

EMPREGO DO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS NO TRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE CORAÇÃO EM CÃES



Noedir A. G. Stolf⁽¹⁾
Roberto Costa⁽²⁾
Antônio A. Groppo⁽³⁾
Luiz Felipe P. Moreira⁽³⁾
Heitor N. Tupinambá⁽³⁾
Gilmar G. Santos⁽³⁾
Eduardo C. Lima⁽³⁾
Paulo M. P. Fernandes⁽³⁾

1. INTRODUÇÃO

O transplante de coração tem sido considerado o método de escolha para o tratamento de pacientes com afecções cardíacas terminais, irreversíveis, sem respostas à terapêutica clínica e sem possibilidade de cirurgia pelos métodos habituais.

Apesar dos estudos realizados no sentido de desenvolver modelos de coração artificial, este ainda não tem perspectiva de aplicação clínica rotineira (1).

LOWER & col. (2), em 1961, padronizaram experimentalmente a técnica de transplante de coração em posição ortotópica e BARNARD, em 1967, realizou o primeiro humano com sucesso (3).

A experiência decorrente da análise de grupos maiores de pacientes transplantados demonstra que o fator fundamental para o sucesso da cirurgia é o controle adequado da rejeição (4,5) e que, a despeito dos esforços desenvolvidos, as drogas imunodepressoras utilizadas na clínica são as mesmas há mais de 5 anos (5, 6).

Atualmente, um dos métodos mais seguros de diagnóstico da rejeição é o emprego de biópsias endomiocárdicas repetidas (5), proposto inicialmente por CAVES & col. em 1972 (7).

Trabalho realizado na Divisão de Experimentação do Instituto do Coração e no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Outros métodos utilizados nesse diagnóstico se baseiam na avaliação hemodinâmica do coração transplantado (8-10) e no emprego de testes imunológicos que avaliem os mecanismos da hipersensibilidade tardia (11-14).

O transplante heterotópico de coração em cães, foi descrito pela primeira vez, em 1905 por CARREL & GUTHRIE (15). Desde então, várias técnicas para esse tipo de transplante têm sido descritas com a finalidade de estudar o órgão transplantado (16-19) e com a finalidade de assistência circulatória (coração auxiliar) por períodos variáveis (20-23).

Desde que DAVID & col. (24), em 1964, descobriram a existência do Fator de Inibição da Migração de

Macrófagos, foi padronizado o teste de inibição da migração de leucócitos, que tem sido correlacionado com a existência de hipersensibilidade tardia (25, 26).

O uso desse método no diagnóstico da rejeição em homoenxertos, tem sido referido por diversos autores após a realização de transplantes renais (27-30).

O objetivo do presente trabalho é o estudo da evolução do transplante heterotópico de coração comparando os achados de biópsias e o teste de inibição da migração de leucócitos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 22 cães mestiços, machos, operados aos pares, sendo um doador e o outro receptor. O peso variou de seis a 14 quilos para o doador e de 16 a 32 quilos para o receptor.

Foi realizado o transplante heterotópico de coração para o abdome.

2.1. Técnica Operatória

Em todos os animais a anestesia era realizada com pentobarbital sódico na dose de 30 mg/Kg de peso, seguida de intubação orotraqueal e ventilação artificial com respirador Takaoka.

A artéria femoral direita e uma veia periférica eram cateterizadas, a primeira para controle de pressão arterial e colheita de amostras e a segunda para infusão de líquidos e medida de pressão venosa central.

2.1.1 — Preparo do Doador

Era realizada toracotomia longitudinal com esternomia mediana e, a seguir, dissecação, ligadura e secção da veia azigos, dissecação e reparo dos ramos da croça da aorta, da aorta descendente e da veia cava superior.

O pericárdio era, então, aberto e reparado para dissecação das veias pulmonares e veia cava inferior.

Antecedendo a retirada do órgão, era administrada heparina na dose de 4 mg/Kg de peso e hipotermia tóxica com solução fisiológica a 4°C.

O coração era retirado após ligadura e secção dos vasos.

Através da veia cava superior era ressecada a valva tricúspide, juntamente com os músculos papilares do ventrículo direito. Esses serviam para estudo histológico.

(1) Prof. Livre-Docente de Clin. Cirúrgica e Resp. pelo Lab. de Pesq. em Circ. Torácica.

(2) Médico-Residente do Departamento de Cirurgia.

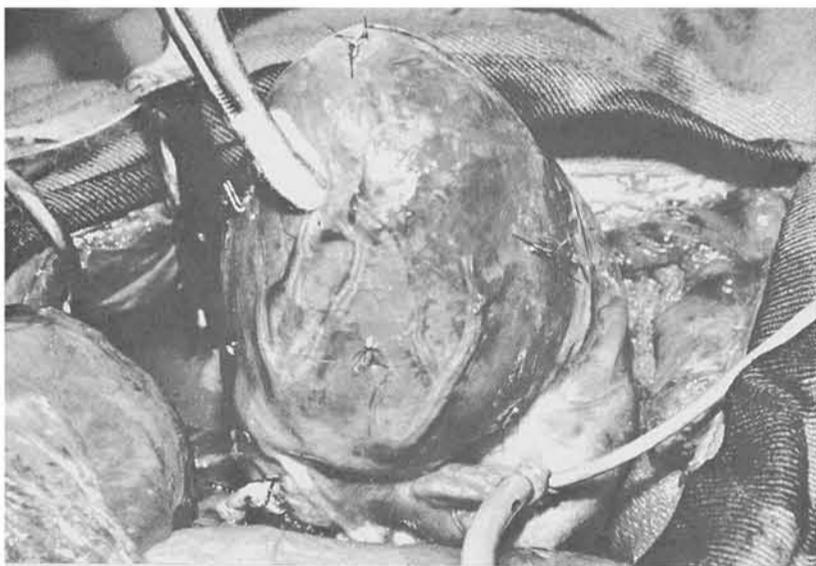
(3) Acadêmico-Estagário da Div. de Exp. e do Lab. de Pesq. em Cir. Torácica.

2 1 2 — Preparo do Receptor

Após laparotomia longitudinal mediana infra-umbelical, dissecava-se a aorta abdominal logo acima da bifurcação das artérias ilacas e a veia cava inferior em extensão de cinco centímetros.

Clampeada a aorta abdominal era realizada anastomose término-lateral entre a aorta ascendente do coração do doador e a aorta do receptor através de sutura contínua. Em seguida, realizava-se anastomose término-lateral entre a veia cava superior do coração do doador e a veia cava inferior do receptor pela mesma técnica.

Quando ocorria fibrilação ventricular, realizava-se desfibrilação elétrica do coração. Iniciava-se sistematicamente a administração de solução de isoprenalina até a obtenção de batimentos cardíacos satisfatórios. (Fig. 1).



Fotografia do campo operatório do cão receptor após o término do transplante.

2.2 — Avaliação Imunológica

Era realizado o teste de inibição da migração de leucócitos do sangue periférico, pelo método de CLOT modificado (28, 31).

Por meio de sedimentação do sangue periférico do animal receptor a 37°C e três lavagens sucessivas do sobrenadante, obtinha-se suspensão de leucócitos que era colocada em tubos capilares a uma concentração de 2×10^7 células por ml e centrifugada para obtenção de um "botão celular", que correspondia a 30 a 50% de linfócitos.

Esse "botão celular" era então incubado em câmaras controles e frente a duas concentrações diferentes de antígeno específico, correspondendo a 1×10^6 e 2×10^6 células por ml, obtidas através da lise por ultrassom dos leucócitos do sangue do animal doador.

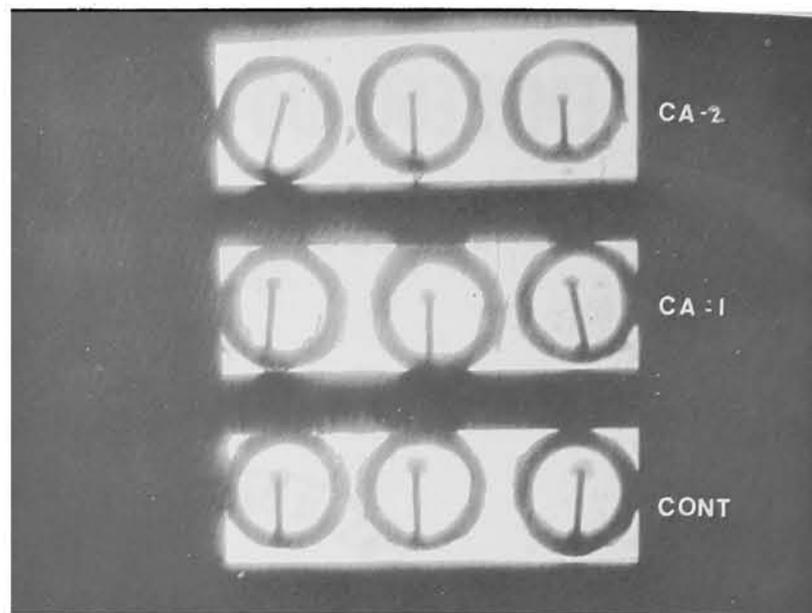
Incubava-se a 37°C, durante 24 horas e realizava-se a leitura da migração através de retroprojeter, sendo as áreas obtidas medidas por planimetria. (Fig. 2).

Era então obtido o índice de migração através da razão entre as áreas de migração frente ao antígeno específico e as áreas de migração controle.

Esse estudo era realizado no primeiro, quinto, oitavo, décimo-segundo e décimo-quinto dia de pós-operatório, quanto ocorria sobrevida.

2.3 — Estudo Histológico

Os fragmentos de biópsias, realizadas de maneira simultânea à avaliação imunológica, ou obtidos na necropsia dos animais eram analisados através da coloração hematoxilina-eosina, com o objetivo de constatar-se



Aspecto do estudo histológico mostrando comprometimento vascular através de infiltrado linfohistioplasmocitário, sugestivo de rejeição.

alterações da estrutura cardíaca e a presença ou não de rejeição.

O infiltrado celular sugestivo de rejeição, se presente, era classificado em leve, moderno e intenso.

3. RESULTADOS

3.1 — Resultados da avaliação imunológica

Os resultados obtidos pelo teste de inibição da migração de leucócitos do sangue periférico do animal receptor estão na Tabela I. Os dados da tabela são mais facilmente analisados nos gráficos seguintes.

Nos Gráficos 1 e 2 estão colocados em ordenadas os índices de migração e em abcissas o dia de pós-operatório em que foi realizado o teste. O gráfico 1 corresponde aos testes realizados com melhor concentração de antígeno. No gráfico 2 a concentração é maior. Nesses gráficos os valores do índice de migração são representados por sinais diferentes, correspondentes aos achados histológicos das biópsias, obtidas no mesmo momento da colheita do sangue para a realização do teste.

Observa-se nos dois gráficos um aumento do índice de migração no primeiro dia de pós-operatório, na maior parte dos cães. Durante a evolução pós-operatória nota-se tendência a queda do índice de migração, fundamentalmente nos casos em que havia evidência histológicas de rejeição.

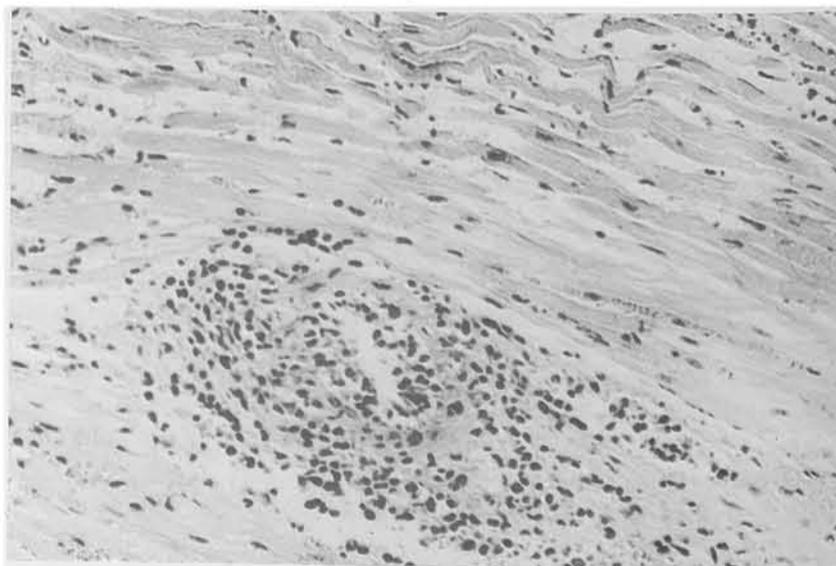


Imagem obtida pelas áreas de migração através de retroprojeter, mostrando as áreas de migração controle (CONT.) a frente às duas concentrações de antígeno (CA-1 e CA-2).

A comparação entre os dois gráficos mostra que em presença de uma concentração maior de antígeno, os valores encontrados no índice de migração foram mais distantes dos limites normais. Por outro lado, no gráfico 2, no primeiro dia de pós-operatório, havia em dois casos valores baixos do índice de migração, sem alterações histológicas.

Os dois gráficos seguintes mostram com maior clareza a evolução dos valores do índice de migração. No gráfico 3 está colocada a curva obtida pelo teste de inibição da migração de leucócitos no cão n.º 8, com duas concentrações de antígeno. O estudo histopatológico deste animal revelou o aparecimento gradual de infiltrado linfohistioplasmocitário e de comprometimento vascular, observador na figura 3. No primeiro dia de pós-operatório obteve-se o aumento do índice de migração e observa-se, durante a evolução pós-operatória, a queda desse índice concomitante com o aparecimento de rejeição.

No gráfico 4 temos a curva obtida no cão n.º 9. Nesse animal não se evidenciou comprometimento histológico compatível com rejeição e não houve grande variação dos valores do índice de migração.

3.2 — Resultados do estudo histológico

Os resultados dessa avaliação são mostrados na Tabela II e comparativamente com os resultados do teste de inibição da migração de leucócitos nos gráficos 1, 2, 3 e 4.

4. DISCUSSÃO

O transplante heterotópico de coração tem sido utilizado por diversos autores no estudo evolutivo dos homoenxertos cardíacos (16-19).

Nos transplantes para o pescoço ou abdome, a técnica classicamente descrita são as anastomoses através da artéria pulmonar e da aorta do coração doador (18, 19).

Nesse trabalho realizou-se uma modificação da técnica clássica. A drenagem das câmaras direitas do coração transplantado foi feita através da anastomose da veia cava superior do doador, após retirada da valva tricúspide, em lugar da drenagem pela artéria pulmonar anastomosada à veia cava inferior do receptor. Acreditamos que essa modificação permite melhor posicionamento do coração e menor chance de acotovelamento das anastomoses.

Essa técnica foi usada inicialmente em transplantes para o pescoço. Quando realizado para o abdome, verificou-se que as condições hemodinâmicas do órgão transplantado foram melhores (32).

A rejeição, cuja gênese está relacionada com os mecanismos de hipersensibilidade tardia, tem sido estudada por vários autores através de testes que avaliem a resposta linfocitária (11-14, 27-30).

As técnicas usadas em homoenxertos cardíacos incluem a avaliação da blastogênese leucocitária através da incorporação de timidina tritiada (13, 14) e o mapeamento da região afetada pelo comprometimento inflamatório através de cintilografia (12). Nos casos tratados com globulina anti-timocitária, a análise de sua meia vida e a contagem dos linfócitos T e B circulantes tem sido relacionadas ao aparecimento de rejeição (11).

O teste de inibição da migração de leucócitos, cujas alterações revelam a presença de hipersensibilidade tardia, tem sido empregado no diagnóstico da rejeição em homoenxertos renais (27-30).

O emprego desse teste baseia-se nas variações do índice de migração. A queda do índice abaixo dos valores normais, correspondendo a uma fase de inibição da migração, sugere a presença de rejeição (29, 30). Em outros estudo, a crise de rejeição é representada no

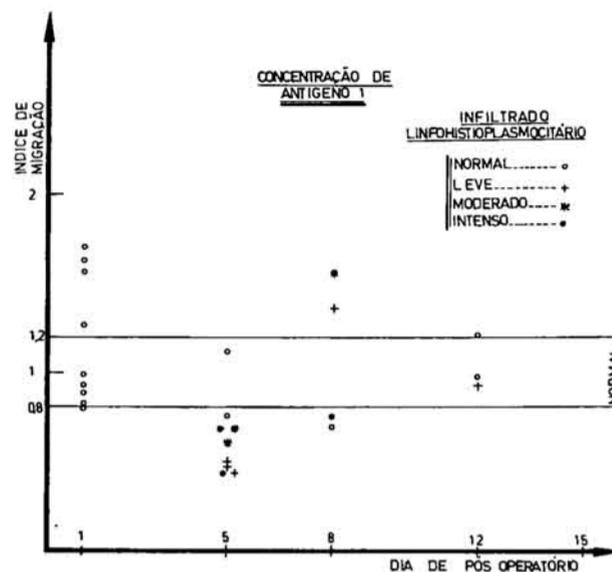


Gráfico 1

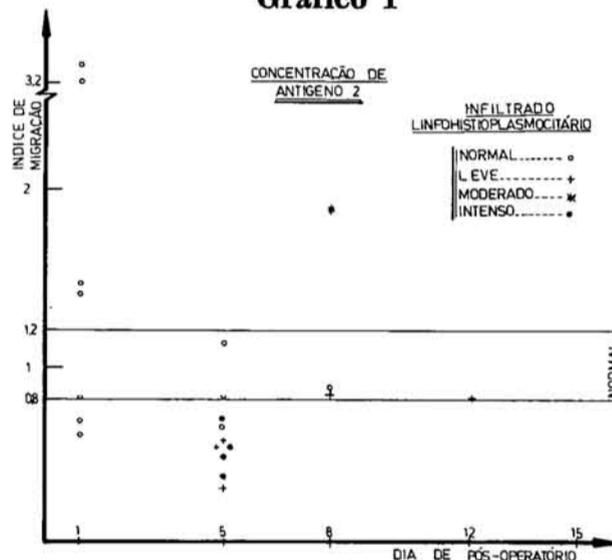


Gráfico 2

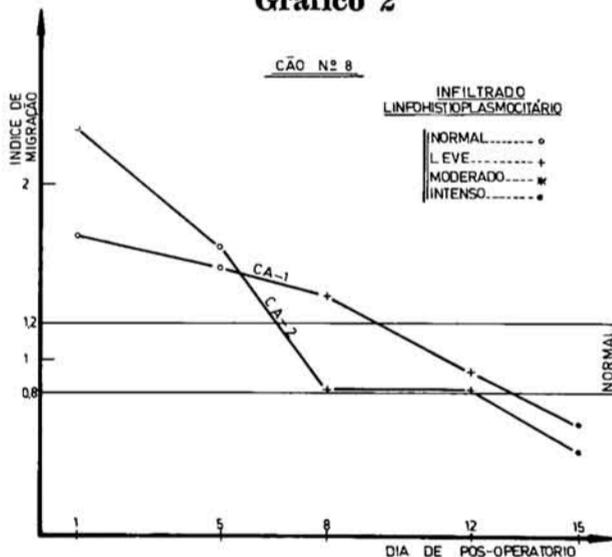


Gráfico 3

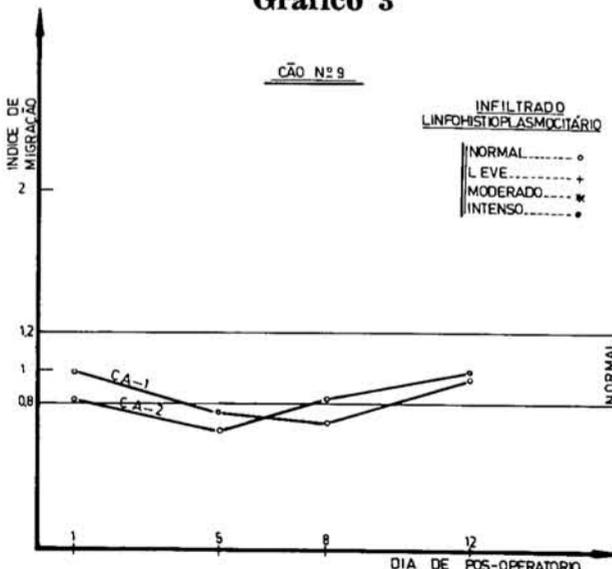


Gráfico 4

TABELA I TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS

CÃO	CONC. DE ANTÍGENO	DIA DE PÓS-OPERATÓRIO				
		1º	5º	8º	12º	15º
01	CA - 1	0,88	-	-	-	-
	CA - 2	0,68	0,82	-	-	-
02	CA 1	1,39	0,68	-	-	-
	CA 2	3,17	0,37	-	-	-
03	CA - 1	1,81	0,43	-	-	-
	CA 2	3,22	0,69	-	-	-
04	CA 1	1,62	0,43	-	-	-
	CA 2	-	0,55	-	-	-
05	CA 1	0,92	0,48	-	-	-
	CA 2	0,59	0,52	-	-	-
06	CA 1	1,26	1,11	-	-	-
	CA 2	1,46	1,13	-	-	-
07	CA 1	1,57	0,45	1,56	1,21	-
	CA 2	1,8	0,29	1,88	1,56	-
08	CA 1	1,7	1,53	1,37	0,92	0,64
	CA 2	2,33	1,64	0,82	0,81	0,48
09	CA 1	0,98	0,77	0,7	0,95	-
	CA 2	0,81	0,66	0,83	0,96	-
10	CA 1	0,8	0,68	-	-	-
	CA 2	1,4	0,52	-	-	-
11	CA 1	0,81	0,6	0,74	-	-
	CA 2	1,04	0,48	0,62	-	-

TABELA II - ESTUDO HISTOLÓGICO

CÃO	DIA DE PÓS-OPERATÓRIO				PARADA DO COR. TRANSPL.
	5º	8º	12º	15º	
01	N				4º PO
02	++				6º PO
03	+++				6º PO
04	+				5º PO *
05	N	+			7º PO
06	N				5º PO *
07	+	++	N		12º PO
08	N	+	+	+++	15º PO
09	N	N	N	N	15º PO
10	++				5º PO
11	++	+++			8º PO

N Normal.

Infiltrado linfohistioplasmocitário (+) a (+++).

* Óbito do animal

teste através de um estímulo seguido de inibição da migração (28).

Várias técnicas para esse teste foram descritas e o antígeno utilizado tem sido obtido através da lise de leucócitos do sangue periférico (28) ou através de células esplênicas, renais e do tecido linfóide do doador (29, 30).

No presente trabalho, foi usado o antígeno obtido pela lise de leucócitos do doador, em duas concentrações diferentes.

Observa-se, nos resultados do estudo, um aumento do índice de migração no primeiro dia de pós-operatório, na maior parte dos cães, revelando uma fase inicial de estimulação da migração. A tendência à queda desse índice, que ocorreu na maioria dos animais, durante a evolução pós-operatória, revelou a presença de rejeição no estudo histológico.

Não se observou relação entre os níveis de inibição da migração no teste e a intensidade do processo de rejeição, em discordância com dados referidos por outros autores (27).

A verificação de valores mais distantes dos limites normais, em presença de uma concentração maior de antígeno, sugere uma sensibilidade maior do teste nessa concentração. Por outro lado, os valores do índice de migração encontrados abaixo dos limites normais, sem alterações histológicas, revelam uma confiabilidade menor do teste nessa mesma concentração. O uso das duas concentrações de antígeno permite uma análise melhor dos resultados obtidos.

Outros fatores, no entanto, podem interferir nos resultados do teste. Em um dos animais (cão n.º 9) houve pequena queda do índice de migração, pouco abaixo do limite normal, embora não houvesse evidência de rejeição na biópsia.

Em conclusão, o emprego do teste de inibição da migração de leucócitos proporciona um meio útil para o diagnóstico da rejeição nos transplantes cardíacos, de maneira não invasiva.

RESUMO

Em onze cães, o coração foi heterotopicamente transplantado para o abdome, segundo modificação da técnica clássica.

Foram realizados, de maneira simultânea e seriada, o teste de inibição da migração de leucócitos e o estudo histológico de biópsias do miocárdio.

Na avaliação imunológica realizada, houve estímulo da migração, seguido de inibição da migração de leucócitos, em casos em que houve rejeição e pequena variação do índice de migração, em casos em que ela não ocorreu.

Em conclusão, verificou-se que os parâmetros utilizados se correlacionam de maneira fiel, contribuindo para o diagnóstico da rejeição nos transplantes cardíacos, um deles de modo não invasivo.

SUMMARY

In eleven dogs the heart was heterotopically transplanted to the abdomen by a variation of the standart technique.

Serially and simultaneously were performed the leukocyte migration test and histological study of myocardial biopsys.

The immunological evaluation there was a stimulation followed by inhibition of leukocyte migration in cases of rejection and little variation in the test in the absence of rejection.

In conclusion it was verified that the used parameters have a good correlation and contribute to the diagnosis of rejection in cardiac transplantation one of them in a noninvasive way.

BIBLIOGRAFIA

1. LOSMAN, J.G. — Human technology after cardiac epigenesis. Artificial heart versus cardiac transplantation. South African M. J. 52: 570, 1977.
2. LOWER, R.R.; STOFER, R.F.; SHUMWAY, N.E. — Homovital transplantation of the heart. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 41: 196, 1961.
3. BARNARD, C.N. — The operation. South African M. J. 41: 1271, 1967.
4. BARNARD, C.N. — The present status of heart transplantation. South African M.J. 49: 213, 1975.
5. BAUMGARTNER, N.A.; REITZ, B.A.; BIEKER, C.P.; OYER, P.E.; SHUMWAY, N.E.; STINSON, E.B. — Current expectations in cardiac transplantation. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 75: 525, 1978.
6. BIEKER, C.P.; GRIEPP, R.B.; OYER, P.E.; WONG, J.; STINSON, E.B. — Use of rabbit antithymocyte globulin in cardiac transplantation. Transplantation 22: 478, 1976.
7. CAVES, P.K.; SCHULZ, W.P.; DONG, E.; STINSON, E.B.; SHUMWAY, N.E. — New instrument for transvenous cardiac biopsy. Am. J. Cardiol. 33: 264, 1974.
8. PENN, O.C.; BROWER, R.W.; LEICHER, F.; MEESTER, G.T.; BOS, E. — Orthotopic canine heart transplantation: left ventricular contractility during chronic rejection. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 71: 526, 1976.
9. STINSON, E.B.; INGELS, N.B.; ALDERMAN, E.L.; GRIEPP, R.B.; OYER, P.E.; COPELAND, J.G.; SHUMWAY, N.E. — New technique for serial noninvasive measurement of left ventricular dynamics in man: application to cardiac transplantation. Surg. Forum 26: 230, 1975.
10. STINSON, E.B.; TECKLENBERG, P.L.; HOLLINGSWORTH, J.F.; JONES, K.W.; SLOANE, R.; RAHMOELLER, G. — Changes in left ventricular mechanical and hemodynamic function during acute rejection of orthotopically transplanted hearts in dogs. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 68: 783, 1974.
11. BIEKER, C.P.; LYDICK, E.; GRIEPP, R.B.; OYER, P.E.; DAVID, L.A.; STINSON, E.B. — Relationships of rabbit ATG serum clearance rates to circulating T-cell levels, rejection onset and survival in cardiac transplantation. Transplant. Proc. 9: 1031, 1977.
12. GILLUM, R.F. — Leukocytic scintigraphy after cardiac transplantation. Am. J. Cardiol. 42: 528, 1978.
13. MORRIS, R.E.; DONG, E.; STRUTHERS, C.M.; GRIEPP, R.B.; STINSON, E.B.; BILLINGHAM, M.E.; SHUMWAY, N.E. — Immunological detection of human cardiac rejection. Surg. Forum 25: 282, 1974.
14. MORRIS, R.E.; DONG, E.; STRUTHERS, C.M.; GRIEPP, R.B.; STINSON, E.B. — Immunologic monitoring of cardiac transplant recipients by a modified reactive leukocyte blastogenesis by a modified reactive leukocyte blastogenesis assay (MRLB). Transplant Proc. 10: 585, 1978.
15. CARREL, A.; GUTHRIC, C.C. — The transplantation of veins and organs. Am. J. Med. 11: 1101, 1905.
16. MANN, F.C.; PRIESTLEY, J.T.; MARKONITZ, J.; YATER, W.M. — Transplantation on the intact mammalian heart. Arch. Surg. 26: 213, 1933.
17. MARCUS, E.; WONG, S.N.T.; LUISADA, A.A. — Homologous heart grafts I. Technique of intern parabiotic perfusion. II. Transplantation of the heart in dogs. Arch. Surg. 66: 179, 1953.
18. TOLEDO-PEREYRA, L.H.; CONDIE, R.M. — Improved survival of heart transplants. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 75: 536, 1978.
19. WESOLOWSKI, S.A.; FENNESSEY, J.F. — Pattern of failure of the homografted canine heart. Circulation 8: 750, 1953.
20. BARNARD, C.N.; LOSMAN, J.C. — Left ventricular bypass. South African M.J. 49: 303, 1975.
21. BARNARD, C.N.; LOSMAN, J.C.; SANCHEZ, H.E.; WOLPEWITZ, A. — The advantage of heterotopic cardiac transplantation over orthotopic cardiac transplantation in the management of severe acute rejection. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 74: 918, 1977.
22. BECK, W.; GERSH, B.J. — Left ventricular bypass using a cardiac allograft: hemodynamics studies. Am. J. Cardiol. 37: 1007, 1976.
23. MARCIAL, M.B.; STOLF, N.A.G.; ARMELIN, E.; LEMOS, P.C.P.; MACRUZ, R.; VERGINELLI, G.; ZERBINI, E.J. — Assisted circulation with an auxiliary heart transplant. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 63: 697, 1972.
24. DAVIS, J.R.; LAWRENCE, H.S.; THOMAS, L. — Delayed hypersensitivity in vitro: II — Effect of sensitive cells on normal cells in the presence of antigen. J. Immunol. 93: 274, 1964.
25. BLOMM, B.R.; BENETT, B. — Migration inhibitory factor associated with delayed type hypersensitivity. Feder. Proc. 27: 13, 1968.
26. SOBORG, M.; BENDIXEN, G. — Human lymphocyte migration as a parameter for hypersensitivity. Acta Med. Scand. 181: 247, 1967.
27. SMITH, M.G.M.; EDDLESTON, A.L.; DOMINGUEZ, J.A. — Changes in leucocyte migration after renal transplantation. Brit. Med. J. 4: 274, 1969.
28. WETZBERG, D.; KALNICKY, S.; GLINA, S.; SZEGO, T. — Emprego do teste de inibição da migração de leucócitos no diagnóstico da rejeição de transplantes renais. Rev. Med. 60: 81, 1976.
29. WOOD, R.F.M.; GRAY, A.C.; BRIGGS, J.D.; BELL, P.R.F. — The prediction of acute rejection in human renal transplantation using the leucocyte migration test. Transplantation 16: 41, 1973.
30. WOOD, R.F.M.; GRAY, A.C.; BELL, P.R.F. — Daily immunologic tests in the prediction of renal transplant rejection. Transplant. Proc. 10: 593, 1978.
31. CLOT, J. — Test de migration des leucocytes du sang circulant technique e interpretation statistique des resultats. Clinique St. Eloi, France.
32. MOREIRA, L.F.P.; TUPINAMBA, H.N.; SANTOS, G.G.; GROppo, A.A.; LIMA, E.C.; COSTA, R.; ARMELIN, E.; STOLF, N.A. — Transplante heterotópico de coração. Resultados preliminares. Ars Curandi Cardiol. 2(7): 63, 1979.

ESTAC

METOCLOPRAMIDA + VIT B6

PODEROSO ANTIEMÉTICO E NORMALIZADOR DAS FUNÇÕES DIGESTIVAS

APRESENTADO EM GOTAS E COMPRIMIDOS

GROSS

