

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**TESIS DOCTORAL**

**Atenuación del rechazo inmunitario con células madre  
mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un modelo  
experimental murino de trasplante de pulmón**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Daniel Ruiz Pérez**

Directores

**Francisco José García Ríos**  
**Carlota Largo Aramburu**  
**Ignacio Álvarez Gómez de Segura**

Madrid  
Ed. electrónica 2019



U N I V E R S I D A D  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL**

**ATENUACIÓN DEL RECHAZO INMUNITARIO CON CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL MURINO DE TRASPLANTE DE PULMÓN**

PRESENTADA POR

**Daniel Ruiz Pérez**

Directores

**Dr. Francisco José García Río**

**Dra. Carlota Largo Aramburu**

**Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura**

Madrid, 2018



**UNIVERSIDAD COMPLITENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO RD 99/2011**



**TESIS DOCTORAL**

**Atenuación del rechazo inmunitario con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un modelo experimental murino de trasplante de pulmón**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR**

PRESENTADA POR

**Daniel Ruiz Pérez**

Directores

Dr. Francisco José García Río

Dra. Carlota Largo Aramburu

Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura

Tutora

Dra. Paloma García Fernández

**Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ)**

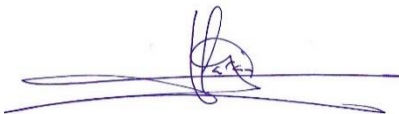


El **Dr. Francisco José García Río**, jefe de Sección de Neumología del Hospital Universitario La Paz y Profesor Titular a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, la **Dra. Carlota Largo Aramburu**, Veterinaria del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario la Paz y el **Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura**, Profesor Titular en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

#### CERTIFICAN

Que Don **Daniel Ruiz Pérez**, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "**Atenuación del rechazo inmunitario con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un modelo experimental murino de trasplante de pulmón**", que presenta como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Para que conste a efectos oportunos, expide y firma la presente en Madrid a 14 de septiembre de 2018



**Fdo. Dr. Francisco García**

Director de tesis



**Fdo. Dra. Carlota Largo**

Directora de tesis



**Fdo. Dr. Ignacio Álvarez**

Director de tesis



Esta tesis ha sido realizada en el Servicio de Cirugía Experimental de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz de Madrid, gracias al contrato predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU13/04638) así como a la ayuda a la movilidad para estancias breves y traslados temporales (EST16/00594), ambas del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.



*“El ayer es historia;  
el mañana es un misterio;  
sin embargo, el hoy es un regalo,  
por eso se le llama presente.”*



# **Agradecimientos**

---



¡Quién me iba a mí a decir que estaría a estas horas de la noche escribiendo, por fin, lo último ultimísimo de la tesis! Y que, con esto, una vez ajustado el formato del texto por enésima vez, acabaría mi etapa de doctorado.

Como todo en esta vida, ha habido momentos buenos, muy buenos, malos y un poco peores, pero todos ellos han hecho de esta experiencia algo, sin duda, inolvidable.

No resultaría cierto decir que todo este trabajo lo he hecho sin ayuda, por lo que creo que es importante escribir unas líneas de agradecimiento a todas esas personas que me habéis ayudado.

Antes de nada, me veo en la obligación de hacer una mención especial a esos animalillos que han hecho posible este proyecto. Sin ellos no habiéramos podido estudiar el rechazo en nuestro modelo de trasplante y ahora mismo no tendría ningún resultado sobre el que escribir. Por eso, creo que merecen siempre un reconocimiento.

Volviendo a las personas que me han ayudado en esta etapa, me gustaría especialmente agradecer a la Doctora Carlota Largo la oportunidad que me brindó de trabajar con ella desde el primer momento en el que aparecí en el Servicio de Cirugía Experimental hace unos cinco años. Muchísimas gracias Carlota por estar siempre apoyándome y por dejarme colaborar en otros proyectos y cursos. Me has enseñado a trabajar con cerdos y conejos, he podido conocer la forma de trabajo de otros médicos y he aprendido a hacer croquetas para ratones. Gracias de verdad por luchar porque el proyecto saliera adelante, pese a que yo no hiciera más que pedir dinero para nuevos reactivos, y por todo el cariño que me has dado.

Quisiera agradecer también a los Doctores Francisco García, Ignacio Álvarez y Mariano García por ofrecerse a guiarme durante el desarrollo de la tesis. Con vosotros he podido aprender de pulmones, de anestesia y animales de laboratorio y de células madre. Gracias también a mi tutora, la Doctora Paloma García, por guiarme en las prácticas docentes de la facultad y por confiar en mí.

Y, ¿qué hubiera hecho yo sin el personal del Servicio de Cirugía Experimental? La verdad es que no hubiera hecho mucho Isa, Sonsoles y Maite, siempre dispuestas a echarme una mano en todo momento, sobre todo durante los trasplantes y las interminables PCRs. También, por consolarme cuando las cosas no salían como yo quería. Gracias a Javi, por introducirme en el mundo de la simulación y a todo el resto del equipo: el Dr. Juan Vázquez, Irene, Pablo, Pedro, Domingo, Dani, Rodrigo y Ángela. No me puedo olvidar tampoco de mis excompañeros Mónica, María y Gonzalo (¡me abandonasteis demasiado pronto!).

Agradecimiento especial también a doctores Santana Rodríguez y Pedro Llontop, de la Unidad de Cirugía Experimental del hospital Doctor Negrín de Las Palmas de Gran Canaria, por acogerme durante una breve estancia y enseñarme todo lo relativo al modelo animal de trasplante pulmonar.

¿Cómo hubiera yo soportado todo este tiempo sin contar mis frustraciones y quejas varias a Arancha, Vir, Sonia, Lupe, Belén, Victoria, Inma...? Gracias también a vosotras por estar siempre dispuestas a tomarnos un café y compartir nuestras penas y agobios.

Agradecer también a mis compañeros de Neuro, en especial a María, Berta, Laura... por ayudarme tanto con las tinciones de las células; a Berta Rodés y Teresa Bellón, por su paciencia con todas mis preguntas; a Álex y Luz, por enseñarme todo lo que sé sobre cultivos celulares; a Sole, por sus conocimientos de histología; a Paco Hernández por toda su ayuda y apoyar mis ideas y a Ane Andrés por enseñarme cosas del trasplante intestinal.

Aunque sé que no lo van a leer, me gustaría mencionar al Doctor Kreisel y a todo su equipo del Departamento de Cirugía Torácica por la gran oportunidad de trabajar con ellos en la WashU de Saint Louis.

Fuera ya del ámbito laboral, gracia a mis amigos de siempre, especialmente a Miguel, Marta, Cintia, Javi, Inés, Rosalía (que, aunque estando tan lejos, también has estado presente), Lorena, Julio y Maca, Bea, Isaac... Gracias a Ana y Marta, amigas de carrera y de sufrimiento durante la tesis y sin las que no hubiera sabido qué papeles entregar en cada momento ni a quién. A mis amigos del pueblo: Darío, Jorge, José, Mario, Arrate, Yoli, Ander, Sara, Andrea... por hacerme desconectar en verano.

Pero los que más han tenido que soportarme, y reconozco que mucho, han sido mis padres. Sin vosotros, no hubiera podido llegar hasta donde he llegado hoy. Habéis estado conmigo desde el principio, ayudándome a conseguir mis metas, guiándome en mis indecisiones y mostrándome que puedo hacer cosas que no creía que podría. Y muchas gracias a mi mejor amiga y hermana, siempre dispuesta a escucharme, a decirme lo que piensa en todo momento y a su apoyo incondicional. Gracias también por darnos lo más bonito que nos ha pasado hasta ahora, una cosa tan pequeña, pero a la vez tan importante: Laia.

Sé que quedan personas por nombrar que, de una manera u otra, también han sido importantes para que pueda acabar esta Tesis Doctoral.

Por todo ello, me gustaría acabar diciendo otra vez ¡MUCHAS GRACIAS!

# Índice

---



<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>21</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>25</b>
<b>RESUMEN/ABSTRACT</b>	<b>29</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>35</b>
<b>1. El trasplante pulmonar</b>	<b>37</b>
1.1. Historia y desarrollo	37
1.2. Situación actual	37
1.3. Situación del trasplante pulmonar en España	39
1.4. Aspectos clínicos del trasplante pulmonar	40
<b>2. Inmunobiología del rechazo</b>	<b>44</b>
2.1. El trasplante pulmonar y el rechazo	44
2.2. Tipos de rechazo	47
2.3. Citoquinas y quimioquinas en el rechazo	48
<b>3. Modelos actuales de estudio de rechazo en el trasplante pulmonar</b>	<b>49</b>
3.1. Modelos disponibles hasta el momento	50
3.2. Modelos experimentales en roedores	51
3.3. Importancia de los modelos experimentales y sus aportaciones científicas	54
3.3.1. Disfunción primaria del injerto por lesión isquemia-reperfusión	55
3.3.2. Rechazo celular agudo	55
3.3.3. Rechazo agudo	55
3.3.4. Rechazo crónico	56
<b>4. Terapias de prevención del rechazo</b>	<b>60</b>
<b>5. Células madre mesenquimales</b>	<b>62</b>
5.1. Características generales	62
5.2. Acción inmunomoduladora	64
5.3. Efectos sobre la inmunidad innata	66
5.4. Efectos sobre la inmunidad adquirida	67
5.5. Otros efectos de interés	69
<b>6. ASCs y microARNs</b>	<b>69</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>71</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>75</b>
<b>1. Diseño de estudio</b>	<b>77</b>
<b>2. Sujetos de estudio: animales</b>	<b>77</b>
<b>3. Procedimientos anestésico y quirúrgico en el TP</b>	<b>77</b>
3.1. Anestesia y cuidados perioperativos	78
3.2. Ventilación mecánica	78

3.3. Monitorización intraoperatoria	79
3.4. Preparación del donante	79
3.5. Preparación del injerto	80
3.6. Preparación del receptor	80
<b>4. Cuidados postoperatorios. Protocolos de supervisión</b>	<b>82</b>
<b>5. Grupos experimentales</b>	<b>84</b>
<b>6. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs)</b>	<b>85</b>
6.1. Aislamiento y cultivo	85
6.2. Caracterización de las poblaciones celulares	87
6.3. Tinción vital fluorescente de las células	88
6.4. Administración de las células ASCs	88
<b>7. Sacrificio y recogida de muestras</b>	<b>89</b>
<b>8. Análisis de las muestras</b>	<b>89</b>
8.1. Análisis histopatológico	89
8.1.1. Protocolo de tinción con hematosilina-eonina	89
8.2. Estudio de poblaciones celulares: inmunohistoquímica	91
8.2.1. Valoración de las muestras	92
8.3. Inmunofluorescencia de las MSCs	92
8.4. Determinación de citoquinas en suero mediante Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	92
8.5. Determinación de citoquinas en pulmón donante	92
8.5.1 Extracción de ARN en muestras de tejido pulmonar y evaluación de su calidad	93
8.5.2. ADN complementario y qPCR	94
<b>9. Secuenciación de microRNAs</b>	<b>95</b>
9.1. Preparación de las librerías y secuenciación con Illumina	95
9.2. Análisis de los microARNs	96
<b>10. Análisis estadístico</b>	<b>97</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>99</b>
<b>1. Modelo experimental de trasplante pulmonar en la rata</b>	<b>101</b>
<b>2. Severidad del proceso</b>	<b>102</b>
<b>3. Localización de las ASCs</b>	<b>102</b>
<b>4. Estudio macroscópico del pulmón donante</b>	<b>103</b>
<b>5. Estudio histológico de los pulmones</b>	<b>105</b>
<b>6. Inmunohistoquímica y recuento de poblaciones celulares inmunes</b>	<b>106</b>
6.1. Sistema inmune innato: macrófagos M1 y M2	106
6.2. Sistema inmune adquirido: linfocitos CD4+ y CD8+	108
<b>7. Determinación de citoquinas en plasma</b>	<b>109</b>

---

7.1. Citoquinas proinflamatorias	110
7.2. Citoquinas antiinflamatorias	112
<b>8. Determinación de citoquinas y quimioquinas en tejido pulmonar</b>	<b>112</b>
8.1. Valoración de la calidad del ARN extraído del tejido pulmonar y qPCR	113
8.2. Citoquinas proinflamatorias	113
8.3. Citoquinas antiinflamatorias	116
8.4. Óxido nítrico sintetasa inducible	117
8.5. Quimioquinas	118
<b>9. Secuenciación de microARNs en muestras de pulmón</b>	<b>119</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>125</b>
<b>1. Efecto de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo sobre el trasplante pulmonar</b>	<b>127</b>
<b>2. Secuenciación de microARNs en el trasplante pulmonar</b>	<b>134</b>
<b>3. Limitaciones del estudio</b>	<b>135</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>137</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>141</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>163</b>
<b>Anexo I. Indicaciones de los trasplantes pulmonares</b>	<b>164</b>
<b>Anexo II. Relación de citoquinas y quimioquinas estudiadas y su función</b>	<b>166</b>
<b>Anexo III. Artículos publicados durante el periodo de doctorado</b>	<b>169</b>



# **Índice de figuras y tablas**



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Número de trasplantes pulmonares por años	38
<b>Figura 2:</b> A) Supervivencia del trasplante pulmonar en adultos en función del tipo de trasplante realizado; B) Supervivencia del trasplante pulmonar sin especificar el tipo, en pacientes adultos y niños	39
<b>Figura 3:</b> Registro del número de trasplantes pulmonares realizados en España hasta la fecha	39
<b>Figura 4:</b> Número de trasplantes pulmonares en España por centro	40
<b>Figura 5:</b> Vías de reconocimiento del injerto donante por las células del propio receptor	45
<b>Figura 6:</b> Diagrama de la jerarquía de las MSC	63
<b>Figura 7:</b> Esquema de los efectos reguladores de las ASCs sobre las células del sistema inmune	68
<b>Figura 8:</b> Extracción y preparación del pulmón donante. Realización de una estereotomía media y disección y extracción del bloque cardiopulmonar	81
<b>Figura 9:</b> Esquema de colocación de un manguito o “cuff” en el pulmón donante y su anastomosis en el pulmón receptor	81
<b>Figura 10:</b> A) Técnicas quirúrgicas descrita de anastomosis vascular y bronquial mediante manguitos o “cuffs”. B) Imagen real del trasplante pulmonar realizado mediante la técnica de “cuff”	82
<b>Figura 11:</b> Visualización microscópica de las células usadas como tratamiento celular una vez muestran una buena confluencia	86
<b>Figura 12:</b> Caracterización de las ASCs mediante citometría de flujo	88
<b>Figura 13:</b> Visualización microscópica por inmunofluorescencia (izquierda) con su correspondiente imagen con hematoxilina-eosina de las ASC en tres muestras aleatorias a los 5 días postrasplante	103
<b>Figura 14:</b> Aspecto de los animales trasplantados a las 2 horas de la cirugía (A) y en el momento previo al sacrificio, a los 5 días postrasplante (B)	104
<b>Figura 15:</b> Aspecto de los pulmones tras el sacrificio (1: pulmones sin alteraciones; 2: pulmón congestivo; 3: pulmón hepatizado; 4: porción apical colapsada)	104
<b>Figura 16:</b> Hematoxilina-Eosina 100x. A) Vénula pulmonar con caso de leve reacción de rechazo A0; B) Vaso sanguíneo con reacción de rechazo agudo grado A3; C) Bronquiolo con rechazo de bajo grado B1R; D) Bronquiolo con un grado B2R de rechazo; E) Vaso de pulmón sano sin rechazo; F) Bronquiolo de pulmón sano sin rechazo	105
<b>Figura 17:</b> Grado de rechazo vascular (A) y rechazo bronquiolar (B) según los criterios establecidos por la ISHLT (n=6 por grupo)	106
<b>Figura 18:</b> Aspecto macroscópico y microscópico del injerto pulmonar. A) Pulmón del grupo MSC SD 5 con un grado de rechazo A3 y B1R. B) Pulmón del grupo Control BN 5 con rechazo A3 y B2R	106
<b>Figura 19:</b> Promedio de macrófagos tipo M1 CD68+ (A) y M2 CD206+ (B) en los pulmones analizados (n = 6 por grupo)	107
<b>Figura 20:</b> Técnica de inmunohistoquímica, 400x. A) Macrófagos CD68+ presentes en el infiltrado inflamatorio que rodea la vénula; B) Macrófago M2 CD206+ presente en el manguito perivenular	107

<b>Figura 21:</b> A) Técnica de inmunohistoquímica, 400x. Vénula con abundantes linfocitos T citotóxicos CD8+. B) Promedio de linfocitos CD8+ en los pulmones analizados (n = 6 por grupo)	108
<b>Figura 22:</b> Técnica de inmunohistoquímica, 400x. Se observa una ausencia de infiltrado de linfocitos CD4+ en bronquiolos (A) y vasos (B)	109
<b>Figura 23:</b> Distribución de las concentraciones plasmáticas de las citoquinas proinflamatorias entre los distintos grupos del estudio	110
<b>Figura 24:</b> Distribución de las concentraciones plasmáticas de las citoquinas antiinflamatorias entre los distintos grupos del estudio	112
<b>Figura 25:</b> Valoración del grado de integridad del ARN de todas las muestras previo a la realización de qPCR y secuenciación. Visualización de las bandas 28S y 18S por electroforesis	113
<b>Figura 26:</b> Expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias en muestras de tejido pulmonar normalizados al gen RNA S18	114
<b>Figura 27:</b> Expresión de ARNm de citoquinas antiinflamatorias en muestras de tejido pulmonar normalizados al gen RNA S18	116
<b>Figura 28:</b> Expresión de ARNm de iNOS en muestras de tejido pulmonar normalizados al gen RNA S18	117
<b>Figura 29:</b> Expresión de ARNm de citoquinas quimiotácticas de las familias CC y CXC, así como receptores de quimioquinas en muestras de tejido pulmonar normalizados al gen RNA S18	118
<b>Figura 30:</b> Análisis de componentes principales basado en las cuentas normalizadas de los diferentes genes obtenidas mediante el método “trimmed mean of M-values” (TMM)	119

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1:</b> Resumen de las características técnicas del trasplante pulmonar en roedores	52
<b>Tabla 2:</b> Aportaciones científicas de los modelos en roedores de trasplante pulmonar	57
<b>Tabla 3:</b> Inmunosupresión utilizada en la actualidad como terapia frente al rechazo tras el trasplante pulmonar	61
<b>Tabla 4:</b> Protocolo de supervisión utilizado en todos los animales sometidos a la cirugía de TP	83
<b>Tabla 5:</b> Características de los grupos experimentales propuestos para el estudio	84
<b>Tabla 6:</b> Criterios de clasificación histológica del rechazo	90
<b>Tabla 7:</b> Relación de primers utilizados para valorar la cantidad de citoquinas y quimioquinas producidas a nivel pulmonar	94
<b>Tabla 8:</b> Variación de la expresión de microARNs respecto al animal sano normal en ratas sometidas a trasplante pulmonar con y sin terapia celular con ASCs	120
<b>Tabla 9:</b> Vías de señalización de todos los microARN desregulados en nuestro modelo, tanto sobreexpresados como infraexpresados	121

# **Abreviaturas**

---



<b>ACP:</b>	Análisis de componentes principales	<b>DMEM:</b>	Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's medium
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ADNc:</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario	<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico	<b>ELISA:</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
<b>ARNm:</b>	Ácido ribonucleico mensajero	<b>FBS:</b>	Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum)
<b>ARNseq:</b>	Secuenciación de Ácido ribonucleico	<b>FiO<sub>2</sub>:</b>	Fracción inspirada de oxígeno
<b>ARS:</b>	Tinción AlizaRIN Red S	<b>G-CSF:</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos (Granulocyte Colony-Stimulating Factor)
<b>ASC:</b>	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Adipose-derived Stromal/Stem Cells)	<b>GM-CSF:</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)
<b>BN:</b>	Brown Norway	<b>H-E:</b>	Hematoxilina-eosina
<b>BO:</b>	Bronquiolitis obliterante	<b>HGF:</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos (Hepatic Growth Factor)
<b>C4d:</b>	Componente de complemento 4	<b>HLA:</b>	Antígenos leucocitarios humanos (Human Leukocyte Antigen)
<b>CD:</b>	Células dendríticas	<b>ICAM1:</b>	Molécula de adhesión intercelular 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)
<b>CMH:</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad	<b>IDO:</b>	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
<b>CPA:</b>	Célula presentadora de antígenos	<b>IFATS:</b>	International Federation for Adipose Therapeutics and Science
<b>CTLA4:</b>	Antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)	<b>Ig:</b>	Inmunoglobulina
<b>DAMPs:</b>	Patrones moleculares asociados al daño (Damage-Associated Molecular Pattern)	<b>IL:</b>	Interleuquina

<b>INF<math>\gamma</math>:</b>	Interferón gamma	<b>PD-1L:</b>	Ligando 1 de muerte programada (Programmed Death-ligand 1)
<b>iNOS:</b>	Óxido nítrico sintetasa inducible	<b>PGE2:</b>	Prostaglandina E2
<b>ISCT:</b>	Sociedad Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy)	<b>qPCR:</b>	Reacción en cadena de la polimersa en tiempo real o cuantitativa (quantitative Polymerase Chain Reaction)
<b>ISHLT:</b>	Sociedad Internacional para el Trasplante de Corazón y Pulmón (The International Society for Heart & Lung Transplantation)	<b>RAS:</b>	Enfermedad pulmonar restrictiva (Restrictive Allograft Syndrome)
<b>LDPG:</b>	Gucosa dextrano bajo en potasio (Low Potassium Dextran Glucose)	<b>SD:</b>	Sprague Dowley
<b>M1:</b>	Macrófagos activados convencionalmente	<b>SII:</b>	Sistema inmune innato
<b>M2:</b>	Macrófagos activados alternativamente	<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	Factor de crecimiento trasformante beta (Transforming Growth Factor beta)
<b>MSCs:</b>	Células madre mesenquimales (Mesenchimal Stem Cells)	<b>Th1:</b>	Linfocitos T helper 1
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells)	<b>Th2:</b>	Linfocitos T helper 2
<b>NK:</b>	Natural Killer	<b>TLR:</b>	Receptor tipo toll (Toll-Like Receptor)
<b>ONT:</b>	Organización Nacional de Trasplantes	<b>TNF<math>\alpha</math>:</b>	Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)
<b>ORO:</b>	Tinción Oil Red O	<b>TP:</b>	Trasplante pulmonar
<b>PaO<sub>2</sub>:</b>	Presión parcial de oxígeno en la sangre arterial	<b>UI:</b>	Unidades internacionales
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)	<b>VCAM1:</b>	Moléculas de adhesión vasculares (Vascular Cell Adhesion Protein 1)
<b>Pb:</b>	Pares de bases		

# **Resumen/Abstract**

---



**Introducción.** El trasplante pulmonar es, en ocasiones, la única opción terapéutica disponible para las fases finales de determinadas enfermedades respiratorias, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la enfermedad pulmonar intersticial difusa, las bronquiectasias asociadas a fibrosis quística o la hipertensión pulmonar, entre otras. Pese a haber aumentado con el tiempo, la tasa de viabilidad del injerto es bastante más baja si se compara con el trasplante de otros órganos sólidos, ya que cae rápidamente en el primer año y es de aproximadamente un 50% a los 5 años. Este hecho, unido a que las terapias actuales se basan en inmunosupresores, con sus consiguientes efectos adversos, ha hecho que se estén buscando nuevas estrategias terapéuticas. Actualmente, se están realizando numerosas investigaciones y ensayos clínicos con células madre mesenquimales (MSCs) procedentes de distintos tipos de tejidos. Esto se debe a que han demostrado tener una capacidad inmunomoduladora afectando tanto a la inmunidad innata como a la adquirida lo que, unido a otras características como sus propiedades regenerativas, angiogénica o antifibróticas, las convierten en candidatas de estudio como terapias alternativas. Por otra parte, en la actualidad se está buscando una relación entre distintas enfermedades con la alteración en la expresión de microARNs, que intervienen en distintas vías o rutas de señalización actuando sobre determinados genes. Consisten en pequeños fragmentos de ARN no codificantes cuya modulación cuando están desregulados podrían revertir los procesos patológicos a un estado fisiológico normal, constituyendo un tratamiento novedoso.

**Objetivos.** Nuestro objetivo principal ha sido evaluar el efecto de las MSCs derivadas de tejido adiposo (ASCs) sobre rechazo hiperagudo y agudo tras un trasplante pulmonar en rata. Además, hemos querido dar a conocer la desregulación de los microARNs ocasionada tras el trasplante con y sin terapia celular.

**Material y métodos.** Se han puesto a punto dos modelos de trasplante ortotópico de pulmón en rata: isogénico (misma cepa donante y receptora) y alogénico (distinta cepa donante y receptora). Ambos fueron sometidos a un tratamiento o no con ASCs, administradas de forma intravenosa por la vena de la cola a una dosis única de  $1 \times 10^6$  células/kg. Tanto el rechazo como el estado inflamatorio se evaluaron a las 24 horas y cinco días postrasplante mediante un análisis macroscópico de los injertos donantes y a través de técnicas histológicas e inmunohistoquímicas para establecer el grado de rechazo vascular y bronquial obtenido. Además, se realizaron también determinaciones de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, así como quimioquinas tanto en plasma como en las muestras de tejido pulmonar utilizando técnicas como ELISA y PCR cuantitativa. Por último, se estudió la expresión de los microARNs tras el rechazo agudo, con y sin tratamiento con ASCs mediante secuenciación de ARN.

**Resultados.** Todos los animales, independientemente de si recibieron o no tratamiento con ASCs manifestaron un rechazo de moderado a grave. En los trasplantes alogénicos, las ASCs disminuyeron los niveles de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, así como los macrófagos M1 y linfocitos CD8+ que se mantuvieron más elevados en los controles sin tratamiento. Sorprendentemente, en los trasplantes isogénicos, la inflamación fue mayor en el grupo con ASCs a las 24 horas postrasplante frente a los cinco días postrasplante. Finalmente, la secuenciación de ARN puso de manifiesto la expresión alterada de 210 microARNs (115 aumentada y 95 disminuida) en el grupo de animales trasplantados sin tratamiento, y 287 microARNs (115 aumentada y 112 disminuida) en el grupo de trasplantes con terapia celular, en comparación con pulmones sanos sin trasplante.

**Conclusiones.** Las ASCs no evitaron el rechazo del injerto tras el trasplante pulmonar, al mostrar todos los animales trasplantados, tanto los que recibieron terapia celular como los que no, un grado similar y evidente de rechazo agudo. Observamos cómo, tras su administración, las ASCs migraron al órgano diana manteniéndose en él durante los 5 días máximos de estudio. Pese a no evitar el rechazo, las ASCs sí parecen mostrar efectos inmunomoduladores en los trasplantes alogénicos, pero no así en los isogénicos, en los que parecen incrementar la inflamación tras su administración. Estos datos nos sugieren que, el ambiente inflamatorio en el que se encuentran las ASCs, en nuestro caso, debido al tipo de trasplante realizado, podría modificar sus efectos inmunomoduladores. En lo referente a la expresión de microARNs, el trasplante pulmonar, independientemente del tratamiento con ASCs, produce una desregulación en su expresión estando algunos aumentados o disminuidos con respecto a controles sanos. Finalmente, sería destacable la necesidad de nuevos estudios para dilucidar la falta de efecto protector de las ASCs en nuestro trabajo, ya que éstas se han demostrado eficaces en otros modelos de trasplante.

**Introduction.** Lung transplantation is sometimes the only therapeutic option available for the final phases of certain respiratory diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease, diffuse interstitial lung disease, bronchiectasis associated with cystic fibrosis or pulmonary hypertension, among others. Despite having increased over time, the viability rate of the graft is considerably lower when compared to the transplant of other solid organs, since it falls rapidly in the first year and being approximately 50% at 5 years. In addition, immunosuppressants therapies have adverse effects. This has led to the search for new therapeutic strategies. Nowadays, numerous investigations and clinical trials are underway with mesenchymal stem cells (MSCs) from different types of tissues. This is because they have shown an immunomodulatory capacity affecting both innate and acquired immunity which, along with other characteristics such as their regenerative, angiogenic or antifibrotic properties, make them relevant candidates as alternative therapies. However, new investigations are presently looking for a relationship between different diseases and the alteration in the expression of microRNAs, which intervene in different signaling pathways or routes acting on certain genes. They consist of small fragments of non-coding RNA whose modulation when deregulated could revert the pathological processes to a normal physiological state, constituting a novel treatment.

**Goals.** Our main objective was to evaluate the adipose tissue-derived MSCs (ASCs) effect on hyperacute and acute rejection after lung transplantation in rats. In addition, we wanted to analyze the deregulation of microRNAs caused after transplantation with and without cell therapy.

**Material and methods.** Two models of orthotopic lung transplant in rats have been developed: isogenic (same donor and recipient strain) and allogenic (different donor and recipient strains). They were treated or not with ASCs, intravenously administered by the tail vein at a single dose of  $1 \times 10^6$  cells/kg. Both the rejection and the inflammatory state were evaluated at 24 hours and five days post-transplant by a macroscopic analysis of the donor grafts and through histological and immunohistochemical techniques to establish the degree of vascular and bronchial rejection. In addition, determinations of proinflammatory and antiinflammatory cytokines, as well as chemokines in both plasma and lung tissue samples were performed using techniques such as ELISA and quantitative PCR. Finally, microRNAs expression after acute rejection was studied, with and without treatment with ASCs, using RNA sequencing.

**Results.** All the animals, regardless whether or not they received treatment with ASCs, showed a moderate to severe rejection. In allogeneic transplants, ASCs decreased levels of proinflammatory cytokines, chemokines, as well as M1 macrophages and CD8 + lymphocytes, that remained higher in controls without treatment. Surprisingly, isogenic transplants showed a greater inflammation in ASCs group at 24 hours post-transplant compared to the five days post-transplant. Finally, RNA sequencing revealed the altered expression of 210 microRNAs (115 increased and 95 decreased) in transplanted animals without treatment, and 287 microRNAs (115 increased and 112 decreased) in the transplanted group with cell therapy, both compared to healthy lungs without a transplant.

**Conclusions.** ASCs did not avoid rejection of the graft after lung transplantation, showing all the transplanted animals, irrespective of the treatment, a similar and evident degree of acute rejection. We observed how, after

their administration, ASCs migrated to the target organ (lung graft), staying in it during the 5 maximum days of study. Despite not avoiding rejection, ASCs did show immunomodulatory effects in allogeneic transplants, but not in isogenic ones, where they increased inflammation after administration. This data suggests that inflammatory environment in which ASCs are found, in our case, due to the type of transplant performed, seems to modify their immunomodulatory effects. Regarding the expression of microRNAs, lung transplantation, with or without cell treatment, produces a deregulation in their expression, some being increased or decreased compared to healthy controls. Finally, new studies would be needed to elucidate the lack of protective effect of ASCs in our work, since these have been known to be effective in other transplant models.

# **Introducción**

---



## 1. El trasplante pulmonar

### 1.1. Historia y desarrollo

El trasplante pulmonar (TP) es, en ocasiones, la única opción terapéutica disponible para las fases finales de determinadas enfermedades respiratorias, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la enfermedad pulmonar intersticial difusa, las bronquiectasias asociadas a fibrosis quística, la bronquiolitis obliterante, la sarcoidosis o la hipertensión pulmonar arterial<sup>1-4</sup>.

Sin embargo, el éxito del mismo se produjo tras muchos años de estudios experimentales y ensayos clínicos. De este modo, y a diferencia del trasplante de otros órganos sólidos, su realización de manera exitosa y rutinaria conllevó más tiempo, debido a problemas en la cicatrización de las anastomosis bronquiales, la elevada inmunogenicidad del pulmón, que requiere una mayor inmunosupresión, y el riesgo de infección pulmonar<sup>5</sup>.

Aunque los primeros intentos experimentales se llevaron a cabo en animales a principios del siglo XX, como se describirá en el apartado de modelos animales, no fue hasta 1963 cuando James D. Hardy realizó el primer trasplante de pulmón izquierdo con una supervivencia del paciente de 18 días, que falleció como consecuencia de una infección e insuficiencia renal, pese a que el pulmón mostraba una buena ventilación y ausencia de rechazo<sup>6-8</sup>.

Años más tarde, en 1968, D. Cooley realizó el primer trasplante cardiopulmonar en un niño de dos meses, aunque falleció a las 14 horas debido a un sangrado<sup>9</sup>. Un año más tarde, W. Lillehei llevó a cabo el segundo trasplante de esta categoría en un paciente de 43 años que vivió 8 días y finalmente murió a causa de una neumonía<sup>10</sup>. En 1971, C. Barnard realizó otro trasplante del bloque cardiopulmonar con una supervivencia del paciente de 23 días<sup>11</sup>.

Entre 1963 y hasta 1981, todos los intentos de trasplante, tanto de pulmones, lóbulos o cardiopulmonares fracasaron a largo plazo. En ese año, B. Reitz efectuó con éxito un trasplante cardiopulmonar debido a mejoras en la técnica quirúrgica y al uso de ciclosporina, que permitió revertir dos episodios de rechazo agudo<sup>12,13</sup>.

En 1983, J. Cooper y su equipo utilizaron omentum para cubrir la anastomosis bronquial tras un trasplante pulmonar derecho, lo que permitió que el paciente viviera 7 años aunque finalmente falleció debido a un fallo renal<sup>14</sup>. Después de ello, en 1986, tuvo éxito al realizar simultáneamente un trasplante bilateral<sup>15</sup>. Más tarde, se describió la técnica para realizar un doble trasplante pulmonar como si fueran dos trasplantes secuenciales unipulmonares, para mejorar los resultados evitando el uso de un bypass cardiopulmonar convencional<sup>16,17</sup>.

### 1.2. Situación actual

En la Sociedad Internacional para el Trasplante de Corazón y Pulmón (con siglas en inglés ISHLT: The International Society for Heart & Lung Transplantation) se encuentran los últimos datos actualizados que hacen referencia a la situación global del trasplante pulmonar. No aparecen registrados los trasplantes realizados en todos los países del mundo, sino sólo de aquellos que son reportados a dicha asociación

internacional, como lo hace España. Pese a ello, este registro proporciona una idea de cómo ha evolucionado el trasplante.

Así, hasta junio de 2016 se han realizado 4745 trasplantes combinados de corazón y pulmón, de los cuales 4015 fueron en adultos y 730 trasplantes pediátricos. Contando únicamente los trasplantes de pulmón, la cifra total asciende hasta 62456, habiéndose realizado 60107 en adultos y 2330 en niños.

Como se puede observar en la siguiente gráfica (figura 1), tanto en adultos como en niños, el número de trasplantes se ha incrementado de manera considerable a lo largo de los años, especialmente cuando se realiza el trasplante bilateral. En el caso del trasplante unilateral, el número se ha mantenido constante desde aproximadamente 1993, aumentando su número en menor medida.

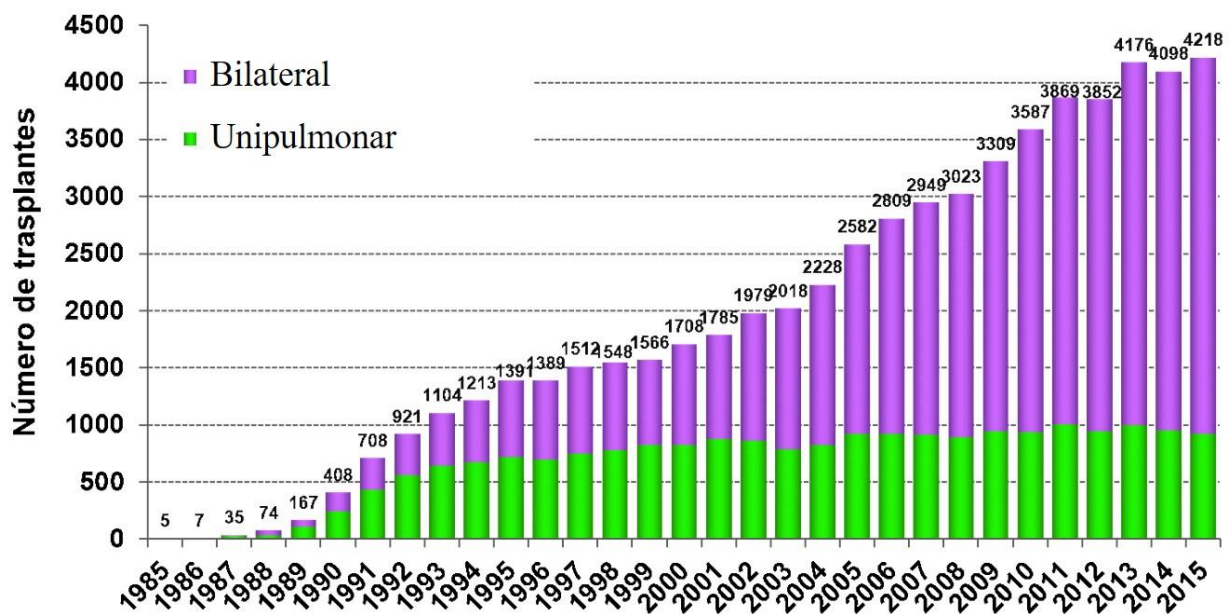
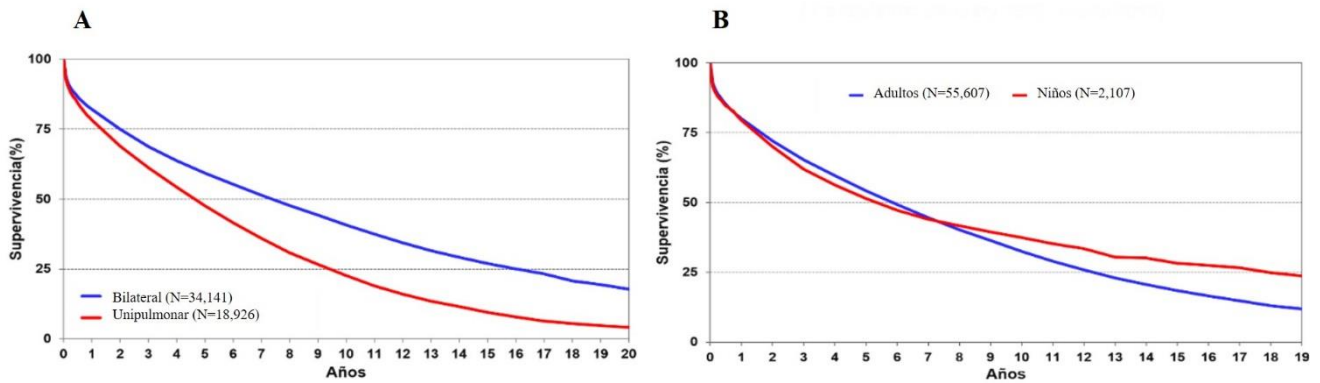


Figura 1: Número de trasplantes pulmonares por años (imagen obtenida del registro de la ISHLT).

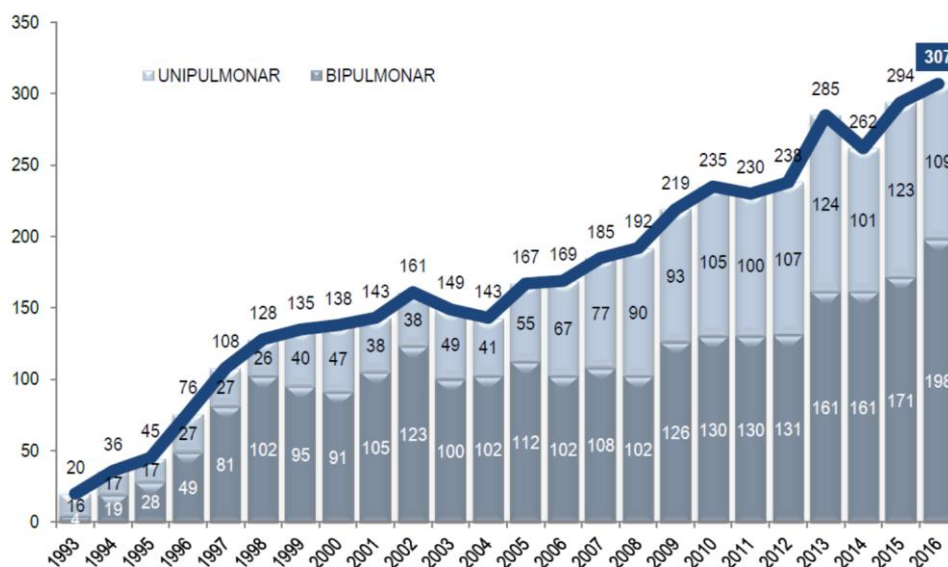
En la actualidad, la tasa de supervivencia ha aumentado con el tiempo. Sin embargo, ésta es bastante menor si se compara con el trasplante de otros órganos sólidos, ya que cae rápidamente en el primer año, siendo a los 5 años de un 50% aproximadamente, independientemente de que el receptor sea adulto o niño. Por otra parte, al comparar los trasplantes unilaterales con los bilaterales, la supervivencia resulta un poco mayor en este último caso llegando casi a los 8 años en el 50% de los casos, frente a los 5 años cuando se realiza trasplante unipulmonar (figura 2).



**Figura 2:** A) Supervivencia del trasplante pulmonar en adultos en función del tipo de trasplante realizado; B) Supervivencia del trasplante pulmonar sin especificar el tipo, en pacientes adultos y niños. Datos de enero de 1990 a junio de 2015 (imagen obtenida del registro de la ISHLT).

### 1.3. Situación del trasplante pulmonar en España

En la última memoria publicada por la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) se indica que desde 1990 hasta 2016 inclusive, se han realizado un total de 4.088 trasplantes, tanto unipulmonares como bipulmonares. El número ha ido incrementándose hasta alcanzar los 307 trasplantes realizados durante el último año registrado (figura 3). Además, de acuerdo a la información proporcionada por la ONT, la supervivencia es bastante más baja que en otros trasplantes de órganos sólidos, siendo de un 73% en un año, un 53% en cinco años y no se registra supervivencia a 10 años <sup>18</sup>.



**Figura 3.** Registro del número de trasplantes pulmonares realizados en España hasta la fecha (imagen obtenida de la ONT).

Es importante destacar que durante el 2016 ha habido siete centros autorizados para realizar los trasplantes pulmonares (figura 4)

HOSPITAL	1990-2000	2001-2005	2006-2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total Acumulado
H.U. Gregorio Marañón	5 (4)	-	-	-	-	-	-	-	-	5 (4)
H.U. Vall d'Hebrón	171 (100)	153 (134)	233 (154)	49 (28)	66 (34)	69 (42)	67 (44)	58 (42)	73 (52)	939 (630)
H.U. Puerta Hierro	143 (84)	150 (109)	181 (118)	32 (22)	30 (17)	37 (28)	47 (37)	40 (31)	43 (37)	703 (483)
H.U. La Fe	178 (142)	113 (98)	127 (88)	28 (20)	30 (22)	29 (17)	30 (18)	35 (24)	49 (38)	619 (467)
H.U. Reina Sofía	116 (81)	96 (60)	123 (64)	24 (14)	24 (11)	34 (14)	26 (9)	35 (6)	33 (11)	511 (270)
H.U. Marqués de Valdecilla	50 (29)	98 (68)	127 (84)	44 (28)	34 (22)	49 (26)	36 (23)	48 (32)	39 (24)	525 (336)
H.U. Ramón y Cajal	22 (19)	26 (13)	-	-	-	-	-	-	-	48 (32)
C.H.U. A Coruña	24 (21)	127 (60)	184 (46)	36 (9)	35 (9)	42 (17)	26 (11)	47 (16)	39 (14)	560 (203)
H.U. Doce de Octubre	-	-	25 (12)	17 (9)	18 (15)	25 (17)	30 (19)	31 (20)	30 (21)	176 (113)
H.U. La Paz Infantil*	-	-	-	-	1 (1)	-	-	-	1 (1)	2 (2)
<b>Total Anual</b>	<b>709 (480)</b>	<b>763 (542)</b>	<b>1000 (566)</b>	<b>230 (130)</b>	<b>238 (131)</b>	<b>285 (161)</b>	<b>262 (161)</b>	<b>294 (171)</b>	<b>307 (198)</b>	<b>4.088 (2.540)</b>
<b>Tx infantiles (&lt;16 años)</b> Incluidos en el total	<b>38</b>	<b>31</b>	<b>31</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>130</b>

Figura 4 Número de trasplantes pulmonares en España por centro (imagen obtenida de la ONT).

#### 1.4. Aspectos clínicos del trasplante pulmonar

Como en los trasplantes de otros órganos sólidos, existen una serie de indicaciones por las cuales se realizan los trasplantes pulmonares, tanto unilaterales como bilaterales, así como contraindicaciones también claramente establecidas<sup>1,2</sup> (anexo 1). Dado que no constituyen nuestro objeto de estudio, no nos centraremos en ellos. Sin embargo, lo que sí resulta de gran importancia es el estudio de las principales complicaciones que se producen tras el trasplante y que impiden que éste sea un completo éxito. Conocer estas complicaciones ha potenciado el desarrollo de modelos experimentales como herramienta fundamental para tratar de entenderlas y solucionarlas, como veremos a continuación. Primero explicaremos de manera resumida los principales problemas asociados al rechazo para pasar, a continuación, a los modelos experimentales desarrollados hasta el momento.

Dentro de las principales causas de morbilidad como de mortalidad tras el trasplante pulmonar se podrían destacar las siguientes:

- **Fallo primario del injerto**

Consiste en un daño agudo del pulmón trasplantado (primeras 72 horas postrasplante) que comprende desde una moderada filtración en el alveolo hasta un daño grave y difuso de la pared alveolar, con el

consiguiente edema, con o sin infiltrado e hipoxemia progresiva. Este síndrome ha recibido distintas denominaciones como daño por isquemia-reperfusión, edema pulmonar no cardiogénico, síndrome distrés respiratorio agudo postrasplante, entre otras<sup>19</sup>. Se debe a los efectos mecánicos de la ventilación, la isquemia a la que se somete el órgano, las condiciones y tiempo de almacenaje del órgano y la reperfusión. Para su estudio se han desarrollado tanto modelos in vitro como in vivo.

#### - **Rechazo hiperagudo**

Se trata de un rechazo humoral fulminante que ocurre en los primeros minutos u horas tras la reperfusión del injerto pulmonar como consecuencia de la presencia, antes del trasplante, de anticuerpos específicos preformados, debidos a transfusiones sanguíneas o trasplantes previos<sup>20</sup>. Actualmente es poco frecuente debido a que antes del trasplante se determina la presencia o no de esos antígenos leucocitarios humanos (en inglés HLA) para evitar que se produzca dicha incompatibilidad.

Cuando se produce, se observa un daño agudo del pulmón con infiltrado de neutrófilos, plaquetas y trombos de fibrina en el septo alveolar con necrosis fibrinoide y hemorragia. La unión de los anticuerpos a su antígeno HLA específico en las células endoteliales activa el complemento que, como resultado final, provoca la lisis de dichas células endoteliales, exponiéndose la membrana basal y activando consecuentemente la cascada de coagulación que conduce a la trombosis y el infarto. Además, esta activación del complemento atrae a neutrófilos y macrófagos que amplían el daño del injerto.

Clínicamente, se produce una rápida hipoxemia y edema en las vías aéreas así como opacidades difusas en las imágenes radiológicas, todo ello en las primeras 24 horas postrasplante<sup>21</sup>.

Tanto la radiografía como la broncoscopia y el lavado bronquial resultan de gran valor en el diagnóstico. Las biopsias pulmonares son siempre muy importantes pero, en este caso, el riesgo que supone el procedimiento hace que no se puedan llevar a cabo.

#### - **Rechazo agudo**

Las dos principales formas de rechazo agudo que se describen son:

- **Rechazo celular agudo:** se caracteriza por ser el tipo de rechazo agudo más común mediado por linfocitos T que reconocen como extraño al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) o a otros antígenos. Afecta a más del 50% de los pulmones trasplantados durante el primer año<sup>21</sup>. En este caso, se clasifica en dos subtipos<sup>22</sup>:
  - **Tipo A:** varía desde un infiltrado inflamatorio linfocítico perivascular moderado sin daño tisular aparente hasta un infiltrado que puede llegar al intersticio y espacios aéreos con daño pulmonar agudo y perivascularitis.
  - **Tipo B:** puede encontrarse desde vías aéreas inflamadas (bronquitis linfocítica) de bajo grado sin daño tisular hasta un alto grado en el que se distingue un mayor infiltrado y daño tisular de las vías aéreas.

Ambos tipos pueden predisponer en gran medida al desarrollo del síndrome de bronquiolitis obliterante<sup>21</sup>.

En los dos casos se trata de una respuesta inflamatoria, predominantemente linfocitaria centrada en los vasos sanguíneos o las vías aéreas. Lo que se observa histopatológicamente es un infiltrado mononuclear perivascular que se puede extender hasta el subendotelio envolviendo las paredes alveolares en altos grados de rechazo (tipo A). Por otra parte, puede encontrarse un componente en las vías aéreas con una respuesta linfocítica que se inicia en la submucosa de los bronquiolos con un aumento de la gravedad al extenderse a través de la membrana basal (tipo B). En ambos casos, estos patrones de afectación pueden ocurrir de manera aislada o presentarse conjuntamente.

En ocasiones se observan eosinófilos en las zonas vasculares o bronquiales. Por su parte, la presencia o no de fibrosis hialina en las vías aéreas y los vasos sanguíneos diferencia el rechazo agudo del crónico<sup>22</sup>.

Dentro de los factores de riesgo se pueden incluir la disparidad en los antígenos leucocitarios humanos (HLA)<sup>23</sup>, factores genéticos, como la resistencia a fármacos<sup>24</sup>, el tipo de inmunosupresión, siendo mayor la prevalencia del rechazo en pacientes con ciclosporina que con tacrólimus<sup>25</sup>, o la edad, en la que los menores de 34 años presentan un mayor rechazo<sup>26</sup>, entre otros factores.

Para su detección son fundamentales el lavado broncoalveolar, para el conteo de células, así como las biopsias transbronquiales.

- **Rechazo mediado por anticuerpos:** se produce como consecuencia de la presencia de anticuerpos contra el CMH del donante u otros epítomos. Estos anticuerpos pueden estar presentes en el receptor a bajas concentraciones antes del trasplante o desarrollarse posteriormente. Aunque no está del todo caracterizado, se describe como un daño pulmonar agudo con depósito de C4d de complemento y neutrófilos en los capilares y macrófagos intravasculares<sup>27</sup>.

La inflamación de los capilares es un rasgo que aparece con frecuencia<sup>28</sup>, aunque no resulta específica.

De nuevo, con la sintomatología que aparece a las semanas o meses y la realización de pruebas de función pulmonar, broncoscopia y biopsias transbronquiales se realiza el diagnóstico. Mediante inmunohistoquímica se determina la presencia de depósito de Cd4<sup>27</sup>.

Para realizar un diagnóstico correcto habría que observar la existencia de un fallo primario del injerto, presencia de anticuerpos específicos del donante en el suero del individuo receptor, evidencias histológicas del daño agudo y depósito de complemento Cd4 subendotelial en los capilares alveolares, además de descartar otras posibles causas de disfunción del injerto<sup>27</sup>.

## - **Disfunción crónica del injerto pulmonar o rechazo crónico**

El fracaso crónico del injerto continúa siendo un obstáculo muy importante en la mejora de la supervivencia a largo plazo tras el trasplante. Actualmente, se distinguen dos causas principales del mismo:

- **Bronquiolitis obliterante.** Es la causa más común de esta disfunción crónica del injerto que histológicamente se caracteriza principalmente por una densa fibrosis eosinofílica hialina en la submucosa de la membrana y bronquiolos respiratorios con obstrucción total o parcial de su luz<sup>29</sup>. También se describe la vasculopatía del injerto con engrosamiento de las paredes de las arterias y venas pulmonares<sup>30</sup>. Todo esto conlleva una gran dificultad para respirar. Aparece aproximadamente en el 50% de los pacientes a los cinco años tras el trasplante<sup>31</sup>.

Las lesiones primarias que se producen consisten en una inflamación de la submucosa por linfocitos y una interrupción del epitelio de las vías respiratorias bajas. Esto es seguido por un crecimiento del tejido granular en la luz de las vías aéreas con su consecuente obstrucción total o parcial. Además, se pueden encontrar bronquiectasias, neumonía y varios grados de rechazo celular agudo<sup>32</sup>.

El resultado final de este trastorno es la obliteración de las vías respiratorias bajas que produce una limitación al flujo aéreo.

- **Disfunción o enfermedad pulmonar restrictiva (RAS).** Se describe como un defecto restrictivo ventilatorio más que como el patrón obstructivo tradicional que se observa en el síndrome anterior, y con un infiltrado fibrótico en los lóbulos superiores visibles por pruebas de imagen<sup>33,34</sup>. Sus alteraciones más características son, por tanto, cambios fibróticos a nivel pleural y subpleural, presencia de exudado fibrinoso intraalveolar y neumonía aguda fibrinosa<sup>33</sup>.

Su afectación patológica incluye cambios en parénquima y pleura con daño alveolar y fibrosis del intersticio y septo interlobular, así como fibrosis pleural, con o sin lesiones de bronquiolitis obliterante<sup>35</sup>.

A nivel clínico, más que una disminución progresiva de la función pulmonar propia de la bronquiolitis obliterante, se manifiesta como una serie de procesos agudos intensificados con distrés respiratorio o dificultad respiratoria que, en ocasiones, origina la muerte o requiere de un retrasplante de urgencia<sup>36</sup>.

## - **Desarrollo de infecciones**

Por último, una complicación frecuente y nada despreciable del trasplante de pulmón se debe a infecciones que aparecen tanto de forma temprana como más tardíamente. Sus causas pueden ser múltiples, desde la inmunosupresión del paciente trasplantado, la carga bacteriana previa del pulmón trasplantado o el estado del receptor, que puede también tener una mayor carga microbiana a nivel

bronquial por patologías previas del pulmón. Además, la propia técnica quirúrgica también puede inducir un aumento de las infecciones<sup>37</sup>.

## 2. Inmunobiología del rechazo

### 2.1. El trasplante pulmonar y el rechazo

Dado que nuestro estudio está centrado en el rechazo agudo se hace preciso resumir las partes básicas de la inmunobiología del trasplante.

La respuesta inmune que se produce tras un trasplante es un proceso gradual en el que interviene el sistema inmune, tanto innato (o respuesta no específica) como adaptativo (o respuesta específica).

La respuesta innata (sistema inmune innato, SII) incluye el reclutamiento y la intervención de macrófagos, neutrófilos, células Natural Killer (NK), citoquinas, ciertos receptores celulares y componentes del complemento<sup>38</sup>.

Las moléculas producidas como consecuencia del daño debido a la extracción del órgano, la isquemia fría y la reperfusión del mismo atraen a los neutrófilos, macrófagos y monocitos que, junto con las citoquinas proinflamatorias que estimulan, provocan una respuesta inflamatoria importante y el consiguiente daño del órgano. Todo ello contribuye también al desencadenamiento de la respuesta inmune adaptativa, interviniendo tanto linfocitos T como B.

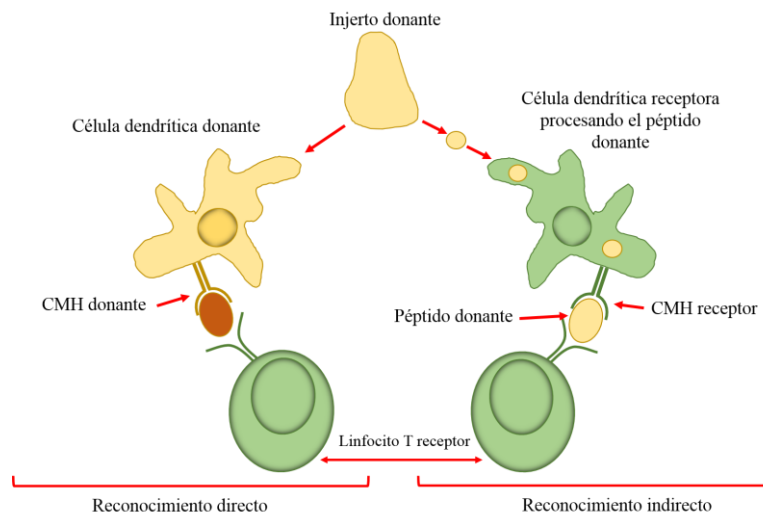
Ambas respuestas se encuentran muy relacionadas, ya que la activación de las células T por antígenos específicos conduce a la producción y secreción de citoquinas y quimioquinas que a su vez reclutan componentes del SII junto con la producción de aloanticuerpos y citotoxicidad mediada por células CD8+. Además, la producción de componentes del complemento resulta de gran importancia para la activación de los linfocitos T<sup>39</sup>.

Por lo tanto, la respuesta inmune adquirida tiene un papel destacado en la destrucción del injerto, de igual manera que el rechazo mediado por anticuerpos se produce por la unión de los aloanticuerpos y la activación del complemento.

De forma resumida, la activación de las células T requiere de dos señales. Por un lado, se produce por la interacción del receptor de dichas células con el antígeno presentado como un péptido por las células presentadoras de antígenos. Por otro lado, la siguiente señal está aportada por estimulación conjunta de la interacción entre ligando/receptor en las superficies de las células T y células presentadoras de antígeno.

Cuando las células se activan, se produce una expansión clonal de las mismas bajo la influencia de factores de diferenciación y crecimiento mitogénico como la IL-2. Las células entonces inducen citotoxicidad mediada por linfocitos CD8+, ayudan a la producción de anticuerpos por las células B y potencian a los macrófagos en la inducción de respuestas retardadas de hipersensibilidad.

El reconocimiento del injerto por los linfocitos T es el principal mecanismo de rechazo del órgano trasplantado. Hay descritas dos formas de reconocimiento del injerto, directa e indirecta (figura 5).



**Figura 5:** Vías de reconocimiento del injerto donante por las células del propio receptor.

En la **vía directa**, de gran importancia en el rechazo agudo, los linfocitos T del receptor reconocen a las células presentadoras de antígeno presentes en el órgano trasplantado en forma de células dendríticas intersticiales, debido a su alta densidad de moléculas del CMH alogénicas intactas en su superficie. Se cree que esta vía es dominante durante el rechazo agudo temprano.

Por otra parte, en la **vía indirecta**, los linfocitos T reconocen los aloantígenos procesados y presentados por las células presentadoras de antígenos del propio receptor. Es más tardía y se cree que está más relacionada con el rechazo crónico. Se trata del sistema habitual de reconocimiento de los antígenos en el que el sistema inmune del receptor reconoce a un antígeno extraño, en este caso del donante, que es presentado por la célula presentadora de antígenos del receptor en su CMH, de clase I ó II, a los linfocitos T del receptor que se activan cuando reconocen a su CMH con el péptido.

Aunque la respuesta inmune primaria está caracterizada por la respuesta proliferativa de los linfocitos T a un número limitado de alopéptidos inmunogénicos de CMH, las respuestas secundarias como las que ocurren en el rechazo crónico o rechazo agudo tardío están asociadas con una respuesta de dichos linfocitos a un mayor y variable repertorio de péptidos que estaban previamente silenciados.

Los antígenos del CMH identifican las células del propio individuo diferenciándolas de aquellas ajenas al mismo. Dada su variabilidad polimórfica, es difícil que dos pacientes presenten los mismos determinantes antigénicos. Hay dos tipos de moléculas CMH: clase I, presente en las células nucleares del individuo, y clase II, en las células presentadoras de antígenos, como los linfocitos B, macrófagos y células dendríticas. Estas últimas constituyen, de alguna manera, las células presentadoras de antígeno “profesionales del trasplante”.

Cuando se trata de dos gemelos idénticos, con HLA iguales, las células del injerto trasplantado no se reconocen como ajenas como ocurre en el caso contrario, en el que se activa el sistema inmune.

Por lo tanto, se pueden diferenciar dos fases en esta respuesta: una primera fase en la que se detectan y reconocen como extrañas a las células del órgano trasplantado, y otra segunda fase efectora en la que se lleva a cabo la destrucción del injerto.

De manera resumida, las células presentadoras de antígenos del receptor que son, como se ha comentado con anterioridad, las células dendríticas, macrófagos y células endoteliales, captan y procesan los aloantígenos del receptor y los colocan en sus moléculas de superficie del CMH. A continuación, se las presentan a los receptores de los linfocitos T. Esta vía indirecta necesita de la unión de la molécula CD28 de los linfocitos T con el ligando de superficie B7-1 o B7-2 de las CPA iniciándose así una señal coestimuladora para reconocer al antígeno<sup>40-42</sup>. Además de estos ligandos que provocan la señal activadora, el antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA4), que también se une a B7-1 y B7-2, promueve una señal inhibidora. Este ligando se expresa en la superficie celular sólo tras la activación inicial de las células T<sup>43</sup>. Por tanto, la unión de CTLA4 con B7 parece que disminuye la respuesta inmune sugiriendo que este antígeno tiene un papel importante en la terminación de la respuesta de las células T.

Las células dendríticas con sus antígenos procesados se dirigen a las zonas con abundantes linfocitos T para presentarles sus antígenos, activando a los linfocitos CD4+ a través del CMH tipo II o linfocitos CD8+ con el CMH tipo I. Al contactar las células dendríticas con los linfocitos CD4+, se desencadena la secreción de IL-12 activando la respuesta inflamatoria tipo Th1 con producción y citotoxicidad de las células T citotóxicas y de las células NK, o se liberan las interleucinas IL-10 o IL-14, que activan la respuesta antiinflamatoria Th2.

Por otra parte, en función de las citocinas producidas, los monocitos se pueden clasificar por su fenotipo en M1, asociado a las respuestas proinflamatorias al ser activado por las citoquinas proinflamatorias, interferón o endotoxinas, o presentar un fenotipo M2, con acción antiinflamatoria al verse estimulados por la interleuquina 4<sup>44</sup>.

Cuando los linfocitos T se han activado al reconocer a los antígenos extraños se dividen rápidamente mediante expansión clonal y, cuando se elimina el antígeno del organismo, sufren un proceso de apoptosis.

Sin embargo, persisten las llamadas células de memoria. De este modo, si aparecen de nuevo los antígenos extraños, responden más rápidamente. Esto se produce, por ejemplo, si el individuo ha recibido transfusiones previas al trasplante, en casos de retrasplantes o si le han sido trasplantados otros órganos con anterioridad. En ocasiones se produce también una reacción cruzada o inmunidad heteróloga al reaccionar las células T activadas por antígenos infecciosos con moléculas del CMH<sup>45</sup>.

Estas células de memoria actúan rápidamente y pueden proteger frente a las infecciones pero dificultar, a su vez, la tolerancia hacia el órgano trasplantado. Además, cuando es necesario realizar un retrasplante, la larga supervivencia de este tipo de células aumenta el riesgo de un nuevo rechazo del injerto trasplantado.

## 2.2. Tipos de rechazo

El **rechazo celular agudo** depende principalmente de la presencia de linfocitos T, que al reconocer los antígenos del injerto provocan su destrucción. En función de los estímulos que reciban, debido a las condiciones tanto sistémicas como locales en las que está el injerto, se produce una respuesta dependiente de linfocitos CD4 colaboradores que se diferencian en linfocitos efectores y promueven una respuesta Th1 (mediante la vía directa de reconocimiento), al ser estimulados por la IL-2, y la producción de interferón  $\gamma$ , activando así a los macrófagos y favoreciendo una respuesta citotóxica o celular. Por otro lado, se puede dar una respuesta Th2 (con la vía indirecta de reconocimiento) con la secreción de IL-4, y ayudando a que la activación de los linfocitos B ocasione un rechazo humoral por la producción de aloanticuerpos.

También pueden intervenir linfocitos Th17, que producen IL-17 e IL-22, con efectos proinflamatorios, implicados en el rechazo de órganos sólidos como el pulmón o el intestino<sup>46,47</sup>.

Son importantes a su vez los linfocitos T reguladores, que conservan el balance inmunológico. Destacan así las células CD4+CD25+Foxp3+ que inducen y mantienen la tolerancia inmune frente a antígenos propios del individuo como aloantígenos al suprimir la acción de los linfocitos T<sup>48</sup>.

Sin embargo, en un estudio del rechazo en un modelo experimental de trasplante pulmonar en ratones, se demostró que el rechazo agudo no era dependiente de linfocitos T CD4+<sup>49</sup>. Se observó también que el infiltrado de células CD8+ en el injerto así como en el lavado broncoalveolar de los animales con rechazo agudo era más abundante que el de células T CD4+<sup>50,51</sup>

En cuanto al **rechazo agudo mediado por anticuerpos**, los linfocitos B reconocen los antígenos con una molécula CMH tipo II y, una vez procesado, se lo presenta a los linfocitos CD4+ generando una respuesta Th2 y produciendo inmunoglobulina M. Además, por la presencia de las citoquinas, los linfocitos B proliferan y se diferencian en células plasmáticas que secretan anticuerpos frente a los antígenos específicos, siendo fundamentalmente de tipo IgG, IgA o IgE.

Por su parte, en el **rechazo crónico**, que da lugar a la aparición de bronquiolitis obliterante, interviene la inmunidad celular. En este caso, las células T CD8+ y CD4+ reconocen al CMH tipo I y II respectivamente iniciando el alorreconocimiento. Es de destacar que las células epiteliales de las vías aéreas expresan moléculas del CMH tipo II, lo que explicaría en cierto modo por qué son el objetivo predominante en el rechazo crónico<sup>52</sup>. Una vez que se activan estas células T CD4+, liberan citoquinas que estimulan la expansión de las células CD8+ y linfocitos B que forman agregados celulares en las vías aéreas bajas<sup>53</sup>. Aunque, como se ha mencionado anteriormente, las células CD8+ tienen un papel importante en el rechazo agudo, su papel en el rechazo crónico no se conoce tan claramente<sup>49</sup>. Además, los linfocitos T reguladores Foxp3+ (subpoblaciones de las células CD4+) y los linfocitos T de memoria CD8+ (subpoblaciones de los linfocitos CD8+) son necesarios para el desarrollo de tolerancia en modelos animales<sup>54,55</sup>.

La inmunidad humoral también interviene en este proceso. De hecho, se cree que la inmunidad mediada por anticuerpos no va dirigida únicamente contra los antígenos de los donantes, si no de los propios antígenos del

receptor. De este modo, la inflamación de las vías aéreas expondría autoantígenos, como el colágeno V y la K- $\alpha$ 1 tubulina, ambos componentes de las vías aéreas bajas y que no se expresan en condiciones fisiológicas, facilitando la autoinmunidad<sup>56</sup>. Por otra parte, polimorfismos en genes asociados con la inmunidad innata también parecen tener un efecto en el desarrollo de BO<sup>57</sup>.

En el caso de la disfunción restrictiva del injerto, similar a la fibrosis pulmonar en los pacientes no trasplantados, parece que está relacionada con el aumento en la producción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ).

### 2.3. Citoquinas y quimioquinas en el rechazo

En el rechazo, además de las distintas poblaciones celulares anteriormente destacadas, intervienen también citoquinas, proteínas de bajo peso molecular que son importantes para la comunicación celular y otras funciones fisiológicas. Son generadas principalmente por macrófagos activados y linfocitos, pero también por células endoteliales, epiteliales, adipocitos o polimorfonucleares, entre otros.

Dentro de sus funciones es importante resaltar que, en ocasiones, distintos tipos de citoquinas realizan acciones parecidas. Además, pueden actuar sobre la propia célula que las producen, sobre el medio próximo en el que se encuentran o en tejidos más alejados.

En la respuesta inmune innata, aunque los leucocitos son los que las producen mayoritariamente, las células parenquimatosas también las secretan e interaccionan con los leucocitos para optimizar la respuesta de defensa del huésped.

Entre las principales citoquinas implicadas en la respuesta inflamatoria, destacan la IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, CXCL8 (también llamada IL-8), G-CSF y GM-CSF. Todas ellas tienen actuación local para activar a las células endoteliales y a los leucocitos del tejido local (mastocitos, células dendríticas, linfocitos T y neuronas) y generar la liberación de quimioquinas, la expresión de moléculas de adhesión de células endoteliales, enlentecimiento del flujo vascular y aumento de la permeabilidad vascular. Estos cambios facilitan la acumulación de proteínas de defensa humoral, factores del complemento, proteínas de coagulación e inmunoglobulinas. Además, reclutan y activan leucocitos, incluyendo linfocitos innatos, células T gamma delta, NK, entre otras. Como consecuencia de ello, se produce la inflamación.

Tanto IL-1 como IL6 y TNF- $\alpha$  actúan de manera sistémica iniciando una respuesta aguda, y el material extraño es procesado por las células presentadoras de antígenos en la respuesta inmune innata. Además, la IL-6 muestra actividad antiinflamatoria en función del ambiente en el que se encuentre y la IL-12 induce la inmunidad celular citotóxica. Por su parte, la IL-8 es un factor quimiotáctico de neutrófilos.

Para contrarrestar el efecto inflamatorio, existen citoquinas con actividad antiinflamatorias como la IL-10 y TGF- $\beta$ . La primera se produce por monocitos, células Th2, células T reguladoras y linfocitos T y B activados. Actúa sobre monocitos y macrófagos, inhibiendo la liberación de mediadores proinflamatorios y disminuyendo la presentación de antígenos y la fagocitosis<sup>58</sup>. Por tanto, inhibe la producción de citoquinas como IL-1, IL-2,

IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . Además, parece que altas concentraciones de la misma se relacionan con la tolerancia al órgano donante trasplantado<sup>59</sup>.

Por su parte, el TGF- $\beta$  es producido por una gran variedad de células, incluidas las células T reguladoras, inhibiendo la activación de linfocitos B y macrófagos activados, por lo que reduce la liberación de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, una producción excesiva conlleva efectos no deseados en la respuesta inmune al favorecer la angiogénesis o la fibrosis. Tiene un papel también importante en la diferenciación de células madre.

En la respuesta inmune adquirida, mediada por células T, intervienen dos citoquinas de gran importancia, como son la IL-2 y el INF- $\gamma$ . La IL-2, que a su vez estimula la producción de INF- $\gamma$ , actúa sobre la proliferación y supervivencia de los linfocitos, tanto B como T. De este modo, cuando se inhibe su producción se puede evitar el rechazo del injerto. Una elevada producción de la misma parece indicar claramente la presencia de rechazo agudo<sup>60</sup>.

Por su parte, el INF- $\gamma$ , liberado por células activadas como los linfocitos CD4+ y las células NK, actúa activando a los macrófagos y linfocitos CD8+ citotóxicos, estimulando la producción de otras citoquinas proinflamatorias. También tiene un efecto sobre las células presentadoras de antígeno y la expresión de moléculas de adhesión del endotelio, causando una infiltración de leucocitos en el injerto trasplantado. Además, puede inducir la producción de anticuerpos IgG al activar a las células plasmáticas.

Existen otras muchas citoquinas, como la IL-13, que regula tanto a monocitos como a los linfocitos B, favoreciendo la respuesta humoral; y otras relacionadas con la inmunidad del trasplante como son la IL-17, IL-22, o IL-23.

Encontramos otro tipo de citoquinas de gran importancia, conocidas como quimioquinas, que inducen la quimiotaxis, es decir, la migración de las células, tanto en condiciones normales como patológicas, liberadas, en este caso, como consecuencia de daño tisular o procesos infecciosos e inflamatorios. De este modo, algunas quimioquinas de la familia CC promueven la migración de los monocitos, células NK o células dendríticas. Otras, como las CXC, actúan sobre los neutrófilos, mientras que un tercer grupo, las XC, atraen a precursores de linfocitos T al timo.

El estudio de estas quimioquinas, así como la expresión de sus receptores en los diferentes tipos celulares puede ayudar a determinar la acción de las células del sistema inmune tras un trasplante de órganos sólidos.

### **3. Modelos actuales de estudio de rechazo**

A pesar del incremento en el número de trasplantes de pulmón debido al desarrollo de técnicas quirúrgicas y de preservación de órganos, al avance en las terapias frente al rechazo y al aumento en las donaciones (aunque éstas resultan en muchos casos insuficientes para cubrir las necesidades de trasplantes a nivel mundial), sigue siendo imprescindible investigar los distintos aspectos que hacen que la supervivencia del órgano y, por

consiguiente, de los pacientes sean inferiores a otros trasplantes de órganos sólidos. En este contexto, los modelos experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, suponen una herramienta indispensable en la generación de conocimiento de los factores y mecanismos implicados en el rechazo, así como el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas.

### 3.1. Modelos disponibles hasta el momento

Una vez conocidos los principales problemas asociados al trasplante pulmonar y la inmunobiología del mismo, pasamos a comentar los modelos preclínicos desarrollados a lo largo del tiempo. Dado que el modelo utilizado en nuestro trabajo está basado en la rata como especie de estudio, más adelante se detallarán los modelos en roedores y las aportaciones que han generado para distintas enfermedades.

De forma esquemática, se podrían citar los siguientes modelos:

- **Cultivo *in vitro*** de células pulmonares que son sometidas a situaciones agudas de hipoxia seguidas de reoxigenación<sup>61</sup> o utilizando soluciones frías de preservación en hipoxia seguidas de una reoxigenación con medio de cultivo simulando una perfusión caliente<sup>62</sup>. Todo ello presenta una serie de ventajas y es que son experimentos de menor duración, más económicos y que permiten evaluar distintos tipos celulares de manera independiente o conjunta. Además, evitan el uso de animales vivos cumpliendo con el objetivo de las Tres Erres. Sin embargo, no simulan perfectamente las condiciones de isquemia-reperfusión que ocurren durante los trasplantes ni permite estudiar todos los tipos celulares involucrados. Este modelo resulta de utilidad para el estudio del **fallo primario del injerto** o, incluso, del **rechazo crónico**, al permitir el estudio de poblaciones celulares de manera individual, como las células epiteliales bronquiales, células mesenquimales troncales o células de la musculatura lisa de las vías aéreas<sup>63-65</sup>.
- **Modelos de clampaje u oclusión del hilio pulmonar.** En este caso, descrito en roedores, los pulmones permanecen ventilados y se realiza una toracotomía para ocluir el hilio pulmonar izquierdo<sup>66</sup>. Se han desarrollado modificaciones de este método resultando técnicamente más rápido y menos demandante que el trasplante ortotópico y con una tasa de éxito mayor. Sin embargo, su principal desventaja es que no simula todo el proceso del trasplante pulmonar. Por ello, este modelo resulta útil en el estudio del **fallo primario del injerto**.
- **Trasplante de tráquea heterotópica.** Se basa en trasplantar un fragmento de tráquea a un lugar del organismo distinto al de su localización anatómica, como bajo la piel<sup>67</sup>. Con este modelo el rechazo agudo del injerto provoca una inflamación temprana, necrosis del epitelio y proliferación de fibrina en el lumen de las vías aéreas. Técnicamente es fácil de realizar y permite observar la progresión desde el **rechazo agudo** a una oclusión que simula la **bronquiolitis obliterante**. Sin embargo, la situación anómala de la tráquea debajo de la piel o el omentum, no permite que reciba flujo aéreo ni aporta información de lo que ocurre en el parénquima pulmonar.

- **Trasplante ortotópico de tráquea.** La ventaja de este modelo con respecto al anterior es la situación anatómica de la tráquea trasplantada, ya que está expuesta al aire inspirado y permite seguir la vasculatura, así como las poblaciones celulares implicadas. Además, resulta de utilidad para los estudios de anastomosis y de fibrosis subepitelial de las vías altas, muy importante para el desarrollo del **rechazo agudo y crónico**. Sin embargo, los cambios apreciados a nivel traqueal no aportan información sobre las vías aéreas periféricas ni sobre el daño que se produce en el parénquima pulmonar durante el rechazo agudo.
- **Trasplante intrapulmonar de la tráquea.** Consiste en introducir un fragmento de tráquea en el parénquima pulmonar<sup>68</sup>. Es útil para evaluar el tejido linfoide. Este modelo se utiliza, por tanto, para el estudio del **rechazo agudo** y también del **crónico**.
- **Trasplante ortotópico de pulmón.** Como se describe más adelante, resulta el mejor método para estudiar el rechazo y todos los aspectos derivados del trasplante, ya sean inmunológicos o no. Sin embargo, es técnicamente muy demandante y requiere equipamiento de mayor coste. Para el estudio de bronquiolitis obliterante, es importante destacar que las lesiones varían en función de las cepas utilizadas y de los laboratorios donde se producen, ya que muchas veces las lesiones no son similares a las causadas en humanos. En ocasiones es necesario recurrir a cepas con una pequeña disparidad en el CMH para evitar un rechazo agudo del pulmón con su consecuente deterioro que impida el desarrollo del rechazo crónico<sup>69</sup>.

### 3.2. Modelos experimentales en roedores

Aunque el primer intento de trasplante experimental de ambos pulmones y el corazón se realizó en torno a 1900 por Alexis Carrel, consistiendo en un trasplante heterotópico de todo el bloque en el cuello de un gato receptor<sup>70</sup>, el primer trasplante pulmonar en animales se llevó a cabo en 1940<sup>71,72</sup>. Estos modelos experimentales han favorecido el desarrollo del procedimiento quirúrgico y la prevención de las complicaciones asociadas al mismo, como el rechazo o la lesión por isquemia-reperusión. El primer trasplante murino se efectuó en 1971<sup>73</sup>, pero en el siglo pasado se realizaron fundamentalmente en el perro<sup>71,72,74</sup>, así como en cerdo, oveja<sup>75</sup> o mono<sup>76-78</sup>, ya que los animales de mayor tamaño presentan ventajas a la hora de desarrollar la técnica quirúrgica y de trasladar los resultados a la clínica humana. Actualmente, pese a que estas especies se siguen empleando, sobre todo para el entrenamiento quirúrgico, especies de menor tamaño han adquirido un mayor protagonismo, como el conejo<sup>79</sup>, la rata o el ratón, ya que proporcionan ventajas económicas, logísticas, de manejo y control logístico. Dado que nuestro trabajo se ha desarrollado en roedores, resulta interesante describir a grosso modo las distintas técnicas utilizadas, así como la importancia y avances derivados de estos modelos animales experimentales.

En la rata, se desarrolló inicialmente el trasplante ortotópico de pulmón izquierdo<sup>73</sup>, mientras que el de todo el bloque cardiopulmonar tiene un uso más limitado por su elevada mortalidad<sup>80</sup>. Las mejoras en el procedimiento quirúrgico, en la técnica anestésica, en la ventilación mecánica y en las condiciones de preservación y reperusión han permitido no solo el éxito del modelo sino también su reproducibilidad. Además, se han

desarrollado modelos de trasplantes heterotópicos, aunque estos carecen de ventilación y buena perfusión del injerto<sup>81,82</sup>. Por último, la disponibilidad de una gran diversidad de cepas, que permiten estudiar factores genéticos que afectan al trasplante, ha potenciado el modelo en ratón<sup>83,84</sup>.

En el siguiente apartado de *material y métodos* se describe detalladamente el modelo quirúrgico empleado en nuestro grupo de investigación. Sin embargo, resulta interesante destacar la evolución en las técnicas quirúrgicas en el caso del trasplante realizado en roedores, especialmente en ratón y rata.

De este modo, el modelo de trasplante ortotópico del pulmón izquierdo es el más utilizado por su viabilidad y mayor sencillez, ya que el pulmón izquierdo está formado por un único lóbulo, mientras que el derecho se divide en 4. No obstante, en el ratón también se ha utilizado el trasplante ortotópico del pulmón derecho<sup>85</sup>.

Desde el primer trasplante hasta la actualidad, se han descrito diferentes técnicas de anastomosis tanto de la arteria y vena pulmonares izquierdas como del bronquio izquierdo, utilizándose tanto suturas convencionales como manguitos o “cuffs” de distintas formas y tamaños. Esto ha permitido aumentar la supervivencia de los trasplantes y reducir el tiempo total de la cirugía, aspecto altamente relacionado también con la supervivencia.

En función del grupo de trabajo y de la técnica empleada, el tiempo necesario para completar la cirugía varía, con tiempos más bajos cuando se emplea la técnica del “cuff”, frente a cuando se utilizan suturas convencionales, especialmente, cuando esto último se realiza en vasos y bronquio. De igual manera, el índice de supervivencia es mejor cuando en las anastomosis se utilizan manguitos frente a puntos de sutura.

En la siguiente tabla, comparamos distintos tipos de protocolos descritos hasta la fecha en la bibliografía.

**Tabla 1:** Resumen de las características técnicas del trasplante pulmonar en roedores<sup>86</sup>. Orden de anastomosis: A: arteria; B: bronquio; V: vena. \*Mortalidad perioperatoria. †Mortalidad postoperatoria

Técnica	Tiempo de cirugía (minutos)	Tipo de anastomosis	Orden anastomosis	Longitud cuff (mm)	Diámetro cuff (mm)	Supervivencia (%)
<b>Sutura</b>						
Asimacopoulos, 1971 <sup>73</sup>	No descrito	Sutura	B-A-V	---	---	50
Marck, 1982 <sup>87</sup>	240	Sutura	V-A-B	---	---	80* 50 †
Prop, 1984 <sup>88</sup>	210 ± 31 y 238 ± 19	Sutura	V-A-B	---	---	89 y 75
Zhang, 2008 <sup>89</sup>	78,4 ± 5,2	Sutura	B-A-V	---	---	89* 50 †

<b>Manguitos vasculares y sutura bronquial</b>						
Mizuta, 1989 <sup>90</sup>	101 ± 4,8	Manguito convencional	V-A-B	2 (cuerpo:1; lengüeta:1)	2 y 1,65	88,8
Kubisa, 2003 <sup>91</sup>	120	Manguito convencional	V-A-B	No descrito	0,8	96,57
Mizobuchi, 2004 <sup>92</sup>	116 ± 1,6	Manguito convencional	V-A-B	4 (cuerpo:2,5; lengüeta:1,5)	1,65	95,6
Zhai, 2008 <sup>93</sup>	No descrito	Manguito modificado	A-B-V	2,5 (cuerpo:1; lengüeta:1,5)	1,65	No descrito
Habertheuer, 2013 <sup>94</sup>	130 ± 9	Manguito convencional	B-A-V	No descrito	No descrito	100% (70-90-100)
<b>Manguitos vasculares y bronquiales</b>						
Mizuta, 1991 <sup>95</sup>	64,1 ± 3,6	No descrito	No descrito	No descrito	No descrito	90 †
Reis, 1995 <sup>96</sup>	108,6 ± 4,2	Manguito convencional	A-V-B	3 (cuerpo:2; lengüeta:1)	1,65	No descrito
Santana Rodríguez, 2004 <sup>97</sup>	110 ± 12,7	Manguito convencional	V-B-A	3 (cuerpo:1,5; lengüeta1,5)	2,2 y 1,65	No descrito
Mizobuchi, 2004 <sup>92</sup>	84,8 ± 0,6	Manguito convencional	V-B-A	4 (cuerpo:2,5; lengüeta:1,5)	2,1 y 1,65	91,8
Zhai, 2008 <sup>93</sup>	No descrito	Manguito modificado	A-B-V	2,5 (cuerpo:1; lengüeta:1,5)	1,65	No descrito
Sugimoto, 2009 <sup>98</sup>	110 aprox	No descrito	A-B-V	No descrito	No descrito	93,6
Jungraithmayr, 2009 <sup>84</sup>	95,6 ± 8,5	Manguito convencional	A-B-V	Diferentes tamaños	0,64-0,51-0,4	80
Santana Rodríguez, 2011 <sup>99</sup>	107,7 ± 6,2	Manguito convencional	A-B-V	3 (cuerpo:1,5; lengüeta1,5)	1,65	87,6
Zheng, 2013 <sup>100</sup>	96,8 ± 6,2	Manguito convencional	A-V-B	Diferentes tamaños	0,81-0,64-0,51	96,7
Zheng, 2013 <sup>100</sup>	85,3 ± 6,9	Manguito modificado	A-V-B	No descrito	0,81-0,64-0,51	80

Como se puede ver en la tabla 1, una vez superada la curva de aprendizaje y establecido el modelo quirúrgico en el grupo de investigación, la supervivencia del trasplante pulmonar resulta bastante elevada. Sin embargo, siempre se pueden producir complicaciones perioperatorias y postoperatorias.

Dentro de las primeras, las más importantes son derivadas del procedimiento quirúrgico, tanto en la preparación del donante como del receptor<sup>101</sup>. Para lograr habilidad en el manejo del material microquirúrgico y, por tanto, alcanzar éxito en la técnica quirúrgica, se requiere una curva de aprendizaje relativamente larga, con una alta mortalidad durante la puesta a punto de la cirugía<sup>83</sup>. Algunos autores establecen en 50 trasplantes el umbral para dominar la técnica<sup>102</sup>. Además, la duración del procedimiento quirúrgico y el tiempo empleado en la realización de las anastomosis influyen en la aparición de complicaciones y en la supervivencia de los animales<sup>73,84,87,94,101</sup>. En general, el uso de manguitos requiere menor habilidad y experiencia, resultando un procedimiento más rápido que la sutura con puntos simples<sup>96,103</sup>. Los manguitos vasculares reducen el riesgo de sangrado y, por ello, se produce menos tejido de granulación, disminuyendo la posibilidad de trombosis o estenosis a largo plazo de las zonas de anastomosis<sup>96</sup>. En el bronquio, se detecta una menor presencia de fugas, factor causante de neumotórax, lo que condiciona la funcionalidad del injerto<sup>92</sup>. No obstante, el uso de manguitos puede originar una disminución de la luz si la elección de su diámetro no es adecuada, y puede provocar una reacción de cuerpo extraño<sup>92,96,103</sup>. Los manguitos modificados, sin extensiones o lengüetas, reducen el riesgo de torsión de los vasos o bronquios tras realizar la anastomosis y el daño producido por dicha extensión. Además, al ser más pequeños producen menos reacción de cuerpo extraño<sup>93</sup>. Otras complicaciones perioperatorias referidas incluyen la rotura de la vena cava, el empiema pleural<sup>91</sup>, la parada respiratoria<sup>96</sup> o la trombosis venosa<sup>100</sup>.

En cuanto a complicaciones postoperatorias, son importantes la insuficiencia respiratoria, la hemoptisis, la trombosis de una vena o arteria bronquial, el neumotórax, las infecciones respiratorias, los derrames pleurales, el edema pulmonar y el rechazo del injerto<sup>88,104</sup>.

### **3.3. Importancia de los modelos experimentales murinos y sus aportaciones científicas**

Pese a la complejidad quirúrgica, los modelos de trasplante pulmonar en roedores están suficientemente estandarizados y son reproducibles, lo que permite evaluar diferentes aspectos técnicos y los mecanismos de las principales complicaciones del trasplante en humanos. Hasta el momento, el trasplante pulmonar murino ha facilitado la generación de conocimiento sobre las características de los donantes<sup>99,105</sup>, modelos de conservación y preservación pulmonar<sup>106-108</sup>, lesión por isquemia-reperfusión<sup>107,109-111</sup> y, sobretodo, rechazo agudo y crónico (tabla 2)<sup>107,112-125</sup>.

### 3.3.1. Disfunción primaria del injerto por lesión isquemia-reperfusión

Aparece en las primeras 72 h y se gradúa en función de la relación  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  y la presencia de infiltrados radiológicos, siendo una causa muy importante de morbimortalidad durante el postoperatorio inmediato.

Su análisis en modelos murinos ha permitido una mejor caracterización de los mecanismos desencadenantes, en los que la lesión primaria de los neutrófilos originada por la isquemia-reperfusión parece desempeñar un papel nuclear. Así, se ha demostrado que neutrófilos aislados de las vías aéreas de receptores de trasplante estimulan las células dendríticas del donante, por un mecanismo dependiente de contacto, para inducir la producción de IL-12 y expandir linfocitos T específicos del aloantígeno<sup>109</sup>. A su vez, se ha demostrado que este fenómeno es regulado por la degranulación inducida por el TNF- $\alpha$  asociado a la membrana plasmática de los neutrófilos<sup>109</sup>. También ha sido posible identificar algunos factores moduladores de esta respuesta celular, que podrían resultar de potencial interés en la identificación de futuras vías terapéuticas. Se ha mostrado que el factor transcripcional Bcl3 limita la granulopoyesis por una vía NF-kB dependiente<sup>110</sup>.

### 3.3.2. Rechazo celular agudo

Los modelos murinos proporcionan un medio ideal para el estudio del rechazo celular agudo, al poder evaluar en cepas puras el grado de concordancia o discordancia del antígeno mayor de histocompatibilidad. Esto resulta particularmente favorecido por el desarrollo de sistemas de monitorización específicos para este modelo de trasplante.

Además de los lavados broncoalveolares para el estudio de la celularidad de las vías aéreas y de medir la capacidad de oxigenación a través de los gases en sangre arterial, se han generado técnicas de imagen propias, como la tomografía volumétrica<sup>112</sup> o la resonancia magnética ultracorta<sup>113</sup>, que junto con la evaluación histológica de los cambios ultraestructurales del rechazo agudo mediante microscopia de barrido<sup>114</sup> facilitan una mejor monitorización del pulmón trasplantado.

También se han desarrollado procedimientos complementarios para la evaluación de la función pulmonar. Así, la oscilación forzada resulta muy útil en los modelos murinos, ya que tanto la elastancia dinámica como la dependencia de frecuencia de las resistencias parecen tener capacidad predictiva del grado de rechazo agudo<sup>115</sup>, constituyéndose como índices no invasivos para la detección y monitorización de su progresión.

En un ámbito de imagen-función, la microtomografía de emisión de positrones permite identificar un mayor consumo de <sup>18</sup>fluorodesoxiglucosa por neutrófilos y linfocitos CD8+<sup>116</sup>, pudiendo identificar más precisamente el rechazo agudo a través de la valoración del metabolismo de las células T.

### 3.3.3. Rechazo agudo

La evaluación de los mecanismos patogénicos del rechazo agudo en modelos murinos ha facilitado el desarrollo de intervenciones para prolongar la supervivencia del injerto, por ejemplo, mediante el bloqueo de

los coestimuladores anti-CD28-B7 y del ligando CD40-CD40<sup>117</sup>. Otros autores han demostrado en un modelo de trasplante pulmonar ortotópico murino MHC-discordante que la monoterapia con anticuerpos anti-CD154 podría ser suficiente para atenuar el rechazo agudo<sup>118</sup>, debido a un bloqueo de la coestimulación CD154/CD40, que favorece un desplazamiento del entorno del injerto hacia un predominio de células T reguladoras CD4+CD25+ Foxp3+<sup>119</sup>. También se ha referido que algunas células pulmonares no hematopoyéticas pueden desempeñar un importante papel en la supresión in vivo de las respuestas inmunes mediadas por células T CD4+<sup>120</sup>. Aunque todavía muy incipiente, estos hallazgos podrían tener una potencial traslación clínica mediante el tratamiento con N-acetilcisteína. En modelos murinos, se ha demostrado que su administración tiene capacidad para atenuar el rechazo pulmonar agudo por reducción del infiltrado de macrófagos y células T, que está íntimamente relacionada con la disminución de la vía de señalización inflamatoria mediada por NF-κB<sup>121</sup>.

### 3.3.4. Rechazo crónico

Suele manifestarse mediante el desarrollo de bronquiolitis obliterante, debida a una infiltración celular de linfocitos y neutrófilos atribuida a un conjunto de factores, como una activación excesiva de la respuesta del sistema inmune innato, una angiogénesis anormal o una inadecuada regeneración epitelial y remodelado del tejido linfoproliferativo<sup>107</sup>. Aunque cada modelo animal tiene ventajas y limitaciones para el estudio de la bronquiolitis obliterante, el modelo de bronquiolitis obliterante secundario al trasplante pulmonar murino resulta más próximo al rechazo crónico humano que otros modelos de bronquiolitis obliterante inducida por agentes químicos. Además, permite valorar de forma seriada tanto la función pulmonar como múltiples alteraciones morfológicas o en la función celular, y probar la eficacia de diversos fármacos. Otra ventaja sustancial viene dada por la disponibilidad de cepas knock-out y transgénicas de modelos de múltiples enfermedades humanas, lo que permite reproducir situaciones de rechazo crónico relativamente similares a las desarrolladas en distintas enfermedades respiratorias terminales, así como evaluar la contribución de potenciales vías de señalización. Sin embargo, algunos factores de la anatomía y fisiología del pulmón murino ocasionan dificultades de traslación. En relación con los pulmones humanos, los bronquiolos murinos tienen una disminución de las glándulas submucosas y un mayor número de células Clara, lo que genera un entorno protector frente a la lesión del epitelio bronquiolar, principalmente mediante la secreción de proteína secretada por las células Clara y una solución similar al surfactante pulmonar, lo que determina una mayor lesión vascular que epitelial en estos modelos de rechazo<sup>117</sup>. No obstante, en los últimos años se han realizado importantes avances en el desarrollo de diversos modelos de bronquiolitis obliterante en el ratón<sup>122-124</sup>, así como estudios con microarrays de ADN para evaluar el rechazo crónico tras el trasplante<sup>125</sup>.

En conclusión, se han producido importantes desarrollos técnicos en el trasplante pulmonar murino, permitiendo la elección de diversas alternativas quirúrgicas con una notable viabilidad de los animales trasplantados. Esto determina una mayor accesibilidad a estos modelos experimentales quirúrgicos, que han

demostrado su capacidad para generar conocimiento sobre los mecanismos patogénicos de la lesión por isquemia-reperfusión y del rechazo, con una potencial traslación al ser humano a medio plazo.

**Tabla 2:** Aportaciones científicas de los modelos en roedores de trasplante pulmonar<sup>86</sup>.

Autor y año	Especie	Sexo	Cepas	Modelo	Objetivo
Aeba et al, 1992 <sup>108</sup>	Rata	Machos	Lewis (donante y receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo tras 6 ó 12 horas de isquemia fría	Comparación de diferentes soluciones de preservación pulmonar (Wisconsin y Euro-Collins)
Zweers et al, 2004 <sup>105</sup>	Rata	Machos	Fisher 344 (donante); Wistar Kyoto WKY (receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de sutura convencional e inducción de muerte cerebral en el donante durante 6 horas	Estudio del efecto de la muerte cerebral en el rechazo crónico tras el trasplante pulmonar
Okazaki et al, 2007 <sup>117</sup>	Ratón	Machos	BALB/c, C57BL/6 (B6)* (donante); B6 (receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff y trasplante heterotópico de tráquea	Comparativa del trasplante de tráquea y trasplante pulmonar en el estudio del rechazo agudo
Greschus et al, 2009 <sup>112</sup>	Rata	Machos	F344, Dark Agouti, WKY (donantes); WKY, Lewis, F344	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff vascular y sutura bronquial	Monitorización y evaluación del pulmón trasplantado mediante tomografía volumétrica
Santana Rodríguez et al, 2011 <sup>111</sup>	Rata	Machos	Sprague-Dawley (donante y receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff	Evaluación del efecto del estradiol en la lesión pulmonar por isquemia-reperfusión
Santana Rodríguez et al, 2011 <sup>99</sup>	Rata	Machos	Sprague-Dawley (donante y receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con la técnica de cuff e inducción de muerte cerebral en el donante	Evaluación de la permedabilidad de las anastomosis y de los signos de lesión por isquemia-reperfusión similares al rechazo agudo en dos modelos técnicos

Kreisel et al, 2011 <sup>109</sup>	Ratón	Machos	Balb/c, B6, B10.BR CD11c-EYFP (donante); B6 LysM-GFP, B6 TNF- $\alpha$ -/- (receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff tras 1 y 18 horas de isquemia fría	Estudio de la disfunción primaria del injerto por isquemia-reperusión
Kreisel et al, 2011 <sup>110</sup>	Ratón	Machos	B6 (donante) - B6 (B6), B6 (Bcl3)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff	Estudio del factor transcripcional Bcl3 y su relación con el rechazo agudo tras el trasplante pulmonar
Dodd-o et al, 2011 <sup>118</sup>	Ratón	Machos	B6, BALB/c (donantes); B6 (receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff	Estudio de la atenuación del rechazo agudo mediante el uso de anticuerpos anti-CD-154
Jungraithmayr et al, 2012 <sup>114</sup>	Ratón	Machos	BALB/c (H-2Kd) (donante); B6(receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff	Evaluación y estudio del rechazo agudo mediante microscopía electrónica de barrido
Santana-Rodríguez et al, 2012 <sup>125</sup>	Rata	Machos	Sprague-Dawley (donante y receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con la técnica de cuff	Evaluación del rechazo agudo en el trasplante pulmonar mediante el estudio de microarrays de ADN
Chen et al, 2013 <sup>116</sup>	Ratón	Machos	B6, BALB/c (donante); B6 (receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff	Identificación del rechazo agudo mediante el estudio del metabolismo de las células T con técnicas de imagen (microtomografía de emisión de positrones)
Erne et al, 2013 <sup>121</sup>	Rata	Machos	Brown-Norway (donante); Lewis (receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff	Atenuación del rechazo pulmonar agudo mediante la administración de N-acetilcisteína
Tanaka et al, 2014 <sup>106</sup>	Rata	Machos	Lewis (donante y receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con la técnica de cuff tras 6 horas	Evaluación del efecto de inflado de los pulmones donantes durante la preservación pulmonar

				de preservación a distintos porcentajes de inflado.	
Takahashi et al, 2014 <sup>115</sup>	Rata	Machos	Brown-Norway (BN) (donante); BN, Lewis (receptores)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff	Estudio de la función pulmonar en el rechazo agudo mediante técnicas no invasivas como la oscilación forzada
Kreisel et al, 201 <sup>126</sup>	Ratón	Machos	B6 <sup>CD45.1</sup> , B6II <sup>-</sup> (donantes); B6, B6Rag <sup>-/-</sup> , B6/B6II <sup>-</sup> F1 (receptores)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff, así como de médula ósea	Estudio del efecto de las células pulmonares no hematopoyéticas y su acción sobre las células T CD4+
Zhou et al, 2015 <sup>119</sup>	Ratón	Machos	B6, BALB/c (donantes); B6 (receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff	Relación entre el rechazo agudo y la producción de IL-17
Raissadati et al, 2015 <sup>122</sup>	Ratón	Machos	BALB/c (donante); B6(receptor)	Trasplante heterotópico de tráquea	Estudio del efecto de la proteína CCN1 en un modelo de bronquiolitis obliterante
Wu et al, 2015 <sup>123</sup>	Ratón	Machos	C57Bl/10, B6(donantes); B6(receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff	Estudio de la influencia de las células T CD4+ y la producción de IL-17 en un modelo de bronquiolitis obliterante
Chuck et al, 2015 <sup>113</sup>	Ratón	Machos	B6, BALB/c (H-2Kd) (donantes); B6 (receptores)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff	Evaluación de los cambios producidos en el pulmón trasplantado por el rechazo agudo y lesión por isquemia-reperfusión mediante resonancia magnética ultracorta
Hsiao et al, 2018 <sup>127</sup>	Ratón	Machos	B6.SJL-PtprcaPepcb/BoyJ (CD45.1+) (donante); B6 (CD45.2+) (receptor)	Trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con técnica de cuff	Estudio del efecto de los monocitos clásicos procedentes del bazo en el reclutamiento y extravasación de neutrófilos durante la lesión por isquemia-reperfusión

#### 4. Terapias de prevención del rechazo

Los principales mecanismos involucrados a la prevención del rechazo tratan de reducir la respuesta inmune actuando sobre los linfocitos T especialmente.

De manera general, en la terapia inmunosupresora se tiene en cuenta que el riesgo de rechazo al injerto es mayor en los seis primeros meses tras el trasplante, decayendo con el tiempo, por lo que la mayor parte de las terapias tienen una mayor intensidad justo tras la cirugía para ir disminuyendo en el primer año. Además, en ocasiones se utilizan combinaciones a bajas dosis de varios fármacos para reducir la toxicidad de la monoterapia con altas dosis y actuar sobre distintos componentes del sistema inmune. Un punto crítico que se debe evitar es la excesiva inmunosupresión por los efectos secundarios que ocasiona, como el aumento de riesgo de infecciones o el desarrollo de tumores.

La realidad es que no existe un consenso internacional en cuanto a la terapia óptima tras el trasplante pulmonar<sup>128</sup>, por lo que el uso de uno u otro fármaco depende en gran medida de cada grupo de trabajo y su experiencia con los mismos, así como de su eficacia en otros tipos de trasplantes de órganos sólidos.

Por lo general, los protocolos de inmunosupresión incluyen tres fases: inducción, mantenimiento y tratamiento del rechazo.

En la **inducción** se utilizan fármacos con un potente efecto inmunosupresor justo tras el trasplante para reducir la respuesta de los linfocitos T, que van dirigidos a la disminución de su número o la interrupción de su activación y proliferación. Pueden ser fármacos policlonales o monoclonales. Algunos ejemplos de los fármacos usados aparecen reflejados en la tabla 3, donde se refleja, además, unas comparativas entre los distintos fármacos para intentar establecer las mejores opciones<sup>129</sup>.

Por su parte, la terapia de **mantenimiento** se administra a todos los pulmones trasplantados para ayudar a prevenir tanto el rechazo agudo como el crónico y la pérdida del injerto, reduciendo los efectos adversos.

Durante esta fase, los pacientes son monitorizados para observar si se produce el rechazo, la aparición de efectos adversos causados por la medicación, regular la dosis de los fármacos y que estos sean los adecuados. El mantenimiento de la inmunosupresión suele disminuir después del primer año tras el trasplante. La decisión de reducir las dosis se realiza en función de las características de cada paciente y su historial de episodios de rechazo, así como de los efectos secundarios que presenten. Así, por ejemplo, en los pacientes que permanecen estables sin episodios de rechazo agudo o sin síndrome de bronquiolitis obliterante, las dosis de los inhibidores de calcineurina (los más empleados) y glucocorticoides, se pueden reducir, al igual que ocurre cuando se presentan infecciones.

Por su parte, los glucocorticoides fueron de los primeros inmunosupresores utilizados a nivel clínico. Se usan altas dosis durante la cirugía previa a la perfusión del injerto para reducir el daño por reperusión. Aunque no son considerados como parte de la terapia de inducción, lo cierto es que, en cierto modo, pueden contribuir a la inmunosupresión inicial. En el mantenimiento sí suelen usarse ya que inhiben la inmunidad humoral y celular al bloquear la transcripción de múltiples genes que intervienen en la inflamación, disminuyendo, por

lo tanto, la producción de citoquinas IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  <sup>130,131</sup>. El problema que presentan los glucocorticoides es el elevado número de efectos adversos como son, por ejemplo, la diabetes, hipertensión, dificultad en la cicatrización, retención de líquidos o aumento de riesgo de infecciones.

**Tabla 3:** Inmunosupresión utilizada en la actualidad como terapia frente al rechazo tras el trasplante pulmonar.

<b>Inducción</b>	
<b>Fármacos</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
Alemtuzumab (Campath-1H)	Anticuerpo monoclonal de rata que actúa contra el antígeno CD52, presente en linfocitos T y B provocando su disminución
Anti-thymocyte globulin	Anticuerpo policlonal frente a distintos antígenos de los linfocitos T, causando una depleción no específica de las células T
Basiliximab	Anticuerpo quimérico humano-murino monoclonal con alta afinidad por el antígeno CD25 en linfocitos T para inhibir la proliferación mediada por IL-2
Daclizumab	Anticuerpo quimérico humano-murino monoclonal con alta afinidad por el antígeno CD25 en linfocitos T para inhibir la proliferación mediada por IL-2
Muromonab-CD3 (OKT3)	Anticuerpo monoclonal murino antiCD3 causando la disminución de linfocitos T
<b>Mantenimiento</b>	
<b>Fármacos</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
<b>Glucocorticoides</b>	
Prednisona, metilprednisona	Inhiben inmunidad humoral y celular. Inhiben la producción de citoquinas inflamatorias al unirse a secuencias de ADN
<b>Inhibidores de la calcineurina</b>	
Ciclosporina A	Previene la activación y proliferación de los linfocitos T al inhibir la producción de interleucinas y otras citoquinas
Tacrolimus	Previene la activación y proliferación de los linfocitos T al inhibir la producción de interleucinas y otras citoquinas

<b>Inhibidores de receptores de rapamicina (mTOR)</b>	
Sirolimus	Inhibe la proliferación de los linfocitos T mediante la parada de las células en fase G1 del ciclo celular
Everolimus	Inhibe la proliferación de los linfocitos T mediante la parada de las células en fase G1 del ciclo celular. También actúa sobre la capa muscular de los vasos y células cancerígenas
<b>Otros</b>	
Micofenolato de Mofetilo	Inhibe la proliferación de linfocitos T al inhibir la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa, implicada en la síntesis de ADN de novo, del que depende la proliferación de dichas células
Azatioprina	Mismo efecto que el micofenolato de mofetailo, pero actuando como análogo de la purina en el ADN en las células T y B que se encuentran en división (también con actividad mutagénica)

Además de estos tratamientos más convencionales, se han estudiado distintas terapias celulares, como las que emplean T reguladoras, células dendríticas tolerogénicas<sup>132</sup> o macrófagos reguladores<sup>133</sup>.

## 5. Células madre

### 5.1. Características generales

En los últimos años, se ha experimentado un aumento en lo que se conoce como terapia celular para el tratamiento de diversos trastornos, mediante la utilización de las conocidas como células madre o “stem cells”, aunque también se las denomina células troncales. Además, en función de la procedencia de las mismas, su clasificación varía, pudiendo encontrarse así células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo o de médula ósea, por ejemplo.

Lo que caracteriza a estos tipos celulares es que son células progenitoras inmaduras, por lo que son capaces de dar lugar a otras células madre idénticas o diferenciarse en células más maduras. Según su capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares, las células madre se diferencian en:

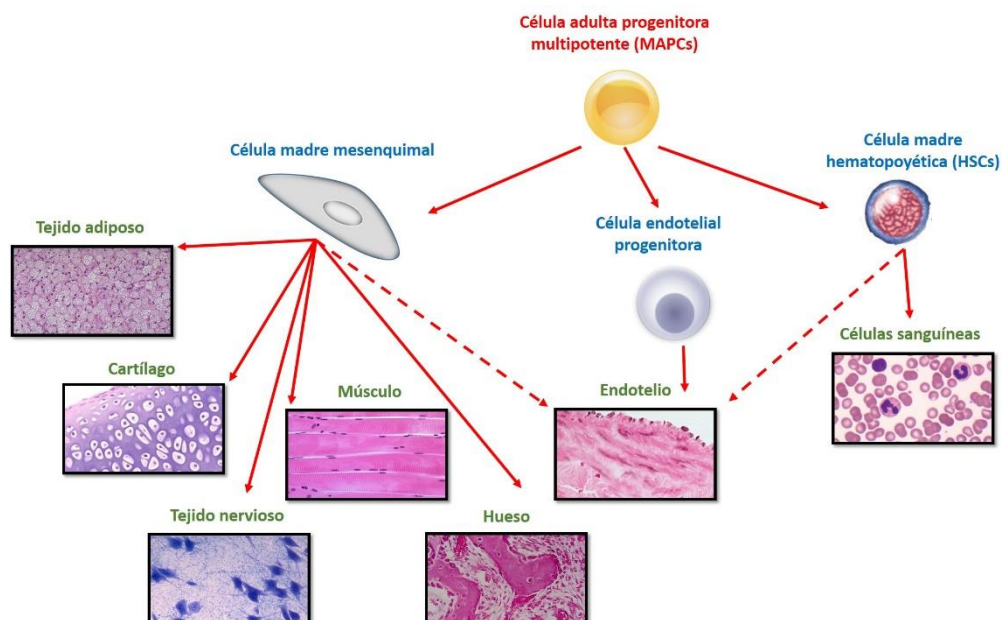
- **Totipotenciales**, cuando pueden dar origen a un organismo completo. Son, por ejemplo, las células embrionarias tempranas, (hasta el estadio de mórula).
- **Pluripotenciales**, cuando son capaces de dar origen tanto al ectodermo como al mesodermo y endodermo, que constituyen las tres capas germinales del embrión, pero no originar al organismo

completo. Principalmente, son las conocidas como células embrionarias de la masa interna del blastocisto.

- **Multipotenciales**, que pueden dar lugar a múltiples, pero no a todos, tipos celulares y sólo de una capa germinal. Un ejemplo serían las células del endodermo, que pueden originar células pulmonares, del hígado o intestinales, pero no células de otra capa germinal, como neuronas (derivan del ectodermo). Podrían ser células embrionarias, pero no adultas, como las células madre mesenquimales (MSCs), que son las que nos interesan.
- **Unipotenciales**, aquellas que únicamente pueden dar lugar a un tipo celular concreto, como por ejemplo las células madre epidérmicas o las espermatogonias, que sólo dan lugar a espermatozoides.

Las células utilizadas en esta tesis doctoral son células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ASCs). Entorno a los años 70 se aislaron las primeras MSCs procedentes de la médula ósea<sup>134,135</sup>, aunque posteriormente se han conseguido obtener de otros tejidos, como el músculo esquelético, pulpa dentaria, tejido adiposo, bazo y corazón o cordón umbilical, entre otros<sup>136-141</sup>.

El hecho de que se puedan extraer de diversos tejidos sumado a que son multipotentes, es decir, capaces de diferenciarse en otros tipos celulares como osteoblastos, condrocitos, miocitos, adipocitos, hepatocitos, células del epitelio, células cardíacas o neuronas, que se pueden expandir y cultivar in vitro sin perder sus características fácilmente y sus propiedades inmunomoduladoras, ha propiciado su uso extenso en medicina regenerativa, especialmente.



**Figura 6:** Diagrama de la jerarquía de las MSC (imagen adaptada de Giordano y col. 2007<sup>142</sup>).

Dado que se trata de un grupo de células bastante heterogéneo, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) fija una serie de criterios mínimos que deben poseer las células para ser consideradas MSCs<sup>143</sup>.

De este modo, una de las principales características es que tienen que:

- Tener la capacidad de cultivarse adheridas al plástico de las placas en condiciones estándar.
- Expresar en más del 95% de la población celular los antígenos de membrana CD73, CD90 y CD105
- Carecer, en más del 98% del total celular, del marcador de leucocitos CD45, marcador hematopoyético y de células endoteliales CD34, marcadores de macrófagos y monocitos CD14 o CD11b y los marcadores de células B CD79 $\alpha$  o CD19.
- Carecer de la expresión del antígeno leucocitario humano DR (HLA-DR), receptor de superficie celular del CMH clase II.
- Deben poder diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, condroblastos y adipocitos.

El motivo de elección de estas células en nuestro trabajo se debe a las capacidades inmunomoduladoras que presentan<sup>144,145</sup> y sus capacidades regenerativas conocidas. Además, son consideradas como un posible tipo de terapia debido a que apenas expresan HLA tipo I y no expresan tipo II, así como otras moléculas de superficie como CD40L, CD80 y CD86, no siendo reconocidas por el sistema inmune<sup>146</sup>.

Actualmente, se cree que la forma de actuar de estas células no es tanto dando lugar a otros tipos celulares sino alterando el microambiente en el que se encuentran de forma paracrina o mediante el contacto con otras células<sup>147</sup>, siempre que el ambiente local sea inflamatorio. Si esto no sucede, y el ambiente es inflamatorio, las células podrían expresar HLA tipo I y II siendo reconocidas por las células del sistema inmune, por lo que serían lisadas por linfocitos CD8+ y NK<sup>148</sup>.

No se conocen muy bien las características que las hacen más privilegiadas inmunológicamente ni si, una vez inyectadas, permanecen mucho tiempo en el individuo receptor siendo esto un aspecto importante, aunque hay artículos que demuestran su larga viabilidad en modelos animales<sup>149</sup>. Además, actualmente algunos grupos intentan demostrar la seguridad y viabilidad de la terapia con estas células en el trasplante de órganos sólidos<sup>150,151</sup>. Todo ello hace necesario estudiar cómo se comportan tras los trasplantes como, en nuestro caso, el pulmonar.

## 5.2. Acción inmunomoduladora

Las MSCs llevan a cabo la inmunomodulación mediante **contacto célula-célula**, expresando distintas moléculas de adhesión, como VCAM1 e ICAM1 u otros inmunorreguladores como PD-1L, actuando sobre linfocitos T y B<sup>152</sup>, pero también mediante la liberación de factores solubles, por lo que podrían ejercer su efecto sin estar necesariamente en el lugar de la lesión, de ahí su importancia terapéutica. Dentro de estos mediadores, se encuentran, entre otros:

- **Indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO):** enzima que cataliza la degradación del triptófano, importante para la proliferación de linfocitos T, por lo que la disminución de este aminoácido los inhibiría<sup>153</sup>. Además, parece que también podría tener un papel importante en la inhibición linfocitos B activados, las NK, en modular la respuesta a macrófagos de tipo M2 e incluso, en producción de nuevas células reguladoras<sup>144,154-157</sup>.
- **TGF- $\beta$ :** aunque con efecto controvertido, podría mostrarlo sobre linfocitos T, NK o incluso aumentando la producción de células reguladoras<sup>158,159</sup>.
- **Prostaglandina E2 (PGE2):** podría tener un efecto sobre la proliferación de las células NK e incluso sobre los linfocitos T y las células dendríticas<sup>157,160</sup>.
- **Interleuquina 10 (IL-10):** la estimulación de los macrófagos M2 por parte de las MSC provoca la liberación de esta citoquina antiinflamatoria que tendría efecto sobre los neutrófilos y también, junto con la secreción de IDO, sobre la supresión de linfocitos T<sup>161</sup>.
- **Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF):** parece tener efecto tanto sobre las células endoteliales, epiteliales e incluso sobre los linfocitos T<sup>158</sup>.
- **HLA G5:** afectaría a la inmunidad innata al inhibir la citólisis mediada por NK, células dendríticas y linfocitos T y la secreción de INF- $\gamma$ , ayudando a prevenir el rechazo<sup>162,163</sup>.
- **Óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS):** este factor, producido por las MSC en presencia de CD4+ o CD8+ parece importante en la inhibición de la proliferación de linfocitos T<sup>164</sup>.
- **CCL2:** quimioquina producida por las MSCs que podría afectar a la respuesta humoral<sup>165</sup>.
- **Galectinas (galectina 1 y 3):** factores solubles secretados tanto por MSCs humanas y de ratones que son capaces de suprimir la proliferación de los linfocitos T, pudiendo inducir también a los linfocitos T reguladores<sup>166</sup>.

Además de esos factores, las MSCs también secretan quimioquinas como CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), CCL26 (eotaxin-3), CX3CL1 (fractalkine), CXCL5 (ENA-78), CXCL11 (i-TAC), CXCL1 (GRO $\alpha$ ), CXCL12 (SDF-1), CXCL8 (IL-8), CXCL2 (GRO $\beta$ ) y CXCL10 (IP-10)<sup>167</sup>. Estas moléculas actúan sobre monocitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, células dendríticas, NK, linfocitos T y de memoria, linfocitos B, y progenitores endoteliales y hematopoyéticos<sup>168</sup>.

La acción inmunosupresora de las MSCs parece depender de la activación de las mismas cuando se encuentran en un ambiente proinflamatorio con la presencia de citoquinas, tales como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , e IL-1 $\beta$ <sup>169</sup>. Sin embargo, hay evidencias de que, en ocasiones, si el ambiente en el que se encuentran no es inflamatorio, las MSCs pueden dar lugar a otro fenotipo proinflamatorio<sup>170</sup>. De este modo, y en el caso de los trasplantes, cuando se activan los receptores tipo Toll (TLR) de las MSCs por moléculas producidas como consecuencia

del daño celular (DAMPs) o también agentes patógenos debido a las infecciones, se secretan citoquinas proinflamatorias y quimioquinas que atraen a los neutrófilos y promueven que liberen properdina, por lo que se activa el complemento<sup>171,172</sup>.

Así, se podrían distinguir dos fenotipos en las MSC, descritas como MSC1 (proinflamatorio), cuando se activan los TLR4, y MSC2 (antiinflamatorio), al activarse TLR3, lo que influiría, de un modo u otro, en la activación de los linfocitos T<sup>173</sup>.

Por lo tanto, las MSC, mediante distintas vías, pueden modular la actividad de las distintas células del sistema inmune (figura 7). A continuación, se mencionan algunas acciones de las MSCs distintas poblaciones celulares y que resultan de interés en el estudio del rechazo tras el trasplante.

### 5.3. Efectos sobre la inmunidad innata

Las MSCs son capaces de actuar sobre **monocitos** y **macrófagos**. Mediante la liberación de quimioquinas como CCL2, CCL3, CXCL2 o CCL12, las MSCs de médula ósea reclutan a monocitos y macrófagos en el lugar de inflamación<sup>174</sup>. Los macrófagos tienen una función muy importante en la respuesta inflamatoria y de regeneración tisular y se diferencian de los monocitos en función del microambiente en dos poblaciones: clásicos o M1, con acción inflamatoria activados al estar expuestos a citoquinas proinflamatorias, y M2, que promueven la resolución de la inflamación y reparación tisular liberando IL-10, secretando factores tróficos y aumentando la limpieza de células apoptóticas<sup>175</sup>. En algunos estudios se ha observado que, cuando se cultivan con monocitos, las MSCs de médula ósea promueven su diferenciación a macrófagos del tipo M2, que producen IL-10 y muestran esa actividad fagocítica con bajos niveles de producción de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  y expresión de MHC de tipo II<sup>176,177</sup>. En modelos experimentales se ha observado que esta producción de IL-10 bloquea el exceso de infiltración de neutrófilos en el tejido lesionado previniendo un daño mayor, además de reducir la producción de TNF- $\alpha$  y CXCL2<sup>178,179</sup>. Por otra parte, estas células son capaces de secretar antagonistas de los receptores de IL-1, impidiendo la liberación de TNF- $\alpha$  e IL-1 por los macrófagos una vez activados, protegiendo el tejido pulmonar de esas dos citoquinas proinflamatorias de gran importancia en el pulmón<sup>180</sup>. IL-1 $\beta$  aumenta además la secreción de TGF- $\beta$  mediada por las células madre, que a su vez está relacionada con la supresión de los linfocitos<sup>181</sup>. Por lo tanto, las MSCs parecen tener un papel importante en la reparación al reclutar monocitos y macrófagos y estimular su diferenciación al tipo 2, evitando una excesiva inflamación y favoreciendo la regeneración tisular.

En cuanto a su efecto sobre los **neutrófilos**, las MSCs, mediante la activación de receptores TLR son capaces de atraerlos y aumentar su esperanza de vida junto con su actividad proinflamatoria así como de producir IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 o CCL5<sup>182</sup>. Esto tendría importancia sobre todo en los casos de infecciones.

En el caso de las **células dendríticas**, las MSCs pueden prevenir su maduración al impedir la diferenciación de los precursores, mediante secreción de IL-6 y prostaglandina E2. Podrían incluso provocar que las células dendríticas maduras pasaran a inmaduras<sup>183-185</sup>. De este modo, se induciría una respuesta más tolerogénica

pasando de ser Th1 a Th2. Según ciertos autores, cuando las células dendríticas se encuentran en presencia de MSC, las primeras pueden perder parte de su actividad, con una menor secreción de IL-12, por lo que resultan incapaces de producir una activación y proliferación de linfocitos T<sup>185</sup>. Pese a ello, otros autores no han observado esta alteración en las células dendríticas. Además, estas células dendríticas en presencia de las MSCs podrían inhibir la proliferación y activación de linfocitos T CD8+ promoviendo una respuesta tipo Th2 de linfocitos T CD4+ gracias a la activación del receptor Notch<sup>186,187</sup>. Por último, las células madre podrían fomentar la generación de linfocitos T reguladores<sup>188</sup>.

Las células NK presentan un papel importante en el rechazo. El efecto de las MSCs sobre ellas depende, según varios estudios, del estado de activación que muestren ambos tipos celulares y del ambiente en el que se encuentre. Así, las NK liberan además grandes cantidades de INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y muestran actividad citotóxica. Las NKs previamente activadas por distintos estímulos, como IL-2, son capaces de lisar a las MSCs tanto si son alogénicas o autólogas<sup>189</sup>. Sin embargo, cuando éstas no se encuentran activadas, pueden liberar pequeñas cantidades de INF- $\gamma$  que estimulan a las MSCs. De este modo, mediante la liberación de IDO, TGF- $\beta$ 1 o PGE-2 se evitaría la activación de las NKs, disminuyendo la producción de esas citoquinas inflamatorias así como su efecto citotóxico<sup>154,157,189</sup>.

#### 5.4. Efectos sobre la inmunidad adquirida

En determinados estudios se ha podido comprobar que tanto las MSCs autólogas como las alogénicas son capaces de inhibir la activación y la respuesta de los **linfocitos T**<sup>190</sup>. Sin embargo, la acción sobre estas células se produce cuando los linfocitos se encuentran previamente activados, por células polimorfonucleares alogénicas o mitógenos y producen INF- $\gamma$  que activa a las MSCs<sup>191</sup>.

Además, pueden inducir anergia de dichos linfocitos y detener su maduración al bloquearlos en la fase G1 del ciclo celular, sin que este efecto se pueda revertir incluso con IL-2 exógeno y a pesar de que las células muestren cantidades normales de receptores para dicha citoquina<sup>192</sup>.

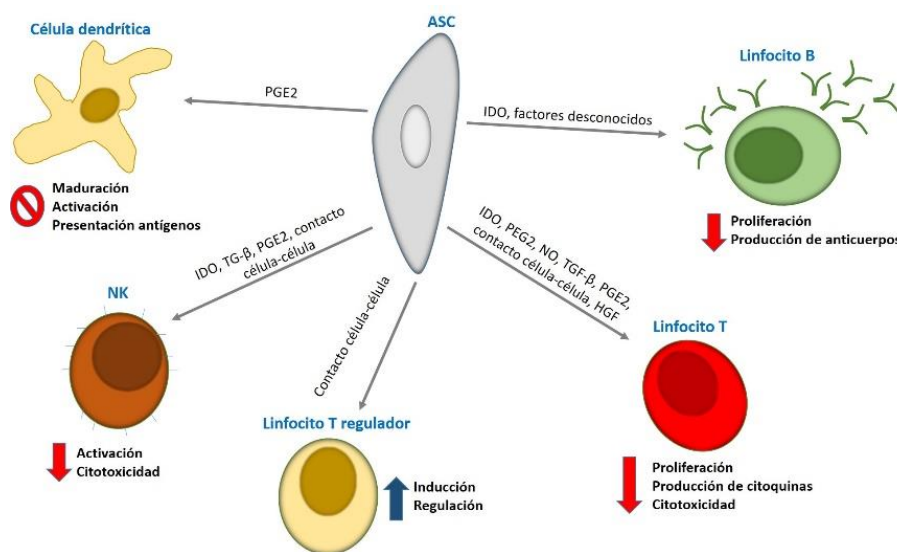
Parece también que en ambientes inflamatorios, en los que hay presencia de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , se estimula la producción por parte de las MSCs de quimioquinas que atraen a los linfocitos T, como CXCL9, CXCL10 y CXCL11, permitiendo así ejercer sus propiedades inmunoregulatoras sobre ellas<sup>193</sup>.

Por otra parte, parece que las MSCs son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T de memoria, tanto CD4+ como CD8+, estimulando la producción de IL-10 así como reduciendo la secreción de citoquinas IL-17, Th1 e INF- $\gamma$  por parte de las primeras y bloqueando a las segundas mediante la producción de TGF- $\beta$ <sup>158,194</sup>. Sin embargo, otros autores no consideran que TGF- $\beta$  esté implicado en esta respuesta.

Otra población celular a tener en cuenta en los trasplantes son las células T reguladoras CD4+CD25+FOXP3+, capaces de suprimir la proliferación de los linfocitos T y así impedir una respuesta inmune excesiva. Se ha descrito, tanto in vitro como in vivo, un aumento en el porcentaje de estas células reguladoras cuando hay presencia de MSCs<sup>162,195</sup>. De este modo, cuando éstas se inyectan previamente a un trasplante de riñón o

corazón en modelos animales, el número de células reguladoras aumenta, con la consecuente disminución del rechazo y mejora la supervivencia del injerto<sup>155,196</sup>. Sin embargo, no todos los autores han encontrado evidencias de que las células madre estimulen o induzcan a las células reguladoras, ni in vitro ni in vivo<sup>197</sup>.

Como hemos visto anteriormente, tanto en el rechazo agudo mediado por anticuerpos como en el rechazo crónico, los linfocitos B juegan un papel importante. Se ha estudiado cómo las MSC pueden actuar sobre la proliferación, diferenciación y maduración de los linfocitos B de manera dosis dependiente<sup>198</sup>. De este modo, cuando en ratones sometidos a un trasplante cardíaco, se suministraron conjuntamente MSCs y rapamicina, se apreció una disminución de los niveles de anticuerpos IgM e IgG, promoviendo la tolerancia al injerto<sup>199</sup>. Además, pueden frenar en cierta manera la migración quimiotáctica al disminuir la expresión de los receptores CXCR4, CXCR5 y CCR7 de los linfocitos<sup>200</sup>. A pesar de esos estudios, otros autores han mostrado una acción opuesta encontrando un efecto estimulador de las MSC en la proliferación y producción de anticuerpos, en función del nivel de estimulación previo de las células<sup>201,202</sup>. Además, parece que no afectan a las propiedades de presentación de antígeno de los linfocitos, ya que las MSC no muestran efecto sobre la expresión del CMH tipo II ni sobre los receptores CD40, CD86, y CD80<sup>200</sup>. Por tanto, para dilucidar el efecto de las MSCs sobre esta población celular, se requieren más estudios en los que intervengan las distintas fases de maduración de estos linfocitos.



**Figura 7:** Esquema de los efectos reguladores de las ASCs sobre las células del sistema inmune (imagen adaptada de Gao et al. 2016<sup>203</sup>).

Además de las propiedades inmunomoduladoras que hemos destacado, las MSCs pueden actuar de manera indirecta sobre otros aspectos de importancia en el trasplante.

## 5.5. Otros efectos de interés

Todo trasplante lleva asociado una **lesión por isquemia-reperfusión** que implica la muerte de células, como consecuencia de la situación de hipoxia generada en el donante por la muerte cerebral y/o parada cardíaca, así como por el propio método y tiempo de preservación del órgano, y que afecta tanto al endotelio vascular como al parénquima del órgano a trasplantar. Además, una vez implantado el órgano en el receptor, la propia reperfusión incrementa este daño. Por lo tanto, las sustancias liberadas por la muerte celular y los propios restos celulares hacen que se liberen mediadores proinflamatorios, aumente la expresión del CMH y se active el sistema inmune. Ante ello, el tratamiento con MSCs podría mitigar este daño, ya que éstas se dirigen al endotelio afectado y a otras zonas inflamadas y ejercen sus funciones sobre el sistema inmune.

Por otra parte, las MSCs muestran propiedades **angiogénicas** ya que se cree que pueden diferenciarse en células endoteliales y, principalmente, reparar el endotelio dañado mediante la secreción de factores proangiogénicos favoreciendo la proliferación de dichas células<sup>204</sup>.

Otras de las propiedades que muestran este tipo celular son su capacidad de **regeneración**, aunque se cree que en el caso de los trasplantes es más importante la capacidad de actuar sobre el sistema inmune, y la capacidad de liberar factores que actúan como **antifibróticos**<sup>205</sup>, aspecto correlacionado con la inflamación del órgano.

## 6. ASCs y microARNs

En la última década, ha tomado relevancia el estudio de la alteración en la expresión de los microARNs, que se ven afectados en condiciones patológicas, regulando determinados genes de interés.

De manera resumida, los microARNs son una clase de ARN pequeños no codificantes, con una longitud de aproximadamente 22-25 nucleótidos que actúan sobre ciertos genes diana, suprimiendo su traducción o actuando sobre su ARNm, con su consecuente degradación<sup>206</sup>. Tienen también efectos sobre distintas vías de señalización, algunas de las cuales resultan de interés en los trasplantes, entre las que destacan aquellas que afectan la expresión de los genes inflamatorios, la diferenciación de los linfocitos T y B o la pérdida de injerto<sup>207</sup>. Cuando estos se expresan de una forma que no es correcta, es decir, cuando se sobre-expresan o infraexpresan, pueden producir procesos patológicos que afectan el sistema inmunitario<sup>208</sup>.

Por lo tanto, en este trabajo hemos querido conocer cuáles se ven afectados tras un rechazo pulmonar agudo sin ningún tipo de medicación y el efecto que la terapia con ASCs muestra en ellos, ya que no hay nada descrito sobre el tema en la rata.



# **Hipótesis y Objetivos**

---



## **HIPÓTESIS**

Las hipótesis en las que se basa el presente trabajo se describen a continuación:

- La terapia celular con MSCs derivadas de tejido adiposo tiene un efecto inmunomodulador, previniendo el rechazo hiperagudo y el rechazo agudo en ratas receptoras de un trasplante ortotópico de pulmón. La confirmación de este efecto podría tener relevancia clínica en la protección del injerto frente al rechazo agudo de los pacientes trasplantados.
- Dicho efecto de la terapia celular podrá evidenciarse tanto a nivel histológico como en la producción de citoquinas mostrando menos signos de rechazo. En las poblaciones celulares es previsible una disminución de los linfocitos T del receptor y células efectoras (tolerancia), y un mayor número de células T reguladoras. Por último, se observarán diferencias en cuanto a la modulación genética mediante un distinto patrón de expresión de microARNs.

## **OBJETIVOS**

El **objetivo principal** del estudio fue evaluar el efecto de las MSCs derivadas de tejido adiposo (ASCs) en la modulación inmunológica en las primeras fases tras el trasplante pulmonar, incluyendo el rechazo hiperagudo y agudo.

Los **objetivos específicos** fueron los siguientes:

- Metodológicamente, el desarrollo y descripción del modelo quirúrgico de trasplante pulmonar en la rata para el estudio del rechazo agudo, tanto en un modelo de trasplante alogénico como isogénico. Otro objetivo metodológico fue el aislamiento y caracterización de las ASCs de rata.
- Evaluación de las poblaciones celulares presentes en los injertos trasplantados, así como de la supervivencia de las ASCs en el órgano diana (pulmón donante).
- Evaluar histológicamente los signos de rechazo en los pulmones trasplantados.
- Evaluar la producción de citoquinas y quimioquinas.
- Evaluar la expresión y regulación de microARNs en condiciones de rechazo.



# **Materiales y métodos**

---



## 1. Diseño del estudio

Se ha diseñado un estudio de evaluación prospectiva de ratas control y trasplantadas, tratados o no con ASCs.

Lo primero que se llevó a cabo fue la puesta a punto del modelo experimental de trasplante ortotópico de pulmón izquierdo en rata. Para ello, se realizó una estancia en el Hospital Doctor Negrín de Gran Canaria.

Una vez superada la curva de aprendizaje, se realizaron todos los trasplantes de la fase experimental, estableciendo diferentes grupos de estudio para valorar el rechazo agudo tras el mismo.

Junto con la etapa anterior, se puso a punto el cultivo y expansión de las ASCs de rata para evaluar su eficacia inmunomoduladora y su efecto sobre el rechazo agudo.

## 2. Sujetos de estudio: animales

Para la puesta a punto del modelo quirúrgico y para la realización de los grupos experimentales, se utilizaron un total de 214 ratas macho entre animales donantes y receptores, procedentes de la cría propia y de los laboratorios Janvier (Francia): 198 de la cepa Sprague Dawley (SD) y 16 de la cepa Brown Norway (BN). Estas últimas fueron utilizadas como animales donantes, mientras que las ratas de la cepa SD se emplearon tanto como donantes como receptoras, así como controles sanos sin trasplante.

Previo a la realización de los procedimientos experimentales, los animales se mantuvieron en grupos de 4 – 5 animales por jaula (Macrolon type IV), localizadas en el animalario del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz. Se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas con una humedad relativa de 40% a 70% y una temperatura ambiente de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Tanto la comida (SAFE A03; Augy, France) como el agua se suministraron ad libitum. Para evitar el estrés de los roedores, una semana antes de sus cirugías, fueron aclimatados convenientemente.

Todos los experimentos se realizaron durante el periodo de luz del animalario y fueron aprobados por el Comité de Ética de Bienestar Animal del propio centro, así como de la autoridad competente (Proex 82/16).

## 3. Procedimientos anestésico y quirúrgico del trasplante pulmonar

Utilizando técnicas de microcirugía, se llevó a cabo un trasplante ortotópico de pulmón izquierdo, según lo descrito anteriormente, aunque con algunas modificaciones, especialmente en la técnica anestésica. Tanto la evolución de la técnica quirúrgica, como de las distintas especies animales en las que se ha realizado y su utilidad, las hemos descrito previamente<sup>208</sup>.

Todas las etapas de la cirugía se realizaron con un microscopio CLS 150 MR (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) con 10, 25 y 40 aumentos.

A continuación, se describen las fases del trasplante pulmonar.

### 3.1. Anestesia y cuidados perioperativos

Con la anestesia del animal se pretende proporcionar un adecuado efecto anestésico y analgésico, manteniendo la estabilidad fisiológica del animal, y se busca que sea fácilmente reversible al finalizar la técnica quirúrgica.

En un primer momento, durante la puesta a punto del modelo quirúrgico, tanto en los receptores como en los donantes, se empleó para la inducción y mantenimiento una inyección subcutánea de ketamina (90 mg/kg) junto con xilacina (12 mg/kg). La ketamina proporciona un efecto analgésico que se potencia al administrar conjuntamente con un agonista de los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos, en este caso la xilacina, que, a la vez, reduce la rigidez muscular. Una ventaja de esta combinación es que se puede revertir fácilmente con la administración de un antagonista de los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos como el atipamezol (0,5 a 1 mg/kg). Dado que los agonistas de los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos provocan diuresis, se compensó mediante la aplicación de fluidoterapia subcutánea. Además, en todos los casos se utilizaron pomadas oftálmicas para evitar la sequedad corneal.

Antes de comenzar con los grupos de estudio se sustituyó en los animales receptores el uso de ketamina + xilacina por el anestésico inhalatorio sevoflurano al 2,5 – 3%, dada la mayor y rápida inducción y recuperación de los animales tras la cirugía y a su efecto protector sobre el pulmón<sup>209</sup>.

Dado que la toracotomía es un potente estímulo nociceptivo y que el sevoflurano no proporciona la analgesia adecuada, se administró subcutáneamente y de manera preoperatoria y postoperatoria el opioide buprenorfina a 10-50  $\mu$ g/kg/8 h. Para incrementar la analgesia local en la cirugía, se inyectó lidocaína al 1% por vía subcutánea. Finalmente, la profilaxis antibiótica se realizó con ceftriaxona (70 mg/kg) que se mantuvo durante 5 días.

### 3.2. Ventilación mecánica

Una vez anestesiados, los animales se intubaron con catéteres de 14 G (ratas > 300 g), 16 G (rata de 200-300g) para ser ventilados mecánicamente (SAR-1000 Ventilator, CWE, INC). Especialmente en el caso del receptor, la ventilación fue en modo de ciclado por presión, dado que su pulmón izquierdo no es funcional durante gran parte de la cirugía.

Para la programación del ventilador, se estableció un volumen corriente de 7-10 ml/Kg (ciclado por volumen), una presión máxima de 10-12 cmH<sub>2</sub>O (ciclado por presión) y una frecuencia respiratoria de 75 respiraciones/minuto. Además, se aplicó una presión positiva al final de la espiración de 2-5 cmH<sub>2</sub>O para evitar la formación de atelectasias durante la espiración y realizar un reclutamiento progresivo pulmonar una vez finalizada la cirugía.

### 3.3. Monitorización intraoperatoria

Se llevó a cabo una monitorización del animal durante toda la duración de la cirugía. Dado su pequeño tamaño, se utilizaron equipamientos específicos para roedores que permiten el registro de pulsioximetría, capnografía, presiones arteriales no invasivas y electrocardiograma (Omicrom ALTEA, RGB medical devices).

Se controló la temperatura corporal (37,5-38,5°C) mediante un termómetro o sonda rectal. La hipotermia es una complicación muy frecuente en roedores y produce muchos efectos adversos si se alcanzan temperaturas inferiores a 32°C, incluyendo un retraso en la recuperación de la anestesia. Para mantener dicha temperatura fisiológica, se utilizó una manta eléctrica, aunque vigilando la posible hipertermia que se pudiera producir. La saturación de oxihemoglobina suele mantenerse en niveles superiores al 99% cuando la fracción inspirada de oxígeno se incrementa entre un 30 ó 60% con respecto al 21% del aire ambiental.

### 3.4. Preparación del donante

Se extrajo todo el bloque cardiopulmonar junto siguiendo la secuencia que se detalla a continuación. Bajo anestesia y con el animal en decúbito supino, se preparó el campo operatorio rasurando la piel del tórax y aplicando povidona yodada de forma centrípeta desde el centro del tórax. Posteriormente, se realizó una esternotomía media con heparinización (100 UI/100 g) vía intracardiaca para evitar la formación de coágulos en el pulmón a trasplantar. Con un microscopio óptico, se procedió a la disección del hilio pulmonar para localizar el cayado aórtico. Simultáneamente, se realizaron cortes a nivel de las aurículas y vena cava inferior.

Realizamos una perfusión anterógrada, a través del tronco pulmonar, combinándola con una perfusión retrógrada desde la aurícula izquierda para simular las condiciones fisiológicas. Los pulmones se perfundieron a una presión mantenida (10-15 cmH<sub>2</sub>O), de forma homogénea, con una solución de preservación fría (4°C) de glucosa dextrano bajo en potasio (LPDG), utilizando en nuestro caso Perfadex<sup>®</sup>.

A continuación, se ligó y seccionó la tráquea para extraer todo el bloque cardiopulmonar con el pulmón insuflado, evitando así la formación de atelectasias y para mejorar la oxigenación y la presencia de surfactante, lo que reduce el daño isquemia-reperfusión<sup>210,211</sup>. Las recomendaciones de inflado varían entre un 50% de la capacidad pulmonar total<sup>211,212</sup> hasta un 75-100%<sup>213</sup> sin llegar a provocar barotrauma. Además, el insuflado previo a la preservación reduce la expresión de marcadores proinflamatorios tras la perfusión<sup>213</sup>.

Con respecto a la preservación del órgano trasplantado, el pulmón donante se mantuvo a 4°C para minimizar el daño isquémico del injerto pulmonar utilizando de nuevo como solución de preservación el Perfadex<sup>®</sup> (dextrano bajo en potasio).

### **3.5. Preparación del injerto**

Una vez extraído el bloque pulmonar, se individualizó el pulmón izquierdo clampando o ligando el bronquio para mantenerlo insuflado. Junto con la arteria y vena pulmonares, se seccionó el bronquio lo más distal posible al pulmón para facilitar las anastomosis (figura 8).

La preparación del pulmón izquierdo se realizó para que todas las anastomosis vasculares y bronquiales fueran empleando manguitos vasculares o “cuffs” (figura 9). De este modo, las uniones vasculares y bronquiales se simplifican al no emplear suturas sino esos “manguitos”, que consisten en unas estructuras anulares constituidas por policloruro de vinilo o teflón fabricadas a partir de cánulas o catéteres, cuyo tamaño es de 16G. Constan de por un cuerpo, que es donde se fijan los vasos o el bronquio, y una lengüeta para permitir una fácil manipulación de los mismos (figura 9). Su longitud es de 2-3 mm (cuerpo de, 1,5 a 2 mm y lengüeta de aproximadamente 1 mm).

La colocación de los mismos se realizó introduciendo la vena, arteria o bronquio del pulmón donante a través del orificio del cuerpo del manguito, para posteriormente evertirlos fijando los tejidos con sutura de polipropileno de 7/0 (figura 9).

### **3.6. Preparación del receptor**

Primero se procedió a la intubación del animal y, bajo anestesia siguiendo el protocolo descrito en el apartado correspondiente, se colocó al animal en decúbito lateral derecho. Se preparó el campo quirúrgico estéril, de igual manera que en el animal donante, para realizar una toracotomía lateral a través del cuarto espacio intercostal. Se extrajo el pulmón izquierdo aislando las principales estructuras clampando la arteria, vena y bronquio pulmonares izquierdos, siempre lo más distal posible al pulmón. La sección de dichas estructuras se produjo lo más próximo posible al parénquima pulmonar.

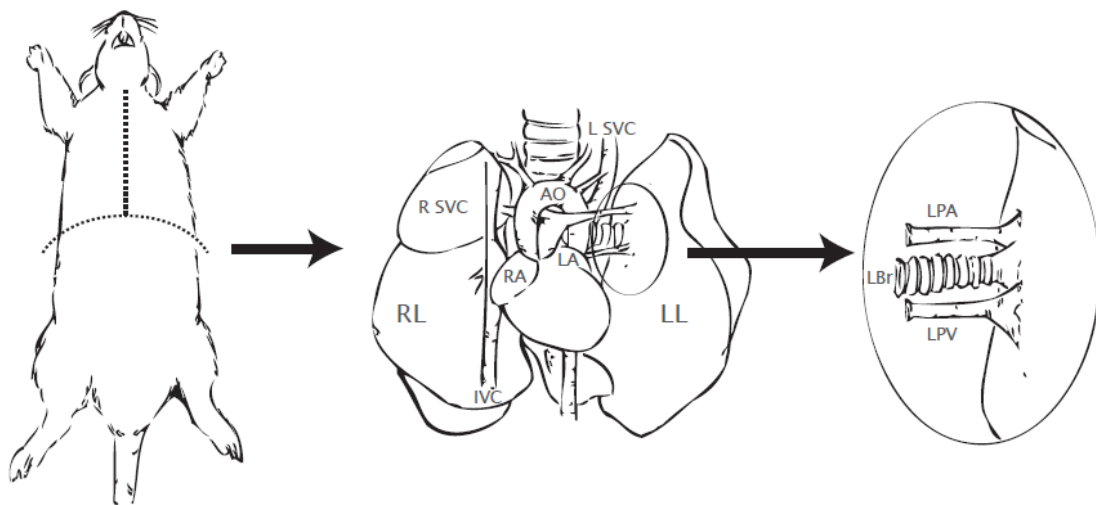
Para evitar la formación de coágulos, se aplicó suero heparinizado (0,5 – 1 UI/ml) a la arteria y a la vena. La manipulación de todas las estructuras fue cuidadosa para evitar desgarros vasculares, causa que puede provocar fácilmente la muerte del animal.

A continuación, se procedió a realizar las anastomosis de las estructuras vasculares y del bronquio. En la figura 10 aparecen reflejadas en una imagen real las anastomosis con manguitos o “cuffs”.

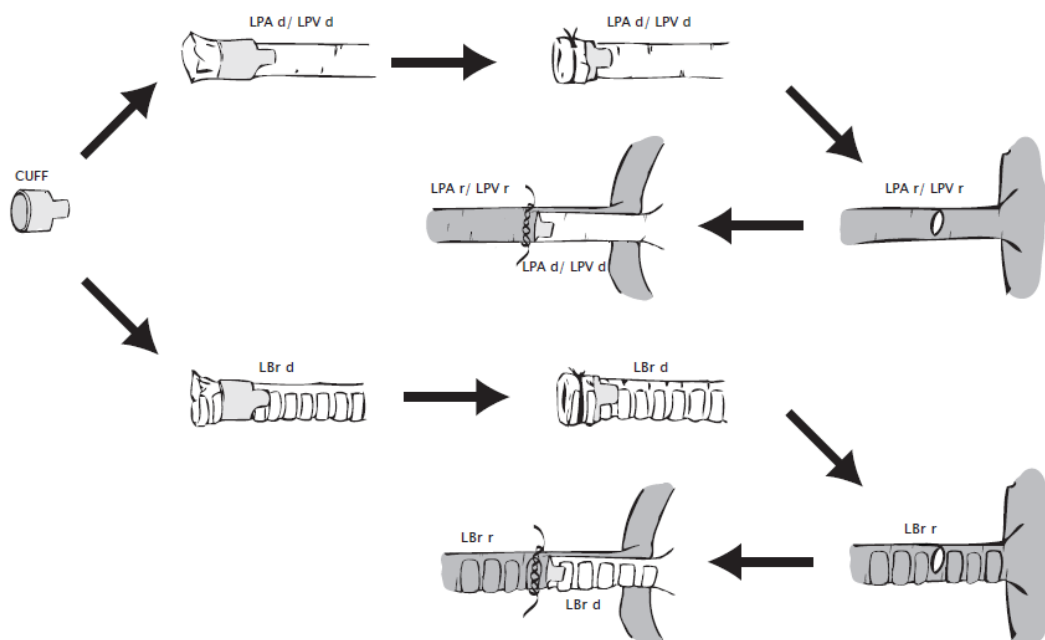
Una vez anastomosado el bronquio, se ventiló el pulmón donante para evitar la formación de atelectasias y favorecer el reclutamiento alveolar. Una rápida reperusión del pulmón indica que la permeabilidad vascular de las anastomosis es adecuada. Por último, se extrajo el pulmón nativo del animal receptor, dejando únicamente el pulmón donante.

Antes de cerrar la herida quirúrgica, se colocó un drenaje para eliminar los restos de sangre, líquido o aire alrededor de los pulmones para asegurar que estos se puedan expandir con normalidad. El cierre de la cavidad

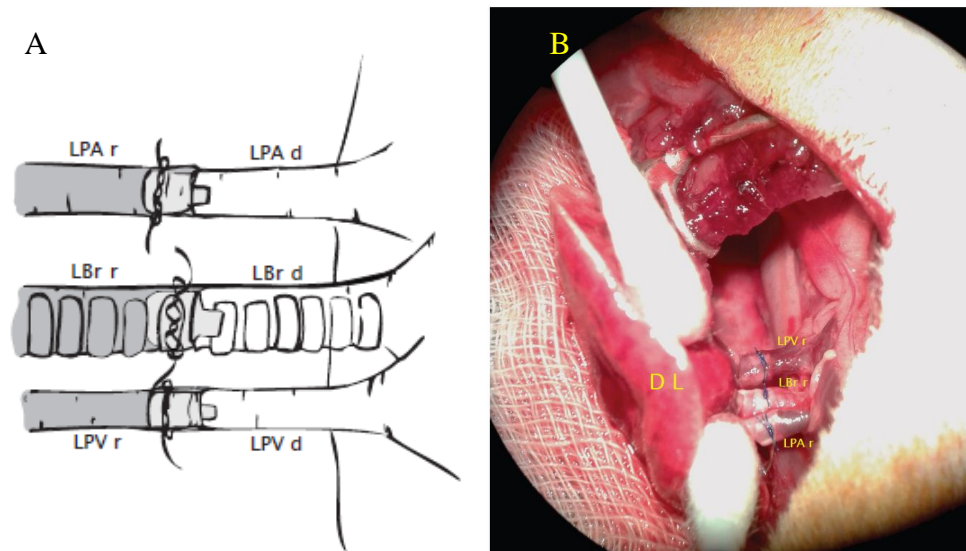
torácica se realizó por planos, retirando el drenaje una vez el animal se recuperó de la anestesia y comenzó su ventilación espontánea.



**Figura 8.** Extracción y preparación del pulmón donante. Realización de una estereotomía media y disección y extracción del bloque cardiopulmonar. Disección de la arteria pulmonar izquierda (LPA), vena pulmonares izquierdas (LPV) y del bronquio izquierdo (LBr). AO: aorta torácica; IVC: vena cava inferior; LA: aurícula derecha; L SVC: vena cava superior izquierda; LL: pulmón izquierdo; RA: aurícula izquierda; RL: pulmón derecho; R SVC: vena cava superior derecha.



**Figura 9.** Esquema de colocación de un manguito o "cuff" en el pulmón donante y su anastomosis en el pulmón receptor. LBr d: bronquio izquierdo de animal donante; LBr r: bronquio izquierdo de animal receptor; LPA d: arteria pulmonar izquierda de animal donante; LPA r: arteria pulmonar izquierda de animal receptor; LPV d: vena pulmonar izquierda de animal donante; LPV r: vena pulmonar izquierda de animal receptor.



**Figura 10.** A) Técnicas quirúrgicas descrita de anastomosis vascular y bronquial mediante manguitos o “cuffs”.

B) Imagen real del trasplante pulmonar realizado mediante la técnica de “cuff”.

LBr d: bronquio izquierdo de animal donante; LBr r: bronquio izquierdo de animal receptor; LPA d: arteria pulmonar izquierda de animal donante; LPA r: arteria pulmonar izquierda de animal receptor; LPV d: vena pulmonar izquierda de animal donante; LPV r: vena pulmonar izquierda de animal receptor; DL: pulmón donante; LBr r: bronquio izquierdo de animal receptor; LPA r: arteria pulmonar izquierda de animal receptor; LPV r: vena pulmonar izquierda de animal receptor.

#### 4. Cuidados postoperatorios. Protocolos de supervisión

Tras la cirugía, y una vez reanimados, los animales se pasaron a jaulas individuales para mantenerlos tranquilos y sin la presencia de otros animales que pudieran impedir su recuperación adecuada.

Previo a la cirugía, tras la intubación, se les administró por vía subcutánea como analgésico el opioide tramadol (Adolonta®) a una dosis de 25mg/kg/12 horas y como antibiótico, ceftriaxona a una dosis de 70 mg/kg/24 horas. Los fármacos se suministraron diluidos en suero para mantener la hidratación de los animales y se mantuvieron durante 5 días. Se realizó un seguimiento diario de los roedores intervenidos incrementándose la analgesia en caso de detectar dolor. La herida quirúrgica se limpió y desinfectó para favorecer la cicatrización.

Justo después de la cirugía se les suministró agua y alimento *ad limitum*.

Se estableció un protocolo de supervisión para valorar el bienestar animal en el que se incluyeron criterios de punto final y se valoraron aspectos como la pérdida de peso, el aspecto físico, el patrón ventilatorio, la presencia de cianosis o el comportamiento del animal. De tal modo, en caso de producirse alteraciones en alguno de los parámetros, se procedió a llevar a cabo las medidas correctoras pertinentes de manera inmediata.

A continuación, aparece detallado el protocolo de supervisión aprobado por el comité ético de bienestar animal y aplicado en todo momento (tabla 4). Se determinó además la severidad acumulada en el procedimiento.

**Tabla 4:** Protocolo de supervisión utilizado en todos los animales sometidos a la cirugía de TP.

PARÁMETRO		VALOR	FRECUENCIA
<b>Peso</b>	Sin modificaciones (normal)	0	Diaria la primera semana y dos veces por semana el resto
	Pérdida inferior al 10%	1	
	Pérdida de entre un 10-20%	2	
	Pérdida de entre un 20-25%	4	
	Pérdida mayor al 25%	7	
<b>Aspecto físico</b>	Normal	0	Diaria
	Ligeramente alterado (pelaje en mal estado)	1	
	Alterado (pelaje en mal estado y presencia de secreciones oculares y/o nasales)	2	
	Muy alterado (pelaje en muy mal estado, postura anómala, caquexia, deshidratación, vocalizaciones anómalas)	4	
<b>Patrón ventilatorio</b>	No alterado	0	Diaria
	Ligeramente alterado	1	
	Moderadamente alterado	3	
	Muy alterado	7	
<b>Cianosis</b>	No	0	Diaria
	Sí	3	
<b>Actividad</b>	Normal	0	Diaria
	Ligeramente alterada	1	
	Alterada (excesiva / disminuida)	3	
	Letargia (no respuesta a estímulos o agresividad)	7	

**Valoraciones:**

- **0 - 6:** Animal sin ningún tipo de alteración. Normal.
- **7 - 13:** Ligera severidad. Se aumentará la vigilancia de los animales. Monitorización cuidadosa. Si las alteraciones observadas persisten, se pasará al siguiente nivel (\*).
- **14 - 19:** Severidad moderada. Se tomarán medidas, en función de lo observado, enriquecimiento del medio en oxígeno, valoración de la necesidad del aumento de las dosis de analgesia y antibioterapia (\*).
- **20 - 28:** Severidad grave. Se procederá a la eutanasia del animal.

(\*) Se considerará como criterio de punto final (sacrificio humanitario) el hecho de que determinados parámetros no sean compatibles con el bienestar animal, como, por ejemplo, una pérdida de peso mayor al 25%, la postración prolongada y ausencia de respuesta a estímulos, un patrón ventilatorio muy alterado o una cianosis muy marcada.

## 5. Grupos experimentales

Se establecieron seis grupos experimentales para la valoración del efecto de las ASCs en el rechazo agudo tras el trasplante pulmonar en la rata.

Tenemos, por tanto, los grupos controles que no recibieron ningún tipo de tratamiento junto con sus respectivos grupos tratados con terapia celular (MSCs). Por otra parte, cuando la cepa donante es Sprague Dawley reciben la denominación SD, mientras que cuando es Brown Norway los identificamos como BN. Por último, si el sacrificio se llevó a cabo a las 24 horas tras la cirugía, añadimos un “1” tras la identificación de la cepa, mientras que, si se recogieron a los cinco días, incluimos un 5 en su lugar.

A continuación, se describen los distintos grupos de estudio.

**Tabla 5:** Características de los grupos experimentales propuestos para el estudio.

Grupo	Cepa donante	Cepa receptora	N.º de días postrasplante	MSCs	N
Control SD 1	SD	SD	1	No	7
MSC SD 1	SD	SD	1	Sí	7
Control SD 5	SD	SD	5	No	7
MSC SD 5	SD	SD	5	Sí	8
Control BN 5	BN	SD	5	No	6
MSC BN 5	BN	SD	5	Sí	6

Previamente al estudio, para la puesta a punto del modelo quirúrgico se estableció un máximo de 15 trasplantes (30 animales: 15 donantes y 15 receptores) hasta alcanzar una buena técnica quirúrgica y suficientemente reproducible con fiabilidad. Finalmente, el número total de trasplantes necesarios y realizados se redujo a 13.

Para el estudio de la localización de las MSC se utilizó un menor grupo de animales por grupo ( $n = 2$ ) y las células se tiñeron con fluorescencia. Se utilizaron tanto como donantes y receptores ratas de la cepa SD que fueron sacrificadas en los días 1, 2, 3 y 5 post-trasplante.

## 6. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs)

### 6.1. Aislamiento y cultivo

Tanto el aislamiento como cultivo de las ASCs se realizaron según el protocolo habitual del laboratorio, que cuenta con gran experiencia en ello. En primer lugar, se aislaron los adipocitos de la grasa abdominal de ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley (cepa utilizada como animal receptor), siguiendo el protocolo de Zuk et al. modificado<sup>215</sup>, que se describe de manera resumida a continuación.

En primer lugar, y con el animal convenientemente anestesiado con isoflurano 2.5 – 3%, y tras rasurar la zona abdominal y desinfectarla con betadine, se sacrificó mediante la administración intracardiaca de cloruro potásico.

Posteriormente, y con material estéril, se realizó una incisión abdominal para la extracción de la grasa inguinal subcutánea y peritoneal que, en cabina de flujo laminar clase II, se lavó con tampón fosfato salino estéril (PBS) y se atemperó, en un baño a 37°C, (PBS, DMEM+10% FBS+1% P/S, buffer de lisis de eritrocitos, colagenasa 0,2% P/V en PBS). Se trocó y disgregó con la ayuda de tijeras hasta la obtención de una especie de “papilla”. Se transfirieron aproximadamente unos 10 ml de grasa a un tubo de 50ml y se añadieron 40 ml de PBC para, a continuación, centrifugar durante 10 minutos a 1500rpm. Se eliminó el PBS y se realizó un nuevo lavado. Seguidamente, se digirió la grasa con colagenasa tipo II durante una hora a 37°C con agitación suave utilizando una noria. Para inactivar la colagenasa, se añadió medio de cultivo DMEM con 10% de suero fetal bovino. Tras centrifugar durante 10 minutos a 1500rpm, se decantó y resuspendió en PBS para, a de nuevo, centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante se eliminó y el agregado celular se resuspendió en 2 ml de PBS.

Las células se pasaron por un filtro de nylon de 70  $\mu\text{m}$ . Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.

El agregado celular se resuspendió en 10 ml de buffer de lisis de eritrocitos. A continuación, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave y se añadió PBS hasta alcanzar un volumen final de 20 ml. Una vez más, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos eliminando el sobrenadante.

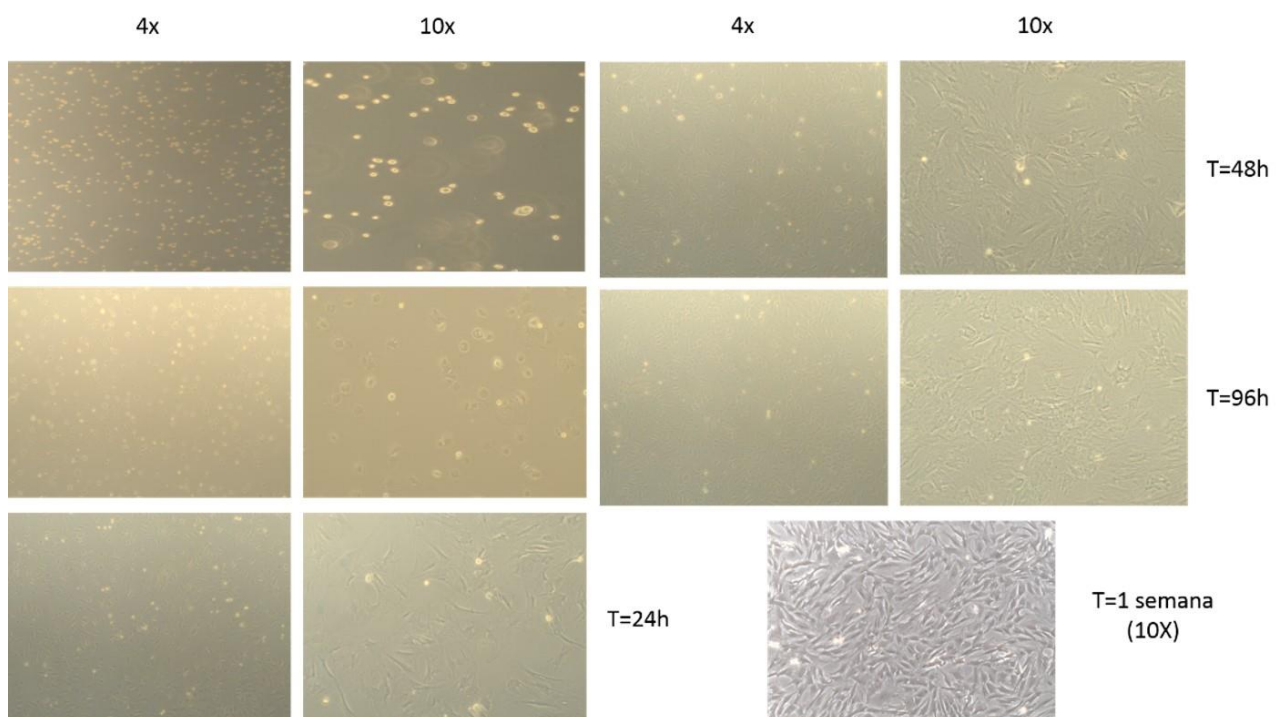
Por último, las células fueron resuspendidas en medio de cultivo completo DMEM con 10% FBS descomplementado y 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina y se sembraron en placas de cultivo de 25cm<sup>2</sup>(Corning Inc., Corning, NY, EEUU) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

A las 24 horas de la incubación, se cambió el medio de cultivo, lavando primero con PBS y añadiendo medio nuevo. De esta forma, se eliminaron las células y restos celulares que no se han adherido.

Las células que permanecieron adheridas a la placa de cultivo, una de las propiedades fundamentales de este tipo de células troncales mesenquimales, se cultivaron durante varios días hasta llegar a una confluencia en la placa de cultivo de aproximadamente 80%. Una vez alcanzado este valor, se hicieron dos lavados con PBS para eliminar los restos del medio y células desprendidas, y se agregó tripsina-EDTA al 0,5% para volver a cultivar las células en frascos de mayor volumen y obtener así el número de células necesarias para iniciar los experimentos.

Para un correcto crecimiento, el medio se renovaba cada 2 ó 3 días. Cuando se alcanzó el pase 3 (tres subcultivos de células), las células se congelaron lentamente en isopropano a -80°C a razón de 1x10<sup>6</sup> células en 1 ml con un 90% de medio completo y 10% de DMSO. A las 24 horas, se almacenaron en nitrógeno líquido para su posterior uso.

Cuando fue necesario utilizar las células, se descongelaron los crioviales en el baño a 37°C y rápidamente se añadió medio de cultivo completo para resembrarlas en las placas de cultivo. A las 24 horas tras la descongelación, el medio se renovó de nuevo para eliminar las células muertas y la presencia de DMSO. No se utilizaron células con más de 6 pases, ya que según se van realizando los mismos, sus características de MSCs pueden ir disminuyendo (figura 11)



**Figura 11:** Visualización microscópica de las células usadas como tratamiento celular una vez muestran una buena confluencia.

## 6.2. Caracterización de las poblaciones celulares

La caracterización de las células se siguió de acuerdo a lo publicado por la ISCT (International Society for Cellular Therapy) y la IFATS (International Federation for Adipose Therapeutics and Science).

De este modo, mediante citometría de flujo empleando el citómetro láser de argón FACScalibur (Becton/Dickinson Biosciences; BDB, San José, CA, EEUU) se determinó la expresión y no expresión de marcadores específicos de superficie de las ASCs después del marcaje con anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos. La caracterización se realizó antes y después de la transfección celular, comprobando los marcadores mesenquimales constantes (figura 12). Se utilizaron los siguientes anticuerpos en cantidades de saturación (siguiendo los protocolos de las casas comerciales): anti-CD90 (Becton Dickinson, BD), anti-CD73 (Millipore), anti-CD45 (Becton Dickinson, BD) y anti-HLA-DR (BD Biosciences) conjugados con el fluorocromo Alexa Fluor 647 (Serotec, Spain).

De manera resumida  $2 \times 10^5$  células se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 20 minutos con cada uno de los anticuerpos mencionados en oscuridad. Se lavaron las muestras con PBS. Por último, se adquirieron al menos 10.000 eventos de cada muestra. Para la adquisición y análisis se utilizó programa informático CELLQuest PRO (BD Biosciences).

Además, y siguiendo de nuevo los protocolos elaborados por Zuk y cols.<sup>215</sup>, se realizaron las diferenciaciones celulares a adipocitos y osteocitos. Se emplearon placas de 6 pocillos para sembrar  $1 \times 10^5$  células en cada pocillo y se cultivaron hasta llegar a tener confluencia, utilizando medio de cultivo adipogénico u osteogénico. El primero de ellos, o medio de inducción, compuesto de medio completo junto con isobutil-metilxantina 0,5mM, dexametasona  $1 \mu\text{M}$ , insulina  $10 \mu\text{M}$  e indometacina  $200 \mu\text{M}$  se utilizó durante 14 días renovándolo cada 2 días. Se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente y se observó la acumulación de lípidos con tinción Oil Red O (ORO) al 0,3% en isopropanol 60% durante 30 minutos en agitación suave.

Por otro lado, durante 28 días se utilizó el medio de cultivo osteogénico, compuesto por medio completo y suplementado con dexametasona  $0,01 \mu\text{M}$ , ascorbato-2-fosfato  $50 \mu\text{M}$  y  $\beta$ -glicerolfosfato  $10 \mu\text{M}$ . Una vez finalizada la incubación y fijadas las células de igual manera que en el caso anterior, con tinción de Alizarin Red S (ARS) se pusieron de manifiesto los depósitos ricos en calcio secretados por osteocitos a la matriz extracelular. Las células se visualizaron en un microscopio invertido de contraste de fases Nikon DIAPHOT-TMD y se fotografiaron con cámara Nikon D80 acoplada al microscopio.

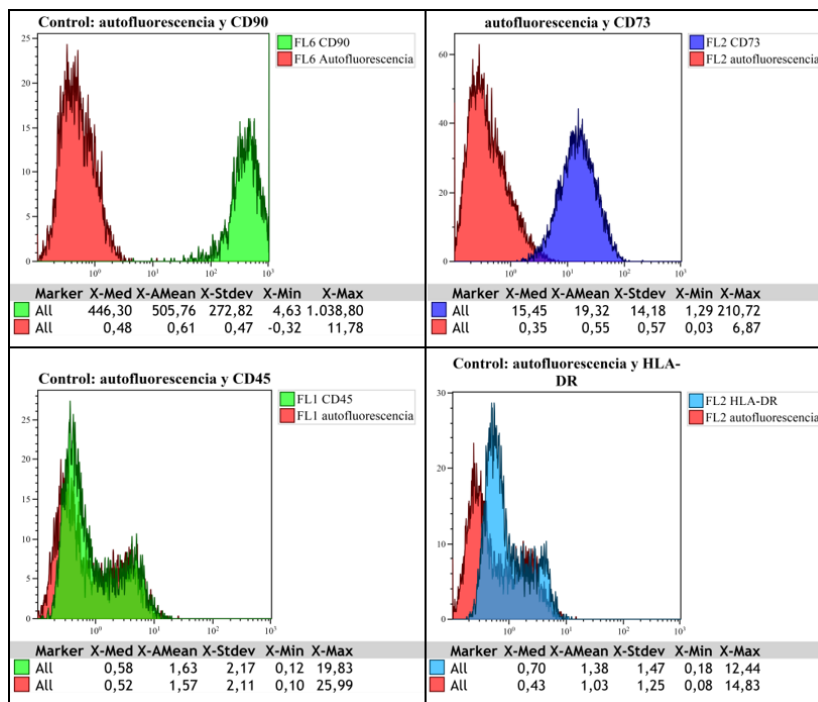


Figura 12: Caracterización de las ASCs mediante citometría de flujo.

### 6.3. Tinción vital fluorescente de las células

Para conocer si las células migraban a los pulmones tras su infusión se utilizó el marcador fluorescente CM-Dil labeling (CellTracker™ CM-Dil, Invitrogen) antes de la administración de las células al receptor. Para ello, tras el conteo de las células a inyectar y su centrifugación, se añadieron 10 µl del marcador junto con 10 ml de PBS. Las células se incubaron en oscuridad durante 5 minutos a 37°C y, a continuación, pasaron a 4°C durante 30 minutos. Tras centrifugar de nuevo y realizar dos lavados del pellet obtenido, las células se resuspendieron en solución salina para finalmente administrarlas sin demora en los animales trasplantados.

### 6.4. Administración de las células ASCs

Tanto las células como el placebo (suero fisiológico) se infundieron en los animales justo tras la cirugía y en el momento de la recuperación anestésica. Se mantuvo al animal ventilado durante aproximadamente una hora mientras se preparaba la terapia celular, que incluía el conteo de células y su tinción para posteriormente inyectarlas por la cola de la vena.

La dosis de células empleadas fue de  $1 \times 10^6$  células /kg de animal, de acuerdo a lo establecido en nuestro grupo de trabajo y siendo la dosis empleada generalmente en humanos. Las células se infundieron lentamente durante 1 ó 2 minutos, diluidas en suero fisiológico (vehículo control) a través de la vena lateral de la cola de la rata. Se trató de evitar, en todo momento, que se formasen agregados celulares que pudiesen provocar émbolos pulmonares, que pueden causar una muerte súbita del animal, como se comprobó durante la puesta a punto del modelo.

## 7. Sacrificio y recogida de muestras

De acuerdo con el diseño experimental anteriormente expuesto, los animales fueron sacrificados en los días 1 y 5 tras el trasplante, en función del grupo de estudio. Para ello, se anestesiaron con sevoflurano al 3% y se intubaron. Se realizó una estereotomía media para valorar macroscópicamente la apariencia y funcionalidad del pulmón (color, presencia o no de atelectasias, adherencias pleurales...). Se observó también si se había producido sangrado en la cavidad torácica y se realizaron vídeos y fotografías de los pulmones.

Previo al sacrificio del animal, se extrajo un mínimo de 2 ml de sangre directamente del ventrículo izquierdo con jeringas estériles para, posteriormente, centrifugar las muestras a 3500 rpm durante 10 minutos para la recogida del suero, que fue transvasado a unos tubos *ependorfs* y almacenados a -80°C para el análisis posterior de citoquinas

A continuación, se procedió a perfundir suero por la aurícula izquierda a fin de limpiar de sangre todo el pulmón receptor. Una vez “limpio”, se extrajo todo el conjunto cardiovascular y, en una placa de petri estéril, se separó el pulmón donante. Una pequeña porción, destinada a la extracción de ARN, se introdujo en un tubo *ependorf* que fue introducido inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente mantenido a -80°C. El resto del pulmón se fijó en paraformaldehído al 10% para realizar cortes histológicos e inmunohistoquímica.

## 8. Análisis de las muestras

### 8.1. Análisis histopatológico

Tras el sacrificio, las muestras fueron suspendidas en una solución de formaldehído al 4% durante 72 horas.

Se procedió a la deshidratación con etanol, una serie de concentraciones crecientes (70, 80, 96 y 100°). Tras tres baños en tolueno, se incluyeron en parafina (Panreac Química SAU, Barcelona, España).

Se efectuaron cortes de 5 micras con un microtomo Micron HM360 en el eje frontal para la realización de técnicas y se procedió a su evaluación tanto por las técnicas histológicas Hematoxilina/Eosina como mediante técnicas Inmunohistoquímicas.

En todos los casos las muestras se examinaron utilizando un microscopio Axioplan 2 (Zeiss). Las imágenes digitales se realizaron con una cámara Axiocam HCR (Zeiss) y fueron almacenadas en formato JPEG. Se analizaron 15 campos aleatorios de 400x de cada caso de estudio.

#### 8.1.1. Protocolo de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E)

Se desparafinaron los cortes de tejido con xilol (3 cambios de 5 minutos cada uno) y se rehidrataron los tejidos sumergiéndolos una serie de alcoholes en concentración decreciente (100%,96%,70%) y por último se sumergieron en baño de agua.

Se llevaron a cabo la tinción con Hematoxilina según Carazzi (Wittekind, 2003) durante 15 minutos (para virar el color de la hematoxilina se lavaron las muestras con agua durante 15 minutos) y la tinción con eosina acuosa al 1% (Panreac Química SAU, Barcelona, España). Se deshidrataron los cortes y se realizó el montaje con resina EUKITT (Labolan, España).

El grado de rechazo de todas las preparaciones fue evaluado de forma ciega por un patólogo siguiendo los criterios establecidos por la ISHLT<sup>22,216</sup>. Los aspectos a valorar aparecen resumidos en la tabla 6, y se valora tanto el rechazo vascular teniendo en cuenta la infiltración perivascular de monocitos y su grado de extensión y distribución alrededor de los vasos e intersticio y el rechazo bronquiolar, en el que se tiene en cuenta la inflamación de las vías aéreas.

**Tabla 6:** Criterios de clasificación histológica del rechazo<sup>22,216</sup>.

Rechazo vascular			
Grado	<b>A0</b>	Sin rechazo	Parénquima pulmonar normal sin evidencias de infiltrado de células mononucleares ni hemorragias ni necrosis.
	<b>A1</b>	Rechazo mínimo	Infiltrado alrededor de vasos (vénuas) de dos o tres capas de células mononucleares.
	<b>A2</b>	Rechazo leve	Infiltrado inflamatorio perivascular alrededor de vénuas y arteriolas. Se incluyen linfocitos activados, macrófagos y eosinófilos.  Posible endotelitis y bronquiolitis linfocítica.
	<b>A3</b>	Rechazo moderado	Inflamación perivascular alrededor de arteriolas y vénuas con presencia de eosinófilos y endotelitis y, en ocasiones, neutrófilos.  Infiltrado perivascular e intersticial están en continuidad y en ocasiones se extiende a bronquios cercanos.
	<b>A4</b>	Rechazo severo	Infiltrado perivascular e intersticial difuso de células mononucleares con endotelitis y daño de neumocitos alveolares.  Presencia de necrosis, membranas hialinas, hemorragia, neutrófilos y macrófago en alveolos.
Rechazo bronquiolar			
Grado	<b>B0</b>	No inflamación	Ausencia de inflamación bronquial.
	<b>B1R</b>	Bajo grado inflamatorio	Presencia desigual o circunferencial de células mononucleares en el tejido conectivo subepitelial en bronquiolos.  Pueden presentarse eosinófilos.  Ausencia de infiltrado por linfocitos y no hay daño epitelial.

	<b>B2R</b>	Alto grado inflamatorio	<p>Denso infiltrado mononuclear en tejido conectivo subepitelial con presencia de eosinófilos.</p> <p>Daño epitelial (necrosis y/o metaplasia) y linfocitos intraepiteliales.</p> <p>En formas más severas, presencia de ulceración epitelial con exudados fibrinopurulentos y restos necróticos.</p>
--	------------	-------------------------	---

## 8.2. Estudio de poblaciones celulares: inmunohistoquímica

Para el estudio de la reacción macrofágica total, se eligió el anticuerpo anti-CD68 de BioRad (MCA341GA), 1/100. Para detectar los macrófagos M2, el anticuerpo-anti CD206 de Biorbyt (orb180464), 1/100. Con el fin de valorar el infiltrado de linfocitos T citotóxicos se utilizó el anticuerpo anti-CD8 alpha antibody de Abcam (ab33786), 1/500, mientras que para el infiltrado de los linfocitos T helper el anticuerpo elegido fue el Anti-CD4 antibody de Abcam (ab203034), 1/100. El protocolo general de la técnica se describe a continuación:

En primer lugar, se bloqueó la peroxidasa endógena tratando los cortes de tejido con 100 µl de una disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-TWEEN.PBS (Sigma-Aldrich, Alemania). Tween 20 (Calbiochem, Alemania).

Posteriormente, el bloqueo se llevó a cabo cubriendo los cortes de tejido con 100 µl de PBS 10% de suero bovino fetal a temperatura ambiente durante una hora en la cámara húmeda.

Transcurrido el tiempo, se decantó la solución y se añadieron 100 µl de una disolución del anticuerpo primario y se realiza una incubación “over-night” en la cámara húmeda a 4°C. Se eliminó la disolución del anticuerpo primario y se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos de duración cada uno.

A continuación, utilizamos como sistema de revelado el Kit Histofine Simple Satin Rat (NHC-414191F), por ser altamente sensitivo y proporcionar una baja tinción de fondo. Se añadió sobre la sección de tejido 100 microlitros del complejo constituido por polímero conjugado con peroxidasa y la fracción de inmunoglobulina F(ab) de inmunoglobulina que proporciona el kit. Se incubó a temperatura ambiente 15 minutos. Tras ello, se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Finalmente, las muestras se deshidrataron mediante pasos sucesivos en alcohol de graduación creciente, se aclararon en xilol y se montaron con EUKITT (Labolan, España).

En todos los casos se realizó un control negativo utilizando secciones de tejido en las que se realizó la técnica, pero omitiendo el paso de incubación con anticuerpo primario.

### **8.2.1. Valoración de las muestras**

Se realizó un conteo de todas las poblaciones celulares de forma ciega y por el mismo observador experto. Para ello, se evaluaron en las preparaciones realizadas, 15 campos distintos a 40 aumentos y bien conservados y con la máxima inflamación. El conteo de las poblaciones celulares del sistema inmune se llevó a cabo tanto en zonas vasculares como bronquiales ya que, como hemos visto en la clasificación de los grados de rechazo, existe un rechazo vascular y un rechazo bronquial. Se eligieron siempre las muestras y las zonas más representativas para todo el proceso de la valoración.

### **8.3. Inmunofluorescencia de las ASCs**

La localización de las células ASCs en las muestras pulmonares recogidas se llevó a cabo mediante técnicas de inmunofluorescencia para así poder asegurar la presencia de dichas células desde justo después de su inyección y su permanencia en el órgano diana (pulmón izquierdo) durante todo el periodo estudiado.

### **8.4. Determinación de citoquinas en suero mediante Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Se determinó la producción de citoquinas a nivel sistémico mediante la técnica de ELISA utilizando muestras de suero obtenidas al momento del sacrificio del animal. Para ello, la sangre tras su extracción en un tubo sin anticoagulante se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Las muestras de suero fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior utilización.

Se emplearon 2 kits de citoquinas para analizar: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-17a y TNF- $\alpha$  (Milliplex MAP kit, Rat Cytokine/ Chemokine Magnetic Bead Panel # RECYTMAG65PMX27BK, Merck Millipore); TGF- $\beta$ 1 (Milliplex MAP TGF - $\beta$ 1 Single Plex Magnetic Bead Kit, Merck Millipore).

Para la preparación y realización de los experimentos se siguieron las instrucciones proporcionadas por los fabricantes. La lectura se realizó con Luminex, Procartaplex (LabClinics), S.A; en el software que proporciona el fabricante.

### **8.5. Determinación de citoquinas en el pulmón donante**

Para valorar la producción de citoquinas en el propio órgano trasplantado se recurrió a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR). Para ello fue necesario, partiendo el órgano trasplantado, extraer primero el ARN total, sintetizar ADN complementario y finalmente llevar a cabo la técnica mencionada.

### 8.5.1. Extracción de ARN en muestras de tejido pulmonar y evaluación de su calidad

Para la extracción del ARN de las células del tejido pulmonar, se emplearon las muestras pulmonares almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Todo el trabajo se llevó a cabo en una cabina de extracción de gases convenientemente desinfectada. El protocolo seguido se describe a continuación:

En primer lugar, de las muestras congeladas se cogieron porciones de entre 50 y 100mg en pequeños tubos o *ependorfs*. Se añadió 1ml de solución TriPure (TriPure Isolation Reagent, Roche) y se trituraron con un homogeneizador tisular (OMNI TH, Omni International).

A continuación, los homogenizados se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos para, posteriormente, ser centrifugados a 1200G otros 10 minutos y a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se transvasó a un tubo limpio de 1.5ml.

El siguiente paso a realizar fue añadir 200 $\mu\text{l}$  de cloroformo por cada 1 ml de solución TriPure. Se mezcló todo con la ayuda de un vórtex y se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se volvieron a centrifugar a 1200G durante 12 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y la fase acuosa, con mucho cuidado de que no se contaminase con el resto de las fases del tubo, se transfirió a un tubo nuevo.

Para la precipitación del ARN y su lavado, se añadió a esa fase acuosa obtenida anteriormente, primero 1 ml de isopropanol por cada 1 ml de solución TriPure empleado, se mezclaron con ayuda de un vórtex. Las muestras se congelaron durante toda la noche a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Al día siguiente, se descongelaron y centrifugaron a 1200G durante 8 minutos. El sobrenadante se desechó para añadir a continuación, 500 $\mu\text{l}$  de etanol al 75%. Se centrifugaron las muestras a 7500G durante 5 minutos y se decantaron para retirar el etanol. Este paso con el alcohol fue repetido dos veces más. Posteriormente, se dejó secar el pellet de ARN al aire durante aproximadamente 1 hora, cubriendo la superficie de los tubos para evitar la entrada de suciedad.

Finalmente, para la solubilización del ARN, éste se disolvió en 60 $\mu\text{l}$  agua libre de enzimas ARNsas que podrían provocar su degradación. Se incubaron las muestras a  $55-60^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y finalmente se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , dada la facilidad del ARN de degradarse a temperatura ambiente.

Antes de realizar la síntesis de ADN complementario, se procedió a medir la cantidad y calidad de ARN mediante un espectrofotómetro de ultravioleta (NanoDrop 2000, Thermo Scientific™). Tras realizar un blanco con el diluyente en el que se haya diluido el ARN en el paso anterior, en este caso, agua libre de ARNsas, se puso en el óptico 1.5  $\mu\text{l}$  de cada muestra, obteniéndose la cantidad de  $\mu\text{g/ml}$  de ARN de cada muestra. Se realizaron tres mediciones por muestra y con ello, la media para asegurarse que la cantidad seleccionada fuera la correcta.

Para determinar la calidad de la muestra, se tuvieron en cuenta los valores de absorbancia, con ratios de 260/230 (donde se valora la contaminación por compuestos orgánicos si el valor es menor de 2) y 260/280 (indicando la contaminación por proteínas si el valor es, de nuevo, menor a 2).

Además de la calidad y cantidad, se comprobó que la integridad del ARN fuera adecuada. Para ello se hizo un gel agarosa al 1% (50ml de buffer 1X TAE, + 0.5mg agarosa + 2ul bromuro de etidio). En los pocillos se cargaron 6 µl: 1µl de buffer de carga + 500 ng de muestra + agua hasta 6 µl). Las muestras se separaron a 80V estimando la intensidad de las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S ribosomales, para que las muestras se consideren adecuadas, el ratio 28S/18S tiene que estar próximo a 2. También se comprobó, mediante un método más sensible y específico, y antes de realizar la secuenciación de ARN, mediante electroforesis.

### 8.5.2. ADN complementario y qPCR

Para la obtención del ADN complementario o ADNc, se procedió a la retrotranscripción de 1 µg total de cada muestra de ARN siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, Bio-Rad Laboratories, USA).

La cuantificación de los niveles de expresión de los genes problema, se realizó mediante la ampliación de ese ADN complementario en el termociclador a tiempo real CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad) utilizando SensiFAST™ SYBR no-ROX kit (BIOLINE).

Los oligonucleótidos que se emplearon como cebadores para la PCR en tiempo real, aparecen reflejados detallados en la siguiente tabla.

**Tabla 7:** Relación de primers utilizados para valorar la cantidad de citoquinas y quimioquinas producidas a nivel pulmonar.

Citoquina / quimioquina	Secuencia	Tamaño (pb)
S18 rRNA	Forward: 5'-ACTGCCATTAAGGGTGTGGG-3' Reverse: 5'-GATGGTGATCACACGCTCCA-3'	120
IL-1β	Forward: 5'-AAGCCAACAAGTGGTATTCTCCA-3' Reverse: 5'-GGTGTGCCGTCTTTCATCAC-3'	126
IL-2	Forward: 5'-CAAGCAGGCCACAGAATTGA-3' Reverse: 5'-TGCAGAGCTCCGAGTTCATT-3'	60
IL-4	Forward: 5'-CGGCAACAAGGAACACCAC-3' Reverse: 5'-CCGAGAACCCAGACTTGTT-3'	118
IL-6	Forward: 5'-GGAAATGAGAAAAGAGTTGTGC-3' Reverse: 5'-TGGAAGCATCCATCATTTCTTTG-3'	114
IL-10	Forward: 5'-GACGCTGTCATCGATTTCTCC-3' Reverse: 5'-GCTCCACTGCCTTGCTTTTA-3'	49
IL-13	Forward: 5'-ACAGCTGGCGGGTTCTGT-3' Reverse: 5'-ATCCGAGGCCTTTTGGTTAC-3'	114

IL-17a	Forward: 5'-GGACTCTGAGCCGCAATGAG-3' Reverse: 5'-TGTGCCTCCCAGATCACAGA-3'	58
IL-22	Forward: 5'-TCAGCCCCTGTACATCAG-3' Reverse: 5'-TCCCCGATCGCTTTAATCTC-3'	112
IL-23a	Forward: 5'-GACAACAGCCAGTTCTGTTTGC-3' Reverse: 5'-CTGAGGCCAGTAGGGAGGT-3'	145
INF- $\gamma$	Forward: 5'-CCAAGTTCGAGGTGAACAACC-3' Reverse: 5'-CGACTCCTTTTCCGCTTCCT-3'	112
TGF- $\beta$	Forward: 5'-CCGCAACAACGCAATCTATG-3' Reverse: 5'-GCACTGCTTCCCGAATGTCT-3'	89
TNF- $\alpha$	Forward: 5'-CCAACAAGGAGGAGAAGTTCCC-3' Reverse: 5'-TGGTGGTTTGCTACGACGTG-3'	127
iNOS	Forward: 5'-GCTATTCCCAGCCCAACAA-3' Reverse: 5'-CATTCTGTGCAGTCCCAGTG-3'	91
CCL2	Forward: 5'-CTGTCTCAGCCAGATGCAGTTA-3' Reverse: 5'-CCTGCTGCTGGTGATTCTCT-3'	111
CCL5	Forward: 5'-CCTTGCAGTCGTCTTTGTC-3' Reverse: 5'-CTTGAACCCACTTCTTCTCTGG-3'	71
CXCR3	Forward: 5'-AGGTCAGTGAACGTCAAGTGCT-3' Reverse: 5'-GGGAGTCAGAGAAGTCGCTTT-3'	108
CXCL1	Forward: 5'-CCAAAAGATGCTAAAGGGTGTCC-3' Reverse: 5'-CCAGCGTTCACCAGACAGAC-3'	81

Las temperaturas de anillamiento y elongación, así como el tiempo de los mismos se calcularon para cada primer y se refleja en la siguiente figura. Todas las pruebas se realizaron por triplicados para disminuir la posibilidad de error y se calcularon los coeficientes de variación producidos intraplaca e interplaca, para asegurarse de que la comparación entre las distintas muestras es correcta.

La cuantificación de la expresión de los genes se realizó siguiendo el cálculo  $2^{-(\Delta\Delta CT)217}$ .

## 9. Secuenciación de microARNs

### 9.1. Preparación de las librerías y secuenciación con Illumina

La secuenciación genética se realizó a partir de las muestras de ARN obtenidas anteriormente. Para valorar las diferencias en cuanto a la expresión de microARNs cuando se realiza un trasplante, se establecieron cuatro grupos de estudio (n = 4 por grupo): grupo **Control** (pulmón de animal sano sin trasplante); grupo **Tx** (pulmón procedente del trasplante alogénico sin terapia celular con sacrificio a los cinco días, es decir, del grupo “Cont

BN 5”); grupo **Tx-ASC** (pulmón procedente del trasplante alogénico con terapia celular con sacrificio a los cinco días, es decir, del grupo “MSC BN 5”).

La preparación de las librerías se llevó a cabo por el servicio externo del Parque Científico de Madrid. De manera resumida, el protocolo fue el siguiente. Se empleó el kit “NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina” (New England Biolabs). El rendimiento de partida del total de ARN (ARN tratado con ADNasa I) para empezar el protocolo fue de 1 µg de ARN cuantificado mediante Agilent 2100 Bioanalyzer. A continuación, se realizó la amplificación de la librería mediante PCR de 13 ciclos.

Las librerías obtenidas se validaron y cuantificaron mediante Agilent 2100 Bioanalyzer y se purificó un grupo mediante electroforesis con un gel de acrilamida seleccionando un tamaño de la región de 140 a 180 pares de bases. El tamaño obtenido del grupo seleccionado de librerías se obtuvo mediante PCR cuantitativa empleando el kit “Kapa-SYBR FAST qPCR kit forLightCycler480” (Kapa BioSystems). El grupo de librerías se desnaturalizó antes de ser sembrado en un flujo continuo de celdas a una densidad de 2,6 pM, donde los grupos se formaron y secuenciaron usando el kit “NextSeq™ 500 High Output Kit”, en una secuencia de lectura individual de 1x75 en el secuenciador NextSeq500.

## 9.2. Análisis de los microARNs

Para conocer la diferente expresión cuando se realiza un trasplante y tras un rechazo agudo, las comparaciones se realizaron entre los grupos **Control vs Tx**, **Control vs Tx-ASC** y **Tx vs Tx-ASC**.

Todas las muestras fueron sometidas a análisis de control de calidad mediante el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) implementado en la suite GPRO<sup>218</sup>.

Los archivos FASTQ se preprocesaron para filtrar por calidad tamaño (tamaño mínimo de 16 pares de bases y máximo de 35 pares de bases, para ser utilizado en posteriores análisis) y contenido en Ns, rechazándose aquellas con más de un 10% de Ns en su secuencia (calidad media mínima de 28). Este filtrado se realizó mediante la herramienta Prinseq<sup>219</sup> implementado en la suite GPRO.

Como transcriptoma de referencia se utilizó un subset del general conteniendo únicamente microARNs. Las diferentes librerías fastq se mapearon contra dicho genoma de referencia usando el software mapeador Bowtie2<sup>220</sup> para realizar una comparación de los resultados.

Se realizaron los 3 test de expresión diferencial usando el programa EdgeR<sup>221</sup>. El input para EdgeR es el resultado del análisis por con el programa Corset de los bams obtenidos en el paso anterior<sup>222</sup>.

Las dianas de los diferentes microARNs se incorporaron a los archivos resultantes de los análisis de expresión diferencial. El archivo conteniendo todas las dianas identificadas y experimentalmente comprobadas fue descargado de mirTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>). Los scripts a desarrollar en el marco de este estudio se programaron usando python (<https://www.python.org>) como lenguaje de

programación. Los análisis de preprocesado, mapeo, expresión diferencial y Goseq anteriormente citados fueron ejecutados en servidor remote a través del suite de interfaces de GPRO.

Por último, se empleó el software DIANA-mirPath<sup>223</sup> para el análisis enriquecido de los genes diana a los que afectan los microARNs que estaban desregulados en los distintos grupos de estudio. Además, gracias a esa aplicación, se determinaron las vías biológicas de señalización en las que están implicados. Para ello, se empleó la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), basado en miRTarBase<sup>224</sup>.

## 10. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos realizados se hicieron con los programas GraphPad Software Prism 7 (California, USA) y SPSS (Illinois, USA) y contaron con la supervisión del Servicio de Estadística del Hospital La Paz.

Para la valoración en la producción de citoquinas y quimioquinas, tanto a nivel sistémico como local, los resultados aparecen expresados en mediana y rango intercuartílico.

Los grupos comparados fueron:

- Control SD 1 vs MSC SD1
- Control SD 5 vs MSC SD 5
- Control BN 5 vs MSC BN 5

Los test realizados fueron no paramétricos:

- Primero se realizaron tres **test de normalidad** de las muestras (Shapiro-Wilks) y se comprobó que todas ellas seguían una distribución no normal, debido al tamaño muestral.
- **Kruskal-Wallis** (significancia global). Este test es el equivalente no paramétrico al análisis de varianza de un factor (ANOVA) y fue usado para comprobar las diferencias existentes entre todos los grupos de estudio. Cuando se produce alguna diferencia significativa, al menos una de las muestras es distinta al resto.

Para las comparaciones post-hoc se utilizó la prueba de Bonferroni.

- **U de Mann-Whitney** (comparación de muestras independientes dos a dos). Se empleó cuando el test anterior daba resultados significativos y para ver entre qué grupos se producía esa diferencia.

En todos los casos se consideró la diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de  $p$  fue menor o igual a 0,05.

Por otra parte, en el estudio de las diferencias en cuanto a la expresión de los microARNs, los resultados se expresan como estadísticamente significativos cuando presentan un valor  $p < 0.05$ , tras la corrección con para múltiples tests por Benjamini-Hochberg de false discovery rate (FDR). A partir de los datos normalizados de

cuentas obtenidos por EdgeR se realizó un Análisis de componentes principales (ACP) para mostrar la variabilidad en las muestras. El test de Chi cuadrado de Pearson and la corrección de FDR se usó para realizar las comparaciones en el número de vías de señalización de los distintos microARNs afectados.

# **Resultados**

---



## 1. Modelo experimental de trasplante pulmonar en la rata

Desde junio de 2015 hasta septiembre de ese mismo año y, tras realizar una primera estancia en Gran Canarias para el aprendizaje del modelo quirúrgico, se llevaron a cabo 13 trasplantes por el mismo cirujano (doctorando) para realizar ajustes tanto en la técnica anestésica como en la quirúrgica. Dichos animales, al estar incluidos en la curva de aprendizaje no se han tenido en cuenta en el estudio.

Desde octubre de 2015 hasta noviembre de 2016, se realizaron un total de 90 trasplantes ortotópicos de pulmón izquierdo (180 animales utilizados: 90 donantes y 90 receptores), de nuevo, por el mismo cirujano.

### Supervivencia

De todos los trasplantes realizados, 75 despertaron tras la cirugía (83,3%) pero 13 de ellos no alcanzaron el día previsto para el sacrificio con lo que fueron excluidas del proyecto del rechazo. Por lo tanto, 62 receptores completaron con éxito el tiempo establecido de estudio (supervivencia final total de 68,9%, siendo de un 82,7% con respecto a las que superaron la cirugía).

### Factores que afectaron a la supervivencia

Uno de los principales factores fue el **tiempo medio** empleado en la cirugía, tanto en la extracción del órgano donante y su preparación como en el receptor. Éste fue mayor considerablemente durante la curva de aprendizaje y se fue reduciendo durante el desarrollo del experimento. Así, en los animales que entran dentro del estudio, el tiempo medio en la cirugía del animal donante, desde el momento de anestesia hasta la extracción del órgano, fue de  $78 \pm 17$  minutos. La preparación del órgano con la colocación de los manguitos fue de aproximadamente 10 minutos y el tiempo de mantenimiento del pulmón en frío fue de 120 minutos. Por último, el tiempo medio del animal receptor, incluyendo las anastomosis y hasta el cierre final de la incisión costal fue  $83 \pm 14$  minutos. Los animales, una vez finalizada la cirugía, se mantuvieron anestesiados y con ventilación mecánica durante una hora más, mientras se preparaba el tratamiento celular.

Otro de los factores importantes en la recuperación de los animales fue el **tipo de anestesia** empleado en los receptores. En un primer momento se utilizaron combinaciones anestésicas inyectables (ketamina con xilacina, y atipamezol para revertir sus efectos una vez completada la cirugía) pero se comprobó que el tiempo de recuperación resultaba excesivo y, en numerosas ocasiones, los animales no llegaban a despertarse. Por ese motivo, se cambió al protocolo anestésico empleado finalmente en el estudio, utilizándose sevoflurano como anestésico inductor y de mantenimiento combinado con analgésicos: lidocaína al 1% a nivel local en la zona costal y tramadol por vía subcutánea. Una vez concluida la cirugía, los animales despertaron transcurridos unos 30 minutos pudiendo ser extubados sin complicaciones.

Otro factor externo a la técnica quirúrgica que afectó en gran medida a la supervivencia fue la **administración de las ASCs** ya que fue necesario realizar pruebas para conocer la cantidad total de las mismas a emplear y el

mejor método para evitar su agregación y consecuentes émbolos pulmonares. Cuando esto se producía, el animal no llegaba a despertarse de la anestesia y moría a los pocos minutos tras haber inyectado la solución con células.

En cuanto a las complicaciones intraoperatorias propias de la técnica quirúrgica, las **lesiones en el pulmón donante**, debidas a la manipulación del órgano durante su preparación o su trasplante en el animal receptor, fueron otro de los motivos por los que los animales no despertaron de la cirugía debido a la presencia de un neumotórax. La ventilación mecánica también ha constituido durante la curva de aprendizaje un motivo de daño pulmonar. El desgarro de la **vena pulmonar** receptora durante la introducción del manguito vascular fue otra causa en dos animales que hizo imposible completar con éxito el trasplante.

Respecto a complicaciones tardías observadas durante el sacrificio de los animales o a los días del trasplante y que impidieron incluir a los animales en el estudio, destacaron la trombosis arterial y venosa, y la estenosis de las mismas.

## **2. Severidad del proceso**

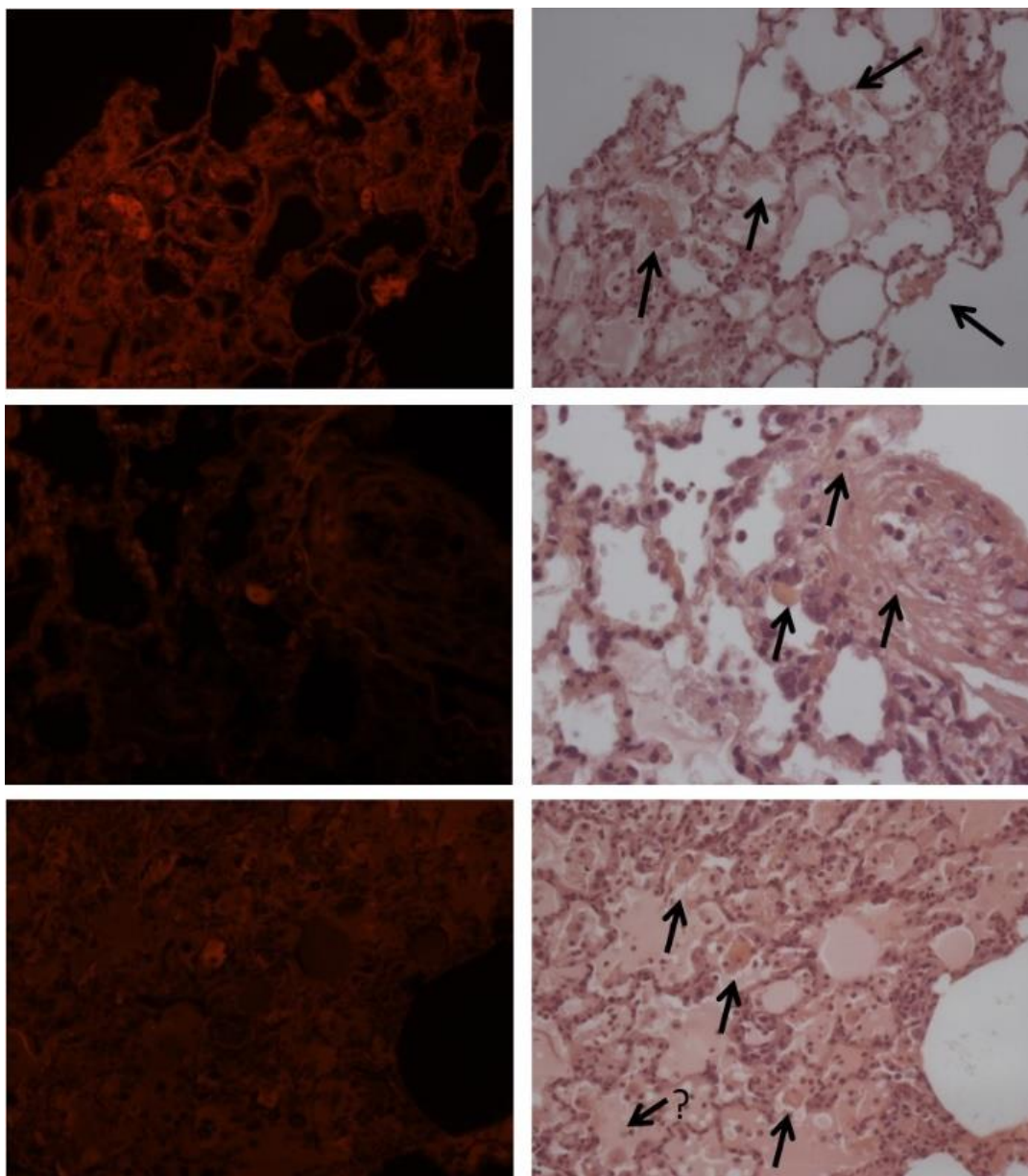
El peso medio de los animales donantes al trasplante fue de  $333,2 \pm 37,4$  gramos (cepa SD:  $337,9 \pm 38,7$  g; cepa BN:  $315,0 \pm 25,7$  g), mientras que, en animales receptores, todos ellos de la cepa SD, fue de  $376,75 \pm 34,4$  g, siempre buscando un mayor tamaño en los animales receptores con respecto a los donantes para facilitar así la técnica quirúrgica.

Se realizó un seguimiento dos veces al día y se observó que se producía una disminución de peso de alrededor de unos 8 gramos/día hasta el momento del sacrificio, aunque se verificó la ingesta de comida y bebida.

Se calculó la severidad acumulada, tanto global como del día al sacrificio. En cuanto al día del sacrificio, los animales que se sacrificaron a las 24 horas, tanto los tratados como los controles, mostraron una severidad mayor que a los 5 días. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en cuanto al uso o no de terapia celular. Por otra parte, en la severidad acumulada global, tampoco hubo diferencias entre los grupos con ASCs y los controles ni entre los trasplantes alogénicos e isogénicos.

## **3. Localización de las ASCs**

Dado que las células se tiñeron, éstas se han podido localizar por inmunofluorescencia en el momento del sacrificio. Así se observa que se han mantenido en el pulmón injertado, realizando su efecto durante al menos los cinco días de tratamiento (figura 13).



**Figura 13:** Visualización microscópica por inmunofluorescencia (izquierda) con su correspondiente imagen con hematoxilina-eosina de las ASC en tres muestras aleatorias a los 5 días postrasplante.

#### 4. Estudio macroscópico del pulmón donante

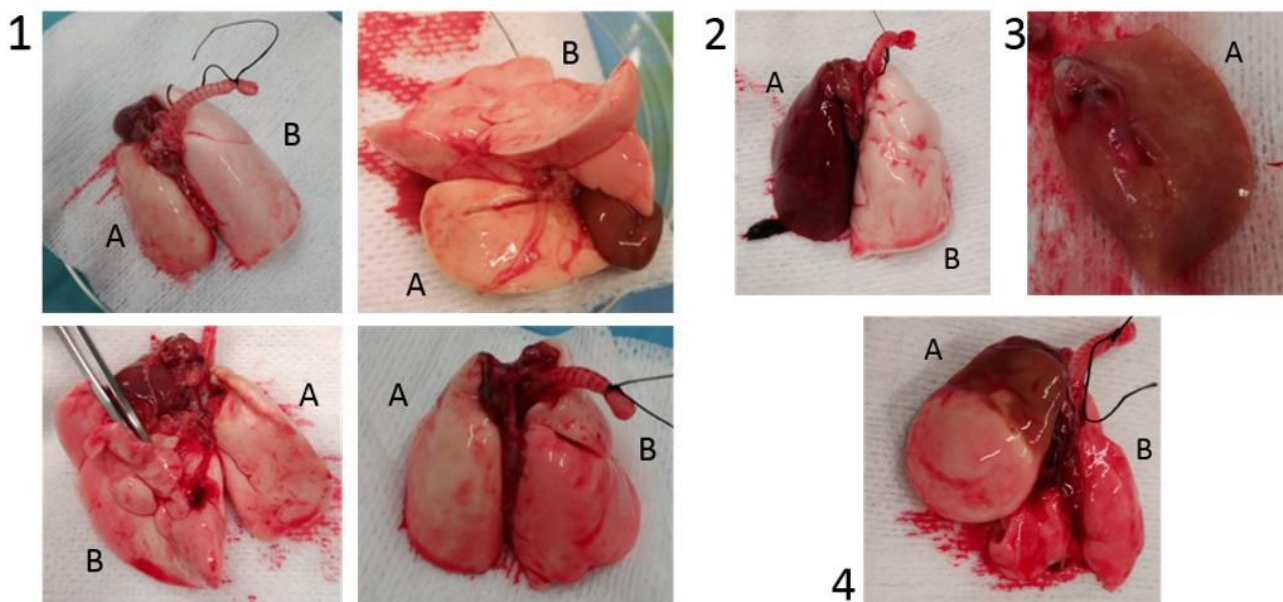
No se consideró en ningún caso el estudio de muestras de pulmón de animales que hubiesen fallecido antes del momento fijado de sacrificio. Todos los animales se encontraban vitales y con buen aspecto, independientemente del tratamiento. Los animales no presentaron en ningún caso problemas respiratorios (figura 14).



**Figura 14:** Aspecto de los animales trasplantados a las 2 horas de la cirugía (A) y en el momento previo al sacrificio, a los 5 días postrasplante (B).

Una vez extraído todo el bloque cardiopulmonar se valoró el aspecto del pulmón trasplantado en comparación con el pulmón nativo sano. En los animales que aparentemente mostraron mayor rechazo, se observó un inicio de fibrosis y adherencias alrededor del órgano. En el resto de los órganos no se observó ninguna alteración relevante.

En los pulmones, se valoró que el grado de colapso (atelectasias) y capacidad de reclutamiento alveolar y la circulación, mediante la perfusión de solución salina con heparina. Salvo en siete casos, los pulmones mostraron un aspecto similar al pulmón nativo del receptor, independientemente del grupo de estudio. En otros casos, la parte apical del pulmón trasplantado se encontró atelectásica y, en los casos más graves, se observó un aspecto hepaticado del pulmón (figura 15).



**Figura 15:** Aspecto de los pulmones tras el sacrificio (1: pulmones sin alteraciones; 2: pulmón congestivo; 3: pulmón hepaticado; 4: porción apical colapsada). A: pulmón donante; B: pulmón sano nativo del receptor.

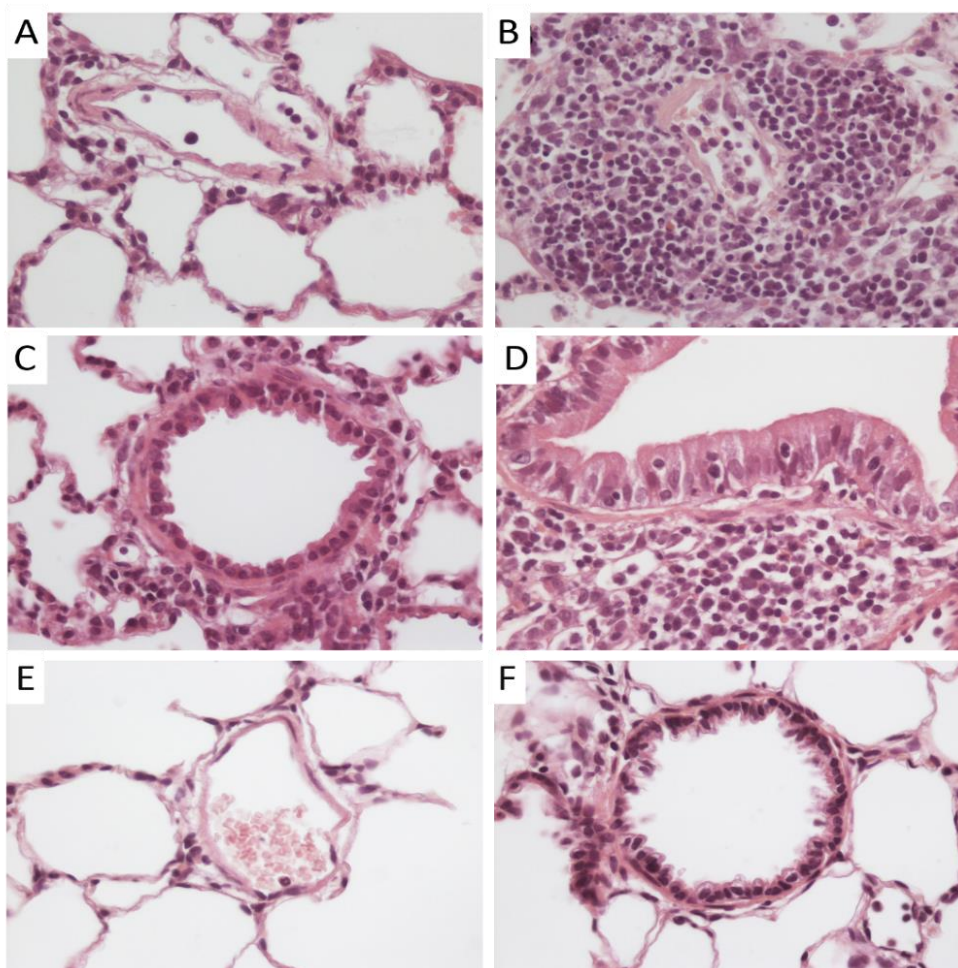
## 5. Estudio histológico de los pulmones

Con la tinción de hematoxilina-eosina se determinó el grado de rechazo tanto vascular como bronquial.

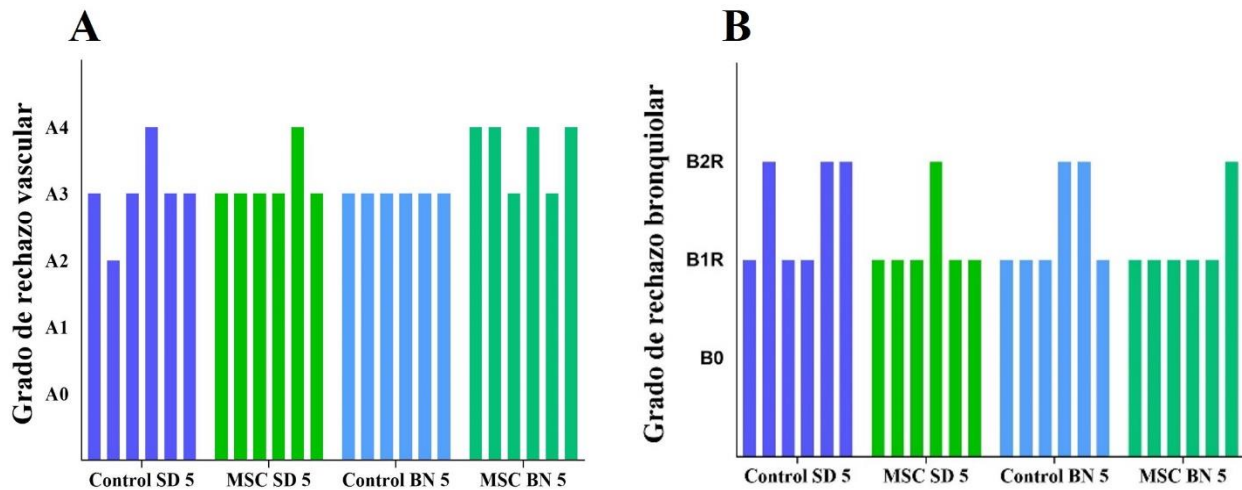
Comparándolos con pulmones sanos no trasplantados, se encontraron diferencias histológicas con todos los trasplantados, incluyendo infiltrado inflamatorio evidente y rechazo (figura 16).

En cuanto a los grupos de estudio con o sin tratamiento celular, no se observaron diferencias significativas entre ellos ya que todos mostraron algún grado de rechazo, tanto a nivel vascular como bronquial (figura 17).

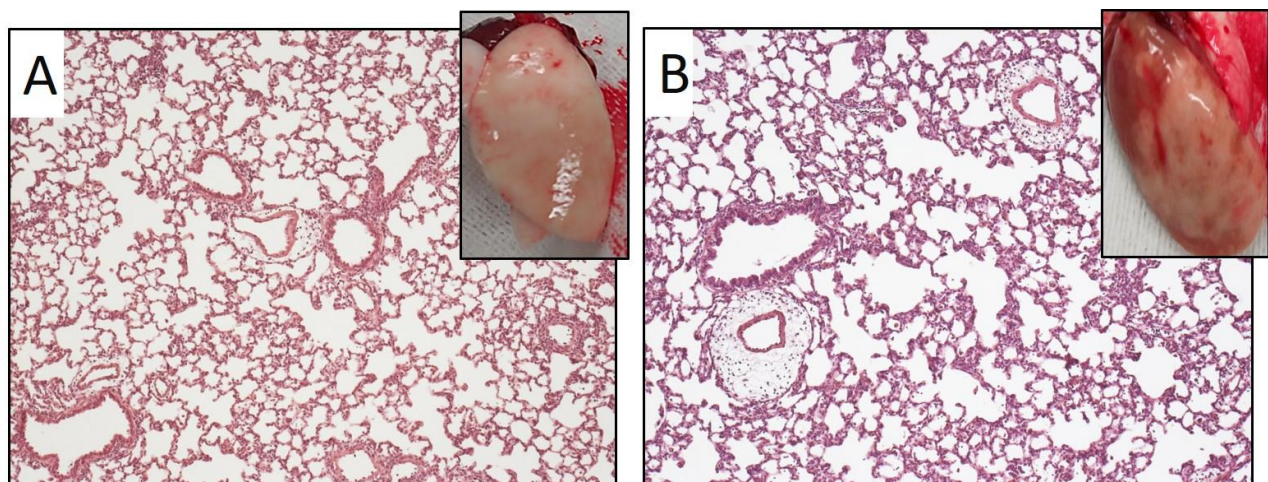
Todos los pulmones tuvieron buen aspecto macroscópico y buena ventilación al momento del sacrificio, salvo los siete casos mostrados anteriormente, aunque a nivel microscópico presentaron un rechazo significativo. Si bien es cierto, que aquellos con peor aspecto, tuvieron mayor infiltrado inflamatorio. No se pueden correlacionar de una manera precisa la imagen macroscópica con la microscópica (figura 18).



**Figura 16:** Hematoxilina-Eosina 100x **A)** Vénula pulmonar con caso de leve reacción de rechazo, A0 (muy poco infiltrado inflamatorio alrededor del vaso); **B)** Vaso sanguíneo con reacción de rechazo agudo grado A3 (manguito de células inflamatorias de más de 2-3 capas de grosor); **C)** Bronquiolo con rechazo de bajo grado B1R; **D)** Bronquiolo con un grado B2R de rechazo; **E)** Vaso de pulmón sano sin rechazo; **F)** Bronquiolo de pulmón sano sin rechazo. Clasificación según la *International Society for Heart and Lung Transplantation*.



**Figura 17:** Grado de rechazo vascular (A) y rechazo bronquiolar (B) según los criterios establecidos por la ISHLT (n=6 por grupo).



**Figura 18:** Aspecto macroscópico y microscópico del injerto pulmonar. **A)** Pulmón del grupo MSC SD 5 con un grado de rechazo A3 y B1R. **B)** Pulmón del grupo Control BN 5 con rechazo A3 y B2R.

## 6. Inmunohistoquímica y recuento de poblaciones celulares inmunes

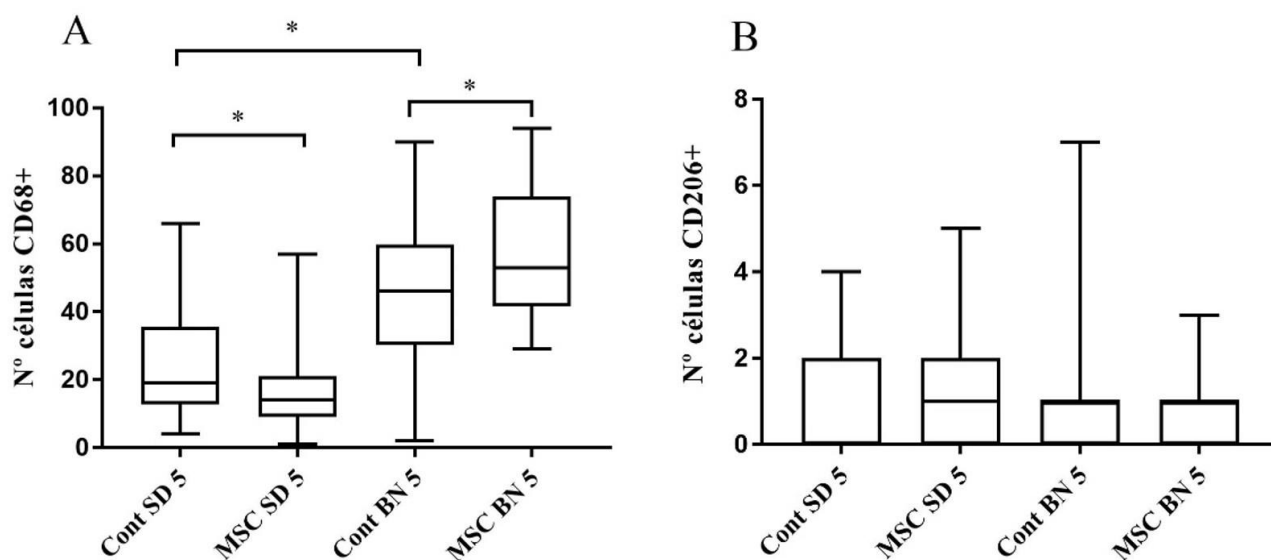
### 6.1. Sistema inmune innato: macrófagos M1 y M2

En la figuras 19 y 20 aparecen reflejados los contajes de macrófagos, tanto de tipo M1 (CD68+) como de tipo M2 (CD206+) así como la evidencia de los mismos en las muestras pulmonares.

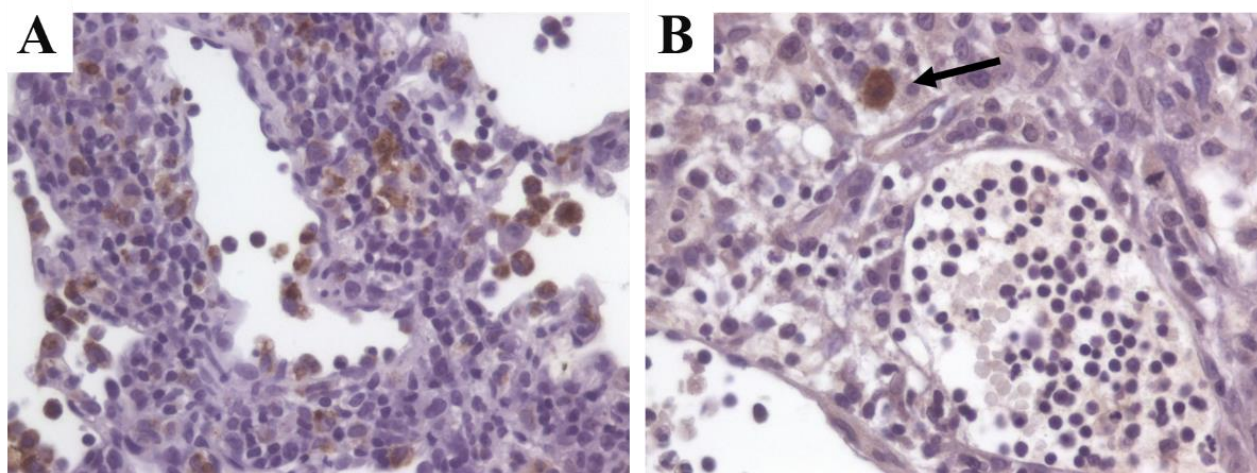
En el caso de los macrófagos M1, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos. De este modo, el número de macrófagos disminuye en el grupo con ASCs de trasplantes isogénicos, es decir, cuando la cepa donante y receptora son iguales (SD). Sin embargo, en los trasplantes alogénicos, es decir, cuando se utiliza la cepa BN como donante y la SD como receptora, su número se ve aumentado.

Además, es de destacar también las diferencias que se encuentran entre los dos grupos controles, con dos cepas distintas de pulmones donantes, siendo mayor el número de macrófagos en el trasplante alogénico.

Por su parte, en cuanto a los macrófagos M2, no se encuentran diferencias significativas en ninguno de los grupos de estudio ( $p > 0.05$ ).



**Figura 19:** Promedio de macrófagos tipo M1 CD68+ (A) y M2 CD206+ (B) en los pulmones analizados (n = 6 por grupo). Test d Mann-Whitney. \* $p < 0,05$



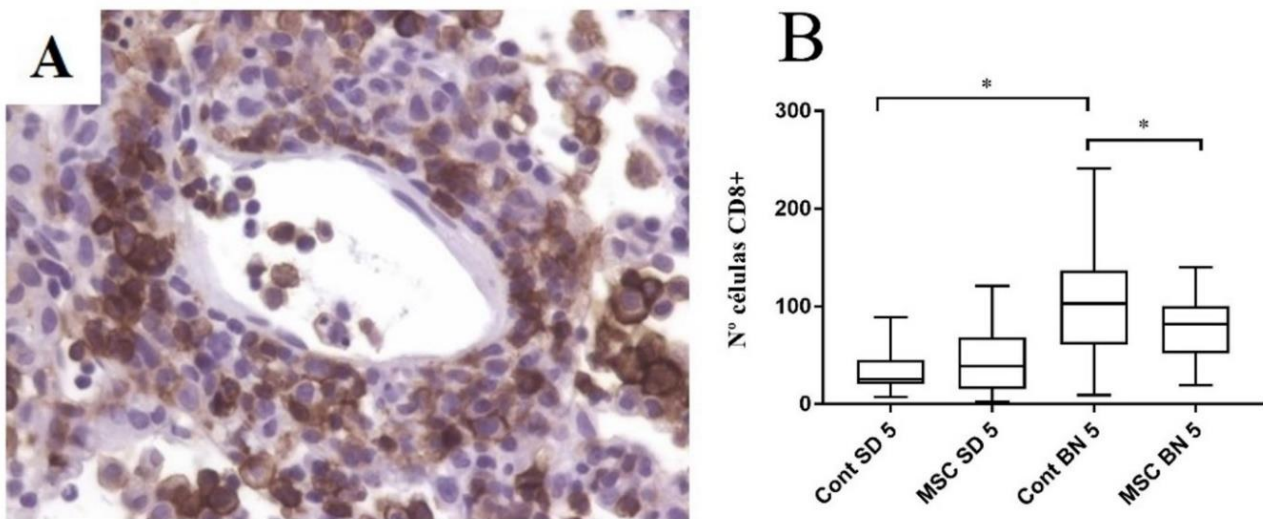
**Figura 20:** Técnica de inmunohistoquímica, 400x. A) Macrófagos CD68+ presentes en el infiltrado inflamatorio que rodea la vénula; B) Macrófago M2 CD206+ presente en el manguito perivenular.

## 6.2. Sistema inmune adquirido: linfocitos CD4+ y CD8+

Como en el caso anterior, las técnicas de inmunohistoquímica permitieron observar la presencia de los distintos tipos de linfocitos y realizar su conteo en las muestras seleccionadas. En la figura 21, aparecen reflejados los linfocitos CD8+ junto con su conteo celular y en la figura 22, se muestran los linfocitos CD4+.

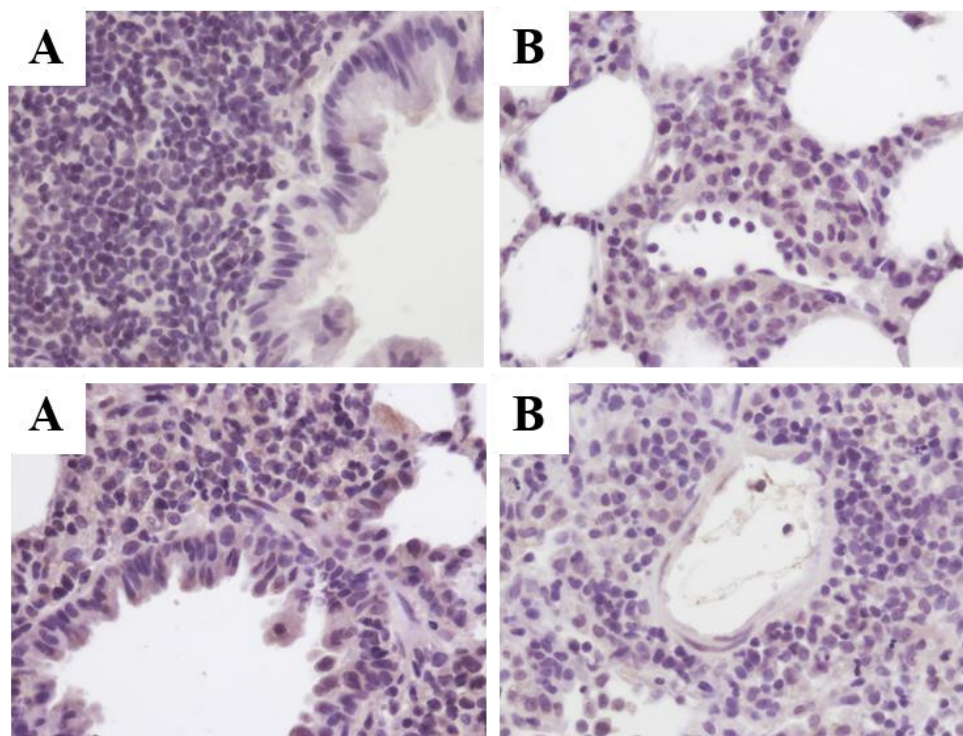
Los linfocitos CD8+ fueron muy abundantes en todos los casos en comparación con los linfocitos CD4+, cuyo número fue muy reducido cuando aparecían, y en la mayoría de los cortes histológicos no se llegaron a localizar.

Como ocurre con los macrófagos M1, el número de linfocitos CD8+ es mayor en los trasplantes alogénicos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con y sin tratamiento en los trasplantes isogénicos ( $p > 0.05$ ), pero sí en los alogénicos. En este último caso, el número de linfocitos fue menor al utilizar la terapia celular ( $p = 0.0345$ ).



**Figura 21:** A) Técnica de inmunohistoquímica, 400x. Vénula con abundantes linfocitos T citotóxicos CD8+. B) Promedio de linfocitos CD8+ en los pulmones analizados (n = 6 por grupo). Test d Mann-Whitney.

\* $p < 0,05$



**Figura 22:** Técnica de inmunohistoquímica, 400x. Se observa una ausencia de infiltrado de linfocitos CD4+ en bronquiolos (A) y vasos (B)

## 7. Determinación de citoquinas en plasma

Para valorar el estado inflamatorio tras la cirugía, se determinaron los niveles de citoquinas sistémicas.

De este modo, realizamos distintas comparaciones en todas las muestras recogidas. Por un lado, para estudiar el efecto propio de las ASC, comparamos los grupos: Control SD 1 frente a MSC SD 1; Control SD 5 frente a MSC SD 5 y Control BN 5 frente a MSC BN 5. Con ello valoramos la influencia del tratamiento en cada grupo frente a sus controles sin tratamiento, pero con el resto de las variables.

Por otro lado, para estudiar evolución temporal en la producción de citoquinas, se han comparado los grupos con muestras recogidas a las 24 horas frente a las que se recogieron a los 5 días, sin tener en cuenta la influencia de las ASCs.

Por último, para comprobar las diferencias entre un trasplante isogénico frente a otro alogénico, se compararon los grupos en los que el sacrificio se produjo a los 5 días tras la cirugía.

Para una mejor comprensión de las interleuquinas estudiadas, aunque algunas de ellas muestren acciones duales, las hemos dividido en proinflamatorias y antiinflamatorias.

### 7.1. Citoquinas proinflamatorias

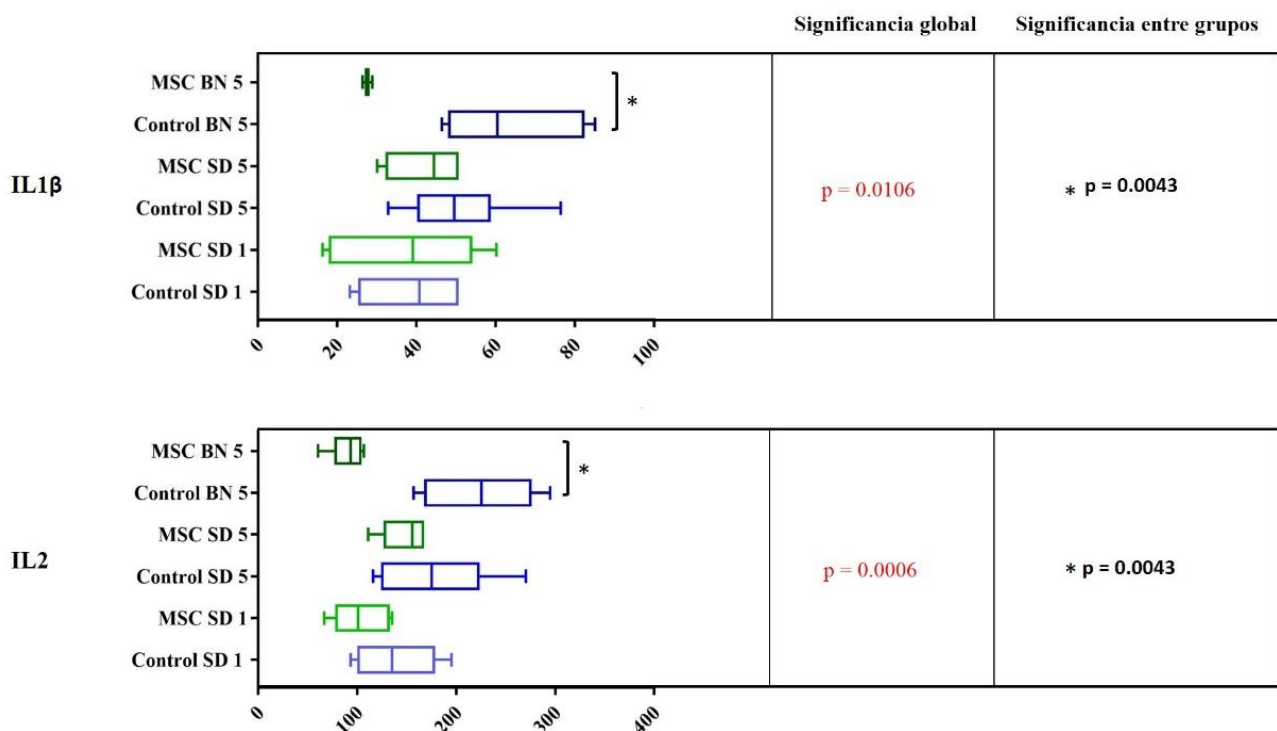
En general, todas ellas, pero especialmente IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, IL-17 y TNF- $\alpha$ , se mantienen en los mismos niveles o disminuyen cuando se emplea la terapia celular, especialmente en el día 5 en los trasplantes alogénicos (figura 23).

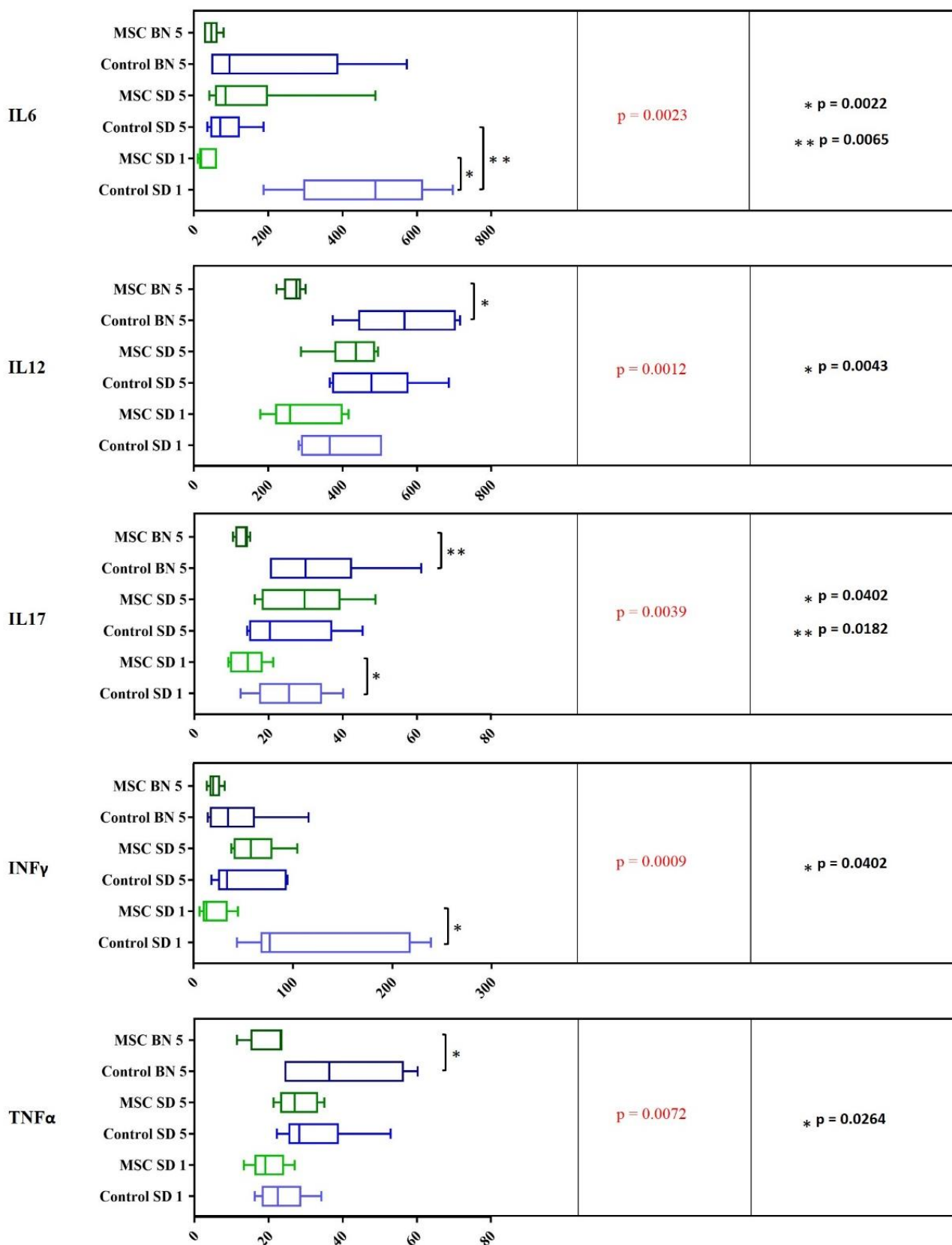
Tanto IL-1 $\beta$  como IL-2, IL-12 y TNF- $\alpha$  parece que muestran esa tendencia a disminuir en todos los grupos que tienen terapia celular, lo que podría indicar en cierto modo, una respuesta favorable al uso de células madre.

Por su parte, la IL-17 aparece aumentada en el día 1 sin tratamiento y en los trasplantes alogénicos sin tratamiento, y no así en los isogénicos a 5 días.

Cuando se compara el efecto que tiene usar dos cepas distintas, observamos que, a nivel sistémico, no hay diferencias significativas entre ambos grupos, pero sí una tendencia, existiendo una mayor producción de interleuquinas proinflamatorias cuando el trasplante es alogénico. Esto quiere decir que, en los trasplantes alogénicos, se parte de un estado en el que las citoquinas proinflamatorias están más elevadas y, al emplear las ASCs, esos niveles disminuyen considerablemente, no así en los trasplantes isogénicos, donde la disminución es menor o no se produce.

Además, tanto el INF- $\gamma$  como IL-6 se encuentran muy elevados en los no tratados del día 1 tras el trasplante isogénico y comparándolos con el día 5. La disminución de esas dos citoquinas junto con IL-17 al utilizar las ASCs es significativamente relevante.





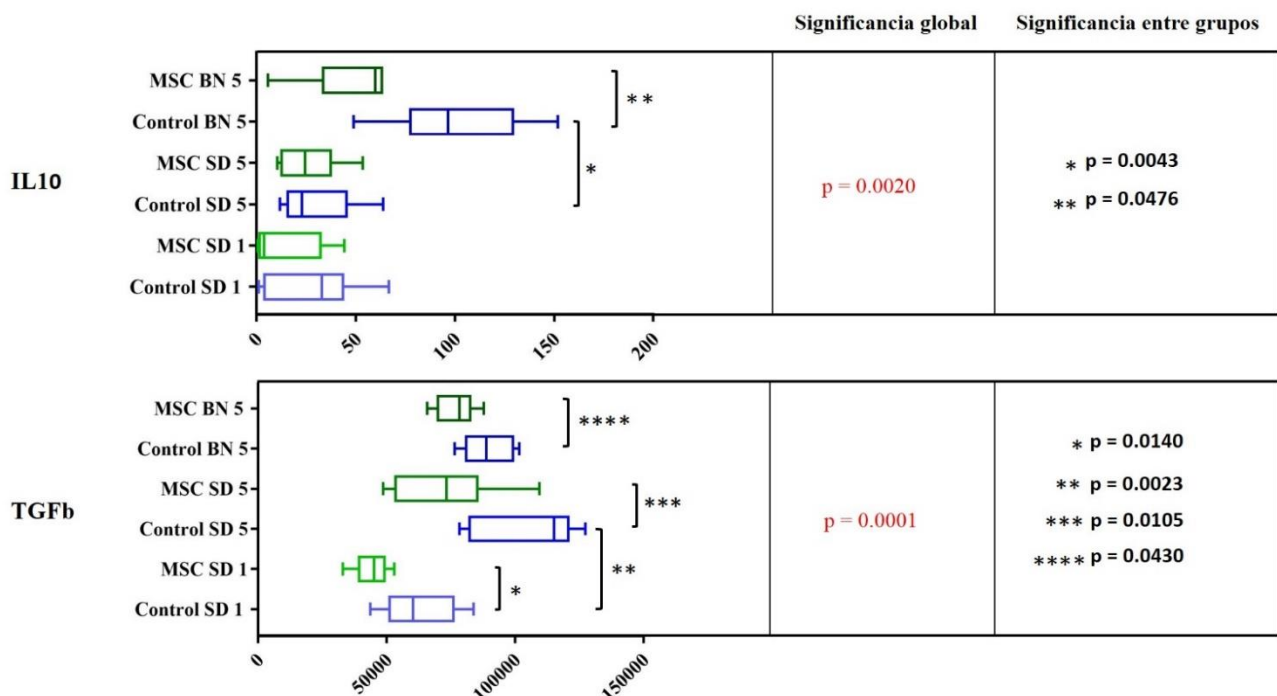
**Figura 23:** Distribución de las concentraciones plasmáticas de las citoquinas proinflamatorias entre los distintos grupos del estudio. El nivel de significancia global se estableció con el test Kruskal-Wallis, mientras que se utilizó el test U de Mann-Whitney para el análisis entre grupos. Los alores son expresados en pg/ml y se muestran en diagramas de cajas como mediana y rango intercuartílico.

## 7.2. Citoquinas antiinflamatorias

En cuanto a la interleuquina antiinflamatoria IL-10, también se aprecia una reducción de sus niveles en la mayoría de los casos de terapia celular y de manera significativa en los trasplantes alogénicos.

Por su parte, al evaluar el factor de crecimiento transformante TGF- $\beta$ , éste se encuentra disminuido considerablemente en todos los grupos cuando se utilizan ASCs. Su producción es mayor en el día 5 con respecto al día 1.

Por otro lado, IL-10 está aumentada en el grupo control de los trasplantes alogénicos con respecto al control en los isogénicos. Su producción está relacionada con los niveles de TNF- $\alpha$ , por lo que se encuentra aumentada en los grupos en los que ésta también presenta una mayor concentración.



**Figura 24:** Distribución de las concentraciones plasmáticas de las citoquinas antiinflamatorias entre los distintos grupos del estudio. El nivel de significancia global se estableció con el test Kruskal-Wallis, mientras que se utilizó el test U de Mann-Whitney para el análisis entre grupos. Los alores son expresados en pg/ml y se muestran en diagramas de cajas como mediana y rango intercuartílico.

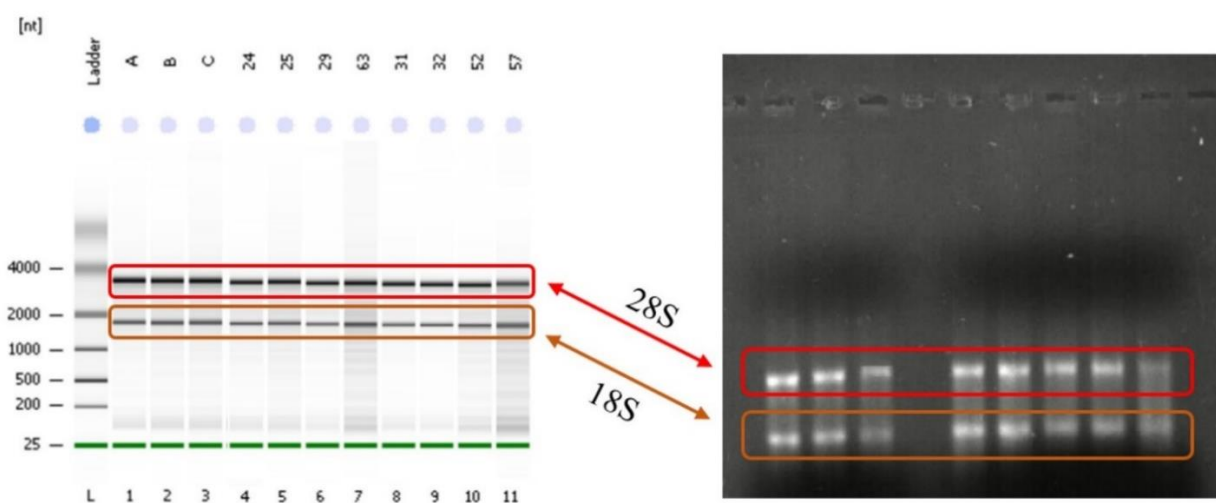
## 8. Determinación de citoquinas y quimioquinas en tejido pulmonar

Como en el caso del estudio de las citoquinas a nivel plasmático, las comparaciones se realizaron de la misma manera para observar las diferencias cuando se empleó la terapia celular y también para distinguir las diferencias entre los trasplantes isogénicos y alogénicos, así como entre el rechazo producido a las 24 horas tras la cirugía frente a los 5 días.

### 8.1. Valoración de la calidad del ARN extraído del tejido pulmonar y qPCR

Para la determinación de la expresión de ARN mensajero (ARNm) de las interleuquinas de interés a nivel del tejido pulmonar, primero se valoró la calidad e integridad del ARN total extraído de las muestras pulmonares.

Tras su cuantificación, se comprobó el grado de deterioro utilizando un gel de agarosa al 1% para estimar la intensidad de las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S ribosomales, siendo la 28S de mayor expresión, como se puede ver en la imagen inferior. El ratio perfecto 28S/18S es de 2. Para la secuenciación de ARN se comprobó también el estado de las muestras mediante electroforesis (figuras 25).



**Figura 25:** Valoración del grado de integridad del ARN de todas las muestras previo a la realización de qPCR y secuenciación. Visualización de las bandas 28S y 18S por electroforesis.

Una vez establecido el grado de pureza e integridad de las muestras totales de ARNm y su paso a ADN complementario, se puso a punto la técnica de la PCR cuantitativa, determinando las temperaturas de anillamiento, elongación y melting de los primers utilizados. Una vez realizado todo ello, se procedió a realizar las determinaciones.

Para poder comparar los distintos grupos de estudio entre sí, se comprobaron los coeficientes de variación intraplacas (variaciones en los triplicados) e interplacas, considerando que son aceptables para las comparaciones si estos son menores al 5%. Los valores obtenidos fueron de  $0.38 \pm 0.04\%$  en las réplicas dentro de la misma placa y de  $1.84 \pm 0.46\%$  como variación entre placas, tomando como referencia el gen endógeno S18.

### 8.2. Citoquinas proinflamatorias

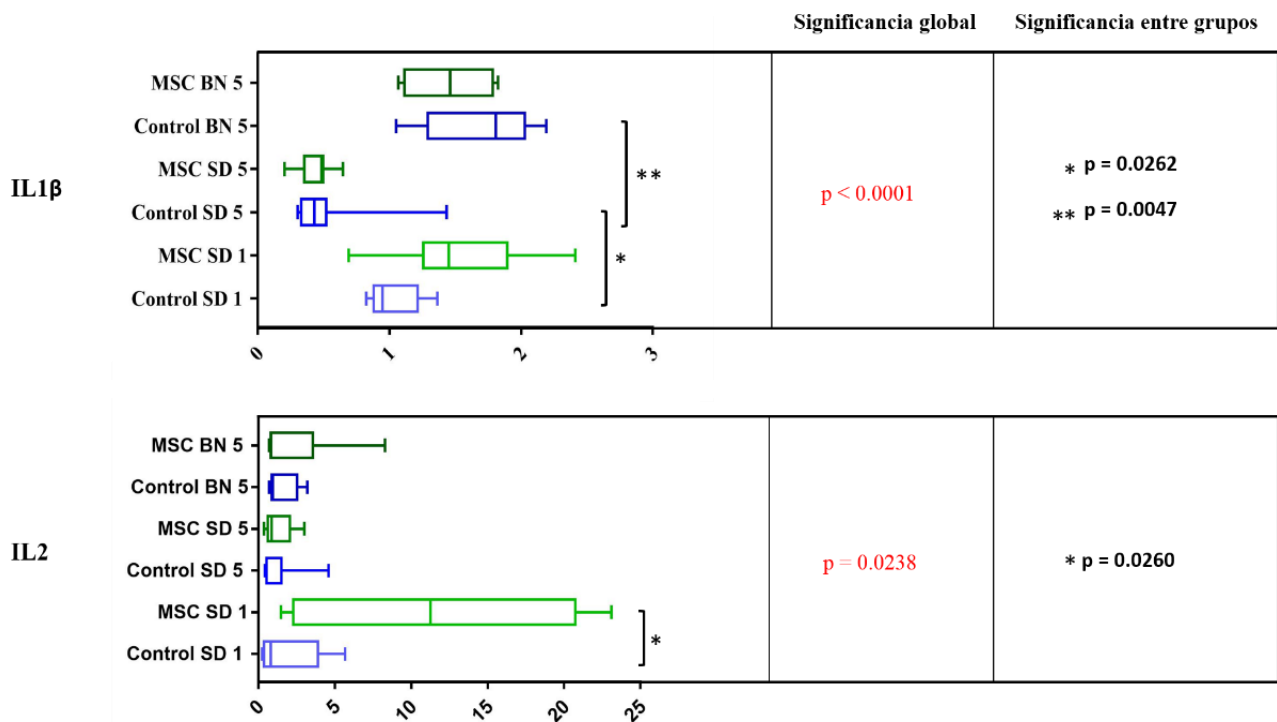
En este caso, no se observaron diferencias entre los grupos controles y aquellos con tratamiento celular, salvo en la IL-2 e IL-17, donde la producción fue mayor en los animales tratados con ASCs en el día 1. En el resto

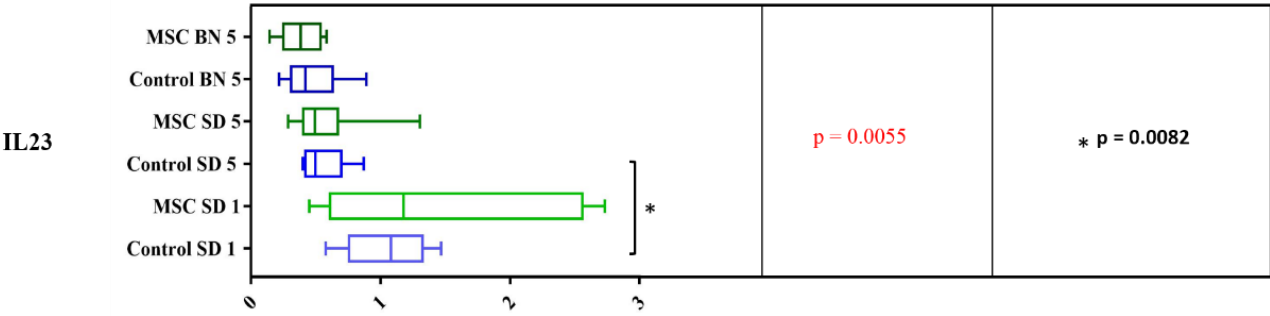
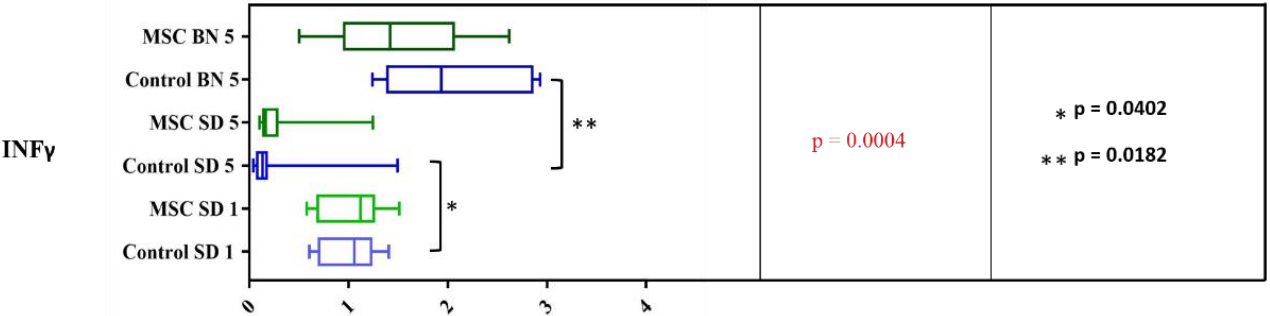
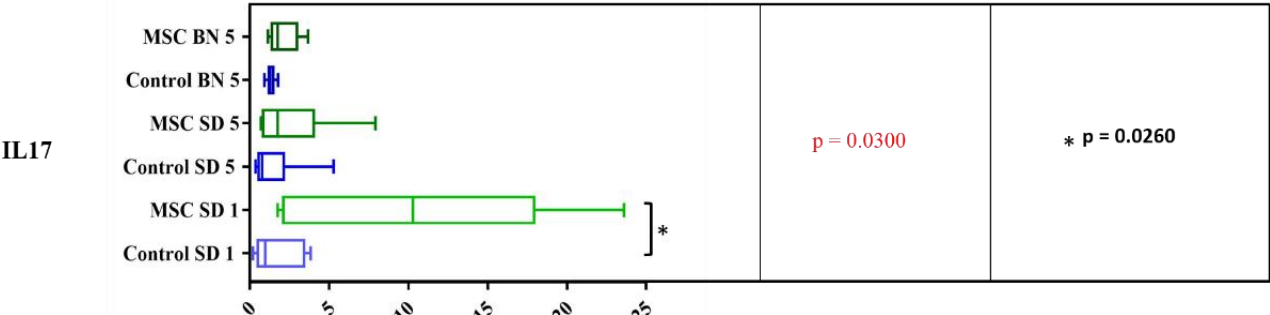
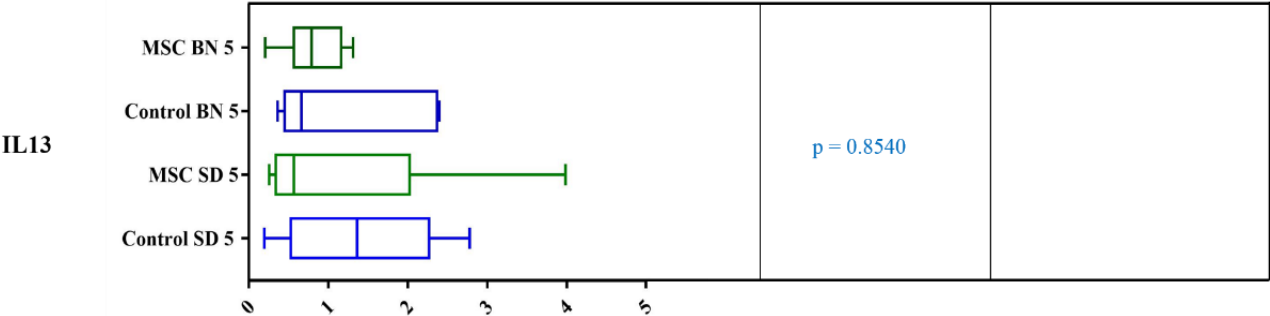
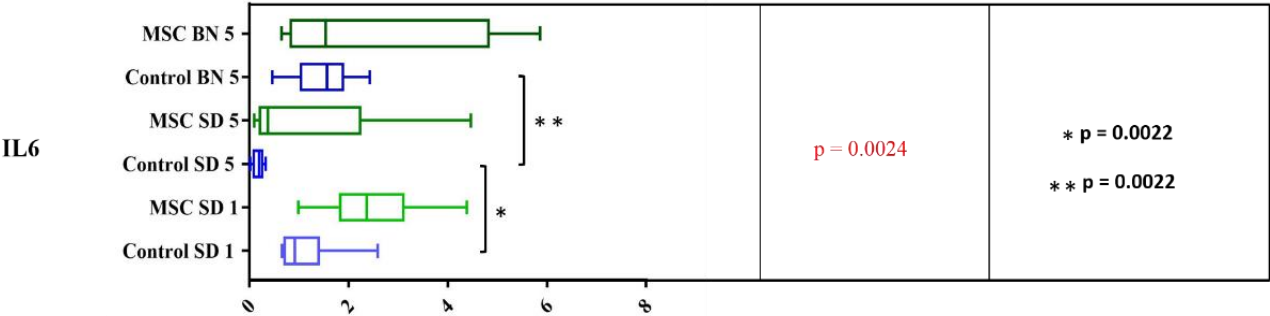
de las citoquinas, aunque no fuera estadísticamente significativo, podemos observar la misma tendencia, ya que todas aparecen aumentadas cuando se usa la terapia celular. Sin embargo, en las muestras recogidas a los cinco días, tanto en los animales tratados con respecto a sus correspondientes controles, los niveles se mantienen similares o ligeramente disminuidos, como ocurre con IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$  en los trasplantes alogénicos.

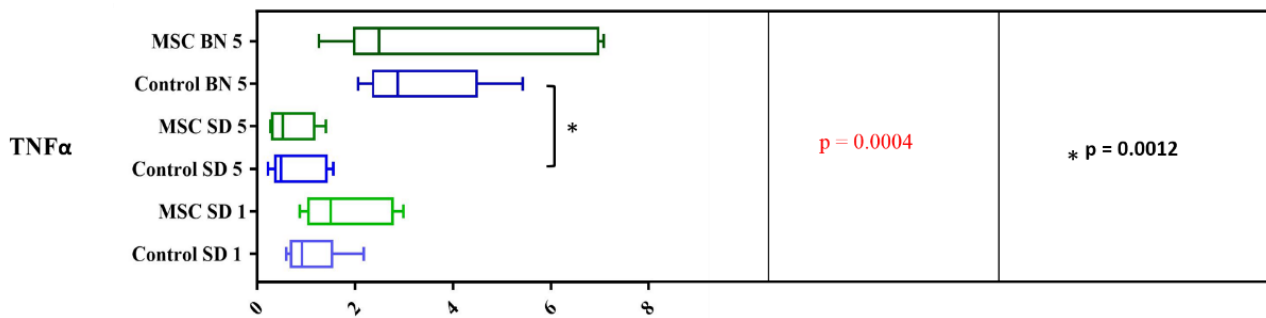
Sí hubo diferencias en cuanto a los trasplantes isogénicos frente a los alogénicos, de manera que el perfil proinflamatorio se muestra más marcado en los segundos, especialmente al observar un mayor nivel de expresión en las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , lo que indica la mayor inflamación al utilizar un donante distinto al receptor. Esto es similar a lo que ocurre a nivel de las citoquinas plasmáticas.

Por otra parte, a las 24 horas del trasplante, la producción de citoquinas inflamatorias fue más destacada tanto en los grupos tratados con células mesenquimales como en los controles en lo referente a IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-17, IL-23 e INF- $\gamma$  con respecto a los niveles en los trasplantes isogénicos a los 5 días.

Cabe destacar también que IL-13, que puede tener acciones proinflamatorias como antiinflamatorias y que contribuye a la remodelación y fibrosis pulmonar, apareció únicamente a los 5 días tras el trasplante y no así a las 24 horas, sin que hubiera diferencias en cuanto a la utilización del tratamiento celular ni entre trasplante isogénicos y alogénicos.







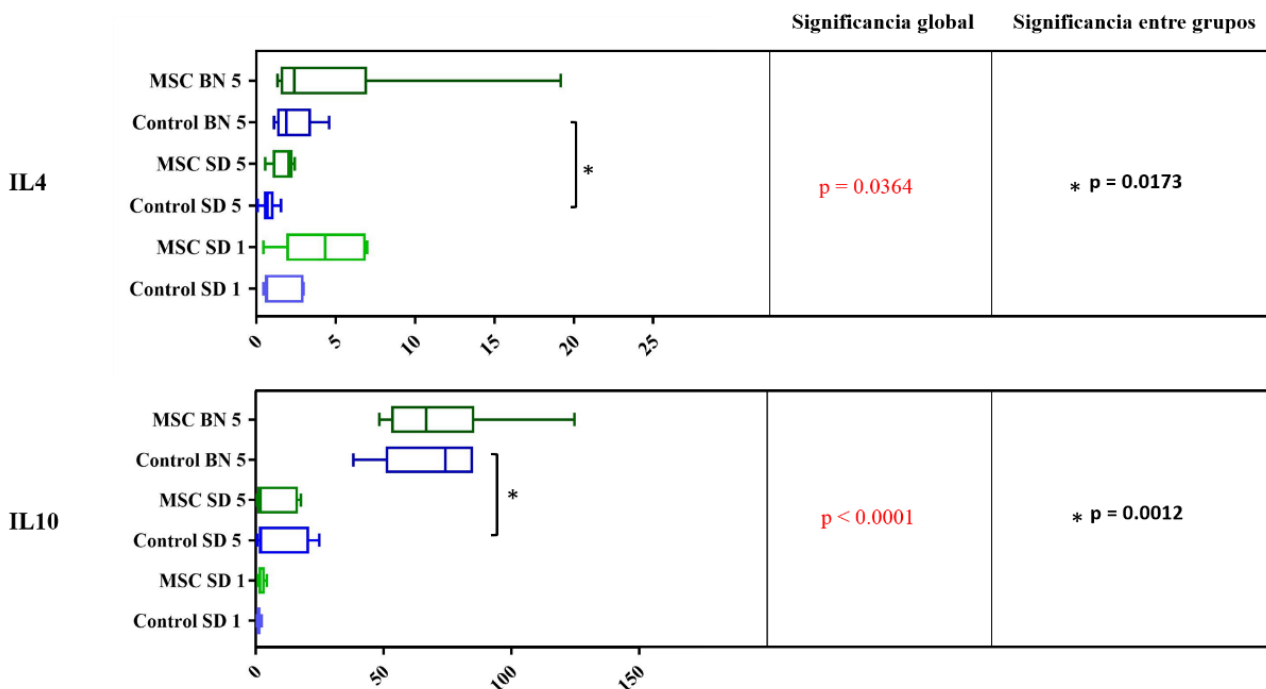
**Figura 26:** Expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias en muestras de tejido pulmonar normalizados al gen RNA S18. El valor de significancia global se estableció con el test Kruskal-Wallis, mientras que se utilizó el test U de Mann-Whitney para el análisis entre grupos. Valores relativos expresados con mediana y rango intercuartílico.

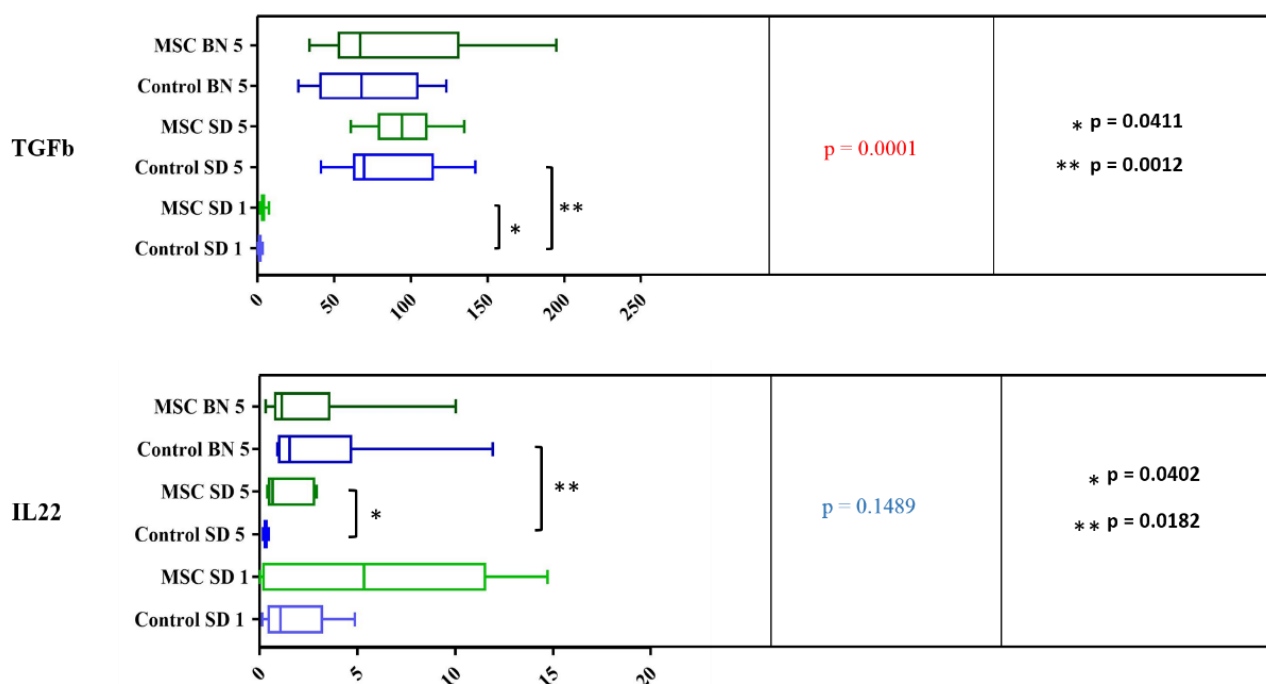
### 8.3. Citoquinas antiinflamatorias

En la evaluación de estas interleuquinas se observó que, independientemente del tratamiento, los niveles de expresión de todas ellas fueron similares salvo en IL-22, con una mayor producción al emplear ASCs en los trasplantes isogénicos.

Por otra parte, los niveles en el día 1 tanto de IL-10 como de TGF-β fueron mucho menores que con respecto al día 5, por lo que su producción fue más tardía.

Además, no hubo mayores diferencias en cuanto al resto de citoquinas salvo con IL-10, con mayor expresión en los trasplantes alogénicos frente a los isogénicos.

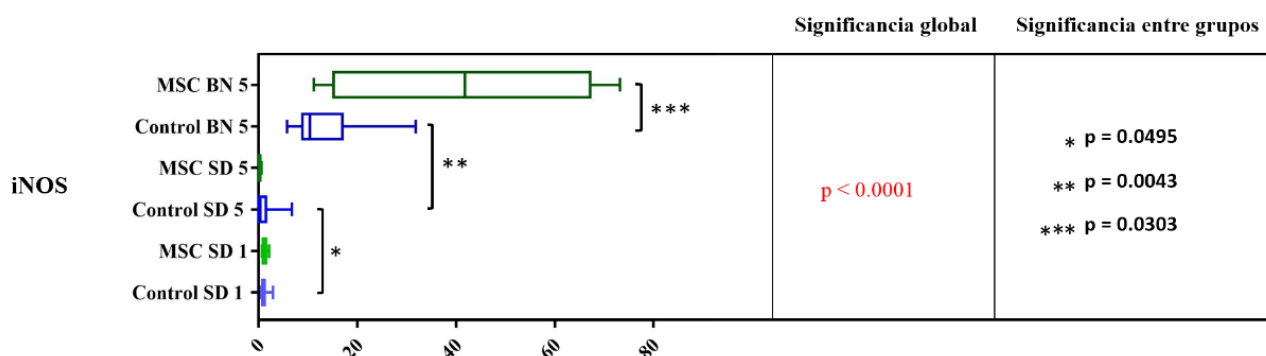




**Figura 27:** Expresión de ARNm de citoquinas antiinflamatorias en muestras de tejido pulmonar normalizados al gen RNA S18. El valor de significancia global se estableció con el test Kruskal-Wallis, mientras que se utilizó el test U de Mann-Whitney para el análisis entre grupos. Valores relativos expresados con mediana y rango intercuartílico.

#### 8.4. Óxido nítrico sintetasa inducible

La óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), que parece tener un papel importante en la inmunosupresión mediada por las ASCs, se encontró más elevada en los grupos con terapia celular de los trasplantes alogénicos. Además, comparando los grupos controles isogénicos frente a los alogénicos, la producción fue mayor en los segundos, y en el tiempo, parece que esta producción es más tardía (controles a 1 día frente a 5 días).



**Figura 28:** Expresión de ARNm de iNOS en muestras de tejido pulmonar normalizados al gen RNA S18. El valor de significancia global se estableció con el test Kruskal-Wallis, mientras que se utilizó el test U de Mann-Whitney para el análisis entre grupos. Valores relativos expresados con mediana y rango intercuartílico.

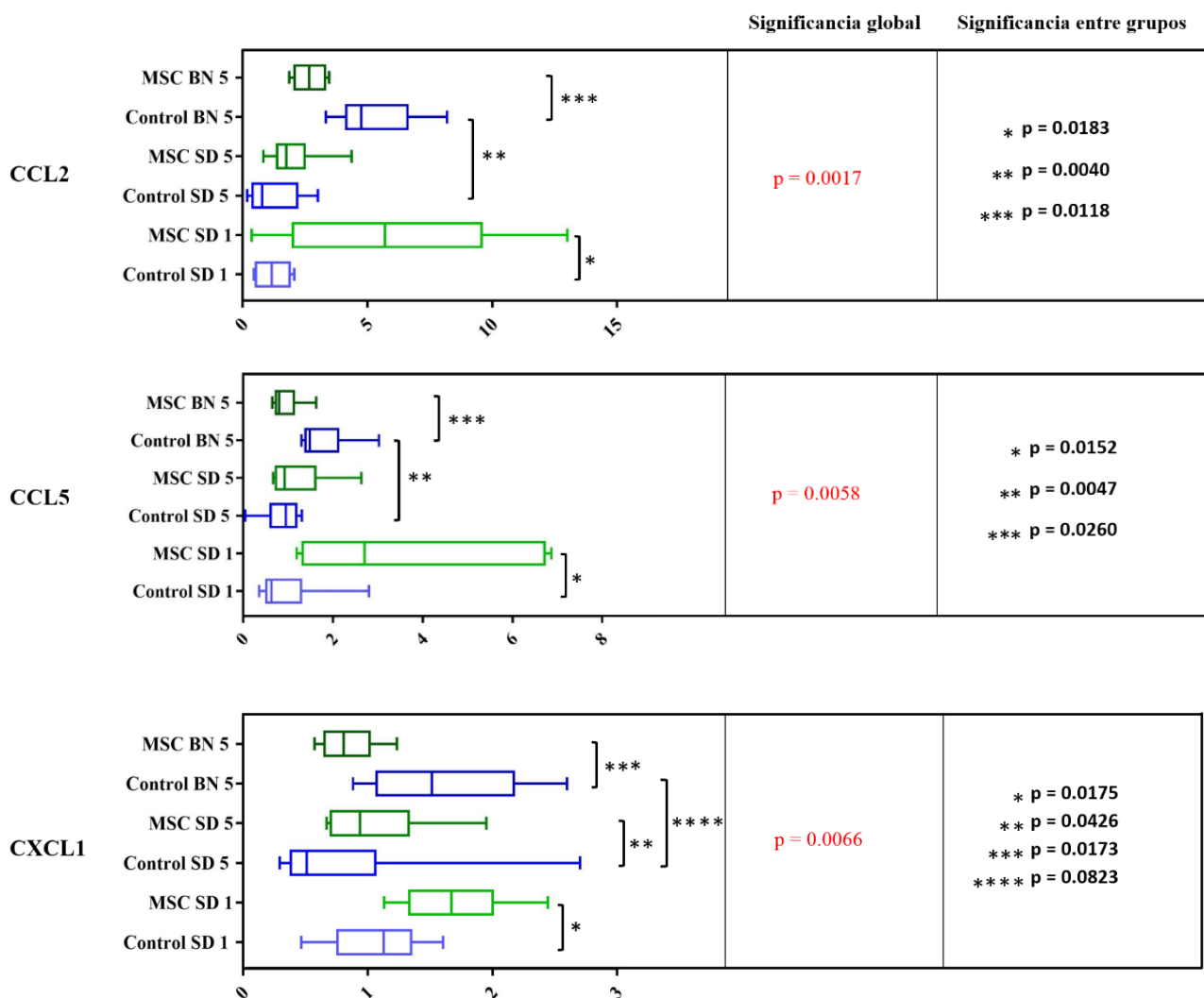
### 8.5. Quimioquinas

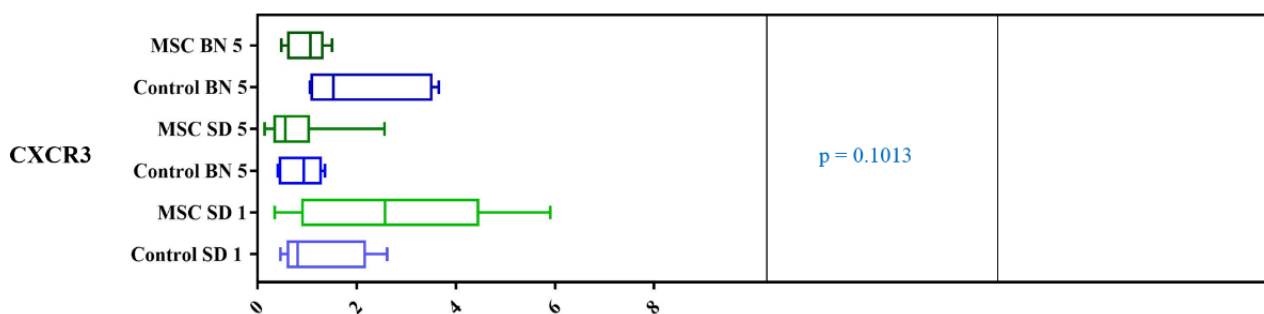
El nivel de expresión fue mayor al utilizar tratamiento celular a las 24 horas del trasplante en comparación con el grupo control, tanto de CCL2 (MCP1) como de CCL5 (RANTES).

Al comparar los grupos de los cinco días postrasplante y, concordando con los estudios histológicos e inmunohistoquímicos, la expresión es más abundante en los trasplantes alogénicos, con la atracción de macrófagos, monocitos y linfocitos T.

En cuanto a la familia de las CXC, la CXCL1 (Gro- $\alpha$ ), se comportó de manera similar a las anteriores, siendo la expresión mayor en los trasplante isogénicos con terapia celular frente a sus controles pero menor en el grupo de trasplantes alogénicos con tratamiento, donde se produjo una disminución destacada en su expresión.

Finalmente, en el receptor CXCR3, aunque sin haber una diferencia estadísticamente significativa, su expresión es mayor a las 24 horas en el grupo con ASCs frente a su correspondiente control. En el resto de grupos, las ASCs disminuyeron su expresión frente a sus controles. Como en los casos anteriores, los niveles en los trasplantes alogénicos fueron mayores que en los isogénicos.

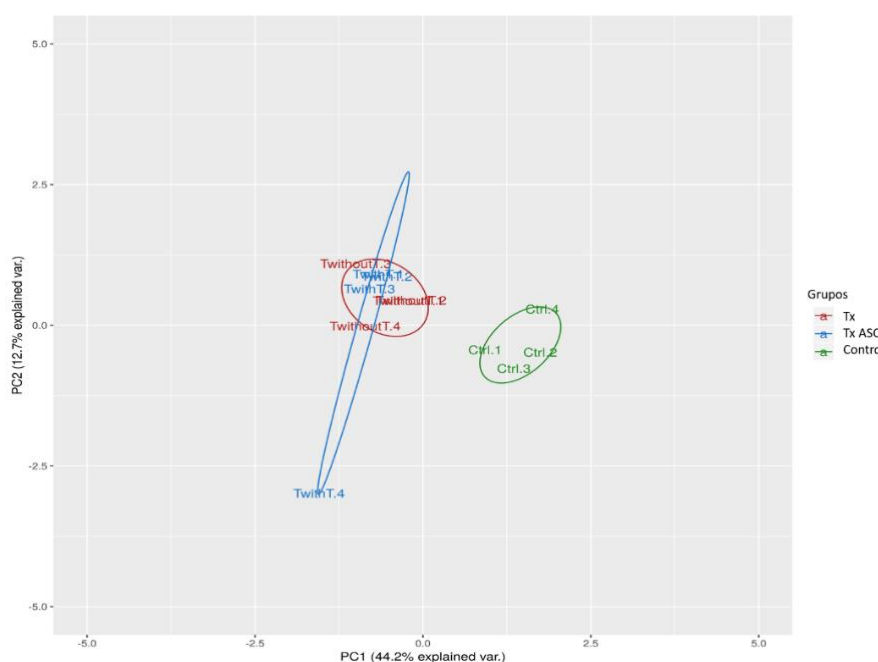




**Figura 29:** Expresión de ARNm de citoquinas quimiotácticas de las familias CC y CXC, así como receptores de quimioquinas en muestras de tejido pulmonar normalizados al gen RNA S18. El valor de significancia global se estableció con el test Kruskal-Wallis, mientras que se utilizó el test U de Mann-Whitney para el análisis entre grupos. Valores relativos expresados con mediana y rango intercuartílico.

## 9. Secuenciación de microARNs en muestras de pulmón

Una vez realizada la secuenciación de los microARNs de cada una de las muestras, se comparó su grado de dispersión. Tanto los resultados numéricos como la representación de la variabilidad mediante un gráfico de análisis de componentes principales (ACP) apuntan a que las muestras de los grupos **Tx** (trasplante sin terapia) y **Tx-ASC** (trasplante con ASCs como tratamiento) no presentan grandes diferencias en términos de expresión diferencial de microARNs. Sin embargo, las muestras del grupo **Tx-ASC** presentaron una mayor dispersión y vemos como el tratamiento, en este caso, no causa el mismo tipo de respuesta en todas las muestras (figura 30).



**Figura 30:** Análisis de componentes principales basado en las cuentas normalizadas de los diferentes genes obtenidas mediante el método “trimmed mean of M-values” (TMM).

**Tabla 8:** Variación de la expresión de microARNs respecto al animal sano normal en ratas sometidas a trasplante pulmonar con y sin terapia celular con ASCs.

UP	Control vs Tx	Control vs Tx-ASC	DOWN	Control vs Tx	Control vs Tx-ASC
	p valor	p valor		p valor	p valor
<b>miR-466f-1</b>	p<0,00001	p<0,00001	<b>miR-551b</b>	p<0,00001	p<0,00001
<b>miR-298</b>	p<0,00001	p<0,00001	<b>miR-297</b>	p<0,0001	p<0,00001
<b>miR-466i</b>	p<0,0001	p<0,001	<b>miR-135a-1</b>	p<0,01	p<0,0001
<b>miR-297c</b>	p<0,00001	p<0,01	<b>miR-135a-2</b>	p<0,05	p<0,01
<b>miR-762</b>	p<0,00001	p<0,00001	<b>miR-547</b>	p<0,00001	p<0,00001
<b>miR-466c</b>	p<0,00001	p<0,00001	<b>miR-217</b>	p<0,00001	p<0,00001
<b>miR-20b</b>	p<0,00001	p<0,00001	<b>miR-676</b>	p<0,00001	p<0,00001
<b>miR-466b-1</b>	p<0,00001	p<0,00001	<b>miR-201</b>	p<0,00001	p<0,00001
<b>miR-212</b>	p<0,00001	p<0,00001	<b>miR-592</b>	p<0,0001	p<0,0001
<b>miR-466b-2</b>	p<0,00001	p<0,00001	<b>miR-375</b>	p<0,00001	p<0,00001
<b>miR-363</b>	p<0,00001	p<0,00001	<b>miR-133c</b>	p<0,00001	p<0,00001
<b>miR-466b-3</b>	p<0,00001	p<0,00001	<b>miR-133a-2</b>	p<0,01	p<0,00001
<b>miR-466i</b>	p<0,0001		<b>miR-136</b>	p<0,0001	p<0,00001
<b>miR-669f</b>	p<0,00001		<b>miR-3571</b>	p<0,001	p<0,00001
<b>miR-1194</b>	p<0,05		<b>miR-218b</b>	p<0,00001	p<0,00001
<b>miR-692-3</b>	p<0,05		<b>miR-216a</b>	p<0,00001	
<b>miR-466i</b>	p<0,05		<b>miR-154</b>	p<0,01	
<b>miR-8485</b>	p<0,01		<b>miR-741</b>		p<0,05
<b>miR-466d</b>	p<0,05		<b>miR-3592</b>		p<0,05
<b>miR-6363</b>		p<0,05	<b>miR-30c-2</b>		p<0,00001
<b>miR-135b</b>		p<0,05	<b>miR-126a</b>		p<0,00001
<b>miR-692-3</b>		p<0,05	<b>miR-125a</b>		p<0,00001
<b>miR-1949</b>		p<0,05	<b>miR-322</b>		p<0,00001
<b>miR-8485</b>		p<0,01	<b>miR-30e</b>		p<0,00001
<b>miR-669f</b>		p<0,00001	<b>miR-127</b>		p<0,05
<b>miR-297a-3</b>		p<0,00001	<b>miR-181a-2</b>		p<0,00001
			<b>miR-184</b>		p<0,00001
			<b>miR-450b-1</b>		p<0,00001
			<b>miR-3588</b>		p<0,00001
			<b>miR-322-1</b>		p<0,00001
			<b>miR-3543-1</b>		p<0,01
			<b>miR-450a-1</b>		p<0,00001

Mediante el Software EdgeR, se determinaron los microARNs desregulados al comparar los grupos trasplantados con el control. De este modo, en el trasplante sin tratamiento (grupo Tx), se observaron 210 microARNs alterados, habiendo 115 sobreexpresados (up-regulated) y 95 infraexpresados (down-regulated). Por su parte, en el grupo de trasplantes con tratamiento celular (Tx-ASC) encontramos 287 microARNs alterados, siempre en relación con el grupo control. De ellos, 115 estuvieron sobreexpresados y 112 infraexpresados. Al comparar los dos grupos trasplantados, únicamente encontramos un microARN alterado, miR-741, con menor expresión en el grupo con terapia celular.

En nuestro trabajo hemos querido valorar, del total de microARNs alterados, aquellos cuya expresión o falta de la misma ha sido muy marcada, por lo que hemos elegido los que están desregulados hasta cuatro veces más o cuatro veces menos en comparación con grupo control de animales sanos (tabla 8). Podemos observar que hay muchos comunes tanto en el trasplante sin terapia celular como con ella. Otros, sin embargo, aunque se encuentran dentro de los desregulados, se han expresado de distinta manera en dichos grupos. Cada uno de los microARNs alterados actúan sobre distintas dianas de genes e intervienen en varias vías de señalización, según la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). A continuación, destacamos las más importantes a nivel del trasplante pulmonar (tabla 9).

**Tabla 9:** Vías de señalización de todos los microARN desregulados en nuestro modelo, tanto sobreexpresados como infraexpresados.

Vías de señalización (KEGG pathway)	microARNs alterados
<b>Biosíntesis de N-glicano</b>	miR-466d, miR-144, miR-206, miR-126b, miR-20b, miR-592, miR-3571, miR-3588, miR-466c, miR-466b, miR-133c, miR-216a, miR-125a, miR-30c, miR-363, miR-154
<b>MAPK (proteína quinasas activadas por mitógenos)</b>	miR-206, , miR-30c, miR-466c, miR-466b, miR-144, miR-3571, miR-181a-2, miR-193b, miR-136, miR-212, miR-375, miR-125a, miR-363, miR-164, miR-216a, miR-322, miR-3588, miR-547, miR-466b, , miR-466d, miR-133c, miR-485, miR-297, miR-20b, miR-126b, miR-376, miR-1949, miR-217, miR-3592, miR-466c, miR-201, miR-450b, miR-3543, miR-218b, miR-741, miR-450a, 101a, miR-297c, miR-297a, miR-669f, miR-692, miR-466i, miR-1194, miR-133a, miR-135a-1
<b>Uniones adherentes</b>	miR-669f, miR-133a, miR-297c, miR-297a, miR-466i, miR-135a, miR-692
<b>Wnt</b>	miR-466d, miR-592, miR-212, miR-322, miR-466c, miR-466b, miR-125a, miR-375, miR-144, miR-363, miR-154, miR-216a, miR-3571, miR-485, miR-466b, miR-3543, miR-547, miR-126b, miR-741, miR-206, miR-30c, miR-181a, miR-3588, miR-218b, miR-201, miR-669f, miR-466i, miR-297c, miR-297a, miR-1194, miR-133a, miR-692, miR-135a-1

<b>FoxO (proteínas FoxO)</b>	miR-466b, miR-3571, miR-193b, miR-212, miR-20b, miR-144, miR-466b, miR-466d, miR-592, miR-216a, miR-375, miR-125a, miR-363, miR-154, miR-297, miR-450a, miR-547, miR-206, miR-136, miR-217, miR-3592, miR-466c, miR-133a, miR-466i, miR-297c, miR-297a, miR-669f, miR-135a, miR-692
<b>Invasión bacteriana de células epiteliales</b>	miR-133a, miR-297c, miR-669f, miR-297a, miR-692, miR-466i, miR-6363, miR-101a
<b>Procesamiento endoplasmático en el retículo de proteínas</b>	miR-466c, miR-466d, miR-466b, miR-450b, miR-144, miR-212, miR-201, miR-3571, miR-181a-2, miR-363, miR-23s, miR-298, miR-126b, miR-3588, miR-217, miR-322, miR-741, miR-206, miR-216a, miR-547, miR-592, miR-426b, miR-154, miR-125a, miR-331, miR-466c, miR-3543, miR-375
<b>TGF-beta</b>	miR-212, miR-3571, miR-363, miR-466b, miR-154, miR-592, miR-466b, miR-322, miR-466d, miR-144, miR-216a, miR-3592, miR-466c, miR-126b, miR-3588, miR-485, miR-193b, miR-136, miR-298, miR-30c, miR-135a-2, miR-297c, miR-669f, miR-297a, miR-133a, miR-692, miR-466i, miR-6363, miR-466f, miR-153a-1
<b>Hippo (apoptosis y desarrollo celular)</b>	miR-363, miR-466b, miR-154, miR-126b, miR-322, miR-466b, miR-741, miR-144, miR-193b, miR-136, miR-3571, miR-30c, miR-466d, miR-216a, miR-375, miR-218b, miR-466c, miR-206, miR-3543, miR-3588, miR-125a, miR-485, miR-450a, miR-297, miR-20b, miR-212, miR-297c, miR-669f, miR-297a, miR-466i, miR-133a, miR-1194, miR-6363, miR-692, miR-466f
<b>Regulación del citoesqueleto de actina</b>	miR-297c, miR-669f, miR-297a, miR-133a, miR-692, miR-466i, miR-135a, miR-6363, miR-1194
<b>mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero)</b>	miR-297c, miR-669f, miR-297a, miR-1194, miR-466i, miR-133a, miR-135a, miR-135a
<b>Proteólisis mediada por ubiquitina</b>	miR-52, miR-206, miR-3571, miR-201, miR-466d, miR-3588, miR-375, miR-466c, miR-297, miR-450a, miR-126b, miR-218b, miR-144, miR-212, miR-485, miR-154, miR-1949, miR-466c, miR-466b, miR-547, miR-216, miR-466b, miR-3592, miR-592, miR-363, miR-125a, miR-323, miR-3543, miR-298, miR-741
<b>Adhesión focal</b>	miR-30c, miR-466d, miR-297, miR-217, miR-216a, miR-212, miR-3592, miR-125a, miR-450b, miR-3571, miR-332, miR-193b, miR-206, miR-144, miR-485, miR-363, miR-466c, miR-466b, miR-547, miR-218b, miR-592, miR-298, miR-3543, miR-133c, miR-466b, miR-154, miR-201, miR-20b, miR-3588, miR-375, miR-692, miR-669f, miR-133a, miR-297c, miR-297a, miR-466i, miR-135a-1, miR-1194, miR-6363

<b>Ciclo celular</b>	miR-466d, miR-363, miR-3571, miR-322, miR-133c, miR-206, miR-466c, miR-466b, miR-466b-2, miR-592, miR-182, miR-193b, miR-136, miR-3588, miR-144, miR-741, miR-297, miR-201, miR-20b, miR-126b, miR-154, miR-216a, miR-212,
<b>Regulación de la pluripotencia de las células madre</b>	miR-466d, miR-216a, miR-363, miR-125a, miR-375, miR-466c, miR-466b, miR-322, miR-144, miR-3571, miR-126b, miR-3588, miR-212, miR-466b, miR-197, miR-206, miR-331, miR-20b, miR-547, miR-592, miR-298, miR-201, miR-692, miR-297c, miR-297a, miR-669f, miR-133a, miR-466i, miR-6363, ,
<b>Hedgehog</b>	miR-466i, miR-133a, miR-669f, miR-297c, miR-297a, miR-135a-2, miR-6363, miR-30e
<b>Fagocitosis mediada por el receptor Fc gamma</b>	miR-466i, miR-133a, miR-297c, miR-297a, miR-669f, miR-135a-1, miR-692, miR-135a-2, miR-6363, miR-30e
<b>GnRH (hormona liberadora de gonadotropina)</b>	miR-669f, miR-133a, miR-297c, miR-297a, miR-135a, miR-466i, miR-692
<b>Uniones Gap</b>	miR-466d, miR-547, miR-363, miR-466c, miR-466b, miR-466b-2, miR-216a, miR-3571, miR-322, miR-154, miR-173b, miR-206, , miR-144, miR-676, miR-20b, miR-212, miR-201, miR-3592, miR-218b, miR-466i, miR-297c, miR-669f, miR-297a, miR-135a-1, 101a, miR-133a, miR-692
<b>Reabsorción de agua mediada por vasopresina</b>	miR-216a, miR-3571, miR-322, miR-466d, miR-20b, miR-144, miR-201, miR-297, miR-466b, miR-363, miR-466c, miR-466b-2, miR-133, miR-741, miR-550b, miR-550a
<b>Proteína tumoral p53</b>	miR-154, miR-466b, miR-466d, miR-450b, miR-144, miR-3571, miR-125a, miR-217, miR-206, miR-547, miR-592, miR-30c, miR-216a, miR-717, miR-375, miR-126b
<b>Metabolismo del inositol fosfato</b>	miR-466b-2, miR-217, miR-592, miR-3571, miR-3592, miR-298, miR-466d, miR-216a, miR-206, miR-466c, miR-741, miR-126b, miR-150a, miR-363, miR-154, miR-144



# **Discusión**

---



## 1. Efecto de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo sobre el trasplante pulmonar

El trasplante pulmonar es uno de los que peor pronóstico tiene en cuanto a supervivencia y funcionamiento del injerto, tanto a corto como a largo plazo. Es por ello por lo que resulta muy importante estudiar la inmunología que le afecta a fin de crear nuevas terapias alternativas a las actuales o que las complementen.

Hasta el momento, las terapias disponibles se basan en el uso de inmunosupresores, con sus consecuentes efectos adversos, y tampoco logran que, en el 50% de los casos trasplantados, la vida media del injerto supere los 5 años. Por dicho motivo, actualmente se están realizando numerosos estudios sobre terapias alternativas en los trasplantes de órganos sólidos. En nuestro caso, hemos elegido un modelo utilizando la rata como animal de estudio, para valorar el efecto que presentan las ASCs en el rechazo agudo tras el trasplante, el cual, se ha demostrado, constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo del rechazo crónico del injerto pulmonar<sup>225</sup>.

Los dos modelos fundamentales en experimentación animal del trasplante de pulmón son la rata y el ratón que, aunque similares, presentan distintas características. En nuestro caso, hemos optado por la rata debido a que, aun resultando quirúrgicamente muy demandante, es ligeramente más asequible en cuanto a la técnica, aunque siempre es necesaria una curva de aprendizaje para la puesta a punto. Una de las grandes ventajas de los modelos en ratones es la gran variabilidad genética que muestran, pese al coste tan elevado. En nuestro caso, el modelo en la rata se ajustaba perfectamente a lo que se pretendía estudiar. Además, seleccionamos las cepas tanto de los animales donantes como de los receptores para conseguir dos tipos de rechazo: uno más potente y claro, utilizando dos cepas alogénicas o no consanguíneas, siendo el donante de la cepa BN y el receptor de la cepa SD. Por otro lado, se buscó un rechazo más leve al realizar un trasplante isogénico con cepas consanguíneas, en este caso la SD tanto en donantes como en receptores. De este modo, estudiamos el efecto de las células madre en un ambiente que se supone muy proinflamatorio (trasplantes alogénicos) frente a otro menos proinflamatorio (trasplantes isogénicos) y observamos su distinto comportamiento. Aunque hablamos de isogénicos cuando el donante y el receptor son de la cepa SD, lo cierto es que estos animales no se comportan como los ratones de cepas consanguíneas, que son genéticamente idénticos y en los que no habría rechazo. Con estas cepas de ratas hay variabilidad individual en mayor o menor medida, lo que determina que en todos los casos exista un cierto grado de rechazo.

En lo referente a la técnica quirúrgica, no ha presentado grandes diferencias con los protocolos descritos por otros autores, ya que se trata de un modelo contrastado y validado. Si bien, es cierto que se realizaron modificaciones en la parte anestésica que no aparecen reflejadas en otros artículos, al utilizar el sevofluorano como anestésico inhalatorio durante toda la cirugía del receptor e incluir analgesia local en las zonas de toracotomía. Como podemos observar al comparar nuestros resultados con los reflejados en la tabla 1, tanto la supervivencia de los animales trasplantados como el tiempo de cirugía, una vez superada la curva de aprendizaje, resulta similar a lo descrito en otros estudios.

Siguiendo los protocolos de supervisión, se valoró la gravedad acumulada de cada animal. No se encontraron diferencias en los distintos grupos y todos los animales incluidos en el estudio mostraron un buen aspecto general sin problemas respiratorios. El peso de los animales disminuyó durante todos esos días, pero sin llegar al 20% que consideramos criterio de punto final. Dado que únicamente se valoraron hasta 5 días postcirugía, no pudimos observar una recuperación del peso perdido.

### **Empleo de terapia celular**

En la actualidad, se están realizando multitud de ensayos clínicos en los que se utiliza la terapia celular debido a sus efectos inmunomoduladores y regenerativos, así como por la ausencia de toxicidad que se le supone. Además, su obtención, cultivo en laboratorios y preservación resulten relativamente sencillos<sup>142,226</sup>. Por otra parte, al ser en cierto modo inmunoprivilegiadas, estas células podrían presentar un papel destacado en todos los trastornos relacionados con los trasplantes, como el rechazo agudo, crónico y las lesiones por isquemia-reperfusión<sup>145,146</sup>.

Estos hechos, unido a que las terapias actuales basadas en inmunosupresores no han conseguido tener los efectos deseados en el TP nos llevaron a elegir la terapia celular basada en ASCs como objetivo de nuestro estudio. Existen trabajos que evidencian el efecto beneficioso de estas terapias, aunque en otro tipo de trasplantes<sup>227-229</sup>.

### **Efecto de las ASCs en nuestro modelo**

A nivel macroscópico, no se observaron diferencias en el grado de rechazo en función del tiempo, el grupo de tratamiento ni por las cepas utilizadas.

Histológicamente, todos los individuos, tanto los tratados con terapia celular como los animales control, mostraron un grado de rechazo de moderado a grave a nivel vascular y moderado a nivel bronquial, sin presentar diferencias entre los grupos observados. Por lo tanto, podríamos afirmar que, a nivel histológico, la terapia celular no ha provocado un efecto en la reducción del grado de rechazo a corto plazo ni en el número de células inmunes reclutadas. Watanabe y cols., en un modelo similar al nuestro en el que inyectaban las ASCs a través de la vena yugular externa tras el trasplante pulmonar en ratas, obtuvieron los mismos resultados, mostrando los animales tratados un rechazo grave. Únicamente, en aquellos grupos en los que se combinaban las ASCs con inmunosupresores, en este caso Tacrólimus, se consiguió un efecto en la reducción del infiltrado linfocitario inflamatorio y, por consiguiente, del rechazo<sup>230</sup>.

A nivel celular, las ASCs tampoco han mostrado una ventaja a la hora de reclutar macrófagos M2, mientras que, en el caso de los M1, han incrementado su número en los trasplantes alogénicos, no así en los isogénicos. Tampoco se mostraron eficaces a la hora de inhibir la proliferación de los linfocitos T CD8+. Aunque la capacidad de regulación de dichos linfocitos se ha demostrado en condiciones in vitro, hay estudios en los que se refleja no sólo que no son capaces de disminuir su número sino que existe una falta de efectos

inmunosupresores de las células como, por ejemplo, en un modelo de enfermedad injerto contra huésped en ratón utilizando MSCs de médula ósea<sup>231</sup>. En otro modelo, con el mismo tipo de células que en el caso anterior pero derivadas del donante (en nuestro caso proceden del receptor), las MSCs indujeron una respuesta de linfocitos T estimulando el rechazo del injerto trasplantado<sup>232</sup>.

Esto puede deberse a que, en condiciones de mayor inflamación, con mayor producción de INF- $\gamma$  (trasplantes alogénicos, con mayor diferencia en el CMH, o a las 24 horas postrasplante), puede aumentar la expresión de CMH tipo II de las ASCs<sup>233</sup> que podrían ser reconocidas por el sistema inmune del receptor, de manera que no son capaces de desarrollar sus funciones inmunomoduladoras. Por otra parte, bajo estas condiciones inflamatorias, las ASCs podrían actuar como células presentadoras de antígeno profesionales favoreciendo así la secreción de factores inflamatorios<sup>170</sup>, no siendo tan inmunoprivilegiadas como se esperaba.

### **Contaje de células y relación con citoquinas**

Cabe recordar que los macrófagos activados clásicamente (M1) inducidos por IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  muestran un fenotipo tipo Th1, son efectores proinflamatorios y tienen funciones bactericidas, mientras que los macrófagos activados alternativamente (M2), que corresponden por lo menos a tres fenotipos diferentes solapados (M2a, b, c), exhiben un fenotipo tipo Th2 y están involucrados en la resolución de la inflamación y la curación del tejido. En nuestro caso, en los grupos tratados frente a los no tratados no hubo diferencias significativas en los M2 pero sí en los M1.

La polarización de los monocitos a M2 parece deberse a una exposición a mayores niveles de IL-4, IL-13, IL-10 y TGF- $\beta$ <sup>234,235</sup>. Esto explicaría por qué no hay diferencias, ya que los niveles de dichas citoquinas a nivel pulmonar son similares tanto en los trasplantes isogénicos como en los alogénicos, salvo en el caso de la IL-10, más elevada en los grupos alogénicos. Esta citoquina, producida también por los monocitos, podría estar relacionada con el aumento de células M1 en dichos trasplantes.

Los macrófagos M1 se encuentran aumentados en los trasplantes alogénicos, especialmente en los tratados con ASCs. Este hecho concuerda con la producción de quimioquinas como CXCL1, CXCL2 o CCL5 (RANTES) entre otras y se podría correlacionar también con un mayor consumo de estas citoquinas al atraer a neutrófilos y linfocitos T CD8+, cuyo número resulta superior en los trasplantes alogénicos con ASCs.

Por otra parte, CCL2, que puede ser secretado por las MSCs<sup>174</sup> atrae especialmente a los monocitos y macrófagos pero también a linfocitos T de memoria. En nuestro caso, su detección a nivel pulmonar sigue una distribución inversa al número de macrófagos encontrados, lo que podría indicar que las MSCs podrían haber incrementado esta quimioquina, lo que atraería a los monocitos y, por tanto, induciría un mayor consumo de la misma. En los trasplantes isogénicos, no hubo diferencias entre los grupos y la producción es menor, al igual que es menor el número de macrófagos. De nuevo, esto indicaría que la inflamación es mayor cuando las cepas utilizadas divergen más genéticamente.

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se encuentran en mayor cantidad en los trasplantes alogénicos y especialmente en los animales sin tratamiento. Son atraídos también por CCL2 que, como vemos en el apartado de resultados, está más elevada en esos grupos. Además, niveles altos de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  producidos en condiciones de mayor inflamación por NKs, como es el caso de los trasplantes alogénicos, estimularían la producción de quimioquinas tanto por las MSCs administradas como por otras células, atrayendo a linfocitos T, tal y como se observa en nuestros datos.

Vemos también como la IL-10 está ligeramente más elevada en el trasplante alogénico cuando se han suministrado ASCs. Este hecho estaría relacionado con que la producción de INF- $\gamma$  se encuentre más reducida y TGF- $\beta$  más elevado. Esto determinaría una menor cantidad de linfocitos T, como observamos en nuestros resultados. A su vez, la expresión del receptor CXCR3 (receptor de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 por las células T) aunque no de manera estadísticamente significativa (posiblemente por el reducido número muestral) parece que tiende a disminuir en los grupos con tratamiento celular, lo que indicaría un menor número de células T activadas en el lugar de la inflamación y menor reclutamiento de los mismos junto con otros leucocitos. También, una menor expresión en estos grupos indicaría una menor fibrosis pulmonar y menor rechazo agudo.

En relación con los linfocitos CD4<sup>+</sup>, se ha observado en todos los grupos que el infiltrado de estas células, tanto a nivel bronquial como vascular, es mínimo o no se produce. Gelman y cols., demostraron, en un modelo de trasplante pulmonar en ratón similar al nuestro, que el rechazo agudo del injerto pulmonar no era dependiente de esta clase de linfocitos<sup>49</sup>, como se ha verificado también en el lavado broncoalveolar de pacientes con dicho rechazo<sup>50</sup>. Este infiltrado es distinto al que aparece en el rechazo de otros órganos sólidos como el corazón, donde los linfocitos CD4<sup>+</sup> son más abundantes que los CD8<sup>+</sup><sup>237</sup>. Además, aunque hay estudios que sugieren que la disminución de los linfocitos CD4<sup>+</sup> conlleva una mayor supervivencia tras el trasplante de islotes pancreáticos alogénicos<sup>238</sup>, otros autores comunican la no contribución de este tipo de linfocitos al rechazo en modelos de injertos de piel e intestino en roedores<sup>239,240</sup>.

### **Expresión de citoquinas y quimioquinas**

En este estudio, quisimos evaluar el efecto que tienen las ASCs durante los primeros cinco días (comparando la evolución del trasplante isogénico a las 24 horas y 5 días) así como la influencia de las cepas utilizadas.

La comparación entre los grupos con ASCs y control muestra que las células reducen los niveles de IL-6, IL-17 e INF- $\gamma$  al primer día del trasplante y que a los cinco días la reducción de IL-17 se acompañan de una disminución de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12 y TNF- $\alpha$ . Esto evidencia claramente un efecto antiinflamatorio que se instaura precozmente y se potencia en el tiempo. Tanto IL-6 como INF- $\gamma$  e IL-17 aparecen en niveles muy inferiores a las 24 horas en los animales tratados, lo que reflejaría un mayor efecto de las ASCs cuando el ambiente es proinflamatorio<sup>241</sup>.

Por otra parte, y contra lo que quizá se podría esperar, se detecta una disminución precoz y tardía de TGF- $\beta$  y de IL-10. Esto sugiere que la acción de las MSC no está mediada por un viraje del fenotipo de macrófagos (M1 vs. M2), como además se aprecia en nuestros resultados, sino probablemente por algún otro mecanismo regulador de la activación celular. En este caso, el ambiente menos antiinflamatorio tendría un efecto menor en la inmunomodulación llevada a cabo por las ASCs.

Por otro lado, sí hemos detectado notables y significativas diferencias en los trasplantes alogénicos, con mayor inflamación de partida y en los que se evidencia que las ASCs inducen una reducción de las citoquinas proinflamatorias.

En cuanto a la expresión de citoquinas a nivel pulmonar, sorprendentemente, Hoogduijn y cols. determinaron que la infusión de MSC por vía intravenosa provocaba una inflamación a nivel pulmonar en un animal sano. Los mismos autores postulan que este efecto puede deberse a que las MSCs entran en contacto con las células endoteliales y leucocitos del propio pulmón. Observaron elevaciones en los niveles de CCL2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 a las dos horas tras la infusión<sup>242</sup>. En nuestro caso, las determinaciones de citoquinas obtenidas a las 24 horas postrasplante mostraron los mismos resultados junto con incrementos en IL-2, IL-17 e IL-23.

Además, las citoquinas antiinflamatorias apenas se vieron afectadas, sólo ligeramente TGF- $\beta$  e IL-4. Todo este efecto inflamatorio, puede deberse en un primer momento a una respuesta del sistema inmune del propio animal como respuesta a la administración de las MSCs al reconocerlas como cuerpo extraño o en una localización que no es la habitual, ya que las células fueron producidas *in vitro* y pueden diferir tanto en tamaño como en el patrón de expresión de proteínas de las MSCs que no han sido cultivadas<sup>243</sup>. Por otro lado, en condiciones normales, el número de ASCs circulantes es más bajo, lo que podría activar una respuesta de limpieza de las células<sup>244</sup>.

Sin embargo, a los cinco días, los niveles de esas citoquinas se estabilizan y disminuyen con respecto a los obtenidos a las 24 horas sin que se observen diferencias atribuibles al tratamiento.

Al comparar los trasplantes alogénicos con los isogénicos, observamos cómo IL-1 $\beta$ , IL-6, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , al igual que las quimioquinas CCL2, CCL5, CXCL1 y el receptor CXCR3, se encuentran más elevadas en los primeros, lo que posiblemente sea debido a que se trata de animales más diferentes genéticamente. De igual manera sucede al comparar IL-10 e IL-22. No obstante, en los trasplantes alogénicos tratados se observa una tendencia en la disminución de las citoquinas IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  así como una disminución clara de todas las quimioquinas antes mencionadas. Este hecho podría deberse a que las ASCs están actuando tratando de disminuir la inflamación al estar en un ambiente más proinflamatorio, con más cantidad de INF- $\gamma$ . Así, cuando comparamos los trasplantes isogénicos con menor inflamación de partida, el efecto que observamos parece menor o inexistente, como ocurre a nivel sistémico<sup>241</sup>.

Finalmente, estos resultados también parecen indicar que la disminución del componente inflamatorio sistémico inducido por las MSC en el 5 día, no está regulada por iNOS (puesto que, al contrario de lo que pasa con las interleuquinas inflamatorias, está aumentada en el 5º día). Si bien, la secreción de iNOS se puede deber

tanto a las MSCs como a los macrófagos M2 que lo producen y secretan junto con especies reactivas de oxígeno.

### **Factores que podrían haber influido en el efecto de las MSCs:**

- **Tipo de células y procedencia**

Como hemos mencionado antes, las MSC pueden proceder de distintos tejidos. En nuestro caso elegimos las derivadas del tejido adiposo (ASC) ya que son fáciles de obtener. A nivel clínico resultarían también más accesibles que otras, como las derivadas de la médula ósea o del cordón umbilical del propio donante. Se ha descrito que conforme se realizan pases en los cultivos celulares, estas células pueden presentar más alteraciones que otras MSCs, aunque en nuestro caso siempre utilizamos los pases recomendados para evitar este problema<sup>245</sup>.

Además, a diferencia de otros estudios donde se emplean células de donante, autólogas o incluso de otras especies<sup>246</sup>, nuestras ASCs fueron singénicas con la cepa receptora para minimizar el rechazo que se pudiera presentar frente a ellas.

- **Protocolos de aislamiento, cultivo y preservación**

Otro factor importante a la hora de evaluar los resultados obtenidos y compararlos con los datos publicados es la diferencia en los métodos de aislamiento y cultivo de los distintos laboratorios<sup>247</sup>. En ocasiones, resulta controvertido el uso de células recién obtenidas o que, por el contrario, han sido sometidas a un proceso de congelación. Nuestra elección de utilizar células que se habían obtenido con anterioridad a partir de dos animales se debió a varios motivos. Por un lado, los protocolos de trabajo con estas células por parte de nuestro grupo de investigación se encuentran validados y han demostrado ser eficaces<sup>248</sup>. Por otro, la posibilidad de criopreservarlas permite expandirlas y utilizarlas como terapia en repetidas ocasiones, posiblemente lo más conveniente en la práctica clínica. Sin embargo, este tipo de conservación puede resultar controvertido ya que, según algunos autores, puede provocar una disminución de la viabilidad y reducir las capacidades inmunosupresoras por el método de descongelación<sup>249,250</sup>.

- **Dosis y momento de administración**

La dosis celular calculada en función del peso del individuo receptor fue de  $1 \times 10^6$  células/kg. A nivel experimental, tanto en ratas como en ratones, no existe una dosis fija y en muchos casos es superior a la que utilizamos<sup>251</sup>. Nuestra elección se debió a que, durante la puesta a punto del modelo, utilizamos distintas dosis de tal forma que, cuando ésta era elevada y debido a la limitación en la cantidad de volumen total y tiempo necesario para la administración, las células se agregaban lo que, junto con un pulmón dañado, provocaba émbolos pulmonares con la consiguiente muerte del animal al poco tiempo de su infusión.

Estudiando los resultados obtenidos, podría resultar que hayamos infravalorado el efecto de las ASCs por el uso de una dosis insuficiente, ya que puede haber un efecto terapéutico distinto en función de la cantidad de

células administradas, como se ha demostrado en ratas, en donde dosis altas disminuyen la proliferación de los linfocitos T, mientras que dosis bajas la favorecen<sup>252</sup>.

Además, se ha demostrado que cuando se administra una sola dosis de células, los beneficios obtenidos no son significativos. Sin embargo, la administración repetida tiene un efecto acumulativo beneficioso y es, por tanto, más efectiva que una dosis única incluso aunque ésta tenga la misma cantidad total de células que la suma de las dosis repetidas<sup>253-256</sup>.

Otro aspecto que puede influir en el efecto que muestran las MSC es el momento de administrarlas que, en nuestro caso fue justo después del trasplante. Consideramos que así es más fácil extrapolar los resultados a la terapia en humanos. Dado que nos centramos en el rechazo agudo y a tiempos cortos, sólo pudimos utilizar un único momento de administración de las células. Sin embargo, en un modelo de trasplante de tráquea en ratones, se ha observado un efecto beneficioso de la repetición de dosis de células madre humanas derivadas de tejido adiposo sobre el desarrollo de bronquiolitis obliterante<sup>246</sup>. En otros casos, una infusión previa de estas células días antes del trasplante consiguió prolongar la supervivencia del injerto, a diferencia de una administración más tardía<sup>196,257</sup>.

- **Localización y migración**

En nuestro estudio, una vez administradas las células teñidas por vía venosa (en la cola del animal), estas se dirigieron al pulmón y anidaron en él durante todo el tiempo de estudio, de manera que fueron observadas por fluorescencia a los 5 días. Se sabe que la capacidad que muestran de migrar a los órganos o tejidos diana y anidar en ellos es baja, de manera que algunos autores no las localizan una vez administradas. Este aspecto resulta un tanto controvertido, ya que en algunos trabajos las células se localizan fácilmente y durante bastante tiempo, mientras que en otros, parece que no anidan pero sí ejercen su efecto de forma paracrina<sup>258-260</sup>. Sin embargo, el pulmón parece ser un órgano en el que normalmente quedan retenidas<sup>260</sup>, incluso cuando no es el órgano dañado, como ocurre por ejemplo cuando se aplica la terapia celular para revertir o solucionar un infarto cardíaco<sup>251</sup>.

Por lo tanto, no queda claro si el efecto que realizan se debe tanto a la migración de las células a la zona dañada para ejercer sus efectos regenerativos y de regulación de la inmunidad, que era lo que inicialmente supusimos que ocurriría en nuestro modelo. Así, hay trabajos que abalan esta teoría al observar cómo las MSCs derivadas de médula ósea son capaces de dirigirse hacia células dañadas de pulmón y no así hacia células sanas *in vitro*<sup>205</sup>.

En resumen, en nuestro estudio no se pudo comprobar un efecto derivado del tratamiento a nivel microscópico ya que todos los individuos mostraron un grado de rechazo similar. A nivel macroscópico, la mayor parte de los pulmones presentaron un buen aspecto, similar al nativo y sin diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, hemos podido observar un indicio de acción inmunomoduladora de las ASCs en cuanto a la expresión de citoquinas y quimioquinas tanto a nivel sistémico como local. Por último, comprobamos la supervivencia de las células administradas en los órganos diana.

## 2. Secuenciación de microARNs en el trasplante pulmonar

Se ha demostrado que los microARN pueden desempeñar un papel importante en el rechazo de injertos pulmonares, tanto agudos como crónicos<sup>261</sup>. Funcionalmente, los microARNs están implicados en mecanismos reguladores básicos, como pueden ser la inflamación o la apoptosis<sup>262</sup>. Por tanto, llevarlos a niveles normales cuando están sobreexpresados o disminuidos con respecto a una situación fisiológica podría conducir a la reversión de la enfermedad. Esto es lo que se conoce como terapia de reemplazo de microARNs<sup>263</sup>.

Dada la naturaleza exploratoria y descriptiva de nuestro trabajo, nuestro principal objetivo ha sido realizar una secuenciación de microARNs en la rata. Aunque se han llevado a cabo estudios para observar los microARNs alterados a través de *microarrays* después del síndrome de distrés respiratorio agudo<sup>264</sup>, no hemos encontrado una secuenciación completa para ver qué está afectado en casos de rechazo agudo de pulmón y tras una cirugía con un alto componente inflamatorio, sin el uso de ningún fármaco antiinflamatorio ni terapia inmunosupresora. Además, dado que hay estudios que determinan un efecto positivo de la terapia celular con MSCs después de un trasplante de pulmón<sup>230</sup>, hemos querido comprobar si la presencia de ASCs regula de alguna manera los microARNs alterados tras el trasplante. Nos hemos observado diferencias en tanto a la cantidad total de los mismos al comparar los distintos grupos con el control sano. Únicamente, el miR-741 ha aparecido con menor expresión en el grupo trasplantado que fue tratado con ASCs frente al trasplante sin terapia celular, permitiendo así una mayor expresión de los genes que regula, como sucede en las células embrionarias de ratón y en las células madre pluripotenciales en la rata<sup>265</sup>, aunque no se conocen con exactitud sus genes diana ni las vías en las que está implicado. Por ello, consideramos importante centrarnos en él para futuros estudios.

Pese a la cantidad de microARNs descritos, hemos podido comprobar que las bases de datos no están tan validadas en el caso de las ratas, a diferencia de lo que ocurre en humanos y ratones, donde las secuencias son más conocidas. Hemos puesto de manifiesto las vías de señalización a las que afectan nuestros microARNs desregulados, algunas tan importantes para el trasplante como la vía de señalización de TGF- $\beta$ , de las uniones intercelulares o de MAPK. Sin embargo, al comparar nuestras secuencias con las equivalentes en humanos, comprobamos que hay otras rutas que también se ven afectadas, como las que modifican a los receptores de las células T y B o las vías de señalización TNF<sup>266</sup>. Sería necesario, por lo tanto, comparar las distintas secuencias que hemos obtenidos con las conocidas de otras especies para comparar los genes diana en cada caso.

Además, dado que nuestro modelo con ASCs no ha supuesto una inmunosupresión con reducción del rechazo agudo, un siguiente paso podría ser realizar la secuenciación completa en casos con donde se inhiba el rechazo y así comparar los resultados con los que hemos obtenido. Esto ayudaría a dirigir las terapias hacia una u otra dirección.

### 3. Limitaciones del estudio

Reconocemos que nuestro estudio presenta diversas limitaciones que requieren un comentario específico.

En primer lugar, consideramos que las desviaciones obtenidas en algunos de los resultados se podrían corregir aumentando la *n* en todos los grupos de estudio. Además, habría resultado interesante incluir más grupos de estudio, con animales tratados con inmunosupresores y una combinación de inmunosupresores y células madre e incrementar el número de individuos por grupo de estudio. Sin embargo, nuestra hipótesis de partida era conocer el efecto de las MSCs per se.

En ocasiones, para determinar qué parte de la inflamación se debe al rechazo y cuál a la propia cirugía, en algunos estudios se incluyen grupos control simulados con y sin tratamiento, en los que únicamente se realiza una toracotomía. De este modo, se eliminaría el factor cirugía en los resultados. Sin embargo, en nuestro estudio decidimos omitir este grupo por varias razones. Por un lado, implica de nuevo aumentar de manera considerable el número de animales utilizados, como anteriormente hemos señalado y, por otro, si queremos valorar el efecto de las ASCs en los trasplantes, nos interesa conocer también cómo de inmunomoduladoras son de manera conjunta afectando tanto a la cirugía como al rechazo.

También hubiera resultado interesante incrementar la duración del estudio para comprobar si se encontraban diferencias a nivel pulmonar de los animales tratados o si se producía un rechazo agudo a un tiempo más largo.

Otra limitación ha sido la dosis empleada, ya que podría haber resultado escasa. Realizando varias administraciones, incluyendo alguna previa el trasplante, se podría comprobar el efecto acumulativo de las ASCs.

Finalmente, en la secuenciación de microARNs, la principal limitación ha sido también el pequeño tamaño muestral. Además, la escasa información de las secuencias en ratas hace que se dificulte el estudio de las vías de señalización afectadas.



# **Conclusiones**

---



1. Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs) no parecen evitar el rechazo tras el trasplante pulmonar, al mostrar todos los animales, tanto los que recibieron terapia celular como los que no, un grado similar y relevante de rechazo agudo.
2. Tras la administración de ASCs, las células migraron al órgano diana evidenciándose durante los primeros 5 días post-trasplante.
3. En los trasplantes isogénicos, las ASCs provocaron una mayor respuesta inflamatoria a las 24 horas tras su administración, que disminuyó a los 5 días. En los trasplantes alogénicos, la terapia celular podría disminuir los niveles de citoquinas proinflamatorias, así como de quimioquinas, siendo dicha reducción mayor que en el trasplante isogénico.
4. El ambiente inflamatorio en el que se encuentran las ASCs parece modificar sus efectos inmunomoduladores, ya que las mayores diferencias se han encontrado en los trasplantes alogénicos.
5. En el trasplante pulmonar se produce una desregulación en la expresión de determinados microARNs, estando algunos aumentados o disminuidos con respecto a controles sanos. Es necesario, por tanto, seguir realizando estudios para profundizar en las implicaciones fisiológicas de esas modificaciones, que pueden estar encaminados a estudiar terapias alternativas a las ya existentes
6. Otros estudios deberían dilucidar la falta de efecto protector de las ASCs dado que en otros modelos de trasplante si se ha observado dicho efecto protector del injerto, es decir, de reducción del nivel de rechazo.



# **Bibliografía**

---



1. Whitson, B. A. & Hayes, D. Indications and outcomes in adult lung transplantation. *J. Thorac. Dis.* 6, 1018–1023 (2014).
2. Kirkby, S. & Hayes, D. Pediatric lung transplantation: indications and outcomes. *J. Thorac. Dis.* 6, 1024–1031 (2014).
3. Moreno Galdó, A., Solé Montserrat, J. & Roman Broto, A. Lung transplantation in children. Specific aspects. *Arch. Bronconeumol.* 49, 523–528 (2013).
4. Lung - OPTN. Available at: <https://optn.transplant.hrsa.gov/data/organ-datasource/lung/>. (Accessed: 3rd May 2018)
5. Venuta, F. & Van Raemdonck, D. History of lung transplantation. *J. Thorac. Dis.* 9, 5458–5471 (2017).
6. Hardy, J. D. The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant. Proc.* 31, 25–29 (1999).
7. Hardy, J. D., Webb, W. R., Dalton, M. L. & Walker, G. R. LUNG HOMOTRANSPLANTATION IN MAN. *JAMA* 186, 1065–1074 (1963).
8. Hardy, J. D., Eraslan, S. & Webb, W. R. TRANSPLANTATION OF THE LUNG. *Ann. Surg.* 160, 440–448 (1964).
9. Cooley, D. A. *et al.* Organ transplantation for advanced cardiopulmonary disease. *Ann. Thorac. Surg.* 8, 30–46 (1969).
10. Wildevuur, C. R. & Benfield, J. R. A review of 23 human lung transplantations by 20 surgeons. *Ann. Thorac. Surg.* 9, 489–515 (1970).
11. Losman, J. G., Campbell, C. D., Replogle, R. L. & Barnard, C. N. Joint transplantation of the heart and lungs. Past experience and present potentials. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)* 23, 440–452 (1982).
12. Reitz, B. A., Pennock, J. L. & Shumway, N. E. Simplified operative method for heart and lung transplantation. *J. Surg. Res.* 31, 1–5 (1981).
13. Reitz, B. A. *et al.* Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N. Engl. J. Med.* 306, 557–564 (1982).
14. Toronto Lung Transplant Group. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 314, 1140–1145 (1986).
15. Patterson, G. A., Cooper, J. D., Dark, J. H. & Jones, M. T. Experimental and clinical double lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 95, 70–74 (1988).
16. Pasque, M. K. *et al.* Improved technique for bilateral lung transplantation: rationale and initial clinical experience. *Ann. Thorac. Surg.* 49, 785–791 (1990).

17. Kaiser, L. R. *et al.* Bilateral sequential lung transplantation: the procedure of choice for double-lung replacement. *Ann. Thorac. Surg.* 52, 438–445; discussion 445–446 (1991).
18. Historia de los Trasplantes. Available at: <http://www.ont.es/home/Paginas/HistoriadelosTrasplantes.aspx>. (Accessed: 3rd May 2018)
19. Porteous, M. K., Diamond, J. M. & Christie, J. D. Primary graft dysfunction: lessons learned about the first 72h after lung transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 20, 506–514 (2015).
20. Masson, E. *et al.* Hyperacute rejection after lung transplantation caused by undetected low-titer anti-HLA antibodies. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 26, 642–645 (2007).
21. Martinu, T., Howell, D. N. & Palmer, S. M. Acute cellular rejection and humoral sensitization in lung transplant recipients. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 31, 179–188 (2010).
22. Stewart, S. *et al.* Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 26, 1229–1242 (2007).
23. Martinu, T., Pavlisko, E. N., Chen, D.-F. & Palmer, S. M. Acute allograft rejection: cellular and humoral processes. *Clin. Chest Med.* 32, 295–310 (2011).
24. Zheng, H. X. *et al.* The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. *Transpl. Immunol.* 14, 37–42 (2005).
25. Christie, J. D. *et al.* The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th adult lung and heart-lung transplant report-2012. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 31, 1073–1086 (2012).
26. Christie, J. D. *et al.* The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report--2011. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 30, 1104–1122 (2011).
27. Levine, D. J. *et al.* Antibody-mediated rejection of the lung: A consensus report of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 35, 397–406 (2016).
28. Witt, C. A. *et al.* Acute antibody-mediated rejection after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 32, 1034–1040 (2013).
29. Dupuis, R. E., Taber, D. J., Fann, A. L. & Lumbert, K. P. Medical management considerations for patients with lung transplantation. *J. Pharm. Pract.* 14, 258–276 (2001).
30. Bando, K. *et al.* Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation. An analysis of risk factors and management. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 110, 4–13; discussion 13–14 (1995).

31. Todd, J. L. & Palmer, S. M. Bronchiolitis obliterans syndrome: the final frontier for lung transplantation. *Chest* 140, 502–508 (2011).
32. Akindipe, O. *et al.* Obliterative bronchiolitis in lung allografts removed at retransplant for intractable airway problems. *Respirol. Carlton Vic* 14, 601–605 (2009).
33. Sato, M. *et al.* Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 30, 735–742 (2011).
34. Verleden, S. E. *et al.* Impact of CLAD Phenotype on Survival After Lung Retransplantation: A Multicenter Study. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 15, 2223–2230 (2015).
35. Ofek, E. *et al.* Restrictive allograft syndrome post lung transplantation is characterized by pleuroparenchymal fibroelastosis. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 26, 350–356 (2013).
36. Sato, M., Hwang, D. M., Waddell, T. K., Singer, L. G. & Keshavjee, S. Progression pattern of restrictive allograft syndrome after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 32, 23–30 (2013).
37. Ussetti Gil, P. Trasplante pulmonar: indicaciones, contraindicaciones, morbilidad y criterios de seguimiento. *Med. - Programa Form. Médica Contin. Acreditado* 8, 4196–4201 (2002).
38. Wyburn, K. R., Jose, M. D., Wu, H., Atkins, R. C. & Chadban, S. J. The role of macrophages in allograft rejection. *Transplantation* 80, 1641–1647 (2005).
39. Pratt, J. R., Basheer, S. A. & Sacks, S. H. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat. Med.* 8, 582–587 (2002).
40. Clarkson, M. R. & Sayegh, M. H. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation* 80, 555–563 (2005).
41. Chen, L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 336–347 (2004).
42. Sayegh, M. H. & Turka, L. A. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* 338, 1813–1821 (1998).
43. Hodi, F. S. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 5238–5242 (2007).
44. Verreck, F. A. W., de Boer, T., Langenberg, D. M. L., van der Zanden, L. & Ottenhoff, T. H. M. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc. Biol.* 79, 285–293 (2006).

45. Krummey, S. M. & Ford, M. L. Heterogeneity within T Cell Memory: Implications for Transplant Tolerance. *Front. Immunol.* 3, (2012).
46. Yang, J.-J. *et al.* Interleukin-17 plays a critical role in the acute rejection of intestinal transplantation. *World J. Gastroenterol. WJG* 19, 682–691 (2013).
47. Chen, Q.-R. *et al.* Role of interleukin-17A in early graft rejection after orthotopic lung transplantation in mice. *J. Thorac. Dis.* 8, 1069–1079 (2016).
48. Li, X. C. & Turka, L. A. An update on regulatory T cells in transplant tolerance and rejection. *Nat. Rev. Nephrol.* 6, 577–583 (2010).
49. Gelman, A. E. *et al.* CD4<sup>+</sup> T lymphocytes are not necessary for the acute rejection of vascularized mouse lung transplants. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 4754–4762 (2008).
50. Donnenberg, V. S. *et al.* P-glycoprotein activity is decreased in CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> lung allograft-infiltrating T cells during acute cellular rejection. *Transplantation* 77, 1699–1706 (2004).
51. Slebos, D.-J. *et al.* Bronchoalveolar lavage fluid characteristics in acute and chronic lung transplant rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 23, 532–540 (2004).
52. Jaramillo, A. *et al.* Immune mechanisms in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Pediatr. Transplant.* 9, 84–93 (2005).
53. Moyron-Quiroz, J. E. *et al.* Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat. Med.* 10, 927–934 (2004).
54. Li, W. *et al.* Lung transplant acceptance is facilitated by early events in the graft and is associated with lymphoid neogenesis. *Mucosal Immunol.* 5, 544–554 (2012).
55. Krupnick, A. S. *et al.* Central memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes mediate lung allograft acceptance. *J. Clin. Invest.* 124, 1130–1143 (2014).
56. Wilkes, D. S. Autoantibody formation in human and rat studies of chronic rejection and primary graft dysfunction. *Semin. Immunol.* 24, 131–135 (2012).
57. Kastelijn, E. A. *et al.* Polymorphisms in innate immunity genes associated with development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 29, 665–671 (2010).
58. Iyer, S. S. & Cheng, G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit. Rev. Immunol.* 32, 23–63 (2012).
59. Cottrez, F., Hurst, S. D., Coffman, R. L. & Groux, H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 4848–4853 (2000).

60. van Emmerik, N. *et al.* Cytokine gene expression profiles in human endomyocardial biopsy (EMB) derived lymphocyte cultures and in EMB tissue. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 7 Suppl 1, S623-626 (1994).
61. Sharma, A. K., Fernandez, L. G., Awad, A. S., Kron, I. L. & Laubach, V. E. Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF-alpha during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L105-113 (2007).
62. Chatterjee, S., Nieman, G. F., Christie, J. D. & Fisher, A. B. Shear stress-related mechanosignaling with lung ischemia: lessons from basic research can inform lung transplantation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 307, L668-680 (2014).
63. Borthwick, L. A. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation. *Thorax* 64, 770–777 (2009).
64. Vanaudenaerde, B. M. *et al.* Interleukin-17 stimulates release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells in vitro: a potential role for interleukin-17 and airway smooth muscle cells in bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 22, 1280–1283 (2003).
65. Walker, N. *et al.* Resident tissue-specific mesenchymal progenitor cells contribute to fibrogenesis in human lung allografts. *Am. J. Pathol.* 178, 2461–2469 (2011).
66. den Hengst, W. A. *et al.* Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299, H1283-1299 (2010).
67. Hertz, M. I., Jessurun, J., King, M. B., Savik, S. K. & Murray, J. J. Reproduction of the obliterative bronchiolitis lesion after heterotopic transplantation of mouse airways. *Am. J. Pathol.* 142, 1945–1951 (1993).
68. Sato, M. *et al.* The role of intrapulmonary de novo lymphoid tissue in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 7307–7316 (2009).
69. Lama, V. N. *et al.* Models of Lung Transplant Research: a consensus statement from the National Heart, Lung, and Blood Institute workshop. *JCI Insight* 2, (2017).
70. Carrel A. The surgery of blood vessels. *Johns Hopkins Hosp Bull* 18, 18–28 (1907).
71. Konstantinov, I. E. At the Cutting Edge of the Impossible. *Tex. Heart Inst. J.* 36, 453–458 (2009).
72. Langer, R. M. Vladimir P. Demikhov, a pioneer of organ transplantation. *Transplant. Proc.* 43, 1221–1222 (2011).
73. Asimacopoulos, P. J., Molokhia, F. A., Pegg, C. A. & Norman, J. C. Lung transplantation in the rat. *Transplant. Proc.* 3, 583–585 (1971).

74. Metras H. Note preliminaire sur greffe totale du poumon chez le chien (Preliminary note on lung transplants in dogs). *Comp Rendues Acad Sci* 231, 1176–7 (1950).
75. Lillehei, C. W., Everts, E. & Shamberger, R. C. Reduced-size lung transplantation from adult to neonatal sheep. *J. Pediatr. Surg.* 27, 1153–1156 (1992).
76. Hausen, B. *et al.* Prevention of acute allograft rejection in nonhuman primate lung transplant recipients: induction with chimeric anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody improves the tolerability and potentiates the immunosuppressive activity of a regimen using low doses of both microemulsion cyclosporine and 40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin. *Transplantation* 69, 488–496 (2000).
77. Platt, J., DiSesa, V., Gail, D., Massicot-Fisher, J. & National Heart, Lung, and Blood Institute Heart and Lung Xenotransplantation Working Group. Recommendations of the National Heart, Lung, and Blood Institute Heart and Lung Xenotransplantation Working Group. *Circulation* 106, 1043–1047 (2002).
78. Lambrihts, D., Sachs, D. H. & Cooper, D. K. Discordant organ xenotransplantation in primates: world experience and current status. *Transplantation* 66, 547–561 (1998).
79. Yoshida, S. *et al.* Surgical technique of experimental lung transplantation in rabbits. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg. Off. J. Assoc. Thorac. Cardiovasc. Surg. Asia* 11, 7–11 (2005).
80. Herr, N. G. Orthotopic transplantation of the rat heart and lungs. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 47, 1227 (1971).
81. Maruyama, T., Swartz, M. T., McBride, L. R. & Pennington, D. G. Working heart model of heterotopic heart-lung transplantation in rats. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 107, 210–215 (1994).
82. Lee, S., Willoughby, W. F., Smallwood, C. J., Dawson, A. & Orloff, M. J. Heterotopic heart and lung transplantation in the rat. *Am. J. Pathol.* 59, 279–298 (1970).
83. Okazaki, M. *et al.* A mouse model of orthotopic vascularized aerated lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 7, 1672–1679 (2007).
84. Jungraithmayr, W. M., Korom, S., Hillinger, S. & Weder, W. A mouse model of orthotopic, single-lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 137, 486–491 (2009).
85. Li, W. *et al.* Orthotopic vascularized right lung transplantation in the mouse. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 139, 1637–1643 (2010).
86. Ruiz-Pérez, D., Largo, C. & García-Río, F. Technical Aspects and Benefits of Experimental Mouse Lung Transplantation. *Arch. Bronconeumol.* 52, 596–604 (2016).
87. Marck, K. W. & Wildevuur, C. R. Lung transplantation in the rat: I. Technique and survival. *Ann. Thorac. Surg.* 34, 74–80 (1982).
88. Prop, J., Ehrie, M. G., Crapo, J. D., Nieuwenhuis, P. & Wildevuur, C. R. Reimplantation response in isografted rat lungs. Analysis of causal factors. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 87, 702–711 (1984).

89. Zhang, Q. *et al.* The orthotopic left lung transplantation in rats: a valuable experimental model without using cuff technique. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 21, 1090–1097 (2008).
90. Mizuta, T., Kawaguchi, A., Nakahara, K. & Kawashima, Y. Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 97, 578–581 (1989).
91. Kubisa, B., Schmid, R. A. & Grodzki, T. Model of single left rat lung transplantation. Relation between surgical experience and outcomes. *Rocz. Akad. Med. W Białymst.* 1995 48, 70–73 (2003).
92. Mizobuchi, T., Sekine, Y., Yasufuku, K., Fujisawa, T. & Wilkes, D. S. Comparison of surgical procedures for vascular and airway anastomoses that utilize a modified non-suture external cuff technique for experimental lung transplantation in rats. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 23, 889–893 (2004).
93. Zhai, W. *et al.* Simplified rat lung transplantation by using a modified cuff technique. *J. Investig. Surg. Off. J. Acad. Surg. Res.* 21, 33–37 (2008).
94. Habertheuer, A. *et al.* Innovative, simplified orthotopic lung transplantation in rats. *J. Surg. Res.* 185, 419–425 (2013).
95. Mizuta, T. *et al.* Total nonmicrosuture technique for rat lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 102, 159–160 (1991).
96. Reis, A., Giaid, A., Serrick, C. & Shennib, H. Improved outcome of rat lung transplantation with modification of the nonsuture external cuff technique. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 14, 274–279 (1995).
97. Santana Rodríguez, N. *et al.* [Lung transplantation in rats: a viable experimental model]. *Arch. Bronconeumol.* 40, 438–442 (2004).
98. Sugimoto, R. *et al.* Experimental orthotopic lung transplantation model in rats with cold storage. *Surg. Today* 39, 641–645 (2009).
99. Santana Rodríguez, N. *et al.* Technical modifications of the orthotopic lung transplantation model in rats with brain-dead donors. *Arch. Bronconeumol.* 47, 488–494 (2011).
100. Zheng, Z. *et al.* Improvements of the Surgical Technique on the Established Mouse Model of Orthotopic Single Lung Transplantation. *PLoS ONE* 8, (2013).
101. Tsushima, Y. *et al.* Mastering mouse lung transplantation from scratch--a track record. *J. Surg. Res.* 185, 426–432 (2013).
102. Krupnick, A. S. *et al.* Orthotopic mouse lung transplantation as experimental methodology to study transplant and tumor biology. *Nat. Protoc.* 4, 86–93 (2009).

103. Hirschburger, M. *et al.* Lung transplantation in the Fischer 344-->Wistar Kyoto rat strain combination is not suitable to study bronchiolitis obliterans. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 26, 390–398 (2007).
104. Khan, S. U. *et al.* Acute pulmonary edema after lung transplantation: the pulmonary reimplantation response. *Chest* 116, 187–194 (1999).
105. Zweers, N. *et al.* Donor brain death aggravates chronic rejection after lung transplantation in rats. *Transplantation* 78, 1251–1258 (2004).
106. Tanaka, Y. *et al.* Optimal lung inflation techniques in a rat lung transplantation model: a revisit. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 62, 427–433 (2014).
107. Lin, X. *et al.* Five-year update on the mouse model of orthotopic lung transplantation: Scientific uses, tricks of the trade, and tips for success. *J. Thorac. Dis.* 4, 247–258 (2012).
108. Aeba, R. *et al.* University of Wisconsin solution for pulmonary preservation in a rat transplant model. *Ann. Thorac. Surg.* 53, 240–245; discussion 245–246 (1992).
109. Kreisel, D. *et al.* Emergency granulopoiesis promotes neutrophil-dendritic cell encounters that prevent mouse lung allograft acceptance. *Blood* 118, 6172–6182 (2011).
110. Kreisel, D. *et al.* Bcl3 prevents acute inflammatory lung injury in mice by restraining emergency granulopoiesis. *J. Clin. Invest.* 121, 265–276 (2011).
111. Santana-Rodríguez, N. *et al.* Estradiol worsens the syndrome of ischemia-reperfusion injury in an experimental lung transplantation model. *Lung* 189, 251–255 (2011).
112. Greschus, S. *et al.* Monitoring of experimental rat lung transplants by high-resolution flat-panel volumetric computer tomography (fpVCT). *J. Investig. Surg. Off. J. Acad. Surg. Res.* 22, 69–75 (2009).
113. Chuck, N. C. *et al.* Ultra-short echo-time magnetic resonance imaging distinguishes ischemia/reperfusion injury from acute rejection in a mouse lung transplantation model. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* (2015). doi:10.1111/tri.12680
114. Jungraithmayr, W., Draenert, A., Marquardt, K. & Weder, W. Ultrastructural changes in acute lung allograft rejection: novel insights from an animal study. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 31, 94–100 (2012).
115. Takahashi, A. *et al.* Noninvasive assessment for acute allograft rejection in a rat lung transplantation model. *Physiol. Rep.* 2, (2014).
116. Chen, D. L. *et al.* Increased T cell glucose uptake reflects acute rejection in lung grafts. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 13, 2540–2549 (2013).
117. Okazaki, M. *et al.* Maintenance of airway epithelium in acutely rejected orthotopic vascularized mouse lung transplants. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37, 625–630 (2007).

118. Dodd-o, J. M. *et al.* CD154 blockade abrogates allospecific responses and enhances CD4(+) regulatory T-cells in mouse orthotopic lung transplant. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 11, 1815–1824 (2011).
119. Zhou, W. *et al.* The Critical Role of Induced CD4+ FoxP3+ Regulatory Cells in Suppression of Interleukin-17 Production and Attenuation of Mouse Orthotopic Lung Allograft Rejection. *Transplantation* 99, 1356–1364 (2015).
120. Kreisel, D. *et al.* Cutting edge: MHC class II expression by pulmonary nonhematopoietic cells plays a critical role in controlling local inflammatory responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 3809–3813 (2010).
121. Erne, B. V. *et al.* Effect of N-acetylcysteine on acute allograft rejection after rat lung transplantation. *Ann. Thorac. Surg.* 95, 1021–1027 (2013).
122. Raissadati, A. *et al.* Systemic overexpression of matricellular protein CCN1 exacerbates obliterative bronchiolitis in mouse tracheal allografts. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* (2015). doi:10.1111/tri.12639
123. Wu, Q. *et al.* CD4 T Cells but Not Th17 Cells Are Required for Mouse Lung Transplant Obliterative Bronchiolitis. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 15, 1793–1804 (2015).
124. Bribrieco, A. C., Li, W., Nava, R. G., Spahn, J. H. & Kreisel, D. Experimental models of lung transplantation. *Front. Biosci. Elite Ed.* 5, 266–272 (2013).
125. Santana-Rodríguez, N. *et al.* Searching for novel molecular targets of chronic rejection in an orthotopic experimental lung transplantation model. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 31, 213–221 (2012).
126. Kreisel, D. *et al.* Cutting edge: MHC class II expression by pulmonary nonhematopoietic cells plays a critical role in controlling local inflammatory responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 3809–3813 (2010).
127. Hsiao, H.-M. *et al.* Spleen-derived classical monocytes mediate lung ischemia-reperfusion injury through IL-1 $\beta$ . *J. Clin. Invest.* (2018). doi:10.1172/JCI98436
128. Chambers, D. C. *et al.* The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Lung And Heart-Lung Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 36, 1047–1059 (2017).
129. Penninga, L. *et al.* Antibody induction therapy for lung transplant recipients. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD008927 (2013). doi:10.1002/14651858.CD008927.pub2
130. Rhen, T. & Cidlowski, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.* 353, 1711–1723 (2005).

131. Barnes, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br. J. Pharmacol.* 148, 245–254 (2006).
132. Franquesa, M., Hoogduijn, M. J. & Baan, C. C. The impact of mesenchymal stem cell therapy in transplant rejection and tolerance. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 17, 355–361 (2012).
133. Hutchinson, J. A., Riquelme, P., Geissler, E. K. & Fändrich, F. Human regulatory macrophages. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 677, 181–192 (2011).
134. Friedenstein, A. J. Precursor cells of mechanocytes. *Int. Rev. Cytol.* 47, 327–359 (1976).
135. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. & Kulagina, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267–274 (1976).
136. Hoogduijn, M. J. *et al.* Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev.* 16, 597–604 (2007).
137. Williams, J. T., Southerland, S. S., Souza, J., Calcutt, A. F. & Cartledge, R. G. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am. Surg.* 65, 22–26 (1999).
138. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13625–13630 (2000).
139. Fajardo-Orduña, G. R. *et al.* Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells from Umbilical Cord Blood and Placenta Exhibit Similar Capacities to Promote Expansion of Hematopoietic Progenitor Cells In Vitro. *Stem Cells Int.* 2017, 6061729 (2017).
140. Zuk, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295 (2002).
141. Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Amri, E.-Z., Ailhaud, G. & Dani, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87, 125–128 (2005).
142. Giordano, A., Galderisi, U. & Marino, I. R. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 211, 27–35 (2007).
143. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317 (2006).
144. Krampera, M. *et al.* Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 435–441 (2006).
145. Leuning, D. G., Reinders, M. E. J., de Fijter, J. W. & Rabelink, T. J. Clinical translation of multipotent mesenchymal stromal cells in transplantation. *Semin. Nephrol.* 34, 351–364 (2014).
146. Reinders, M. E. J., Rabelink, T. J. & de Fijter, J. W. The role of mesenchymal stromal cells in chronic transplant rejection after solid organ transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 18, 44–50 (2013).

147. Singer, N. G. & Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu. Rev. Pathol.* 6, 457–478 (2011).
148. Crop, M. J. *et al.* Human mesenchymal stem cells are susceptible to lysis by CD8(+) T cells and NK cells. *Cell Transplant.* 20, 1547–1559 (2011).
149. Vilalta, M. *et al.* Biodistribution, long-term survival, and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplanted in nude mice by high sensitivity non-invasive bioluminescence imaging. *Stem Cells Dev.* 17, 993–1003 (2008).
150. Perico, N. *et al.* Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 6, 412–422 (2011).
151. Hoogduijn, M. J. *et al.* Advancement of mesenchymal stem cell therapy in solid organ transplantation (MISOT). *Transplantation* 90, 124–126 (2010).
152. Augello, A. *et al.* Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur. J. Immunol.* 35, 1482–1490 (2005).
153. Meisel, R. *et al.* Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103, 4619–4621 (2004).
154. Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N. & Papamichail, M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 74–85 (2006).
155. Ge, W. *et al.* Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation* 90, 1312–1320 (2010).
156. François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M. & Galipeau, J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 187–195 (2012).
157. Spaggiari, G. M. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111, 1327–1333 (2008).
158. Di Nicola, M. *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838–3843 (2002).
159. Tasso, R. *et al.* Mesenchymal stem cells induce functionally active T-regulatory lymphocytes in a paracrine fashion and ameliorate experimental autoimmune uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 786–793 (2012).
160. Yañez, R., Oviedo, A., Aldea, M., Bueren, J. A. & Lamana, M. L. Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Exp. Cell Res.* 316, 3109–3123 (2010).

161. Yang, S.-H. *et al.* Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp. Mol. Med.* 41, 315–324 (2009).
162. Selmani, Z. *et al.* Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 212–222 (2008).
163. Nasef, A. *et al.* Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation* 84, 231–237 (2007).
164. Sato, K. *et al.* Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109, 228–234 (2007).
165. Rafei, M. *et al.* Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood* 112, 4991–4998 (2008).
166. Baum, L. G. *et al.* Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 109, 295–307 (2003).
167. da Silva Meirelles, L., Caplan, A. I. & Nardi, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 2287–2299 (2008).
168. Rollins, B. J. Chemokines. *Blood* 90, 909–928 (1997).
169. Crop, M. J. *et al.* Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* 162, 474–486 (2010).
170. Hoogduijn, M. J. *et al.* The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int. Immunopharmacol.* 10, 1496–1500 (2010).
171. Casiraghi, F. *et al.* Localization of mesenchymal stromal cells dictates their immune or proinflammatory effects in kidney transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 2373–2383 (2012).
172. Le Blanc, K. & Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 383–396 (2012).
173. Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L. & Betancourt, A. M. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PloS One* 5, e10088 (2010).
174. Chen, L., Tredget, E. E., Wu, P. Y. G. & Wu, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PloS One* 3, e1886 (2008).
175. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969 (2008).

176. Maggini, J. *et al.* Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One* 5, e9252 (2010).
177. Kim, J. & Hematti, P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp. Hematol.* 37, 1445–1453 (2009).
178. Németh, K. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* 15, 42–49 (2009).
179. Gupta, N. *et al.* Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 1855–1863 (2007).
180. Ortiz, L. A. *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11002–11007 (2007).
181. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726–736 (2008).
182. Romieu-Mourez, R. *et al.* Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 7963–7973 (2009).
183. Jiang, X.-X. *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105, 4120–4126 (2005).
184. English, K., Barry, F. P. & Mahon, B. P. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol. Lett.* 115, 50–58 (2008).
185. Spaggiari, G. M., Abdelrazik, H., Becchetti, F. & Moretta, L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 113, 6576–6583 (2009).
186. Eagar, T. N. *et al.* Notch 1 signaling regulates peripheral T cell activation. *Immunity* 20, 407–415 (2004).
187. Amsen, D. *et al.* Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117, 515–526 (2004).
188. Li, Y.-P. *et al.* Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 1598–1608 (2008).
189. Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C. & Moretta, L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107, 1484–1490 (2006).

190. Krampera, M., Franchini, M., Pizzolo, G. & Aprili, G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* 5, 120–129 (2007).
191. Sheng, H. *et al.* A critical role of IFN $\gamma$  in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res.* 18, 846–857 (2008).
192. Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W.-F. & Dazzi, F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105, 2821–2827 (2005).
193. Ren, G. *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2, 141–150 (2008).
194. Han, K. H. *et al.* Immunosuppressive mechanisms of embryonic stem cells and mesenchymal stem cells in alloimmune response. *Transpl. Immunol.* 25, 7–15 (2011).
195. English, K. *et al.* Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 156, 149–160 (2009).
196. Casiraghi, F. *et al.* Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 3933–3946 (2008).
197. Engela, A. U., Baan, C. C., Dor, F. J. M. F., Weimar, W. & Hoogduijn, M. J. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Front. Immunol.* 3, 126 (2012).
198. Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Bestard, O. & Grinyó, J. M. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Front. Immunol.* 3, 212 (2012).
199. Ge, W. *et al.* Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 1760–1772 (2009).
200. Corcione, A. *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107, 367–372 (2006).
201. Rasmusson, I., Le Blanc, K., Sundberg, B. & Ringdén, O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand. J. Immunol.* 65, 336–343 (2007).
202. Traggiai, E. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 562–569 (2008).
203. Gao, F. *et al.* Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis.* 7, e2062 (2016).

204. Reinders, M. E. J., Fibbe, W. E. & Rabelink, T. J. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 25, 17–24 (2010).
205. Rojas, M. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33, 145–152 (2005).
206. Stefani, G. & Slack, F. J. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 219–230 (2008).
207. Sarma, N. J. *et al.* Modulation of immune responses following solid organ transplantation by microRNA. *Exp. Mol. Pathol.* 93, 378–385 (2012).
208. Furer, V., Greenberg, J. D., Attur, M., Abramson, S. B. & Pillinger, M. H. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 136, 1–15 (2010).
209. Kalimeris, K. *et al.* Pretreatment with sevoflurane attenuates direct lung injury. *Minerva Anesthesiol.* 80, 635–644 (2014).
210. Kayano, K., Toda, K., Naka, Y. & Pinsky, D. J. Identification of optimal conditions for lung graft storage with Euro-Collins solution by use of a rat orthotopic lung transplant model. *Circulation* 100, II257-261 (1999).
211. DeCampos, K. N., Keshavjee, S., Liu, M. & Slutsky, A. S. Optimal inflation volume for hypothermic preservation of rat lungs. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 17, 599–607 (1998).
212. Santana Rodríguez, N. *et al.* Technical modifications of the orthotopic lung transplantation model in rats with brain-dead donors. *Arch. Bronconeumol.* 47, 488–494 (2011).
213. Tanaka, Y. *et al.* Optimal lung inflation techniques in a rat lung transplantation model: a revisit. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 62, 427–433 (2014).
214. de Perrot, M. & Keshavjee, S. Lung preservation. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 16, 300–308 (2004).
215. Zuk, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228 (2001).
216. Marboe, C. C. Pathology of lung transplantation. *Semin. Diagn. Pathol.* 24, 188–198 (2007).
217. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408 (2001).
218. Bernet, G. & Llorens, C. GPRO: the professional tool for management, functional analysis and annotation of omic sequences and databases.
219. Schmieder, R. & Edwards, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 27, 863–864 (2011).

220. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359 (2012).
221. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 139–140 (2010).
222. Davidson, N. M. & Oshlack, A. Corset: enabling differential gene expression analysis for de novo assembled transcriptomes. *Genome Biol.* 15, 410 (2014).
223. Papadopoulos, G. L., Alexiou, P., Maragkakis, M., Reczko, M. & Hatzigeorgiou, A. G. DIANA-mirPath: Integrating human and mouse microRNAs in pathways. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 1991–1993 (2009).
224. Hsu, S.-D. *et al.* miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 39, D163-169 (2011).
225. Hachem, R. R. *et al.* The significance of a single episode of minimal acute rejection after lung transplantation. *Transplantation* 80, 1406–1413 (2005).
226. Lazarus, H. M., Haynesworth, S. E., Gerson, S. L., Rosenthal, N. S. & Caplan, A. I. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* 16, 557–564 (1995).
227. Perico, N. *et al.* Mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: pretransplant infusion protects from graft dysfunction while fostering immunoregulation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 26, 867–878 (2013).
228. Roemeling-van Rhijn, M. *et al.* Human Bone Marrow- and Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal Cells are Immunosuppressive In vitro and in a Humanized Allograft Rejection Model. *J. Stem Cell Res. Ther. Suppl* 6, 20780 (2013).
229. Benseler, V. *et al.* MSC-based therapies in solid organ transplantation. *Hepatol. Int.* 8, 179–184 (2014).
230. Watanabe, H. *et al.* Adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate rejection in a rat lung transplantation model. *J. Surg. Res.* 227, 17–27 (2018).
231. Sudres, M. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176, 7761–7767 (2006).
232. Nauta, A. J. *et al.* Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 108, 2114–2120 (2006).
233. Chan, W. K. *et al.* MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge. *Exp. Hematol.* 36, 1545–1555 (2008).
234. Gundra, U. M. *et al.* Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood* 123, e110-122 (2014).

235. Lu, J. *et al.* Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney Int.* 84, 745–755 (2013).
236. Arango Duque, G. & Descoteaux, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 5, 491 (2014).
237. van Besouw, N. M., Balk, A. H., Mochtar, B., Vaessen, L. M. & Weimar, W. Phenotypic analysis of lymphocytes infiltrating human cardiac allografts during acute rejection and the development of graft vascular disease. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 9 Suppl 1, S234–236 (1996).
238. Makhlouf, L. *et al.* Depleting anti-CD4 monoclonal antibody cures new-onset diabetes, prevents recurrent autoimmune diabetes, and delays allograft rejection in nonobese diabetic mice. *Transplantation* 77, 990–997 (2004).
239. Newell, K. A. *et al.* Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD4+ but not CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 2358–2362 (1999).
240. Jones, N. D. *et al.* Effector and memory CD8+ T cells can be generated in response to alloantigen independently of CD4+ T cell help. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 2316–2323 (2006).
241. Polchert, D. *et al.* IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur. J. Immunol.* 38, 1745–1755 (2008).
242. Hoogduijn, M. J. *et al.* Mesenchymal stem cells induce an inflammatory response after intravenous infusion. *Stem Cells Dev.* 22, 2825–2835 (2013).
243. Lin, G. *et al.* Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 17, 1053–1063 (2008).
244. Roufousse, C. A., Direkze, N. C., Otto, W. R. & Wright, N. A. Circulating mesenchymal stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 585–597 (2004).
245. Ivanova-Todorova, E. *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol. Lett.* 126, 37–42 (2009).
246. Zheng, G. *et al.* Human adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate obliterative bronchiolitis in a murine model via IDO. *Respir. Res.* 18, 119 (2017).
247. Sharma, R. R., Pollock, K., Hubel, A. & McKenna, D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion (Paris)* 54, 1418–1437 (2014).
248. Lloncop, P. *et al.* Airway transplantation of adipose stem cells protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* 66, 739–746 (2018).

249. Holubova, M., Lysak, D., Vlas, T., Vannucci, L. & Jindra, P. Expanded cryopreserved mesenchymal stromal cells as an optimal source for graft-versus-host disease treatment. *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* 42, 139–144 (2014).
250. Galipeau, J. The mesenchymal stromal cells dilemma--does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy* 15, 2–8 (2013).
251. Wysoczynski, M., Khan, A. & Bolli, R. New Paradigms in Cell Therapy: Repeated Dosing, Intravenous Delivery, Immunomodulatory Actions, and New Cell Types. *Circ. Res.* 123, 138–158 (2018).
252. Liu, X.-J. *et al.* Reciprocal effect of mesenchymal stem cell on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-6. *Clin. Exp. Immunol.* 158, 37–44 (2009).
253. Tang, X.-L. *et al.* Repeated Administrations of Cardiac Progenitor Cells Are Superior to a Single Administration of an Equivalent Cumulative Dose. *J. Am. Heart Assoc.* 7, (2018).
254. Tokita, Y. *et al.* Repeated Administrations of Cardiac Progenitor Cells Are Markedly More Effective Than a Single Administration: A New Paradigm in Cell Therapy. *Circ. Res.* 119, 635–651 (2016).
255. Guo, Y. *et al.* Repeated doses of cardiac mesenchymal cells are therapeutically superior to a single dose in mice with old myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 112, 18 (2017).
256. Wan, C.-D., Cheng, R., Wang, H.-B. & Liu, T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. HBPD INT* 7, 29–33 (2008).
257. Popp, F. C. *et al.* Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transpl. Immunol.* 20, 55–60 (2008).
258. Liu, Y., Yang, R. & Shi, S. Systemic Infusion of Mesenchymal Stem Cells Improves Cell-Based Bone Regeneration via Upregulation of Regulatory T Cells. *Tissue Eng. Part A* 21, 498–509 (2015).
259. Devine, S. M., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A. & Hoffman, R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 101, 2999–3001 (2003).
260. Barbash, I. M. *et al.* Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108, 863–868 (2003).
261. Ladak, S. S., Ward, C. & Ali, S. The potential role of microRNAs in lung allograft rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 35, 550–559 (2016).
262. Kishore, A., Borucka, J., Petrakova, J. & Petrek, M. Novel insights into miRNA in lung and heart inflammatory diseases. *Mediators Inflamm.* 2014, 259131 (2014).

263. Bader, A. G., Brown, D. & Winkler, M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res.* 70, 7027–7030 (2010).
264. Huang, C. *et al.* MicroRNA and mRNA expression profiling in rat acute respiratory distress syndrome. *BMC Med. Genomics* 7, 46 (2014).
265. Sherstyuk, V. V. *et al.* Genome-wide profiling and differential expression of microRNA in rat pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 7, (2017).
266. Xu, Z. *et al.* De novo-developed antibodies to donor MHC antigens lead to dysregulation of microRNAs and induction of MHC class II. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 6133–6143 (2015).



# **Anexos**

---



## Anexo I. Indicaciones de los trasplantes pulmonares

Grupo de edad	Indicaciones en niños	Porcentaje trasplantes
Menos de 1 año	Deficiencia proteína b surfactante	17
	Enfermedad congénita del corazón	17
	Hipertensión arterial pulmonar idiopática	13
1 - 5 años	Hipertensión arterial pulmonar idiopática	22
	Fibrosis pulmonar idiopática	17
	Fibrosis pulmonar (otras causas)	9
	Retrasplante	9
6 - 10 años	Fibrosis quística	53
	Hipertensión arterial pulmonar idiopática	9
	Bronquiolitis obliterante (sin retrasplante)	7
	Retrasplante	6
	Fibrosis pulmonar idiopática	6
11 - 17 años	Fibrosis quística	71
	Hipertensión arterial pulmonar idiopática	8
	Retrasplante	5

Obtenido de *Pediatric lung transplantation: indications and outcomes*<sup>2</sup>

Indicaciones en adultos	Total (%)
EPOC* (sin deficiencia de $\alpha$ 1-antitripsina)	33,5
EPOC* (con deficiencia de $\alpha$ 1-antitripsina)	5,8
Enfermedad pulmonar intersticial (sin fibrosis pulmonar idiopática)	23,7
Bronquiectasia asociada a fibrosis quística	16,6
Hipertensión pulmonar arterial idiopática	3,1
Fibrosis pulmonar	3,7
Bronquiectasia	2,7
Retrasplante (bronquiolitis obliterante)	1,5
Retrasplante (sin bronquiolitis obliterante)	1,1
Sarcoidosis	2,5
Enfermedad del tejido conectivo	1,3
Bronquiolitis obliterante, sin retrasplante	1,1
Linfangiomiomatosis	1
Enfermedad congénita del corazón	0,9
Cáncer	0,1
Otras causas	1,4
* EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica	

Obtenido de *Indications and outcomes in adult lung transplantation*<sup>1</sup>.

## Anexo II. Relación de citoquinas y quimioquinas estudiadas y su función

<b>CITOQUINAS</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Tipo</b>	<b>Síntesis</b>	<b>Función</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Proinflamatoria	Macrófagos	Favorece la diferenciación, proliferación y apoptosis de las células inmunes. Puede inducir fibrosis pulmonar y liberación de otras citoquinas inflamatorias y alterar la barrera epitelio-alveolar causando edema pulmonar.
<b>IL-2</b>	Proinflamatoria	Linfocitos T helper 1	Tiene su acción sobre linfocitos T, tanto los que lo producen como otras subpoblaciones, como los linfocitos reguladores. Estimula la liberación de otras citoquinas como TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ o IL-1.
<b>IL-4</b>	Antiinflamatoria	Mastocitos, T helper y basófilos.	Se induce por linfocitos B. Inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias, aumenta la producción de IL-1Ra y favorece la reparación epitelial. Puede provocar fibrosis pulmonar.
<b>IL-6</b>	Pleiotrópica	Monocitos, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales	Induce la diferenciación y activación de las células B y T, activación de monocitos y macrófagos e intervienen en la reparación del epitelio y endotelio.
<b>IL-10</b>	Antiinflamatoria	Monocitos, CD8+, T helper 2	Inhibe la diferenciación de células Th, macrófagos y células dendríticas, la liberación de quimioquinas y citoquinas así como produce la supresión de los neutrófilos.
<b>IL-12</b>	Proinflamatoria	Macrófagos y linfocitos	Induce la proliferación de Natural Killer y linfocitos y, en consecuencia, la producción de INF- $\gamma$ e inhibe la producción de IL-4 e IL-10.
<b>IL-13</b>	Pleiotrópica	Mastocitos, Natural Killer y Th2	Supresión de la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-8) y aumento de la producción de IL-1Ra. Aumenta el colágeno de fibroblastos y macrófagos.
<b>IL-17</b>	Proinflamatoria	Linfocitos T helper 17	Activa células inflamatorias (monocitos y neutrófilos) células endoteliales y epiteliales. Estimula la producción de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión.

<b>IL-22</b>	Pleiotrópica	Natural Killer y Linfocitos Th17	Su acción proinflamatoria o de protección de tejido puede estar regulada por la expresión de IL-17. En el pulmón, puede inhibir la inflamación y el daño pulmonar y proteger frente a la fibrosis.
<b>IL-23</b>	Proinflamatoria	Monocitos y células dendríticas	Diferenciación de Th17 en presencia de TGF- $\beta$ e IL-6. Además, favorece la proliferación de linfocitos CD4+ de memoria y estimula la producción de IFN- $\gamma$ por las células dendríticas y Natural Killer.
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Pleiotrópica	Macrófagos, linfocitos, células endoteliales	Inhibe la expresión de moléculas de adhesión proinflamatorias, como IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ o IFN- $\gamma$ así como la activación de células CD4+ y CD8+ y proliferación de linfocitos B. Induce también la fibrosis en pulmones.
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Proinflamatoria	Macrófagos, neutrófilos, CD4+, Natural Killer, células endoteliales...	Induce la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, el reclutamiento de células inflamatorias. Aumenta la permeabilidad de la barrera alveolar y con ello el edema pulmonar e interviene en mecanismos de reparación.
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	proinflamatoria	Linfocitos T CD4+ y Natural Killer	Recluta monocitos e induce la activación de macrófagos, células dendríticas y Natural Killer, aumentando la secreción de IL-12.

### CITOQUINAS QUIMIOTÁCTICAS / RECEPTORES

Nombre	Tipo	Síntesis	Función
<b>CCL2 (MCP1)</b>	Quimioquina	Monocitos, macrófagos, células endoteliales y dendríticas	Recibe el nombre de "proteína quimiotáctica de monocitos 1". Atrae monocitos, células dendríticas y linfocitos T de memoria. Su receptor es CCR2.
<b>CCL5 (RANTES)</b>	Quimioquina	Células hematopoyéticas y no hematopoyéticas	Atrae a monocitos, linfocitos T helper, eosinófilos y basófilos. Con IL-2 e IFN- $\gamma$ (producido por linfocitos T), estimula la proliferación y activación de Natural Killer. Su receptor es CCR5.

<b>CXCL1 (Gro-<math>\alpha</math>)</b>	Quimioquina	Macrófagos, neutrófilos, células epiteliales	Actividad quimiotáctica de neutrófilos. Su receptor es CXCR2.
<b>CXCL3</b>	Quimioquina	Plaquetas, megacariocitos	Interviene en la migración y adhesión de monocitos en la zona de inflamación, así como quimiotaxis de neutrófilos. Además, muestran efecto angiogénico. Su receptor es el CXCR2.
<b>CXCR1</b>	Receptor quimioquina	Neutrófilos	Receptor de IL-8 (CXCL8), que al unirse en los neutrófilos, estimula su activación y quimiotaxis. También receptor de CXCL6.
<b>CXCR2</b>	Receptor quimioquina	Neutrófilos	Receptor de CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 y CXCL8. Media la migración de neutrófilos.
<b>CXCR3</b>	Receptor quimioquina	Linfocitos T, Natural Killer y células epiteliales	Receptor de CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Regula la migración de leucocitos y promueve la estimulación de células Th1. Implicada en fibrosis pulmonar y rechazo agudo.

## Anexo III. Artículos publicados durante el periodo de doctorado

### 1. Relacionados con la tesis doctoral

- Ruiz-Pérez D, Largo C, García-Río F. **Technical Aspects and Benefits of Experimental Mouse Lung Transplantation.** Arch Bronconeumol. 2016 Dec;52(12):596-604
- Gauthier JM, Ruiz-Pérez D, Li W, Hachem RR, Puri V, Gelman AE, Kreisel D. **Diagnosis, Pathophysiology and Experimental Models of Chronic Lung Allograft Rejection.** ransplantation. 2018 Sep;102(9):1459-1466
- Siao HM, Fernandez R, Tanaka S, Li W, Spahn JH, Chiu S, Akbarpour M, Ruiz-Perez D, Wu Q, Turam C, Scozzi D, Takahashi T, Luehmann HP, Puri V, Budinger GRS, Krupnick AS, Misharin AV, Lavine KJ, Liu Y, Gelman AE, Bharat A, Kreisel D. **Spleen-derived classical monocytes mediate lung ischemia-reperfusion injury through IL-1 $\beta$ .** J Clin Invest. 2018 Jul 2;128(7):2833-2847

### 2. No relacionados con la tesis doctoral

- Ruiz-Pérez D, Benito J, Largo C, Polo G, Canfrán S, Gómez de Segura IA. **Metamizole (dipyrone) effects on sevoflurane requirements and postoperative hyperalgesia in rats.** Lab Anim. 2017 Aug;51(4):365-375
- Ruiz-Pérez D, Benito J, Polo G, Largo C, Aguado D, Sanz L, Gómez de Segura IA. **The Effects of the Toll-Like Receptor 4 Antagonist, Ibudilast, on Sevoflurane's Minimum Alveolar Concentration and the Delayed Remifentanil-Induced Increase in the Minimum Alveolar Concentration in Rats.** Anesth Analg. 2016 May;122(5):1370-6





Review

## Technical Aspects and Benefits of Experimental Mouse Lung Transplantation<sup>☆</sup>



Daniel Ruiz-Pérez,<sup>a</sup> Carlota Largo,<sup>a</sup> Francisco García-Río<sup>b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain

<sup>b</sup> Servicio de Neumología, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>d</sup> CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Spain

### ARTICLE INFO

**Article history:**

Received 4 February 2016

Accepted 15 April 2016

Available online 1 November 2016

**Keywords:**

Transplantation

Mouse model

Experimental

Lung

### ABSTRACT

In recent years, the number of lung transplantations performed as the last option for many respiratory diseases has grown considerably, both in adults and children. However, the causes for the relatively short survival of lungs compared to other organ transplants still need to be studied.

Techniques have improved since the 1950s when experimental lung transplantation began, and the different animal species used now include rodents. The advantage of using these small species is that the surgical model has been expanded and standardized, and different respiratory problems can be studied.

In this review we examine the different technical strategies used in experimental transplantation in rats and mice, focusing on surgical techniques and anesthesia and monitoring methods, and highlighting the major contributions of mouse lung transplantation to the field.

© 2016 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Aspectos técnicos y utilidades del trasplante pulmonar experimental murino

### RESUMEN

A lo largo de las últimas décadas, el número de trasplantes pulmonares realizados como terapia final de muchas enfermedades respiratorias ha ido creciendo considerablemente, tanto en la población adulta como a nivel pediátrico. Sin embargo, se hace muy necesario estudiar las causas por las que su supervivencia es relativamente baja en comparación con otros trasplantes de órganos.

Por ello, desde mediados del siglo pasado comenzaron a realizarse trasplantes pulmonares experimentales, cuya técnica ha ido mejorando, y se ha ampliado a distintas especies animales hasta llegar a los roedores. La ventaja que presentan estas especies pequeñas ha facilitado que el modelo quirúrgico se haya extendido y estandarizado, permitiendo estudiar diferentes aspectos relacionados con las enfermedades respiratorias.

En esta revisión se analizan las distintas modalidades técnicas disponibles de trasplante experimental en rata y ratón, destacando tanto la técnica quirúrgica como la anestésica o la monitorización, así como las principales aportaciones generadas por el trasplante pulmonar murino.

© 2016 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

**Palabras clave:**

Trasplante

Modelo murino

Experimental

Pulmón

### Introduction

Lung transplantation is occasionally the only therapeutic option available in the final stages of respiratory diseases such as chronic

obstructive pulmonary disease, diffuse interstitial pulmonary disease, bronchiectasis associated with cystic fibrosis, bronchiolitis obliterans, sarcoidosis or arterial pulmonary hypertension.<sup>1–3</sup>

Since the first transplantations were performed in animals in 1940,<sup>4,5</sup> these experimental models have contributed to the development of surgical procedures and the prevention of associated complications, such as rejection or ischemia–reperfusion injury. Although the first mouse transplantation took place in 1971,<sup>6</sup> in the 20th century the procedure was generally performed in dogs,<sup>4,5</sup> pigs,<sup>7</sup> and monkeys,<sup>8–10</sup> since larger animals offer

<sup>☆</sup> Please cite this article as: Ruiz-Pérez D. Aspectos técnicos y utilidades del trasplante pulmonar experimental murino. Arch Bronconeumol. 2016;52:596–604.

\* Corresponding author.

E-mail address: [fgr01m@gmail.com](mailto:fgr01m@gmail.com) (F. García-Río).

# Diagnosis, Pathophysiology and Experimental Models of Chronic Lung Allograft Rejection

Jason M. Gauthier, MD,<sup>1</sup> Daniel Ruiz-Pérez, DVM, MS,<sup>1,2</sup> Wenjun Li, MD,<sup>1</sup> Ramsey R. Hachem, MD,<sup>3</sup> Varun Puri, MD, MSCI,<sup>1</sup> Andrew E. Gelman, PhD,<sup>1,4</sup> and Daniel Kreisel, MD, PhD<sup>1,4</sup>

**Abstract:** Chronic rejection is the Achilles heel of modern lung transplantation, characterized by a slow, progressive decline in allograft function. Clinically, this manifests as obstructive disease, restrictive disease, or a mixture of the 2 depending on the underlying pathology. The 2 major phenotypes of chronic rejection include bronchiolitis obliterans syndrome and restrictive allograft syndrome. The last decade of research has revealed that each of these phenotypes has a unique underlying pathophysiology which may require a distinct treatment regimen for optimal control. Insights into the intricate alloimmune pathways contributing to chronic rejection have been gained from both large and small animal models, suggesting directions for future research. In this review, we explore the pathological hallmarks of chronic rejection, recent insights gained from both clinical and basic science research, and the current state of animal models of chronic lung rejection.

(*Transplantation* 2018;102: 1459–1466)

Lung transplantation outcomes have improved over the last 2 decades. Advances in operative technique, donor selection, and postoperative care have improved short-term outcomes.<sup>1,2</sup> Long-term outcomes, however, remain disappointing, and the median survival is 5.3 years.<sup>3</sup> This comparatively poor long-term survival is predominantly a result of chronic rejection, which affects approximately 50% of patients at 5 years and is the leading cause of mortality beyond the first year after transplantation.<sup>3,4</sup> Traditionally, the mainstay of treatment for chronic rejection has entailed a change in the patient's immunosuppressive regimen.<sup>5</sup> Although some studies have shown marginal benefits with this approach, chronic rejection typically progresses inexorably to respiratory failure and death.

Research over the last decade has revealed that chronic rejection is a heterogeneous process with a variety of immune

responses contributing to it, in part explaining why some patients respond to medical interventions while others do not.<sup>6,7</sup> Innate and adaptive immunities, both humoral and cellular arms, contribute to chronic rejection, which can present clinically in a variety of phenotypes, as discussed below. Experimental models of chronic rejection in small and large animals have provided a great deal of insight into these complex and interwoven immune pathways.<sup>8,9</sup> Technical barriers initially limited these experimental models to large animal models of orthotopic lung transplants, which lack immunological tools to conduct mechanistic studies, and heterotopic tracheal transplants in rodents, which may not adequately model basic physiological processes of clinical lung transplantation.<sup>10,11</sup> Two decades of perfecting animal transplantation techniques has created models that are now more applicable to human subjects, and recent findings have directed novel targets of therapy and suggest future areas of investigation.

## Chronic Lung Allograft Dysfunction

The term “chronic lung allograft dysfunction” (CLAD) has emerged over the last decade as an umbrella term for the diagnosis for patients with chronic lung dysfunction after transplantation.<sup>12</sup> Chronic lung allograft dysfunction comprises 2 phenotypes with some overlap. Obliterative bronchiolitis (OB) is the prototypic form of chronic rejection and CLAD. Obliterative bronchiolitis results in an obstructive ventilatory defect, and therefore, is sometimes referred to as obstructive CLAD. Histologically, this is characterized by luminal obliteration of respiratory and terminal bronchioles, but because histologic confirmation is difficult with transbronchial lung biopsy, bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) is the clinical surrogate.<sup>13</sup> Bronchiolitis obliterans syndrome is defined according to changes in spirometry. Baseline pulmonary function is defined as the mean of the 2 best posttransplant

Received 13 February 2018. Revision received 4 April 2018.

Accepted 9 April 2018.

<sup>1</sup> Division of Cardiothoracic Surgery, Department of Surgery.

<sup>2</sup> Division of Experimental Surgery, La Paz University Hospital Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine.

<sup>4</sup> Department of Pathology and Immunology Washington University School of Medicine Saint Louis, Missouri.

D.K. is on the scientific advisory board of Compass Therapeutics. All other authors declare no conflicts of interest.

DK is supported by NIH 1P01AI116501, R01 HL094601, Veterans Administration Merit Review 1101BX002730, and the Foundation for Barnes-Jewish Hospital.

Each author participated in the writing of this article and approved the final version for submission.

Correspondence: Daniel Kreisel, MD, PhD, Campus Box 8234, 660 South Euclid Ave, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110. (kreisel@wustl.edu).

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0041-1337/18/10209-1459

DOI: 10.1097/TP.0000000000002250

# Spleen-derived classical monocytes mediate lung ischemia-reperfusion injury through IL-1 $\beta$

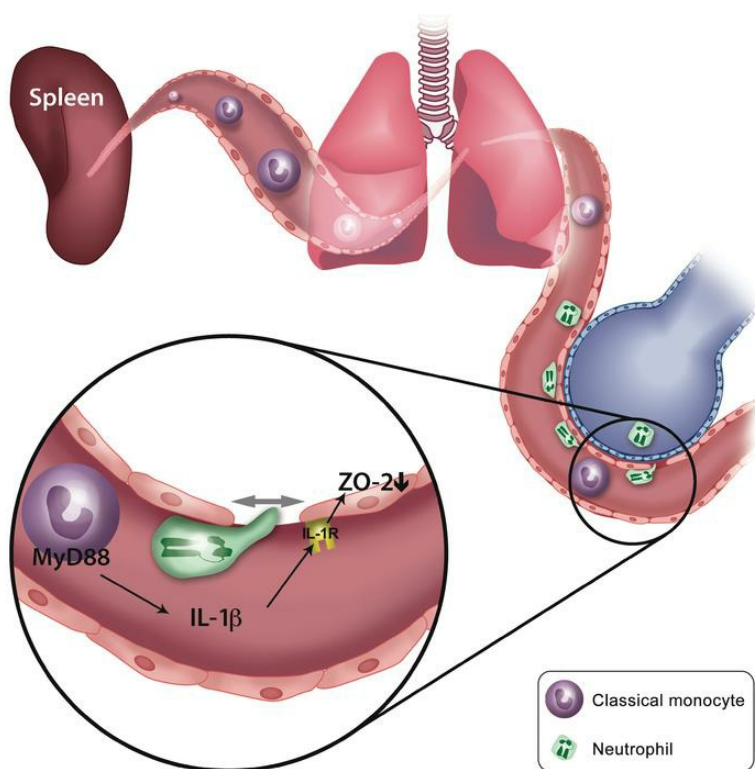
Hsi-Min Hsiao, ... , Ankit Bharat, Daniel Kreisel

*J Clin Invest.* 2018. <https://doi.org/10.1172/JCI98436>.

Research Article

Transplantation

## Graphical abstract



Find the latest version:

<http://jci.me/98436/pdf>



# Spleen-derived classical monocytes mediate lung ischemia-reperfusion injury through IL-1 $\beta$

Hsi-Min Hsiao,<sup>1</sup> Ramiro Fernandez,<sup>2</sup> Satona Tanaka,<sup>1</sup> Wenjun Li,<sup>1</sup> Jessica H. Spahn,<sup>1</sup> Stephen Chiu,<sup>2</sup> Mahzad Akbarpour,<sup>2</sup> Daniel Ruiz-Perez,<sup>1</sup> Qiang Wu,<sup>2</sup> Cem Turam,<sup>1</sup> Davide Scozzi,<sup>1</sup> Tsuyoshi Takahashi,<sup>1</sup> Hannah P. Luehmann,<sup>3</sup> Varun Puri,<sup>1</sup> G.R. Scott Budinger,<sup>4</sup> Alexander S. Krupnick,<sup>5</sup> Alexander V. Misharin,<sup>4</sup> Kory J. Lavine,<sup>6</sup> Yongjian Liu,<sup>3</sup> Andrew E. Gelman,<sup>1,7</sup> Ankit Bharat,<sup>2,4</sup> and Daniel Kreisel<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgery, Washington University in St. Louis, St. Louis, Missouri, USA. <sup>2</sup>Department of Surgery, Northwestern University, Chicago, Illinois, USA. <sup>3</sup>Department of Radiology, Washington University in St. Louis, St. Louis, Missouri, USA. <sup>4</sup>Department of Medicine, Northwestern University, Chicago, Illinois, USA. <sup>5</sup>Department of Surgery, The University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA. <sup>6</sup>Department of Medicine, and <sup>7</sup>Department of Pathology & Immunology, Washington University in St. Louis, St. Louis, Missouri, USA.

Ischemia-reperfusion injury, a form of sterile inflammation, is the leading risk factor for both short-term mortality following pulmonary transplantation and chronic lung allograft dysfunction. While it is well recognized that neutrophils are critical mediators of acute lung injury, processes that guide their entry into pulmonary tissue are not well understood. Here, we found that CCR2<sup>+</sup> classical monocytes are necessary and sufficient for mediating extravasation of neutrophils into pulmonary tissue during ischemia-reperfusion injury following hilar clamping or lung transplantation. The classical monocytes were mobilized from the host spleen, and splenectomy attenuated the recruitment of classical monocytes as well as the entry of neutrophils into injured lung tissue, which was associated with improved graft function. Neutrophil extravasation was mediated by MyD88-dependent IL-1 $\beta$  production by graft-infiltrating classical monocytes, which downregulated the expression of the tight junction-associated protein ZO-2 in pulmonary vascular endothelial cells. Thus, we have uncovered a crucial role for classical monocytes, mobilized from the spleen, in mediating neutrophil extravasation, with potential implications for targeting of recipient classical monocytes to ameliorate pulmonary ischemia-reperfusion injury in the clinic.

## Introduction

Ischemia-reperfusion injury (IRI) following solid organ transplantation is mediated by host neutrophils that, upon extravasation, initiate NETosis and induce allograft damage (1, 2). Following lung transplantation, IRI leads to primary graft dysfunction in over 50% of lung recipients, which is the predominant risk factor for early mortality as well as chronic rejection and thus late mortality (3–6). While depletion of neutrophils can ameliorate IRI, it can also compromise the pathogen-directed response of the host (7–11). Elucidating the mechanisms of neutrophil trafficking into the allograft is, therefore, crucial to developing clinically applicable therapies against IRI.

Blood monocytes can be classified into nonclassical and classical subtypes based on cell surface markers (12, 13). Classical monocytes are characterized by a high expression of the cell-surface molecule Ly6C and the presence of the chemokine receptor CCR2. They are the predominant monocytes found in the circulation, where they survey organ spaces and readily respond to inflammatory cues. Classical monocytes are generally regarded as “proinflammatory,” as they are readily recruited to sites of infectious and sterile inflamma-

tion, where they elaborate proinflammatory cytokines and differentiate into macrophages and dendritic cells (13). Nonclassical monocytes, in contrast, lack expression of CCR2, but express low levels of Ly6C and high levels of the fractalkine receptor CX<sub>3</sub>CR1. These cells patrol the microvasculature in a CX<sub>3</sub>CR1-dependent manner, and although less is known about the development and function of nonclassical monocytes, recent studies have implicated this monocyte subtype in various inflammatory processes (14–21). The precise role of monocytes in mediating neutrophil migration into injured tissues remains unclear. We recently found that donor-derived nonclassical monocytes are necessary for early neutrophil recruitment through the production of the neutrophil chemoattractant MIP-2 and that depletion of these cells ameliorates lung IRI (21). Interestingly, using intravital 2-photon imaging, we have previously observed that circulating monocytes facilitate neutrophil trafficking into freshly reperfused lungs. Furthermore, we found that pulmonary graft function is significantly improved when lung-transplant recipients lack CCR2 expression, which impairs recruitment of classical monocytes to lung grafts (9, 22). Since both recruitment to the tissue and extravasation of neutrophils into the extravascular space are necessary for the initiation and propagation of lung IRI (23), it can be postulated that classical monocytes are perhaps essential for neutrophil extravasation. Therefore, we hypothesized that nonclassical and classical monocytes may have complementary roles in the development of IRI, in which nonclassical monocytes provide the initial signals for leukocyte recruitment, while host-derived classical monocytes are essential for the extravasation of neutrophils into the injured lungs.

**Authorship note:** HMH and RF contributed equally to this work. AB and DK are co-senior authors.

**Conflict of interest:** YL, DK, and KJL have a pending US patent entitled “Compositions and methods for detecting CCR2 receptors” (application number 15/611,577).

**Submitted:** November 3, 2017; **Accepted:** April 4, 2018.

**Reference information:** *J Clin Invest*. <https://doi.org/10.1172/JCI98436>.

# Metamizole (dipyrone) effects on sevoflurane requirements and postoperative hyperalgesia in rats

Daniel Ruiz-Pérez<sup>1,2</sup>, Javier Benito<sup>1,\*</sup>, Carlota Largo<sup>2</sup>, Gonzalo Polo<sup>1</sup>, Susana Canfrán<sup>1</sup> and Ignacio Alvarez Gómez de Segura<sup>1</sup>

Laboratory Animals  
0(0) 1–9  
© The Author(s) 2016  
Reprints and permissions:  
sagepub.co.uk/  
journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/0023677216671553  
la.sagepub.com



## Abstract

Unlike non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), metamizole has poor anti-inflammatory effects; and is suitable for models where analgesia, but not anti-inflammatory effects, is desirable. Like opioids, these drugs produce perioperative analgesia while reducing anaesthetic requirements, but it remains unclear whether they may develop tolerance or hyperalgesia, and thus decrease in analgesic efficacy. The aim was to determine whether tolerance or hyperalgesia to metamizole occurred in rats, and whether the sevoflurane minimum alveolar concentration (MAC) was affected. In a randomized, prospective, controlled study, male Wistar rats ( $n=8$  per group) were administered metamizole (300 mg/kg, day 4). Previously, the following treatments were provided: daily metamizole for four days (0–3), morphine (10 mg/kg; positive control, day 0 only) or saline (negative control). The main outcome measures were mechanical (MNT) and warm thermal (WNT) nociceptive quantitative sensory thresholds. The baseline sevoflurane MAC and the reduction produced by the treatments were also determined. The mean (SD) baseline MAC [2.4(0.2)%vol] was decreased by morphine and metamizole by 45(11)% and 33(7)% ( $P=0.000$ , both), respectively. Baseline MNT [35.4(4.5) g] and WNT [13.2(2.4) s] were decreased by morphine and metamizole: MNT reduction of 22(6)% ( $P=0.000$ ) and 22(7)% ( $P=0.001$ ), respectively and WNT reduction of 34(14)% ( $P=0.000$ ) and 24(13)% ( $P=0.001$ ). The baseline MAC on day 4 was neither modified by treatments nor the MAC reduction produced by metamizole (days 0 and 4;  $P>0.05$ ). In conclusion, repeated metamizole administration may produce hyperalgesia, although it may not modify its anaesthetic sparing effect. The clinical relevance of this effect in painful research models requiring prolonged analgesic therapy warrants further investigation.

## Keywords

metamizole, dipyrone, MAC, hyperalgesia, sevoflurane

Metamizole (dipyrone) is one of the most commonly employed analgesic drugs, used in both the perioperative period<sup>1</sup> and for reducing postoperative opioid consumption in humans.<sup>2,3</sup> Compared with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), metamizole has low renal, cardiovascular and gastrointestinal toxicity. This relative absence of anti-inflammatory effects has encouraged its use in research in animal models of coagulation and inflammation,<sup>4</sup> including adjuvant-induced arthritis.<sup>5</sup> Metamizole has also been employed in neuropathic pain models, such as sciatic pain or acute lumbalgia, and in the postsurgical period.<sup>6</sup> Due to its unique actions, metamizole

<sup>1</sup>Comparative Pain Research Group, Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Experimental Surgery Unit, La Paz University Hospital, Madrid, Spain

### Corresponding author:

Ignacio A Gómez de Segura, Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid (UCM), Avda Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.  
Email: iagsegura@vet.ucm.es

\*Current address: Clinical Service of Anesthesia, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

# The Effects of the Toll-Like Receptor 4 Antagonist, Ibudilast, on Sevoflurane's Minimum Alveolar Concentration and the Delayed Remifentanyl-Induced Increase in the Minimum Alveolar Concentration in Rats

Daniel Ruiz-Pérez, DVM, MS,\* Javier Benito, DVM, MS,† Gonzalo Polo, DVM,\*  
Carlota Largo, DVM, PhD, MS,‡ Delia Aguado, DVM, PhD, MS,\* Luis Sanz, PhD,§  
and Ignacio A. Gómez de Segura, DVM, PhD, Dip ECVA, Dip ECLAM\*

**BACKGROUND:** Ultralow doses of naloxone, an opioid and toll-like receptor 4 antagonist, blocked remifentanyl-induced hyperalgesia and the associated increase in the minimum alveolar concentration (MAC), but not tolerance. The aim was to determine the effects of the toll-like receptor 4 antagonist, ibudilast, on the MAC in the rat and how it might prevent the effects of remifentanyl.

**METHODS:** Male Wistar rats were randomly allocated to 5 treatment groups ( $n = 7$  per group): 10 mg/kg ibudilast intraperitoneally, 240  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  remifentanyl IV, ibudilast plus remifentanyl, remifentanyl plus naloxone IV, or saline. The sevoflurane MAC was determined 3 times in every rat and every day (days 0, 2, and 4): baseline (MAC-A) and 2 further determinations were made after treatments, 1.5 hours apart (MAC-B and MAC-C).

**RESULTS:** A reduction in baseline MAC was produced on day 0 by ibudilast, remifentanyl, remifentanyl plus ibudilast, remifentanyl plus naloxone ( $P < 0.01$ ), but not saline. Similar effects were found on days 2 and 4. A tolerance to remifentanyl was found on days 0, 2, and 4, which neither ibudilast nor naloxone prevented. The MAC increase produced by remifentanyl on day 4 ( $P = 0.001$ ) was prevented by either ibudilast or naloxone.

**CONCLUSIONS:** Ibudilast, besides reducing the MAC, prevented the delayed increase in baseline MAC produced by remifentanyl but not the increase in MAC caused by tolerance to remifentanyl. (Anesth Analg 2016;122:1370–6)

Opioids produce excellent analgesia, but their antinociceptive effects may be limited by the development of tolerance and hyperalgesia.<sup>1,2</sup> Tolerance may develop during months of chronic opioid treatment,<sup>3</sup> but it has also been observed after acute administration over days and hours.<sup>4</sup> In the rat, remifentanyl is related to the development of hyperalgesia and opioid tolerance, which, in turn, may produce a decrease in the sevoflurane-sparing effect of opioids.<sup>5</sup> The clinical consequences may include an increase

in anesthetic and opioid requirements during surgery, potentially increasing their undesirable dose-dependent side effects.<sup>6</sup> This is determined by measuring the reduction in the minimum alveolar concentration (MAC) produced by analgesics and is considered an indirect, although clinically valuable, method of determining analgesic potency during the intraoperative period.

Glial cell activation has been reported to have an important role in modulating the analgesia induced by chronic opioid administration or by high doses of opioids<sup>7–10</sup> and may contribute to opioid tolerance and withdrawal, factors that reduce the clinical efficacy of opioids as pain therapeutics.<sup>11–13</sup> Interestingly, the opioid antagonist and also toll-like receptor 4 (TLR4) antagonist, naloxone, may block remifentanyl-induced hyperalgesia and the associated increase in anesthetic requirements (MAC)<sup>6</sup> in the naive nonoperated rat. Ibudilast (AV-411) is a nonselective phosphodiesterase inhibitor and TLR4 receptor antagonist. It is also known to suppress glial cell activation<sup>14,15</sup> and has potential for the treatment of multiple sclerosis or neuropathic pain. It may also improve the efficacy and safety of opioids by decreasing opioid tolerance, withdrawal, and reinforcement.<sup>16</sup> Ibudilast may not only suppress the production of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin  $1\beta$ , but also increase the production of the anti-inflammatory cytokine interleukin 10 and various neurotrophic factors.<sup>14,17–20</sup> We hypothesized that ibudilast would significantly reduce the opioid tolerance effect associated with remifentanyl in rats and, second, that it would have a significant MAC-sparing effect with sevoflurane.

From the \*Comparative Pain Research Group, Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid (UCM), Madrid, Spain; †Clinical Service of Anesthesia, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, University of Montreal (UdM), Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada; ‡Experimental Surgery Unit, La Paz University Hospital (HULP), Madrid, Spain; and §Mathematics Faculty, Department of Statistics and Operations Research, Complutense University of Madrid (UCM), Madrid, Spain.

Daniel Ruiz-Pérez, DVM, MS, is currently affiliated with the Experimental Surgery Unit, La Paz University Hospital (HULP), Madrid, Spain.

Accepted for publication December 8, 2015.

Funding: This study has been funded by the Spanish Government (grant PI11-01241).

The authors declare no conflicts of interest.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website ([www.anesthesia-analgesia.org](http://www.anesthesia-analgesia.org)).

Reprints will not be available from the authors.

Address correspondence to Ignacio A. Gómez de Segura, DVM, PhD, Veterinary Faculty, Department of Animal Medicine and Surgery, Complutense University of Madrid (UCM), Avda, Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain. Address e-mail to [iagsegura@vet.ucm.es](mailto:iagsegura@vet.ucm.es).

Copyright © 2016 International Anesthesia Research Society  
DOI: 10.1213/ANE.0000000000001171