

Persistencia de trasplantes xenoplásticos en anfibios anuros por tratamiento con semicarbácida

M. Alonso y A. Fraile

Laboratorio de Fisiología Animal. Facultad de Ciencias.
Universidad de Madrid (España)

(Recibido el 5 de junio de 1970)

M. ALONSO and A. FRAILE. *Survival of Xenoplastic Transplants by Semicarbazide In Anura*. R. esp. Fisiol., 26, 331-334, 1970.

Xenoplastic transplantations have been performed between *Discoglossus pictus* (anura) and *Rana esculenta* (anura). The grafts were taken from *Discoglossus* neurulas. The hosts (*Rana esculenta*) were operated at tail-bud stage.

After operation, larvae growing in Holtfreter's solution plus semicarbazide did not show the typical reaction of graft rejection. All the grafts were accepted under these conditions.

The possibilities of Histidine Decarboxylase Enzymatic System inhibition by semicarbazide and the role of intracellular histamine formed in the acceptance and rejection processes in low vertebrates are discussed.

Casi desde el tiempo del descubrimiento de la histamina, se sabe que esta sustancia está relacionada con la respuesta a la interacción antígeno-anticuerpo. También es conocida la relación de la histamina con la anafilaxia. En este sentido orientan sus trabajos KAHLSON *et al* (3), quienes encuentran una relación entre la respuesta antigénica y el aumento de actividad histidindescarboxilasa (HDC) en la mayor parte de los tejidos del cuerpo, en el cobayo.

KAHLSON diferencia la acción fisiológica de la histamina extracelular «descargada» y la histamina intracelular «formada». La concentración de esta última depende de la actividad del sistema enzimático HDC. Los efectos de la histamina intracelular formada no pueden ser bloqueados por los antihistamínicos ni pueden ser producidos por histamina extracelular inyectada.

MOORE y CHANG (6), después de observar la imposibilidad de prolongar los injertos de piel homoplásticos en rata, mediante el uso de antihistamínicos, dirigieron su atención hacia la formación y metabolismo de la histamina intracelular y la actividad del sistema HDC. Observan que el tiempo de rechazo del injerto coincide (en el grupo de trasplantes homoplásticos) aproximadamente con la elevación de la excreción de histamina urinaria — método utilizado por KAHLSON para medir la proporción de histamina intracelular formada —. El aumento de la cantidad de histamina excretada y el rechazo del injerto fueron observados también en la segunda serie de homoinjertos.

Estos resultados sugieren la posibilidad de que la histamina esté implicada en la respuesta de defensa del organismo a los tejidos trasplantados.

Recientes estudios han demostrado la

posibilidad de mantener la supervivencia de los homoinjertos mediante el tratamiento con inhibidores de la HDC, en ratas.

Estudios realizados por nosotros (2) en estados embrionarios de anfibios anuros demuestran la presencia de histidindescarboxilasa en estos primeros estados del desarrollo. Existe, pues, capacidad formadora de histamina en los embriones.

En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos en relación con la supervivencia de los trasplantes xenoplásticos entre dos géneros diferentes de anfibios anuros al estado larvario después de tratamiento, antes y después de la operación, con semicarbácida (SC), inhibidor de la histidindescarboxilasa, suministrada al medio salino (solución de Holtfreter al 10 %) en el que viven.

Material y métodos

Como animales receptores del injerto se utilizaron embriones de *Rana esculenta*. Los animales adultos, procedentes de diversas partes de España, principalmente de Segovia y Tarragona, fueron inducidos a ovular por inyección de extracto de hipófisis homoplásticas a las hembras. Se obtiene ovulación dentro de las 24 horas. Se realiza la fecundación experimental.

Los embriones de *Discoglossus pictus* se obtienen en el laboratorio por inyección de gonadotrofinas coriónicas de mamíferos (Gonavister) a machos y hembras. Los animales adultos fueron enviados gentilmente por el profesor REVERBERI (Director del Instituto de Zoología de Palermo).

Los embriones de *Rana* se dejan desarrollar hasta el estado de botón caudal inicial, mientras que el *Discoglossus* es utilizado al estado de néurula.

A las 24 horas de la fecundación la *Rana esculenta* alcanza el estado de mórula y en este estado se le priva de la envuelta gelatinosa que rodea el huevo, por tratamiento con tioglicolato sódico durante unos minutos. Después de lavados suficientemente se distribuyen en seis cápsu-

las que contienen concentraciones diferentes de SC en Holtfreter, a razón de 50 mórulas en cada una.

El número total de operados para cada concentración de SC es de cinco, de los cuales, en unos casos dos y en otros tres, pasan de nuevo, después de la operación, a semicarbácida y Holtfreter y el resto (hasta cinco) pasan a solución salina de Holtfreter.

Las concentraciones de SC en Holtfreter utilizadas han variado de 10^{-2} M a 10^{-6} M. Se han operado al mismo tiempo cinco controles.

Los embriones colocados en SC 10^{-2} M no fueron operados. De las 50 mórulas en SC se separan cinco cuando han alcanzado el estado de botón caudal, que suele ser a los tres días en *Rana esculenta*. Excepto en el caso de SC 10^{-3} M, en que el injerto consta de lámina neural, crestas neurales y techo del arquéteron, en el resto el injerto está formado por la lámina neural y porción más dorsal del techo del arquéteron del embrión dador *Discoglossus pictus*. El injerto se realiza en la región ventral del animal huésped.

La operación de trasplante se hace en cápsulas de Siracusa o de Petri indistintamente, con fondo de agar saturado de sulfatiazol, en donde se practica una pequeña cavidad. Se utilizan finas agujas de tungsteno para realizar el trasplante y se disponen encima pequeños puentes para mantener el injerto. No ha dado resultado el método aconsejado por otros autores de cubrir el embrión en la parte operada con plastilina convenientemente lavada. El injerto prende en un plazo de media hora.

Se dejan desarrollar y se observa periódicamente la reacción.

Resultados

TRATAMIENTO DE LOS EMBRIONES DE RANA ESCULENTE AL ESTADO DE NÉURULA CON SEMICARBACIDA.

Semicarbácida 10^{-2} M. — Se ha observado que los embriones no progresan

en el desarrollo. La membrana que los envuelve se hace muy opaca en los cinco embriones a las 19 horas. Algunos se privan de sus membranas, pero tampoco éstos avanzan en el desarrollo. A las 38 horas el ectodermo se hace más claro que en los controles.

En este estado se mantienen durante 8 días. No se desintegran pero tampoco progresan.

No se hizo con ellos operación ninguna. Tenemos en estudio la posibilidad de revitalización de estos tejidos.

Semicarbacida 10^{-3} M. — Los resultados obtenidos de los injertos de *Discoglossus* en *Rana* son los siguientes:

1.º De los cinco individuos operados (*Rana esculenta*) con crestas neurales, placa neural y porción dorsal del arquenteron, tres se conservan en la misma placa de agar y Holtfreter en que se hizo la operación. A pesar de haber estado en SC 10^{-3} M tres días antes, se observa que a las 16 horas comienza el rechazo del injerto. Las células del injerto se hacen grises, pierden vitalidad y pronto el trasplante es rechazado. Se observa que en el lugar del rechazo el ectodermo se hace muy fino y muy claro, mientras que en los alrededores se arruga fuertemente y se oscurece.

2.º El resto hasta cinco se colocan de nuevo en el medio con semicarbacida. El trasplante se adhiere perfectamente, y aunque a las 38 horas expulsa una pequeña vesícula de ectodermo perteneciente al *Discoglossus* dador, el resto del trasplante continúa perfectamente adherido al huésped.

A los diez días se trasladan a solución salina sin semicarbacida, para ver si el injerto es rechazado. Durante seis horas, al menos, éste permanece en perfecto estado. Después se fijan en Bouin.

Semicarbacida 10^{-4} M, 10^{-5} M y 10^{-6} M. La operación en estos casos se realizó to-

mando la placa medular truncal y la región más dorsal del techo del arquenteron.

En todos los casos, parte de los embriones permanecen en la cápsula donde se realizó la operación, manteniéndose en el medio salino acostumbrado sin SC. En todos ellos existe rechazo evidente del trasplante en las 16 horas posteriores. Los demás, pasados a SC, se mantienen perfectamente. Se conservan la mayoría durante doce días. Después se fijan en Bouin.

No se han observado diferencias con respecto a la sobrevivencia de los trasplantes a diferentes concentraciones de semicarbacida.

Si al cuarto día se trasladan al medio salino sin SC, el trasplante es rechazado violentamente, apareciendo la reacción típica observada en las operaciones de control.

En las operaciones de control, realizadas también en número de cinco, el trasplante es rechazado a las 16 horas y a veces antes. Es típica la aparición de una zona clara en la región del trasplante, rodeada de otra oscura y muy plegada.

Discusión

Los resultados anteriormente expuestos nos permiten concluir que la semicarbacida, a concentraciones variables de 10^{-3} a 10^{-6} M en solución salina de Holtfreter, permite la supervivencia de los trasplantes xenoplásticos de *Discoglossus pictus* (anfibio anuro) en un huésped *Rana esculenta* (anfibio anuro).

En los embriones operados tomados como controles y mantenidos en Holtfreter al 10 % (solución salina de anfibios) antes y después de la operación, el tiempo medio de sobrevivencia del injerto en el huésped no pasa de las 16 horas. Después de este período el injerto es eliminado. Este mismo resultado se observa cuando se mantienen los embriones durante tres días en SC y Holtfreter antes de la ope-

ración y son posteriormente trasladados a solución de Holtfreter normal. Cuando los embriones se colocan en SC y Holtfreter después de operados, hemos podido mantener los trasplantes en perfecto estado hasta un período de 10 ó 12 días. Después de este tiempo, y sin haber sido rechazados, los embriones se fijan en Bouin para cortes histológicos.

Según estudios realizados por MOORE y SCHAYER (7), la histamina intracelular juega un papel importante en los procesos de aceptación y rechazo de los injertos de piel en rata. Toda la histamina endógena es formada intracelularmente por descarboxilación de la histidina a través de la acción de la histidind Descarboxilasa. El fosfato de piridoxal es el coenzima para esta acción. MOORE (4, 5) ha estudiado la prolongación de la sobrevivencia de los trasplantes en rata utilizando inhibidores de la HDC, y SMELLIE y MOORE (9) en injertos renales en perro.

Parece, pues, lógico concluir que también en anfibios la semicarbácida actúa en el mismo sentido inhibiendo la actividad del sistema enzimático histidind Descarboxilasa.

Estudios proyectados por nosotros utilizando inhibidores específicos de la histidind Descarboxilasa en injertos xenoplásticos de anfibios, así como también medidas de la actividad HDC en homo y heteroinjertos de piel en ranas adultos, confirmarían la importancia que la histamina intracelular formada juega también en los Vertebrados inferiores, concretamente en los procesos de rechazo de trasplantes xenoplásticos. Otros estudios realizados en nuestro laboratorio (1) no parecen hacer intervenir a la histamina en los procesos de regeneración de las células de la cola en anfibios anuros (*Rana*, *Discoglossus*, *Bufo*) al estado larvario. La adición al medio de SC, a partir de una concentración 10^{-3} M, no impide las mitosis celulares en esta región en regeneración concreta. Sin embargo, como hemos hecho

notar, la concentración de SC 10^{-2} M en Holtfreter impide todo crecimiento y desarrollo, no solamente al estado de néurula, sino también en estados posteriores. Es posible, como indican MUTO *et al.* (8), que la SC inhiba la actividad del RNA de transferencia para aceptar aminoácidos, y así impida la actividad de una serie de enzimas que serían responsables del proceso de rechazo.

Resumen

Se han realizado trasplantes xenoplásticos entre dos géneros de anfibios anuros, *Discoglossus pictus* y *Rana esculenta*. Los injertos fueron tomados de néurulas de *Discoglossus*. El huésped (*Rana esculenta*) fue operado a estado de botón caudal.

Después de la operación, las larvas mantenidas en solución de Holtfreter y semicarbácida (SC) no muestran la reacción típica de rechazo del injerto. Todos los injertos fueron aceptados en estas condiciones.

Se estudian las posibilidades de que exista una inhibición por parte de la semicarbácida del sistema enzimático histidind Descarboxilasa (HDC) y la función de la histamina intracelular formada, en los mecanismos de aceptación y rechazo de los injertos en los vertebrados inferiores.

Bibliografía

1. ALONSO, M.: Resultados no publicados, 1969.
2. FRAILE, A., ALONSO, M., y DELSO, J. L.: *XI Reunión Nac. Soc. Esp. C. Fisiol.*, página 235, 1968.
3. KAHLSON, G., ROSENGREN, E., and THUNBERG, R.: *Lancet*, **1**, 782, 1966.
4. MOORE, T. C.: *Nature*, **215**, 871, 1967.
5. MOORE, T. C.: *J. Cardiovasc. Surg.*, **64**, 63, 1968.
6. MOORE, T. C., CHANG, J. K.: *Ann. Surg.*, **167**, 232, 1968.
7. MOORE, T. C., SCHAYER, R. W.: *Transplantation*, **7**, 99, 1969.
8. MUTO, A., MIURA, K., HAYATSU, H., UKITA, T.: *Biochem. Biophys. Acta*, **95**, 669, 1965.
9. SMELLIE, W. A. B., MOORE, T. C.: *Surg. Gynecol. Obstet.*, **128**, 81, 1969.