
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

SERGIO FILONI, GIANCARLO GIBERTINI, VITO
MARGOTTA, NICOLA CATALINI

**Trapianti di pelle in Tritoni adulti. II. Sopravvivenza
di eterotrapianti tra *Triturus marmoratus* Latr. e
Triturus cristatus carnifex Laur. in seguito ad
irradiazione ed inoculazione di milza eterologa**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 51 (1971), n.5, p. 440-446.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_51_5_440_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biologia. — *Trapianti di pelle in Tritoni adulti. II. Sopravvivenza di eterotrapianti tra Triturus marmoratus Latr. e Triturus cristatus carnifex Laur. in seguito ad irradiazione ed inoculazione di milza eterologa* (*). Nota di SERGIO FILONI, GIANCARLO GIBERTINI, VITO MARGOTTA e NICOLA CATALINI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Skin fragments (6×4 mm) from adult *Triturus marmoratus* Latr. were grafted on the dorsal side of adult *Triturus cristatus carnifex* Laur. The recipient newts were divided into four batches: 1) non-treated (control specimens); 2) X-ray irradiated (1250 r); 3) X-ray irradiated (2450 r); 4) X-ray irradiated (2450 r) and injected with a spleen suspension from the donor. From the results it was apparent that: 1) in non-irradiated allografts an early histoincompatibility reaction develops (day 15); 2) the reject phase is delayed but not prevented by X-ray irradiation; 3) the injection of heterologous spleen from the donor, performed in addition to irradiation, nearly always results in longer survival of the grafts (53 days). On the basis of these results it is suggested that the survival of the graft is due to the formation, in the recipient, of a new lymphoid system at the expense of the lymphocytes from the spleen donor.

Solo recentemente è stata chiaramente dimostrata l'esistenza di una risposta immunitaria anche nei Vertebrati a sangue freddo; in particolare, per quanto riguarda gli Anfibi, numerosi sono gli studi che hanno messo in evidenza una reazione anticorpale in questa classe di Vertebrati. (Kent *et al.*, 1964; Cooper e Hildemann, 1965; Baculi e Cooper, 1967; Charlemagne, 1967; Cooper, 1968; Du Pasquier, 1969; Houillon *et al.*, 1969).

Inoltre, negli Anfibi urodeli, si è potuto osservare che il periodo di sopravvivenza di trapianti omoplastici (Forte, 1959; Cohen, 1966 a, 1966 b; Cohen, 1968 a; Filoni e Margotta, 1969; Gibertini e Filoni, 1970; Margotta e Filoni, 1970) ed ancor più di trapianti eteroplastici (Houillon 1964, 1967; Cohen, 1968 b, 1969, 1970; Tournefier, 1968) è alquanto breve.

Allo scopo di prolungare, negli Anfibi, il periodo di sopravvivenza del trapianto sono stati impiegati vari metodi tendenti tutti a diminuire la risposta immunitaria dell'ospite (Cohen, 1966 c, 1968 b, 1970; Charlemagne e Houillon, 1968; Baldwin e Cohen, 1970).

Le varie tecniche usate da questi Autori, pur ritardando la reazione di rigetto da parte dell'ospite verso il trapianto, non riuscivano ad annullarne la risposta. In una precedente ricerca (Gibertini e Filoni, 1970) abbiamo messo a punto un nuovo metodo basato sulla irradiazione letale del portatore e successiva inoculazione di milza eterologa e abbiamo ottenuto una prolungata sopravvivenza di omotrapianti di pelle in Tritoni adulti.

(*) Il lavoro è stato eseguito nell'Istituto di Anatomia Comparata « G. B. Grassi » dell'Università di Roma.

(**) Nella seduta del 13 novembre 1971.

Abbiamo ritenuto interessante estendere le nostre ricerche anche a trapianti tra Anfibi urodela di specie diversa, per vedere se anche in questo caso, in cui la istoincompatibilità dovrebbe essere ancor più marcata, la tecnica da noi precedentemente utilizzata inibisce la fase di rigetto, annullando la reazione immunitaria del portatore del trapianto.

MATERIALE E METODI

Sono stati effettuati 117 trapianti di pelle di *Triturus marmoratus* Latr. in *Triturus cristatus carnifex* Laur., adulti, di ambo i sessi.

Gli animali operati sono stati suddivisi in quattro Lotti (fig. 1).

Lotto I (17 individui): eterotrapianti di pelle della regione della gola di *Triturus marmoratus* nella regione dorsale di *Triturus cristatus*.

Lotto II (20 individui): eterotrapianti di pelle della regione della gola di *Triturus marmoratus* nella regione dorsale di *Triturus cristatus* irradiato 12 h prima dell'intervento con dose subletale di raggi X (1250 r).

Lotto III (35 individui): eterotrapianti di pelle della regione della gola di *Triturus marmoratus* nella regione dorsale di *Triturus cristatus* irradiato 12 h prima dell'intervento con dose LD 50/30 di raggi X (2450 r).

Lotto IV (45 individui): eterotrapianti di pelle della regione della gola di *Triturus marmoratus* nella regione dorsale di *Triturus cristatus* irradiato 12 h prima dell'intervento con dose LD 50/30 di raggi X (2450 r) e, al momento del trapianto, sottoposto ad inoculazione di una sospensione di cellule spleniche provenienti dal donatore.

Sono stati inoltre usati 15 individui di *Triturus cristatus carnifex*, sottoposti ad un'irradiazione di 2450 r, come ulteriore controllo della mortalità a questa dose di raggi X. In tutte le operazioni di trapianto il lembo di pelle aveva le dimensioni di 6×4 mm circa.

La sospensione di cellule spleniche, provenienti dalla milza del donatore del trapianto, era allestita dissociando meccanicamente la milza attraverso un sottile retino metallico (484 maglie/cm²) in una soluzione sterile di Holtfreter (con lo stesso metodo già descritto da uno di noi, Gibertini, 1967), ed inocolata nell'ospite per via intraperitoneale. Tutte le operazioni sono state eseguite in cabina sterile.

Le caratteristiche fisiche dell'irradiazione erano: 180 KV, 6 mA, distanza focale 50 cm, filtro di 3 mm di Al, intensità 75 r/min., misurata in aria con dosimetro Gilardoni. Gli animali, dopo essere stati anestetizzati con MS 222 (1 : 1000), sono stati panirradiati in gruppi di 2-10 alla volta posti in posizione prona. Tutti gli animali sono stati tenuti in camera termostatica a 18° C. I trapianti, prelevati con una zona di pelle dell'ospite circostante il trapianto stesso, sono stati fissati a diversi intervalli di tempo dall'operazione in Bouin e le sezioni trasversali di 7 µ colorate con il metodo di Mallory-Azan.

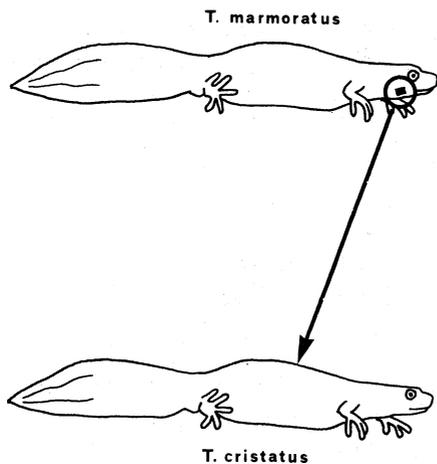
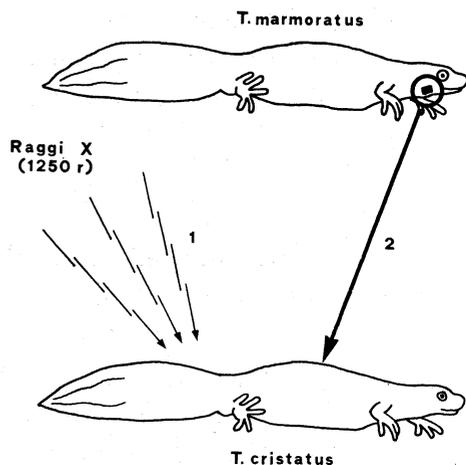
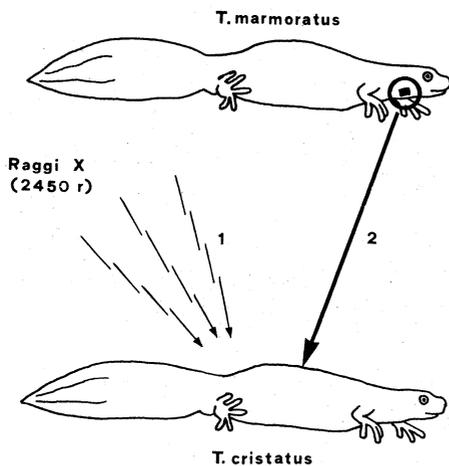
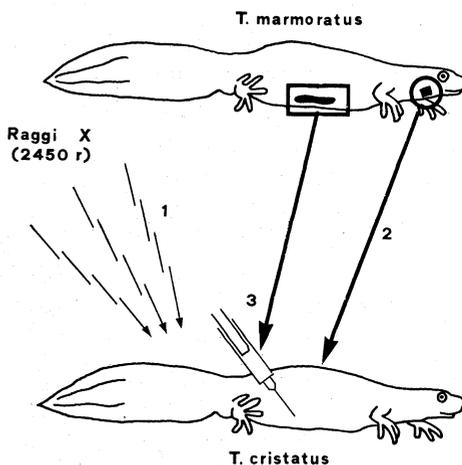
Lotto I**Lotto II****Lotto III****Lotto IV**

Fig. 1.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

Lotto I:

Dopo 15 gg. dal trapianto, nei 2 casi esaminati è stata osservata una debole infiltrazione di piccoli linfociti soprattutto a livello della tela sottocutanea; nello strato epidermico sono stati riscontrati alcuni residui melanici. Le ghiandole appaiono di dimensioni ridotte ed in un caso anche in minor numero. A 20 gg. dall'intervento, nei 3 casi di cui disponiamo, l'infiltrazione linfocitica risulta notevolmente aumentata rispetto allo stadio precedente e

comincia ad invadere oltre che la tela sottocutanea, in cui i linfociti sono numerosissimi, anche il derma lasso e le ghiandole, che sono molto ridotte di numero e di dimensioni (Tav. I, fig. 1).

Anche a livello dell'epidermide si è osservata una notevole infiltrazione linfocitica (in 2 dei 3 casi esaminati) e sempre la presenza di residui melanici. Al 30° giorno (3 casi) tutta l'area del trapianto è invasa da linfociti; numerose ghiandole sono scomparse e le poche ancora presenti sono infiltrate (Tav. I, fig. 2). Al 45° giorno (4 casi) non vi è più netta distinzione tra epidermide e derma lasso; le ghiandole sono totalmente scomparse e l'infiltrazione linfocitica, notevolissima, è presente a tutti i livelli. I residui melanici sono scarsamente presenti e, dei vari strati della pelle, solo il derma compatto è ancora ben evidente. In un caso esaminato comincia la proliferazione dell'epidermide dell'ospite dai bordi del trapianto verso il centro. A 60 gg. dall'operazione (3 casi) i linfociti sono massivamente presenti a tutti i livelli, le ghiandole assenti, e l'unico strato distinguibile è il derma compatto. L'epidermide del *Triturus cristatus*, circostante l'area del trapianto, si estende gradualmente a ricoprire il lembo di pelle trapiantato ormai in via di degenerazione (Tav. I, fig. 3).

Lotto II:

In questo lotto, in seguito ad irradiazione (1250 r) l'infiltrazione linfocitica non viene eliminata, ma lievemente ritardata; infatti al 20° giorno dal trapianto (4 casi) l'epidermide presenta un aspetto normale con scarsi residui melanici e le ghiandole, ridotte in numero e dimensioni, cominciano ad essere infiltrate da alcuni piccoli linfociti; il derma, soprattutto nello strato lasso, è alquanto infiltrato (Tav. I, fig. 4). Dopo 30 gg. dal trapianto (4 casi) il numero dei linfociti aumenta notevolmente e nell'epidermide si riscontrano numerosi residui melanici. La maggior parte delle ghiandole è scomparsa; il derma è molto infiltrato. Comunque l'entità dell'infiltrazione linfocitica è inferiore a quella osservata nel Lotto I allo stesso stadio e tale differenza si accentua negli stadi più avanzati. Infatti dopo 45 gg. (3 casi) il lembo di pelle trapiantato presenta lo strato epidermico pressoché normale, anche se alquanto sottile, con numerosi cromatofori.

Le ghiandole sono piuttosto rare, il derma appare poco infiltrato. A 60 gg. (3 casi) dal trapianto, il numero dei linfociti presenti appare notevolmente inferiore a quello riscontrato nel Lotto I dopo lo stesso periodo di tempo dal trapianto (Tav. II, fig. 5).

Lotto III:

In questo lotto, in cui il portatore è stato sottoposto ad irradiazione di 2450 r, si è riscontrata una mortalità del 50% al 30° giorno. Negli individui sopravvissuti, al 15° giorno (2 casi) la reazione di istoincompatibilità da parte dell'ospite non viene annullata, ma solo limitata e ritardata (Tav. II, fig. 6).

A questo stadio infatti l'epidermide appare normale con scarsi accumuli melanici; le ghiandole, seppur di numero e dimensioni ridotte, non presentano infiltrazione linfocitica. In un caso il derma e la tela sottocutanea sono lievemente infiltrati. Al 20° giorno dall'operazione (3 casi), l'area del trapianto comincia ad essere invasa da alcuni linfociti; infatti quest'ultimi sono presenti a livello epidermico, tra le ghiandole e, soprattutto, nello strato del derma e della tela sottocutanea.

Lotto IV:

In questo lotto, si è constatato che l'inoculazione di cellule spleniche del donatore, non solo provoca una netta diminuzione della mortalità (5% al 30° giorno) rispetto a quella riscontrata nel Lotto III, ma nella grande maggioranza dei casi riesce ad annullare la reazione di rigetto da parte dell'ospite. Al 20° giorno (4 casi) l'infiltrazione linfocitica è del tutto assente ed anche le ghiandole sono presenti, sebbene poco numerose. Solo in un caso è stata riscontrata la presenza sia di linfociti che di residui melanici localizzati soltanto in alcune zone del trapianto.

Tra il 30° ed il 32° giorno (8 casi) (Tav. II, fig. 7) il quadro istologico del lembo di pelle trapiantato è pressochè sovrapponibile a quello normale (in 6 casi); nei rimanenti 2 casi, in uno si è notata una leggera infiltrazione a livello del derma, che non interessa però le ghiandole e lo strato epidermico, nell'altro l'infiltrazione linfocitaria è più marcata e si estende anche all'epidermide e ad alcune ghiandole. A 45 gg. (2 casi) il trapianto mostra un aspetto normale se si eccettua un notevole ispessimento a carico del derma compatto. A 50-53 gg. (2 casi) il trapianto presenta un aspetto istologico sovrapponibile a quello osservato allo stadio precedente (Tav. II, fig. 8).

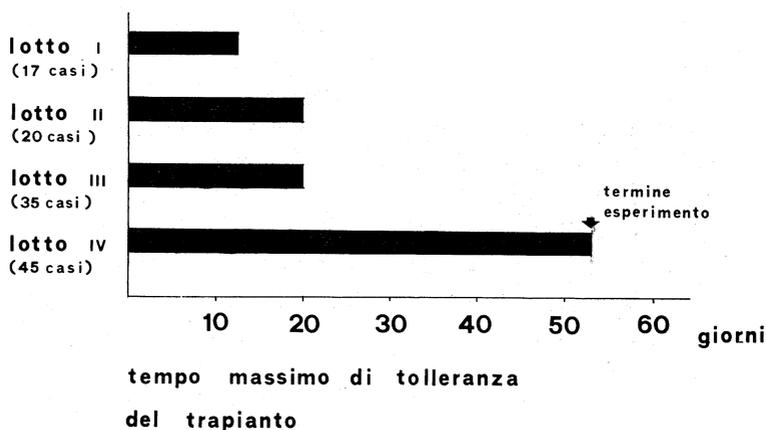


Fig. 2.

La fig. 2 riassume graficamente il tempo massimo di tolleranza del trapianto nei quattro Lotti.

DISCUSSIONE

Dai risultati ottenuti negli eterotrapianti di pelle tra *Triturus marmoratus* e *Triturus cristatus* risulta evidente, innanzi tutto, la comparsa di una più precoce reazione di istoincompatibilità tra donatore ed ospite, rispetto a quella già precedentemente messa in evidenza in casi di trapianti omoplastici tra Tritoni (Forte, 1959; Cohen, 1966 a, 1966 b; Gibertini e Filoni, 1970).

Come già sperimentato da alcuni di noi (Gibertini e Filoni, 1970) in omo-trapianti di pelle in Tritoni adulti, anche negli eterotrapianti la panirradiazione abbassa la risposta immunitaria dell'ospite. Infatti, in seguito ad una dose subletale di raggi X (1250 r) si osserva un ritardo nella comparsa della risposta immunologica, che si manifesta con un'infiltrazione linfocitica di minore entità rispetto a quella riscontrata negli eterotrapianti di controllo. Anche ad una dose di raggi X pari alla LD 50/30 (2450 r) la reazione di istoincompatibilità da parte dell'ospite non viene completamente annullata, almeno fino al 30° giorno post-operatorio; dopo questo periodo di tempo gli animali venivano rapidamente a morte, per cui non è stato possibile seguire ulteriormente il destino dell'eterotrapianto.

Invece, nel caso in cui il portatore, precedentemente irradiato sempre con una dose LD 50/30 di 2450 r, subisca anche, al momento del trapianto, una inoculazione di una sospensione di milza proveniente dallo stesso individuo che fornirà poi il lembo di pelle, il trapianto, fino al termine dell'esperimento, non va incontro (nella grande maggioranza dei casi) a processi degenerativi evidenti.

Questa prolungata sopravvivenza del trapianto può essere spiegata ammettendo che i linfociti splenici del donatore possano ricostituire nel portatore un nuovo sistema linfoide, che da un lato prolunga la sopravvivenza dell'ospite, e dall'altro consente l'attecchimento del trapianto eteroplastico, in quanto riconosce come istologicamente compatibile il lembo di pelle trapiantato.

BIBLIOGRAFIA

- BACULI B. S. e COOPER E. L., « J. Morph. », 123, 463 (1967).
BALDWIN W. M. e COHEN N., « Transplantation », 10, 530 (1970).
CHARLEMAGNE J., « Bull. Soc. Zool. de France », 92, 153 (1967).
CHARLEMAGNE J. e HOUILLON C., « C. R. Acad. Sc. Paris », 267, 253 (1968).
COHEN N., « J. Exp. Zool. », 163, 157 (1966 a).
COHEN N., « J. Exp. Zool. », 163, 173 (1966 b).
COHEN N., « J. Exp. Zool. », 163, 231 (1966 c).
COHEN N., « J. Exp. Zool. », 167, 37 (1968 a).
COHEN N., « J. Exp. Zool. », 167, 37 (1968 b).
COHEN N., « Transplantation », 7, 332 (1969).
COHEN N., « Transplantation », 10, 382 (1970).
COOPER E. L., « Anat. Rec. », 162, 453 (1968).
COOPER E. L. e HILDEMAN W. H., « Ann. N. Y. Acad. Sc. », 126, 647 (1965).
DU PASQUIER L., « C. R. Soc. Biol. », 163, 1379 (1969).

- FILONI S. e MARGOTTA V., «Acta Embryol. Experim.», 169 (1969).
FORTE C., «Monit. Zool. Ital.», 67, 130 (1959).
GIBERTINI G., «Riv. Biol.», Suppl. 60, 3 (1967).
GIBERTINI G. e FILONI S., «Rend. Accad. Naz. Lincei», serie VIII, 48, 720 (1970).
HOUILLOIN C., «C. R. Acad. Sc.» Paris, 258, 3901 (1964).
HOUILLOIN C., «C. R. Acad. Sc.», Paris, 264, 834 (1967).
HOUILLOIN C., TOURNEFIER A. e CHARLEMAGNE J., «C. R. Acad. Sc.», Paris, 268, 2982 (1969).
KENT S. P., EVANS E. E. e ATTLEBERGER M. H., «Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.», 116, 456 (1964).
MARGOTTA V. e FILONI S., «Acta Embryol. Experim.», 151 (1970).
TOURNEFIER A., «Bull. Soc. Zool. de France.», 93, 99 (1968).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I.

- Fig. 1. - Lembo di pelle di *T. marmoratus* trapiantato in *T. cristatus* non trattato dopo 20 gg. È già evidente una cospicua infiltrazione linfocitica.
- Fig. 2. - Lembo di pelle di *T. marmoratus* trapiantato in *T. cristatus* non trattato fissato dopo 30 gg. Tutta l'area del trapianto, epidermide compresa, è invasa dai linfociti.
- Fig. 3. - Lembo di pelle di *T. marmoratus* trapiantato in *T. cristatus* non trattato fissato dopo 60 gg. Il trapianto è completamente degenerato. L'epidermide del *T. cristatus*, circostante il trapianto (freccia), tende a sovrapporsi al trapianto stesso.
- Fig. 4. - Lembo di pelle di *T. marmoratus* trapiantato in *T. cristatus* precedentemente irradiato con 1250 r e fissato dopo 20 gg. L'infiltrazione linfocitica a livello del derma lasso e della tela sottocutanea è ben evidente.

TAVOLA II.

- Fig. 5. - Lembo di pelle di *T. marmoratus* trapiantato in *T. cristatus* precedentemente irradiato con 1250 r e fissato dopo 60 gg. Il trapianto è quasi completamente degenerato, ma il numero dei linfociti presenti è inferiore a quello osservabile nella fig. 3;
- Fig. 6. - Lembo di pelle di *T. marmoratus* trapiantato in *T. cristatus* precedentemente irradiato con 2450 r e fissato dopo 15 gg.
- Figg. 7-8. - Lembo di pelle di *T. marmoratus* trapiantato in *T. cristatus* precedentemente irradiato con 2450 r ed inoculato con una sospensione di cellule spleniche del donatore; dopo 30 gg. (fig. 7) e dopo 53 gg. (fig. 8). In entrambi gli stadi di fissazione l'istologia del trapianto è pressochè normale e non si riscontra infiltrazione linfocitica.

