

ESTUDO IMUNOLÓGICO NAS CERATOPLASTIAS EXPERIMENTAIS EM COBAIAS (*)

Luiz Eurico Ferreira (**)
Lucyr Jones Antunes (***)

1 — INTRODUÇÃO

O aspecto imunológico dos transplantes começou com Portier e Richet, 1902, (19) seguidos de Kraupa, em 1911 (13) e vem sendo estudado em relação à córnea ocasionalmente até chegar à afirmação magistral de Pau-fique et alii em 1948 (17): “mais dans l'ensemble, l'ère chirurgicale de la kératoplastie se trouve dépassée: nous abordons la période biologique”.

O pouco interesse dos oftalmologistas do passado em relação ao problema imunológico da ceratoplastia prendeu-se ao relativo sucesso dos transplantes de córnea em relação ao de outros órgãos sólidos e à frequência maior antigamente de insucessos decorrentes de falhas técnicas e àquelas ligadas ao material doador.

No primeiro caso, o sucesso relativo na ceratoplastia parecia depender de quatro itens (22 e 12): falta aparente de antigenicidade da córnea, morte rápida das células corneanas e sua substituição por outras do hospedeiro, adaptação do disco doador ao receptor, tirando-lhe a condição antigênica e, finalmente, a existência de privilégio especial da córnea, em razão de sua avascularidade.

Estas condições têm sido estudadas e a antigenicidade da córnea está demonstrada por muitos autores (4, 6, 12, 21, 5), bem como a possibilidade de sobrevivência de células doadoras (3, 7, 19). A adaptação do disco doador ao receptor tem mostrado a possibilidade de reação de “second set” e a sensibilização sistêmica através da dosagem de anticorpos (21, 12), como do ensaio do fator de inibição de leucócitos, LIF (5).

Resta discutir o privilégio imunológico da córnea. A vascularização da córnea é um fator que facilita o desenvolvimento de fenômenos de rejeição (12, 22). No entanto, mesmo na córnea avascular reações imunológicas ocorrem, quer experimentalmente (12, 5), quer clinicamente (11, 18). Podemos admitir, com Jones (10), a existência de um arco reflexo imunológico, com a via aferente (canais linfáticos, vasos eventuais, humor aquoso, meio conjuntival) o centro (linfonodos, baço) e a via eferente (arterial). Em certas

(*) Trabalho realizado no Hospital S. Geraldo (Serviço do Prof. Hilton Rocha).

(**) Professor Titular da Universidade Gama Filho e Diretor do Instituto Brasileiro de Oftalmologia — Rio de Janeiro.

(***) Professor Adjunto da Universidade Federal de Minas Gerais e Chefe do Laboratório de Imunologia do Hospital S. Geraldo.

condições poderia ser admitido um circuito local, com produção de anticorpos locais (1, 21) e/ou presença de células imunocompetentes na úvea anterior ou no limbo.

O mecanismo exato da rejeição não está inteiramente esclarecido, devendo dele participar fenômenos outros que os já conhecidos. Sem dúvida, os linfócitos estão ligados à rejeição, quer através das linfoquinas dos linfócitos T ou dos anticorpos circulantes dos linfócitos B. Certamente ocorrem diferentes fenômenos nos transplantes, conforme a origem do material doador, se autógeno, alógeno ou xenógeno. Neste trabalho procuramos estudar dois aspectos imunológicos em diversos tipos de ceratoplastia: o perfil linfocitário (LTa x LB) através da formação de rosáceas e o ensaio do fator inibidor da migração de leucócitos (LIF). As operações consistiram de ceratectomia e ceratoplastia lamelar autógena, alógena e xenógena.

2 — MATERIAL

Utilizamos para obtenção de antígenos e discos doadores bem como para grupo-controle e receptores, cobaias albinas de peso entre 400 e 700 gramas, clinicamente normais, oriundas de diferentes fontes. Como fornecedores de material xenógeno, discos doadores e antígenos para o LIF, servimo-nos de galinhas, com peso entre 2000 e 3000 gramas, com aspecto normal.

O material cirúrgico usado foi o habitualmente empregado em ceratoplastia lamelar, incluindo microscópio cirúrgico (16 x), agulha espatulada de 5 mm e náilon monofilamentado de 30 micra ou 10/0.

A medicação utilizada consistiu de: novesina a 0,4%, quetamina, atropina injetável, éter anestésico e colírio de rifamicina SV a 0,33%.

As soluções, reagentes e instrumental de exame foram os exigidos para as técnicas empregadas e referidas adiante.

3 — MÉTODOS

A — Técnica cirúrgica.

As operações foram realizadas sob anestesia geral com quetamina (2.5 mg/kpc), complementada por novesina local e, eventualmente, por éter anestésico e/ou baixas doses suplementares de quetamina.

Feitas a anti-sepsia a assepsia com lavagem e pincelagem de rifamicina nas bordas palpebrais, o globo ocular é fixado e as pálpebras são afastadas. Tais condições são conseguidas facilmente com a passagem de fio de mersilene montado em agulha espatulada na episclera, junto ao limbo e em posições diametralmente opostas, em correspondência ao meio das pálpebras. Tais fios são anodados no campo operatório de esponja de celulose. O globo ocular deverá ser fixado em ligeira proptose.

a — Ceratectomia.

Fazemos a delimitação do disco a ser excisado com trépano de 5mm, na profundidade de 0.2mm. O sulco é regularizado com bisturi arqueado de Paufigue e depois é feita a dissecação com pinça tipo relojoeiro ou pinça

de Pearce e bisturi com microlâmina ou outro dissector. A tesoura de Vannas é também um instrumento complementar útil, permitindo variantes técnicas (fig. 1).

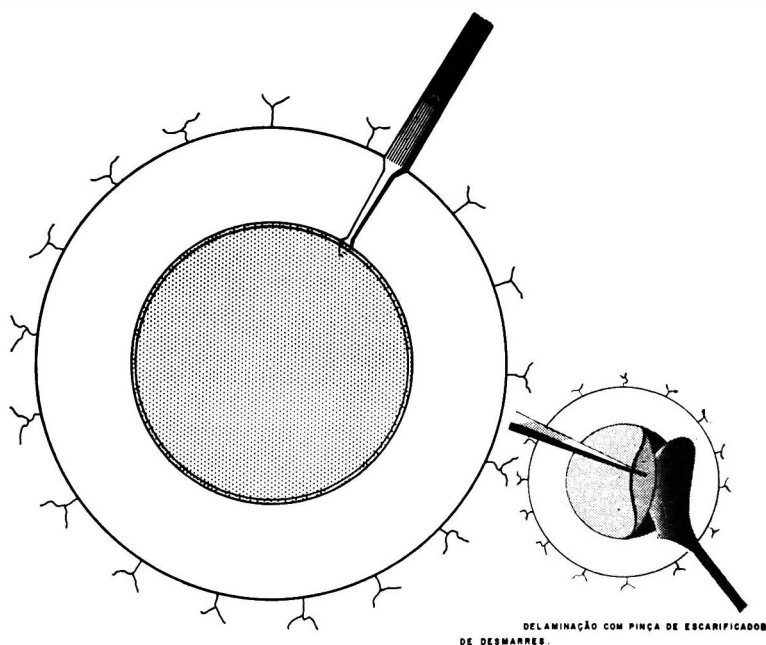


Fig.- 1 - REGULARIZAÇÃO DO SULCO, QUANDO NECESSÁRIO, COM BISTURI ANGULAR DE PAUFIQUE.

b — Ceratoplastia lamelar.

No processo autógeno, o disco é suturado no mesmo lugar de que foi removido (isotópico). Inicialmente são colocados 4 pontos cardinais, após o que damos início à sutura contínua. Frizamos a modificação que introduzimos neste início de sutura: a agulha é passada em primeiro lugar no lábio receptor e depois no doador, após o que procedemos a um nó duplo em que uma das extremidades é passada por dentro da alça antes do anodamento. Quando estiramos as pontas do fio, uma fica para a direita da alça e outra, com a agulha, para a esquerda, de modo que o nó fique embutido na cicatriz (Fig. 2). Prosseguimos a sutura continuamente até chegar próximo ao início. A última passagem da agulha é feita somente no disco doador de modo a permitir a feitura de nó sepultado utilizando a extremidade direita do primeiro nó. Terminada a sutura contínua, removemos os pontos cardinais, cuja finalidade foi somente de manter o disco na posição correta, permitindo regularidade da sutura contínua e bom afrontamento das bordas que pretendemos unir.

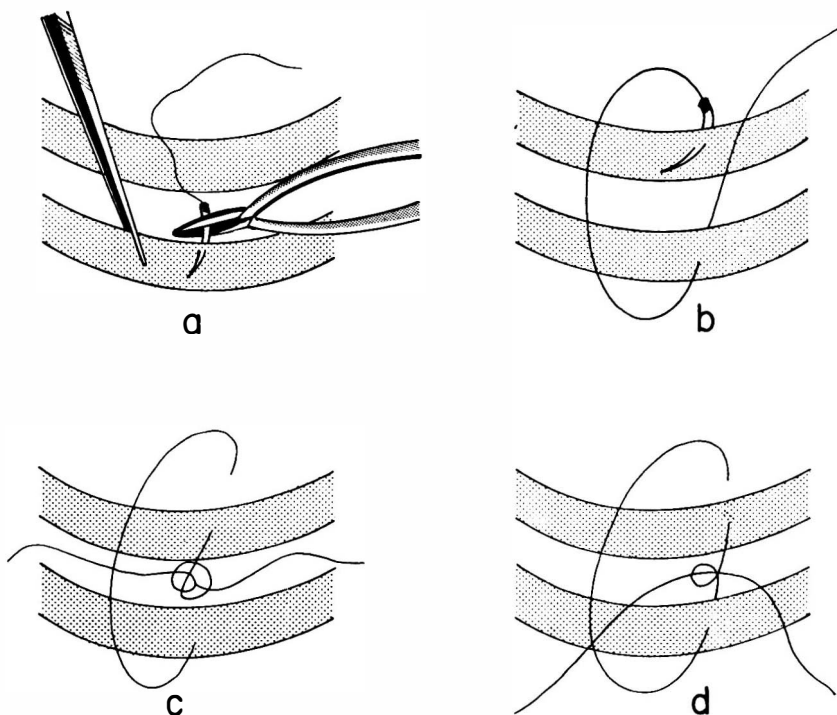


Fig. 2 — INÍCIO DA SUTURA CONTÍNUA PELO LÁBIO RECEPTOR DA INCISÃO PARA PROPICIAR SEPULTAMENTO

Terminada a cirurgia, é instilado colírio de rifamicina Sv a 0,33%, instilação que é repetida diariamente.

Nas ceratoplastias alógenas e xenógenas, a técnica foi idêntica, diferindo apenas na origem do disco doador. Em todos os casos a implantação foi feita imediatamente após a retirada do animal doador.

B — Perfil linfocitário.

A determinação do perfil linfocitário foi feita para LTa, segundo a técnica de Wybran e Fudenberg (25) ligeiramente modificada e para LIF, conforme Lay e Nussenzweig (14). Tais processos estão descritos em trabalhos anteriores (5).

C — Fator inibidor da migração de leucócitos (LIF)

O LIF (leukocyte inhibitory factor) foi pesquisado pela técnica de Harrington e Statsny (8) com ligeira adaptação (5). Os antígenos foram obtidos de um macerado de córneas de cobala, na dose de 1:40. Em um grupo

de animais foi feito também o LIF com antígenos de córneas de galinha. A leitura foi feita em microscópio invertido, sendo a notação feita como negativo (—) ou positiva (+).

D — Análise estatística.

Os seguintes métodos estatísticos foram empregados: cálculo das médias e desvios-padrão, teste t de Student, teste do χ^2 , análise da variância e gráficos.

Para o estudo imunológico procedemos a sorteio aleatório de 11 animais do grupo-controle composto de 30 e 11 animais entre os operados, em 2 grupos, com 10 dias e com 30 dias de cirurgia.

4 — RESULTADOS

A — Tipagem linfocitária

Apresentaremos somente as médias do porcentual de LTa e LB e os desvios-padrão conforme o tempo decorrido (Fator A) e o tipo de cirurgia (Fator B), considerado como 0 dia, animais não operados.

Quadro 1 — Ceratectomia — LTa x LB

Tipo de linfócito	Médias e desvios-padrão		
	0 dia	10 dias	30 dias
LTa	19,66 $\pm$ 5,6	17,7 $\pm$ 4,25	23,23 $\pm$ 6,62
LB	6,52 $\pm$ 1,6	13,01 $\pm$ 8,94	9,21 $\pm$ 4,9

Quadro 2 — Ceratoplastia lamelar autógena

Tipo de linfócito	Médias e desvios-padrão		
	0 dia	10 dias	30 dias
LTa	18,89 $\pm$ 3,17	21,39 $\pm$ 4,95	21,85 $\pm$ 6,62
LB	6,10 $\pm$ 1,45	10,20 $\pm$ 4,30	7,35 $\pm$ 2,31

Quadro 3 — Ceratoplastia lamelar alógena

Tipo de linfócito	Médias e desvios-padrão		
	0 dia	10 dias	30 dias
LTa	19,82 $\pm$ 2,69	23,9 $\pm$ 9,69	24,7 $\pm$ 13,6
LB	6,0 $\pm$ 1,62	12,0 $\pm$ 7,70	4,4 $\pm$ 3,8

Quadro 4 — Ceratoplastia lamelar xenôgena

Tipo de linfócito	Médias e desvios-padrão		
	0 dia	10 dias	30 dias
Lta	19,07 ± 5,33	29,13 ± 7,7	29,15 ± 10,84
LB	6,22 ± 1,42	13,37 ± 4,34	10,29 ± 5,4

Para melhor visão de conjunto, apresentamos os gráficos das figuras 3 e 4, em que apreciamos o comportamento dos LTa e dos LB, nos prazos referidos e nos vários tipos de operação realizados.

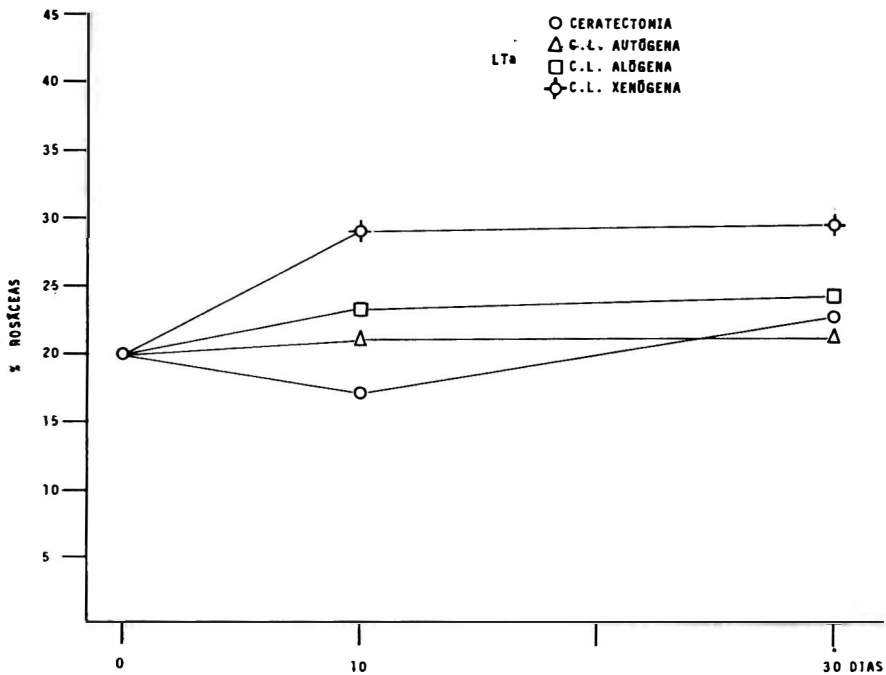


Fig. 3 - Comportamento dos LTa em relação aos vários tipos de cirurgia.

A avaliação estatística dos resultados do perfil linfocitário foi realizada pela análise da variância para os LTa e LB, considerando-se dois critérios de variação: o fator A — tempo (0, 10 e 30 dias) e o fator B — cirurgia (4 tipos). Esta análise mostrou que, relativamente aos LTa, o fator tempo é significativo para $\alpha = 0,01$ e o fator cirurgia o é para $\alpha = 0,05$. A associação de ambos não é significativa, conforme apreciamos no quadro 5. Quanto aos LB ficou evidenciado que somente o fator tempo é significativo.

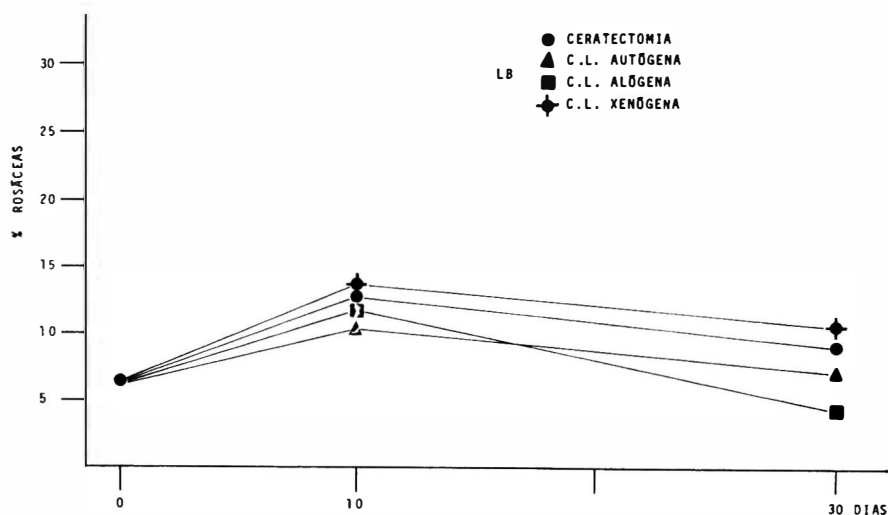


Fig. 4 - Comportamento dos LB em relação aos vários tipos de cirurgia.

Quadro 5 — Significância dos fatores A e B.

Fator	Lta		LB	
	F	α	F	α
Tempo (A)	5,50	0,01	19,20	0,01
Cirurgia (B)	4,77	0,05	2,28	—
Ambos (AB)	1,14	—	1,05	—

Diante dos resultados obtidos dos Lta e analisando os gráficos das figuras 3 e 4, notamos que o grupo xenógeno parecia comportar-se de modo diferente dos outros três. Optamos por excluí-lo e aplicar novamente a análise da variância. Nenhum dos fatores isoladamente ou em conjunto mostrou significância, conforme podemos verificar no quadro 6.

Quadro 6 — Significância dos fatores A, B e AB, excluindo os casos de xenoceratoplastia

Fator	F	α
A	2,38	—
B	1,38	—
AB	0,67	—

Verificando a diferença dos resultados obtidos com os xenotransplantes e os demais tipos de cirurgia empregados neste trabalho resolvemos considerar a autoceratoplastia como grupo-controle e comparar seus resultados com os da xenoceratoplastia, através do teste t de Student.

O teste t de Student evidenciou diferença significativa dos LTA ao nível de $\alpha = 0,01$ ($t = 2,68$), no prazo de 10 dias, e significativa ao nível $\alpha = 0,05$ ($t = 1,817$), no prazo de 30 dias.

Por outro lado, as diferenças dos LB não foram significativas, para os prazos de 10 e 30 dias, ao nível de $\alpha = 0,05$ ($t = 1,64$ e $1,59$).

B — Fator inibitório da migração de leucócitos (LIF)

A pesquisa do fator inibitório de migração de leucócitos — LIF — foi realizada em todos os animais operados, por ocasião da enucleação com antígenos de cobaia, no entanto, em alguns animais, procedemos ao LIF com antígenos de córneas de galinha. Estes casos serão vistos no final, em separado.

Eis os resultados obtidos nos diversos grupos, de acordo com a cirurgia e o tempo decorrido.

Quadro 7 — Positividade do LIF, considerando o número de animais igual a 11 em todos os grupos

Tipo de Cirurgia.	Prazo decorrido	
	10 dias	30 dias
Ceratectomia	4/11	3/11
C. 1. autógena	6/11	4/11
C. 1. alógena	5/11	9/11
C. 1. xenógena	5/11	7/11
Totais	20/44	23/44

Procuramos a influência de cada tipo de cirurgia nos prazos de 10 e 30 dias após a operação, com teste do X^2 .

Considerando esta análise, verificamos que somente aos 30 dias houve relação significativa entre a positividade do LIF e o tipo de cirurgia, ao nível de $\alpha = 0,05$.

A visão panorâmica dos resultados pode ser apreciada na figura 5.

Percentualmente os resultados de positividade do LIF com antígenos de cobaia foram os seguintes:

Ceratectomia : 36% aos 10 dias e 29% aos 30 dias

C. 1. autógena: 54% aos 10 dias e 36% aos 30 dias

C. 1. alógena: 45% aos 10 dias e 81,8% aos 30 dias

C. 1. xenógena: 45,4% aos 10 dias e 63,6% aos 30 dias.

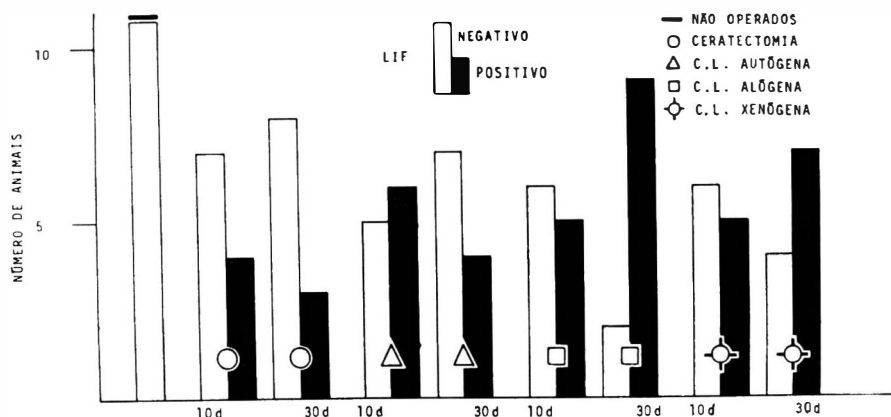


Fig. 5 — Panorama geral do LIF, conforme o tipo de cirurgia e o tempo decorrido

Realizamos também a pesquisa do LIF com antígenos de córneas de galinha em animais submetidos a alo e xenoenxertos e os percentuais de positividade foram 71 e 71,4%, respectivamente. É interessante assinalar que os percentuais de positividade para antígenos de cobaia foram 63 e 54%, respectivamente.

5 — COMENTÁRIOS

O estudo imunológico, embora limitado ao perfil linfocitário e ao LIF, mostra concordância com trabalhos de outros autores e enfatiza a rejeição dentro da ceratoplastia. O aumento dos LTa nos tipos de cirurgia que mais envolvem fenômenos imunológicos, embora menos agressivos em relação aos fenômenos inflamatórios, mostra, pelo menos, relativa independência destes dois tipos de reação. A ceratectomia que representa cirurgia agressiva, com exposição da ferida operatória, tem, no entanto, pouca expressividade imunológica. A ceratoplastia lamelar autógena, de evolução uniforme quanto aos LTa difere da evolução imunológica da xenoceratoplastia e da alokeratoplastia.

As alterações dos LB são menos importantes, talvez porque a técnica empregada não seja a mais indicada nos dias atuais.

O LIF comporta-se diferentemente aos 10 e 30 dias, tendo, de um lado, a ceratectomia e a ceratoplastia autógena mostrando redução da positividade com o passar do tempo e, de outro lado, a ceratoplastia alógena e xenógena com a positividade aumentando no prazo maior estudado. Este fato significa a sensibilização sistêmica, conforme outros autores demonstraram empregando diferentes métodos (21, 15, 16, 23, 9, 24, 2).

CONCLUSÕES

1 — Há relação significativa dos linfócitos timo-dependentes ativos em relação ao tempo ($\alpha = 0,01$), nos animais operados, como também ao tipo de cirurgia ($\alpha = 0,05$).

2 — Há relação significativa dos linfócitos bursa-dependentes, nos mesmos animais, somente em relação ao tempo ($\alpha = 0,05$).

3 — A análise gráfica dos resultados gerais do perfil linfocitário mostra maior alteração nos casos de xenotransplantes, e a análise da variância demonstra que, excluídos estes animais, não ocorre alteração significativa nos LTA e nos LB tanto quanto ao tipo de cirurgia, como em relação ao tempo.

4 — A comparação pelo teste t de Student entre os resultados de auto e xenotransplantes mostra diferença significativa dos LTA, aos 10 dias ($\alpha = 0,01$) e aos 30 dias ($\alpha = 0,05$) e não significativa dos LB.

5 — A positividade do LIF é aproximadamente semelhante aos 10 dias, diminuindo aos 30 dias nos casos de ceratectomia e ceratoplastia autógena e aumentando nos de alógena e xenógena.

6 — A análise do X^2 dos resultados do LIF mostra haver relação significativa entre a positividade e os tipos de cirurgia somente aos 30 dias, enquanto a análise gráfica evidencia comportamento diferente dos grupos alógenos e xenógenos contra os demais.

7 — Os resultados do LIF com antígenos de córneas de galinha mostra semelhança na positividade entre os grupos alógenos e xenógenos.

SUMARIO

Os autores estudam o comportamento dos linfócitos LTA e LB e da positividade do LIF em cobaias albinas submetidas a ceratectomia e ceratoplastia lamelar autógena, alógena e xenógena. Os estudos foram feitos nos prazos de 10 e 30 dias decorridos da cirurgia. As alterações mais significativas foram as seguintes: variação dos LTA em relação ao tempo e ao tipo de cirurgia, notadamente nos xenotransplantes aos 30 dias; diferença significativa dos LTA entre auto e xenotransplantes; maior positividade do LIF aos 30 dias e com os animais submetidos a alo e xenotransplantes.

SUMARIO

Los autores estudian el comportamiento de los linfócitos LTA y LB y de la positividad del LIF en cobayas albinas sometidas a ceratectomia y queratoplastia lamelar autógena, alógena y xenógena. Los estudios han sido hechos en los plazos de 10 y 30 días después de la cirugía. Las alteraciones más importantes fueran las siguientes: variación de los LTA en relación al tiempo y al tipo de cirugía, notadamente en los xenotransplantes a los 30 días; diferencia significativa de los LTA entre auto y xenotransplantes; mayor positividad del LIF a los 30 días y con los animales sometidos a alo y xenotransplante.

SUMMARY

The authors study the behaviour of the lymphocytes LTA and LB and the positivity of the LIF on albin guinea pigs submitted to ceratectomy and lamelar auto, homo and heterografts. The studies were made in the 10th and the 30 day of the post-operative course. The main alterations were the following: modification of the LTA in relation to

the time and to the kind of surgery, principally in the heterografts in the 30 days; significative difference of the LTa between auto and heterografts; more positivity of the LIF in the 30 days and with the animals submitted to alo and heterografts.

RESUMÉ

Les auteurs faisaient une étude immunologique des cobayes soumettées a ceratectomie, auto, homo et hétérogrèffes. Cet étude est fait avec la determination du profil lymphocitaire (LTa et LB) et la recherche du LIF, dans les 10 et 30 jours après la operation. Les alteracions plus importantes sont: changement de les LTa avec relación au temps et au tipe de chirurgie, considérablement dans les hétérogreffes dans les 30 jours; différence significative des LTa entre auto et hétérogrèffes; plus fréquent positivité du LIF dans les 30 jours et avec les animaux opérés pour homo et hétérogreffes.

BIBLIOGRAFIA

1. ARTIGAS, E. S. (1969) — Immunobiologia de los injertos de cornea. Arch. Oftal. N. Arg. 1:71.
2. BABEL, J. et BOURQUIN, J. B. (1925b) — Nouvelles recherches expérimentales sur les hétérogreffes de cornée. Bull. Mém. Soc. Fr. Ophtal. 65:360.
3. BASU, P. K.; MILLER, I. and ORMSBY, H. L. (1960a) — Sex chromatin as a biologic cell marker in the study of the fate of corneal transplants. Amer. J. Ophthal., 49:513.
4. FAURE, J. P. (1964) — Les réactions immunologiques das les greffes de la cor-née., Arch. Ophthal. (Paris), 24:501 e 603.
5. FERREIRA, L. E. (1976) — Ceratoplastia experimental em cobaias. Tese Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janiro. e
6. FRENCH, M. E. (1972) — Immunological aspects of corneal graft rejection, in Corneal Grafting; ed by Casey, T. A. Butterworths, London, pág. 63.
7. HANNA, C. and IRWIN, E. S. (1962) — Fate of cells in the corneal graft. Arch. Ophthal., 68:810.
8. HARRINGTON, J. T. Jr. and STASTNY, P. (1973) — Macrophage migration on agarose droplet: development of a micromethod for assay of delayed hypersensitivity. J. Immunol., 110:752.
9. HENLEY, W. L. and OKAS, S. (1974) — The study of ophthalmologic disease by leukocyte migration inhibition. J. Ped. Ophthal. 11:55.
10. JONES, B. R. (1973b) — Summing up, present knowledge and problems of Corneal Graft Failure. Ciba Foundation Symposium. Elsevier Excerpta Medica, pág. 349.
11. KHODADOUST, A. A. (1973) — The allograft rejection the leading cause of late failure of clinical corneal grafts. In Corneal Graft Failure. Elsevier-Excerpta Medica. North Holland, pág. 151.
12. KHODADOUST, A. A. and SILVERSTEIN, A. M. (1972) — Studies on the nature of the privilege enjoyed by corneal allografts. Invest. Ophthal., 11:137.
13. KRAUPA (1911) in FAURE, J. P. (1964) — Les réactions immunologiques dans les greffes de la cornée. Arch. Ophthal. (Paris), 24:512.
14. LAY, W. H. and NUSSENZWEIG, V. (1968) — Receptors for complement on Leukocytes. J. Exp. Med. 128:991.
15. MEDEIROS, O. T. (1973) — Estudo biomicroscópico e imunológico da ceratoplastia experimental em coelhos, com córneas autólogas e homólogas frescas e conservadas em câmara úmida. Tese de doutoramento. Belo Horizonte.
16. MÜLLER, H. et MAUMENEE, A. E. (1951) — Considérations sur la maladie du grafted. Arc. Opht., 11:146 (Paris).
17. PAUFIQUE, L.; SOURDILLE, G. P. et OFFRET, G. (1948) — Les greffes de cor-née (keratoplasties). Masson et Cie., éditeurs. Paris.
18. POLACK, F. M. (1970) — Keratoplasty and Graft reaction, in Corneal and External Diseases of the Eye. Ed. Polack. F. M. — Charles Thomas, publisher. Springfield. pág. 301.

19. POLACK, F. M.; SMELSER, G. K. and ROSE, J. (1964) — Long-term survival of isotopically labeled stromal and endothelial cells in corneal homografts. *Am. J. Ophthal.*, 57:67.
20. PORTIER, P. and RICHTER, C. (1902) — *Comput. Reud. Soc. Biol.*, 54:170.
21. REMKY, H. (1963) — Ophthalmological transplants research. *Immunology of keratoplasty. Int. Ophthal. Clin.*, 3:559.
22. SILVERSTEIN, A. M. and KHODADOUST, A. A. (1973) — Transplantation immunobiology of the cornea. *Corneal Graft Failure. Ciba Foundation Symposium. Elsevier-Excerpta Medica. North Holland.*, pág. 105.
23. TSUTSUI, J. and WATANABE, S. (1961b) — Clinical evaluation of the precipitin test in the post operative course of keratoplasty. *Arc. Ophthal.*, 65:375.
24. UGRINSKI, P. S. and KIRKPATRICK, C. H. (1974) — Corneal cellular immunity in the guinea pig. *Amer. J. Pathol.* 74:365.
25. WYBRAN, J. and FUDENBERG, H. H. (1973) — Thymus-derived rosette-forming cells in various human disease state: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections and other diseases. *The J. Clin. Invest.*, 52:1026.