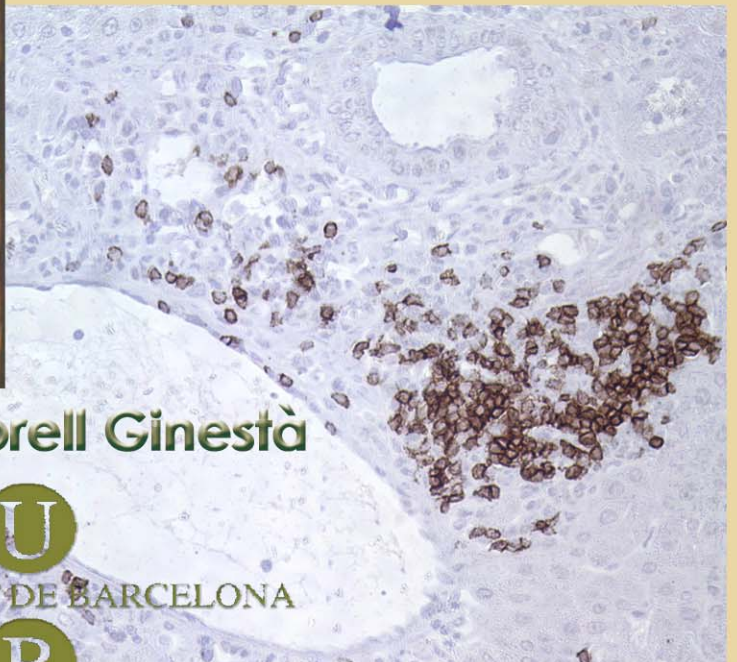
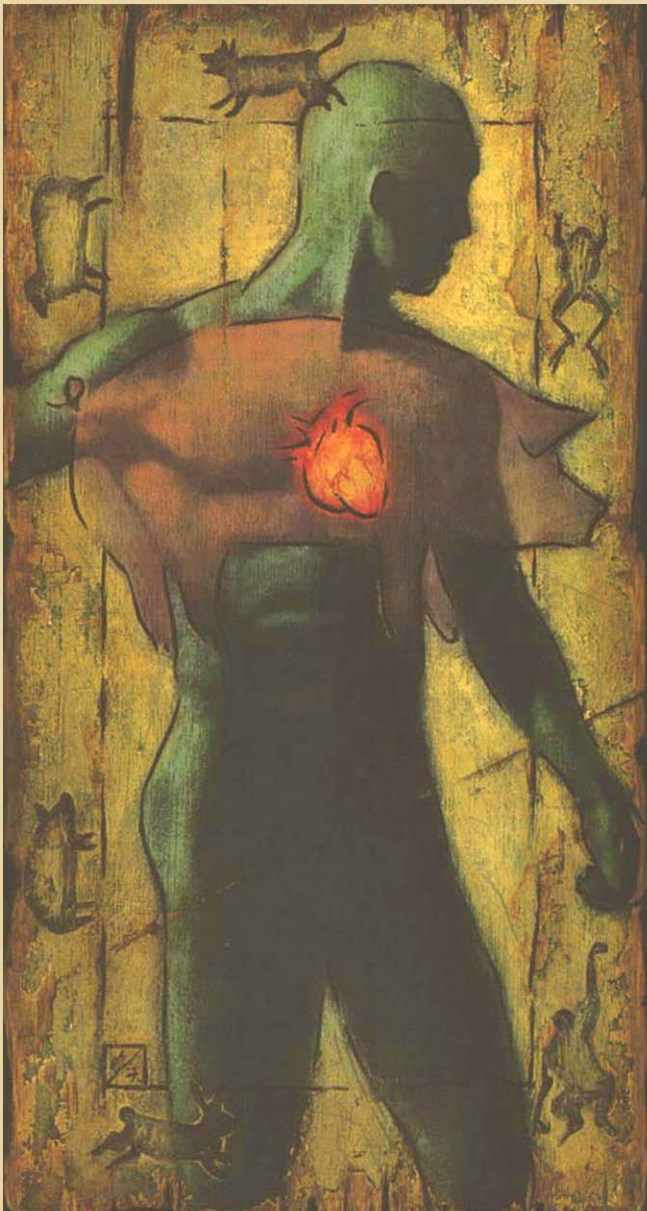


Disseny d'una pauta immunosupressora en un model de xenotrasplantament hepàtic en rosegadors: alteracions del sistema immunitari i del status hemostàtic



Mireia Morell Ginestà



UNIVERSITAT DE BARCELONA





Facultat de Medicina

Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques

**Disseny d'una pauta immunosupressora en un
model de xenotrasplantament hepàtic en
rosegadors: alteracions del sistema immunitari i del
status hemostàtic.**

Tesi doctoral presentada per Mireia Morell i Ginestà per optar al grau de doctora en biologia, dirigida pel Prof. Eduard Jaurrieta i el Dr. David G. Molleví.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

En Eduard Jaurrieta Mas, Catedràtic de Cirurgia de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona i En David Garcia i Molleví, Doctor en Biologia per la Universitat de Barcelona.

CERTIFIQUEN:

Que la tesi doctoral titulada: **“Disseny d’una pauta immunosupressora en un model de xenotrasplantament hepàtic en rosegadors: alteracions del sistema immunitari i del *status* hemostàtic”**, realitzada per na Mireia Morell i Ginestà per aspirar al grau de Doctora en Biologia, és en condicions de ser presentada i sotmesa a l’aprovació del tribunal convocat.

La qual cosa es fa constar a tots els efectes a 23 de febrer del dos mil quatre

Professor Eduard Jaurrieta Mas

Co-director de la present tesi

Dr. David Garcia i Molleví

Co-director de la present tesi

“Res és tan fàcil com sembla”.

Albert Einstein.

Al padrí.

Al David,

per totes les hores, l'esforç, els sacrificis
i la il·lusió que ha dipositat en aquesta tesi.

AGRAÏMENTS.

Al professor Eduardo Jaurieta Mas, catedràtic del Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques de la Universitat de Barcelona per haver-me obert les portes i donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi. Així com la confiança que ha dipositat en mi i les facilitats que m'ha donat per tal d'intentar-me obrir camí en allò que sempre he tingut la il·lusió de poder-me dedicar, el complicat i difícil món de la recerca biomèdica.

Al David Garcia i Molleví, codirector d'aquesta tesi, company de laboratori i amic. Pel seu suport incondicional, pel seu ajut intel·lectual, sense el qual aquesta tesi hagués estat totalment impossible i per les hores que s'ha passat amb els ulls enganxats a la lupa i entremig del material quirúrgic i els animals, feina sovint farregosa i poc agràida. Per les llargues discussions dels resultats i per ajudar-me a superar els problemes que tota tesi implica, tot i que unes més que altres. Li agraeixo que m'hagi ajudat a fer més amenes les hores que he passat al laboratori, que no han estat poques, i que m'hagi aguantat les meves "neures" i la força que m'ha comunicat per superar els moments difícils.

Al doctor Joan Figueras Felip, professor titular de la Universitat de Barcelona, pel seu suport intel·lectual i per rebre'm a la Unitat de Trasplantament Hepàtic, donar-me confiança, fer-me sentir a gust realitzant una tasca que era totalment nova per mi i no cansar-se mai de respondre la quantitat de preguntes que li he fet.

Al Daniel Azuara company de laboratori per haver-me aguantat tot aquest temps les meves "neures" i manies sense queixar-se i haver-me sabut escoltar quan ho he necessitat. Pels cafès xerrats del matí i pels molts dinars de carmanyola i a la "bene" que hem compartit.

A la Yolanda Ribas per poder compartir els resultats dels seu estudi. Per la seva amistat i tots els sopars parlant del xenotrasplantament dels que sempre he après.

A la Dra. Teresa Serrano per totes les hores que s'ha passat al microscopi mirant els "fetges de rata", pel seu esforç per extrapolar els seus coneixements del camp del trasplantament hepàtic en humans al camp de xenotrasplantament en rosegadors i per facilitar-me que em podés moure pel servei d'Anatomia Patològica amb tranquil·litat.

A la Dra. Mariona Mestre i al Dr. Jordi Bas per fer-me entendre una mica més la Immunologia, que ha estat molt important per realitzar aquesta tesi. Per deixar-me entrar al seu laboratori i aguantar amb filosofia l'insistent que sovint he estat.

Al Dr. Pere Domènech per la seva col·laboració en la realització de les determinacions dels paràmetres hemostàtics, la discussió dels seus resultats i el seu bon humor.

A tots els de la UTH per haver obert les portes a una "bàsica" i haver-me ajudat a poder realitzar la tasca que he estat duent a terme aquest últim any encara que sovint ha volgut dir aguantar moltes preguntes i omplir formularis una mica pesats i capritxosos.

Al Jordi, la Caita i la Carme pels molts dies que he interferit a la seva feina i que no s'han queixat, especialment al Jordi que sempre ha posat un toc de bon humor a les hores que he passat al laboratori d'Immunologia.

A l'Agnès Figueras per haver-me ensenyat a fer "immunos" i per haver-me aconsellat quan em trobava en un carreró sense sortida intentant posar apunt les diferents tècniques d'immunohistoquímiques, que potser no sembla però són molt capricioses.

A la meua família que sempre m'han recolzat i m'han donat ànims per superar els moments en que les forces baixaven i així poder acabar aquesta tesi que no ha estat fàcil.

A la Mercè i a la Cristina per escoltar-me i aguantar-me els rotllos que els he donat durant tot aquest temps. Em sembla que gairebé tenen tantes ganes com jo de que acabi la tesi!

A tots els meus amics, els de la "facu" i els del poble, que continuen al meu costat malgrat que sovint jo no he tingut temps per ells i els he donat la pallissa sempre amb el mateix tema i que m'imagino que han acabat del "xeno" i de la meua tesi fins al cap d'amunt.

A tots aquells que m'han ensenyat el que no sabia i m'han despertat que el que ja sabia.

ÍNDEX

1. Introducció	3
1.1. Aspectes immunològics	6
1.1.1. Immunologia del rebuig xenogènic	6
1.1.1.1. Xenoanticossos i xenoantígens	6
1.1.1.2. Complement	9
1.1.1.3. Cèl·lules endotelials	11
1.1.2. Tipus de rebuig xenogènic	13
1.1.2.1. Rebuig hiperagut	13
1.1.2.2. Rebuig vascular agut	18
1.1.2.3. Rebuig cel·lular xenogènic	20
1.1.2.4. Rebuig tardà del xenoempelt	22
1.1.3. Acomodació	23
1.1.4. Tolerància	24
1.1.4.1. Generalitats	24
1.1.4.2. Mecanismes per induir tolerància	29
1.2. Aspectes no immunològics	33
1.2.1. Barreres anatòmic-fisiològiques	33
1.2.2. Barreres metabòliques	34
1.2.3. Xenozoonosis	36
1.2.4. Aspectes ètics	37
1.3. Fàrmacs immunosupressors	38
1.4. Trasplantament hepàtic	41
1.4.1. El fetge: generalitats	41
1.4.2. Trasplantament hepàtic clínic	44
1.4.3. Immunologia del trasplantament hepàtic	49
1.4.4. Models experimentals en trasplantament	50
1.4.5. Xenotrasplantament	51
1.5 Factor Activador de plaquetes (PAF)	55
1.5.1. Síntesi i degradació del PAF	55
1.5.2. Receptor del PAF	59
1.5.3. Efectes del PAF	60
1.5.4. El PAF i els òrgans trasplantats	61
1.5.5. Antagonistes del PAF	62

1.5.6. UR12670	63
2. Hipòtesis i objectius	67
3. Material i mètodes	75
3.1 Animals d'experimentació	75
3.2 Fàrmacs administrats	76
3.2.1. immunosupressors	76
3.2.2. Antagonista del PAF	77
3.3 Intervenció quirúrgica	77
3.3.1. Intervenció en el donant	78
3.3.2. Intervenció en el receptor	80
3.4. Disseny experimental	85
3.4.1. Disseny de l'estudi 1	85
3.4.2. Disseny de l'estudi 2	86
3.5. Obtenció de mostres	87
3.5.1. Obtenció de sèrum	87
3.5.2. Obtenció de sang total	88
3.5.3. Obtenció de teixit hepàtic	88
3.6. Estudi histològic	88
3.7. Proves de funció hepàtica	90
3.8. Tincions immunohistoquímiques	90
3.8.1. Dipòsits d'anticossos i molècules del complement C3.....	90
3.8.2. Cèl·lules de Kupffer i Natural Killer	91
3.8.3. Limfòcits CD8 ⁺ i CD45RC ⁺	92
3.8.4. Cèl·lules B	92
3.8.5. Macròfags	93
3.8.6. Recompte de limfòcits infiltrants al parènquima	93
3.9. Realització d'hemogrames	94
3.10. Determinació de subpoblacions limfocitàries en sang perifèria.....	94
3.11. Valoració de paràmetres de la cascada de la coagulació.....	96
3.12. Quantificació de xenoanticossos en sèrum	96
3.13. Valoració de la molècula del complement C3 en sèrum	97
3.14. Determinació antigènica dels anticossos	98
3.14.1. Immunoblot	98
3.14.2. Immunohistoquímica indirecta	99
3.15 Metodologia estadística	99

4. Resultats	103
4.1 Estudi 1	103
4.1.1 Estudi histològic	104
4.1.2 Proves de funció hepàtica	107
4.1.3 Estudi immunohistoquímic	108
4.1.4 Subpoblacions en sang perifèrica	114
4.1.5 Canvis en la cascada de la coagulació	125
4.2 Estudi 2	133
4.2.1 Supervivència de l'empelt	133
4.2.2 Proves de funció hepàtica	134
4.2.3 Estudi histològic	135
4.2.4 Caracterització immunohistoquímica	138
4.2.5 Determinació de dipòsits d'anticossos i complement	141
4.2.6 Valoració del complement	142
4.2.7 Proves d'immunofluorescència indirecta	146
4.2.8 Especificitat dels xenoanticossos a diferents dies postrasplantament	147
4.2.9 Nivells sèrics de xenoanticossos	148
5. Discussió	153
6. Conclusions	171
7. Bibliografia	175

PRINCIPALS ABREVIATURES.

AT: Antitrombina.

AST: Aspartate aminotransferasa.

ALT: Aspartate aminotransferase.

AVXR: Acute Vascular Xenograft Rejection.

AXR: Acute Xenograft Rejection.

BN: Brown norway rats.

CPA: Cèl·lula presentadora d'antígens.

CVF: Cobra VenomFactor.

DA: Dark Agouti rats.

DAF: Decay Acceleration Factor.

FITC: Tiocianat de Fluoresceïna.

GS: Golden Syrian hamsters.

H-E: Hematoxilina Eosina.

IL: Interleuquina.

LXR: Late Xenograft Rejection.

MMF: Mofetil Micofenolat.

NK: Natural Killer cells.

ON: Over night.

PAF: Platelet Activating Factor.

PBS: Phosphate Buffered Saline.

PE: Ficoeritrina.

TAT: Trombina-Antitrombina.

TP: Temps de protrombina.

TTPA: Temps de tromboplastina parcial activada.

TNF- β : Tumor Necrosis Factor β .