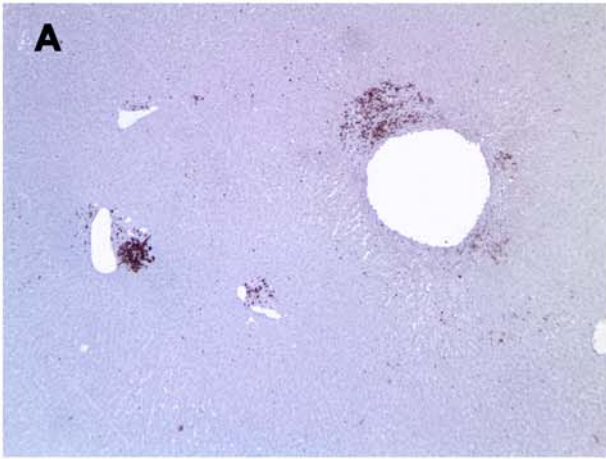


Figura 34: Marcatge de diferents subpoblacions limfocitàries infiltrants als al·loempelts (x100). A, Limfòcits CD45RC+; B, Cèl·lules NK; C, Cèl·lules CD8+. D, Macròfags ED1+; E, Cèl·lules CD4+.





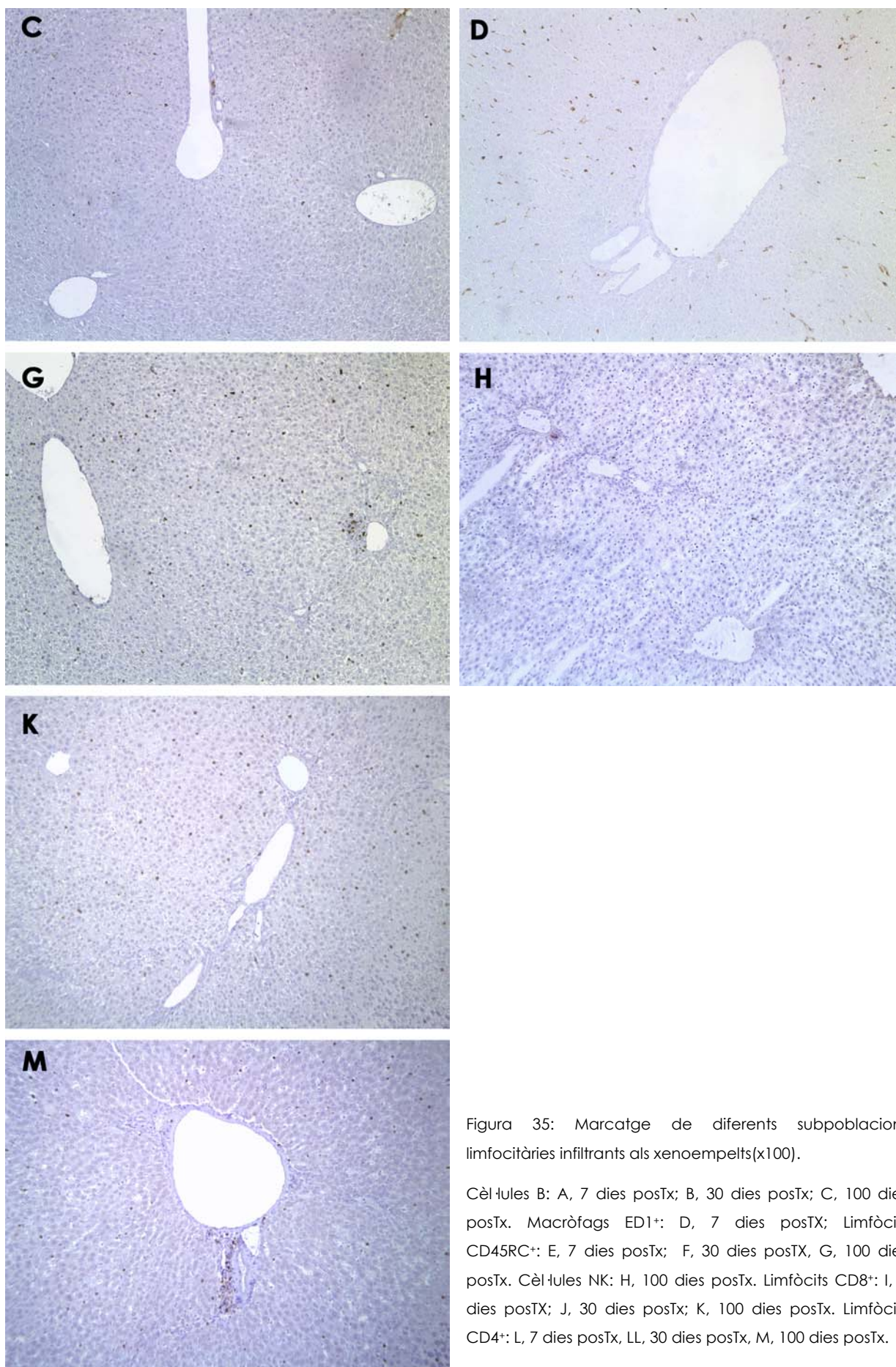


Figura 35: Marcatge de diferents subpoblacions limfocitàries infiltrants als xenoempelts(x100).

Cèl·lules B: A, 7 dies postTx; B, 30 dies postTx; C, 100 dies postTx. Macròfags ED1+: D, 7 dies postTx; Limfòcits CD45RC+: E, 7 dies postTx; F, 30 dies postTx, G, 100 dies postTx. Cèl·lules NK: H, 100 dies postTx. Limfòcits CD8+: I, 7 dies postTx; J, 30 dies postTx; K, 100 dies postTx. Limfòcits CD4+: L, 7 dies postTx, LL, 30 dies postTx, M, 100 dies postTx.

#### 4.1.4 Subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica.

L'estudi de les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica que hem realitzat mitjançant citometria de flux i marcatge triple ens permet valorar les diferents subpoblacions de cèl·lules T però no ens permet diferenciar entre la subpoblació de limfòcits B i de cèl·lules Natural Killer (NK). Les cèl·lules NK han estat relacionades amb el rebuig xenogènic entre espècies discordants<sup>32</sup> i en combinacions concordants utilitzant rates atímiques<sup>55</sup>; en estudis realitzats pel nostre grup<sup>59</sup> i en altres duts a terme per altres autors, tant en situacions de rebuig com en situacions estables, no hem observat la presència de cèl·lules NK en l'infiltrat dels xenoempelts hepàtics; S. Brouard et al. en xenotrasplantament cardíac amb la mateixa combinació, va descriure que la proporció de cèl·lules NK que participaven en aquest model era reduïda<sup>65,227</sup>. Així doncs pensem que la proporció de cèl·lules NK que queden dins d'aquest compartiment són poques.

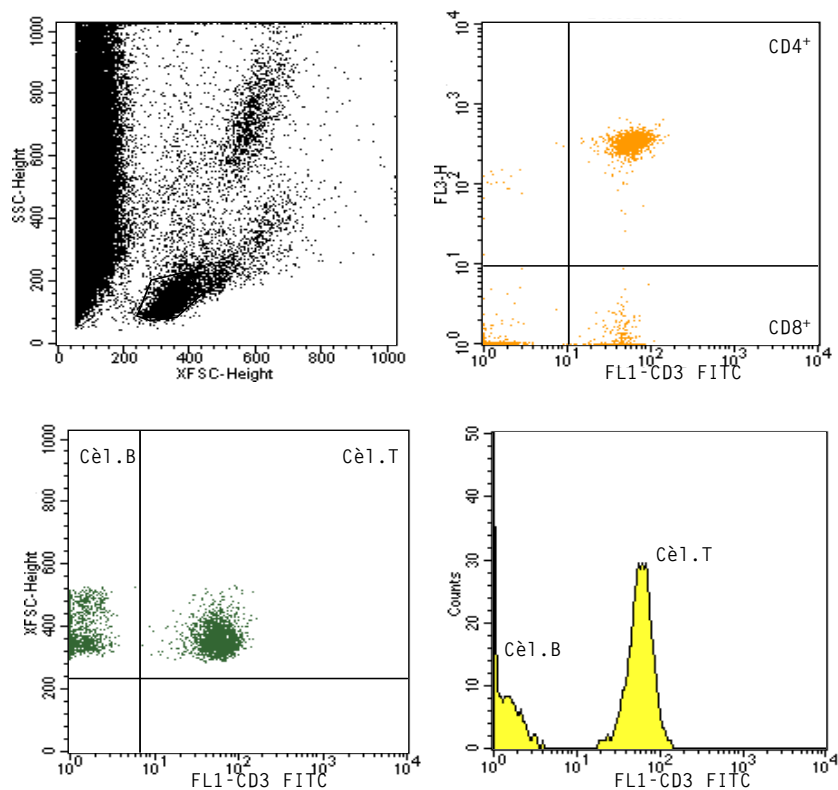
Els resultats obtinguts ens mostraren com la immunosupressió administrada produïa canvis estadísticament significatius en la proporció de limfòcits T CD8<sup>+</sup> (taula 4). Com a conseqüència observàrem una de limfòcits CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> significativament superior que el de les rates control sense immunosupressió (figura 36). Per aquest motiu es van fer la resta de comparacions dels diferents grups respecte aquest grup control amb immunosupressió.

Taula 4 : Mediana dels resultats obtinguts de les mostres dels grups controls amb i sense immunosupressió.

|  | % CD3 <sup>+</sup> | % CD4 <sup>+</sup> | % CD8 <sup>+</sup> | % Cel B i NK | CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------|------------------------------------|
| <b>Rates Lewis control</b>                     | 66                 | 49                 | 19                 | 34           | 2,7                                |
| <b>Rates Lewis control amb immunosupressió</b> | 65                 | 50,5               | 14,5*              | 35           | 3,4*                               |

\*p<0,05, test estadístic: U Mann-Whitney

Figura 36: Representació gràfica de les subpoblacions limfocitàries obtinguda per citometria de flux d'una rata del grup control sense immunosupressió.



No vam observar diferències estadístiques en cap dels tres grups d'al·lotrasplantament hepàtic ortotòpic comparant-los amb el grup control amb immunosupressió (taula 5) tot i que el grup de 100 dies postrasplantament presentava una acusada tendència a un augment de cèl·lules B i NK (35% vs 61% de mediana) en detriment de la proporció de limfòcits T (65% vs 39% de mediana). En relació als limfòcits T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> s'observaren canvis en les seves proporcions sense arribar a ser significatius tal i com ho podem observar a la taula 5. Comparant els tres punts de l'estudi entre ells (7, 30 i 100 dies), dels grups d'al·lotrasplantament, no vam observar diferències estadísticament significatives (figures 37, 38 i 39).

En els grups de xenotrasplantament vam poder observar un comportament diferent. El grup de 7 dies després del trasplantament presentava diferències significatives respecte les

rates control amb immunosupressió en les proporcions de les diferents subpoblacions; va disminuir la proporció de cèl·lules B i NK i va incrementar la proporció de cèl·lules T i dins d'aquestes segones també van canviar les proporcions de cèl·lules CD4<sup>+</sup> i de les cèl·lules CD8<sup>+</sup> (figura 37). El grup de 30 dies recuperà proporcions molt similars a les del grup 2 (figura 38). El grup d'estudi als 100 dies del trasplantament presentava un altre cop diferències significatives en totes les subpoblacions estudiades en relació al grup control amb immunosupressió, però aquest grup mostrava unes proporcions totalment inverses a les observades el dia 7 postrasplantament (figura 39). Així doncs la subpoblació de limfòcits B havia incrementat considerablement en detriment dels limfòcits T en relació als controls immunosuprimits. Les dues subpoblacions de cèl·lules T també presentaven proporcions diferents, mostrant una disminució tant de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> com de cèl·lules T CD8<sup>+</sup>. Així doncs observarem que els grups de xenotrasplantament presentaven característiques molt diferents a cada punt de l'estudi: als primers dies postrasplantament hi havia un increment de cèl·lules T que progressivament va anar disminuint, arribant-se a invertir les proporcions de limfòcits B-NK i cèl·lules T als 100 dies de la intervenció.

Taula 5: mediana del % de les diferents subpoblacions limfocitàries presents en sang perifèrica:

|                       | % Limf. B-NK       | % Limf. T          | %Limf.TCD4 <sup>+</sup> | % Limf.T CD8 <sup>+</sup> | Ratio CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|---------------------------|--|
| <b>Ctrl immunosup</b> | 35                 | 65                 | 50,5                    | 14,5                      | 3,4                                      |
| <b>Al lo 7 dies</b>   | 28 <sup>#</sup>    | 72                 | 52,5                    | 19                        | 2,8                                      |
| <b>Al lo 30 dies</b>  | 29                 | 71                 | 54                      | 16                        | 3  |
| <b>Al lo 100 dies</b> | 61                 | 39                 | 30                      | 9                         | 3,3                                      |
| <b>Xeno 7 dies</b>    | 20 <sup>‡</sup>    | 80 <sup>‡</sup>    | 62,5 <sup>‡</sup>       | 16,5 <sup>‡</sup>         | 3,7                                      |
| <b>Xeno 30 dies</b>   | 39 <sup>**</sup>   | 61 <sup>**</sup>   | 45 <sup>**</sup>        | 16                        | 3  |
| <b>Xeno 100 dies</b>  | 58 <sup>‡***</sup> | 42 <sup>‡***</sup> | 33 <sup>‡***</sup>      | 9 <sup>‡***</sup>         | 2,8                                      |

Test estadístic U de Mann-Whitney:

‡ p<0,05 respecte grup control amb immunosupressió.

\* p<0,05 Xeno 7 dies vs Xeno 30 dies.

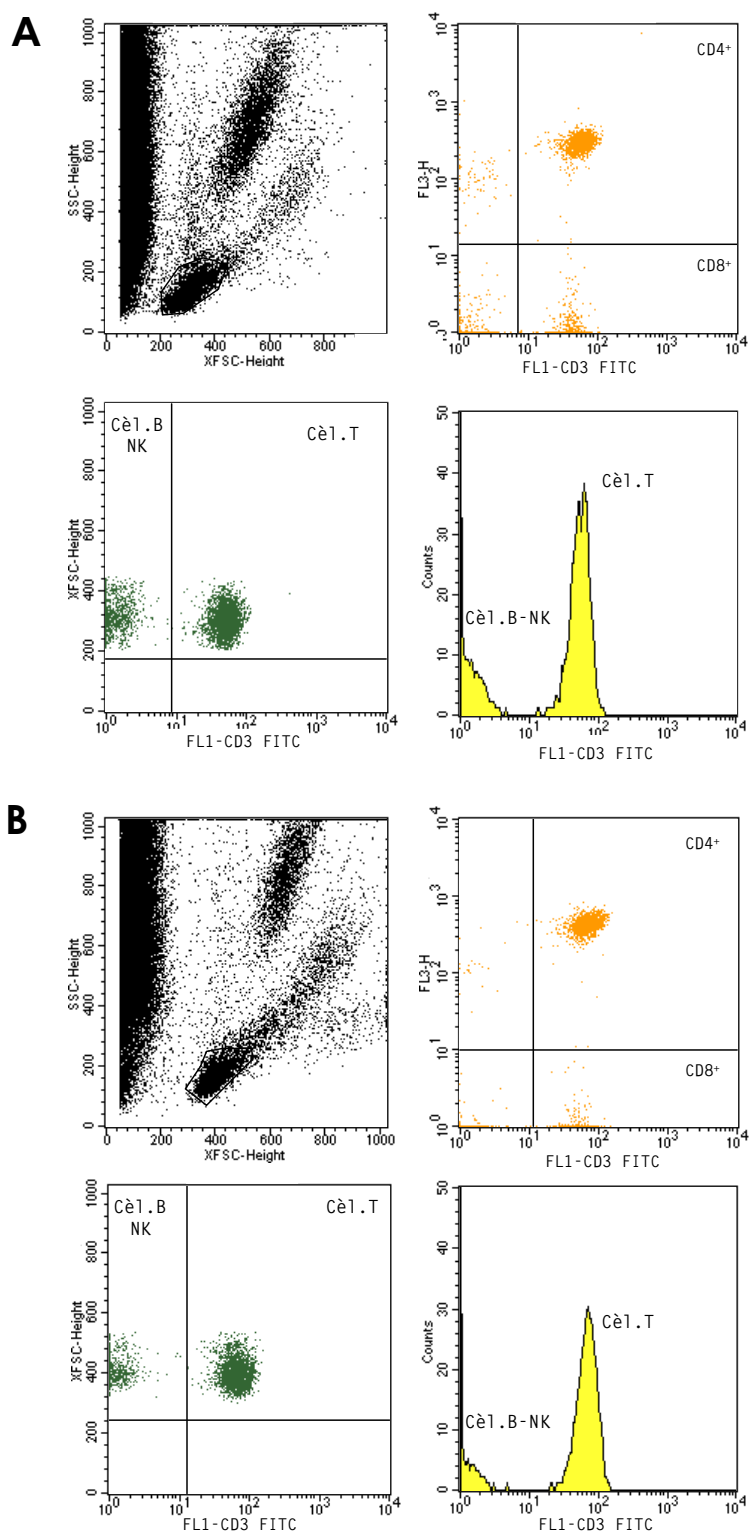
\*\* p<0,05 Xeno 30 dies vs Xeno 100 dies.

\*\*\* p<0,05 Xeno 7 dies vs Xeno 100 dies.

# p<0,05 Al-lo 7 dies vs Xeno 7 dies.



Figura 37: Representació gràfica de les subpoblacions limfocitàries obtinguda per citometria de flux als 7 dies posttrasplantament. A: rata al·lotrasplantada. B: rata xenotrasplantada.



## 4. Resultats

Figura 38: Representació gràfica de les sub poblacions limfocitàries obtinguda per citometria de flux als 30 dies posttrasplantament. A: rata al·logranteda. B: rata xenotranteda.

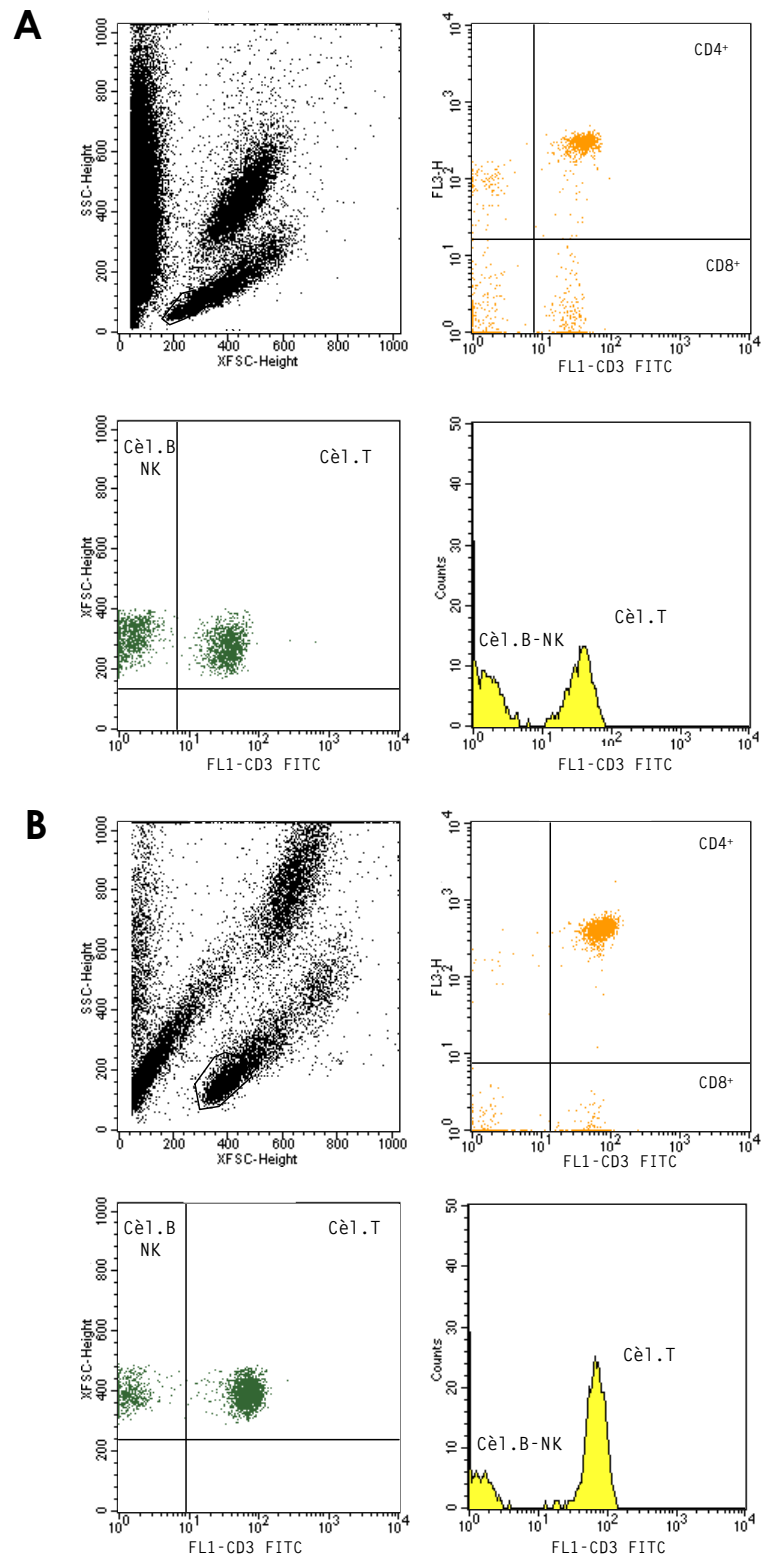
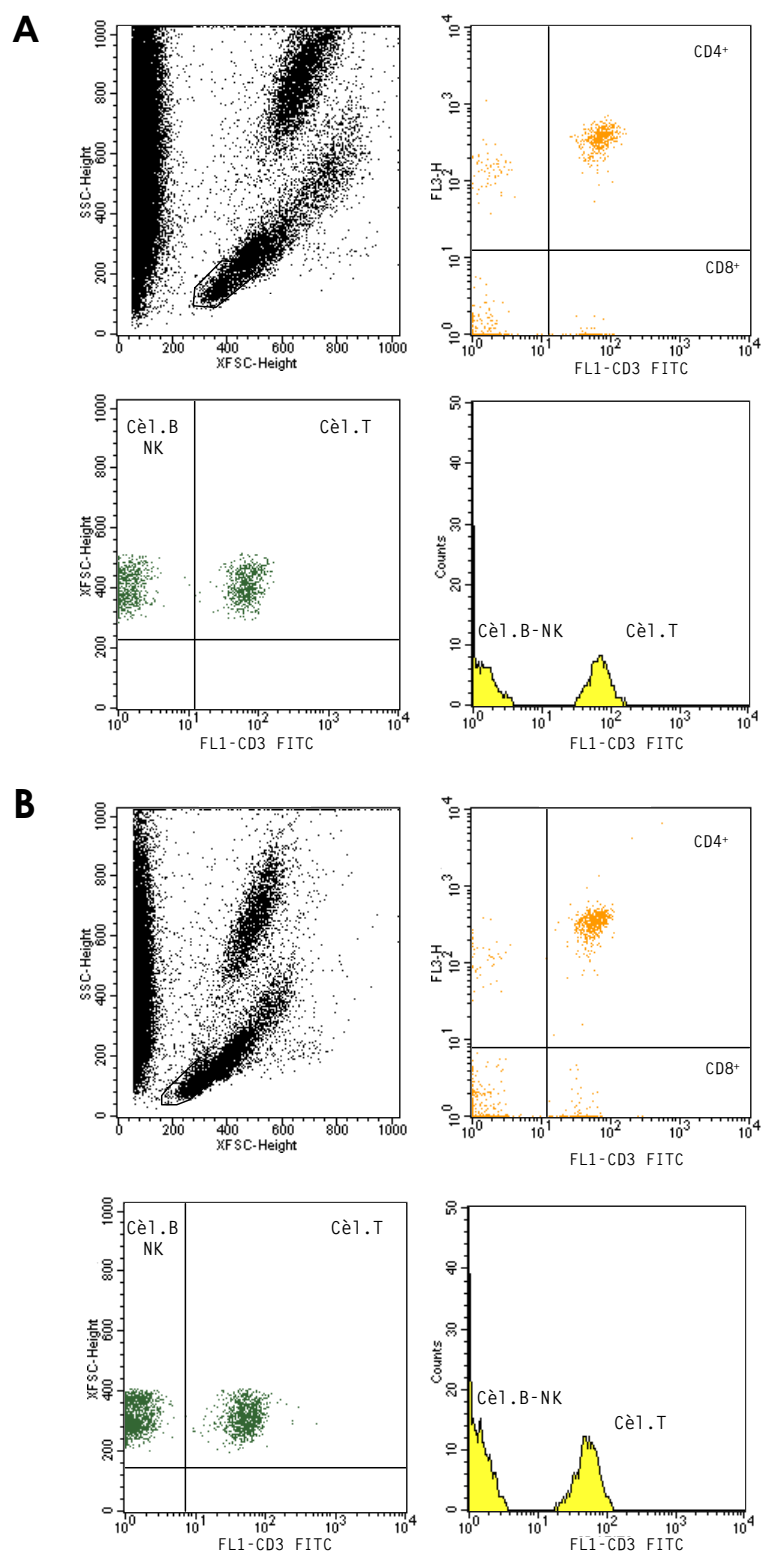


Figura 39: Representació gràfica de les subpoblacions limfocitàries obtinguda per citometria de flux als 100 dies posttrasplantament. A: rata al·lotrasplantada. B: rata xenotrasplantada.



Els resultats dels hemogrames ens mostraren uns valors de limfòcits sense diferències significatives entre els diferents grups de l'estudi. Aquest fet ens va portar a poder extrapolar que les diferències trobades en la valoració de les proporcions de cada subpoblació limfocitària es van convertir en diferències dels valors absoluts dels diferents tipus de limfòcits.

Amb la utilització dels valors de limfòcits totals obtinguts amb la realització dels hemogrames vàrem obtenir els valors del nombre total de limfòcits de cadascuna de les diferents subpoblacions tal i com podem observar a la taula adjunta (taula 6). Amb els valors que hi són detallats podem veure un increment de cèl·lules B als 100 dies de la intervenció quirúrgica, tant en trasplantaments dins la mateixa espècie com en xenotrasplantament.

Taula 6: Mediana dels resultats del càlcul del número total de cèl·lules de cadascuna de les subpoblacions limfocitàries.

|                       | NºLimfòcits          | Limf. B-NK <sup>‡</sup>  | Limf. T              | Cèl.T CD4 <sup>+</sup> | Cèl.T CD8 <sup>+</sup> | Ratio CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> |
|-----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|--|
| <b>Ctrl immunsup</b>  | 33,9 10 <sup>8</sup> | 12,3 10 <sup>8</sup>     | 21,6 10 <sup>8</sup> | 16,7 10 <sup>8</sup>   | 4,91 10 <sup>8</sup>   | 3,40                                     |
| <b>Al·lo 7 dies</b>   | 22,1 10 <sup>8</sup> | 8,69 10 <sup>8</sup>     | 14,4 10 <sup>8</sup> | 10,6 10 <sup>8</sup>   | 3,82 10 <sup>8</sup>   | 2,83                                     |
| <b>Al·lo 30 dies</b>  | 20,5 10 <sup>8</sup> | 6,00 10 <sup>8</sup> **  | 16,8 10 <sup>8</sup> | 12,3 10 <sup>8</sup>   | 4,51 10 <sup>8</sup>   | 3  |
| <b>Al·lo 100 dies</b> | 50,4 10 <sup>8</sup> | 31,6 10 <sup>8</sup> *   | 24,1 10 <sup>8</sup> | 18,9 10 <sup>8</sup>   | 5,21 10 <sup>8</sup>   | 3  |
| <b>Xeno 7 dies</b>    | 26,5 10 <sup>8</sup> | 4,89 10 <sup>8</sup> *   | 21,6 10 <sup>8</sup> | 17,3 10 <sup>8</sup>   | 4,27 10 <sup>8</sup>   | 3,78                                     |
| <b>Xeno 30 dies</b>   | 27,0 10 <sup>8</sup> | 11,1 10 <sup>8</sup> *** | 16,2 10 <sup>8</sup> | 12,6 10 <sup>8</sup>   | 3,81 10 <sup>8</sup>   | 3,05                                     |
| <b>Xeno 100 dies</b>  | 44,9 10 <sup>8</sup> | 24,2 10 <sup>8</sup> *** | 20,7 10 <sup>8</sup> | 16,6 10 <sup>8</sup>   | 4,04 10 <sup>8</sup>   | 2,83                                     |

Test de Kruskal Wallis

‡p<0,05.

Test estadístic U Mann-Whitney:

\*\*p< 0,05 grup Al·lo 30 dies vs Al·lo 100 dies.

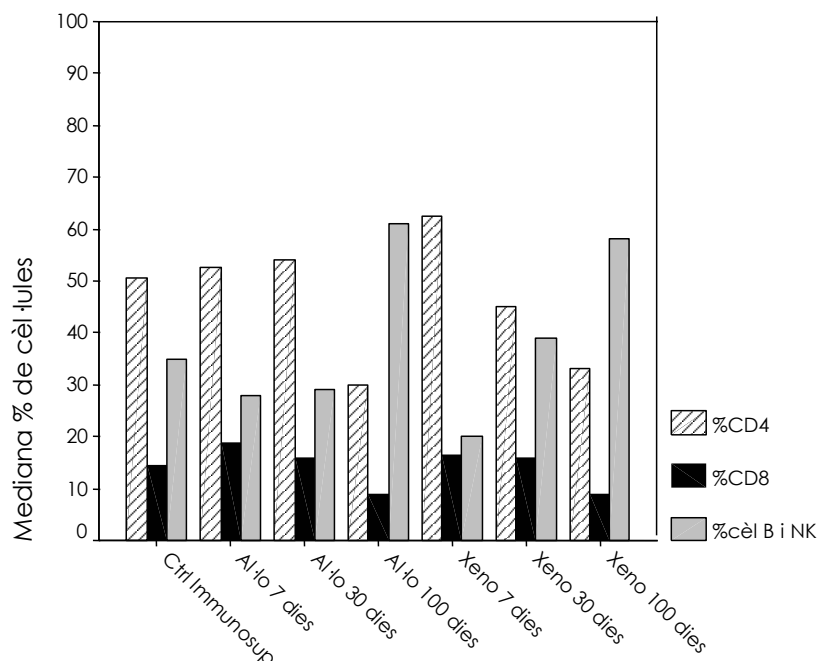
\*p< 0,05 grup xeno 7 dies vs xeno 30 dies.

\*\*p< 0,05 grup xeno 30 dies vs xeno 100 dies.

\*\*\*p< 0,05 grup xeno 7 dies vs xeno 100 dies.

\*p< 0,05 grup Al·lo 30 dies vs xeno 30 dies.

Figura 40: Mediana de les diferents subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica en grups d'al·lotrasplantament i xenotrasplantament.

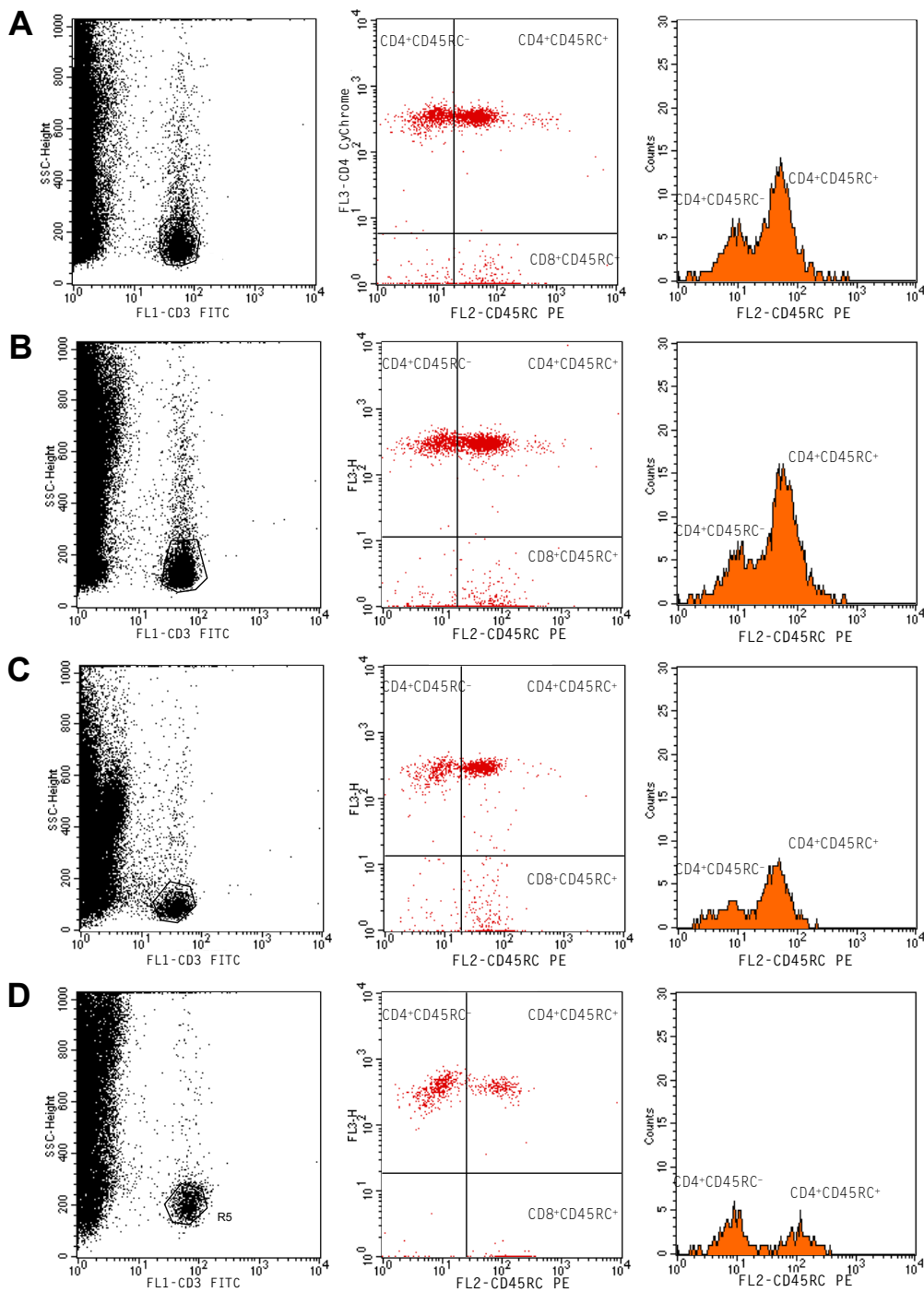


Amb la utilització de l'anticòs anti-rat CD45RC-PE vam poder valorar les subpoblacions de limfòcits T CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>+</sup> (Th1) i els limfòcits T CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>-</sup> (Th2). Comparant el grup de rates control sense immunosupressió amb les que en van rebre observàrem diferències significatives ( $p < 0,05$ ) en ambdues poblacions de cèl·lules, CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>+</sup>: 65,27% vs 70,44 % i en la subpoblació de CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>-</sup>: 36,11% vs 29,55% (taula 7). Així doncs, un cop més, vam fer les comparacions dels grups de trasplantament amb aquest segon grup amb immunosupressió.

Comparant el grup d'al·lotrasplantament als 100 dies amb el de rates control amb immunosupressió veiérem que les proporcions de les dues subpoblacions s'havien invertit totalment (figures 40, 41 i 43). Les proporcions de limfòcits CD4<sup>+</sup>Th1 i Th2 del grup de 100 dies posttrasplantament eren 38,1% i 61,9% respectivament (taules 7 i 8).

#### 4. Resultats

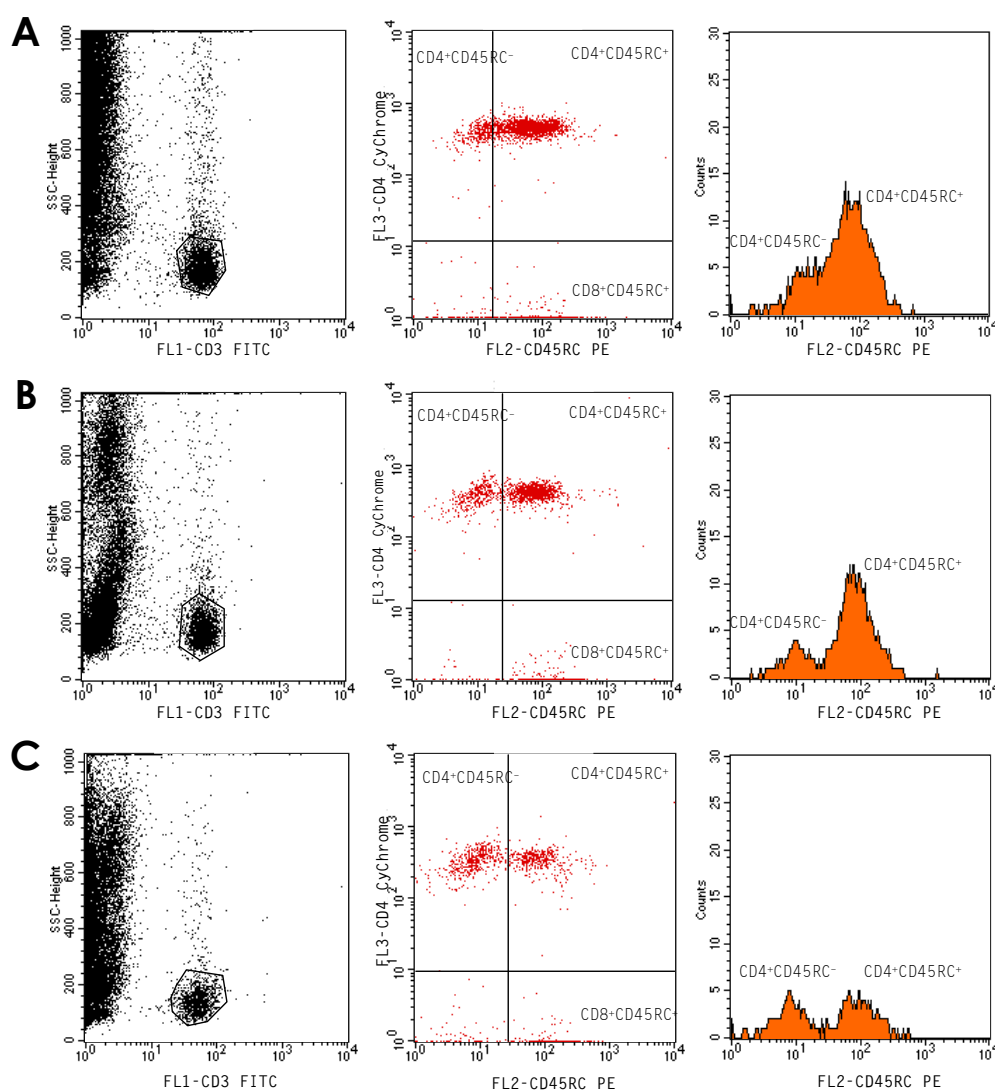
Figura 41: Representació gràfica de les subpoblacions limfocitàries CD45RC<sup>+</sup>/CD45RC<sup>-</sup> obtinguda per citometria de flux. A: rata control. Rates al·lotrasplantades, B: 7 dies postTx, C: 30 dies postTx, D: 100 dies postTx.



D'altra banda en el grup de xenotrasplantament als 100 dies, tal i com veiem a la taula adjunta (taula 7) i a les figures 42 i 43, presenten proporcions molt similars les dues subpoblacions i ambdós valors amb diferències estadísticament significatives respecte el grup control amb immunosupressió. Aquesta observació es va confirmar amb la obtenció dels valors absoluts calculats a partir dels valors de limfòcits obtinguts amb la realització dels

hemogrames (taula 8). Així doncs tant en al·lotrasplantament com en xenotrasplantament veïem que als 100 dies de la intervenció hi ha una davallada dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>+</sup> i un increment dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>-</sup>.

Figura 42: Representació gràfica de les subpoblacions limfocitàries CD45RC<sup>+</sup>/CD45RC<sup>-</sup> obtinguda per citometria de flux. Rates xenotrasplantades, A: 7 dies postTx, B: 30 dies postTx, C: 100 dies postTx.



#### 4. Resultats

Taula 7: Mediana del % de cèl·lules CD3 que són CD4<sup>+</sup> CD45 RC<sup>+</sup> o Th1 i CD4<sup>+</sup> CD45 RC<sup>-</sup> o Th2:

|                        | % CD4 <sup>+</sup> CD45RC <sup>+</sup> | % CD4 <sup>+</sup> CD45RC <sup>-</sup> | Ratio %CD4 <sup>+</sup> CD45RC <sup>+</sup> / %CD4 <sup>+</sup> CD45RC <sup>-</sup> |
|------------------------|--|--|---|
| <b>Ctrl immunosupr</b> | 70,4                                   | 29,5                                   | 0,42  |
| <b>Al·lo 7 dies</b>    | 67,3 <sup>#</sup>                      | 32,6 <sup>#</sup>                      | 0,48  |
| <b>Al·lo 30 dies</b>   | 74,3 <sup>##</sup>                     | 25,6 <sup>##</sup>                     | 0,34  |
| <b>Al·lo 100 dies</b>  | 38,1 <sup>*</sup>                      | 61,9 <sup>*</sup>                      | 0,82  |
| <b>Xeno 7 dies</b>     | 71,3                                   | 31,6                                   | 0,45  |
| <b>Xeno 30 dies</b>    | 77,82 <sup>*</sup>                     | 22,1 <sup>**</sup>                     | 0,28 <sup>*</sup>   |
| <b>Xeno 100 dies</b>   | 54,4 <sup>***</sup>                    | 45,4 <sup>***</sup>                    | 0,83 <sup>***</sup>   |

Test estadístic U Mann Whitney:

\* p<0,05 respecte grup control amb immunosupressió

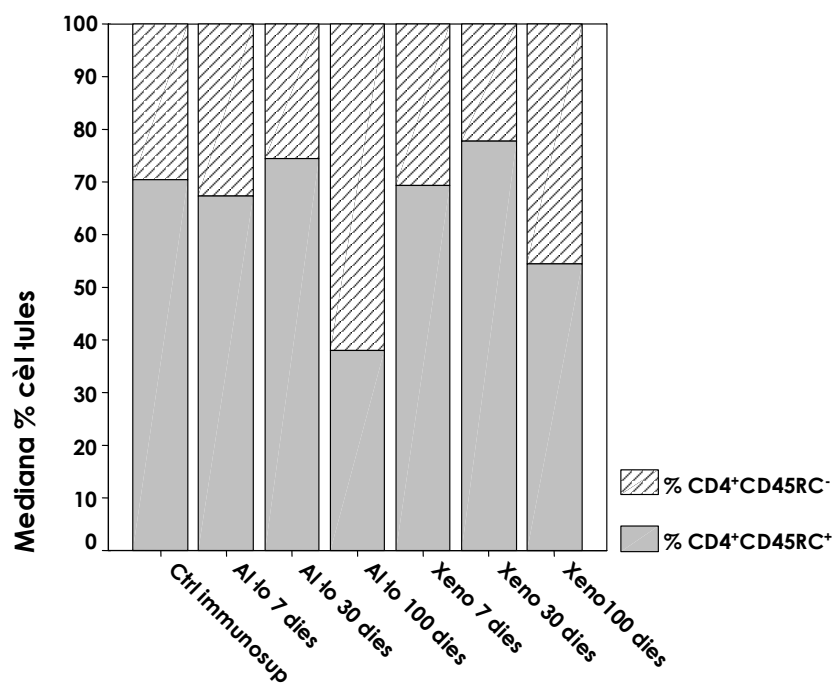
# p< 0.05 al·lo 7 dies vs al·lo 100 dies

## p<0,05 al·lo 30 dies vs al·lo 100 dies

\* p< 0,05 xeno 30 dies vs xeno 100 dies

\*\* p< 0,05 xeno 7 dies vs xeno 100 dies

Figura 43: Mediana del % de cèl·lules de les subpoblacions limfocitàries CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>+</sup> o Th1 i CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>-</sup> o Th2 en sang perifèrica.





Taula 8: Mediana dels valors absoluts dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> Th1 i Th2:

|                       | CD4 <sup>+</sup> CD45RC <sup>+</sup> | CD4 <sup>+</sup> CD45RC <sup>-</sup> |
|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Ctrl immunopr</b>  | 12,2 10 <sup>8</sup>                 | 4,87 10 <sup>8</sup>                 |
| <b>Al lo 7 dies</b>   | 7,4 10 <sup>8</sup>                  | 3,18 10 <sup>8</sup>                 |
| <b>Al lo 30 dies</b>  | 10,3 10 <sup>8</sup>                 | 2,35 10 <sup>8</sup> #               |
| <b>Al lo 100 dies</b> | 7,19 10 <sup>8</sup>                 | 9,68 10 <sup>8</sup> *               |
| <b>Xeno 7 dies</b>    | 12,1 10 <sup>8</sup>                 | 4,68 10 <sup>8</sup> *               |
| <b>Xeno 30 dies</b>   | 3,78 10 <sup>8</sup> *               | 1,10 10 <sup>8</sup> **              |
| <b>Xeno 100 dies</b>  | 9,29 10 <sup>8</sup>                 | 7,44 10 <sup>8</sup>                 |

Test estadístic U Mann Whitney:

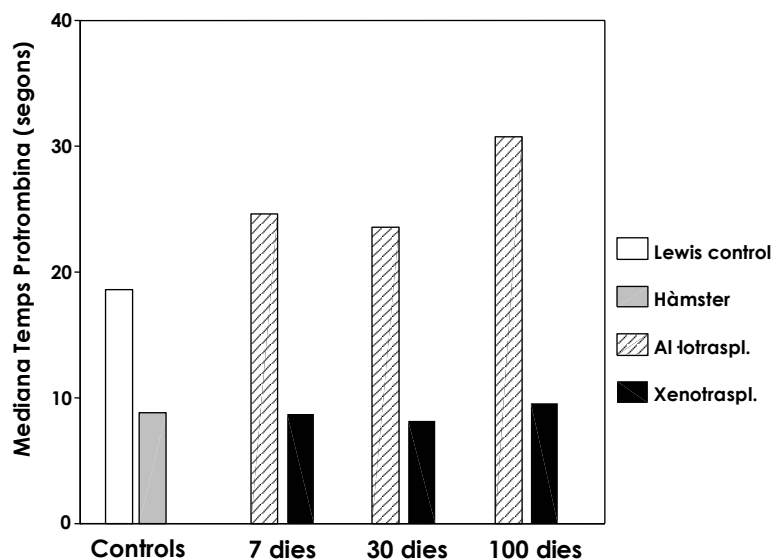
- \* p<0,05 respecte grup control amb immunosupressió
- # p<0,05 al-lo 30 dies vs al-lo 100 dies
- p< 0,05 xeno 7 dies vs xeno 30 dies
- \*\* p< 0,05 xeno 30 dies vs xeno 100 dies

## 4.1.5 Canvis de la cascada de la coagulació.

### 4.1.5.1 Temps de protrombina.

Aquest paràmetre (figura 44) ens dóna una visió general del funcionament de la via extrínseca de la coagulació. Vam poder observar que els valors basals de la soca de rates receptora, Lewis, i els de hámster són molt dispars, presentaven diferències estadístiques significatives (taula 10). En relació als grups de trasplantament veiérem que els tres grups d'al·lotrasplantament tenien un temps de protrombina més llarg que el de les rates control i els grups de xenotrasplantament presentaven uns valors de temps de protrombina molt més baixos que els de les rates control. Aquests valors eren molt més semblants als que presentaven els hámsters, i no s'observaren diferències estadístiques entre els valors de cap dels grups de xenotrasplantament i els valors basals dels hámsters, mentre que tots els grups d'al·lotrasplantament presentaven diferències estadísticament significatives respecte els valors normals en rata. Aquestes diferències ja eren presents el dia 7 després del trasplantament.

Figura 44: Temps de protrombina expressada en segons.



#### 4.1.5.2 Temps de tromboplastina parcial activada o TPA.

Aquest paràmetre mostra una visió general de la via intrínseca de la coagulació. Tal i com ho podem veure a la taula 10 els valors normals de hámster i els de rata presentaren diferències estadístiques. A la figura 45 es mostra que els tres grups d'al·lotrasplantament presentaren valors més semblants als de la espècie donant (rata). Així mateix, els tres grups de xenotrasplantament presentaren uns valors similars als de hámster, i per tant més elevats que els de les rates control i que els de les rates al·lotrasplantades.

#### 4.1.5.3 Factor V.

Aquest factor (figura 46) de síntesi hepàtica es trobà en valors similars en plasma de rata i de hámster: 4,44 UI/ml de mediana en la rata i 3,79 UI/ml en els hámsters. Els grups d'al·lotrasplantament presentaven nivells plasmàtics significativament inferiors als de rata control (taula 10). Els grups de xenotrasplantament de 7 i 30 dies presentaven una tendència a tenir nivells més elevats de factor V en plasma, tant en relació a les rates com als hámster control malgrat no arribar a una significació estadística. D'altra banda el grup de 100 dies presentà diferències estadístiques amb el grup de rates control, podent observar nivells més baixos d'aquest factor però en canvi mostrà uns valors pràcticament idèntics als de l'espècie donant, hámster.

Figura 45: Temps de tromboplastina parcial activada o TPA expressat en segons:

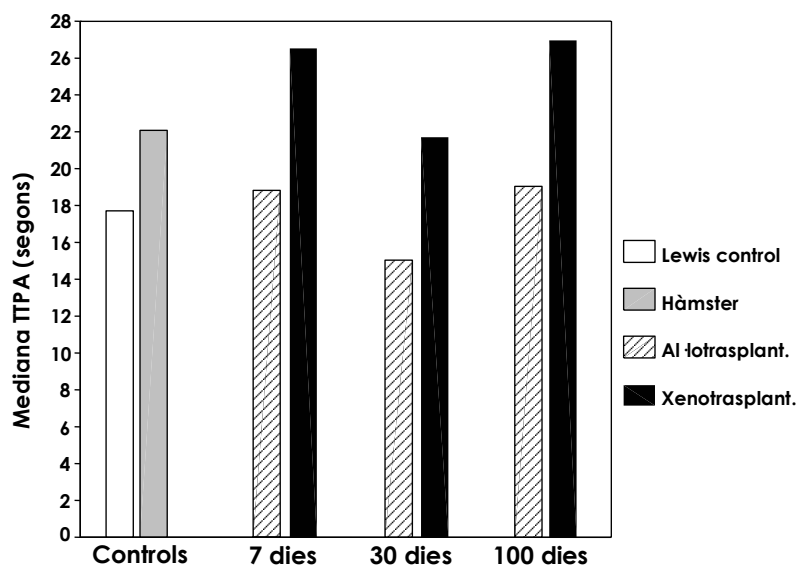
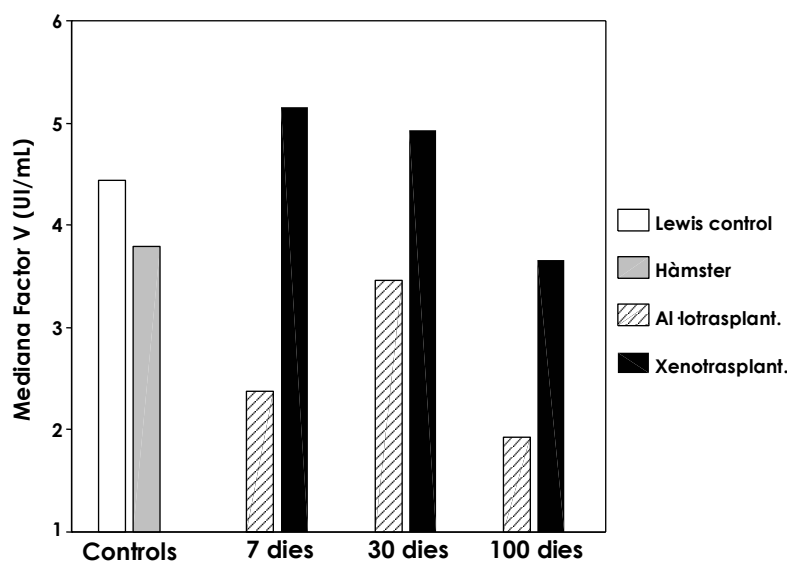


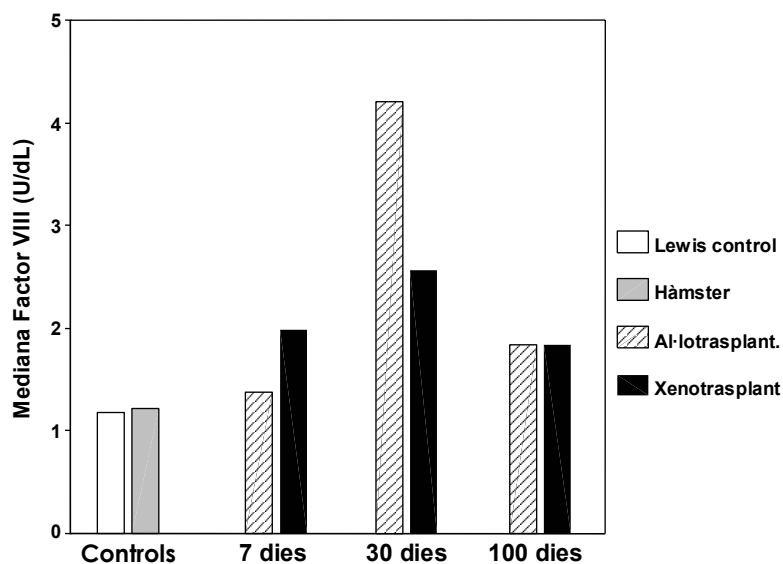
Figura 46: Factor V en plasma expressat en UI/ml:



#### 4.1.5.4 Factor VIII.

Els valors obtinguts d'aquest factor (figura 47) amb plasma de rata i de hámster van ser similars. La mediana dels valors de rata era de 1,18UI/dl i la de hámster de 1,21 UI/dl. Tots els grups de trasplantament, tant els d'al·lotrasplantament com els de xenotrasplantament presentaven nivells més elevats que els valors basals en rata tot i que no en tots els grups s'observaven diferències estadístiques significatives (taula 10). De totes maneres, els resultats que fan referència a aquest factor són difícils d'interpretar perquè el factor VIII és una proteïna de fase aguda i no està sintetitzada exclusivament al fetge; la melsa, el ronyó i els pulmons també poden sintetitzar aquest factor.

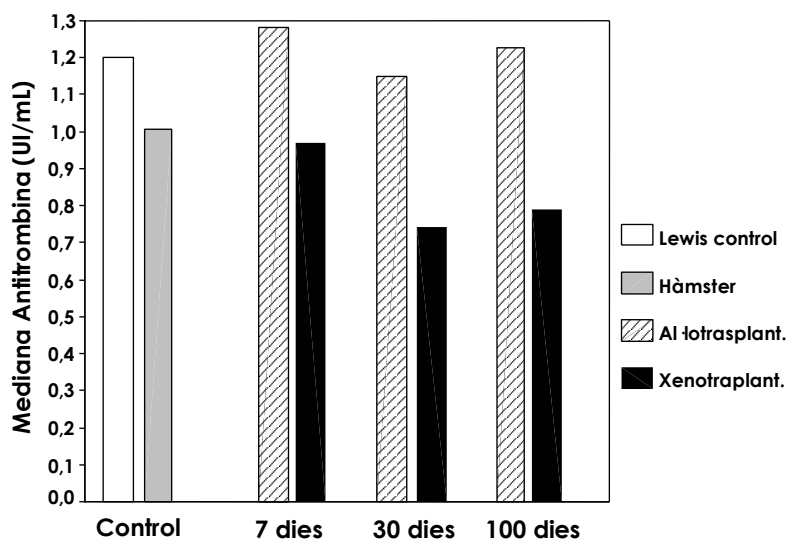
Figura 47: Factor VIII en plasma expressat en UI/ml.



#### 4.1.5.5 Antitrombina.

En aquest paràmetre, un cop més, vam trobar diferències entre rates i hámsters (taula 10). Els tres grups d'al·lotrasplantament mostraven uns valors lleugerament més elevats que els de les rates control, però sense arribar a la significació estadística. En canvi, els tres grups de xenotrasplantament presentaven nivells significativament més baixos que les rates control i sense diferències estadístiques en relació als valors de hámsters control (figura 48).

Figures 48: Antitrombina en plasma (UI/ml):



#### 4.1.5.6 Proteïna S lliure.

Malgrat l'existència de diferències entre rates i hámsters, els grups de xenotrasplantament presentaven uns valors més similars als de les rates. En relació als grups d'al·lotrasplantament, als 7 i 30 dies presenten uns valors similars als de les rates Lewis, però en canvi, als 100 dies de trasplantament mostren uns valors molt més elevats. A conseqüència d'aquest resultat, vam mesurar els nivells de proteïna S lliure en plasma de la soca de rates Brown Norway, soca donant en el grup d'al·lotrasplantament als 100 dies. El que vàrem observar va ser que aquestes rates presentaven uns valors molt més elevats que els de les rates Lewis (87 UI/dl rates BN vs 28.5 UI/ml rates Lewis). Així doncs els resultats de la determinació de la proteïna S als 100 dies de l'al·lotrasplantament són atribuïbles als valors normals que presenta la soca donant Brown Norway (87 UI/dl vs 76,8 UI/dl), (taula 10 i figura 49).

#### 4.1.5.7 Proteïna C.

Potser els resultats més interessants són els que fan referència a la proteïna C, ja que aquesta proteïna és absent a les rates i en canvi els hámsters presenten uns valors de 22.1UI/dl de mediana. Les rates al·lotrasplantades, al igual que les rates donants, no presenten nivells valorables de proteïna C. En canvi, és molt rellevant que al plasma de les rates xenotrasplantades als 7 dies del trasplantament ja es detectaven nivells de 5,50 UI/dl de proteïna C. Als dies 30 i 100 després del trasplantament podíem observar valors lleugerament superiors als de hámster, espècie donant (taula 10 i figura 50).

Figura 49: proteïna S lliure en plasma (UI/dl).

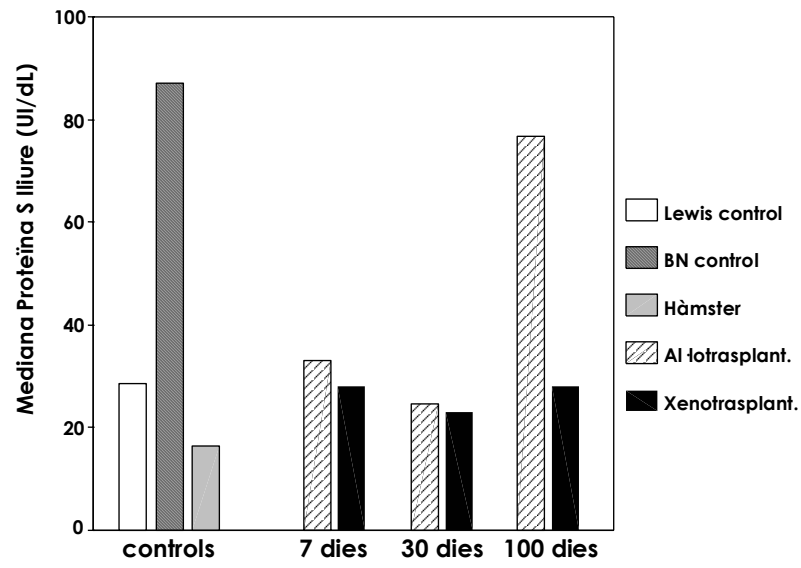
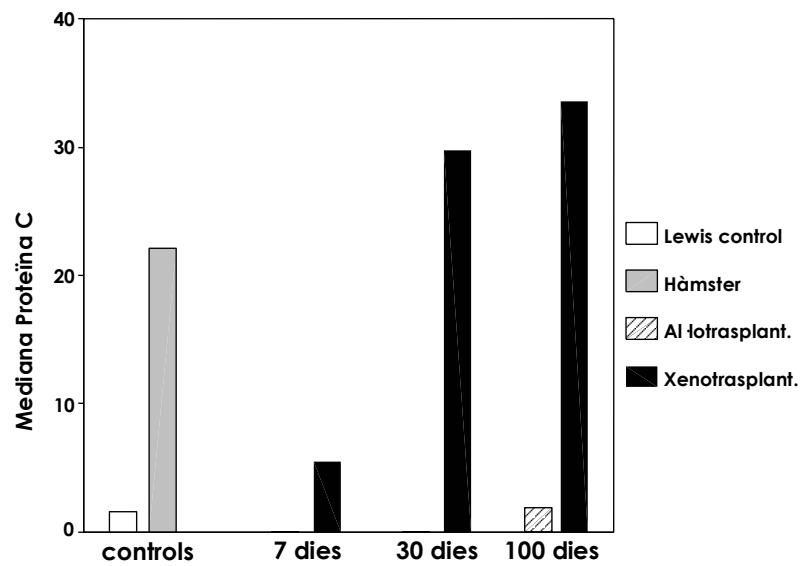


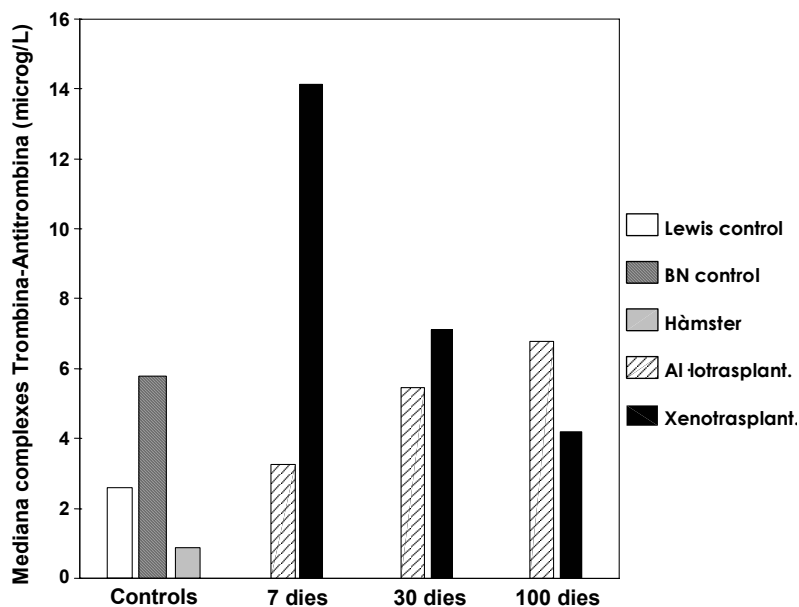
Figura 50: Proteïna C en plasma (UI/dl).



#### 4.1.5.8 TAT complexes.

En el cas dels complexos Trombina-Antitrombina succeeix un fet similar al de la proteïna S. Els grups d'al·lotrasplantament als 7 i 30 dies no mostraven diferències significatives respecte les rates Lewis control, però en canvi el grup d'al·lotrasplantament als 100 dies sí que en presentava. Els resultats observats en les rates Brown Norway ens va fer pensar que, més que produir-se una activació de la coagulació en aquest moment posttrasplantament en el que no s'observaven signes de rebuig ni problemes de coagulació, el que tenia lloc era l'adopció de valors similars als de la soca donant. Les rates al·lotrasplantades als 100 dies del trasplantament presentaven valors de 6,7  $\mu\text{g/l}$  mentre que la mediana de les rates BN era de 5,7  $\mu\text{g/l}$  (figura 51). Als grups de xenotrasplantament sí que observàrem una activació important de la coagulació especialment als 7 dies posttrasplantament on vam observar nivells de 14,1  $\mu\text{g/l}$  (taula 10). Aquesta activació de la coagulació es va anar corregint amb el temps, arribant a valors substancialment inferiors als del dia +7 però encara estadísticament significatius respecte als de hàmmsters control, però sense diferències significatives respecte a rates control (figura 51).

Figura 51: Complexes Trombina-antitrombina en plasma expressat en micrograms/litre.



Taula10: Valors obtinguts dels diferents paràmetres determinats de la cascada de la coagulació valorats amb plasma de rates Lewis control, hámsters normals i els diferents grups d'al·lo i xenotrasplantament.

|  | Controls   |         | Al totrasplantament |           |           | Xenotrasplantament |         |          |
|--|------------|---------|---------------------|-----------|-----------|--------------------|---------|----------|
|  | Rata Lewis | Hámster | 7 dies              | 30 dies   | 100 dies  | 7 dies             | 30 dies | 100 dies |
| <b>T protrombina(seg)</b>                | 18,60      | 8,80*   | 24,60*              | 23,60*    | 30,80*    | 8,75*              | 8,15*   | 9,60*    |
| <b>TTPA (seg)</b>                        | 17,70      | 22,10*  | 18,85               | 15,05*    | 19,00     | 26,50*‡            | 21,70*  | 27,00*‡  |
| <b>Factor V (UI/ml)</b>                  | 4,44       | 3,79    | 2,37*               | 3,46*     | 1,92*     | 5,16               | 4,93    | 3,66*    |
| <b>Factor VIII (UI/ml)</b>               | 1,18       | 1,21    | 1,37                | 4,20*     | 1,84*     | 1,99*              | 2,57*‡  | 1,84     |
| <b>AT-III (UI/ml)</b>                    | 1,20       | 1,00*   | 1,28                | 1,15      | 1,22      | 0,97*              | 0,74*‡  | 0,79*    |
| <b>Proteína C (UI/dl)</b>                | 1,59       | 22,10*  | Indetect.           | Indetect. | Indetect. | 5,50*‡             | 29,70*‡ | 33,50*   |
| <b>Proteína S (UI/dl)</b>                | 28,50      | 16,50*  | 33,00               | 24,50     | 76,80*    | 27,95‡             | 23,10   | 28,00‡   |
| <b>ComplexesTAT(<math>\mu</math>g/l)</b> | 2,5        | 0,8*    | 3,2                 | 5,4       | 6,7*      | 14,1*‡             | 7,1*‡   | 4,1‡     |

Test estadístic U Mann Whitney:

\*  $p < 0.05$  en relació als valors de rata Lewis control

‡  $p < 0,05$  en relació als paràmetres de hámster control



## 4.2 ESTUDI 2.

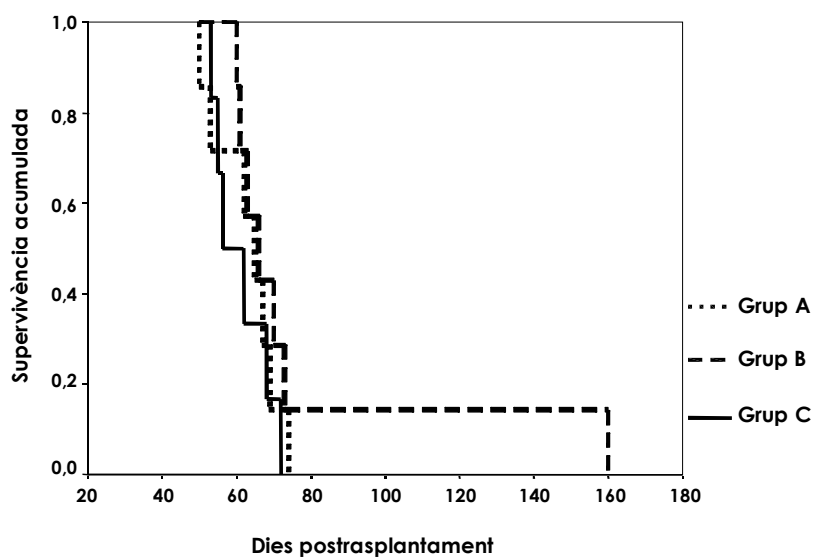
### 4.2.1 Supervivència de l'empelt.

Tal i com podem observar a la taula 11 i a la figura 52 no vam observar diferències significatives en les supervivències dels animals dels diferents grups de l'estudi. En aquest model considerem que el rebuig de l'òrgan trasplantat coincideix amb la mort de l'animal. Els empelts van ser rebutjats pel procés que es coneix com a Rebuig Tardà del Xenoempelt o, de l'anglès, *Late Xenograft Rejection* (LXR). Vàrem poder observar com ni l'administració de l'antagonista del PAF durant els primers dies després del trasplantament ni la seva administració de forma continuada endarreriria l'aparició del rebuig.

Taula 11: Tractaments i supervivències dels diferents grups de l'estudi 2.

| Grup | Tractament        | Supervivència         | Mitjana supervivència | Mediana supervivència |
|------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| A    | MMF (0→7)         |                       |                       |                       |
|      | Tacrolimus (0→30) | 53,50,67,65,74,62,69  | 63±8 dies             | 65 dies               |
| B    | MMF (0→7)         |                       |                       |                       |
|      | Tacrolimus (0→30) | 66,70,73,160,61,63,60 | 79±36 dies            | 66 dies               |
|      | UR-12670 (0→7)    |                       |                       |                       |
| C    | MMF (0→7)         |                       |                       |                       |
|      | Tacrolimus (0→30) | 57,63,69,73,54,56     | 62±8 dies             | 60 dies               |
|      | UR-12670 (0→∞)    |                       |                       |                       |

Figura 52: Supervivències acumulades dels tres grups de l'estudi. En destaquem la supervivència de 160 dies d'un animal del grup B, 130 dies sense immunosupressió.



#### 4.2.2 Proves de funció hepàtica.

Els primers dies després de la intervenció quirúrgica podem observar nivells de transaminases elevats conseqüència de la isquèmia freda, la cirurgia del trasplantament i una pauta immunosupressora molt ajustada. Després de la primera setmana els valors tornaven a ser molt propers als basals i es mantenien així fins als dies propers al rebuig que tornaven a incrementar, taula 12.

Els valors eren molt semblants als tres grups, tanmateix el grup C, al que se li administrà l'UR-12670 de forma continuada, presentà valors més baixos de ALT i AST des de després de la intervenció quirúrgica fins al moment del rebuig, però malgrat aquesta tendència la diferència no era estadísticament significativa.

L'albumina al ser una proteïna de síntesi exclusivament hepàtica ens informa de la funció d'aquest òrgan. Els primers dies després del trasplantament els nivells sèrics d'albumina experimentaren una lleugera davallada en els tres grups de l'estudi, però els valors

s'estabilitzaren i es van mantenir estables tot i que considerablement inferiors als basals fins als dies propers al rebuig quan van disminuir de forma acusada essent indicadors d'una fallada hepàtica, taula 12.

Taula12: Transaminases i albúmina en sèrum. Mediana de AST i ALT expressades en UI/l i dels valors d'albúmina expressats en g/l.

|                | Grup A (n=7) |     |          | Grup B (n=7) |       |          | Grup C (n=6) |       |          |
|----------------|--------------|-----|----------|--------------|-------|----------|--------------|-------|----------|
|                | ALT          | AST | Albúmina | ALT          | AST   | Albúmina | ALT          | AST   | Albúmina |
| <b>Dia 0</b>   | 85           | 78  | 33       | 61           | 73    | 31       | 50           | 64    | 39       |
| <b>Dia +3</b>  | 164          | 109 | 23       | 646          | 326   | 23       | 580          | 504   | 28       |
| <b>Dia +7</b>  | 719.5        | 323 | 25       | 202          | 187   | 25       | 95.5         | 111   | 27       |
| <b>Dia +15</b> | 114          | 119 | 27       | 65.5         | 98    | 22       | 67           | 98    | 23       |
| <b>Dia +30</b> | 149          | 167 | 27       | 178          | 163   | 26.5     | 98           | 114.5 | 25.5     |
| <b>Dia +40</b> | 141          | 152 | 23.5     | 105          | 140   | 25       | 98.5         | 134.5 | 26.5     |
| <b>Dia +50</b> | 164.5        | 166 | 19.5     | 133          | 132   | 23       | 96           | 166   | 23       |
| <b>Rebuig</b>  | 434.5        | 361 | 12       | 361.5        | 514.5 | 12       | 332          | 267.5 | 13.5     |

### 4.2.3 Estudi histològic.

La histologia dels empelts de llarga supervivència mostrava patrons histològics diferents depenent del tractament rebut tal i com ho podem veure en la taula 13. El patró dels grups A i B eren molt similars. Aquests dos grups presentaven el principal dany histològic a les zones lobel·lar i centrelobel·lar on vàrem observar necrosi confluent massiva, pèrdua d'hepatòcits, congestió sinusoidal, hemorràgia intersticial i un moderat infiltrat per cèl·lules mononucleades (figura 53A i 53B). Només presentaven diferències estadístiques en relació al paràmetre que valora les cèl·lules infiltrants als espais porta, presentaven una infiltració massiva de limfòcits, que en el cas del grup A sobrepassen la limitant d'aquests espais i observàrem, també, infiltrats periportals. La majoria d'aquestes cèl·lules infiltrants presentaven la morfologia típica de limfòcits activats, és a dir amb el nucli gran i obert, amb un o més nucleols prominents.

Actualment està totalment acceptada la relació d'aquestes cèl·lules amb el diagnòstic del rebuig.

El grup C, que és el que rep l'antagonista del PAF de forma continuada presentà diferències estadísticament significatives respecte els altres dos grups tal i com ho podem veure a la taula 13. Els paràmetres en que quedaren patents aquestes diferències foren: endotelitis, necrosi hepatocitària, pèrdua d'hepatòcits, hemorràgia i congestió sinusoidal a la zona centrelobel·lar i a la del lobul·let hepàtic (figura 53C). Altres paràmetres també presentaven diferències malgrat no aconseguir la significació estadística. L'infiltrat limfocitari a les àrees portals era considerablement inferior al grup C així doncs observarem un infiltrat lleu en el 50% dels casos mentre que als grups A i B només n'eren un 14,3% i en canvi un 85,7% de les laminetes d'aquests dos grups presentaven un infiltrat entre moderat i intens.

La presència de fibrosi era un tret comú de tots els animals de llarga supervivència independentment del grup al que pertanyien (figura 53D). A les venes dels espais porta i a les centrelobel·lars en la majoria dels animals del grup A i B s'observà endotelitis lleugera malgrat que el grau d'infiltrat limfocitari era força considerable. Al grup C la presència d'endotelitis era molt lleu. Pràcticament no es va observar dany dels ductes biliars malgrat observar certa proliferació colangiolar en alguns animals independentment del grup al que pertanyien i que podíem associar a complicacions del model en si mateix com va suggerir Kamada<sup>229</sup>.

Taula 13: Paràmetres histològics i que presenten Rebuig Tardà del xenoempelt .

|               |                            | Grup A    | Grup B       | Grup C       |
|---------------|----------------------------|-----------|--------------|--------------|
| Canvis zona 1 | Infiltrat limfocitari      | 2.43±0.79 | 2.14±0.69    | 1.67±0.82    |
|               | Endotelitis‡               | 1**       | 1.14±0.69    | 0.33±0.82*** |
|               | Infiltrat periportal ‡     | 2±0.82*   | 0.71±0.95    | 0.83±0.75**  |
|               | Proliferació colangiolar   | 0.71±0.49 | 0.14±0.38    | 0.50±0.55    |
|               | Dany als conductes biliars | 0.29±0.49 | 0            | 0            |
| Canvis zona 2 | Infiltrat limfocitari      | 1.29±0.49 | 1.43±0.53    | 0.83±0.75    |
|               | Necrosis‡                  | 1.86±1.21 | 1.86±0.90*** | 0.50±0.84**  |
|               | Pèrdua d'hepatòcits        | 1.43±1.51 | 2.14±1.21    | 0.83±0.75    |
| Canvis zona 3 | Infiltrat limfocitari      | 1.14±0.38 | 0.86±0.38    | 0.83±0.75    |
|               | Necrosi‡                   | 1±0.82    | 1.57±0.79*** | 0**          |
|               | Pèrdua d'hepatòcits‡       | 0.86±0.9  | 1.43±0.53*** | 0**          |
|               | Endotelitis                | 0.29±0.76 | 0.29±0.49    | 0            |
|               | Hemorragia‡                | 1.71±1.38 | 2.43±0.79*** | 0.67±0.82    |
|               | Dilatació sinusoidal       | 0.71±0.76 | 0.14±0.38    | 0.67±0.82    |
|               | Congestió sinusoidal‡      | 2.29±0.76 | 2.43±0.79*** | 0.83±0.75**  |
|               | <b>Fibrosi</b>             | 2         | 2            | 2            |

‡p<0.05, Kruskal-Wallis test.

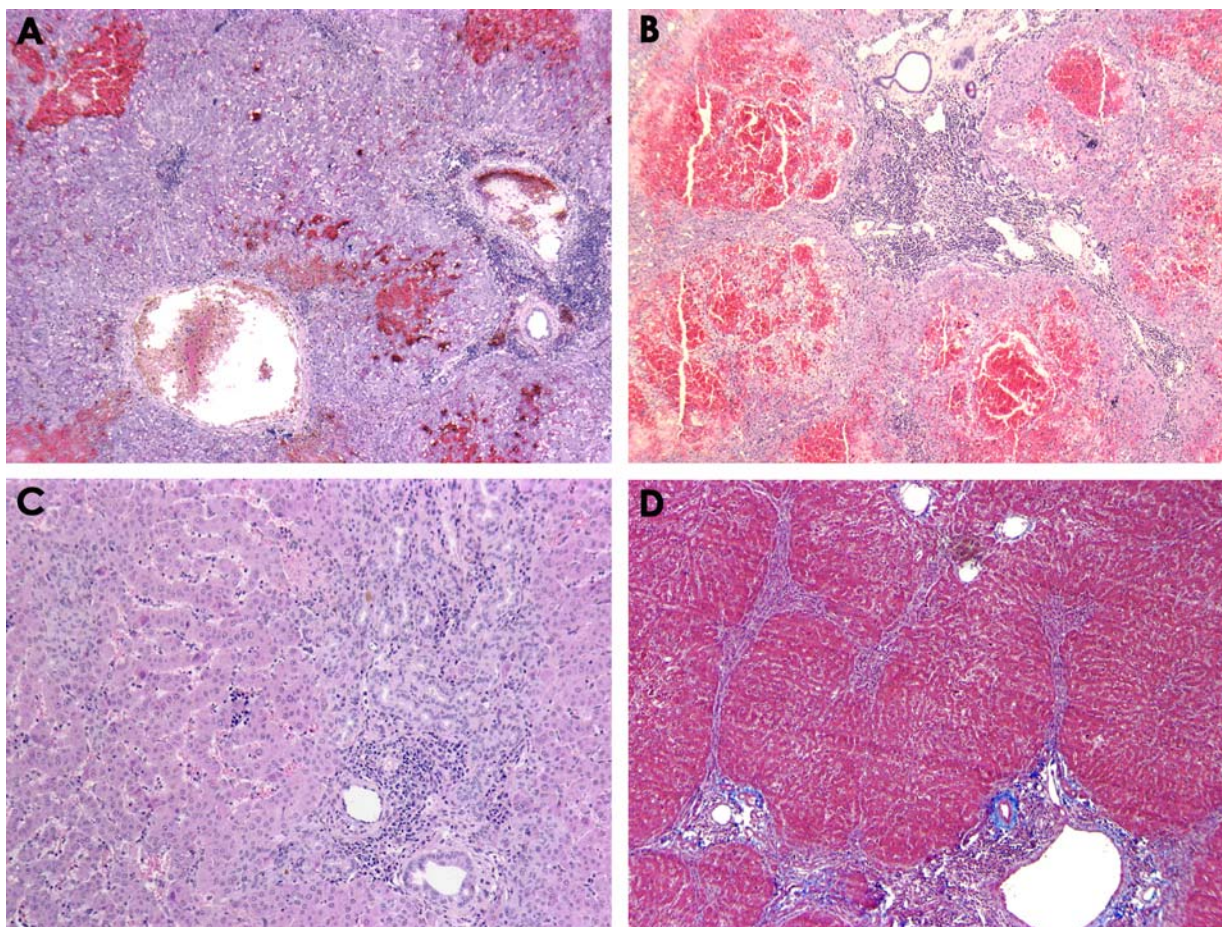
U the Mann-Whitney test:

\*p<0,05 group A vs group B;

\*\*p<0,05 group A vs group C;

\*\*\*p<0,05 group B vs group C.

Figura 53: Mostra l'estat dels xenoempelts dels grups de l'estudi 2. Els grups A (A, x50) i B (B, x50) al LXR presenten hemorràgia, necrosi i infiltrat limfocitari als espais porta. El grup C (C, x100) mostra absència de necrosi i hemorràgia i menys infiltració limfocitària. D(x50): tinció tricròmica de Masson, mostra els ponts de fibrosi porto-portals presents en els tres grups de l'estudi.



#### 4.2.4 Caracterització immunohistoquímica de cèl·lules infiltrants al parènquima hepàtic.

Mitjançant les tincions immunohistoquímiques vam poder caracteritzar els infiltrats al parènquima hepàtic. Per tal de valorar els macròfags infiltrants vam realitzar dues tincions immunohistoquímiques amb anticossos dirigits contra els antígens específics dels anticossos dels clons ED1 i ED2, aquest segon exclusiu de les cèl·lules de Kupffer. Vam observar diferències estadísticament significatives en relació als macròfags ED1<sup>+</sup>, ja que el grup que va rebre el tractament amb l'antagonista del PAF de forma continuada presentava un menor nombre de cèl·lules ED1<sup>+</sup> que els altres dos grups (taula 14). D'altra banda en relació a les cèl·lules de

Kupffer, no hem observat diferències estadístiques malgrat poder veure una acusada disminució d'aquestes cèl·lules al grup que rep l'antagonista del PAF de forma continuada (taula 14). Podem veure els resultats a la taula acompanyant:

Taula 14: Mediana de cèl·lules infiltrants al parènquima/mm<sup>2</sup> de teixit.

|               | <b>C. Kupffer</b> | <b>Cel. ED1<sup>+</sup></b> |
|---------------|-------------------|-----------------------------|
| <b>Grup A</b> | 155               | 131,55                      |
| <b>Grup B</b> | 89,1*             | 162,71                      |
| <b>Grup C</b> | 76,60*            | 97,8                        |

\*p<0,05 en relació grup A

Els valors de la caracterització dels limfòcits infiltrants als espais porta els detallem a la taula acompanyant (taula 15), mostrant els resultats com a mediana del % de cada tipus de limfòcits infiltrant/espai porta. És important remarcar que per fer aquests càlculs s'han comptat, en els casos que ha estat possible, 10 espais porta. Diem en els casos que ha estat possible perquè en els grups A i B no teníem tants espais porta a totes les mostres degut a les extenses àrees de necrosi i hemorràgia intersticial. Aquests resultats ens mostren quin tant per cent de cada tipus limfocitàri trobàvem infiltrant els espais porta però no ens informen de la quantitat de cèl·lules, aquest resultats queden reflexats en l'anàlisi histològica que hem mostrat en l'apartat anterior.

Tal i com observem a la taula acompanyant (taula 15), veiem que el grup A mostra unes proporcions de les diferents subpoblacions limfocitàries estadísticament significatives tant respecte el grup que rep l'antagonista del PAF durant els primers set dies posttrasplantament com el que rep el fàrmac de manera continuada. En canvi els dos grups que rebien l'UR-12670 presenten proporcions semblants de cadascun dels subtipus limfocitàris, fet que no implica quantitats totals similars ja que ja hem comentat anteriorment que el nombre d'infiltrats al grup C era més reduït (figura 54).

Taula 15: Mediana del % de les subpoblacions limfocitàries infiltrants als espais porta.

|               | <b>Cel. B</b> | <b>CD8<sup>+</sup></b> | <b>CD4<sup>+</sup></b> | <b>CD45RC<sup>+</sup></b> | <b>Valor histològic</b> |
|---------------|---------------|------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <b>Grup A</b> | 31,27         | 24,19                  | 44,54                  | 64,11                     | 2,43                    |
| <b>Grup B</b> | 13,55*        | 13,70*                 | 71,77*                 | 51,35                     | 2,14                    |
| <b>Grup C</b> | 12,75**       | 14,05**                | 74,63**                | 57,23                     | 1,67                    |

U the Mann-Whitney test:

\* p<0,05 grup A vs B

\*\* p<0,05 grupA vs C

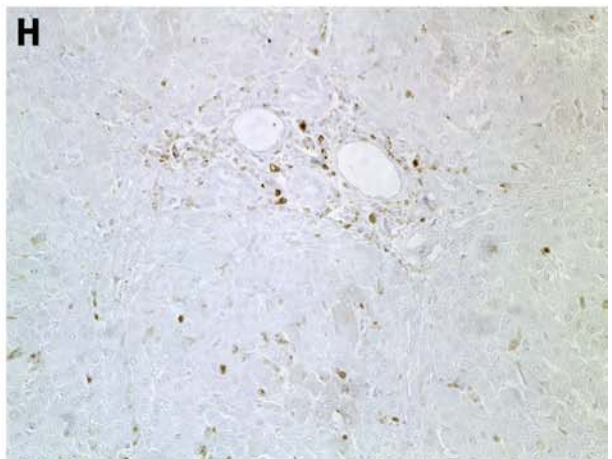
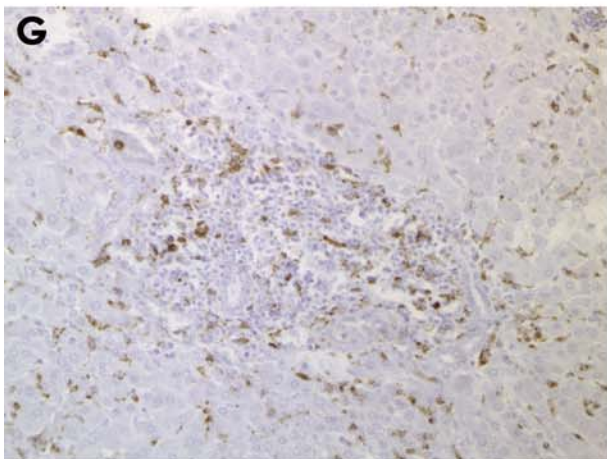
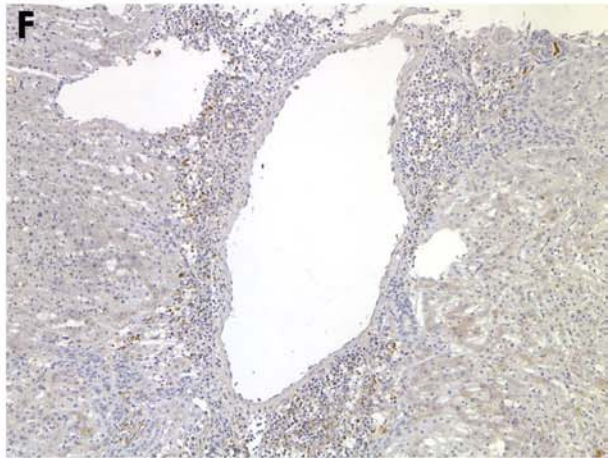
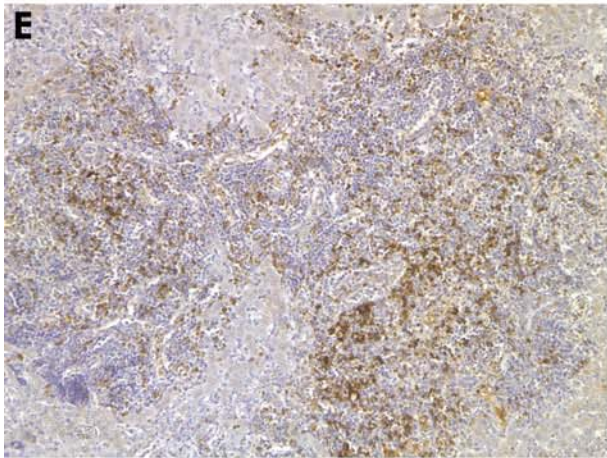
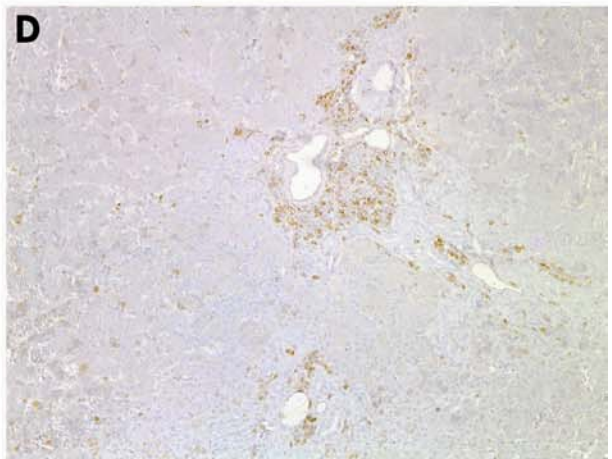
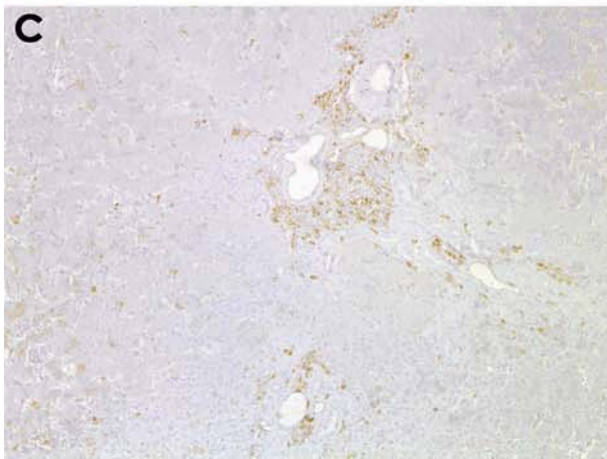
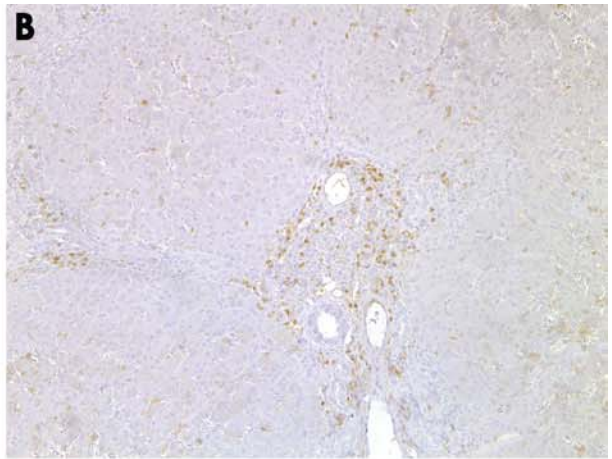
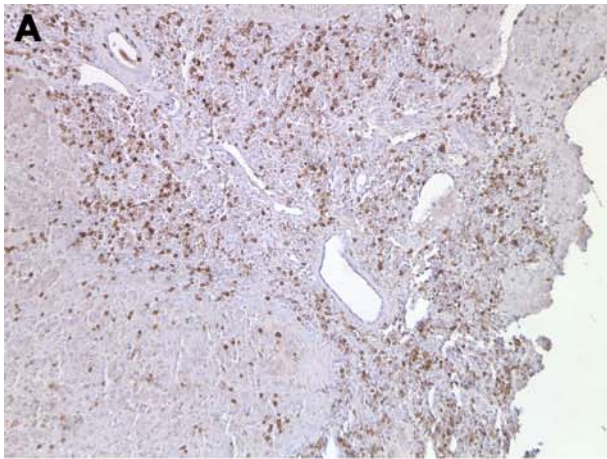




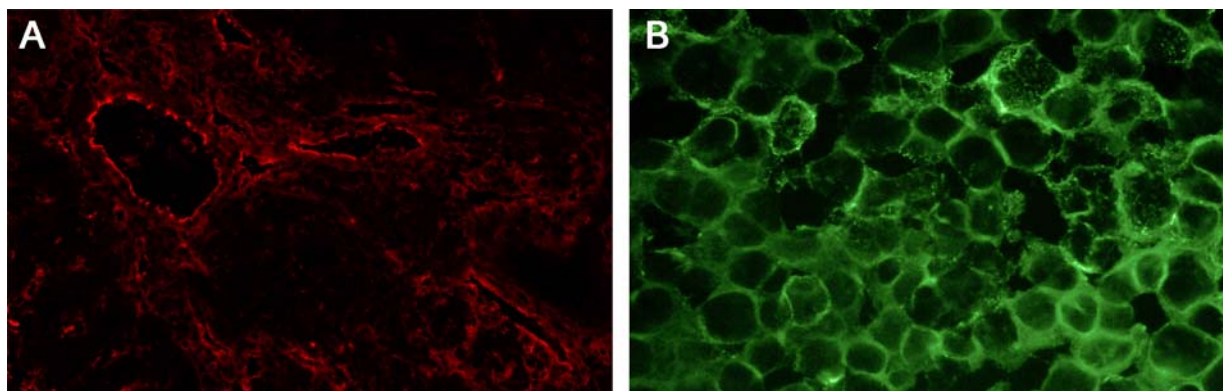
Figura 54: Marcatge de diferents subpoblacions limfocitàries infiltrants als empelts(x100). Cèl·lules CD8+: A, 7 dies posTx; B, 100 dies posTx. Limfòcits CD45RC+: C, 7 dies posTx; D, 100 dies posTx. Cèl·lules B: E, 7 dies posTx; F, 100 dies posTx. Macròfags ED1+: G, 7 dies posTx; H, 100 dies posTx.

#### 4.2.5 Determinació de dipòsits d'anticossos i complement.

La immunofluorescència directa ha estat utilitzada per avaluar els dipòsits de IgM i de IgG als xenoempelts hepàtics. Als tres grups vam observar dipòsits moderats de IgM i lleus de IgG. Els dipòsits eren presents als vasos dels espais porta (figura 55A), als sinusoides i vorejant els hepatòcits, mostrant un patró reticular recordant una xarxa (figura 55B). Aquest patró va ser observat a tots els animals trasplantats suggerint que els xenoantígens podien estar a la membrana plasmàtica dels hepatòcits o bé a la matriu extracel·lular però no al citoplasma.

Amb la tinció immunohistoquímica de la molècula del complement C3 vam observar-ne dipòsits lleus o moderats als tres grups de l'estudi. Donat que és una molècula de síntesi principalment hepàtica i els empelts analitzats eren de hámster vam pensar que es podia donar una manca d'especificitat de l'anticòs (anticòs monoclonal mouse anti-rat C3-FITC) i decidírem realitzar la tècnica de *Rocket immunoelectrophoresi* per tal de detectar els nivells de complement en sèrum (anticòs policlonal goat anti-rat C3) i així completar la informació referent al complement.

Figura 55: Mostra dels dipòsits d'anticossos IgM presents al rebuig dels tres grups de l'estudi, localitzant-se principalment als vasos grans (A, x200), i recordant una xarxa, voregen els hepatòcits (B, x650).



### 4.2.6 Valoració del complement: Rocket immunoelectroforesi.

Amb la valoració dels nivells sèrics de la molècula del complement C3 vam poder observar que no es donaven canvis significatius (taula 16). Com ja hem esmentat, aquesta és una molècula de síntesi principalment hepàtica i d'altra banda es dona una despesa d'aquesta en situacions de rebuig, per tant els seus valors són conseqüència de la balança d'aquests dos processos.

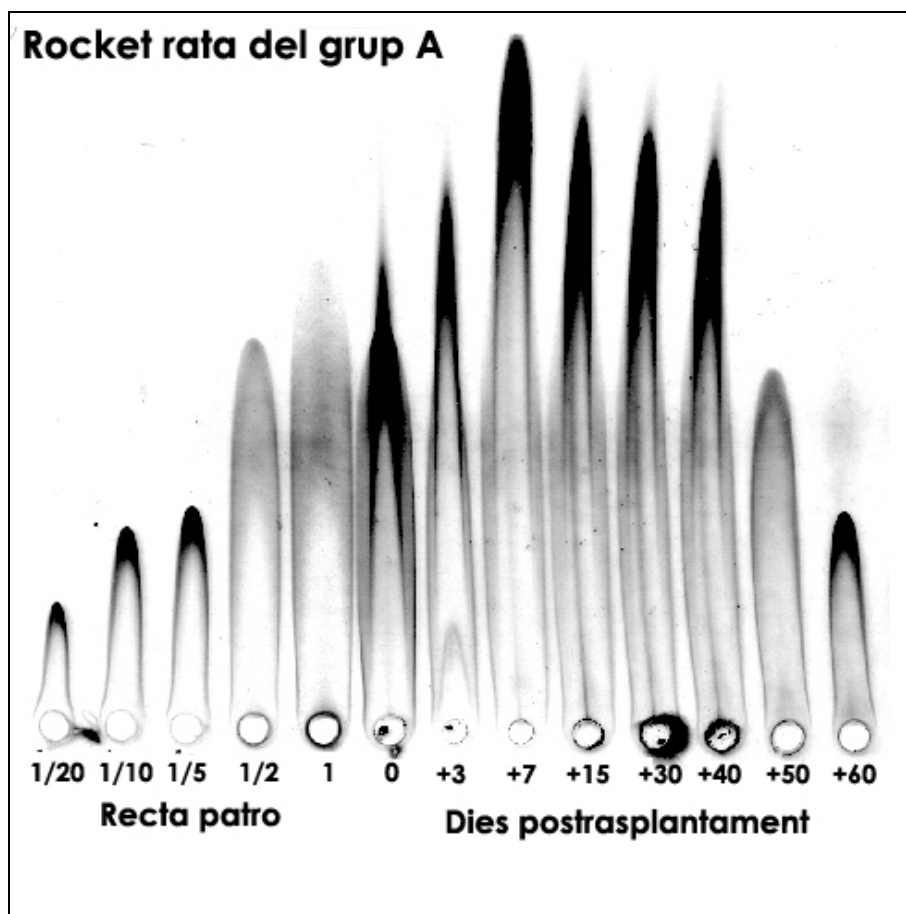
El punt on vàrem observar certes diferències significatives utilitzant el test no paramètric de Kruskal-Wallis va ser el dia 7 després del trasplantament que el grup A, el que no rep l'antagonista del PAF, presentava nivells lleugerament més alts (1,54 el grup A, 0,70 i 0,78 el grup B i C respectivament). La resta de dies els tres grups presenten valors similars als del dia 0 fins als dies propers al rebuig que presentaven una davallada important. Seguien un patró molt similar als nivells d'albumina en sèrum (figura 56).

Taula 16: Valors relatius de la molècula del complement C3 en sèrum. Considerem 1 els valors de cada animal abans del trasplantament.

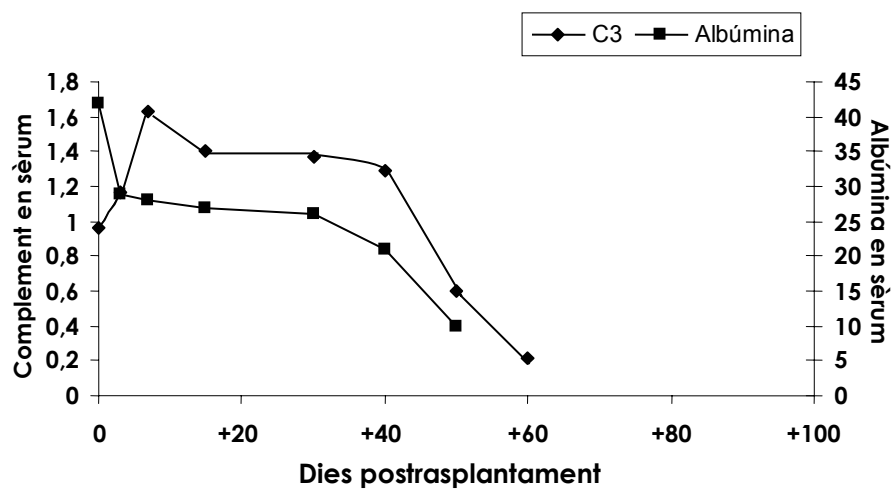
|               | Dies postrasplantament |       |        |        |        |        |        |
|---------------|------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
|               | Dia 0                  | Dia 7 | Dia 15 | Dia 30 | Dia 40 | Dia 50 | Dia 60 |
| <b>Grup A</b> | 1                      | 1,30* | 0,72   | 0,89   | 0,88   | 0,62   | 0,32   |
| <b>Grup B</b> | 1                      | 0,85* | 0,70   | 0,71   | 0,69   | 0,64   | 0,56   |
| <b>Grup C</b> | 1                      | 0,88* | 0,87   | 0,96   | 0,78   | 0,67   | 0,98   |

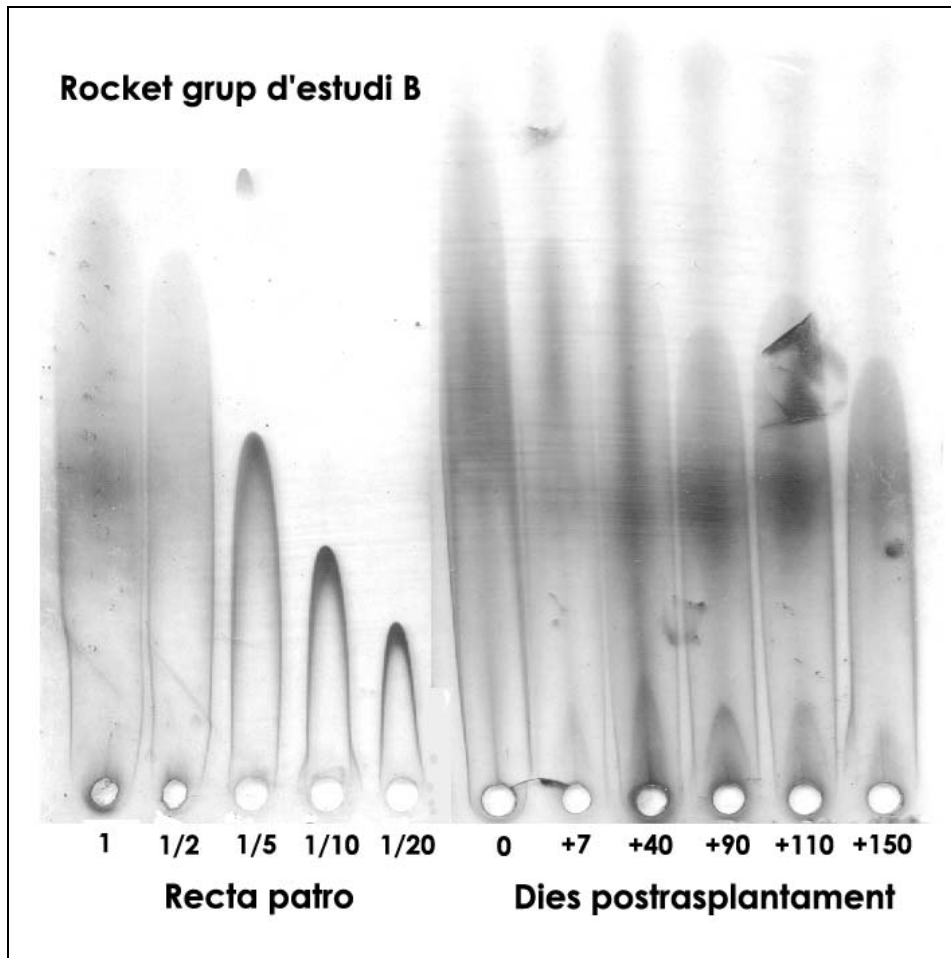
\*  $p < 0,005$  test de Kruskal Wallis

Figura 56: podem observar un exemple de cada grup de les Rocket immunoelectroforesis realitzades i de les gràfiques que obtenim després de la realització dels càlculs. La primera figura correspon a un animal del grup A, no reben UR-12670; la segona és d'un animal del grup B amb la peculiaritat que aquest animal va sobreviure 160 dies, 130 dies sense immunosupressió. La tercera figura correspon a un animal del grup C, reben UR-12670 de forma continuada.

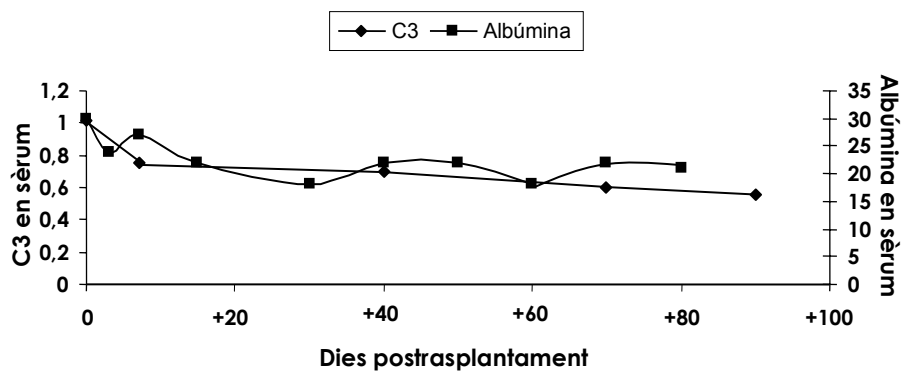


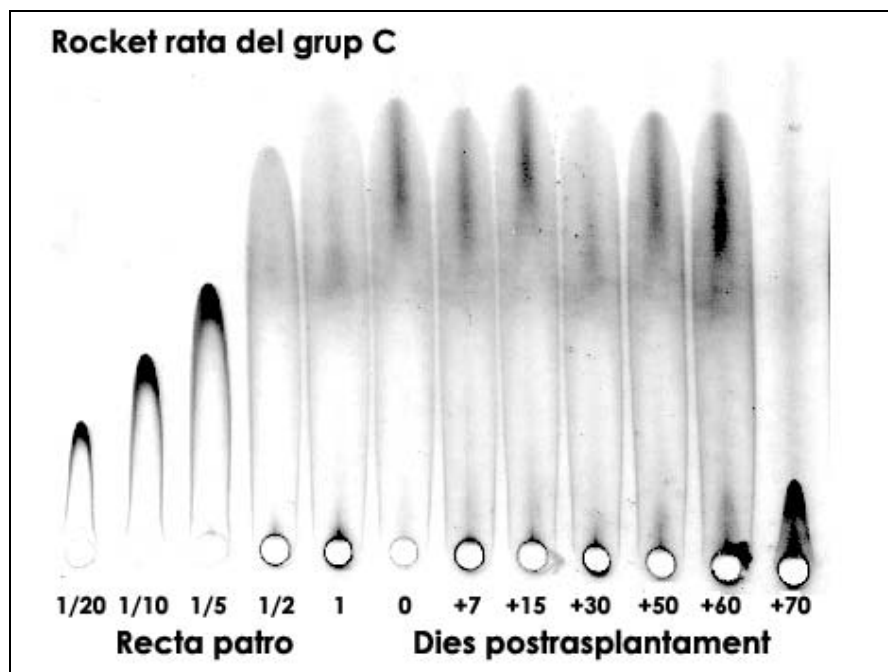
Rata del grup d'estudi A



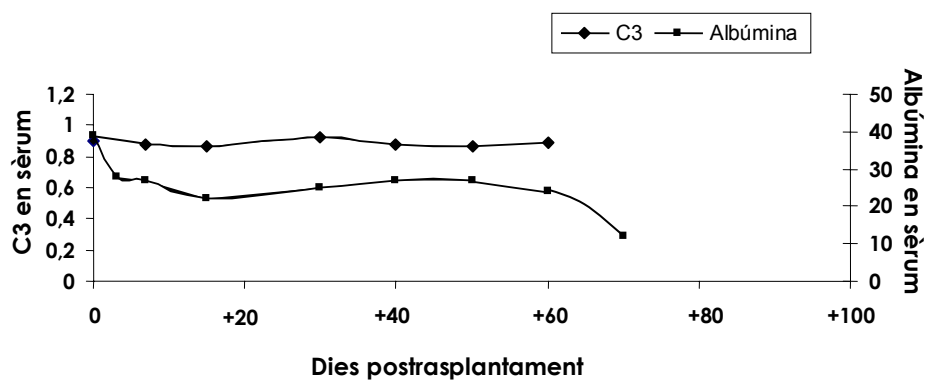


**Rata del grup d'estudi B**





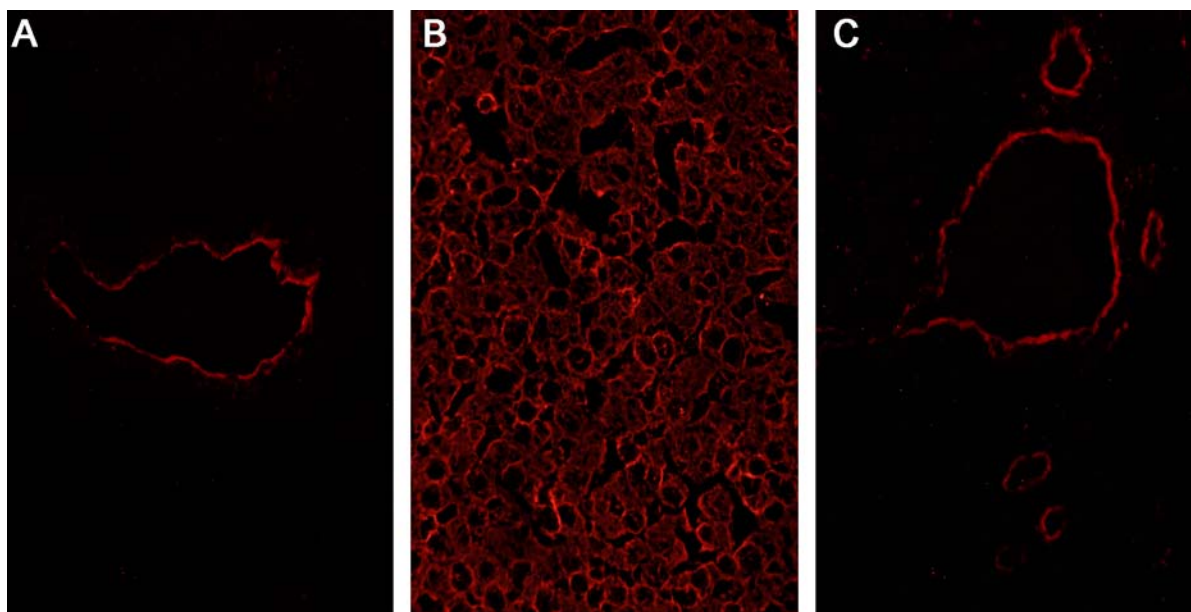
Rata del grup d'estudi C



### 4.2.7 Proves d'immunofluorescència indirecta.

Les proves d'immunofluorescència indirecta van ser realitzades per tal de valorar on es trobaven els antígens dels xenoanticossos IgM presents en sèrum a diferents dies postrasplantament i valorar així un possible canvi d'especificitat dels anticossos. Els talls de teixit hepàtic de hámster normal enfrontats a sèrum de rates control van mostrar una fluorescència molt lleu. En canvi quan el sèrum era del dia 7 després del trasplantament es podia observar una intensa fluorescència als endotelis i vorejant els hepatòcits mostrant un patró similar al que mostraven les proves d'immunofluorescència directa (figura 57B). Les mostres de sèrum dels dies +30 i +60 donaven una fluorescència lleu i moderada respectivament, però en tots els casos conservant el mateix patró.

Figura 57: Fluorescència indirecta resultant d'enfrontar sèrum del dia 7 posTx d'una rata xenotrasplantada a: esòfag de simi (A,x200), fetge de hámster control (B, 200) i a esòfag de hámster (C, x400).

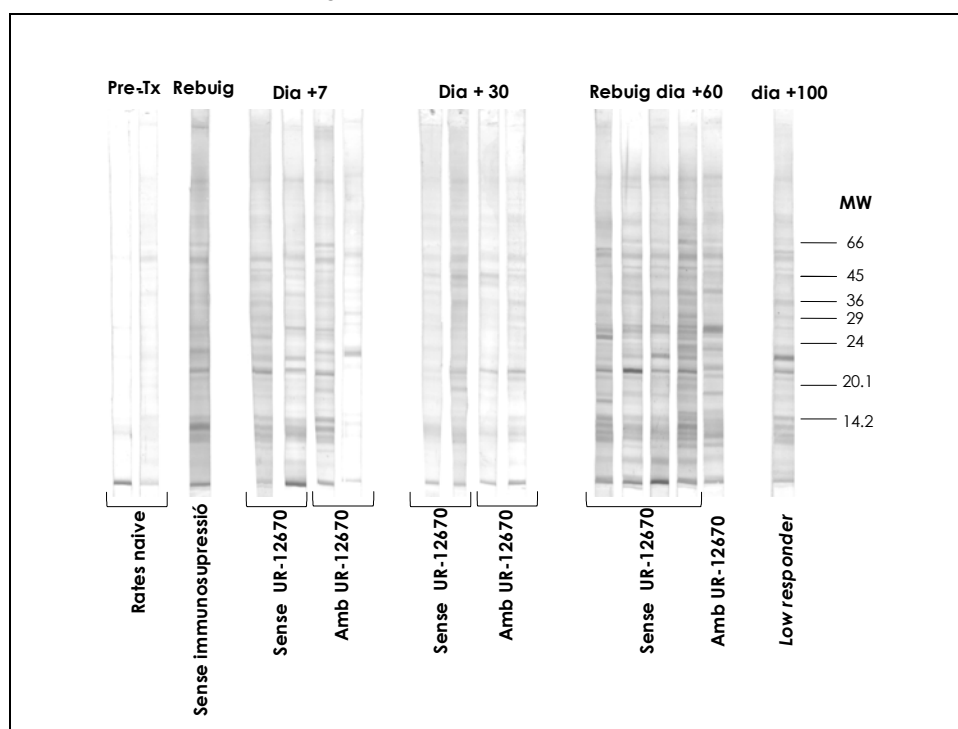


Els resultats d'enfrontar sèrum del dia 7 postrasplantament dels diferents grups a mostres d'esòfag de simi (figura 57A), esòfag de hámster (figura 57C), xenoempelts cardíacs i a fetge de rata de la soca Lewis va ser un patró de fluorescència marcat en tots els grups i en totes les mostres excepte les mostres de fetge de rata control independentment de a quin grup pertanyés el sèrum que s'enfrontava als diferents teixits. Les mostres d'esòfag mostraven fluorescència marcant els endotelis i els xenoempelts cardíacs mostraven fluorescència als vasos i entremig dels miòcits.

## 4.2.8 Especificitat dels xenoanticossos a diferents dies postrasplantament.

L'especificitat dels xenoanticossos ha estat valorada mitjançant la tècnica de *Western blot*. Tires de membrana a la que s'han transferit les proteïnes d'un extracte de teixit hepàtic de hámster normal s'han incubat amb sèrum de rata control i de diferents dies després del trasplantament tal i com podem observar a la figura 58. Els xenoanticossos IgM reconeixen un número limitat d'antígens. Les IgM presents al sèrum de les rates trasplantades 7, 30 i 60 dies després del trasplantament s'uniren a les mateixes bandes de proteïnes però amb major intensitat els dies 7 i 60 postrasplantament, malgrat les diferències d'intensitat el patró de bandes era molt similar. Les IgM dels diferents dies postrasplantament comparteixen una reacció més intensa amb proteïnes d'aproximadament 14, 21, 23, 28, 39 i 60 Kda, que no s'observa amb les mostres d'abans del trasplantament.

Figura 58: Immunoblot



### 4.2.9 Nivells sèrics d'anticossos antihàmsster.

La quantitat d'anticossos antihàmsster presents en sèrum va ser valorada per citometria de flux (figura 60). La seqüència de producció de xenoanticossos, tant IgM com IgG, va ser molt similar als tres grups de l'estudi. Al setè dia després del trasplantament els títols d'anticossos IgM en sèrum presentaven un increment de 10 o 12 cops els nivells d'abans del trasplantament. El mateix dia també s'observà un pic d'anticossos IgG però era de molta menys intensitat. Els valors dels títols d'anticossos antihàmsster el dia 15 posttrasplantament eren pràcticament iguals als d'abans de la intervenció i així es van mantenir fins i tot després de retirar la immunosupressió i fins la mort de l'animal. Ho podem observar a la figura següent (figura 59):

Figura 59: Nivells d'anticossos en sèrum.

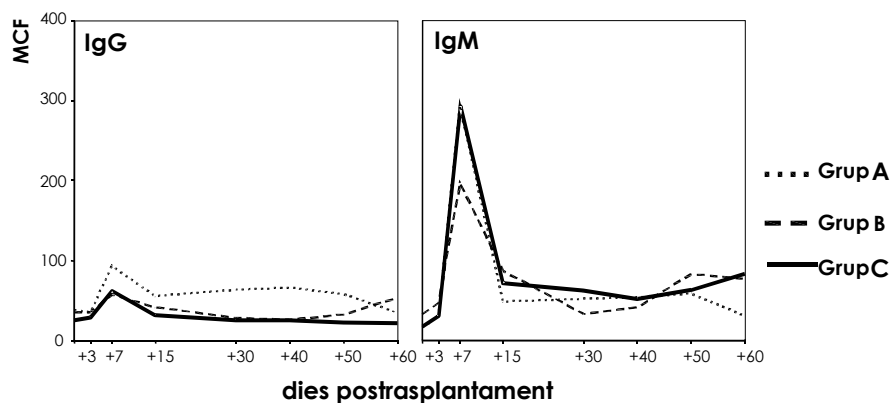




Figura 60: Histogrames dels nivells d'anticossos en sèrum a diferents dies posttrasplantament.

