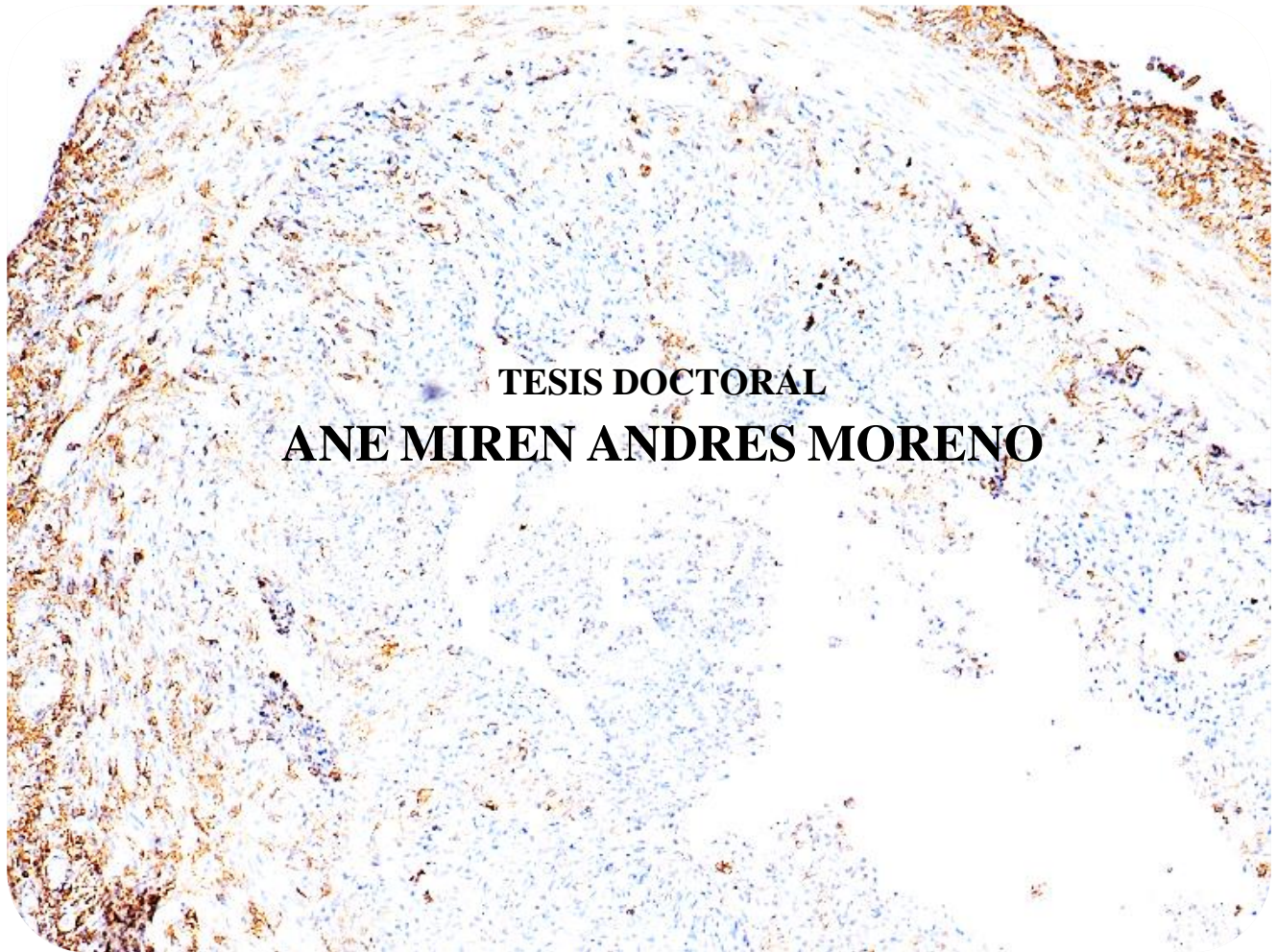


**TRASPLANTE INTESTINAL Y RECHAZO:  
ESTUDIO EXPERIMENTAL CON CÉLULAS TRONCALES  
MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO  
PARA SU PREVENCIÓN**

**Y**

**PERSPECTIVAS CLÍNICAS FUTURAS EN LA BÚSQUEDA  
DE LA TOLERANCIA INMUNOLÓGICA.**



**TESIS DOCTORAL  
ANE MIREN ANDRES MORENO**





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría

Programa de Doctorado del RD 1393/2007

**TRASPLANTE INTESTINAL Y RECHAZO:  
ESTUDIO EXPERIMENTAL CON CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES  
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO PARA SU PREVENCIÓN  
Y  
PERSPECTIVAS CLÍNICAS FUTURAS EN LA BÚSQUEDA DE LA TOLERANCIA  
INMUNOLÓGICA.**

Tesis Doctoral presentada por:

**Ane Miren Andrés Moreno**

Dirigida por:

**Prof. Juan Antonio Tovar Larrucea**

**Dr. Manuel López Santamaría**

Madrid, 2017



## **Certificado del Director**

**Prof. Manuel López Santamaría**, Prof. Asociado de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital U. La Paz y **Prof. Juan Antonio Tovar Larrucea**, Profesor Emérito de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada:

**TRASPLANTE INTESTINAL Y RECHAZO:  
ESTUDIO EXPERIMENTAL CON CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES  
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO PARA SU PREVENCIÓN  
Y  
PERSPECTIVAS CLÍNICAS FUTURAS EN LA BÚSQUEDA DE LA TOLERANCIA  
INMUNOLÓGICA.**

ha sido realizada bajo nuestra dirección por D<sup>a</sup>. **Ane Miren Andrés Moreno** durante los años 2010 a 2017. Este trabajo reúne los requisitos necesarios para su defensa pública y para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente certificado en Madrid a 10 de mayo de 2017. /



*A mis padres, que me regalaron una caña y me enseñaron a pescar. Que sin ser doctores, lo parecen. Que me enseñaron a sembrar, sin decirme que luego obtendría tantos frutos.*

*A Juanjo, por TODO, y a nuestros tres soles, Miguel, Irene y Javier, que son mi terapia, y al igual que en la investigación, me enseñan día a día humildad, a superar las frustraciones, a salir airosa de ellas, y a ilusionarme y a embarcarme en proyectos futuros.*

*A todos los que conocen el esfuerzo que me ha supuesto esta tesis, porque han estado ahí: Mara, Gerardo, Jorge, Jesús, Maria Amparo, Isa, Ana, Paco, Jose, Pablo S, Isa Taylor, Carlota, Mónica, Toñi, Pedro, Pablo, Domingo, Dani, Sol, Maite, Rosa, Elena, Mario, Toñi L, .... Muchas gracias por el apoyo, por sufrir mi testarudez, por vuestros sabios consejos, por vuestras risas, y por alegraros con mis pequeños éxitos del día a día.*





## AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, *Juan Antonio Tovar* y *Manuel López Santamaría*, mis máximos referentes en cirugía pediátrica y del trasplante, y en investigación, porque sigo aprendiendo de ellos cada día, y porque me han dejado y dejarán huella, que a su vez yo transmitiré.

A *Mónica Santamaría*, por ser una profesional y persona extraordinaria, que me animó a seguir con el proyecto y conseguir las células troncales mesenquimales, en momentos difíciles. Que, a partir de entonces, estuvo siempre disponible para colaborar y para ayudarme a orientar esta tesis.

A *Carlota Largo*, veterinaria y jefa del animalario, que desde el principio, me orientó con la parte experimental, de diseño, me enseñó mucho sobre las ratas, y también a encariñarme con ellas, me dio grandes consejos y me hizo formar parte de un equipo.

A *Luz* y a *Mariano*, que aparecieron en el momento justo para ayudarme a conseguir las células, y que sin ninguna pega, y con sólo palabras de ánimo, dieron un giro a este proyecto.

A *Soledad*, una históloga motivada, con muchas ganas de investigar, que también apareció justo a tiempo para no desesperar con la inmunohistoquímica. A *Maite* y a *Rosa*, por su también inestimable ayuda con las preparaciones y las inmunos.

A *Pablo Stringa*, un veterinario, trasplantador de ratas excepcional, y amigo, que compartió mi curva de aprendizaje con sabios consejos y palabras de ánimo, y que será un referente mundial del trasplante intestinal experimental en los próximos años.

A *Jose*, un gran amigo, compañero y cirujano, y experto en escuchar y aconsejar durante su tiempo libre, que no sé de donde lo saca, porque me ayudó no sólo económicamente a finalizar este proyecto, sino anímicamente y con sabios consejos.

A *Paco*, un gran amigo, compañero y mi maestro cirujano, que me metió en todo este lío así como quien no quiere la cosa, que me enseñó a trasplantar intestinos en ratas y, quien, desde el primer día que aterricé en este hospital, se empeña en embarcarme en mil asuntos, porque sabe que yo siempre pico.

A *Manolo Gámez*, que además de sus múltiples habilidades, también sabe, cómo no, anastomosar vasos en ratas. Que cuando va al experimental, todo el mundo le hace la ola, y aprender resulta más divertido. Gracias por escuchar, aconsejar, enseñar y dejar hacer.

A mis *compañeros de Cirugía Pediátrica*, a Toñi, Antonio, y Begoña, que conocen el esfuerzo que he invertido, y que me han echado una mano con soporte informático, impresión, ... hasta ordenando bloques en parafina.

A *Pablo, Pedro, Domingo, Dani...* que son el alma del experimental, porque han pasado visita conmigo a muchas ratas, algunas han conseguido reanimarlas, me han enseñado muchos trucos... Agradecerles sus palabras de ánimo y sus risas, y recordar una frase de Pablo al poco de llegar yo: “El experimental es el gimnasio de los deportistas, no creas que todos los cirujanos vienen aquí”, frase que consiguió subir mi autoestima y motivación.

## **¿POR QUÉ ES IMPORTANTE ESTA TESIS?**

Me planteo resumir en dos páginas por qué esta tesis merece la pena, y por qué tanto esfuerzo, muchas veces poco lucido, en la investigación. Pretendo leer estas páginas de nuevo al finalizar la redacción y comprobar que tenía razón al decir que sí merecía toda la pena.

Por azar, destino o por elección personal, nunca lo sabré, desde hace unos años el amplio círculo en el que mi mundo se movía, pasó a reducirse más y más. De un inmenso abanico de posibilidades, decidí dedicarme a curar a los demás, y este enfoque ya nunca más me permitió encontrar otro mejor para encontrar la felicidad en el trabajo. La cirugía y los niños, personas a las que siempre intento parecerme, volvieron a reducir mis miras, y sé que ni hoy ni en un futuro los cambiaría por nada ni nadie.

Un día, elegí un hospital que desde el principio me llamó por la posibilidad de formarme en el trasplante. Como tipo de cirugía y lección de anatomía, disciplina que me fascina y que enseño desde hace años, el trasplante no tenía rival, así como devolver una vida normal a un niño que de no ser trasplantado acabaría falleciendo en un periodo de tiempo más o menos corto. Y por suerte, mezclada con esfuerzo personal y motivación, supongo, se fueron abriendo puertas en mi mundo de forma fácil, atrayente, y por qué no, algo adictiva. Estoy segura de que el Dr Lopez Santamaría, tuvo algo que ver, viendo en mí a una persona motivada y animándome a embarcarme en esto.

Cuál fue mi sorpresa, al descubrir que dentro del trasplante, el trasplante intestinal era algo pionero en mi hospital a nivel nacional, y posteriormente lo sería a nivel internacional, y que había mucho que hacer, que investigar y que aprender antes de poder sentirnos orgullosos de ofertarlo a los pacientes, de garantizarles un porcentaje asumible de éxito. Todo ello fomentado por la oportunidad que me brindó el hospital de formarme durante más de un año en EEUU, y de volver a mesa puesta más motivada que nunca a trabajar por esta causa. Para colmo, la tasa de supervivencia global inferior al 60%, así como la cercanía con estas familias al estar ingresadas tantos meses, resultaron el punto de motivación clave para que alguien como yo, bastante terca y romántica al mismo tiempo, decidiera como objetivo en sus siguientes años, intentar trabajar por y para ellos, quienes daban sentido a mi esfuerzo, y de nuevo, la felicidad en el trabajo.

Sin embargo, en estos años, he visto morir a muchos pacientes trasplantados, algunos por problemas postquirúrgicos pero la gran mayoría por problemas inmunológicos. Mi sensación y la de todo el equipo siempre ha sido que vamos por detrás, que algo se escapa en el trasplante intestinal, y es que, en términos más propios de un cirujano en su afán de simplificar y resolver, que de otros clínicos o investigadores, el injerto podría asemejarse a un “saco de células inmunitarias mal

definidas”. Cuando tenemos “suerte”, estas células del huésped y el injerto congenian y el paciente consigue una vida normal, pero cuando no tenemos suerte, gana uno de los dos, el huésped o el injerto, y en esa pelea por el dominio, sufren muchos órganos generando un fallo multiorgánico que lleva ineludiblemente al trasplante, o a la muerte, dependiendo de quién gane. Esa “suerte” tratamos de controlarla y llevarla a nuestro terreno mediante la experiencia acumulada de nuestro centro y otros internacionales, y cuando pese a todo, esa “suerte” no nos acompaña, tenemos armas terapéuticas para combatir a las dificultades, pero sin una explicación racional totalmente definida y establecida hasta el momento.

Y sin embargo, ese factor “suerte” no debería existir. Es necesario investigar y definir bien esa batalla campal inmunológica que se genera en el organismo después de un trasplante intestinal. Y una vez entendida, investigar y diseñar las estrategias terapéuticas para combatirla, ajustada en función de cada organismo, de cada paciente y su realidad concreta.

Y en ese fascinante mundo de la investigación aterricé yo un día, ilusa por pensar que iba a ser fácil, convencida de que mi esfuerzo tendría resultados tempranos, dispuesta a sacrificar mi tiempo libre por aprender algo más sobre la inmunología y el trasplante intestinal. Una vez más, el factor “suerte” esta vez jugó a mi favor y me concedieron un proyecto financiado de investigación; por otro lado, la experiencia acumulada en mi servicio a lo largo de las últimas décadas en experimentación animal, gracias en gran parte a las inquietudes del Profesor Tovar que nos supo transmitir a los jóvenes, y la ilusión por investigar que me transmitió el Dr Hernández, cuyos pasos no dejo de seguir en mi carrera profesional, hicieron que yo viera factible y posible investigar en este campo, algo que no todos tienen a su alcance.

La terapia celular, y en particular, las células troncales mesenquimales empezaban entonces a brillar internacionalmente por su potencial capacidad regenerativa e inmunomoduladora, abriendo un mundo de posibilidades terapéuticas en numerosas enfermedades, aun sin tratamiento. En La Paz, se creaba una Unidad de Terapia Celular, y ahí llegamos nosotros, los cirujanos pediátricos, entre otros especialistas, a intentar descubrir si esas células tan atractivas, podrían servir a nuestros pacientes para librarse del temido rechazo. De confirmarse, sería totalmente novedoso, ya que nadie lo había probado hasta la fecha. Es por tanto necesario investigar, para concretar dosis, momento de administración, efectos.... si creemos que algún día podrán llegar a la clínica, pero también es necesario no perder nunca el punto de vista clínico, a nuestros pacientes, que nos enseñan cada día qué caminos debemos tomar, a veces muy duros, otros más esperanzadores. Y por eso esta tesis, y muchos trabajos futuros que a raíz de ella vendrán, merecen la pena, estoy plenamente convencida. Se lo debemos.

## ABREVIATURAS Y TRADUCCIONES

---

- Ad-CTM: Células Troncales Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo
- AMR: Rechazo mediado por Anticuerpos (del inglés “*Antibody Mediated Rejection*”); sinónimo de Rechazo humoral.
- ATG: Timoglobulina
- BCSE: Factor estimulante de linfocitos B
- BMC: Células derivadas de la médula ósea (del inglés “*Bone marrow cells*”).
- BN: Brown-Norway (cepa de rata)
- CD: Células Dendríticas (“*DC*” en inglés)
- CDC: citotoxicidad dependiente de complemento
- CDCXM: prueba cruzada basada en citotoxicidad dependiente de complemento
- CFU-U: Unidades Formadoras de Colonias Fibroblásticas.
- CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- CNI: Anticalcineurínicos
- COX-1: enzima ciclooxigenasa 1
- COX-2: enzima ciclooxigenasa 2
- CPA: célula presentadora del antígeno (“*APC*” en inglés)
- CsA: Ciclosporina
- CT: Células Troncales
- CTE: Células Troncales Embrionarias
- CTH o BMC: Células Troncales Hematopoyéticas derivadas de la de médula ósea (sinónimo de *bone marrow cells*)
- CTM: Células “Troncales” o “Madre” o “Estromales” Mesenquimales (*MSC: Mesenchymal stem or stromal cells*)
- DSA: Anticuerpos específicos contra el donante (del inglés “*Donor Specific Antibodies*”)
- EICH: Enfermedad de Injerto contra Huésped
- FC: Citometría de flujo (del inglés “*Flow cytometry*”)
- FCXM: Prueba cruzada basada en la citometría de flujo
- GALT: tejido linfoide asociado al intestino (del inglés “*Gut associated Lymphoid Tissue*”)
- GMP: Buenas prácticas de fabricación (del inglés “*Good Manufacturing Practice*”)
- h-CTM: Células Troncales Mesenquimales procedentes de humanos
- HI: Hepatointestinal
- HLA: Antígeno Leucocitario Humano (del inglés “*Human Leucocyte Antigen*”)
- iCD: Celulas Dendríticas inmaduras
- IDO: Indoleamine 2,3-dioxigenasa
- IFN $\gamma$ : Interferon gamma
- Ig iv /IVIG: Inmunoglobulina intravenosa
- Ig: Inmunoglobulina

- IL: interleuquina
- iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
- iPSC: Células Troncales Pluripotentes Inducidas (del inglés “*Induced Pluripotent Stem Cells*”).
- IR: Isquemia Reperusión
- ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular (del inglés “*International Society for Cellular Therapy*”)
- ITN: grupo de trabajo “Red de tolerancia inmunológica” (del inglés “*Immune Tolerance Network*”)
- ITR: Registro de Trasplante Intestinal (del inglés “*Intestinal Transplant Registry*”)
- Iv: intravenoso/a
- Lew: Lewis (cepa de rata)
- LPS: Lipopolisacárido
- MDSC: células mieloides supresoras
- MiSOT: grupo de trabajo “Células Troncales Mesenquimales en el Trasplante de Órgano Sólido” (del inglés “*Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation*”)
- MMF: Micofenolato Mofetil
- MO: Médula ósea
- MO-CTM: Células Troncales Mesenquimales derivadas de la médula ósea
- MV: Multivisceral
- MVM: Multivisceral modificado
- NO: Óxido Nítrico
- PBMC: Célula mononuclear de sangre periférica (del inglés “*Peripheral Blood Mononuclear Cell*”). Incluye a los monocitos y linfocitos.
- PGE2: Prostaglandina E2
- PMN: Polimorfonucleares. Incluye a los neutrófilos, basófilos y eosinófilos.
- PRA test: Prueba de reacción contra anticuerpos (del inglés “*Panel Reactivity Antibody Test*”)
- RA: Rechazo Agudo
- RC: Rechazo Crónico
- r-CTM: Células Troncales Mesenquimales procedentes de ratón
- Riset: “*Reprogramming Immune System for the Establishment of Tolerance*”
- RL: Ringer Lactato
- RLM: Reacción leucocitaria mixta
- SAB: del inglés “*single antigen bead*”
- SF: Salino Fisiológico
- SFI: Medición intensidad estándar de fluorescencia (también MFI; del inglés “*standard fluorescence intensity*”)
- SI: Sistema Inmune
- SIA: Sistema Inmune Adquirido
- SII: Sistema Inmune Innato

- SLP: Síndrome linfoproliferativo
- TAC: Tacrolimus
- TGF $\beta$ : citoquina “*transforming growth factor beta*”
- TI: Trasplante Intestinal
- TIAi: Trasplante Intestinal Aislado
- TIA: Trasplante Intestinal Alogénico
- TLR: Receptores tipo Toll (del inglés “*Toll-like receptor*”)
- tolCD: Células dendríticas tolerogénicas
- TOS: Trasplante de Órgano Sólido
- TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos; Se utiliza como sinónimo el término TMO: trasplante de médula osea
- TRDV: Trasplante renal de donante vivo
- TSG-6: proteína “*TNF $\alpha$  stimulated gene 6 protein*”
- vXM :prueba cruzada virtual
- XM: Prueba cruzada (del inglés “*cross match*”)





# ÍNDICE

---



# 1. ÍNDICE

---

<b>1. ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
1. TRASPLANTE INTESTINAL (TI): ASPECTOS INMUNOLÓGICOS .....	10
<i>I. Historia y desarrollo del TI</i> .....	10
a. Comienzos inmunológicos en el Trasplante de Órgano Sólido .....	10
b. Comienzos inmunológicos en el Trasplante Intestinal .....	11
c. Intestinal Transplant Registry .....	11
d. Trasplante Intestinal en el Hospital La Paz.....	14
<i>II. Trasplante Intestinal y Rechazo</i> .....	17
a. Fisiopatología del Rechazo en el TI .....	17
1) Sistema Inmune Innato .....	17
2) Sistema Inmune Adquirido.....	18
3) Reconocimiento .....	18
4) Expansión y células T de memoria .....	21
5) Rechazo celular y humoral; subpoblaciones linfocitarias implicadas. Paradigma Th1/Th2 y nuevos paradigmas. ....	22
6) Citoquinas y su papel en el Rechazo .....	32
b. Monitorización clínica inmunológica en el receptor de intestino y métodos diagnósticos del Rechazo .....	37
1) Métodos diagnósticos de Rechazo Celular actualmente utilizados en clínica.....	37
2) Métodos diagnósticos de Rechazo Celular en fase de investigación .....	42
3) Métodos diagnósticos de Rechazo Humoral usados en clínica .....	44
c. Terapias para la prevención y tratamiento del Rechazo en el TI .....	51
1) Prevención del Rechazo .....	51
2) Tratamiento del Rechazo .....	55
d. Inducción de la aceptación del injerto y búsqueda de la tolerancia. ....	58
1) Actuación sobre el injerto y/o el donante.....	58
2) Actuación sobre el receptor .....	59
2. CÉLULAS TRONCALES DE ORIGEN MESENQUIMAL (CTM).....	65

# ÍNDICE

I.	<i>Historia y generalidades de las CTM</i> .....	65
II.	<i>Función inmunomoduladora de las CTM: actuación sobre diferentes poblaciones celulares</i> .....	69
a.	Acción sobre células diana del Sistema Inmune Innato: .....	70
1)	Células dendríticas .....	70
2)	Macrófagos y monocitos .....	73
3)	Células Natural Killer .....	74
b.	Acción sobre células diana del Sistema Inmune Adquirido .....	75
1)	Células T .....	75
2)	Células B .....	79
c.	Mecanismos de actuación a nivel molecular de las CTM .....	80
1)	Factores secretados (acción paracrina) .....	80
2)	Contacto celular .....	85
d.	Nuevos paradigmas en los mecanismos de actuación de las CTM: CTM1/CTM2 .....	87
e.	Otros mecanismos indirectos de actuación de las CTM en el Trasplante .....	90
1)	Daño isquemia reperfusión (IR) .....	90
2)	Propiedades regenerativas y antifibróticas .....	90
3)	Propiedades angiogénicas .....	91
III.	<i>Estudios Preclínicos sobre el uso de las CTM en el TOS para el tratamiento del rechazo</i> .....	92
IV.	<i>Ensayos Clínicos con CTM en TOS</i> .....	100
1)	Ensayos Clínicos con CTM en EICH .....	101
2)	Ensayos Clínicos con CTM y Rechazo .....	103
3.	TRASPLANTE INTESTINAL EXPERIMENTAL Y RECHAZO/ TOLERANCIA .....	115
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>123</b>
1.	GENERALES .....	123
2.	ESPECÍFICOS .....	123
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>127</b>
1.	CONCEPTUALES .....	127
2.	OPERATIVAS .....	128

<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS: ESTUDIO DEL PAPEL INMUNOMODULADOR DE LAS AD-CTM EN LA PREVENCIÓN DEL RECHAZO AGUDO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE TI .....</b>	<b>131</b>
1. DISEÑO EXPERIMENTAL; PLAN DE TRABAJO .....	131
2. ANIMALES. CUIDADOS PREOPERATORIOS .....	131
3. TÉCNICA MICROQUIRÚRGICA DEL TI .....	132
I. Anestesia .....	132
II. Operación del Donante .....	132
III. Operación del Receptor (Trasplante Intestinal) .....	132
4. GRUPOS EXPERIMENTALES.....	135
5. CUIDADOS POSTOPERATORIOS. PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN .....	138
6. RECOGIDA DE DATOS.....	139
I. Primera Fase: Descripción de un modelo experimental de Trasplante Intestinal Alogénico (TIA) en rata. Curva de aprendizaje.....	139
II. Segunda Fase: Desarrollo de un modelo de rechazo agudo en un TIA en rata. Estudio de los mecanismos del rechazo.....	139
III. Tercera fase: Estudio del papel inmunomodulador de las CTM en la prevención del rechazo agudo en un modelo experimental de TIA en rata .....	140
7. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (AD-CTM) .....	140
I. Aislamiento y cultivo.....	140
II. Caracterización de las Ad-CTM.....	143
III. Migración e implantación de las CTM con Dil o Green Fluorescence Protein (GFP) .....	144
IV. Dosis de CTM, momento y vía de administración.....	145
V. CTM y administración. Estudios preliminares.....	146
a. Estudio 1 en relación a la dosis .....	146
b. Estudio 2 en relación a la vía y ritmo de administración.....	147
c. Momento de administración .....	148
8. SACRIFICIO, EVALUACIÓN DEL INJERTO Y RECOGIDA DE MUESTRAS. ....	149
9. ESTUDIO DE LAS MUESTRAS. ....	150
I. Histología.....	150

## ÍNDICE

Tinciones convencionales .....	150
<b>II. Inmunohistoquímica: Estudio de poblaciones del sistema inmune .....</b>	<b>151</b>
a. Técnica inmunohistoquímica .....	152
b. Valoración de las muestras .....	153
<b>III. Inmunofluorescencia: Protocolos y contaje .....</b>	<b>156</b>
<b>IV. Determinación de citoquinas plasmáticas: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....</b>	<b>156</b>
a. Kit y lectura de las muestras: .....	156
b. Análisis de los resultados: .....	156
<b>10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>158</b>
<b>6. RESULTADOS: ESTUDIO DEL PAPEL INMUNOMODULADOR DE LAS AD-CTM EN LA PREVENCIÓN DEL RECHAZO AGUDO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE TI 163</b>	
1. PRIMERA FASE: DESCRIPCIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE TIA EN RATA .....	163
2. SEGUNDA FASE: DESARROLLO DE UN MODELO DE RECHAZO AGUDO. ESTUDIOS .....	167
DE LOS MECANISMOS DE RECHAZO .....	167
I. Tiempos medios quirúrgicos .....	167
II. Seguimiento postoperatorio de los animales .....	167
III. Sacrificio de los animales; estudio macroscópico del injerto .....	169
IV. Estudio histológico de las muestras (hematoxilina-eosina) .....	171
V. Análisis de la validez del modelo .....	174
3. TERCERA FASE: ESTUDIO DEL ROL INMUNOMODULADOR DE LAS CTM EN LA PREVENCIÓN DEL RECHAZO AGUDO EN EL MODELO DESCRITO EN LAS FASES PREVIAS .....	175
I. Tiempos medios quirúrgicos .....	175
II. Seguimiento postoperatorio de los animales .....	176
III. Sacrificio de los animales; estudio macroscópico del injerto .....	177
IV. Estudio histológico de las muestras (Hematoxilina-eosina) .....	177
injerto intestinal y mesenterio: .....	177
V. Inmunohistoquímica: Estudio de poblaciones del sistema inmune .....	179
a. Sistema inmune innato: Macrófagos CD68+ .....	179
b. Sistema Inmune Adquirido: Linfocitos CD4, CD8, CD20 .....	181

c.	Células Foxp3+ .....	187
VI.	<i>Inmunofluorescencia (GFP; CM-Dil)</i> .....	189
VII.	<i>Determinación de citoquinas plasmáticas</i> .....	189
a.	Interleuquinas Proinflamatorias: IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL2, IL6; IFN $\gamma$ ; IL5, IL12, IL13, IL17 .....	189
b.	Interleuquinas Antiinflamatorias: IL4, IL10 .....	194
b.	Factores estimuladores de colonias: G-CSM; GF-CSM .....	195
c.	Citoquinas quimiotácticas .....	196
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>203</b>
I.	<i>Otras alternativas a las CTM en Terapia Celular en el Trasplante de Órgano Sólido .....</i>	<i>205</i>
II.	<i>¿Dónde están las CTM? ¿Dónde migran? ¿Cuánto tiempo sobreviven tras su administración? ¿Por qué mecanismos actúan? .....</i>	<i>207</i>
III.	<i>¿Cuál es el momento óptimo de administración? .....</i>	<i>210</i>
IV.	<i>¿Cuál es la procedencia óptima de las CTM para plantearlas como terapia en TOS? .....</i>	<i>212</i>
a.	¿Donante, receptor o third party? .....	212
b.	¿Médula ósea o tejido adiposo? ¿otros? .....	214
c.	¿Alogénicas o xenogénicas? .....	216
V.	<i>¿Cuál es la forma más óptima de administración de las CTM para plantearlas como terapia en TOS?</i> <i>217</i>	
VI.	<i>¿Cuál es la dosis óptima de CTM? .....</i>	<i>218</i>
VII.	<i>Interacción de las CTM con otros fármacos .....</i>	<i>219</i>
VIII.	<i>Otras consideraciones de las CTM .....</i>	<i>222</i>
IX.	<i>Perspectivas clínicas futuras de las CTM en el Trasplante Intestinal .....</i>	<i>226</i>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>231</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>235</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>260</b>
I.	<i>ANEXO 1: Quimoquinas descritas, distintas nomenclaturas y receptores .....</i>	<i>260</i>
II.	<i>ANEXO 2: Protocolo de Inmunofluorescencia Directa (marcaje con CM-DIL).....</i>	<i>262</i>
III.	<i>ANEXO 3: Protocolo de Inmunofluorescencia para GFP (green fluorescence protein) .....</i>	<i>263</i>
IV.	<i>ANEXO 4: Resumen de las citoquinas estudiadas .....</i>	<i>264</i>
V.	<i>ANEXO 5: Determinación de citoquinas plasmáticas: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....</i>	<i>267</i>
VI.	<i>ANEXO 6: Publicaciones surgidas de la tesis .....</i>	<i>269</i>





# INTRODUCCIÓN

---



## 2. INTRODUCCIÓN

---

El **trasplante de intestino** (TI) ha sido de los últimos en trasladarse a la clínica y la supervivencia a largo plazo sigue sin equipararse a la de otros órganos. Sus resultados mediocres, son debidos a problemas fundamentalmente inmunológicos, entre ellos el **rechazo y la enfermedad de injerto contra huésped (EICH)**.

Ambas representan las dos caras de una misma moneda, en la que predomina el sistema inmune del receptor o del donante, respectivamente, en una “batalla inmunológica”, donde un huésped, inmunosuprimido farmacológicamente, se enfrenta a un órgano linfoide extraño, y donde un “empate” o “equilibrio” de ambos sistemas permitiría la aceptación del injerto, fenómeno que se ha denominado “tolerancia”.

En términos más científicos, trasplantar un injerto “parcialmente incompatible” desencadena la activación de linfocitos T efectores, unos destructores del injerto y otros protectores y reguladores. El balance entre estas subpoblaciones opuestas es el que va a determinar en último término el destino del alotrasplante [1].

Por otro lado, el potencial de las **células troncales mesenquimales** (CTM) es un tema de enorme actualidad por su capacidad regenerativa, pero también inmunomoduladora, y su ausencia de toxicidad ha sido demostrada ampliamente. Esto incita a pensar que su aplicación el campo del trasplante podría ser enorme, y en particular en el TI, como alternativa o coadyuvante a los distintos inmunosupresores, utilizados a veces empíricamente y sin éxito, cuando surgen las complicaciones inmunológicas.

El **objetivo de esta tesis** es profundizar en la patología del rechazo, y en general en la inmunología del trasplante intestinal, tanto a nivel internacional como la experiencia en nuestro centro, con el fin de comprender mejor los mecanismos fisiopatológicos y estudiar el papel que podrían jugar las CTM en la prevención del mismo.

Dado que confluyen **tres disciplinas** totalmente distintas y complejas, **la inmunología, el trasplante y la terapia celular**, en las próximas páginas se resumen algunos conceptos básicos de éstas para actualizar al lector y colocarle en situación de entender el resto del trabajo.

## 1. TRASPLANTE INTESTINAL (TI): ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

### I. HISTORIA Y DESARROLLO DEL TI

#### a. COMIENZOS INMUNOLÓGICOS EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO

El Trasplante de Órgano Sólido (TOS) ha vivido grandes avances durante las últimas décadas gracias al desarrollo de nuevos fármacos inmunosupresores y al mejor entendimiento de la naturaleza de la respuesta inmune contra el injerto. Actualmente, la supervivencia del injerto tras un trasplante renal, hepático o cardíaco supera el 90% al año y oscila alrededor del 50% a los 10 años en la mayoría de centros de trasplante ([www.unos.org](http://www.unos.org); [www.ont.es](http://www.ont.es)).

Sin embargo, el rechazo fue el principal obstáculo al desarrollo de esta disciplina en los primeros tiempos. En el caso del primer trasplante renal realizado con éxito entre hermanos monocigóticos en 1954, se confirmó la compatibilidad entre los gemelos tras el cruce exitoso de injertos de piel de espesor total [2]. Posteriormente se fueron introduciendo otros métodos para estudiar la histocompatibilidad, procedentes de la medicina de las transfusiones. Con estos métodos, se detectaban anticuerpos preexistentes en el receptor, que podrían llevar a un rechazo hiperagudo. La respuesta leucocitaria mixta (RLM), que se propuso inicialmente como test de histocompatibilidad hace 45 años, reconocía ya entonces el papel esencial de la citotoxicidad mediada por células en el rechazo celular agudo [3]. La publicación crucial fue la de Patel y Terasaki en 1969, primera en describir el fallo del injerto renal en donantes con prueba cruzada positiva [4].

Paralelamente, el reconocimiento del papel fundamental del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en la presentación del antígeno condujo a la primera definición completa de sistema “Antígeno del leucocito humano” (HLA) [5]. Jean Dausset describió el primer antígeno HLA MAC (HLA-A2, 28) en 1958, que fue seguido del sistema 4a/4b descrito por Jan van Rood en 1963, y del HLA-A1, A2, y A3, descritos por Rose Payne y Walter Bodmer en 1964. Con la identificación de un gran número de alelos CMH, se comprendió que los resultados del injerto, tanto en hipo como en hiperrespondedores en la RLM, se veían influenciados tanto por los de la clase I como por los de la clase II. Todo ello culminó en la introducción del test HLA como componente fundamental en la evaluación del donante-receptor en el trasplante renal [6].

## b. COMIENZOS INMUNOLÓGICOS EN EL TRASPLANTE INTESTINAL

El TI ha sido el último de los grandes trasplantes desarrollado a nivel internacional y también de los últimos introducidos en España, por su alta incidencia de rechazo, que no ofrecía un riesgo beneficio asumible. Su historia comienza en 1959, cuando un equipo de cirujanos de Minnessota dirigidos por Richard Lillehei publican el primer trasplante intestinal con éxito en perros. Cinco años después, Ralph Deterling en Boston, intenta sin éxito el primer TI en humanos, al trasplantar parte del intestino de sus respectivas madres a dos niños. Lillehei y su equipo también fracasan al realizar en 1967 el primer TI de donante cadáver a una mujer de 46 años. Durante las dos siguientes décadas, hubo más intentos de TI en humanos, pero con muy escasos resultados, ya que los pacientes fallecían por complicaciones técnicas, sepsis o rechazo. En esta época se empleaban corticoides y Azatioprina, un antiproliferativo que impide la vasta expansión de linfocitos activados. Incluso en los ochenta, con la ciclosporina, cuyo descubrimiento en 1972 había revolucionado el campo del trasplante, ampliando su indicación a pacientes hasta entonces no trasplantables, como los niños, el intestino sigue sin despegar. No es hasta 1988, cuando se realiza el primer TI con éxito en Alemania por E. Deltz, seguido poco después por equipos en Francia en 1989 y en Canada. En este momento, el TI pasa de ser un procedimiento experimental a ser un tratamiento que puede salvar la vida de un paciente. En 1990, el Tacrolimus aparece en el mercado como una alternativa superior a la ciclosporina. Este hecho sumado a los avances de la nutrición parenteral hizo que durante las dos décadas siguientes el TI pudiera desarrollarse enormemente tanto en número de casos como en resultados. Es entonces cuando comienza a hablarse de verdaderos programas de TI con cierto éxito.

En España, la primera intervención se realizó en octubre de 1999 por nuestro centro en colaboración con el Hospital Ramón y Cajal (adulto), siendo este niño actualmente un adulto con muy buena calidad de vida. Actualmente se realizan unos 8-10 TI al año en nuestro país, entre niños y adultos, bien aislados o en combinación con el hígado y otros órganos.

## c. INTESTINAL TRANSPLANT REGISTRY

En el ITR (*Intestinal Transplant Registry*), encontramos datos actualizados por última vez en febrero de 2013 acerca de la situación internacional del TI ([www.intestinaltransplant.org](http://www.intestinaltransplant.org)):

## INTRODUCCIÓN

Hasta ese momento, se habían realizado un total de 2887 TI en el mundo, 45% intestinales aislados (TIAi), 31% hepatointestinales (HI) y 23% multiviscerales (MV) con o sin hígado, con un total de 1416 supervivientes en esa fecha, equivalente al 49%.

Habían sido realizados por 87 centros en el mundo, pero sólo 47 de éstos eran activos en ese momento, fundamentalmente concentrados en Europa y Estados Unidos, aunque existían algunos programas en Asia, uno en Australia y 4 en Sudamérica. En el ámbito pediátrico, se habían realizado 1611 en un total de 55 centros (38 activos en el 2013): 36 %TIAi, 45% HI y 18% MV, con 822 supervivientes en esa fecha (51%).

En cuanto a **datos demográficos**, la tendencia en el número de casos, tanto en niños como en adultos, había sido a ascender hasta el 2008, momento en que comenzó a descender (Figura 1). La principal indicación de trasplante era y sigue siendo el síndrome de intestino corto, en los adultos por isquemia, enfermedad de Crohn, vólvulo, trauma..., y en niños sobre todo por malformaciones congénitas o enterocolitis. Como otras causas, en adultos destacaban los tumores (8% frente a 1% en niños), y en niños los trastornos motores (18% frente a un 11% en adultos). La tasa de retrasplante en ambos oscilaba alrededor del 7-8%. La tendencia con los años, fue a que el paciente, especialmente el pediátrico, se encontrase en casa y no hospitalizado el día del trasplante.

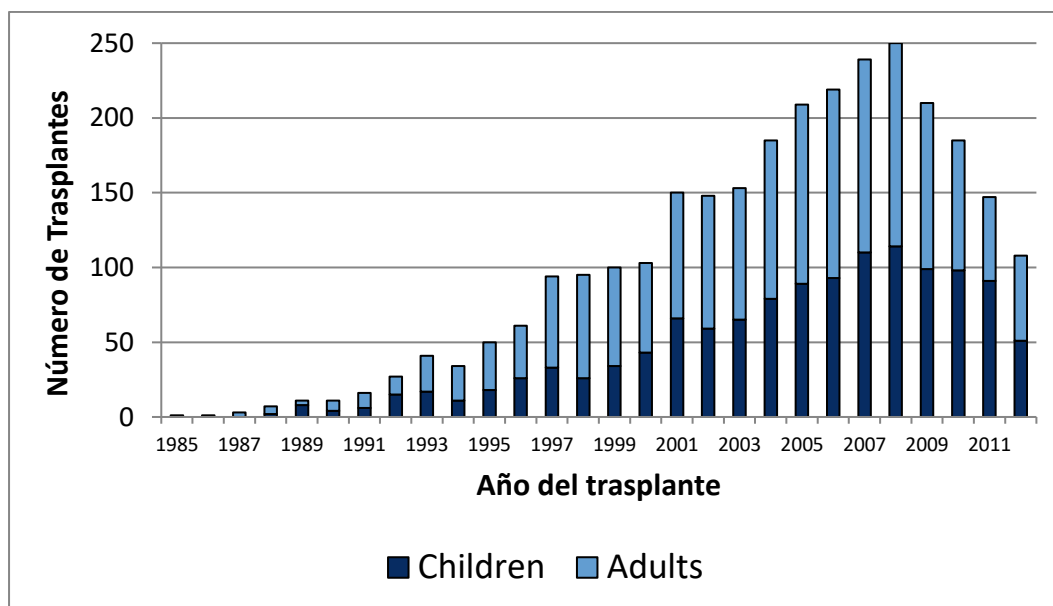


Figura 1: Número de trasplantes intestinales por años (imagen obtenida del ITR registry).

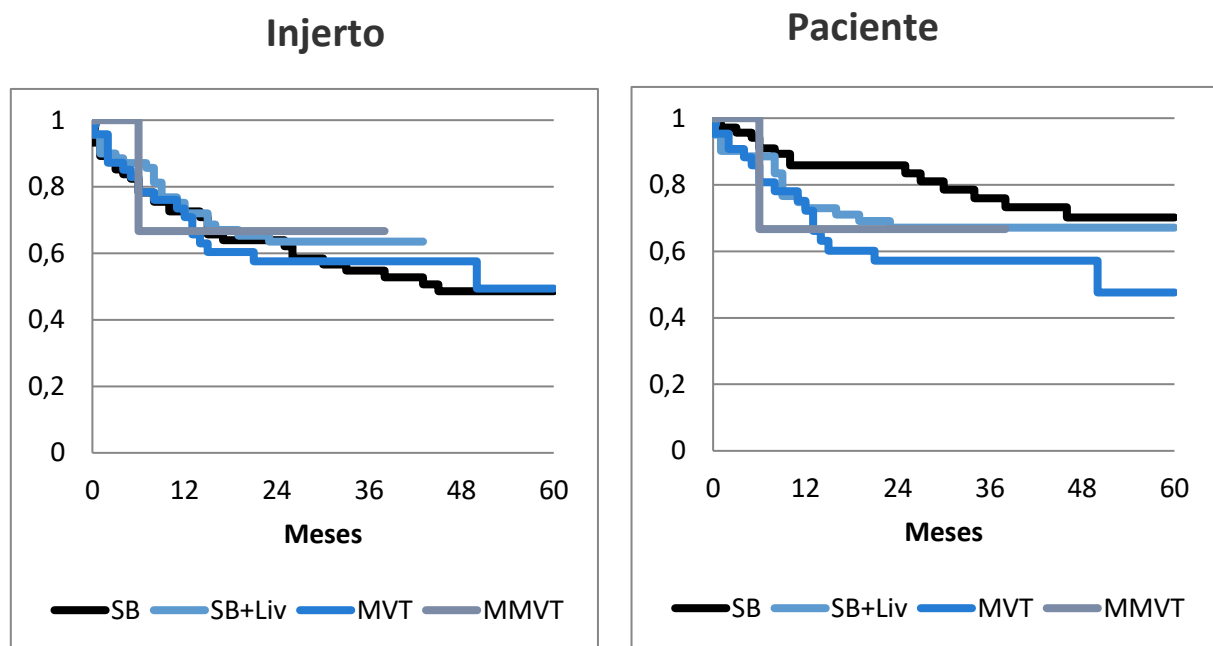
La tasa de **supervivencia** aumentó con el tiempo, aunque todavía era muy mejorable, sobre todo en el largo plazo, y además se había alcanzado un “plateau” en los últimos años. La *supervivencia del injerto* en la población general caía a los 5 años, no superando el 40% a los 10 años de seguimiento, similar a épocas previas del 2000 y 2005. Esto ocurría en todos los tipos de trasplante, excepto en el multivisceral modificado, que era algo mayor, del 60%. En niños, aunque había mejorado algo, seguía siendo inferior al 60% al año del trasplante. La *supervivencia del paciente* era mayor en aquellos con un TIAi y con el MVM y caía por debajo del 50% en el HI y MV a los 5 años (Figura 2). Mediante un análisis de regresión múltiple, se vio que tanto la supervivencia del injerto como del paciente resultaron ser mayor en los niños, en los pacientes que estaban en casa en el momento del trasplante, en los primeros trasplantes frente a los retrasplantes, en aquellos que incluían hígado en el injerto, y, como novedad, en aquellos que tomaban Rapamicina como mantenimiento. Por el contrario, el volumen de casos del centro dejó de ser en el 2013 una variable significativa.

Entre otros **resultados**, hasta un 20% de los supervivientes trasplantados hacía más de 6 meses seguía dependiendo de nutrición parenteral y un 10% de fluidoterapia intravenosa. La inclusión del colon en el injerto (por un 30% de los grupos, porcentaje creciente en los últimos años), se asoció a un aumento leve de la supervivencia del injerto a los 3 años del trasplante, y a un 5% más de autonomía digestiva. La media de días de hospitalización seguía rondando los 40 días desde el año 2000, frente a los más de 140 días en los años 90.

En cuanto al **rechazo** en concreto, según autores de centros con experiencia [7, 8], éste ha ido disminuido con el tiempo (del 80 al 30-40%), aumentando así la supervivencia del paciente y del injerto al año hasta el 90 y 80% respectivamente. Sin embargo, los resultados a largo plazo no son en absoluto comparables a los de otros TOS por la intensa respuesta inmune alógena. En el ITR, la incidencia de rechazo fue algo mayor en el TIAi (57%), que además fueron más graves y refractarios según algunos grupos, frente al HI (39%) o el TMV (48%). Además, más del 10% experimentaron síndromes linfoproliferativos (SLP) potencialmente letales, debido a una inmunosupresión a altas dosis, y más del 10% perdieron el injerto por un rechazo crónico (RC) en los primeros 5 años tras el trasplante [9].

## INTRODUCCIÓN

*Todos estos datos muestran un “plateau” en la supervivencia en los últimos años, donde dos obstáculos iniciales como eran la técnica quirúrgica y la situación del paciente previa al trasplante han mejorado al menos parcialmente, pero muchas complicaciones inmunológicas permanecen sin respuesta.*



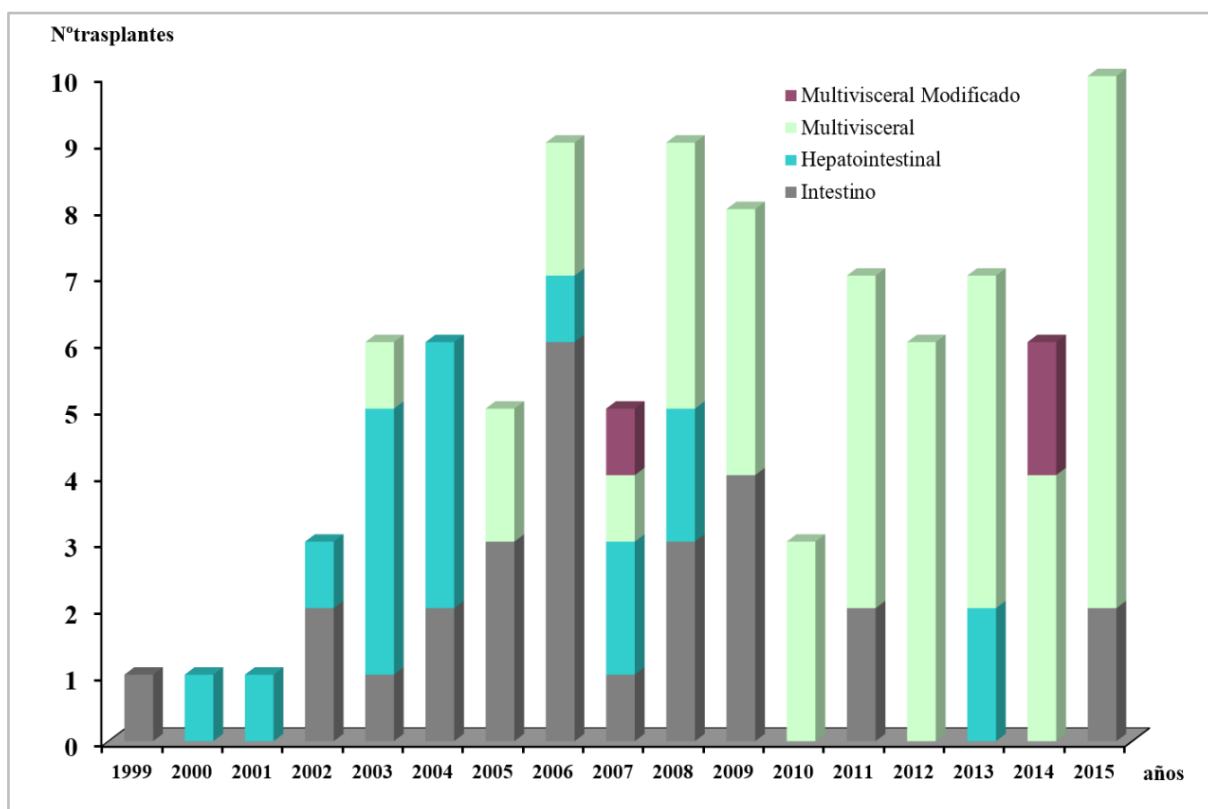
**Figura 2:** Supervivencia del TI pediátrico (tanto del paciente como del injerto) en función del tipo de trasplante, durante los trasplantes realizados entre 2008 y 2012 (imagen obtenida del ITR registry).

### d. TRASPLANTE INTESTINAL EN EL HOSPITAL LA PAZ

Los datos del ITR concuerdan con los obtenidos en nuestro centro. Entre octubre de 1999 y diciembre de 2015, se realizaron 96 trasplantes en 76 pacientes en el Hospital La Paz (20 retrasplantes, de ellos 15 eran segundo injerto y 5 tercer injerto). La distribución por años se detalla en la **Figura 3**. La mediana de edad al trasplante fue de 37 meses (6 meses -19.8 años). Veintiseis fueron intestinales aislados, 22 hepatointestinales, 45 multiviscerales y 3 multivisceral modificado. La elección del tipo de injerto vino determinada por la existencia de hepatopatía avanzada que obligaba a incluir el hígado en el injerto (hepatointestinal o multivisceral) o la afectación del estómago en la patología que motivaba el trasplante (POIIC, por ej). Así mismo, el bajo peso de los candidatos motivó a usar injerto multivisceral en lugar de hepatointestinal. La indicación más



frecuente del trasplante fue el síndrome de intestino corto debido a enterocolitis del prematuro, o a malformaciones congénitas, pero en ningún caso se trataba de enfermedades inmunológicas que pudieran explicar fenómenos inmunológicos tras el trasplante.



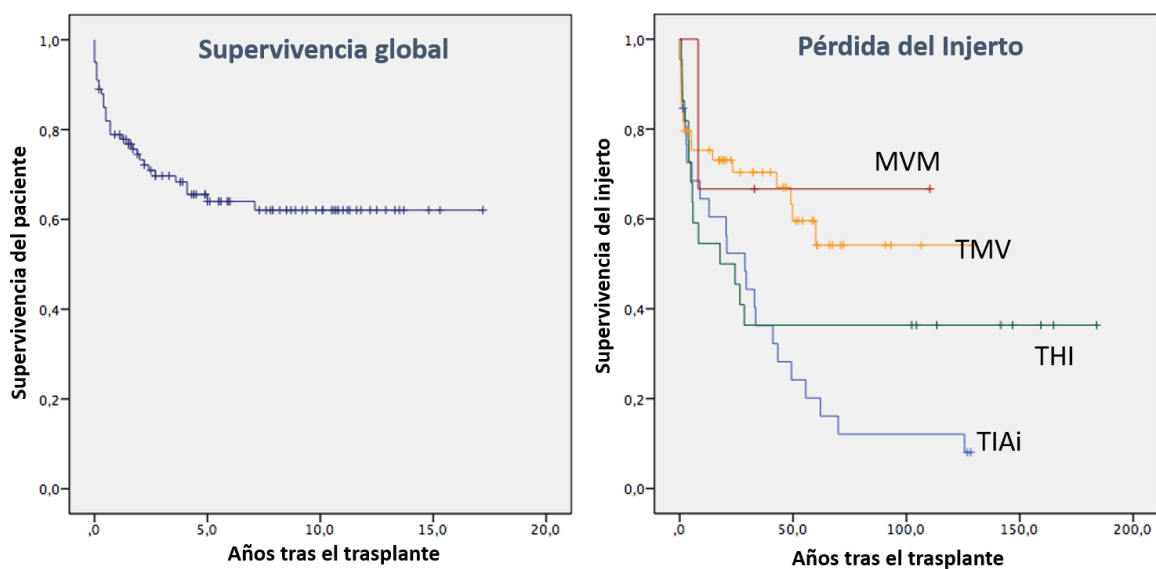
**Figura 3:** Distribución por años y tipo de trasplante, de los TI realizados en nuestro centro.

Centrándonos en el **rechazo**, se diagnosticaron 27 episodios de *rechazo celular agudo* (28,1%): 4 leves, 9 moderados y 14 (14,5%) graves; 6 pacientes más desarrollaron *rechazo crónico* (6%), y otros 2 desarrollaron un *rechazo humoral franco* (2%), aunque este último dato probablemente esté infraestimado, ya que la detección de anticuerpos específicos frente al donante se realiza en nuestro centro desde 2012. En concordancia con los datos del ITR, observamos una incidencia significativamente mayor de rechazo celular agudo en el grupo de los TIAi frente a los otros tipos de trasplante, y aun más evidente al agrupar el HI y el MV (injertos compuestos, con hígado). Además, éstos rechazos fueron más graves que en los otros tipos de trasplante (10 de los 14 rechazos graves ocurrieron tras un TIAi), lo cual impactó negativamente en la supervivencia, en especial del injerto, pero también del paciente (ver Tabla 1 y Figura 4).

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 1:** Incidencia de rechazo celular agudo agrupados por tipo de injerto

	Rechazo	No rechazo	Total
TIAi	14 (53,8%)	12 (46,1%)	26 (100%)
HI	5 (22,7%)	17 (77,2%)	22 (100%)
MV/ MVM	8 (16,6%)	40 (83,3%)	48 (100%)
Total	27 (26,7%)	69 (73,2%)	96 (100%)



**Figura 4:** Gráficas de supervivencia (Kaplan Meier) global del paciente y de los distintos tipos de injertos en el Hospital La Paz, en general, en función del tipo de trasplante.

*Todos estos datos sumados a los del ITR, nos muestran que el rechazo y con él la pérdida del injerto, y a veces, también del paciente, son problemas no resueltos. Así, cualquier esfuerzo en reunir la experiencia clínica con los avances en investigación merecen enormemente la pena.*

## II. TRASPLANTE INTESTINAL Y RECHAZO

### a. FISIOPATOLOGÍA DEL RECHAZO EN EL TI

La respuesta inmune frente al injerto es un proceso progresivo que implica al sistema inmune (SI) tanto innato como adquirido y que comienza desde el momento de la reperfusión. A partir de entonces, el SI local del intestino donante se va sustituyendo progresivamente por el del receptor durante un periodo que oscila entre semanas y meses. Esta infiltración del injerto por parte del tejido linfoide del receptor es crucial, ya que, si no se consigue un balance entre los mecanismos efectores y reguladores, por medio de la inmunosupresión, puede dar lugar al **rechazo**. El intestino es especialmente susceptible a esta complicación, al tratarse de un órgano altamente inmunogénico por su gran cantidad de tejido linfoide del donante asociado al intestino y al mesenterio.

#### 1) Sistema Inmune Innato

Las células del **sistema inmune innato** (SII) carecen de mecanismos para reconocer al antígeno específico, pero reconocen a un espectro amplio de fragmentos de esos antígenos como extraños. Son las responsables de generar el daño del injerto en los primeros momentos tras el trasplante, incluso durante la muerte cerebral del donante y durante la isquemia reperfusión (IR). El daño tisular isquémico que ocurre durante la extracción inicia la producción de moléculas asociadas al daño, que son reconocidas como extraños por los **monocitos y macrófagos** del huésped a través de receptores, que, a diferencia de los linfocitos, no requieren expansión clonal. Así, los injertos se infiltran con monocitos, macrófagos y **neutrófilos** muy precozmente tras el implante, que a su vez estimulan la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias, creando un ambiente local inflamatorio y de daño tisular, lo cual ha demostrado jugar también un papel en el rechazo, ya que desencadenarán la infiltración del injerto por linfocitos T antígeno específicos [10]. Mientras que los neutrófilos están presentes sólo durante los episodios de inflamación, los macrófagos permanecen a lo largo de toda la vida del injerto, manteniéndose en números reducidos en ausencia de rechazo y una vez superado el daño IR. El complemento puede formar parte también del SII al activarse aun en ausencia de anticuerpos, como ocurre durante el daño IR, y provoca daño tisular y amplifica la respuesta inmune (por ej el C3, un fragmento molecular producto del complemento, es altamente quimiotáctico para los leucocitos).

### 2) Sistema Inmune Adquirido

Aunque el rechazo del órgano es multifactorial, la **respuesta inmune adquirida, mediada por linfocitos T** juega un papel protagonista en la destrucción del injerto, al inducir la proliferación de células T antígeno específicas y activar sus funciones efectoras. Asimismo, el rechazo **mediado por anticuerpos** (*antibody mediated rejection o AMR*) se desencadena por la unión de los aloanticuerpos y la activación del complemento y también contribuye a la pérdida del injerto.

### 3) Reconocimiento

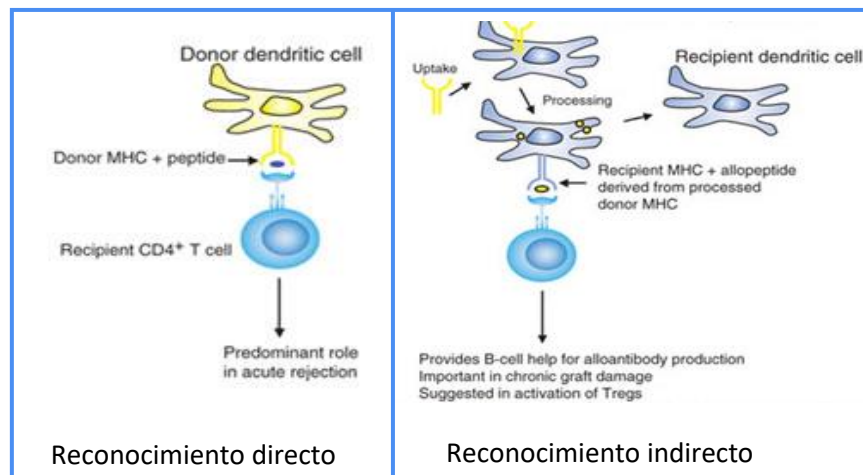
Los linfocitos T del receptor, pueden **reconocer el injerto** de dos formas, **directa e indirecta** (Figura 5). La **via directa** está protagonizada por los linfocitos del donante, el sistema inmune del receptor los reconoce y reacciona contra ellos en el propio injerto. Predomina en los momentos iniciales, y sólo se da en un contexto no fisiológico, como es el trasplante.

La célula inmunogénica más potente en un órgano trasplantado es el “**leucocito pasajero**”, que son **células dendríticas del donante** derivadas de la médula ósea que estaban residiendo temporalmente en el injerto intestinal en el momento del trasplante, y que desde allí emigran hasta los órganos linfoides secundarios del receptor (bazo y ganglios linfáticos) donde contactan y activan a los linfocitos T naïve de éste. Se ha visto en trasplantes en ratas, que la eliminación de estas células dendríticas pasajeras podría reducir la respuesta inmune o rechazo agudo, aunque no el desarrollo del rechazo crónico. Sin embargo, los intentos en clínica de eliminarlas mediante perfusión de anticuerpos monoclonales y así prevenir el rechazo han fracasado hasta el momento.

La via directa no es suficiente para activar a los linfocitos T y destruir el injerto. El **alorreconocimiento indirecto** es más tardío y se relaciona más con el desarrollo de rechazo crónico. Ocurre de acuerdo a las vías fisiológicas del reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos T: el antígeno del donante es presentado por las **células presentadoras de antígeno (CPA)** del receptor, concretamente en los huecos de las moléculas CMH clase I ó II de su superficie, a sus linfocitos T para que se activen al reconocer a su propio CMH junto con el péptido extraño (del donante).

En cierto sentido, todas las células nucleadas en el cuerpo son CPAs porque expresan antígenos CMH tipo I (si se infectan con un virus, por ejemplo, generan complejos péptido-CMH tipo I). Pero las “CPAs profesionales” del trasplante, son las **células dendríticas del receptor**, aunque los macrófagos y los linfocitos B pueden tener también esta función. Expresan los antígenos CMH tipo

II y además llevan otras moléculas en la superficie llamadas “moléculas coestimuladoras” (CD80/B7-1, CD86/B7-2, CD83, CD40), que son especialmente buenas procesando estos antígenos extrajenos, convirtiéndolas en fragmentos péptidos, colocándolos en la superficie celular y activando a los linfocitos T del receptor. Así, pueden estimular directamente al cluster de linfocitos CD4 diferenciados que estaba inactivo.



**Figura 5:** Reconocimiento del injerto por parte del receptor (*imagen obtenida de Cellular Immunology; Vol. 248, Issue 1, July 2007, 31–43*)

Por tanto, las **células dendríticas (CD)** tanto del donante para el reconocimiento directo, como del receptor para el reconocimiento indirecto, son fundamentales en la respuesta precoz innata, y pueden dirigir la respuesta inmune adquirida.

In vitro, pueden derivarse de ambos cordones celulares: las CD34 y los monocitos de sangre periférica CD14 en presencia de colonias estimuladoras de macrófagos y monocitos (GM-CSF) y de TNF $\alpha$  y/o IL4. Su maduración posterior puede ser completada por el lipopolisacárido (LPS), TNF $\alpha$  o añadiendo el ligando CD40. En ausencia de señales de estimulación, estas células permanecen en un **estado inmaduro (iCD)**, que ni expresan sus moléculas coestimuladoras, ni regulan sus moléculas CMH. Las iCD exhiben un **destino tolerogénico**, son ampliamente distribuidas a través de diferentes tejidos y tienen la capacidad de reconocer antígenos y procesarlos. Una vez marcadas, migran a zonas enriquecidas de linfocitos T y les presentan su antígenos (mediante el CMH I para los linfocitos CD8 y mediante el CMH II para los CD4), completando por tanto así su **maduración**. Cuando las CD interactúan con las CD4 (o T helper), dependiendo del antígeno expuesto, pueden liberar bien IL-12, desencadenando el proceso inflamatorio de Th1, o bien IL10 y IL4, suprimiendo Th1 y desencadenando la cascada antiinflamatoria Th2. Es importante saber que las CD maduras

## INTRODUCCIÓN

sólo activan las células T si sus moléculas coestimuladoras están unidas también. En caso contrario, la interacción resulta en una anergia de células T o apoptosis, lo cual induce tolerancia.

Con los **monocitos y macrófagos**, ocurre algo similar. Se ha visto que la estimulación de los monocitos con citoquinas proinflamatorias o agonistas de sus “*toll-like receptors*” (TLRs), incluyendo el IFN y la endotoxina (LPS, agonista del TLR-4), los polariza hacia un fenotipo **M1** que participa en respuestas proinflamatorias precoces [11]. Sin embargo, la estimulación de estos monocitos con IL4 los polariza hacia un fenotipo **M2** asociado a la respuesta antiinflamatoria.

**¿Cómo reconoce el sistema inmune del huésped al injerto a nivel molecular?** ¿Cómo saben las células dendríticas que las células de ese injerto son extrañas? En condiciones no patológicas, los “huecos” de la molécula CMH para que se una el antígeno en las células de los tejidos sanos están ocupados por péptidos de las propias células, y su reconocimiento normalmente es evitado porque los linfocitos T potencialmente autorreactivos son borrados en el timo (selección negativa).

En condiciones patológicas, como ocurre en el trasplante, existen dos posibilidades: la primera es similar a lo que ocurre en una infección vírica, donde los péptidos propios son reemplazados por péptidos virales, los linfocitos T reconocen el complejo **CMH propio-péptido extraño** y sus receptores se unen fuertemente a él, destruyendo las células infectadas.

La segunda es que, en un trasplante, los “huecos” de unión del péptido de las moléculas CMH no ocupadas del donante y del receptor son distintas y por tanto desencadenan una producción diferente de péptidos de tejidos normales de gran variedad. Sin embargo, los linfocitos T del receptor, también los reconocen como complejos extraños y como hay muchos péptidos derivados del donante posibles, muchos linfocitos T pueden responder. Así, entre los  $5 \times 10^{11}$  linfocitos T presentes en el cuerpo humano, existen clones individuales de linfocitos B y T con gran diversidad de receptores generados a través de reordenamiento de genes que tienen especificidad para distintos fragmentos antigénicos. Hasta 1 de cada 1000 puede reconocer directamente un órgano trasplantado al ver un complejo **CMH extraño-péptido extraño**, unirse con afinidad suficiente y responder. La abundancia de clones con especificidad para un determinado antígeno, y a su vez, la abundancia de antígenos CMH, presentes en la mayoría de las células del órgano recién llegado, permite el reconocimiento entre huésped e injerto.

Estas dos posibilidades explican los altos niveles de células alorreactivas que hay, que no son excluyentes y se solapan. Y este reconocimiento se acentúa en el trasplante intestinal porque ambos, CMH I y II se expresan en las células epiteliales intestinales [12].

Además, algunas proteínas normales varían de persona a persona (variantes alélicas). Por eso, dos personas con la misma molécula CMH en las células, pero con diferentes alelos de una proteína normal, expresan complejos CMH-péptido que pueden ser diferenciados por los linfocitos T. Estas diferencias en los *antígenos de histocompatibilidad menor* (moléculas CMH con péptidos alélicos) pueden contribuir también al alorreconocimiento, incluso cuando el donante y el receptor son muy similares, y desencadenar respuestas de rechazo.

#### 4) **Expansión y células T de memoria**

A partir de ahí, el linfocito que ha reconocido al “extraño” tiene la capacidad de dividirse muy rápido, duplicando sus números en 8-18 horas, de tal forma que cada linfocito T, en teoría, produce entre mil y un millón de células descendientes específicas para el antígeno del injerto. Así, se produce una **selección y expansión clonal** de los linfocitos específicos para los antígenos que tarda unos 5 días, y conlleva la producción de células efectoras, la mayoría de las cuales acaban en una muerte celular programada (apoptosis) al eliminarse el antígeno, en el caso por ejemplo de una infección.

Las que no mueren y persisten aun en ausencia del antígeno una vez que la activación ha sido completada se denominan **células de memoria** pudiendo responder rápidamente ante el estímulo del mismo antígeno si reaparece. En el contexto del trasplante, pueden generarse a partir de trasplantes previos, transfusiones sanguíneas y embarazos previos. Otra posibilidad es que hayan sido generadas durante una “proliferación homeostática”, proceso por el cual una linfopenia transitoria, causada por infecciones virales o por la depleción terapéutica de células T (práctica habitual en el trasplante), inducen a las células T naive residuales a una rápida proliferación y adquisición de un fenotipo de célula de memoria [13]. También pueden generarse cuando las células T, inicialmente llamadas para actuar contra agentes infecciosos y antígenos ambientales, reaccionan de forma cruzada con moléculas del CMH [14], fenómeno conocido como “inmunidad heteróloga”.

Por tanto, estas células merecen una atención especial en la fisiopatología del rechazo. Inmunofenotípicamente, son CD45RO+ y CD45RA- en humanos [15], y, aunque heterogéneas, se

## INTRODUCCIÓN

pueden clasificar en “centrales” (CCR7+CD62L<sup>high</sup>), que circulan entre la sangre y órganos linfoides secundarios, donde pueden proliferar extensamente para generar nuevas efectoras tras la rellamada, y “efectoras” (CCR7+CD62L<sup>low</sup>), las cuales migran a tejidos no linfoides y tienen funciones efectoras inmediatas en sitios periféricos [16].

Las células T de memoria viven más que las naïve, tienen una menor activación y son menos dependientes de la coestimulación para reactivarse [16], con respuestas mucho más rápidas y fuertes. Son relativamente resistentes a la depleción de células T con fármacos (timoglobulina, alemtuzumab...), enriqueciendo por tanto el repertorio de linfocitos de memoria del paciente [17-19]. También parecen escaparse de la inmunosupresión mediada por Tregs [20, 21] y de la inhibición por un bloqueo coestimulador [22, 23].

Por tanto, estas células T de memoria representan un arma de doble filo en el trasplante, ya que aunque protegen contra patógenos frente a cierto grado de inmunosupresión, suponen una **barrera a la inducción de la tolerancia**. El rechazo mediado por células T de memoria específicas contra el donante es extremadamente difícil de prevenir o tratar, no siendo tan eficaces las opciones terapéuticas que detienen la activación de las células T naïve. Así, por ej. su presencia se ha correlacionado con las lesiones de rechazo en trasplantados de riñón, pese a ser tratados con Tacrolimus o con Sirolimus [24-26]. También se ha visto una mayor disfunción tardía del injerto en los receptores que antes de un trasplante renal presentaban un elevado número de células T de memoria específicas para el donante en sangre periférica [14, 16, 27, 28]. Por tanto, son cruciales a la hora de afrontar un retrasplante, por el riesgo que suponen de un nuevo rechazo.

Llama la atención que, en la práctica clínica habitual, cuando existe un rechazo tras un trasplante intestinal, y en general tras cualquier trasplante no estudiamos si es a expensas de células de memoria o naïve. Tampoco existen anticuerpos monoclonales dirigidos hacia un tipo u otro.

### 5) Rechazo celular y humoral; subpoblaciones linfocitarias implicadas. Paradigma Th1/Th2 y nuevos paradigmas.

Una vez que los linfocitos han completado su activación, el proceso inflamatorio puede seguir dos vías. Por una parte puede provocarse un **rechazo celular** por medio de linfocitos T citotóxicos. Por otra parte, la activación de los linfocitos B por parte de las células T, llevan a la producción de anticuerpos específicos frente a los antígenos del donante (DSA o “*donor specific antibodies*”) apareciendo un **rechazo humoral**.



Por otro lado, el daño del injerto puede ocurrir en diferentes momentos después del trasplante: de minutos a horas (**rechazo hiperagudo**); de días a semanas (**rechazo agudo**); y de meses a años (**rechazo crónico**). Estos términos relacionados con la presentación clínica de los síntomas, tienden también a reflejar los diferentes mecanismos inmunológicos.

### *1) Rechazo celular agudo*

El **Rechazo celular agudo** es dependiente de **linfocitos T**. Roedores con depleción linfocitaria son incapaces de rechazar aloinjertos. Los linfocitos T del receptor reconocen el injerto como un extraño de forma antígeno específica, y destruyen el injerto, ya sea de forma específica (mediado por anticuerpos o por células citotóxicas) o inespecífica (inflamación o hipersensibilidad de tipo retardada).

Al transferir subpoblaciones de linfocitos T a animales inmunodeficientes para determinar cuáles son las capaces de rechazar un trasplante, se ha visto que los **CD4** juegan un papel fundamental en la destrucción del injerto, por diferentes mecanismos: Por un lado, hay **CD4 citotóxicos**, aunque probablemente no causan excesivo daño tisular, ya que reconocen directamente a los antígenos del CMH II presentes en el endotelio o epitelio activado, pero en teoría en ningún sitio más del órgano trasplantado, y podrían ser las responsables de la endotelitis. Por otro lado, los **CD4 helper (T helper)**, son los principales moduladores intrínsecos del sistema inmune, y clásicamente se han dividido en dos grupos en función de las citoquinas que producen, grupos que a su vez regulan y polarizan las dos vías principales de respuesta específica, citotóxica o celular (**Th1**) y humoral (**Th2**). Esas respuestas son antagónicas o excluyentes entre sí, creando una especie de regulación cruzada muy particular, porque las citoquinas que favorecen la inmunidad humoral inhiben las acciones de las citoquinas que ayudan a la inmunidad celular y viceversa, y esto es crucial para entender la inmunología del trasplante, y el balance entre el rechazo y la aceptación del injerto [29-31].

Así, los Th2 en concreto, promueven la activación de los **linfocitos B** y su diferenciación a **células plasmáticas** para producir **anticuerpos**, pero sólo actúan si han sido activados por la vía indirecta del reconocimiento, ya que deben interactuar con las moléculas CMH II, presentes en los linfocitos B del receptor. Los **CD8**, estimulados por los TH1, en cambio, son citotóxicos, y necesitan activarse por la vía del reconocimiento directo; así, reconocen a las moléculas CMH tipo I presentes en la mayoría de las células nucleadas del injerto, y probablemente contribuyen al daño mediante muerte

## INTRODUCCIÓN

celular por lisis o por apoptosis. Ambos tipos de muerte parecen tener un papel en el rechazo del injerto y las apoptosis explicarían como los CD8 podrían dañar el injerto sin evidencia histológica de lisis celular en los tejidos. Sin embargo, su papel es controvertido, ya que pueden verse altamente activados en los injertos que sufren rechazo, y por otro lado, si se inyectan en tejidos causan muerte celular y necrosis en lugar de la inyección. Parece que no son capaces de crecer y diferenciarse en ausencia de linfocitos Th1 productores de IL2, ya que cuando células naïve CD8 se transfirieron a un receptor sin otros linfocitos T, estos no se activaron ni desencadenaron rechazo, ni siquiera cuando se transfirieron preactivados. Sólo se produjo el rechazo del órgano cuando además se administraron dosis regulares de IL2 para mantener la viabilidad de los CD8 activados.

*En conclusión, no es posible atribuir el rechazo a una sola población linfocitaria, puesto que la interacción entre ellas es fundamental para comprender sus mecanismos de actuación. Y de ahí la dificultad para tratarlo de forma selectiva. Ya no es tan importante si es CD4, CD8... sino el tipo de citoquinas que secretan, o receptores que se activan, porque pueden provocar efectos diferentes e incluso contrarios. Es necesario cambiar el enfoque clásico del rechazo y aceptar la complejidad del nuevo escenario.*

### **Otras poblaciones celulares implicadas en el rechazo:**

Además, se han descubierto recientemente otras poblaciones celulares implicadas en la alorreatividad y en los mecanismos de tolerancia, complicando el clásico paradigma Th1/Th2.

En concreto, en el rechazo celular agudo, aunque las células Th1 son clásicamente las que atacan al injerto, están ganando interés las **T helper 17**, como potentes inductoras de la inflamación y productoras de IL17, citoquina altamente proinflamatoria con efectos sobre las células estromales de muchos tejidos. Su función principal parece ser acabar con los patógenos que no son adecuadamente manejados por las Th1 o por las Th2. De hecho, parecen estar relegadas a un ambiente libre de Th1.

Se han relacionado experimentalmente con la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes e inflamatorias en humanos. Se han visto también implicadas en el rechazo de otros órganos sólidos como pulmón y corazón, y por primera vez en el 2013, también en el trasplante de intestino [32]. Así, un grupo de China, al ver que 3 pacientes de su hospital que desarrollaron rechazo tras un TI presentaban unos niveles muy elevados niveles de Th17, realizaron un estudio experimental en ratas observando una correlación clara entre la expresión de células Th17 y el grado de rechazo, y vieron

que el anticuerpo monoclonal anti IL17 prolongaba la supervivencia en estos casos, disminuyendo su presencia, así como la expresión de IL17 en suero y en el injerto, y de otras citoquinas proinflamatorias en el injerto. Sugerían así que la IL17 podría ser una diana para tratar el rechazo.

Además de las células Th1 y las Th17, se siguen descubriendo otras poblaciones, como las **Th9**, productoras de IL9, o las **T helper foliculares**, que son importantes ayudando los linfocitos B, y podrían tener roles importantes en enfermedades autoinmunes y modelos alérgicos, etc. Aunque su función exacta en la aloinmunidad se desconoce, podrían estar implicadas en respuestas de rechazo en TOS..

En la última década, la mayoría de la investigación acerca del rechazo y de la tolerancia se ha centrado en el balance entre células T de memoria efectoras y **células T reguladoras (Tregs)**. Estas últimas merecen especial atención, aunque cada vez se describen más subtipos de las **células reguladoras** del SI, y esto se complica al existir diferencias entre humanos y ratones: B reguladoras (Bregs), macrófagos reguladores (Mregs), CD tolerogénicas (tolCDs)...[33]. Algunas de estas poblaciones se mencionan más adelante al estudiar los efectos inmunomoduladores de las células troncales mesenquimales, aunque aquí nos centraremos en las Tregs.

Los primeros linfocitos con **capacidad supresora** se describieron como células T CD8 entre los 60 y 70, aunque posteriormente se vio que también había CD4. A mediados de los 80, renace el concepto de Células T supresoras, que posteriormente se llamarían **Linfocitos T reguladores o Treg** gracias a las publicaciones de *Sakaguchi et al* donde realizan estudios en ratones sometidos a timectomía neonatal induciéndoles una enfermedad autoinmune; se vio que tenían cifras muy bajas de CD4 y CD8, y sólo eran capaces de curarse cuando se reponían con células **CD4+**, sugiriendo que éstas eran las encargadas del control de la autoinmunidad. Más tarde se demostró que este control dependía de un subgrupo de las CD4, que expresaban la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25), sugiriendo que las **CD25+** eran realmente las encargadas del control de los fenómenos autoinmunitarios. No obstante, el principal grupo se ha descrito dentro de las CD4. Las Treg en ratones se distinguen con la simple expresión de CD4+CD25+, mientras que en los humanos con ser CD4+CD25<sup>high</sup> es suficiente, ya que este CD25 se expresa también en células T recién activadas.

Desde entonces, el interés de la inmunología por las Treg (mayoritariamente **CD4+CD25+Foxp3+**) ha crecido exponencialmente, definiéndose como “una subpoblación de células T que juegan un

## INTRODUCCIÓN

papel fundamental en inducir y mantener el estado de tolerancia frente a antígenos tanto propios como extraños mediante la supresión de respuestas de células T agresivas” [34, 35]. No sólo inhiben a las Th1, sino también a las Th17, siendo su balance fundamental para regular respuestas inmunes y autoinmunes, así como promover o inhibir el rechazo [36], aunque hay discrepancia al respecto, ya que otros autores dicen que las Th17 no se afectan por la supresión mediada por las Tregs [37].

Se clasifican en función de su origen y su mecanismo de acción. Este último puede ser por contacto directo entre las células Treg y su célula diana, o a través de la secreción de factores solubles, como las citoquinas IL10 y el TGF $\beta$ . Se está investigando si son también capaces de actuar a través de las CPA.

Las **Tregs** pueden ser naturales (**nTregs**) (**CD4+CD25+Foxp3+**), de origen tímico [38-40], y adquiridas, que se inducen en la periferia en respuesta a la estimulación antigénica bajo condiciones tolerogénicas.

Las **nTreg** controlan tanto las respuestas autoinmunes como alogénicas. Durante la maduración tímica, los timocitos que van a diferenciarse en nTreg tienen una gran afinidad por los CMH-autoantígenos expresados en el estroma tímico, aunque no la suficiente como para inducir su muerte celular tras la activación, proceso frecuente en el desarrollo tímico. Expresan constitutivamente una gran variedad de moléculas (CD25, CD45RB<sup>low</sup>, CD62L, CD103, CD152, CTLA-4 o GITR), aunque en los humanos, el mejor modo de identificarlas es mediante una **expresión muy alta de CD25**. Sin embargo, el marcador más empleado hasta la fecha ha sido el de su master gen **Foxp3**. Se descubrió en el 2003 con estudios en ratones *scurfy* y en pacientes con síndrome IPEX, ambos con enfermedades autoinmunes, al ver que tenían mutado este gen, y que eso se traducía en una reducción de las Treg CD4+CD25+. Más adelante se vio que el **Foxp3** también se podía relacionar con células CD4+CD25- con propiedades reguladoras. Al ser un factor de transcripción, y por tanto, una proteína intracelular, su marcaje implica una permeabilización, lo que hace imposible utilizar estas células en cultivos in vitro posteriores, u otros estudios funcionales, y por ello actualmente se han descrito otros marcadores de superficie como la **baja o ausente expresión de CD127** en su superficie junto a la alta expresión de CD25.

Junto a estos, se han descrito otros marcadores relacionados con su estado de activación. Así, el CD45RA<sup>+</sup> implica que son Treg *naïve*, frente a los CD45RA<sup>-</sup>, que son de *memoria*. Además, la expresión de HLA-DR en la superficie celular implica que dicha célula Treg realiza su función de

un modo dependiente del contacto. Por último, existen diferentes marcadores que se expresan en un porcentaje variable de Tregs.

Estas células son capaces de controlar la respuesta inmunitaria tanto adquirida como innata, ya que parecen actuar sobre las CPA, bañándolas de citoquinas (por ej. TGF), inhibiendo su capacidad para activar el rechazo, y modificándolas para que sólo puedan activar a otros linfocitos T reguladores (“Tolerancia infecciosa”). Su capacidad supresora puede estudiarse *in vitro* usando diferentes cantidades de células T reguladoras (CD4+CD25+) y de células T efectoras (CD4+CD25-), viendo como en presencia de un estímulo de proliferación, las nTreg pueden suprimir la proliferación de las efectoras y la producción de IL2, de manera dosis dependiente.

Sin embargo, esta idea tan esperanzadora no es tan fácil de llevar a la clínica, ya que para medir la capacidad inmunosupresora son necesarios al menos 4 días para cultivar ambos tipos celulares, y estudiar la proliferación celular. Con el fin de acortar los resultados se ha propuesto por ejemplo evaluar la expresión de los marcadores de activación de las células efectoras, como el CD60 o CD154 (CD40L). También se ha visto que la capacidad supresora puede ser mediada por el TGFβ, o por la expresión de moléculas de superficie como el CTLA-4. Además, pueden inducir la expresión deIDO en las células dendríticas y convertirlas en tolerogénicas.

Las **Treg adquiridas** tienen una baja capacidad proliferativa, y no modifican su fenotipo ni su función. Tampoco expresan niveles elevados de CD25 ni Foxp3, pareciendo poblaciones distintas, con distinta capacidad de diferenciarse según el antígeno específico y distintos mecanismos de acción reguladores. Así, las tímicas se reclutan y activan en fases tempranas de la respuesta inmunitaria, mientras que las adquiridas se activan tras estímulos repetidos con el antígeno, pudiendo actuar en fases tardías de la respuesta y mantener estadios de tolerancia, lo cual resulta de interés en el campo del trasplante. Dentro de este grupo, hay también subtipos como las **Tr1** y **Thelper3**, aunque carentes de un marcador fenotípico específico. Las **Tr1** secretan grandes cantidades de IL10, y también de TGFβ, suprimiendo así las respuestas de las T efectoras naïve y de memoria. A diferencia de otras CD4, como las Th1 o las Th2, producen muy poca IL2 y nada de IL4. A veces producen IL5 e IFNγ, pero menos que las Th1. Tras activarse, expresan valores normales de marcadores de activación, como CD69, CD28, CD40L, CTLA-4 o HLA-DR. En reposo estas células expresan receptores de quimoquinas asociados tanto a células Th1 (CXCR3, y CCR5) como a células Th2 (CCR3, CCR4, CCR8). Las **Th3** se localizan en las placas de Peyer del intestino, donde parecen diferenciarse. Se identificaron en estudios acerca de los mecanismos de la

## INTRODUCCIÓN

tolerancia oral, al ver que al administrar un antígeno en dosis bajas por vía oral, estas células, que eran CD8, suprimían la respuesta inmunitaria 1 o 2 días después mediante la secreción del TGF $\beta$ , mientras que en dosis altas inducían anergia o depleción celular. Son capaces de suprimir la proliferación y producción de citoquinas de células Th1 mediante la secreción de citoquinas supresoras (IL10, IL4, TGF $\beta$ ), de forma antígeno inespecífica. Posteriormente se ha visto que las Th3, tanto CD4 como CD8 secretan TGF $\beta$ , mientras que sólo las CD4 producen IL4 e IL10.

Además de las Tregs naturales y tímicas, existen **otras células T con propiedades reguladoras**, entre ellas las CD8, las Natural Killer T y otras células T reguladoras doble negativas. Como hemos comentado al principio, las **CD8** fueron las primeras células que se definieron como “reguladoras”, en modelos experimentales de encefalitis alérgica, al ser capaces de suprimir la activación de los CD4 por autoantígenos. Más adelante su capacidad reguladora se atribuyó a una molécula que expresaban (la Qa-1), capaz de presentarles péptidos endógenos y exógenos, también descrita en humanos (HLA-E). Sin embargo, el mecanismo exacto por el que las CD8 se diferencian hacia citotóxicas o hacia supresoras mediante la secreción de citoquinas se desconoce. Recientemente, se ha descrito la subpoblación **T CD8+CD28-**, también Foxp3+, que convierten a las células dendríticas en tolerogénicas, y éstas a su vez promueven la generación de células Treg CD4.

Las **natural Killer T (NKT)** son CD4-CD8-, y presentan un alto grado de conservación entre las especies. La proporción de células NKT en el timo es del 0,5%, mientras que suponen el 5% de los timocitos que salen a la periferia para distribuirse en sangre, ganglios linfáticos (0,5% de los linfocitos T), bazo y ganglios mesentéricos y pancreáticos (2,5%) y en el hígado (30%). Una vez activadas producen gran cantidad de citoquinas en 1-2 horas, tanto Th1 (IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) como Th2 (IL4 e IL13) simultáneamente in vivo. Sin embargo, también se han asociado con la regulación de respuestas inmunitarias en patología autoinmune, cáncer e infecciones. Existen dos teorías al respecto: la primera sugiere que existen dos poblaciones de células NKT, las Th1 y las Th2, las cuales dirigen después las respuestas Th1 o Th2 o tolerogénicas; y la segunda sugiere que las células NKT son homogéneas y se diferencian a distintos fenotipos funcionales según las citoquinas presentes en el ambiente de activación y la afinidad por el antígeno que es reconocido por el receptor celular.

El 1-2% de los linfocitos maduros son **TCR+CD4-CD8- o doble negativos (DN)** y no expresan marcadores de células NK como CD16 ó CD56. No está claro ni su origen ni si todas estas células son reguladoras, pero parecen contribuir a mantener la tolerancia frente a los autoantígenos y los

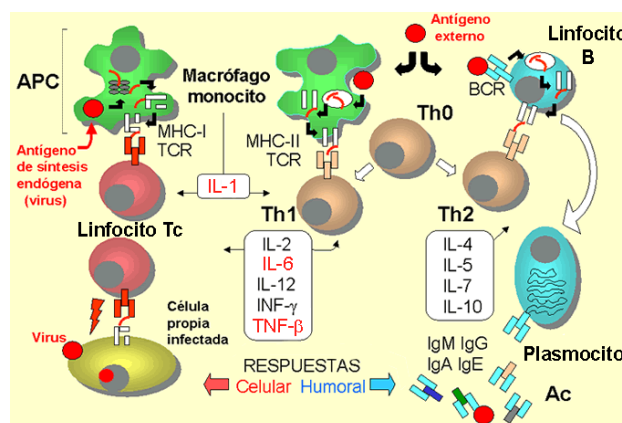
aloinjertos, y también frente a la EICH y contra el crecimiento tumoral. Se sabe que los timocitos pueden diferenciarse en estas DN cuando se cultivan con antígenos de alta afinidad, pero quizá también se puedan diferenciar desde linfocitos periféricos, tal como sugieren los experimentos en ratones timectomizados que se reconstituyen con médula ósea. Una vez activos expresan **CD25** y **CD69**, pero no CD44 ni CD28. Por otro lado, el patrón de expresión de citoquinas es distinto al de otras células T: las de ratón producen  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  y algo de  $TGF\beta$ , pero no IL4, ni IL10 ni IL13. Las humanas producen  $IFN\gamma$ , y en muy pocas cantidades IL2, IL4 e IL10.

*Todas estas posibilidades dentro de las células T reguladoras complican la comprensión de la respuesta inmune, y permiten explicar muchos resultados controvertidos en investigación,*

## 2) Rechazo humoral

El **Rechazo humoral o mediado por anticuerpos** (AMR, de “*antibody mediated rejection*”) se ha descrito más recientemente y puede conducir también a la pérdida del injerto. Se produce por el desarrollo de anticuerpos específicos (IgG) antiHLA del donante (DSA). En la *patogenia* intervienen linfocitos **B**, células plasmáticas y otros mediadores del sistema del complemento.

Clásicamente, un linfocito B nativo reconoce un antígeno mediante su receptor a través de una molécula CMH II, lo procesa y se lo presenta a las CD4 (Th2), al mismo tiempo que desencadena la producción de Ig M. El Th2, previamente captado por una CPA con el mismo antígeno, se une al linfocito B y secreta citoquinas, desencadenando la proliferación de células B y su diferenciación en células plasmáticas. Estas son una fábrica de anticuerpos contra ese antígeno específico, cambiando de IgM a producir IgG, IgA e IgE (Figura 6).



**Figura 6:** Esquema de la presentación del antígeno desencadenando las respuestas celular y humoral, similar a lo que ocurre en el rechazo (imagen obtenida de <https://oposinet.cvexpres.com/temario-de-biologia>)

## INTRODUCCIÓN

Recientemente también se han descrito los linfocitos B con un perfil regulador (**Bregs**), que contribuyen a mantener la tolerancia en enfermedades autoinmunes [41, 42]; el balance entre las células B efectoras y las reguladoras es actualmente el principal foco de muchos estudios. Aunque el fenotipo de las Bregs aun no está claro, sí parece que la IL10 es crucial para su función. También en TOS, existen evidencias preliminares sobre la existencia de estas células en receptores renales libres de inmunosupresión, sugiriendo que estas células podrían jugar un papel importante en las complejas redes hacia la tolerancia [43, 44].

Por otro lado, los linfocitos B también pueden permanecer como **células B de memoria**. De hecho, se vio que pacientes trasplantados renales con función renal estable presentaban una mayor frecuencia de células B y de células B de memoria CD19+CD27+ [45-47]. No obstante, hacen falta más estudios.

Se han descrito varios fenotipos clínicos dentro del Rechazo humoral: el **Rechazo hiperagudo** es una complicación grave que se presenta inmediatamente tras la reperfusión. Está provocado por DSA preformados en el receptor. Las células endoteliales de los vasos del injerto son las principales diana, y cuando se unen los anticuerpos a ellas, causan lisis celular debida a la activación del complemento y de las células endoteliales, produciéndose una trombosis intravascular por el depósito de fibrina y plaquetas, con consecuencias catastróficas para el injerto. Se detiene así el flujo al injerto recién anastomosado, que pasa de ser rosa a oscurecerse en unos minutos y finalmente a la necrosis. Los anticuerpos contra los antígenos del grupo sanguíneo pueden provocar rechazo hiperagudo, estando contraindicado trasplantar con una incompatibilidad AB0, excepto en casos seleccionados en receptores previamente condicionados (es decir, tratado antes del trasplante para reducir la concentración circulante de los anticuerpos contra el antígeno). El paciente puede tener DSA (“hipersensibilizado”) por transfusiones sanguíneas, embarazos, o trasplantes previos. Alrededor de un 20% de los pacientes transfundidos producen anticuerpos contra los antígenos de los leucocitos humanos (HLA). Las mujeres embarazadas (en especial las multíparas) pueden tener concentraciones muy altas de anticuerpos dirigidos contra antígenos paternos del feto.

El **rechazo precoz grave** ocurre en las primeras semanas post-trasplante y generalmente se produce por sensibilización previa con bajo título de anticuerpos. Es el más difícil de distinguir del rechazo celular agudo. Mediante un proceso T dependiente, las células B de memoria previamente generadas producen anticuerpos anti-HLA neoformados. En estos casos la prueba cruzada puede ser negativa. Del mismo modo, el **rechazo tardío humoral de novo** es de desarrollo lento y



progresivo, y por lo tanto, de diagnóstico tardío, generalmente a partir del año del trasplante con un injerto estable. En la histología se ve vasculopatía crónica y fibrosis.

En modelos experimentales, el rechazo celular agudo normalmente se acompaña también de producción de **aloanticuerpos**, pero éstos puede que no dañen al injerto. Estudios recientes en ratones carentes de anticuerpos pero que por otro lado tienen un sistema inmune intacto muestran como los linfocitos T son los principales efectores del rechazo agudo del injerto. Sin embargo, cuando los linfocitos T están comprometidos, los anticuerpos pasan a tener un papel más importante en el rechazo. Consistente con esta afirmación, estudios experimentales han demostrado que el tratamiento para suprimir el rechazo disminuye también la unión de los anticuerpos en el injerto. La monitorización post trasplante de rutina de la producción de anticuerpos (DSA) en receptores humanos es muy reciente, y es probable que el AMR fuera infraestimado hasta hace poco. Las respuestas de los anticuerpos tras el trasplante no son fáciles de interpretar, sugiriendo algunos estudios que los circulantes y a muy pequeñas dosis podrían incluso proteger al injerto del rechazo agudo. Por ejemplo, la transferencia pasiva de anticuerpos antidonante a ratas trasplantadas las protegía del rechazo (tolerancia inmunológica pasiva) y causaba daño sólo cuando el complemento de conejo se inyectaba también. Del mismo modo, experimentos in vitro muestran que anticuerpos en muy pequeñas dosis protegen a las células reguladoras de las moléculas de adhesión mediadas por citoquinas.

*Una vez más es difícil independizar a la población inmune responsable del rechazo humoral y/o celular para enfocar mejor el tratamiento.*

### 3) Rechazo crónico

Por último, el **rechazo crónico** adquiere mayor relevancia a medida que aumenta la supervivencia del paciente y del injerto. Se calcula una incidencia del 8% y según algunas series, haber tenido un rechazo agudo severo o daño IR previo es un factor de riesgo. Es de aparición lenta e insidiosa, pero progresiva. Es una de las principales causas de pérdida del injerto que obliga al retrasplante. No nos detendremos más al no ser el objetivo de esta tesis.

### 6) Citoquinas y su papel en el Rechazo

Para comprender la fisiopatología del rechazo, además de estudiar las distintas poblaciones celulares implicadas, es necesario hablar de otras moléculas, que van a dirigir las respuestas de estas células hacia un mayor o menor daño. Las más importantes y estudiadas son las citoquinas, aunque cada vez se descubren más. Estas proteínas solubles de bajo peso molecular descubiertas en la década de los 60-70 son producidas sobre todo por linfocitos y macrófagos activados, pero también por polimorfonucleares, células endoteliales, epiteliales... Son esenciales para la comunicación intercelular y controlan muchas funciones fisiológicas críticas tales como diferenciación y maduración, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y muchos otros procesos biológicos.

Las interleucinas (IL), entre ellas, son sintetizadas principalmente por leucocitos, y son protagonistas en la inflamación y respuesta inmune local y sistémica, al unirse a receptores de superficie celulares específicos, activándolos y generando cascadas de señalización celular, que alteran la función celular, como por ej. la proliferación y quimiotaxis, el crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas... Esto incluye la regulación positiva o negativa de diversos genes y sus factores de transcripción que resultan en la producción de otras citoquinas o un aumento en el número de receptores de superficie para otras moléculas, o la supresión de su propio efecto mediante retroregulación.

Se caracterizan por su redundancia, ya que muchas citoquinas diferentes comparten funciones similares, y por ser pleiotrópicas, es decir, actúan sobre muchos tipos celulares diferentes y una célula puede expresar receptores para más de una citoquina. Pueden actuar de forma autocrina (sobre la célula que la secreta), paracrina (en el entorno inmediato al que se secreta) y endocrinas, llegando a través del plasma a regiones distantes para actuar sobre diferentes tejidos.

Algunas participan más específicamente en la respuesta inmune innata, otras en la celular o citotóxica y otras en la humoral, y existen citoquinas con funciones más homeostáticas que inmunológicas. Las que actúan en la **respuesta inmune innata** son mayoritariamente **proinflamatorias**, destacando el IL1, TNF $\alpha$ , IL8, IL12, IL16 e interferones:

La **IL1** y el **TNF $\alpha$**  son los principales mediadores de la respuesta aguda inflamatoria generalizada. Son las más tóxicas, si se producen en exceso generan shock séptico y fallo multisistémico orgánico. En trasplante, se ha descrito que las concentraciones de TNF $\alpha$  se correlacionan positivamente con el grado de rechazo agudo en TOS, así como con la inducción de apoptosis y

proliferación de células T, tanto en el ámbito clínico como experimental, incluido el TI [36, 48-51]. La IL1 $\alpha$  es sintetizada por mononucleares y macrófagos; Induce reacción de fase aguda y la activación y reconocimiento por parte de los linfocitos T y de los macrófagos del lugar donde se desarrolla la respuesta inmunitaria. IL6 e IL12, además actúan en la inmunidad específica: **IL6** es un factor autocrino de linfocitos B y **IL12** estimula la inmunidad celular citotóxica.

También existen **citoquinas antiinflamatorias**, que inhiben y antagonizan los efectos de las previas, y son producidas por los linfocitos **Th2 y por las Tregs**, como la IL10 y el TGF $\beta$ , como ya hemos visto: La **IL10** es producida por linfocitos T y B y macrófagos activados, y se encarga de suprimir la activación de macrófagos y su consiguiente producción de TNF $\alpha$ , IL1, IL6 y IL8. Al inhibir la presentación antigénica, indirectamente suprime la proliferación de células T CD4 efectoras y su producción de IL2 y de TNF $\alpha$ . También inhibe la producción de IFN $\gamma$  por las células Th1 y NK.

El **TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta)** es otra citoquina poderosamente antiinflamatoria y/o inmunosupresora, que actúa sobre muchas células diana. Es muy importante en la regulación y su actividad incrementada induce consecuencias indeseables de la respuesta inmune tales como fibrosis, angiogénesis e inmunosupresión en cáncer. Al igual que la IL10, también es producido por las Tregs (Tr1), reduciendo la actividad de las CPAs e inhibiendo la secreción y proliferación de citoquinas por parte de las células T, como la IL12 y la expresión de CD40, desviando hacia una respuesta Th2 y Th3.

Las principales citoquinas que participan en la **respuesta inmune celular y/o citotóxica**, y por tanto protagonistas en la patogenia del rechazo, son el **Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) e Interleuquina 2 (IL2)**, sintetizadas y secretadas por los linfocitos Th1, activados tanto por la vía directa como la indirecta de aloreconocimiento. El **IFN $\gamma$  o “inmune”**, sólo se produce por células inmunológicas activadas, y es el principal activador de macrófagos y linfocitos T citotóxicos (sobre todo CD8) y de NK, y les induce a liberar enzimas, radicales libres y otros agentes nocivos (como si pretendiera limpiar la infección) así como otras citoquinas proinflamatorias (por ej IL1, TNF $\alpha$ ). También aumenta la capacidad de las CPAs de procesar y presentar el antígeno y de expresar moléculas coestimuladoras para activar los linfocitos T. Así, El IFN $\gamma$  aumenta la expresión de moléculas de adhesión del endotelio y de moléculas de CMH II en el parénquima del injerto, facilitando así la adhesión de los leucocitos circulantes a las paredes de los vasos y su infiltración del injerto (patognomónico del rechazo agudo). Esta vía, análoga a la hipersensibilidad retardada de tipo IV,

## INTRODUCCIÓN

parece ser fundamental en el daño del injerto. Curiosamente el IFN $\gamma$  también actúa en la inmunidad humoral, induciendo la producción de IgG.

La **IL-2** o “factor de crecimiento de células T” fue descubierto en 1977 por Robert Gallo, y actúa como factor de crecimiento de células B y T, aumentando dramáticamente su proliferación y supervivencia, siendo esencial para mantener viables sus cultivos. De hecho, el rechazo del injerto puede ser suprimido al bloquear su producción (con los inhibidores de la calcineurina, como la ciclosporina o el tacrolimus), o su reciclaje actuando sobre los receptores de IL2 (usando anticuerpos monoclonales antiCD25, una de las cadenas del receptor de la IL2, como el basiliximab), o las señales intracelulares a través del receptor de IL2 (con rapamicina). Volveremos a ello al hablar del tratamiento del rechazo en el punto siguiente. Además, los CD8 citotóxicos dependen de la IL2 para activarse. También genera otras células citotóxicas, especialmente NK y macrófagos antitumorales.

Las citoquinas pro y antiinflamatorias juegan un papel fundamental en la inmunología del trasplante. Estudios previos demostraron que la IL2 aumentaba dramáticamente en el rechazo agudo y se correlacionaba muy bien con la severidad del mismo [52]. Por el contrario, altas concentraciones de IL10 se asocian con el no rechazo del injerto y con la inducción de tolerancia [53]. Se ha descrito que la IL10 inhibe la respuesta Th1 bloqueando la síntesis de la IL12 en las células dendríticas e induciendo respuestas Th2 [54]. Asimismo, las concentraciones en suero de IL2 e IL10 y el ratio IL2/IL10 se ha relacionado con el rechazo y la tolerancia en el TI [55, 56]. Sin embargo, en pocos centros se utilizan estos parámetros en la práctica clínica.

Otras citoquinas como la **IL4**, **IL5**, **IL6**, **IL10** y la **IL13** favorecen **respuestas humorales**, y por tanto la secreción de anticuerpos por los linfocitos B o células plasmáticas, resultando en una respuesta menor de rechazo [57]. Son secretadas por los linfocitos **Th2**, pero también por linfocitos B, mastocitos, eosinófilos y algunas por macrófagos (IL6, IL13). La **IL4 o Factor estimulante de linfocitos B** (IL4 o BCSF) es la mejor caracterizada: en pocas cantidades induce secreción de las subclases de IgG: IgG1, IgG3 e IgG4, mientras que en grandes cantidades induce la producción de IgE; antagoniza la función del IFN $\gamma$  (activación de macrófagos y células citotóxicas), inhibiendo así las células Th1. La **IL5** tiene un rango de acción más reducido, induce la generación de IgA y eosinófilos. La **IL6** es una citoquina pleotrófica; en inflamación, induce la síntesis de reactivos de fase aguda por parte de los hepatocitos y potencia los efectos de IL1 e TNF $\alpha$  aunque sin la toxicidad de éstas; en la inmunidad humoral tiene los efectos similares a **IL11**, promoviendo la

proliferación, diferenciación de linfocitos B y la síntesis de inmunoglobulinas. Adicionalmente, la IL6 se ha visto que actúa como factor autocrino de crecimiento de células tumorales B malignas y benignas, como en el mieloma múltiple o en el mixoma cardíaco, y también está elevada en el lupus eritematoso sistémico, teniendo un papel en la autoinmunidad.

Hay también **citoquinas con funciones homeostáticas**, actuando en procesos tisulares como hematopoyesis, remodelación ósea o el desarrollo embrionario. Algunas actúan en las líneas primordiales multipotentes, como la **IL3, GM-CSF**, otras en líneas celulares ya definidas o comprometidas hacia la diferenciación, como la eritropoyetina, factor de crecimiento de megacariocitos (TPO), de granulocitos (G-CSF), monocitos (M-CSF), linfocitos (IL-2) o eosinófilos (IL-5); y otras que que inhiben o actúan sinérgicamente con otras citoquinas, aunque solas tienen poco efecto (Stem Cell Factor, IL-6, IL-1).

Dentro de las citoquinas, existe un subgrupo conocido como **quimoquinas**, capaces de inducir la quimiotaxis. Estructuralmente son pequeñas y tienen cuatro residuos de cisteína, que les confieren su estructura tridimensional. Históricamente se han llamado de varias formas. Algunas se consideran homeostáticas y están involucradas en el control de la migración celular durante los procesos normales de mantenimiento o desarrollo de tejidos. Otras son **inflamatorias** y son liberadas por una gran variedad de células como respuesta a una infección o daño físico. Crean un gradiente de concentración, atrayendo a las células diana, como leucocitos, entre ellos monocitos, neutrófilos y otras células efectoras desde la sangre hasta lugares de infección o daño tisular. Su liberación es a menudo estimulada por citoquinas pro-inflamatorias tales como la IL1. Algunas incluso activan las células para iniciar una respuesta inmunitaria tanto inespecífica como específica, o para promover la cicatrización. Actúan mediante su unión a receptores transmembrana que se encuentran selectivamente en las superficies de sus células diana, llamados CCR.

Son aproximadamente un 20-50% idénticas entre sí, es decir, comparten homología de secuencia genética y de aminoácidos. Se dividen en cuatro grupos dependiendo de la distancia entre sus dos primeros residuos de cisteína.

1. Las **quimoquinas CC** (o  $\beta$ -quimoquinas) tienen dos cisteínas adyacentes. Están descritas al menos 27 que estén presentes en los mamíferos, y se llaman ligandos de quimoquinas CC (CCL) -1 a -28, aunque la nomenclatura es confusa y reciben diferentes nombres en

## INTRODUCCIÓN

distintos artículos, lo que dificulta su interpretación; Inducen la migración de varios tipos celulares, como monocitos, células NK y células dendríticas. Ejemplos son la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2) que induce a los monocitos a liberar el torrente sanguíneo y entrar en el tejido circundante para convertirse en macrófagos tisulares, o las CCL5(o RANTES), que atraen a células que expresan el receptor CCR5, como las células T, eosinófilos y basófilos. Otras son las MIP 1 $\alpha$  y 1 $\beta$  (proteínas inflamatorias de macrófagos, ahora conocidas como CCL5, CCL3 y CCL4).

2. Las **quimoquinas CXC** (o  $\alpha$ -quimoquinas), tienen dos cisteínas N terminales separadas por un aminoácido, representado en el nombre con una X. Se han descubierto 17 CXC en mamíferos; unas, como la IL8, inducen específicamente la migración de neutrófilos, e interactúan con los receptores CXCR1 y CXCR2. Otras como la CXCL13, atraen a los linfocitos...
3. Las **quimoquinas XC** (o quimoquinas  $\gamma$ ), sólo presentan dos cisteínas y atraen a los precursores de las células T al timo. Sólo hay dos descritas (XCL1 y XCL2).
4. Las **quimoquinas CX<sub>3</sub>C**: presentan tres aminoácidos entre las dos cisteínas. La única descrita ha sido la fractalquina (o CX<sub>3</sub>CL1). Es a la vez secretada y unida a la superficie de la célula que lo expresa, por lo que sirve tanto como un quimioatrayente como una molécula de adhesión.

Hay descritos diecinueve **receptores de quimoquinas** distintos hasta la fecha, que se dividen en cuatro familias dependiendo del tipo de quimoquina al que se unen: así, los receptores CCR se unen a quimoquinas CC, los receptores CXCR se unen a quimoquinas CXC (hay siete descritos, y se designan CXCR 1-7); el receptor XCR1 se une a las dos quimoquinas XC, y el receptor CX<sub>3</sub>CR1 se une a la CX<sub>3</sub>CL1. En general, estos receptores están acoplados a receptores de proteínas G con siete dominios transmembrana situados en la superficie de los leucocitos. Cuando se activan, las proteínas G se acoplan al C terminal para permitir la señalización intracelular, mientras que el dominio N terminal determina la especificidad de unión del ligando. En los Anexos I, se detalla una tabla con los diferentes nombres de las quimoquinas y sus receptores conocidas hasta la fecha.

*El conocimiento integrado de las múltiples poblaciones celulares y moléculas implicadas en el rechazo celular, sumado a la aceptación de que probablemente irán apareciendo muchas más que se deben integrar en los conceptos ya asimilados, es el que nos va a permitir entender el rechazo, en este caso, el rechazo celular agudo, de un forma más integral y exhaustiva, con el fin de orientar mejor su prevención y tratamiento.*

## b. MONITORIZACIÓN CLÍNICA INMUNOLÓGICA EN EL RECEPTOR DE INTESTINO Y MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DEL RECHAZO

Ante la complejidad expuesta acerca de la fisiopatología del rechazo ¿cómo prevenirlo y diagnosticarlo? Un diagnóstico precoz es clave, ya que una demora en el tratamiento puede conducir a la pérdida del injerto, y se consigue monitorizando tanto el injerto como el sistema inmune del receptor. Esta monitorización permitirá además predecir una adaptación buena del injerto, y la respuesta a la inmunosupresión, pudiendo realizar los ajustes oportunos.

### 1) Métodos diagnósticos de Rechazo Celular actualmente utilizados en clínica

Actualmente, el *diagnóstico* se basa en la **clínica** y en los **hallazgos endoscópicos e histológicos**. Hay muchos intentos por encontrar **marcadores menos invasivos**, aunque hasta la fecha no han sido capaces de sustituir a los tradicionales.

En el **rechazo celular agudo**, la **clínica** es inespecífica, suele ser aumento de pérdidas, fiebre, distensión... o incluso sepsis por translocación si la mucosa ha perdido la integridad.

La toma de **biopsias** de rutina a través de la ileostomía sigue siendo la prueba estándar de vigilancia para el despistaje del rechazo. Como línea general, el cierre de ileostomía no se hace hasta pasados los 6 meses del trasplante, por este motivo. Al principio se realiza semanalmente espaciando la endoscopia después a sólo cuando existe sospecha clínica de rechazo. El ileon, por su distribución del GALT (tejido linfóide asociado al intestino), resulta el sitio más idóneo para biopsiar, ampliando a endoscopia alta cuando hay sintomatología del tracto alto o en casos con ileoscopia normal pese a una alta sospecha clínica. Se deben realizar varias biopsias por la posibilidad de una afectación parcheada y lejos del estoma para evitar cambios regenerativos e inflamatorios inespecíficos. Conviene incluir zonas afectadas e indemnes, y a ser posible muscularis mucosae y parte de la submucosa para incluir suficientes criptas y el GALT.

*Histológicamente*, el rechazo celular agudo se caracteriza por una combinación variable de apoptosis de las células profundas de las criptas, un infiltrado mixto (linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y neutrófilos) y un daño del epitelio de las criptas. La apoptosis (>6/cripta) es un hallazgo fundamental, aunque no específico, y se puede ver también en el daño de preservación, la isquemia o las infecciones. Suele verse más en los rechazos más tardíos y predomina la infiltración en los más precoces. Puede aparecer criptitis, pero los abscesos en las criptas son raros. En los

## INTRODUCCIÓN

rechazos graves, puede aparecer un exudado mucopurulento con la formación de pseudomembranas como consecuencia de la destrucción mucosa. Si las muestras tienen muchas úlceras o necrosis puede ser que no se aprecien los cambios asociados al rechazo. *Ultraestructuralmente*, aunque no se realiza de rutina, los cambios en las microvellosidades, así como la alteración de las uniones celulares en la mucosa del injerto se han descrito como marcadores de rechazo [58, 59].

El **rechazo celular crónico** suele presentarse como diarrea persistente con ulceración mucosa que no responde al tratamiento habitual del rechazo agudo. Se caracteriza histológicamente por una arteriopatía obliterante con proliferación fibrosa de la íntima de grandes y medianos vasos, aunque en algunos casos se ha descrito fibrosis sin arteriopatía obliterante. Desgraciadamente, no se aprecian en las biopsias de rutina, ya que dichos vasos no están presentes en la mucosa. No obstante, la clínica junto con algunas alteraciones inespecíficas, como la fibrosis, pérdida de criptas, distorsión de la arquitectura o ulceraciones pueden hacer sospechar el diagnóstico. Al analizar las piezas de la enterectomía, se aprecia un infiltrado inflamatorio mononuclear que se extiende desde la vecindad de las ramas principales de los grandes vasos hacia el resto del mesenterio que provoca una fibrosis progresiva que envuelve el intestino, transformándolo en un paquete rígido de paredes adelgazadas, conocido como “peritonitis esclerosante”. Este fenómeno explica la manifestación del cuadro como disfunción del injerto con trastorno de la motilidad.

Pese a seguir siendo la técnica de elección, la endoscopia con toma de biopsias no está exenta de complicaciones, por lo que los esfuerzos van dirigidos a encontrar **pruebas de detección de rechazo no invasivas**. Sin embargo, la mayoría se han enfocado en el trasplante renal, mucho más frecuente que el intestinal, y no han resultado tan exitosas. Entre otros motivos, el 60% de los receptores de un TI son niños y a veces estos tests requieren extraer demasiada cantidad de sangre. Por otro, encontrar una correlación estadísticamente significativa entre los estudios experimentales y los resultados inmunológicos reales del paciente son muy difíciles en trabajos de un solo centro. A continuación, se describen algunas de estas pruebas, algunas ya utilizadas de rutina en clínica, mientras que otras aún en vías de investigación (ver Tabla 2).



**Tabla 2:** Métodos diagnósticos de rechazo celular y humoral utilizados en clínica y en vías de investigación en el Trasplante Intestinal.

<b>Métodos diagnósticos de rechazo celular</b>		<b>Monitorización</b>
<b>Tradicionales, usados en clínica</b>	Clínica Endoscopia y biopsias	Injerto y Sistema Inmune Injerto
<b>Alternativos, usados en clínica</b>	Citrulina Calprotectina Medición de niveles de inmunosupresión Determinación de poblaciones periféricas de linfocitos Monitorización viral Immunow (Cylex) o test de la inmunidad celular	Injerto Injerto Sistema Inmune Sistema Inmune Sistema Inmune Sistema Inmune
<b>En vías de investigación</b>	Flujometría por dópler-láser Análisis de acidos biliares Granzima B Perforina Tests moleculares (NOD2) Determinación de citoquinas plasmáticas y en el injerto: ratio IL2/IL10, TNF $\alpha$ ... Ratio de células dendríticas mieloides /células dendríticas plasmacitoides ELISPOT Citometría de Flujo: CFSE, CD154+, CD8+CD28-, ... Cuantificación de células Tregs	Injerto Injerto Injerto Injerto Injerto Injerto Sistema Inmune Sistema Inmune Sistema Inmune Sistema inmune
<b>Métodos diagnósticos de rechazo humoral</b>		
<b>Usados en clínica</b>	DSA Clínica Endoscopia y biopsias Ensayos celulares citotóxicos: CDCXM Ensayos celulares no citotóxicos: Citometría de flujo (FCXM) Ensayos no celulares o de fase sólida (ELISA; LUMINEX) C4d Métodos de tipificación mediante técnicas de biología molecular	
<b>En vías de investigación</b>	C1Q	

## INTRODUCCIÓN

Entre las que *monitorizan el injerto*, la citrulina y la calprotectina han sido las más utilizadas en clínica, aunque resultan bastante inespecíficas, y existe la necesidad de buscar marcadores más específicos de rechazo. La **citrulina** es un aminoácido producido exclusivamente por el enterocito a partir de la conversión de la glutamina, útil como marcador de masa enterocitaria y predictor pronóstico en el fracaso intestinal secundario a intestino corto. Se propuso como marcador de rechazo en 2001, pero es inespecífico al no distinguir entre rechazo e infección. Estudios preliminares mostraron que los niveles de citrulina alcanzaron su punto más bajo a los pocos días del trasplante, para ascender a partir de ese momento hasta alcanzar un nivel estable a los 90-120 días del trasplante. Posteriormente se intentó establecer una correlación entre los niveles de citrulina y la gravedad del rechazo, obteniendo sólo una discreta diferencia entre el grupo de rechazo leve o moderado frente al grave, y sin capacidad predictiva. Posteriormente algún estudio ha encontrado que niveles  $<13\mu\text{mol/l}$  son predictivos de rechazo moderado-grave, pero otros estudios discrepan. Recientemente se vio que niveles  $>20\mu\text{mol/l}$  tenían un gran valor predictivo negativo para descartar rechazo en cualquier grado, y por encima de  $10\mu\text{mol/l}$ , para descartar rechazo grave [60]. En nuestro centro se realizan determinaciones a partir de las 2-4 semanas del trasplante, tanto en revisiones periódicas como cuando hay sospecha clínica de rechazo pese a una endoscopia normal, y se objetivó un descenso en los niveles de citrulina en los pacientes trasplantados con rechazo moderado-severo, aunque también en una paciente con enteritis por rotavirus.

La **calprotectina** es una proteína involucrada en múltiples procesos intra y extracelulares. Se encuentra en una alta concentración en el citoplasma de los neutrófilos, por lo que se eleva en las heces en los procesos que cursan con infiltración por leucocitos de la mucosa intestinal. Niveles altos se han correlacionado con el grado de actividad en la enfermedad inflamatoria intestinal. En un estudio piloto inicial *Sudan et al* observaron diferencia de niveles entre el grupo control y los grupos de rechazo y enteritis viral en una serie de TI, encontrando también que el riesgo de rechazo con niveles de calprotectina normales ( $<92\mu\text{mol/l}$ ) era muy bajo [61]. Otros estudios de mayor tamaño han corroborado estos hallazgos [62], aunque sigue siendo inespecífica y no permite diferenciar entre rechazo e infección.

Para *monitorizar el sistema inmune*, el método más empleado es la **medición de los niveles de inmunosupresión**. El parámetro más eficaz es el nivel de exposición al fármaco, siendo el nivel valle (predosis) el más fiable. La correlación de los niveles con la dosis es muy variable entre los individuos e incluso en el mismo individuo según las circunstancias. Además, los niveles óptimos

varían según el fármaco, el momento evolutivo del trasplante y otros factores asociados (función renal, infecciones), por lo que es necesaria una vigilancia estrecha.

La **determinación de poblaciones periféricas de linfocitos** es un test que está disponible en la mayoría de los hospitales de referencia, y mide la proporción y recuento absoluto de linfocitos T-helper CD3+CD4+, linfocitos T-citotóxicos CD3+CD8+, Linfocitos B CD19+ y Natural Killer CD16+CD56+, entre otros. Así, tras administrar agentes deplecionantes, se pueden cuantificar las distintas poblaciones, lo que ayudará a ajustar las dosis. La reconstitución de los CD4 se completa tras el segundo año del trasplante. Desgraciadamente, debido a la amplia variación en las poblaciones linfocitarias en función de la edad, y la escasez de pacientes trasplantados de intestino, es muy difícil establecer recuentos para cada población linfocitaria, que pudiera identificar individuos de alto riesgo [63, 64]. En Pittsburgh, recientemente midieron poblaciones linfocitarias seriadas en 67 niños trasplantados de intestino e inducidos con Timoglobulina [63], viendo que los propensos al rechazo tenían más linfocitos totales, T citotóxicos, y células NK antes del trasplante; que los recuperaban antes tras la depleción linfocitaria, y que el recuento era mayor también durante los primeros 30 días post-trasplante, cuando hay mayor riesgo de rechazo. En nuestro centro, no se realiza de rutina, salvo en casos aislados y sólo para contaje de linfocitos globales, en pacientes que han recibido medicación deplecionante, y que requieren un ajuste de medicación.

La **monitorización viral** es otra forma indirecta para monitorizar el nivel de inmunosupresión, ya que se ha visto que durante los primeros 2-3 meses tras el trasplante, cuando hay mayor riesgo de infecciones oportunistas por VEB, CMV o adenovirus, los recuentos de CD4 son inversamente proporcionales a las cargas virales de VEB. Estas cargas elevadas de VEB se han visto cada vez más como indicadores de que la inmunosupresión es excesiva, y ayudan a decidir a los clínicos a disminuir la inmunosupresión.

El **Inmunow (Cylex) o test de la inmunidad celular** estudia la competencia inmune tras el TI, en concreto de los CD4. Se realiza extrayendo una muestra de sangre y midiendo la producción de ATP tras estimular los CD4 con phytohemaglutinina. En un estudio ciego retrospectivo, *Zeevi et al* validaron su utilidad clínica al demostrar la correlación entre los resultados del test y los hallazgos clínicos e histológicos de 20 adultos trasplantados de intestino durante el primer año de trasplante. Así, los pacientes categorizados como “inmunológica y clínicamente estables” tenían una función inmune moderada-baja y no precisaron cambios en la medicación, mientras que los “inmunológica

## INTRODUCCIÓN

y clínicamente volátiles” tenían una función inmune alta y precisaron más medicación para tratar los episodios de rechazo agudo [65]. Así, este test sería útil para identificar a los pacientes susceptibles y para tomar la decisión o no de ir reduciendo la inmunosupresión de forma segura, al mismo tiempo que evitarlo en otros que tengan un riesgo elevado de rechazo. Sin embargo, su uso no está sistematizado de momento en todos los centros, y tampoco en el nuestro.

### 2) Métodos diagnósticos de Rechazo Celular en fase de investigación

Se han descrito **otros métodos** para monitorizar el injerto y el sistema inmune en el TI, que pueden añadir información en la búsqueda del rechazo, aunque siguen *en fase de investigación* y su aplicación clínica es limitada [66]:

En la *monitorización de injerto*, se han postulado otros métodos diagnósticos de rechazo como la **flujometría por doppler-laser, análisis de ácidos biliares, granzima B, perforina....** sin éxito. También se han estudiado **tests moleculares** para identificar marcadores de la inflamación intestinal, como el NOD2: nucleotide-binding oligomerization protein gene polymorphisms... todos ellos aún muy lejos de la clínica.

Con el objetivo de *evaluar la inmunidad general*, se ha descrito algunos tests inespecíficos, como el **ratio elevado de células dendríticas mieloides (CDM)/células dendríticas plasmacitoides (CDP)**: como hemos visto, las células dendríticas (CD) son CPAs muy potentes, y se ha sugerido que podrían servir como marcadores de “rechazo probable” en el TI. Las CDM (CD11c+) suelen elevarse en fases agudas de inflamación, mientras que las CDP (CD123+) tienen potencial tolerogénico, y se han visto aumentadas cuando el curso tras trasplante se desarrolla libre de rechazo, sugiriendo que el paciente requiere mínima o nada de inmunosupresión. *Gupta et al* publicaron en 2010 un estudio en pacientes pediátricos trasplantados de intestino e inducidos con timoglobulina, en el que observaron un aumento significativo del ratio CDM/CDP en los que desarrollaron rechazo precoz (en los primeros 60 días del trasplante), frente a los que no rechazaron. Así, sugirieron que una ratio mínima de 1.52 se relacionaba con ser rechazador (sensibilidad 86%, especificidad 67%) y podría identificar a los receptores más susceptibles de desarrollarlo en la clínica. No se vio correlación entre la ratio y los niveles en sangre de Tacrolimus [67].

Existen otros métodos, basados en reacciones leucocitarias mixtas (**RLM**), para detectar alorespuestas de los linfocitos T más específicas hacia el injerto, protectoras o dañinas. Clásicamente, esta RLM medía la proliferación de los linfocitos del receptor en sangre periférica, al estimularlo con linfocitos del donante y de third party. El test **ELISPOT** desarrollado por

*Gebauer et al* [68] es una versión mas sofisticada: así, estudios con muchos pacientes trasplantados renales demostraron que había relación entre un aumento en los linfocitos T del donante productores de IFN $\gamma$  y una menor supervivencia del injerto.

La RLM también se puede realizar con **citometría de flujo**, la cual, mediante anticuerpos marcados con fluorocromos, detecta la proliferación de marcadores inflamatorios en las células T del receptor, al estimularlas en un mismo cultivo durante 3-5 días con células de sangre periférica del donante o de third-party. Así se usa el CFSE (**carboxifluoresceína succinilmidyl ester**) para identificar la proliferación de linfocitos T citotóxicos, descrito como marcador de rechazo de TxI en niños [69]; o el **CD154+**, de los CD8 citotóxicos de memoria T aloespecíficos [70]; o el **CD8+CD28-** de las células T supresoras en el receptor. Esta técnica permite identificar la población de linfocitos T con el mejor balance de especificidad y sensibilidad para asociarla con el rechazo.

Otros estudios ya mencionados serían la **determinación de citoquinas**, ya sea en plasma o en el injerto, tales como el **TNF $\alpha$** , la **IL17**, ratio **IL2/IL10**...

#### **Células T reguladoras (Tregs) en la monitorización y el pronóstico del trasplante:**

Dadas las capacidades inmunorreguladoras de las células Treg, estas se propusieron rápidamente como **biomarcadores de tolerancia y de monitorización del trasplante** de órganos sólidos. En 2005, se observaron valores elevados de mRNA de Foxp3 en la orina de trasplantados renales con rechazo agudo, y además se relacionaban con un cuadro reversible, sugiriendo esto que podía ser una infiltración del tejido rechazado por células Treg para combatir dicho rechazo. Más tarde, estos valores elevados de mRNA de Foxp3 también se vieron en el injerto, tras la biopsia renal, en pacientes con rechazos borderline, sobre todo en aquellos que progresaron hacia rechazo agudo respecto a los no progresores. Así, en un trabajo posterior, se definió un grupo de pacientes con fenotipo regulador, frente a otro grupo con fenotipo citotóxico. Otros estudios han relacionado la mejor evolución del trasplante, con la proporción de células Foxp3+/IL17+. Así, la mayor expresión de Foxp3 en el injerto no se asocia a una mejor supervivencia, pero parece reflejar un efecto antagonizante de las células Treg frente al estado inflamatorio del rechazo, predice el resultado del rechazo subclínico en injertos renales [71], y su elevación permanente en el primer año posttrasplante renal se ha asociado a una mayor supervivencia del injerto y mejor función renal [47]; *Shan J et al* realizaron una revisión sistemática en 2011, concluyendo que los Tregs parecían correlacionarse bien con los resultados del trasplante de órgano sólido.

## INTRODUCCIÓN

Las células Treg también se han propuesto como marcadores en trasplante para **monitorizar el tipo y la cantidad de inmunosupresión**. Por ejemplo, se ha demostrado tanto in vitro como in vivo que el tratamiento continuado con los inhibidores de mTOR favorecen la diferenciación de Treg y su persistencia en sangre periférica frente al tratamiento con CNI, que inducen una reducción drástica de estas células en pacientes trasplantados renales. Sin embargo, esto no parece corresponderse con estados de tolerancia, ya que tanto en receptores renales como hepáticos que han dejado la inmunosupresión y no rechazan, no se ha visto un aumento de Tregs, sino otro tipo de perfiles, como la respuesta de células B o de células T gamma delta. Así, recientemente se ha sugerido que las células B con función reguladora (Breg), podrían tener un papel en la evolución postrasplante, pero de nuevo faltan estudios.

Un problema adicional a la hora de trasladar las Tregs a la clínica es la dificultad para caracterizarlas, ya que expresan muchos y diferentes marcadores fenotípicos, como ya se ha comentado. Así, pese a la ilusión inicial, existen muy pocos estudios que demuestren un **papel pronóstico** de la cuantificación de células Treg en el TOS, y casi todos en trasplante renal. En nuestro centro, la medición de Tregs, en concreto del Foxp3, no se realiza de rutina, aunque sí se ha realizado para diagnóstico de otras enfermedades ajenas al trasplante.

### 3) Métodos diagnósticos de Rechazo Humoral usados en clínica

El **rechazo humoral** se *diagnostica* mediante la **demonstración de anticuerpos específicos contra el donante (DSA) y confirmación histológica**: congestión mucosa, infiltrado neutrofílico y microtrombos de fibrina y plaquetas afectando a pequeños vasos [45-47].

Hasta hace poco, la *monitorización postrasplante* de la producción de DSA en los pacientes trasplantados se hacía en escasos centros, y el rechazo humoral estaba probablemente infraestimado. Cuando el órgano trasplantado empezaba a fallar en ausencia de un rechazo agudo celular, se intentaba la plasmaféresis e inmunosupresión adicional de forma empírica, no siempre con éxito. En los últimos años, la detección de aloanticuerpos ha evolucionado, realizándose en muchos centros algunos tests para determinar la presencia y especificidad de **anticuerpos anti-HLA antes y/o después del TI** y conocer el estado de hipersensibilidad del receptor, identificando los sujetos en riesgo. Estos tests han evolucionado en complejidad a mayor conocimiento inmunológico y pueden agruparse en “**ensayos celulares**” y “**ensayos no celulares o en fase sólida**”, con diferentes dianas frente a la que se analizan los anticuerpos.... su interpretación y aplicación clínica requieren especialización y experiencia, además del conocimiento de la historia inmunitaria del paciente,

incluyendo aquellos sucesos que puedan ser causantes de sensibilización. En este sentido la colaboración estrecha entre inmunólogos y clínicos es fundamental.

Los **ensayos celulares** utilizan células vivas para poner de manifiesto la presencia de anticuerpos en el suero. Hay técnicas **citotóxicas** y **no citotóxicas**.

Dentro de las primeras, la técnica de **citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)** desarrollada por Patel y Terasaki a finales de los 60, sigue siendo el *gold standard* para la **prueba cruzada (XM)** entre donante y receptor justo en el momento de la donación: se incuba el suero del posible receptor con células del donante, en presencia de complemento (CDC), ya sean linfocitos T o linfocitos B a partir de sangre periférica, o de los ganglios linfáticos o del bazo. Puede contraindicar el trasplante cuando el receptor tiene *anticuerpos antidonante preformados HLA específicos o no específicos* y mata a las células del donante, por alto riesgo de rechazo hiperagudo [4]. En el caso del TI, se realiza, aunque no contraindica el trasplante, ya que la escasez de donantes y los tiempos mínimos requeridos de isquemia limitan los criterios de selección al grupo sanguíneo y al tamaño del receptor.

Algunas limitaciones son que al usar leucocitos no detecta reacciones positivas extrañas contra el endotelio; y al no saber exactamente la diana contra la que se dirigen los anticuerpos, se discute si un test negativo frente a células T y positivo para células B a títulos altos también debe contraindicar el trasplante, ya que podría deberse a una baja concentración de anticuerpos frente a moléculas de clase I, o a la presencia de anticuerpos frente a clase II o autoanticuerpos.

Por otro lado, y de forma global para estudiar la **compatibilidad HLA o test de tipaje**, se pueden **combinar los antígenos** del donante concreto con los del receptor justo antes del trasplante, para elegir el más idóneo de entre varios receptores. La situación más óptima sería cuando donante y receptor comparten los 6 antígenos (compatibilidad total, ambos alelos en el donante y receptor), pero al menos deben coincidir en 3 loci HLA: los más importantes son el HLA-A y HLA-B clase I y el HLA-DR clase II. La peor situación sería no compartir ninguno. Este test se utiliza de rutina en el trasplante renal, y una mayor compatibilidad se ha correlacionado con mejores resultados del injerto y menor grado de rechazo, tanto en trasplante renal como cardíaco. En el TI, y concretamente en nuestro centro, se realiza a modo documentativo desde hace años, aunque al igual que la prueba cruzada, no es determinante para la elección del receptor, ya que se obtienen los resultados una hora después de la donación [66]. No obstante, los resultados, orientan para ajustar las dosis de inmunosupresión en cada caso.

## INTRODUCCIÓN

Las técnicas citotóxicas también permiten **detectar anticuerpos reactivos del paciente** mientras está **en lista de espera** enfrentando su suero con un panel de unas 60-100 células de tipificación HLA conocida, que expresan un amplio espectro de antígenos representativos de la población del potencial donante. Así, se calcula el “**panel reactivity antibody test**” (**PRA test**) que determina la probabilidad que tiene un paciente de recibir un trasplante compatible en una población concreta. En general, un 15% de muerte celular predice una baja probabilidad de rechazo del órgano. Un 100% de muerte contraindica el trasplante, ahora bien, cuando hay un 40% o 60% de reactividad se debe analizar más en profundidad para conocer la especificidad de los anticuerpos. La utilidad clínica de este estudio es mayor en pacientes que están esperando un retrasplante de intestino, ya que mide su grado de inmunización y permite establecer pautas de desensibilización antes del trasplante si tienen niveles altos de anticuerpos, mejorando sus oportunidades de encontrar un donante más compatible. Sin embargo, existen algunas limitaciones como la necesidad de conocer la viabilidad celular en la muestra de partida para cuantificar las células muertas. En nuestro centro, el test PRA se hacía hasta que ha sido sustituida por la prueba del Luminex, más específica y sensible.

Como *limitaciones*, las técnicas citotóxicas tienen baja *especificidad* y *sensibilidad*: la XM puede resultar falso positivo en un 20% desperdiciando un injerto válido, o falso negativo en un 4%, pudiendo sufrir una pérdida del injerto en menos de 48 horas. Los *falsos positivos*, sin tener DSA, ocurren por la presencia de anticuerpos irrelevantes para el trasplante, como los autoanticuerpos: Esto se puede mejorar añadiendo el ditiotritol (DTT) que inactiva las IgM, aumentando la probabilidad de que sean IgG antidonante HLA-específicos, o realizando una auto-prueba cruzada, aunque es de difícil lectura ya que la presencia de autoanticuerpos implica una cierta mortalidad celular de base. Por otro lado, la asignación de la especificidad HLA no siempre puede hacerse, ya que es difícil determinar qué molécula es la diana real de los anticuerpos. Los *falsos negativos* ocurren cuando la concentración de anticuerpos en el suero no es muy alta, o cuando hay anticuerpos antiHLA no fijadores de complemento (IgG2/IgG4), pese a que los más importantes en trasplante sean IgM, IgG1 e IgG3, que sí que fijan. Para detectar estos anticuerpos débiles, suele incluirse la antiglobulina humana (AHG) en el test, entre otros recursos.

Por otro lado, la mayoría de los laboratorios suelen referirse frente a HLA de la clase I exclusivamente para calcular el PRA ya que sólo aíslan linfocitos T o células mononucleares dada la dificultad para obtener linfocitos B de sangre periférica en cantidad suficiente.



La **Prueba cruzada no citotóxica con Citometría de flujo (FCXM)** también se usa como prueba cruzada pretrasplante para determinar la presencia de anticuerpos. Es más sensible aunque poco específica, no requiere fijación del complemento, y se correlaciona bien con la evolución del injerto. Las muestras de partida para la obtención de células son las mismas que en el caso de la XM, pero no es necesario separar las poblaciones T y B, ya que el uso de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo permite diferenciarlas en el citómetro. Así, permite diferenciar mejor entre los anti-HLA de clase I y los anti-HLA de clase II, usando bien células T aisladas que expresan los HLA de clase I sólo o bien células B que por constitución expresan ambos antígenos, HLA de clase I y II. Las células deben tener una buena viabilidad, para poder ser reconocidas en el citómetro como linfocitos. En nuestro centro es la prueba que se realiza de rutina durante el TI. Si es positiva frente a células T, se considera de riesgo, aunque no contraindica. Hay que tener en cuenta que, cuanto más sensibilidad tenga la prueba, más pacientes se excluirán para el trasplante, así que hay que encontrar el nivel de sensibilidad apropiado.

**Ensayos no celulares o en fase sólida (ELISA, Luminex):** Son nuevos tests más sensibles y específicos que los estudios celulares, mas fácilmente estandarizables y no requieren células vivas; pueden diferenciar IgG de IgM. De momento no han reemplazado a la prueba cruzada clásica, pero los resultados se pueden contrastar.

Para detectar DSA antiHLA, en lugar de células, usan moléculas solubles de **HLA purificados**, extraídas de líneas celulares o recombinantes, inmovilizadas en una superficie sólida, que puede ser una placa microtiter en el **ELISA** o **esferas de latex** o de poliestireno (**Luminex**).

El sistema que más se ha generalizado es el basado en microesferas, y en concreto el llamado **Luminex**. En nuestro centro se realiza para detectar pacientes hipersensibilizados en lista de espera (habitualmente retrasplantes), en el momento del trasplante para realizar una prueba cruzada virtual al disponer del tipaje del donante, y durante el seguimiento a corto y largo plazo, tanto para la monitorización del injerto como para el diagnóstico de rechazo humoral y seguimiento de su tratamiento. Ha desbancado a otras técnicas con citometría convencional, ya que es capaz de contener hasta 100 poblaciones de microesferas distintas en un único pocillo, impregnadas con diferentes proporciones de dos colorantes fluorescentes. Las moléculas HLA se adhieren a su superficie y se incuban con el suero problema. Para el revelado se emplea un segundo anticuerpo, que en general es una anti IgG humana marcada con ficoeritrina y la detección se lleva a cabo en un fluorocitómetro que tiene dos láseres, uno rojo que excita el colorante de las microesferas y otro verde que excita a la ficoeritrina unida al anticuerpo secundario. Cada microesfera emite dos

## INTRODUCCIÓN

señales diferentes: una relativa a su identidad y la otra a la unión del anticuerpo específico. El ensayo es semicuantitativo, y los resultados se expresan en medidas de intensidad de fluorescencia (MFI). Estos no representan el título de anticuerpos, sino la cantidad del anticuerpo unido a una partícula en relación a la cantidad total del antígeno adherido a esa partícula, y esta cantidad varía entre las diferentes esferas.

Basados en esta tecnología Luminex, existen **ensayos de escrutinio, de fenotipo y de antígeno simple**. Los de **escrutinio** utilizan dos o más poblaciones de microesferas recubiertas con una mezcla de moléculas HLA de clase I (A+B+C) y de clase II (DR + DQ + DP) extraídas de múltiples líneas celulares, y detectan la presencia de anticuerpos IgG frente a dichas moléculas. Detectan títulos de anticuerpos más bajos que los ensayos celulares, y son más específicos al detectar sólo antiHLA, y más rápidos, porque en un solo tubo el suero del paciente se enfrenta a moléculas HLA procedentes de un pool de numerosos donantes (varios cientos). Sin embargo, no permiten determinar la especificidad, ya que todo el conjunto de moléculas HLA de clase I y de clase II procedentes de este conjunto de donantes se encuentra unido a un número muy limitado de microesferas. Es el que usamos de entrada en los pacientes candidatos a TI o durante el trasplante. En los **ensayos de fenotipo** las microesferas llevan adheridas moléculas de HLA de clase I o de clase II obtenidas de una línea celular única, simulando la superficie de una célula de un determinado individuo, como ocurre en los ensayos celulares. Sin embargo, algunas moléculas de clase HLA pueden no estar representadas, los paneles están más adaptados para poblaciones europeas y existen problemas de desequilibrio de ligamiento entre las diferentes moléculas de clase I o de clase II. Este tipo de ensayos no se realiza de rutina en los pacientes con TI. Finalmente, los **ensayos de antígeno simple** (SAB, “*single antigen bead*”), sí permiten determinar la especificidad, ya que cada microesfera está recubierta por una única molécula HLA recombinante, I ó II, y así se puede precisar la identidad de las moléculas HLA frente a las que se dirige la reacción. Se realizan tras un ensayo de escrutinio positivo y permiten mejorar el cálculo del **PRA** para decidir el tratamiento o no, e introducir las especificidades positivas (también llamadas “no permitidas”) en bases de datos internacionales como la OPTN (*Organ Procurement and Transplantation Network*) de los EEUU o la del Eurotransplant, que disponen de las frecuencias fenotípicas de miles de donantes cadáveres y calculan el **PRA calculado (PRAc o PRA virtual)**.

Así, el PRAc de un paciente concreto suele ser mayor que el PRA ya que se está utilizando una técnica mucho más sensible, e incluye información anteriormente no disponible, como la detección

de anticuerpos dirigidos contra antígenos de clase II. Este PRA<sub>c</sub> es el que se realiza de rutina en nuestro centro.

Para distinguir entre anticuerpos fijadores y no fijadores de complemento, se han desarrollado dos modificaciones del ensayo. Uno es la presencia de fracción del complemento **C4d** altamente específico, aunque poco sensible, y que depende de la activación del complemento, pero a su vez, esta está influida por diferentes factores reguladores. Su presencia en las células endoteliales del donante mediante **inmunofluorescencia o** inmunohistoquímica se ha propuesto para diagnosticar histológicamente el rechazo humoral, de hecho en nuestro centro sí se utiliza en clínica aunque es poco sensible. Su positividad puede ayudar en la toma de decisiones terapéuticas. Otro es el **C1q**, que no requiere activación del complemento, y algunos estudios sugieren una mayor influencia de los anticuerpos antiHLA C1q positivos en la supervivencia del injerto, aunque se requieren más estudios.

Paralelamente al desarrollo de estos ensayos de determinación de anticuerpos se han mejorado los **métodos de tipificación mediante técnicas de biología molecular**, por lo que actualmente es posible tipificar todos los loci del donante. Esto, unido a un patrón de especificidades de anticuerpos del receptor (mediante un ensayo de SAB, muy sensible y específica) permite realizar una XM virtual (vXM) sin necesidad de disponer linfocitos del donante. La vXM ha revolucionado los sistemas de intercambio de órganos, sobre todo para aquellos pacientes hipersensibilizados, ya que disminuye el número de CDCXM positivas, y en caso de serlo facilita su interpretación, aumenta el radio geográfico de donación, y hasta ha supuesto cambios en los algoritmos de trabajo en cuanto a los definir los loci HLA que deben tipificarse. No obstante, en el trasplante intestinal el empleo en clínica de la vXM está todavía muy lejos de utilizarse debido al mínimo tiempo de isquemia exigido.

Sin embargo, falta estandarizar los reactivos y los protocolos de trabajo para conseguir una homogeneidad en los resultados entre laboratorios: cada ensayo tiene una concentración de antígenos en la microsfera y una concentración de anticuerpos en el suero, así como unos puntos de corte diferente, sustancias presentes en el suero (IgM, C1)..., limitando la reproducibilidad. También hay que tener en cuenta que la mayor especificidad y sensibilidad no implica mayor relevancia clínica, ya que ahora se estudian muchos más anticuerpos y a veces hay reacción epitopos no nativos irrelevantes en la evolución del trasplante; debe sospecharse cuando se detecta

## INTRODUCCIÓN

sólo en ensayos SAB, pero no en ensayos celulares o en ensayos de fase sólida con proteínas nativas, o cuando la reactividad se dirige frente a moléculas HLA muy infrecuentes en la población o se detecta reactividad con múltiples moléculas HLA que no comparten ningún epitopo. Además, existen aún dudas sobre la influencia de los anticuerpos frente a moléculas no HLA (de células endoteliales o MICA, epiteliales, por ej.), y su determinación se va incorporando a los protocolos sistemáticos de trabajo.

Esta carencia de conocimiento sobre los anticuerpos que realmente afectan al injerto y los que no, para saber cuándo actuar y cuándo no, hacen que el rechazo humoral siga siendo una amenaza para el injerto, y en definitiva, para el paciente.

*Pese a numerosos intentos en investigación para buscar marcadores precoces y no invasivos de rechazo, lo cierto es que, la clínica, y la confirmación histológica siguen siendo las únicas herramientas diagnósticas fiables. Aunque se van instaurando otras pruebas en los protocolos de despistaje, como la medición de poblaciones linfocitarias, o la búsqueda de anticuerpos específicos contra el donante, un mejor conocimiento de la respuesta inmune nos ayudaría en muchos casos a interpretarlas.*

### c. TERAPIAS PARA LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL RECHAZO EN EL TI

Las principales estrategias disponibles actualmente para la prevención y tratamiento del rechazo tanto agudo como crónico consisten en minimizar la activación inmune, reduciendo el número de linfocitos T en el receptor, impidiendo la activación y proliferación de los linfocitos T, y suprimiendo así la inflamación. Sin embargo, tras lo resumido en las páginas anteriores, esta última frase resulta ahora imprecisa, ya que linfocitos T hay de muchos tipos, tanto del receptor como del donante, y además están más implicadas algunas células de lo que clásicamente se ha considerado, como los linfocitos B. El objetivo final es conseguir la tolerancia del injerto a largo plazo.

#### 1) **Prevención del Rechazo**

En general, todos los regímenes de inmunosupresión se basan en una terapia de inducción y un tratamiento de mantenimiento.

La **terapia de inducción** consiste en la aplicación de anticuerpos mono o policlonales en el periodo peritrasplante. Trata de disminuir los linfocitos T circulantes y así producir una potente inmunosupresión inicial que permita proporcionar el tiempo suficiente para alcanzar niveles terapéuticos de anticalcineurínicos, disminuyendo la respuesta inmune del receptor contra el injerto. Se busca inducir así una tolerancia al injerto, y se ha demostrado mayor tasa de éxito desde que se utiliza inducción, aunque también ha aumentado la incidencia de SLP (10-20% dependiendo del tipo de trasplante).

A nivel internacional, cada grupo utiliza diferentes protocolos con distintos fármacos inductores, casi todos basados en la depleción en mayor o menor grado de determinadas subpoblaciones linfocitarias. La ventaja de los anticuerpos monoclonales es que permiten fabricar y proporcionar indefinidamente un producto activo factible, si la especificidad del antígeno preciso es conocida. Con los anticuerpos policlonales, no podemos saber cuáles son los anticuerpos activos en un suero antilinfocito crudo. De hecho, muchos de estos anticuerpos no van dirigidos contra los linfocitos T.

Los fármacos **Policlonales** son anticuerpos generados en conejos, cabras o caballos y se dirigen frente a varios antígenos de superficie de los linfocitos T por lo que todos producen su depleción. Ejemplos de ellos son el ATGAM® (no disponible en España), linfoglobulina®, Timoglobulina®, ATG frexenius®. En España el que más se utiliza es la **Timoglobulina** previo a la reperusión. En niños para evitar infusiones muy rápidas, se divide en dos dosis, previo y posterior al trasplante.

## INTRODUCCIÓN

Dentro de los fármacos **monoclonales**, los hay deplecionantes como el Alemtuzumab y el OKT3, o no deplecionantes (antiCD25, bloqueantes de IL2, presente en la superficie de los linfocitos activados), como el **Daclizumab** (Zenapax®) o el **Basiliximab** (Simulect®). Éste último es el más utilizado en nuestro centro; es un anticuerpo quimérico humano-murino. En general suelen usarse dos dosis, en el posttrasplante inmediato (dentro de las primeras 6 horas) y en el 4º día posttrasplante.

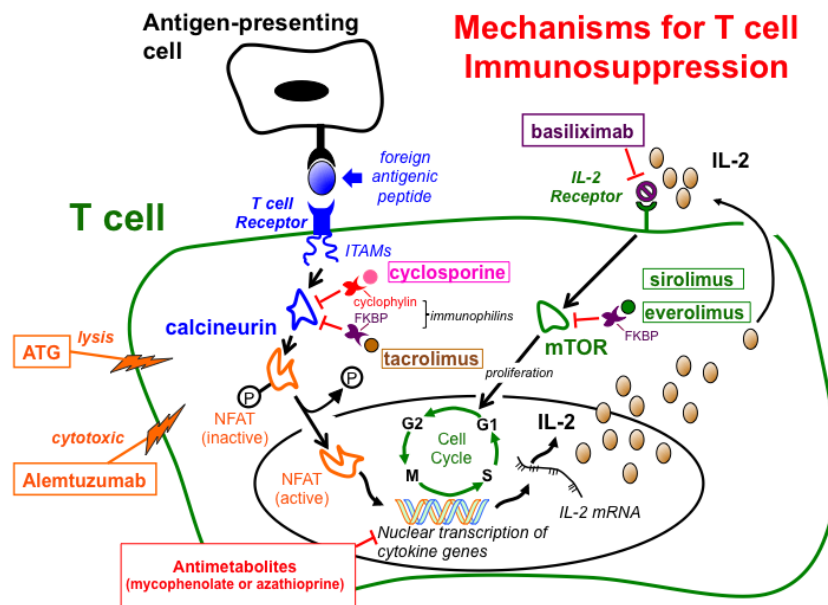
El **Alemtuzumab** (Campath®) es un anticuerpo murino contra el antígeno CD52, presente en linfocitos, monocitos, macrófagos, y células naturales Killer, por lo que provoca una depleción prolongada de linfocitos T (3-6 meses) y algo menos de linfocitos B y monocitos (un mes). Existen numerosos estudios en trasplante renal en adultos con buenos resultados y sin un incremento significativo en el número de infecciones o tumores. Es utilizado con éxito en varios grupos de trasplante intestinal, incluido nuestro grupo. Su uso se limita a partir de los 4 años, ya que se ha descrito un síndrome de distrés respiratorio en niños pequeños.

El Muromonab-CD3 (ortoclone – **OKT3®**) es un anticuerpo murino antiCD3 (molécula asociada al receptor del linfocito T) y por tanto provoca depleción de linfocitos T. Su uso en la actualidad es excepcional, ya que provoca importantes reacciones en la infusión (síndrome de liberación de citoquinas), y excesiva inmunosupresión en ocasiones, con mayor riesgo de infecciones virales y trastornos linfoproliferativos.

Como **terapia de mantenimiento**, los inmunosupresores clásicos empleados en las primeras décadas del trasplante, como la **azatioprina** o la **ciclosporina (CsA)**, se han ido sustituyendo por otros nuevos, como el **Tacrolimus (TAC)** (Figura 7). Al igual que la CsA, éste también es un inhibidor de la calcineurina, una fosfatasa importante en activar el gen de la IL2, y por tanto bloquea la transducción de un factor nuclear necesario para la activación de las células B y T. Así, inhibe la primera fase de la activación de las células T, que no progresan desde la fase G0 a la G1. Puede ser administrado de forma iv u oral, siendo ésta última la más usada, obteniéndose niveles terapéuticos mientras se realiza la terapia de inducción. Recientemente han aparecido presentaciones de liberación prolongada que permiten una dosis única diaria (Advagraf®), con una aparente seguridad y eficacia similar al Tacrolimus convencional. Pese a sus ventajas, los efectos secundarios del Tacrolimus (nefrotoxicidad, anemia hemolítica, diabetes, neurotoxicidad) obligan a disminuir sus niveles o incluso a retirarlo, siendo necesario buscar alternativas.

El **Sirolimus** o **Rapamicina** es un inhibidor de los receptores de rapamicina de mamíferos (mTOR). Así, es un agente antiproliferativo, que se une a un receptor del citosol e inhibe las señales activadoras enviadas por el receptor de la IL2, interfiriendo con la diferenciación y proliferación de los linfocitos a través del ciclo celular. Hasta hace poco, era más utilizado como fármaco coadyuvante que como de mantenimiento a largo plazo, por sus efectos secundarios, como hipertrigliceridemia, neutropenia, plaquetopenia, retraso en la cicatrización, infecciones...pero cada vez hay más evidencia clínica de su seguridad y eficacia, y se está generalizando su uso. En nuestro centro, es el fármaco de elección ante la aparición de efectos adversos del Tacrolimus. Además, parece que ambos fármacos se potencian mutuamente, siendo necesarias menores dosis de cada droga cuando se usan juntas, aunque la administración de Sirolimus parece disminuir los niveles de Tacrolimus, lo que hay que tener en cuenta a la hora de la monitorización. Del mismo grupo que el Sirolimus, el **Everolimus** se perfila como una posible alternativa por su acción antiproliferativa en general, tanto de linfocitos T como de la muscular de los vasos y de las células cancerígenas. De hecho, se ha utilizado en el tratamiento de algunos tumores y como coadyuvante en la enfermedad coronaria. Su uso en trasplante es inicial, con pocos estudios, sobre todo en trasplante renal, hepático y cardíaco y ninguno en trasplante intestinal. Produce menos efectos secundarios que el Sirolimus, y al igual que él, disminuye la toxicidad renal permitiendo bajar la dosis del TAC.

Otro fármaco utilizado desde los primeros protocolos fue el **Micofenolato Mofetil (MMF)**, que inhibe una enzima, inosina monofosfato deshidrogenasa, implicada en la síntesis de DNA de novo. Los linfocitos en fase de proliferación casi siempre dependen solo de este mecanismo de novo, así que el MMF tiene un efecto llamativamente específico para los linfocitos. Inhibe la expansión de grandes cantidades de linfocitos T y B, por tanto, previene tanto el rechazo celular como humoral. Además, es un inhibidor no competitivo de la síntesis de DNA, necesita un cofactor necesario para inhibir la síntesis enzimática de IMD, a diferencia de la **azatioprina**, que se incorpora como un análogo de la purina en el DNA de las células que se están dividiendo, causando daño en el DNA y por tanto con actividad mutagénica. Sin embargo, su variable absorción y los frecuentes efectos secundarios digestivos han hecho que se utilice poco actualmente, especialmente en trasplante intestinal.



**Figura 7:** Actuación a nivel molecular de los inmunosupresores clásicos (*imagen obtenida de [http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/organ\\_transplantation](http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/organ_transplantation)*).

Los **esteroides** fueron los primeros agentes inmunosupresores usados en la clínica, y han constituido un pilar fundamental del tratamiento en el trasplante, aunque actualmente existen algunos protocolos, como los basados en Timoglobulina o Alemtuzumab, que ya no los utilizan como mantenimiento. Se suelen administrar a dosis bajas de forma prolongada tras el trasplante o en bolos a grandes dosis durante poco tiempo. A dosis bajas suprimen la activación de los macrófagos, reducen la expresión de las moléculas de adhesión en el injerto, interfieren con la función de presentación del antígeno de las células dendríticas e inhiben la proliferación de linfocitos interrumpiendo las señales celulares necesarias para la activación celular. A altas dosis se usan para eliminar grandes cifras de linfocitos T y B de los pacientes que desarrollan rechazo, porque los linfocitos activados son susceptibles a la apoptosis inducida por corticoides. Los corticoides ellos solos no impiden la activación de los linfocitos T, en parte porque son demasiado tóxicos para dar una dosis suficiente.

Se usan tanto en la inducción como en el mantenimiento. Durante el post-trasplante inmediato se administran dosis altas para luego ir descendiendo en los primeros días hasta llegar a una dosis de mantenimiento en unos 6-12 meses y después a días alternos. Aunque su vida media es muy corta, se pueden dar cada 24 horas porque su efecto inhibitor sobre los linfocitos es prolongado. Son



conocidos sus numerosos efectos secundarios, pero en el caso de los niños es especialmente importante su efecto sobre el crecimiento, algo menor si se administra a días alternos.

## 2) Tratamiento del Rechazo

La primera línea de tratamiento para el **rechazo celular agudo** son los corticoides en bolos y aumentar los niveles de Tacrolimus, aunque a veces están paradójicamente elevados por la mala metabolización del Tacrolimus por parte del enterocito. Dependiendo del grado de rechazo, las dosis oscilan entre un bolo y tres al día de metilprednisolona 10-20mg/kg (maximo 1 gr) con descenso en los 5-7 días posteriores, similar al utilizado en el post-trasplante inmediato hasta alcanzar la dosis previa al episodio de rechazo. Si no responde o el episodio es muy severo, se pueden utilizar sueros antilinfocíticos, como el OKT3 (nosotros no lo hemos usado), Timoglobulina, Alemtuzumab, o Infliximab (antiTNF; Remicade®). Si sigue sin responder, a veces es necesaria la trasplantectomía.

El tratamiento *convencional* del **rechazo humoral** se basa por una parte en eliminar los anticuerpos circulantes y por otra en la depleción de las células plasmáticas. Para reducir los anticuerpos antiHLA circulantes se han utilizado técnicas de dilución en varias sesiones, como la plasmaféresis o recambios plasmáticos; técnicas de **inmunoadsorción** o captura selectiva de las inmunoglobulinas (Ig) en un soporte sólido; y técnicas promotoras de la degradación de las inmunoglobulinas circulantes, como es la paradójica administración de inmunoglobulinas iv (**IVIG**), ya que evitan el rebote en la producción.

Además de tratar el rechazo humoral establecido, las IVIG, tanto en dosis altas como en bajas, se usan también en los protocolos de desensibilización, aunque su mecanismo de actuación exacto se desconoce. Parece que bloquean los receptores para el Fc de la IgG de los fagocitos y de las NK; bloquean los receptores Fc del endotelio; inhiben la respuesta inflamatoria de los macrófagos, monocitos y células dendríticas, y también tienen efectos antiinflamatorios derivados de una pequeña porción de las IgG.

Además, los linfocitos B se pueden eliminar físicamente mediante **anticuerpos monoclonales anti-cd20 (Rituximab®)** o con métodos menos específicos como un suero antilinfocítico o Alemtuzumab. Por otro lado, el **Bortezomib®** (inhibidor del proteosoma 26S) afecta a las propias células plasmáticas, interfiriendo así en la producción de inmunoglobulinas aunque el mecanismo de actuación no está claro; al no afectar a los linfocitos B ni a los anticuerpos preformados, se debe usar combinado con otros agentes. Su efectividad es variable y parece ser menos útil para los anticuerpos antiHLA-II. Se ha utilizado en el tratamiento del mieloma múltiple, y aunque existen

## INTRODUCCIÓN

estudios en trasplantados renales, en protocolos de desensibilización... son seguimientos cortos y resultados preliminares, y más aun en el caso de trasplante intestinal pediátrico.

Por último, el **Eculizumab®** es un anticuerpo monoclonal bloqueante de la fracción C5 del complemento, que inhibe la activación del mismo, impidiendo la lesión histológica. Se usa en la hemoglobinuria paroxística nocturna y se ha utilizado también en la profilaxis y tratamiento del rechazo humoral renal. No parece haber tenido gran aceptación en el TI.

Estos tratamientos deben administrarse de forma repetida, ya que de lo contrario se podría producir un fenómeno de rebote. Existen protocolos con casi todas las combinaciones de las estrategias citadas, que pueden asociarse o no a inmunosupresores clásicos, aunque hay que tener en cuenta que los corticoides, anticalcineurínicos o antilinfocíticos (tratamiento del rechazo celular estándar) pueden prevenir la aparición del rechazo humoral, impidiendo la síntesis de anticuerpos de novo a partir de la activación de los linfocitos T, pero una vez establecido el proceso, no son capaces de detenerlo.

A veces es difícil saber cuándo tratar un rechazo humoral; en general, se trata a los pacientes con plasmaféresis, IVIG y Rituximab cuando hay deterioro clínico, evidencia en el suero de anticuerpos antiHLA y presencia de C4d en las muestras histológicas. En el rechazo humoral hiperagudo con un PRA-CDC alto, la experiencia en este terreno es escasa y de momento los resultados no han sido muy alentadores, aunque pequeñas series refieren buenos resultados con recuperación de los injertos tras tratamiento agresivo con OKT3, PGE2 y corticoides a altas dosis.

Debido a la dificultad en diagnosticar y tratar el rechazo humoral, es aún más importante **prevenirlo** mediante **protocolos de desensibilización**, para eliminar los DSA, incluso previo al trasplante, en aquellos pacientes hipersensibilizados (con Luminex de escrutinio positivo). Por un lado, aumenta la posibilidad de que el trasplante sea más compatible, y, por otro, una vez realizado, disminuye la probabilidad y consecuencias de la posible reaparición de DSA, mejorando así la supervivencia del injerto. Sin embargo, la decisión de realizar el protocolo no es siempre fácil, no garantiza que se vaya a trasplantar antes, ni que sea eficiente. Primero conviene descartar que la CDCXM positiva no sea consecuencia de autoanticuerpos linfocitotóxicos, presentes en un 2-4% de los pacientes sensibilizados en lista de espera, y que no contraindican el trasplante. Por otro lado, en el trasplante renal, por ejemplo, aunque la supervivencia del injerto en pacientes sometidos a desensibilización es buena (80-90% al año y 70% a los 5 años), sigue siendo 2,6 veces menor que el grupo no sensibilizado. En contrapartida, la incidencia de episodios de rechazo humoral en

pacientes desensibilizados es alta, entre el 30 y el 45%. En el TI, y en concreto en nuestro centro, tras un test de Luminex de escrutinio positivo y posterior confirmación de existencia de DSA en el receptor, optamos por prevenir el posible rechazo humoral tratándolo, puesto que la asociación entre rechazo humoral y crónico es conocida, y cuando se desarrollan síntomas de éste último, ya es tarde para tratarlo.

Entre las técnicas de desensibilización *no convencionales* también llamadas “biológicas” se incluirían el **trasplante simultáneo de hígado**, que consigue reducir los anticuerpos antiHLA circulantes, al menos a corto plazo; aunque el mecanismo no está claro, podría actuar a través de antígenos HLA solubles liberados por el hígado, o bien por la capacidad del hígado de absorber o fijar los aloanticuerpos sin sufrir un daño irreversible. Los resultados son variables y podrían depender de la cantidad de células plasmáticas preexistentes. En el TI, incluir el hígado en el injerto, es una práctica habitual, especialmente en los retrasplantes con antecedente de rechazo, y en nuestra serie hemos tenido buena experiencia. De hecho, de 18 pacientes retrasplantados, 5 han recibido un segundo injerto intestinal aislado sin éxito, requiriendo posteriormente un tercer injerto, esta vez multivisceral, con buen resultado. Esto ha motivado a que actualmente optemos por realizar el retrasplante con un injerto multivisceral con el fin de proteger el injerto del rechazo, aun teniendo una función hepática conservada.

Otras estrategias descritas han sido por ejemplo la **transfusión previa de plaquetas del donante** en el trasplante de progenitores hematopoyéticos, anticuerpos monoclonales contra componentes del complemento, supuestamente capaces de evitar el rechazo hiperagudo, .... En el trasplante intestinal no hay mucha experiencia al respecto, y tampoco en nuestro centro.

El **tratamiento del rechazo crónico** es casi siempre la trasplantectomía al no existir tratamiento médico efectivo y la confirmación histológica se obtiene con la pieza quirúrgica de la enterectomía. No obstante, el diagnóstico de sospecha es clínico, con apoyo de pruebas de imagen TAC y/o RMN.

*Pese a la introducción en clínica de nuevos y potentes fármacos inmunosupresores, el empleo de los mismos a veces sigue siendo empírico, en especial en las situaciones de rechazo refractario u otras complicaciones inmunológicas, ya que inmunosuprimen de una forma generalizada, sin discriminar entre células del huésped o del donante, ni entre células efectoras y reguladoras, ni teniendo en cuenta las diferentes condiciones ambientales en las que actúan.*

### d. INDUCCIÓN DE LA ACEPTACIÓN DEL INJERTO Y BÚSQUEDA DE LA TOLERANCIA.

Los efectos secundarios de los inmunosupresores, dirigidos sobre todo hacia las células T, no deben ser infravalorados y afectan a largo plazo a la supervivencia del paciente y del injerto. Un objetivo ideal para todo trasplante sería alcanzar un “*estado de tolerancia*”, definido como “la ausencia de una respuesta patológica inmune contra el injerto en un huésped inmunocompetente en ausencia de una inmunosupresión generalizada” [1, 33, 72]. Esta situación, que implica unos procesos inmunes enormemente activos y complejos, conseguiría eliminar el rechazo sin necesidad de tomar inmunosupresores, pero manteniendo la capacidad de respuesta protectora contra antígenos third-party [49].

La primera descripción de la “tolerancia adquirida” a antígenos del injerto se remonta a 1953, cuando *Billingham et al* describen una asociación entre el quimerismo de la médula ósea y la inducción de tolerancia específica del donante a unos injertos cutáneos [73]. Posteriormente, se han intentado numerosas estrategias inmunomoduladoras con el fin de prolongar la supervivencia del injerto, algunas inicialmente exitosas en modelos animales, concretamente en roedores [74, 75], y posteriormente en primates y algunos ensayos clínicos pilotos [76]. Pero la realidad es que la traslación a la clínica ha sido decepcionante [77-79], con sólo algunos ejemplos anecdóticos descritos [80]. A diferencia de los humanos, en los roedores resulta fácil conseguir la aceptación del injerto a largo plazo mediante manipulación antes o después del trasplante, entre otros motivos porque el concepto de largo plazo en una rata son 100 días, insuficiente en la clínica humana; y porque los roedores de laboratorio se crían en un ambiente libre de patógenos, mientras que los humanos presentan grandes cantidades de células T de memoria alorreactivas antes del trasplante, muy poco sensibles a cualquier terapia, que pueden influir en la supervivencia del injerto.

#### 1) Actuación sobre el injerto y/o el donante

Ya en los 80, era de la ciclosporina, se trató de encontrar un estado de tolerancia en el TI en forma de tratamiento previo del **injerto o del donante**. Así, *Starzl y su equipo* intentaron deplecionar de linfocitos al donante de injerto hepatointestinal o multivisceral, mediante perfusión con OKT3 90 minutos antes de la extracción o mediante una técnica de almacenaje que no permitía la supervivencia de los leucocitos pasajeros, pero dos receptores fallecieron de sangrado perioperatorio (*Starzl TE. Comunicación personal, 1991, no publicada*). *Williams y su equipo*

también fracasaron al irradiar los injertos ex vivo con una fuente de cobalto-60 además del OKT3, ya que las biospias mostraron rechazo agudo ya en el tercer día del trasplante pese al tratamiento con ciclosporina y prednisona [81].

Otros intentos más recientes en investigación han consistido en perfundir el injerto con citoquinas para cambiar las características de las células dendríticas (CDM) en aquellas necesarias para inducción de la tolerancia (CDP). Otra teoría acerca de la protección del injerto es que necesitan activarse genes “protectores” que podrían estar relacionados con la respuesta de estrés. En un estudio, se vio que los injertos de los donantes que habían sido estresados (y por tanto con una expresión aumentada de *heat shock proteins* en los tejidos) sobrevivían relativamente bien en comparación con los tejidos no estresados. Un mejor conocimiento de la acomodación del injerto nos permitiría inducir este estado en los aloinjertos y xenoinjertos en el momento del trasplante. Por último, el injerto puede ser transfectado con varios genes que pueden influenciar la respuesta inmune antes del trasplante. Se han hecho intentos con genes reguladores de citoquinas y de otras moléculas (por ej. CTLA4Ig) con la esperanza de que la producción local de estas citoquinas proteja al injerto [82, 83].

## 2) Actuación sobre el receptor

Sin embargo, su aplicación en humanos todavía está muy lejos, por lo que a partir de la década de los 90, las estrategias protolerogénicas pasaron a enfocarse en el **precondicionamiento del receptor**, el cual resulta más fácilmente manipulable mediante tratamiento con **antígenos, anticuerpos o fármacos**. Y más recientemente, se está investigando la **terapia celular**, donde se incluyen las células troncales mesenquimales, que protagonizan esta tesis doctoral.

**Tratamiento con antígenos:** Una posible estrategia sería la inyección directa de los antígenos del donante en el timo para borrar los linfocitos T reactivos contra el donante mientras ellos van madurando, como ocurre en la selección natural con los autorreactivos. Este es el mecanismo de la tolerancia neonatal y los que se escapan de ese proceso acaban siendo desactivados en la periferia. Se ha visto que esto induce la aceptación del injerto en roedores, particularmente si este protocolo se combina con un tratamiento para reducir el número de linfocitos T circulantes maduros [84]. También es posible inyectar médula del donante en el periodo neonatal antes de que los linfocitos T del timo pasen a la periferia, y se ha visto que injertos cutáneos son aceptados. Sin embargo, si la inyección se hace más tarde, los injertos no se aceptan.

## INTRODUCCIÓN

En el contexto del trasplante, y de los adultos, es fundamental entender el concepto de el **quimerismo mixto**, caracterizado por un estado de “coexistencia de células hematopoyéticas de ambos, donante y receptor” [76], crucial en el desarrollo y mantenimiento de la tolerancia, aunque por mecanismos mal conocidos.

Así, en un estudio **experimental** de TI en rata de *Murase et al*, se encontraron linfocitos derivados del donante en el tejido linfático del receptor que había conseguido supervivencia prolongada con Tacrolimus [85, 86]. Se ha visto que inyectar células del donante un mínimo de 5-7 días antes de un trasplante renal o cardíaco induce aceptación a largo plazo del injerto (100 días), ya que el pretratamiento permite tiempo para el desarrollo activo de la “no respuesta”. En otro modelo porcino de TI, se vio que una transfusión preoperatoria de sangre del donante más una dosis baja de ciclosporina prolongaba la supervivencia del injerto intestinal a través de un aumento de quimerismo [87]. Sin embargo, otro estudio en un modelo de TI en rata (esta vez infusión de médula ósea del donante) demostró el efecto contrario [88]. *Hu et al*, en 2012 también fueron capaces de inducir quimerismo en ratas al infundir células de la médula ósea del donante simultáneamente al TI y junto a un pequeño ciclo de tacrolimus [49].

La vía de administración del antígeno parece influir también en la inducción de la no respuesta. Así, en modelos roedores, antígenos intravenosos prolongan la supervivencia del injerto, pero subcutáneo aceleran el rechazo, probablemente al drenar al ganglio linfático local donde encuentran a las CD, muy buenas activando dicha respuesta. Por otro lado, la introducción del antígeno del donante, como por ej esplenocitos o células de la médula ósea a través de la vena porta (o la dorsal del pene que drena en el sistema portal) maximiza su captura por parte de las CPAs (macrófagos) en el hígado y del bazo, y parece la más eficiente en inducir no respuesta inmune, tal y como avalan algunos artículos, también de TI [86, 89-91].

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) de la médula ósea simultáneo con TOS es un paso más y sería lógico pensar en él como estrategia para inducir quimerismo y tolerancia; sin embargo, en la clínica no ha llegado a ser viable por la toxicidad del condicionamiento mieloablativo o citorreductor del receptor y la alta incidencia de EICH [82], por lo que los estudios continuaron enfocándose en la infusión de células de médula ósea derivadas del donante, sin tales efectos secundarios [92]. Actualmente, con nuevos tratamientos mejor tolerados, se vuelve a plantear como alternativa.

Estos efectos se han observado también en **clínica**: de hecho, ya en los 70 se valoró transfundir con sangre específica del donante [93]. Así, pacientes politransfundidos de donantes aleatorios (que quizá por azar han sido expuestos a los antígenos de su órgano donante) o transfundidos menos veces, pero por su donante específico, es menos probable que rechacen los injertos. Este “efecto de la transfusión sanguínea” es paradójico porque uno podría pensar que una exposición previa al antígeno sensibilizaría más que suprimiría. El *equipo de Starzl* en 1993 fue también el primero en liderar los primeros intentos de conseguir un quimerismo mixto estable tras un TI, al transfundir al receptor células de la médula ósea no modificadas del donante como inducción durante las primeras 12 horas, con el fin de optimizar la inmunosupresión [94]. Este grupo de Pittsburgh y, posteriormente, el de Miami, continuó así durante una década, pero al igual que con la radiación ex vivo del injerto, no se vieron mejorías en cuanto a rechazo, agudo o crónico.

Otra opción, como ya se ha comentado, ha sido la inclusión del hígado en el injerto como agente tolerizante.

**Tratamiento con fármacos / anticuerpos:** En trasplante de donante cadáver, organizar un pretratamiento con antígenos del donante es inviable. Sin embargo, **el injerto en sí mismo** constituye una fuente de antígenos del donante capaz de inducir aceptación del injerto con la medicación adecuada, siendo ésta la estrategia habitual en la clínica, mediante una terapia de inducción y un tratamiento de mantenimiento. Como ya se ha comentado, la **inducción**, con agentes deplecionantes de células T, trata de resetear el SI y promover un ambiente tolerante permisivo en el momento de la presentación aloantigénica [95]. Se ha sugerido que la linfopenia transitoria que se produce tras esta terapia podría producir una expansión homeostática de una única población de células T reguladoras con potentes efectos inmunoreguladores in vitro e in vivo [96]. Con el mismo objetivo, los primeros intentos trataron de condicionar a receptores adultos de un TPH con radiación corporal total o linfática [97, 98]. También se ha demostrado que los xenoinjertos puestos en animales deplecionados de anticuerpos naturales no rechazan cuando las concentraciones de anticuerpos se recuperan tras la “acomodación” del injerto.

Sin embargo, no está claro que deplecionar de linfocitos al principio proteja del rechazo; así, en trasplante renal en humanos la inducción con Alemtuzumab o Timoglobulina no protegió a los pacientes del daño renal crónico o disfunción del injerto, a pesar de promover el contaje de Tregs circulando y preservar su capacidad inmunosupresora [18]. A este respecto, se ha sugerido en animales, y posteriormente en clínica, que los propios fármacos inmunosupresores, al interferir con la respuesta inmune, pueden impedir o infraestimar la aceptación del injerto.

## INTRODUCCIÓN

Con respecto a la **terapia de mantenimiento**, en modelos animales de trasplante está más que demostrado que un tratamiento corto con CsA o TAC (7-10 días postoperatorios) induce no respuesta inmune a largo plazo, y en la clínica humana, no la inhibe, pero retrasa la activación del rechazo. Algunas personas, incluso, dejan de tomar la medicación por motivos personales o médicos o la mantienen a dosis muy bajas, sugiriendo que la aceptación del injerto, y quizás la tolerancia inmunológica, es posible; por ello, la investigación se ha enfocado en refinar regímenes inmunosupresores para conseguir dicha “tolerancia operacional” [33].

Estos se han enfocado sobre todo en la deleción, anergia o supresión de las **células T**, tanto efectoras como reguladoras, ya que son las principales protagonistas del rechazo y/o de la aceptación del injerto [99, 100]. Por ej, la IL2 es importante en la activación de las células T efectoras y su deprivación durante el proceso de activación de éstas les conduce a la apoptosis o a la anergia, es decir, no mueren, pero son incapaces de responder a los antígenos. Estas células anérgicas se ha visto que tienen propiedades de células T reguladoras, cuyo aumento conduce a la aceptación del injerto y supresión del rechazo. Así, los fármacos que suprimen las vías de la IL2, como el Basiliximab o la Rapamicina favorecen la inducción de la no respuesta. De hecho, los primeros protocolos propusieron inducir la tolerancia clínica del trasplante dando Rapamicina, aunque por el momento, pocos grupos se atreven a abandonar la inmunosupresión de mantenimiento estándar.

Recientemente, la investigación se ha enfocado en algunas subpoblaciones concretas, como las **células T de memoria específicas**, que parecen comprometer el desarrollo de la tolerancia, asociándose a mal resultado del injerto [101].

Sin embargo, se está dando cada vez más importancia a las células del SII, como por ejemplo, las **células dendríticas**, cruciales en la respuesta del huésped contra el injerto y capaces de promover la iniciación de las respuestas de las células T efectoras o favorecer una expansión de Tregs [102]. Así, se ha intentado manipular su maduración mediante la transferencia de genes, aunque aún está en fase de investigación. Otros esfuerzos han conseguido inhibir el rechazo del injerto en roedores y en monos, al bloquear la interacción entre las CPAs y los linfocitos T durante los estadios iniciales de la activación, mediante anticuerpos contra el CD40 o contra el CTLA4-Ig que bloquean las interacciones entre CD40 y CD40L o entre B7 (CD80 y CD86) y CD29 [103, 104]. Al carecer así de estimulación necesaria, los linfocitos T no se activan, sino que se dirigen hacia la apoptosis y la anergia.



Por tanto, el objetivo sería dirigirse a las múltiples vías implicadas en el rechazo, tanto del SII como del SIA, y equilibrar la balanza de los mecanismos efectores y reguladores.

Desgraciadamente, estrategias que han tenido éxito en otros órganos, como el corazón o los riñones, se siguen resistiendo en el TI, complejo por su alta inmunogenicidad [84, 105]. En la última década, algunos trabajos enfocaron su búsqueda a alterar el **tráfico de los linfocitos** del donante. Por ej, *Song et al* estudian los efectos de un fármaco novedoso, el FTY20 (sphingosin 1-phosphate receptor agonista), que los secuestra en el injerto y los redirigía hacia órganos linfoides del donante, pero no del receptor [106], en un modelo de EICH tras un TI heterotópico en rata, observando su eficacia, asociado a una menor producción de IFN en los órganos diana. Estas ideas prometedoras, sin embargo, no han prosperado en la clínica. Claramente, hacen falta más estudios, y se plantean otras alternativas.

Otros tratamientos inmunomoduladores sobre el receptor que sí se usan en clínica son por ejemplo la **fotoaféresis extracorpórea**, donde los leucocitos son seleccionados en la sangre recogida del paciente antes de reinfundirla. El efecto inmunomodulador es mediado a través de perder linfocitos T y disminuir su estimulación, aumentar la citoquinas antiinflamatorias y generar células Treguladoras [107]. Parece interesante ya que los linfocitos T y B de los pacientes tratados mantienen su capacidad de responder a antígenos nuevos y de rellamada [108]. En nuestro centro se ha utilizado en casos de EICH de mal pronóstico y otras enfermedades digestivas autoinmunes refractarias al tratamiento estándar, observando tan sólo mejorías discretas [109].

**Tratamiento con terapia celular:** La propiedad supresora de las **células Tregs** las convierte en candidatas para una terapia protolerogénica. En investigación se seleccionan y se expanden; y después se enfrentan a distintas proporciones de células T efectoras, habitualmente de 1:5 a 1:10, aunque en los cultivos in vitro suele emplearse una proporción 1:1 y a partir de ésta se va reduciendo la cantidad de células Treg para comprobar su capacidad dinámica de supresión. El problema para usarlas en terapia celular, con fines terapéuticos, es su bajo número en circulación, por lo que sería necesaria la expansión de estas células, mediante estimulación con altas dosis de IL2 y anticuerpos antiCD3 y antiCD28, para conseguir un número elevado con varias rondas de activación, ya que estas células son anérgicas en cultivos in vitro convencionales. Aparte de los ensayos ya publicados en TMO y trasplante de cordón umbilical, existen en la actualidad varios ensayos clínicos en marcha también en TOS, especialmente renal y hepático, dentro de consorcios

## INTRODUCCIÓN

internacionales como RASET (Reprogramming Immune System for the Establishment of Tolerance) e ITN (Immune Tolerance Network).

Las **células dendríticas tolerogénicas** (tolDC) se han propuesto también como candidatas para terapia celular debido a sus propiedades como inductoras de la supervivencia del injerto a largo plazo [33], aunque no se ha conseguido su traslación a la clínica por el momento. Lo mismo ocurre con la supoblación de **macrófagos reguladores** [110].

Por otro lado, el uso de las **Celulas Troncales Mesenquimales** como terapia alternativa o coadyuvante a la tradicional con el fin de prevenir el rechazo y conseguir la aceptación del injerto se está investigando y constituye la hipótesis de esta tesis. Los procedimientos de aislamiento y expansión son más fáciles y además, parecen desaparecer pocos días tras la infusión, frente a las Tregs, que parecen quedarse mucho más tiempo, lo cual supone un riesgo adicional. A cambio, las Tregs, parecen capaces de suprimir el SI de un modo más específico. Sin embargo, la falta de conocimiento sobre los mecanismos exactos de actuación de las CTM sobre el sistema inmune hace difícil su comparación con otras terapias. Estos mecanismos, se abordan en las siguientes páginas, especialmente enfocados en el escenario del Trasplante de Órgano Sólido.

## 2. CÉLULAS TRONCALES DE ORIGEN MESENQUIMAL (CTM)

### I. HISTORIA Y GENERALIDADES DE LAS CTM

Los mamíferos somos complejos organismos poblados por una ciudad muy cosmopolita de células. Las células son como los ladrillos de los bloques de edificios, que equivaldrían a todos los tejidos de los órganos, desde los más delicados hasta los más vastos [111]; Sin embargo, a diferencia de los edificios que tienen que ser diseñados y construidos, algunos ladrillos en un organismo multicelular pueden encargarse de la autorenovación y se conocen clásicamente como “**stem cells**” o “**células madre**” [112] (en inglés, la abreviatura será SC, como MSC, HSC....) aunque más recientemente se habla de “**células troncales**” o “**estromales**” [113, 114], pudiendo considerarse todos estos términos sinónimos. La discrepancia entre la terminología y las características biológicas se debe probablemente a la variabilidad en la metodología utilizada por diferentes investigadores. Con el fin de simplificar, y de acuerdo a los criterios internacionales (*EMEA*) y nacionales (*AEMPS*), nosotros las llamaremos troncales o estromales [115, 116] y las abreviaremos en castellano como CT con su correspondiente sufijo o prefijo: por ej. CTM si son mesenquimales, o CTH, si son hematopoyéticas; Ad-CTM si son Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo o MO-CTM si son derivadas de la médula ósea. Añadiremos el prefijo “h-” si se trata de células humanas. De forma anecdótica, en inglés existe menos conflicto con las siglas MSC, puesto que sirve tanto para “Mesenchymal Stem Cells”, como para “Multipotent Stromal Cells”.

Así, las CT son células progenitoras inmaduras capaces de autorenovarse y de diferenciarse en múltiples líneas celulares a través de un proceso de mitosis asimétrica, lo que conduce a la formación de dos células hijas, una idéntica a la célula madre y otra capaz de diferenciarse en otras células más maduras [117]. Las CT pueden ser (Figura 8):

**Totipotentes**, capaces de formar un organismo completo, ya que pueden dar lugar a todos los tejidos embrionarios y a la placenta. Aquí se incluyen, por ejemplo, células tempranas del embrión (1- 3 días desde la fertilización del ovocito).

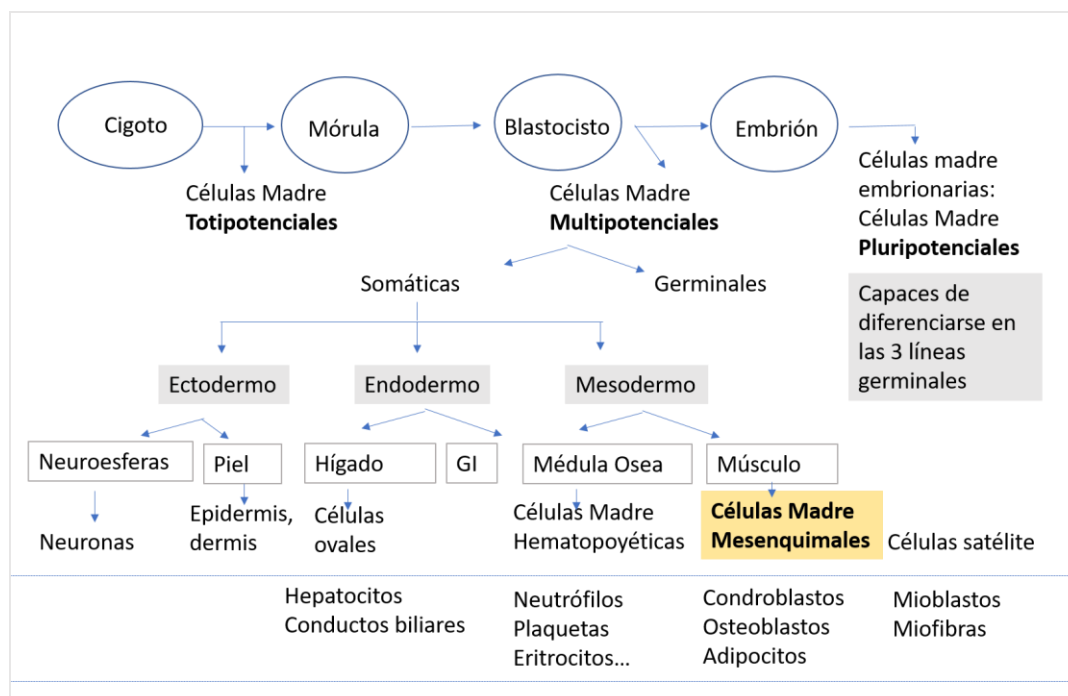
**Pluripotentes**, que retienen la capacidad de formar células de tejidos de las tres hojas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) pero no otros como la placenta o el cordón umbilical. Aquí se incluyen por ej. las **células embrionarias** del blastocisto (ESC en inglés o CTE en castellano) (entre los días 4 y 14 tras la fertilización del ovocito).

**Multipotentes**, que son capaces de diferenciarse en diferentes tejidos, pero todos pertenecientes a una de las hojas germinales: ectodérmica (neuronas o piel), endodérmica (hepatocitos, pulmón,

## INTRODUCCIÓN

células intestinales), o mesodérmica. Pueden ser embrionarias, desde el día 14 en adelante, o del adulto. Aquí se incluyen las **células troncales hematopoyéticas (CTH)** y las **células troncales mesenquimales (CTM)** del adulto. Estas últimas son el objeto de esta tesis ya que se consideran uno de los tipos celulares más prometedores en cuanto a aplicaciones terapéuticas, aunque mencionaremos algunas alternativas. También se incluyen las **Células Multipotentes Progenitoras del adulto** (MAPC en inglés), de enorme actualidad, que pueden diferenciarse in vitro en células epiteliales, endoteliales y neurales, así como otras de origen mesenquimal [118]. Así, las MAPC son probablemente los progenitores comunes de las CTH y las CTM, y deberían considerarse más bien pluripotentes .

**Unipotentes:** son CT presentes tanto en los tejidos y órganos fetales (sangre, pulmón, hígado) como en los tejidos de adultos, aunque con menos capacidad de expandirse y diferenciarse que en el feto. Su origen pueden ser células embrionarias o no. Actúan como reservorios para reemplazar a las células cuando ocurre un daño, y están disponibles a lo largo de la vida. En el hígado, por ej. que se regenera mucho, se llaman “células ovals”, en el músculo esquelético se llaman “células satélites”, etc.



**Figura 8:** Modelo jerárquico de las células madre o troncales

Dentro de las CT, esta tesis se centra en las **células troncales mesenquimales (CTM)**. Se aislaron por primera vez con éxito a partir de la médula ósea de adultos hace ya 40 años [119-121]; al sembrar muestras de médula ósea en placas de cultivo y eliminar las células no adherentes después de varias horas, se observaron unas pocas células adheridas parecidas a los “fibroblastos” que formaban pequeños “*clusters*” o “racimos” y se llamaron inicialmente “**Unidades formadoras de colonias fibroblásticas**” (*CFU-F* en inglés). Lo interesante fue descubrir que, tras varios pases en cultivo, las células supervivientes se hacían homogéneas y retenían su capacidad para replicarse y formar células óseas y cartilaginosas [113]. Posteriormente se vio que tenían capacidad para diferenciarse en tejidos derivados del mesodermo, y se han ido aislando de una gran variedad de tejidos, como el bazo, el corazón, el músculo esquelético, el líquido sinovial, el líquido amniótico, la pulpa dental, el hueso, el cordón umbilical, el tejido adiposo y prácticamente de todos los tejidos u órganos conectivos postnatales, probablemente por su origen perivascular (de los pericitos) [116], sugiriendo que el “sistema mesenquimal” está virtualmente presente en todos los tejidos de adultos [116, 122]. Algunos autores incluso han visto CTM circulando en sangre periférica, aunque en muy pequeña cantidad [123]. En concreto, las CTM derivadas de tejido adiposo (Ad-CTM), protagonistas de esta tesis, fueron identificadas por primera vez por *Zuk et al.* en 2001[124].

Su **origen** no está claro, algunos las relacionan con los pericitos [125], otros dicen que comparten muchas características con los fibroblastos... Debido a que son un grupo heterogéneo de células, resulta difícil caracterizarlas, al carecer de un anticuerpo específico. Los investigadores utilizan diferentes medios de aislamiento y expansión, así como diferentes protocolos de diferenciación, lo cual dificulta la comparación y el contraste de resultados entre diferentes estudios. La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) establece los criterios mínimos para **definir las CTM**: En primer lugar, deben ser plasticoadherentes en condiciones de cultivo estándar. Además, deben expresar CD105, CD73 y CD90, y carecer de expresión de CD45, CD34 (estos dos son marcadores hematopoyéticos), CD14 (marcador de monocito) o CD11b (células dendríticas), CD79 $\alpha$  (precursor de célula B), y CD19 (marcador de linfocito B) y el CMH clase II receptor de la superficie celular HLA-DR. Y finalmente, las CTM deben ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro*. Esta definición dada por Dominici [126] ha sido ampliamente citada por numerosos autores [127, 128]. Sin embargo, requiere algunos ajustes en investigación, y no es definitiva, especialmente cuando proceden de otros tejidos diferentes a la médula ósea, como ocurre, por ej, con el CD34 que expresan las CTM de tejido adiposo. De hecho, es más que probable que esta definición cambie con el tiempo [10].

## INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de la **terapia celular con CT de adultos**, el Trasplante de médula ósea o progenitores hematopoyéticos (TMO o TPH) fue pionero mucho antes de que se comenzara a hablar de las CTM. Las **células troncales hematopoyéticas (CTH)** se han usado ampliamente en terapias experimentales, desde los años 50 [129], y posteriormente en la clínica para el tratamiento de determinados cánceres hematológicos como la leucemia o el mieloma múltiple. Éstas también son una población de células troncales multipotentes heterogénea, capaces de formar todos los tipos de células sanguíneas, y mantener su recambio, y pueden aislarse de la médula ósea seleccionando las células con unos marcadores característicos y falta de expresión de otros.

En cuanto a las CTM, su uso para **regeneración ósea** ha sido bien reconocido durante muchos años, demostrando su efecto terapéutico por ej. en casos de osteogénesis imperfecta [130]; regeneración de cartílago y de tendones [131], de músculo esquelético [132] y miocárdico [133], neural, etc... Sin embargo, éstas células se redescubrieron a finales de los 90 al evidenciar que, pese a su naturaleza de adulto, eran capaces de expandirse en los cultivos manteniendo su multipotencialidad, y además eran capaces de diferenciarse de forma pluripotente en tejidos derivados de mesodermo (grasa, hueso, cartílago, músculo...), lo cual las convertía en útiles en **medicina regenerativa**. Las CTM han demostrado incluso ser capaces de renovar el microambiente estromal necesario para la hematopoyesis [134], ya que in vitro mantienen los cultivos hematopoyéticos a largo plazo muy eficientemente y en clínica, la coin fusión de CTM con un TMO se ha visto que ayudaba a la recuperación más rápida tras la quimioterapia, favoreciendo el “*engraftment*” y reduciendo la incidencia y/o la severidad del EICH.

Desde principios del 2000 se comienzan a evidenciar también sus **capacidades inmunomoduladoras** que las convierten en extremadamente útiles como terapia celular para tratar un amplio espectro de actividades, entre ellas enfermedades autoinmunes, o el trasplante de órganos [117, 135], con varias revisiones al respecto [47, 136-138]. En este campo se han postulado como un tratamiento posible, novedoso y potencialmente factible para prevenir y/o tratar el rechazo y/o la enfermedad injerto contra huésped (EICH), e inducir la tolerancia inmunológica [47, 127, 138]. Éste es el objeto de esta tesis, enfocada más concretamente al trasplante intestinal.

En las próximas páginas, se describen cómo las CTM pueden regular las respuestas inmunes innatas y adquiridas y controlar la proliferación, migración y función de las células del sistema inmune.

## II. FUNCIÓN INMUNOMODULADORA DE LAS CTM: ACTUACIÓN SOBRE DIFERENTES POBLACIONES CELULARES

Hay numerosas **evidencias**, tanto in vitro como in vivo y en múltiples modelos de ratón, mono y humanos, que corroboran las **propiedades inmunomoduladoras** de las CTM, incluso de una forma independiente del CMH [117, 139, 140] y de las diferencias en las especies [135, 141] mediante 1. la **inhibición de respuestas de proliferación inmune** y 2. la **inducción de células inmunes reguladoras**. Ambos fenómenos se han observado tanto en la respuesta inmune innata como adquirida, implicando a una gran variedad de células y moléculas.

Parece que actúan a través de varios **mecanismos combinados** [142]. Aunque se asumía clásicamente que las CTM actúan diferenciándose en células funcionales [130], cada vez hay más evidencia de que las CTM no son inmunosupresoras constitutivamente y probablemente actúan de forma paracrina, mediante contacto directo con células y otros factores **modificando el microambiente** [143], necesitando además ser activadas primero por condiciones inflamatorias locales, siendo claves citoquinas como el  $TNF\alpha$ , la  $IL1\beta$  y el  $IFN\gamma$ , entre otras... para regular su inmunofenotipo y permitir su actuación [117, 122].

El principal fundamento para pensar en terapias con CTM es que clásicamente se han considerado **inmunoprivilegiadas**, por su baja expresión de HLA I y II y moléculas coestimuladoras en su superficie (como el *CD80*, *CD86* y el *CD40L*), que les permite escapar del sistema inmune en condiciones no estimuladas [128]; en el año 2000, por ej., dos grupos demostraron que al inyectar MO-CTM humanas intraperitonealmente en un feto de oveja, éstas eran capaces de sobrevivir más de un año sin ser rechazadas, tras el desarrollo de su competencia inmunológica [144, 145].

Actualmente hay evidencia acumulada de que las CTM sí son “**inmunogénicas**” y en un ambiente inflamatorio son capaces de expresar HLA I y II, y por tanto ser reconocidas por el SI, tanto adquirido como el innato. Así, CTM humanas pueden ser reconocidas y lisadas por células CD8 [146], y modelos de trasplante demuestran que bajo determinadas condiciones las CTM del donante pueden sensibilizarse contra órganos del mismo donante; esto es doblemente importante, por la posibilidad de sensibilización HLA tras una terapia con CTM alogénicas, y si se usan de forma repetida, la potencial disminución de su eficacia al aclararse rápidamente.

## INTRODUCCIÓN

Por otro lado, también se ha visto que las CTM tanto alogénicas como autólogas pueden ser lisadas por células del SII, como las NK activadas. No se sabe muy bien porqué, pero es posible que cambios inducidos por los cultivos conviertan a las CTM en dianas para las NK. Así, la optimización de la terapia con CTM quizá requeriría también una reducción de la actividad de las NK. Aún más preocupante, se ha demostrado que la inmunogenicidad de las CTM (ya sean del donante o third party) puede afectar negativamente a la supervivencia del TOS. A este respecto, *Griffin et al* revisa y recoge la evidencia científica acerca de las respuestas inmunes celulares y humorales contra los antígenos del donante tras la administración de CTM alogénicas activadas por IFN $\gamma$ . Este tema es relevante y se merece futuros estudios en el escenario clínico[147].

Por tanto, estos y otros datos sugieren que las CTM son menos inmunoprivilegiadas de lo que inicialmente se pensaba, y esto podría explicar su corta vida tras la infusión. No obstante, hasta la fecha no se ha demostrado que la longevidad de las CTM tras la infusión sea importante para que la terapia sea eficaz. De hecho, como hemos comentado, sus efectos probablemente se deben a los efectos que provocan en otros tipos celulares.

Pese a las controversias, las CTM siguen planteándose como una terapia celular prometedora en TOS. Existen varias revisiones acerca de su interacción con el SI, aunque generalmente están enfocadas en poblaciones celulares o mecanismos moleculares concretos. Es fundamental ensamblar todos estos trabajos con el fin de entender mejor el mecanismo de acción de las CTM, y a su vez, adaptar estos a las particularidades del TI, para poder plantearlas como una posible terapia.

### a. ACCIÓN SOBRE CÉLULAS DIANA DEL SISTEMA INMUNE INNATO:

Cada vez, existen más evidencias de las propiedades inmunorreguladoras de las CTM sobre la respuesta inmune innata. A este respecto, *Le Blanc et al* publican en 2012 una interesante revisión del conocimiento actual sobre el tema [148] (Figura 9).

#### 1) Células dendríticas

Como ya se ha comentado, las **células dendríticas** (CD) son un tipo de CPA fundamentales en la respuesta precoz innata, que procesan y presentan los antígenos a las células T del receptor, y pueden dirigir la respuesta inmune adquirida, al influenciar la diferenciación de las células T para inducir preferentemente las respuestas de CD4. En TOS son claves en determinar el balance entre la inmunidad y la aceptación del injerto [149].



Estudios recientes in vivo sugieren que sus progenitoras, las **células mieloides** son probablemente las primeras afectadas al infundir las CTM y podrían jugar un papel fundamental en el trasplante al regular la respuesta inmune antígeno específica mediada por CTM [150]. Las CTM interactúan con las CD, principalmente de dos formas: 1. inhibiendo su diferenciación y proliferación, y 2. interfiriendo en su maduración, y modificando su fenotipo hacia un perfil tolerogénico [151].

In vitro, se ha demostrado que las CTM bloquean la **diferenciación** de los monocitos de sangre periférica CD14+ [152-154] y de los progenitores mieloides CD34+ en CD [136, 150], a través de la secreción de PGE2 [155] o de IL6 [156]. *Popp et al* sugieren que actúan como CPAs e intrínsecamente expresan indoleamine 2,3-dioxigenasa (IDO), al observar que las CTM expresaban CD80 y que eran capaces de fagocitar esplenocitos, como ya se había publicado previamente [157]. Otras moléculas implicadas en este bloqueo descritas son el M-CSF y la IL10 [141, 158, 159].

Por otra parte, las CTM interfieren en la **maduración** posterior de las CD convencionales al bloquearlas en un estado inmaduro (iCD), mediante la ausencia de regulación de marcadores de CD maduras como son el CMH II, y otras moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86, necesarias para activar a las células T y promover la respuesta Th1 [151-156, 160, 161]. Por tanto, al no unirse a las células T efectoras, las iCDs pierden su actividad funcional, que resulta finalmente en una anergia de células T o apoptosis y una promoción de la actividad de las Treg [127, 150, 162, 163]. Aquí también se ha visto implicada la IL6 secretada por las CTM [153].

Se ha demostrado además que las CTM pueden también revertir el estado de las CDs de maduras a inmaduras cuando se cultivan juntas, siendo incapaces de estimular la proliferación de linfocitos y producir citoquinas. Aun más, estas iCDs son incapaces de secretar las citoquinas proinflamatorias IL12 y TNF $\alpha$ , pero sí las antiinflamatorias TGF $\beta$  y IL10, **modificando su fenotipo** hacia un grupo heterogéneo de células con perfil regulador, llamadas células mieloides supresoras (MDSC), o tolCD, o CD plasmocitoides, como ya vimos [160]. *Aldinucci et al* en 2010 aportaron que la generación de CDtol mediada por CTM era dependiente de moléculas de adhesión como VCAM1 y N-cadherina [164].

Otros estudios in vivo también han observado que la inyección de CTM supone además una incapacidad de las CD para **emigrar** a los ganglios linfáticos y por tanto suprime la presentación de antígenos; parece que es esto dependiente de la expresión de CCR7 [161]. Además, las CD

## INTRODUCCIÓN

generadas en presencia de las CTM expresan altos niveles de Jagged, un miembro de la familia de receptores Notch 2, que cuando aparecen en las células T, están implicados en suprimir la respuesta Th1 (inhiben la proliferación y activación de las CD8 al inhibir la liberación de IL12 por parte de las CD4) y promover la respuesta Th2 (estimulan la liberación de IL10 e IL4 por parte de las CD4)[165].

Esto se ha demostrado en numerosos trabajos: Así, CDs cultivadas en presencia de CTM o de medios condicionados expresaban menor nivel de moléculas estimuladoras, una proliferación de células T muy poco estimulada y Tregs generados eficientemente a través de la liberación de TGF $\beta$  [163, 165, 166].

Por el contrario, otros autores han encontrado una capacidad estimuladora intacta de las CD en presencia de las CTM; sin embargo, estas CDs promovieron la generación de células Tregs; *Ge et al.*, por ej., vieron que las CTM eran capaces de promover CD tolerogénicas en su modelo de trasplante renal [167]. *Eggenhofer et al* también observaron una expansión de células “MDSC like” en los órganos linfoides de las ratas receptoras tras un trasplante cardíaco y administración de CTM peritrasplante, y de nuevo la presencia de MDSC se asoció con la expansión de Tregs en el injerto [168]. En un modelo in vivo de trasplante de islotes, la inyección de tolCDs inducidas por CTM del donante, producía una anergia de células T e inducción de Tregs junto a una disminución de la proliferación de las células B y de la producción de anticuerpos, todo lo cual prolongaba la supervivencia del injerto [169].

Más aun, el mismo grupo describen la plasticidad celular pudiendo convertirse las Th17 hacia Treg, en un modelo murino de trasplante cardíaco, a los que les administran CTM junto al MMF. Observan un efecto sinérgico entre ambos, mediado por las MDSC, y sugieren la importancia de las condiciones ambientales para conseguir el balance entre Th17 y Tregs en el camino hacia la tolerancia [170].

En resumen, todos estos estudios sugieren un posible cambio desde la cadena de Th1 al Th2, la capacidad de las CD de promover la generación de linfocitos Tregs, la reducción de la capacidad de las CDs para estimular CD8 mediante la activación de la vía Notch, y en general, la promoción de un estado de tolerancia por medio de las CDs en presencia de CTM [152].

## 2) Macrófagos y monocitos

Los **macrófagos** constituyen otro componente esencial de la inmunidad innata y migran a los tejidos en respuesta al daño donde contribuyen a la homeostasis y reparación tisular. Están presentes en las biopsias de los injertos trasplantados tanto en modelos animales como en humanos. Dependiendo del ambiente, estos macrófagos pueden ser polarizados a ejercer funciones específicas. Así, los macrófagos clásicos M1 inflamatorios son el producto de la exposición a las citoquinas proinflamatorias como el IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$ , que promueven una respuesta Th1, y con una mayor capacidad fagocítica. Por el contrario, los M2 activados alternativamente, son inducidos por citoquinas propias de Th2, como IL4 e IL13 [171] y se consideran una subpoblación de macrófagos reguladora, ya que son capaces de suprimir la proliferación de células T policlonales alogénicas activadas in vitro y de producir IDO e IL10, pero no (o apenas) citoquinas proinflamatorias [33, 110, 172, 173]. Obviamente, la identificación de una población de macrófagos que es capaz de suprimir las células T ha hecho que crezca su interés en los últimos años [33, 174-177].

En cierto modo, las propiedades inmunosupresoras de las CTM se parecen a la de los macrófagos reguladores, que también expresan niveles altos de IDO y que al igual que las CTM, inicialmente se alojan en los pulmones y en el hígado [159]. Se ha demostrado que las CTM, en presencia de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , son capaces tanto in vitro como in vivo de desviar el destino de los macrófagos activados por LPS y también de los monocitos en tan sólo 24 horas hacia el fenotipo regulador (M2 o Mregs, CD206+), secretadores de IL10 y disminuyendo su producción de TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$ , IL6 y IL12, con **propiedades antiproliferativas y antiinflamatorias** [176, 178, 179]. De hecho, la reprogramación de los macrófagos por las CTM se ha sugerido como el principal mecanismo por el cual éstas mejoran la sepsis en ratones [177]. Además de **modificar el fenotipo**, animales tratados con CTM demostraron también menos macrófagos M1 infiltrando el parénquima y una menor expresión de citoquinas proinflamatorias [33].

Por otro lado, el rol de los macrófagos M2 en la **inducción de Tregs** por parte de las CTM se ha confirmado en modelos de ratón con esclerosis sistémica o con colitis experimental: en estos, la infusión sistémica de MO-CTM murinas tanto singénicas como alogénicas indujo a la apoptosis transitoria de las células T, que desencadenó la producción de altos niveles de TGF $\beta$  en sangre periférica por parte de los macrófagos, promoviendo la generación de Tregs, traducándose este

## INTRODUCCIÓN

efecto en una mejoría de los fenotipos de la enfermedad [174]. Otros autores coinciden con esta afirmación [175, 180].

En realidad, las CTM inducen Tregs a través de un mecanismo que implica el paso de los **monocitos** hacia M2. Así, cuando se cultivan monocitos en presencia de CTM, éstos producen mayores niveles de IL10 y median la formación de Tregs a través de la producción de quimoquina CCL18, mientras que al deplecionar los PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) de monocitos en las mismas condiciones, el porcentaje de Tregs disminuye [175, 181]. Además, los monocitos son también capaces de convertir a los CD8 en un fenotipo no citotóxico [182].

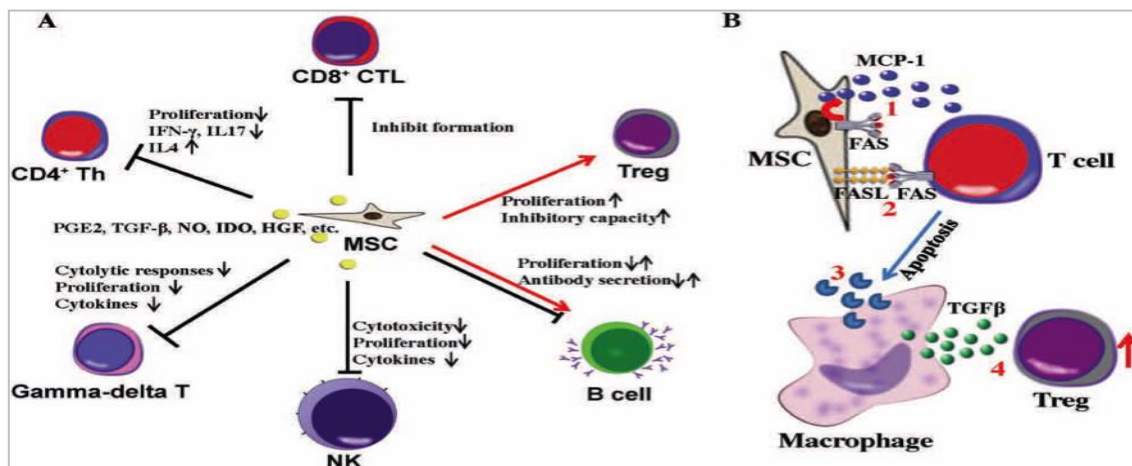
### 3) Células Natural Killer

Las NK son de especial interés cuando estudiamos las respuestas inmunes innatas en el rechazo ya que juegan un papel complejo en la citotoxicidad independiente del CMH. Así, se ha visto que median el rechazo tanto de los injertos de médula ósea alogénicos como de órgano sólido xenogénicos. Los niveles bajos o nulos de moléculas CMH I en la superficie de una célula, típico de las células neoplásicas e infectadas por virus, son la señal de peligro que las NK reconocen a través de su receptor inhibitor NKG2. Cuando se activan, las NK liberan IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  sobre las células diana, y su citotoxicidad es mediada por perforinas, granzima y ligando FAS.

Las CTM pueden impedir la activación y proliferación de las NK. Así, cuando se cultivan conjuntamente con las NK y con sus estimuladores, como la IL2 o la IL15, y con moléculas diana (tumores o células infectadas por virus), provocan la regulación de los receptores de las NK, como son el NKG2D, pero también el CD132 (la cadena gamma del receptor IL-2), CD56 (NCAM), NKR2B4, NKp30 y NKp44, por tanto, impidiendo que las reconozcan y ejerzan su efecto citotóxico [135, 183-186]. Sin embargo, otros estudios fracasaron en encontrar un efecto [187], especialmente en NK aisladas en fresco.

Es importante señalar que las CTM sólo suprimen a las NK cuando estas no están previamente activadas, y, por tanto, liberan IFN $\gamma$  de una forma moderada; en estas condiciones, las CTM se estimulan y bloquean su capacidad lítica. Esto también ocurre cuando las CTM están expuestas a IFN $\gamma$  exógeno, ya que regulan la expresión de las moléculas CMH I, quedando las NK incapaces de activarse y matar a las células diana. Por el contrario, cuando las NK están previamente activadas por la IL2 o la IL15, son capaces de matar a las CTM alogénicas y autogénicas. Esta interacción esta mediada por NKp30, NKG2D, DNAM-1 y LFA-1.

En vista de estos hallazgos, es importante tener en cuenta dos posibles efectos durante la terapia con CTM: En primer lugar, la infección y las células tumorales podrían activar las NK y estimularlas para matar las CTM terapéuticas, lo cual disminuiría su efecto beneficioso. Como las CTM expresan el antígeno HLA I, aunque sea en un bajo nivel, parece que pueden ser vulnerables a la lisis por las NK [186]. En segundo lugar, las CTM podrían ejercer un efecto contraproducente al apagar otras respuestas inmunes innatas de las NK contra una infección futura o desarrollo de una neoplasia.



**Figura 9:** Esquema de las células diana de las CTM, desde una perspectiva inmunomoduladora (*Imagen de De Miguel, M.P. Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications, Curr Mol Med. 2012 Jun;12(5):574-91*)

## b. ACCIÓN SOBRE CÉLULAS DIANA DEL SISTEMA INMUNE ADQUIRIDO

Como hemos visto, la respuesta inmune adquirida tiene dos actores principales: los linfocitos T y los B.

### 1) Células T

**Inmunosupresión:** Se ha demostrado ampliamente, tanto in vitro como in vivo, la capacidad de las CTM para inhibir fuertemente la **respuesta y/o activación** de las células T [33, 188, 189] [190, 191]. Como se ha comentado, dicha inhibición no está restringida al CMH [192]. Además, las CTM detienen también su **proliferación** [141], y disminuyen la secreción de citoquinas

## INTRODUCCIÓN

inflamatorias [128, 135]. Inducen una anergia de células T y las detienen en la fase del ciclo celular G1 similar a lo que ocurre con algunos inmunosupresores mediante distintos mecanismos, como el Tacrolimus o el Sirolimus. Este efecto es irreversible mediante re estimulación con IL2 exógena, a pesar de que las células T expresan receptores normales de IL2 [157]. Se están estudiando varias moléculas implicadas en esto.

Aunque sus células diana son las CD4 y las CD8 efectoras (Th1), tanto naïve como de memoria, [140, 193-195], a diferencia de los inmunosupresores clásicos, recientemente se ha demostrado también el efecto de las CTM sobre las Th17 [196, 197].

Conviene señalar que las CTM ejercen estas propiedades inmunosupresoras sólo cuando las células T ha sido activadas ya sea por otras células (PBMCs alogénicas, linfocitos, CD, por ej) o por mitógenos (fitohemaglutinina, IL2), y secretan IFN $\gamma$ . El IFN $\gamma$  induce la expresión deIDO por las CTM, lo cual conduce a la supresión de las células T [198]. De hecho, bloqueando el receptor para el IFN $\gamma$  en las CTM o inhibiendo la producción de IFN $\gamma$  de las células T se bloquea la capacidad supresora de las CTM. No obstante, existen resultados contradictorios en este tema.

Recientemente, *Cortinovis et al* se centran en las **células T de memoria**, tan importantes en el trasplante [25] y describe cómo las CTM son capaces de controlar e inhibir su expansión, basado en múltiples estudios in vitro, tanto con células de ratón [140, 199], como con CTM humanas, incluyendo las **CD8+CD28-**, que como ya se ha mencionado, son conocidas por escapar al bloqueo con coestimulación CD28/B7 [200]. Así, tanto las CTM como las MAPCs, disminuyeron la proliferación de CD4 y CD8 efectoras de memoria humanas de forma dosis dependiente en respuesta a mitógenos, y también disminuyeron la secreción de IFN $\gamma$  antígeno específico y de citoquinas Th1 y de IL17 por parte de las CD4 de memoria efectoras, mientras que aumentaron la secreción de IL10 [195]. Los mecanismos por los cuales las CTM suprimen la proliferación de las CD8 de memoria siguen siendo investigados, parece ser debido a la producción de TGF $\beta$ , el cual antagoniza el efecto de la IL15, fundamental en la expansión de los CD8 de memoria [79, 190].

Esta inhibición se ha demostrado también en **clínica**, en el contexto de enfermedades autoinmunes, como la esclerosis múltiple, la diabetes tipo I y la celiaquía. En concreto, las MAPCs suprimieron la proliferación ex vivo y la función efectora de las células T autorreactivas aisladas contra los islotes de pacientes con diabetes tipo I [195]. De la misma manera, las CTM redujeron la proliferación y la producción de IFN $\gamma$  de las células T autorreactivas contra la gliadina obtenidas de mucosa en pacientes celíacos de forma dosis dependiente [201]. Curiosamente, las CTM impusieron

una supresión duradera que persistió durante nuevas estimulaciones con antígenos, aunque ya no estuviesen presentes en los cocultivos, lo cual es importante desde la perspectiva clínica, ya que las CTM tienen una vida media corta tras la infusión [202, 203]. Asimismo, las CTM inhibieron la proliferación de células T de memoria inducidas por la mielina en pacientes con esclerosis múltiple, correlacionándose bien con los niveles de PGE2 en los sobrenadantes de estos cultivos [204].

Pese a la importancia emergente de otras poblaciones celulares inmunes, como Th9 [188] no hay estudios todavía que describan el efecto de las CTM sobre estas poblaciones.

**Modulación:** Además de su capacidad de suprimir a las células T efectoras, las CTM tienen la propiedad única *in vitro* de **modular la respuesta inmune**, al promover la **generación de Tregs**, desviando el balance entre Tregs y células T de memoria/efectoras hacia un ambiente protolerogénico [33, 35, 150, 158, 159, 190, 205, 206].

Así, **in vitro**, polarizan a las células T CD4 o CD8, y recientemente también se ha descrito con las Th17 hacia su diferenciación a Tregs, tanto nTregs (Foxp3+), como células Tr1 productoras de IL10, o células Tregs Th3 productoras de TGF $\beta$ , con consiguiente supresión de las respuestas Th1, Th2 o Th17 [33, 127, 196, 207-209]. Son también capaces de inducir Tregs a partir de las CD3+ (linfocitos T), tanto naive (CD3+CD45RA+) como de memoria (CD3+CD45RO+) [135, 194, 206, 207, 210, 211]. Esta capacidad se ha demostrado ampliamente *in vitro*. Así, cuando las CTM se añaden en una RLM, el porcentaje de Tregs aumenta, seguido de la expresión de PGE2 y TGF $\beta$ , y éstos suprimen la respuesta proliferativa aloantígeno-específica. Este efecto es contacto dependiente cuando se usan CD4 aisladas, y no es contacto dependiente cuando las PBMCs están incluidas, lo cual sugiere algún tipo de mediación de las CPAs.

Por el contrario, algunos autores no han encontrado ninguna inducción de Tregs por medio de las CTM *in vitro* *in vivo*, aunque si bien es cierto que en estos estudios el efecto de los Tregs fue medido sólo indirectamente por acumulación de citoquinas en el medio. Además, la presencia de CDs en el cultivo no se tuvo en cuenta en los experimentos, cuando las CTM podrían ejercer su papel de promover Tregs indirectamente a través de las CD. Por otro lado, el impacto de las CTM sobre las nTregs sigue siendo controvertido [117, 193]; de hecho, *Franquesa et al* publicaron que las nTregs no afectaba a las propiedades inmunosupresoras de las CTM y viceversa [212].

## INTRODUCCIÓN

Parece que la modulación de la respuesta de las células T depende en último término del **ambiente de citoquinas** en el que las CTM actúen, aunque se han observado efectos contradictorios: algunos sugieren que un ambiente proinflamatorio (presencia de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ ) fomenta la capacidad supresora de las CTM [213]; otros, sin embargo, defienden que las CTM, en medios condicionados con citoquinas proinflamatorias, como la IL1 $\beta$ , estimulan la generación de células Th17. En este contexto, se ha descrito un aumento de la secreción de IL6, lo cual, sumado a una producción espontánea de TGF $\beta$ , resultan dos factores clave para la diferenciación de las células T naïve en Th17 [208]. Otro estudio objetivó que al cultivar de forma temprana CTM con células T bajo condiciones polarizadas hacia Th1 y Th17, éstas ejercieron un efecto supresor sobre todas las subpoblaciones de CD4, mientras que, si se cultivaban con células Th1 y Th17 ya diferenciadas, disminuyó la producción de IFN por parte de las células Th1, pero paradójicamente incrementó la IL17 [214].

Pese a las controversias, los resultados han motivado a buscar la tolerancia inducida por CTM en **modelos experimentales**, entre ellos esta tesis doctoral [167, 202, 215-218], y muchos de estos estudios son alentadores: Así, por ej., en primates no trasplantados, la infusión sistémica de MO-CTM autólogas redujo los niveles de células T efectoras de memoria, especialmente las CD8, mientras que provocó una expansión de Tregs. En el campo del TOS, las CTM derivadas del donante inyectadas antes de un trasplante alogénico de riñón o de corazón, aumentaron el número de Tregs, disminuyeron el rechazo y aumentaron la supervivencia, y esta tolerancia inducida por las CTM resultó ser donante específica [202]. Hay datos que demuestran su capacidad de controlar la proliferación de las CD8 de memoria efectoras y la función citotóxica de los CD8 específicos contra el donante a largo plazo, lo cual anticiparía el establecimiento de un ambiente protolerogénico en el trasplante renal. Por el contrario, cuando *Popp et al* investigaron en su modelo murino de trasplante cardíaco si las CTM convertían a las CD4 a un estado de no respuesta frente al aloantígeno in vivo mediante estudios en RLM, vieron la misma proliferación en los receptores con CTM y MMF, que en aquellos con MMF sólo o sin tratamiento. Esto sugería que las CTM interactúan con las células T efectoras diferentes de las CD4 o ejercen su efecto de forma indirecta a través de las CPA, como las CD tolerogénicas [141].

También hay evidencias en la **clínica**, de la modulación de las células T mediada por CTM, en enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como el lupus, la artritis inducida por colágeno, diabetes, colitis y miastenia gravis...[219-224]. Sin embargo, la experiencia clínica con las CTM en



TOS es todavía muy inmadura y nadie hasta el momento ha demostrado que esta terapia sea capaz conseguir la tolerancia operacional, como veremos en las próximas páginas.

## 2) Células B

Hemos comentado la importancia creciente de los anticuerpos en el desarrollo del rechazo crónico, por lo que los tratamientos futuros no deberían estar sólo enfocados en suprimir o modular a los linfocitos T, sino también en controlar a los B.

Aunque hay pocos datos y controvertidos, las CTM también parecen afectar al funcionamiento de las células B [43], pudiendo impedir su **proliferación, diferenciación y maduración** de una forma dosis dependiente; así, estudios con CTM tanto de ratón como de humano inhibieron la proliferación de células B y redujeron significativamente la producción de Igs por parte de las células plasmáticas cuando existía una ratio alta CTM/linfocito B (1:1 o 1:4), efecto que no se observó en proporciones menores (1:10)[117, 225-227]. En TOS, las MO-CTM también redujeron los niveles de IgG y de IgM dentro del injerto en un modelo murino de trasplante cardiaco [167]. Sin embargo, otros autores han encontrado que las CTM podrían estimular la proliferación de células B humanas y la secreción de anticuerpos [227, 228].

Entre los mecanismos más importantes destacan la quimioquina CCL2 [229] e interacciones PD-1/PDL1 [230]. Así, la CCL2 procesada por las metaloproteinasas en las CTM y unida a su receptor CCL2R en las células B bloquea la expresión de Blimp-1, necesaria para la producción de IgG.

Por otro lado, las CTM no parecen alterar la capacidad de la célula B de presentar antígeno al no tener efecto sobre la expresión del CMH II, CD 40, CD86 y CD80, pero sí frenan su migración mediada por quimioquinas, ya que los linfocitos B regulan sus receptores de quimiotaxis CXCR4 y CXCR5 en presencia de las CTM.

Al igual que ocurre con las células T, las CTM necesitan cultivarse en medios ricos en células B y T y ser estimulados con PBMCs, bajo el estímulo de diferentes moléculas como el LPS, CpG oligodeoxinucleótidos, CD40L, IL2, IL4 o IL10, ...para ejercer sus efectos sobre los linfocitos B [226, 231, 232].

La relación entre CTM y Bregs no se ha estudiado aún, pero parece que las CTM podrían inducir la diferenciación de los Bregs. Así, un estudio reciente en pacientes transplantados demostró que las CTM también regulaban la respuesta mediada por aloanticuerpos hacia receptores más tolerantes y se vio la acumulación de linfocitos B exhibiendo un perfil regulador e inhibidor [43, 44, 117, 225, 227].

## INTRODUCCIÓN

A la hora de trasladar estos conceptos a la **clínica**, es evidente que se requieren más estudios para comprender la interacción entre las CTM y los linfocitos B, y explicar la heterogeneidad de los resultados. Así, en un modelo murino de lupus, el tratamiento con CTM humanas condujo a la remisión completa de la enfermedad, mientras que en otro estudio similar no se vieron efectos [233]. Es necesario investigar usando diferentes poblaciones de células B (inmaduras, naïves, de memoria ...), así como pensar nuevos enfoques basados en las células T helper foliculares o en el rastreo de las CTM hacia la MO o hacia el injerto [234], antes de poder plantear su papel en el rechazo humoral, tras un TOS.

### c. MECANISMOS DE ACTUACIÓN A NIVEL MOLECULAR DE LAS CTM

Hemos visto que las CTM ejercen su efecto inmunosupresor a través de una combinación de mecanismos dependientes del **contacto celular** y de **factores secretados**. No obstante, para algunos también ejercen una acción sistémica por mecanismos aún poco conocidos. Sus células diana hemos visto que incluyen las CD, macrófagos y monocitos, PMN (eosinófilos, neutrófilos, basófilos), NK, células T naïve y de memoria, células B, y progenitores hematopoyéticos y endoteliales.

#### 1) Factores secretados (acción paracrina)

Una vez en el sitio del daño o en órganos linfoides, pueden actuar sobre las células diana mediante la **secreción de un largo espectro de moléculas** bioactivas, que ejercen efectos beneficiosos tróficos, inmunomoduladores, anticicatriciales y quimiotácticos. Los tróficos, a su vez, pueden ser antiapoptóticos, angiogénicos, y estructurales o de soporte (estimulación de la mitosis, proliferación y diferenciación de precursores intrínsecos del órgano o de células troncales). Esto explica cómo las CTM pueden ser terapéuticas incluso cuando no permanecen o cuando no se diferencian en otros tipos celulares [116]. El número de moléculas conocidas que median la acción paracrina crece cada día, y muchas posiblemente no se han identificado todavía [158, 159]. Las más citadas en la literatura, se describen a continuación (Tabla 3).

**Tabla 3:** Principales moléculas descritas, implicadas en el mecanismo de acción de las CTM.

Moléculas implicadas en el mecanismo de acción de las CTM	
Acción paracrina	Contacto celular
<ul style="list-style-type: none"> <li>•IDO</li> <li>•Oxido nítrico (NO)</li> <li>•Proteína HLA-G (HLA-G5)</li> <li>•PGE2</li> <li>•IL10</li> <li>•TGFβ</li> <li>•TSG6 (TNFα-stimulated gene 6 protein)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Moléculas de adhesión</li> <li>• Quimoquinas y sus receptores</li> <li>• Factores de crecimiento</li> <li>• Microvesículas</li> </ul>

#### 1) *Indoleamine 2,3-dioxigenasa (IDO)*

El **IDO** parece ser un factor clave en la regulación de las CTM. Es una enzima que cataliza la degradación del triptófano hasta la Kynurenine. El triptófano es un aminoácido esencial para la proliferación de las células T, y su depleción, y sobre todo la acumulación de los metabolitos derivados han demostrado potentes propiedades inhibitorias sobre las **células T** [198], las **células B** activadas [117] y las **NK** [185].

El IDO es expresado, entre otras, por las CPAs, en especial por las CD. Su activación constituye el principal mecanismo inhibitorio de las células T en la interacción CPA/Células T. Además, también inhibe la proliferación así como la apoptosis de las células T. [235, 236]. Por otro lado, el IDO también parece un factor clave para la inducción de M2 [175]. Además, se ha visto relacionado con la generación de Tregs en un modelo murino de rechazo agudo en trasplante renal [237] y en general en TOS [141].

Todo ello sugiere que podría jugar un papel importante en el trasplante, previniendo el rechazo [238] y promoviendo la tolerancia del injerto. Cuál es exactamente la célula que expresa el IDO en el proceso de la inducción de tolerancia continúa siendo un enigma.

Se ha demostrado *in vitro* que las CTM median la tolerancia a largo plazo [198]. *Popp et al* investigan el mecanismo inmunológico *in vivo* por el que ocurre este fenómeno, y en concreto

## INTRODUCCIÓN

estudia in vitro el papel del IDO en la proliferación de las células T, de las Tregs y de las CD tolerogénicas en la tolerancia mediada por CTM [141]. Pese a expresar CD80 y ser capaces de fagocitar esplenocitos in vitro, no parece que las CTM actúen como CPAs tolerogénicas e intrínsecamente expresen IDO, al no verse en el receptor en el momento del trasplante. De hecho, las CTM no expresan IDO de forma constitutiva, aunque se ha visto que el IDO puede ser *up regulado* en condiciones inflamatorias, por ej, tras la exposición al IFN $\gamma$ , al TNF $\alpha$  o a la IL1 [198, 239]. Según este estudio, parece más probable que las CTM interactúen con las CD, y después se aclaren del huésped, ya que en su estudio las CD de los animales tratados con CTM expresaron menos CMH tipo II y CD86 que los controles, habiéndose asociado este fenotipo al potencial tolerogénico de las CD [240], que sí secretan IDO [241], y son en sí mismas potentes moduladoras de la respuesta inmune. Por otro lado, aunque se ha descrito una relación entre las CD tolerogénicas que expresan IDO y las Tregs [242], Popp et al sólo vieron un discreto aumento de Tregs en los animales que habían recibido CTM frente a los controles, y no se vieron diferencias de Foxp3 a los 10 días en el injerto ni en los ganglios. Por tanto, las CTM podrían inducir la proliferación de Tregs, pero la mayoría emergen en un momento diferente tras el trasplante.

*Franquesa et al*, por otro lado, observa también en su modelo de rechazo crónico en trasplante renal, un aumento del IDO en los grupos tratados con BMC (células de la médula ósea) y con CTM, pero sobre todo en los grupos con CTM [243].

Otros autores han observado que el IDO también parece mediar en la inhibición de las NK por parte de las CTM.

Cabe señalar que el IDO parece ser predominante en las propiedades inmunomoduladoras mediadas por las CTM humanas, a diferencia de las de ratón que expresan muy poco IDO y abundante iNOS [239]. Esto sugiere la idea de que hay variación en los mecanismos de la inmunosupresión de las CTM entre las especies.

### 2) Óxido nítrico (iNOS)

Por tanto, el IDO no parece ser el único factor implicado, ya que en algunas condiciones donde las CTM no expresan IDO, estas mantienen sus propiedades inmunosupresoras [239]. El **óxido nítrico (NO)** parece jugar también un papel crucial en la inmunomodulación mediada por CTM, especialmente en las murinas ya que en altas concentraciones inhibe la proliferación de **células T** tanto in vivo como in vitro. Se sintetiza a partir de la NO sintasa (iNOS) inducida en CTM murinas

al interactuar con CD4 o CD8 en condiciones inflamatorias que implican al IFN $\gamma$ , al TNF $\alpha$  o a la IL1 [244, 245], al igual que el IDO. Tanto el IDO como NO actúan exclusivamente de forma local.

### 3) *HLA G*

La proteína **HLA G** es una molécula de HLA I humana no clásica, descubierta inicialmente en trofoblastos, donde juega un papel crucial en la tolerancia materno fetal [246], y recientemente también se ha visto implicada en la inmunomodulación mediada por CTM [247]. Ha demostrado propiedades tolerogénicas debido a su interacción con receptores inhibitorios sobre las **CD**, **NK** y **células T**. También, el **HLA G5** puede promover las células T supresoras CD3+CD4<sup>low</sup> y CD3+CD8<sup>low</sup>. Su expresión parece dependiente de la IL10 y también necesita un contacto cercano celular con las células T alorreactivas [183]. Se ha sugerido incluso que la coinyección de HLA G y CTM podría usarse para prevenir el rechazo en trasplante de órganos [183].

### 4) *PGE2*

La secreción de prostaglandina E2 (**PGE2**) se ha descrito como otro de los mecanismos de la inmunomodulación mediada por CTM. Ésta es una molécula lipídica pequeña que regula muchos procesos en el cuerpo, incluida la función inmune. Se sintetiza a partir del ácido araquidónico por la enzima ciclooxigenasa COX-1 y COX-2. La COX-1 se expresa constitutivamente en las MO-CTM y la expresión de COX-2 puede ser inducida por citoquinas proinflamatorias como la IL1 $\beta$ , IL6, IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$ . Las prostaglandinas tienen una vida media muy corta, sugiriendo que actúan de forma paracrina o autocrina.

La PGE2 secretada por las CTM actúa sobre diferentes células diana: **dentro del SII**, inhibe la proliferación y citotoxicidad de las **NK**; Se ha observado en CTM humanas que el IDO y la PGE2 tienen un efecto inhibitorio sinérgico sobre las células T, y sobre las NK [185, 248]. Se ha visto que cuando se inhibe la síntesis de PGE2 se inhiben los efectos antiproliferativos de las CTM sobre ambas, las células T y las NK [249]. Además, la PGE2 parece jugar un papel fundamental sobre los **macrófagos**, actuando sobre sus receptores EP2 y EP4 y reprogramándolos hacia un perfil regulador, induciendo la liberación de IL10, disminuyendo la producción de citoquinas inflamatorias, y suprimiendo así a las células T, como se ha visto también en modelos animales de sepsis con MO-CTM activadas [177, 250]. Con respecto a las **CD**, se ha visto que las CTM inhiben la maduración de las CD mieloides y su capacidad de presentar antígenos [155, 177]. *Yañez et al* también confirman el rol de la PGE2 en estos mecanismos [249].

## INTRODUCCIÓN

**Dentro del SIA**, la PGE2 también juega un papel en inhibir la proliferación de las células T tanto humanas como murinas, y su producción de citoquinas tanto en la respuesta Th1 como en la Th2 [135, 177], al inhibir la liberación intracelular de calcio y la actividad de la proteína tirosin kinasa p59. *Yañez et al*, en su estudio de las Ad-CTM, además observan que al bloquear la PGE2 con IDM, se preservaba la capacidad proliferativa aunque no aumentaban las citoquinas proinflamatorias, pero sí disminuía la IL10, sugiriendo una implicación en el mecanismo de actuación de las CTM, aunque no el único [249]. Similares resultados se obtuvieron con MO-CTM, aunque otros autores han encontrado efectos diferentes [251, 252]. También, por ejemplo, observan un aumento de IL6 y de IL8, aunque no se sabe si de forma dependiente o independiente a la PGE2.

En otros modelos, se ha visto que las CTM inhiben la secreción de IL17 por parte de las **Th17** aisladas en un área inflamada, e impiden en cultivo la diferenciación de las CD4 naïve en Th17 y su consiguiente expresión de IL17, IL22, IFN $\gamma$  y de TNF $\alpha$ , todo ello mediado en parte por la PGE2. Sin embargo, otros estudios sugieren el efecto contrario, esto es, que la PGE2 podría tener un rol inmunoestimulador facilitando la diferenciación hacia células Th1 y la expansión de células Th17.

### 1) *Citoquinas relevantes como la IL10 y el TGF $\beta$*

Dentro de las citoquinas, la **IL10** juega un papel importante en la inmunosupresión mediada por CTM ya que inducen la producción de IL10 por parte de las CPAs [253]. Sin embargo, no parece que las CTM puedan secretar IL10 directamente. En otros estudios, sin embargo, la IL10 producida por las CTM inhibió el linaje de las Th17.

Por el contrario, la citoquina antiinflamatoria **TGF $\beta$**  sí parece ser constitutivamente expresada por las MO-CTM [190]. Se ha visto que anticuerpos antiTGF $\beta$ 1 provocan una disfunción del efecto inmunomodulador de las CTM sobre las células T y las NK. Sin embargo, otros han relacionado la producción de TGF $\beta$  con el aumento de Tregs inducidos por CTM como por ej. en modelos de enterocolitis y de uveítis autoinmune [254]. Otros, sin embargo, han publicado que el TGF $\beta$  no tiene efecto sobre las propiedades inmunosupresoras de las CTM [252], siendo estas discrepancias explicadas por las diferentes condiciones experimentales.

## 2) TSG6 (*TNF $\alpha$ -stimulated gene 6 protein*)

Entre los mediadores solubles implicados en la interacción entre las CTM y los macrófagos o CPAs, destaca la proteína **TSG6 (TNF $\alpha$ -stimulated gene 6 protein)**, avalada por diferentes trabajos. Esta es el único factor derivado de las CTM descrito hasta el momento que se puede obtener de forma recombinante, capaz de reproducir suficientemente la actividad terapéutica de las CTM en modelos animales de daño cardíaco, pulmonar y corneal. Parece que la TSG6 interactúa con el CD44 de los macrófagos para inhibir su actividad [255]. En un modelo de daño pulmonar se vio que anulando la expresión de TSG6, se anulaba el efecto antiinflamatorio de las CTM. También hay evidencia del efecto beneficioso de las CTM vía TSG6 en modelos animales de diabetes; así, la administración de CTM humanas en ratones diabéticos no obesos retrasó la aparición de la diabetes autoinmune al inhibir la insulinitis y aumentar la infiltración de Tregs en los islotes pancreáticos, y ese efecto protector de las CTM estuvo mediado por la liberación de TSG6. Asimismo, el tratamiento con TSG6 in vivo convirtió a las CPAs en más tolerogénicas, capaces de promover la generación de Tregs y de retrasar la diabetes en un modelo *adoptive transfer* [256]. Por otro lado, la infusión peritrasplante iv de CTM para prevenir el rechazo del trasplante corneal en ratones atenuó el proceso inflamatorio precoz tras el trasplante y redujo la aparición de CPAs en la córnea y ganglios linfáticos. Estos efectos fueron secundarios a una liberación de TSG6 de las CTM activadas tras su atrapamiento en el pulmón que disminuyó la señalización del factor nuclear NF- $\kappa$ B en los macrófagos residentes de la córnea [257].

## 2) **Contacto celular**

Además de los factores secretados, los mecanismos de **contacto celular** parecen claves en la función de las CTM:

Así, éstas expresan **moléculas de adhesión** como la **ICAM1** y **VCAM1**, y otras coestimuladoras en su superficie como **PD-1L** o la **B7-H4**. Así, por ej. la expresión de PD-1L está inducida por el IFN $\gamma$  y ejerce una estimulación negativa sobre las células B y T [258]; La B7-H4 también parece que inhibe la activación de las células T y su proliferación [259].

Asimismo, el IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$ , de forma sinérgica, promueven la expresión de las moléculas de adhesión en las CTM capacitando a la quimocina **CCL20** a unirse al receptor CCR6 para inducir in vitro la adhesión de las Th17 a las CTM y promover así su diferenciación a partir de las T naïve.

## INTRODUCCIÓN

Acerca de la producción de Tregs mediada por CTM, se ha sugerido que este efecto podría ser parcialmente mediado por la interacción entre las CTM y la **CCL1** y su receptor sobre las células T, el CCR8 [122, 260].

Entre **otras quimoquinas** secretadas por las CTM, se ha descrito la CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL20, CCL26, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8, CXCL10, CXCL11, CXCL12, la IL6... [116] (Ver Anexo I),... Aunque son moléculas constitutivamente expresadas por las CTM, con algunas discrepancias entre distintos artículos probablemente por usar diferentes medios de cultivo, lo más probable es que el perfil de expresión de éstas se modifique en función de la exposición a otras células, en especial las inmunes.

In vitro, se ha visto también que las CTM expresan varios **receptores para quimoquinas**, como el CXCR4, y **factores de crecimiento**, incluyendo el PDGF, HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), bFGF, IGF (factor de crecimiento derivado de la insulina), M-CSF (macrofagos), G-CSF, GM-CSF... La expresión de estos factores también sugiere que no sólo son capaces de migrar en respuesta al gradiente de quimoquinas inducidas por la inflamación, sino también cuando ocurre el daño tisular, siendo todos ellos importantes para ejercer sus propiedades estructurales fomentando el crecimiento de las células troncales locales y de células progenitoras de los distintos tejidos, además del soporte hematopoyético.

Además, se han visto otro tipo de moléculas implicadas, como el antagonista del receptor de IL1 (IL1RA) (antiinflamatorio), factor inhibidor de la leucemia (LIF), Peptido LL37 (antiinflamatorio y antibacteriano), MMP3 (matrix metalloproteinasa), MMP9 (actuando sobre la neoangiogénesis), angiopoietina 1 (actuando sobre la permeabilidad proteica), galectina 3, galectina 1, semaphorin 3A...

Hay también evidencia de que algunas de las funciones inmunomoduladoras de las CTM pueden ser realizadas por **microvesículas**, capaces de interferir con la respuesta inmune inducida por antígenos [261, 262], mediadas a su vez por la PGE2, el TGF- $\beta$  y la IL10, como se demostró en un estudio con pacientes con diabetes tipo I al estimular sus PBMC con antígenos específicos contra los islotes o con un antígeno de rellamada (vacuna polivalente). Las microvesículas de las CTM redujeron el número de células T productoras de IFN.



*En resumen, es evidente que los mecanismos por los que las CTM promueven la reparación del tejido son más complejos de lo que originalmente se creía, ya que hay muchísimas moléculas implicadas. Además, los diferentes métodos de aislamiento y medios de cultivo usados para expandir y seleccionar las CTM pueden influenciar en sus propiedades. Las condiciones inmunológicas, además, juegan un papel fundamental. Bloquear cada uno de estos factores por separado no restablece la función y la proliferación de las células inmunes, lo que indica que existen muchos factores implicados e interrelacionados.*

#### d. NUEVOS PARADIGMAS EN LOS MECANISMOS DE ACTUACIÓN DE LAS CTM: CTM1/CTM2

Pese a las propiedades antiinflamatorias descritas de las CTM, en un ambiente inflamatorio las CTM también pueden girar hacia un fenotipo más proinflamatorio. Esta capacidad inmunomodulatoria dual depende de los factores secretados mencionados arriba, que a su vez dependen de las condiciones ambientales [263].

Muy pocos estudios hablan de dicha **actividad inflamatoria** de las CTM. La observación de este efecto inmune divergente por las MO-CTM vino de estudios primariamente enfocados en las consecuencias de la estimulación de los **receptores Toll-like (TLR)** con estas células.

Los TLR son una familia conservada de receptores que reconocen moléculas asociadas a patógenos de forma precoz y promueven la activación de células inmunes. Se han identificado muchos TLR (desde el 1 al 13) y se han caracterizado en una gran variedad de células inmunes y especies. Agonistas de los TLRs son componentes microbianos exógenos, como el LPS, peptidoglicanos, RNA viral... y moléculas endógenas generadas tras un daño celular, como las heat shock proteins o moléculas de la matriz extracelular. Estos TLRs se expresan de diferentes formas en los leucocitos y pueden regular respuestas de la inmunidad adquirida. *Bunnell et al*, por ej, vieron que la estimulación de TLR4 con LPS llevaba a la secreción de IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IL12, IFN y TNF $\alpha$  [264], siendo esto también descrito por otros autores [265, 266].

Las CTM se incluyen dentro de las células que expresan un abanico de TLRs, entre ellos TLR2, 3,4,5,6 y 9). Cuando se activan estas vías, se secretan citoquinas proinflamatorias, quimoquinas y productos génicos relacionados con el TLR. Se ha visto que las características únicas de los TLR hacen que jueguen un papel importante en sus propiedades inmunomoduladoras, así como en la

## INTRODUCCIÓN

migración hacia el daño. Así, al inyectar CTM murinas activadas con IFN y TLR (TLR3 y TLR4) en matrices Mitrigel se producía un área de inflamación atrayendo a las células inmunes innatas y provocando un dramático reclutamiento de neutrófilos y aumento de mediadores inflamatorios, como la IL1, IL6 y IL8 (propias de la inmunidad innata), observándose este mismo efecto en implantes in vivo [265]. Otros vieron que la unión del LPS afectaba en los cocultivos de leucocitos con CTM humanas y disminuían su efecto inhibitor y afectaban a la capacidad de secretar IFN. *Raicevic y colegas* en 2010, estudiando el efecto de la activación del TLR con CTM en un ambiente inflamatorio, vieron que este entorno desviaba el perfil de citoquinas hacia uno más proinflamatorio que el inmunosupresor esperado, junto a un aumento de la IL1 $\beta$ , IL6, IL12. Además, la exposición de las CTM a la sangre humana con complemento activo, produce el depósito de productos de complemento activado en la superficie de las CTM, generando anafilotoxinas solubles. Este proceso llevó a una activación de neutrófilos y monocitos mediada por complemento mediante la unión del receptor de complemento de C3 (CD11b/CD18) a estas células.

*Federica Casirhagi et al*, en 2012, como veremos, observa en su modelo murino de trasplante renal que al infundir las CTM tras el trasplante (pero no antes del trasplante), el ambiente creado bien por el daño de IR y por el insulto inmunológico desencadenan las señales de TLR así como la activación de complemento y en este ambiente subclínico proinflamatorio del injerto, las CTM se reclutan se activan y contribuyen a up-regular la expresión de citoquinas inflamatorias, en especial la IL6 y factores quimiotácticos para neutrófilos y a activar el complemento, llevando a la disfunción prematura del injerto [215].

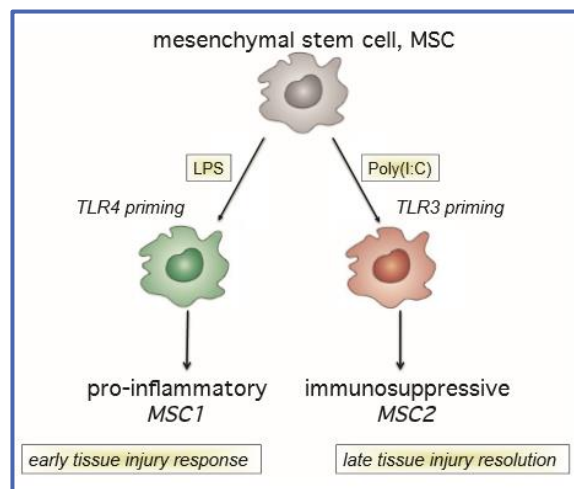
Aunque existen discrepancias entre los artículos, especialmente con respecto a los efectos del TLR sobre las propiedades de diferenciación y proliferación de las CTM [267-270], de alguna forma demuestran la evidencia emergente de un nuevo rol proinflamatorio de las MO-CTM, y de las CTM en general, y que hay que tener en cuenta dado el uso acelerado que se les está dando a estas células en terapias inmunosupresoras o antiinflamatorias. De hecho, *Raicevic et al* sugieren que enfocarse en los TLR de las CTM como diana terapéutica podría evitar consecuencias indeseables [271]. Por el contrario, las MO-CTM proinflamatorias con TLR activado podrían ser útiles en romper la tolerancia en el tratamiento de enfermedades que escapan del sistema inmune, como el cáncer.

Así se ha propuesto un nuevo paradigma de las CTM: la polarización hacia un fenotipo proinflamatorio (CTM1) o antiinflamatorio (CTM2), basada también en la literatura de los monocitos (Figura 10). El grupo de *Waterman RS et al* observó que la exposición de las CTM a

agonistas del TLR4 las polarizó hacia CTM1 mientras que la activación del TLR3 las polarizó hacia CTM2, provocando efectos opuestos sobre la activación de los linfocitos T [272]. También demostró en un modelo de daño pulmonar en ratón este efecto contrario al infundirles CTM1 o CTM2 (no publicado).

De este modo, el fenotipo inmunosupresor que se ha descrito mayoritariamente tendría que ver con las preparaciones, el aislamiento del huésped y la expansión en cultivos. Parece que por defecto las MO-CTM deben tener un fenotipo antiinflamatorio para evitar consecuencias terribles sobre los nichos de células hematopoyéticas que mantienen y soportan, que ocurrirían en caso de ser CTM1. Sin embargo, las circulantes o quiescentes están equipadas de ambas formas para responder a las señales ambientales, y no tienen el compromiso de interactuar con el resto de células inmunes o de mediar la reparación mientras están circulando. Así, las CTM son inmunosupresoras hasta que un rol proinflamatorio se requiere para promover la reparación del tejido, parecido al estado inmaduro de los monocitos, CD y otras células inmunes.

Es más que probable que la unión del TLR4 no sea la única forma de inducir un fenotipo CTM1, sino que intervengan otros factores, como los interferones, o el contacto directo con otras células proinflamatorias y el microambiente, en la línea de lo que comentan *Romieu-Mourez y Raicevic* en 2009 [266, 271]. También queda pendiente ver si se describen más fenotipos en un futuro. Obviamente, todos estos conceptos permitirán orientar mejor las terapias basadas en CTM.



**Figura 10:** Bunnell, B.A., A.M. Betancourt, and D.E. Sullivan, *New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther, 2010

### e. OTROS MECANISMOS INDIRECTOS DE ACTUACIÓN DE LAS CTM EN EL TRASPLANTE

#### 1) Daño isquemia reperfusión (IR)

El daño IR en TOS es el resultado de una muerte celular provocada por hipoxia y activación de unos transductores de señal inducidos por el estrés en el endotelio vascular y en el parénquima del órgano, que son desencadenados por la muerte cerebral o cardíaca y por la preservación del órgano, y que se amplifican tras la reperfusión. Este daño puede provocar una función retardada o una disfunción primaria del injerto, lo cual aumenta la inmunogenicidad del órgano debido a una expresión elevada de moléculas de CMH, mediadores proinflamatorios y activación del sistema inmune adquirido. De hecho, los órganos procedentes de cadáveres tienen tasas mayores de rechazo de los de donantes vivos. Tras la inyección de las CTM, éstas se van preferentemente a la zona de daño vascular o de inflamación donde probablemente funcionan como los pericitos residentes nativos cuando hay un daño pequeño vascular. Esta propiedad se ha sugerido que podría ayudar a mitigar el daño IR rescatando a donantes marginales, reduciendo la activación de la inmunidad innata que podría llevar a una fibrosis progresiva del tejido, sinergizando con las estrategias para inducir la tolerancia inmune [147, 273-275]

#### 2) Propiedades regenerativas y antifibróticas

Las CTM mejoran el daño tisular, como respuesta a la agresión y a la enfermedad. De hecho, fueron originariamente estudiadas por su capacidad para reparar defectos esqueléticos en modelos experimentales y subsiguientemente en pacientes con osteogénesis imperfecta. Como hemos visto, esta capacidad reparadora quizá tenga más que ver con su capacidad para producir factores paracrinos que con su transdiferenciación. Así, por ej. *Franquesa et al* no ven diferencias en el Ki67 (marcador de proliferación y regeneración tisular) en su modelo de rechazo crónico en trasplante renal, ni puede demostrar estructuras renales o células derivadas del parénquima renal procedentes de las CTM inyectadas [243]. Sin embargo, observaron un efecto terapéutico de las CTM atenuando la progresión de la insuficiencia renal ya instaurada. Además, las CTM ejercen **propiedades antifibróticas**, mediante la secreción de diferentes citoquinas y expresión de moléculas, demostrado en modelos animales de fibrosis cardíaca [276] y de otros órganos como el pulmón, hígado o riñón [277-280]. Puede que el efecto beneficioso de las CTM se deba a la inmunomodulación más que a promover en sí la regeneración tisular, pero como fibrosis e inflamación están interconectadas entre sí, resulta difícil independizar ambos mecanismos.

### 3) **Propiedades angiogénicas**

El proceso del trasplante implica daños importantes al endotelio del donante que es muy susceptible a la IR, así como a los procesos inmunológicos que se generan y que requerirán reparación. Por ejemplo, en trasplante renal, el daño microvascular del injerto se ha relacionado asociado a la insuficiencia renal progresiva y disfunción del injerto, y el reemplazo de las células endoteliales se correlaciona con los grados de daño en los injertos humanos. Algunos estudios han demostrado que las CTM son capaces de diferenciarse en células endoteliales y contribuir a la angiogénesis, inhibición de la apoptosis y a la reparación del daño del endotelio tanto in vitro como in vivo [281, 282] [283]. En medios condicionados, MO-CTM murinas han demostrado actuar como factores de crecimiento vascular, fibroblástico y placentario favoreciendo la proliferación de células endoteliales y células de músculo liso. Todo ello sugiere una vez más que pueden tener indicaciones importantes en el contexto del trasplante [159].

*Tras un extenso recorrido profundizando en el TI y el rechazo, así como en los conocimientos actuales acerca de las CTM, es evidente que los conocimientos en investigación no transcurren en paralelo con los que manejamos en la práctica clínica, donde se emplean muchos tratamientos de forma empírica. Es necesaria una mayor interrelación entre dos disciplinas muy dispares, la cirugía y la inmunología, para poder mejorar la supervivencia a largo plazo.*

### III. ESTUDIOS PRECLINICOS SOBRE EL USO DE LAS CTM EN EL TOS PARA EL TRATAMIENTO DEL RECHAZO

Hasta el momento, se han mencionado numerosos estudios *in vitro* con CTM en TOS, prestando especial atención a sus propiedades inmunomoduladoras y ayudando a comprender sus mecanismos de acción. En las siguientes páginas, damos un paso más al revisar los estudios preclínicos más relevantes, muchos de ellos publicados con posterioridad al desarrollo de esta tesis. Estos modelos experimentales han proporcionado evidencia del potencial uso de las CTM en el trasplante de distintos órganos sólidos, no sólo en el rechazo, sino también en otros modelos de daño del injerto, más enfocados en sus propiedades regenerativas que en las inmunomoduladoras, aunque aquí nos centraremos en aquellos relacionados con el rechazo.

**Trasplante de piel:** *Bartholomew et al* fueron de los primeros en observar que las CTM suprimían la actividad proliferativa *in vitro* de los linfocitos de sangre periférica, y posteriormente las administraron *iv* en un trasplante de piel en monos, observando que prolongaban la supervivencia del injerto frente a los controles [189], independientemente de su procedencia (autólogas, del donante, o “third party”). Esta mejoría ha sido corroborada por otros autores usando h-Ad-CTM en ratones [284]. Sin embargo, otro estudio con ratas, demostró que las CTM derivadas del donante podían ser inmunogénicas y promover el rechazo del injerto [285].

**Trasplante cardíaco:** Existen varios estudios con modelos de trasplante cardíaco en rata que demuestran un papel inmunomodulador de las CTM. Así, *Zhou et al* observaron que CTM del donante suprimían las respuestas alogénicas de los linfocitos T tanto *in vitro* como *in vivo*, y su administración *iv* prolongaba la supervivencia del injerto [286]. Las CTM migraban fuertemente al lugar del rechazo crónico, sugiriendo que eran atraídas hacia el sitio de la inflamación para participar en el proceso de reparación del tejido. Además, la diferenciación hacia fibroblastos se inhibía y se desviaba hacia la línea celular de músculo liso, sugiriendo su potencial regenerativo como estrategia terapéutica del **rechazo crónico** [287, 288]. *Inoue et al* describen los efectos inmunomoduladores de las CTM en un modelo similar [157]. *Casirhagi et al* demostraron en un modelo en ratones que la infusión pretrasplante de CTM prolongaba la supervivencia de los injertos, mediante la generación de linfocitos T reguladores antígeno específicos [202]. *Ge et al* observaron que la infusión de CTM y rapamicina disminuían sinérgicamente las respuestas aloinmunes y promovían la tolerancia del injerto cardíaco. Así, los animales tratados con CTM,

presentaban mayor frecuencia de Tol-CDs y células T CD4+CD25+Foxp3+ junto a una ausencia de anticuerpos frente al donante [167].

*Eggenhofer et al*, por otro lado, observaron que las CTM conjuntamente con MMF inhibían las CPAs y la infiltración de las células T en los injertos cardíacos alogénicos en rata [289]. El mismo grupo ya había publicado previamente este efecto sinérgico con el mismo modelo para inducir aceptación a largo plazo del órgano [141]. *Popp et al*, en esta ocasión, inyectaban  $2 \times 10^6$  MO-CTM derivadas del donante en la vena de la cola, en un grupo 4 días antes del trasplante, en otros grupos justo tras el trasplante con una inyección adicional el día 3, y en los controles inyectaban  $2 \times 10^6$  esplenocitos del donante en el día 4. El MMF se inyectaba en el peritoneo durante 7 días, en dosis bajas, a los grupos seleccionados.

Observaron que las CTM por sí solas administradas pretrasplante no fueron capaces de prolongar la supervivencia, e incluso la empeoraban (6 días frente a los 8 de los controles). Además, no las encontraron cuando se buscaron 4 días tras su administración, sugiriendo que o bien provocaban una respuesta inmune in vivo con la aparición de células efectoras enseguida y siendo rechazadas por los receptores, o que morían muy tempranamente tras la inyección. Sin embargo, sugerían la interacción de las CTM con las CD in vivo para ejercer su efecto, ya que las CTM alogénicas se rechazan a largo plazo, pero las CD adquirirían un fenotipo más tolerogénico.

Sin embargo, las CTM aumentaron la supervivencia del injerto de 8 a 15 días cuando se administraron conjuntamente con MMF. Y aun más, cuando las CTM o los leucocitos derivados del donante se inyectaron 4 días antes del trasplante, la supervivencia aumentó a más de 100 días. No obstante, al analizar histológicamente los corazones de los supervivientes, se vio una proliferación de la íntima sugiriendo que las CTM protegieron únicamente del rechazo agudo, no del crónico. Por el contrario, las CTM administradas justo en el trasplante y en el día +3, no prolongaron la supervivencia frente a los animales que recibieron sólo MMF. Este artículo es de especial interés, al ser de los primeros que sugieren que la administración de las CTM pretrasplante es la que induce la tolerancia del injerto.

En cuanto a los mecanismos de actuación de las CTM, este grupo demostró el papel importante del IDO, aunque no es el único, al igual que sugieren otros autores en otros modelos [243]. Así, 7 animales que recibieron CTM 4 días antes del trasplante recibieron triptófano, un potente inhibidor del IDO durante 7 días, de los cuales 6 rechazaron el injerto tras una media de 19 días, mientras que sólo 4 de los 9 animales que no recibieron triptófano rechazaron los injertos. Y este efecto sólo se vio en los animales tratados con CTM, no con esplenocitos.

### **Trasplante renal:**

Hasta 2012, sólo 3 grupos habían estudiado el efecto de las CTM en modelos de trasplante renal en rata, pero enfocándose en el **fallo renal agudo**: *Zhang et al* no observaron un efecto beneficioso comparado con la ciclosporina como monoterapia [290]; Sin embargo, posteriormente otros sí demostraron que el uso de CTM procedentes del donante inducía tolerancia y expansión de Tregs mediante la inducción de la expresión de IDO [237]. Asimismo, *De Martino et al* demostraron también que las CTM alogénicas promovían la recuperación funcional y atenuaban el daño histológico del rechazo agudo (menor infiltración celular) durante los 7 días de seguimiento tanto en modelos singénicos como alogénicos [291].

También existían algunos trabajos acerca de las CTM en **fallo renal crónico**: Así, por ej. en un modelo de nefrectomía casi total, la inyección de CTM alogénicas disminuyó la proteinuria y la fibrosis, cuando se inyectaron iv o a través de la capsula renal [292]; *Caldas et al* vieron que la inyección de MO-CTM en el parénquima renal mostraron un mejor resultado que las propias células mononucleares de la médula ósea en un modelo de fallo renal crónico [293]. En modelos en ratón, algunos demostraron que reducían la fibrosis intersticial, aunque no retrasaban la progresión del daño renal crónico [277]; otros, que contribuían a la regeneración de los podocitos y mejora de la enfermedad renal en el Síndrome de Alport [294].

*Franquesa et al* demuestran la baja inmunogenicidad de las CTM y su claro efecto protector en un modelo en rata de rechazo renal crónico [243]. Les infunden MO-CTM a través de la vena de la cola, en una única dosis, 11 semanas después del trasplante, momento en el que en dicho modelo se observaba una proteinuria creciente. Utilizan células mononucleares de la médula ósea (BMCs), o nada (0,5 ml PBS) como controles, y analizan los resultados a las 12 y 24 semanas del trasplante, tras el sacrificio. No obstante, no consiguen localizar las células inyectadas en el injerto.

Así, tanto las CTM como las BMC preservaron la función renal (niveles de creatinina) a las 24 semanas evitando la proteinuria, frente a los controles, que empeoraban desde la semana 12 en adelante; ambos tratamientos también disminuyeron la vasculopatía y la progresión de la glomerulosclerosis. Sin embargo, sólo en los animales tratados con CTM se evidenció una total preservación de la estructura del parénquima con menor fibrosis intersticial y atrofia tubular, así como una menor infiltración por células T y macrófagos, tanto en la semana 12 como en la 24. La menor fibrosis se explicó por una modulación genética de los genes profibróticos, ya que a partir de



las 13 semanas se vio menos FGF $\beta$  y fibronectina en los animales tratados con CTM. Aunque la fibronectina volvía a ser igual en los tres grupos a las 24 semanas, el FGF $\beta$  se mantenía más bajo en los grupos tratados frente a los controles (también en los grupos con BMC). Además, a las 24 semanas este efecto antifibrótico pudo verse también en la histología convencional y en estudios inmunohistoquímicos, acompañado de una disminución de los niveles de CTGF y de  $\alpha$ SMA, también observado en los tratados con BMC, pero no de forma tan llamativa.

Sin embargo, con respecto a las propiedades regenerativas de las CTM, éstas no pudieron demostrarse al no encontrar diferencias entre los grupos con respecto al Ki67 (marcador de regeneración o proliferación celular), o al HFG (factor de crecimiento de hepatocitos). Sí se vio que los grupos tratados impidieron la sobreexpresión de otros genes relacionados con el daño renal y con la regeneración para superar dicho daño (Kim-1; NGAL, CLusterin, HGF) a diferencia de los controles, tanto en la semana 12 como en la 24, lo que al menos sugiere una prevención y bloqueo del daño por parte de las CTM.

Demostraron también que las CTM eran capaces de modular la respuesta inflamatoria: así, mientras que las BMC aumentaron inmediatamente los niveles de macrófagos (ED1+), el tratamiento con CTM disminuyó los ED1+ y los CD3 persistiendo esta observación a las 24 semanas. Además, los animales tratados con CTM mostraron una reducción de la expresión de genes relacionados con la inflamación y por tanto una menor expresión de citoquinas inflamatorias durante el seguimiento (sobre todo TNF $\alpha$ , IL6, IL23 y IL7R; no así con IL15, IL12p40 o IL4) junto a un efecto a largo plazo de la IL10. También se observó un aumento logarítmico delIDO a las 24 semanas, marcado también en el grupo con BMC, pero mucho más con las CTM. Además, las CTM disminuyeron las respuestas humorales mediadas por DSA tanto I como II, frente a los otros dos grupos, tanto a las 12 como a las 24 semanas. Por último, la terapia celular influyó también en la migración celular, con una menor expresión de CXCL12 y CxCR4 en el parénquima renal a las 12 semanas en los grupos tratados, sugiriendo de nuevo el bloqueo del daño tisular, aunque este efecto no se objetivaba ya a las 24 semanas.

En resumen, se trata de un extenso trabajo que sugiere el papel más bien preventivo que terapéutico de las CTM en el contexto de la nefropatía crónica del injerto, al proteger del daño más que regenerar el tejido lesionado.

*Federica Casirhagi et al* publican también un artículo de gran interés por dos motivos [215]: En primer lugar, desarrolla un modelo murino de rechazo agudo en trasplante renal en un contexto de alta frecuencia de células T de memoria donante específicas pretrasplante, situación que se asemeja

## INTRODUCCIÓN

al escenario del trasplante en la clínica humana, con peores resultados del injerto, comparados con los modelos animales. Así, al ver que tras un trasplante con cepas altamente histoincompatibles, la mayoría desarrollaban rechazo a los 10 días, pero un tercio conseguían vivir hasta 60 días, realizan una sensibilización previa de los receptores infundiéndoles esplenocitos del donante 7 días antes del trasplante, consiguiendo un modelo de rechazo más severo a los 10 días en todos los trasplantes, debido un aumento de células efectoras frente al donante y de DSA y una reducción del ratio Treg/CD4+ o CD8+.

En segundo lugar, son de los primeros en publicar que el momento óptimo de administración de las CTM, para que éstas sean capaces de promover la tolerancia inmunológica, es varios días antes del trasplante, y no post trasplante, demostrando así la importancia del ambiente inflamatorio, y sus argumentos podrían explicar el porqué de muchos intentos fallidos a la hora de su aplicación en la clínica. En realidad, como hemos visto, *Popp et al* lo sugieren en un estudio previo, aunque lo relacionan con el MMF [141].

Para el estudio, emplea MO-CTM singénicas infundidas iv en cuatro momentos: día 2 tras el trasplante, 7 días antes, 1 día antes, y los días -1 y -7 antes del trasplante; y observan más disfunción del injerto prematura en el grupo post-trasplante que en el resto de grupos, incluidos controles, y mejor supervivencia en el grupo de la doble infusión pretrasplante, aunque no de forma significativa. Sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto al desarrollo de rechazo, entre los grupos con y sin CTM, aunque curiosamente, los grupos sensibilizados sí desarrollaron menos rechazo, por lo que no parece que fallo del injerto fuera de tipo humoral.

Este efecto lo atribuye a una distribución diferente de las CTM, ya que las infundidas postrasplante migraron preferentemente al injerto, mientras que las infundidas pretrasplante se localizaron sobre todo en el bazo, y fueron casi indetectables en el injerto. Se encontraron más CTM en el injerto en los trasplantes singénicos que en los ratones no trasplantados, aunque menos que en los trasplantes alogénicos, lo que sugiere que tanto el daño IR como el incipiente insulto inmunológico contribuyeron también a la localización de las CTM en el injerto.

Un grupo de ratones tolerantes (supervivencia de injerto >60 días) se analizó más detenidamente tras el sacrificio para estudiar los mecanismos de aceptación del injerto, y así, se vio que los tratados con CTM y sensibilizados presentaban una menor respuesta de las células T productoras de IFN $\gamma$  contra los antígenos específicos del donante, pero similar frente a antígenos third party; y en aquellos ratones tolerantes a los que se les había dado CTM pretrasplante encontraron también un mayor porcentaje de células CD4+Foxp3+ frente a los CD4 totales, tanto en el bazo como en el injerto (27% de los CD4+ frente al 9%).

Más aun, la transferencia de los Treg del bazo de ratones tratados con CTM en ratones naïve indujo la tolerancia del riñón injertado frente a los no tratados, confirmándose la capacidad de las CTM de inducir tempranamente Tregs funcionales in vivo. Además, al administrar un antiCD25 en 3 ratones adicionales tratados con CTM, estos rechazaron el injerto, sugiriendo un papel primordial de los Treg **CD25+** en la prolongación de la supervivencia del injerto inducida por CTM.

En cuanto al ambiente inflamatorio creado en el contexto del trasplante, este propició la infiltración de injerto por neutrófilos y depósito de complemento, y resultó mayor en el grupo tratado con CTM postrasplante, las cuales probablemente regularon la liberación de citoquinas proinflamatorias, que no fueron diferentes entre los grupos.

En otro modelo de trasplante renal en rata con cepas altamente incompatibles, otro grupo alemán estudia el efecto de las MO-CTM autólogas administradas de forma intravenosa o intraarterial en el momento del trasplante, sin inmunosupresión adicional [295]. Al igual que otros autores [291], observaron efectos beneficiosos de las CTM a corto plazo cuando las sacrificaban a los 3 días (por tanto, beneficioso sobre el daño IR), pero a largo plazo no vieron una mejoría de la supervivencia, pese a disminuir la infiltración de células B y T en el injerto, la inflamación intersticial, y disminuir la expresión de genes inflamatorios especialmente después de la inyección intraarterial. El autor concluye diciendo que, aunque las CTM demostraron una inmunomodulación tras el trasplante, son necesarias nuevas estrategias para elegir el momento óptimo y tratamientos coadyuvantes para explotar mejor así el potencial de las CTM en TOS.

Como estudio preclínico también, aunque más cerca de su implantación en clínica, *Crop et al* realizaron estudios de RLM con sangre procedente de receptores renales antes y después del trasplante, y CTM derivadas del donante, observando su actividad supresora sobre las células T [296].

### **Trasplante hepático:**

Existen también estudios acerca del uso beneficioso de las CTM en modelos de trasplante hepático en rata, pero muchos se han enfocado a sus propiedades regenerativas más que inmunomoduladoras, como ocurre con los modelos de fallo hepático, o de resección o de daño IR. Por ej. en un estudio sobre **fallo hepático agudo**, las ratas se trataron exitosamente con una infusión de CTM, disminuyendo los marcadores bioquímicos de daño hepático y mejorando la tasa de

## INTRODUCCIÓN

supervivencia. La replicación de los hepatocitos aumentó mientras que la apoptosis disminuyó en un 90% [297]. En otro estudio, las CTM también demostraron ser eficientes tratando el fallo hepático fulminante [298]. Sin embargo, se ha sugerido que las CTM podrían ser sólo eficientes dentro de una ventana terapéutica, indicando que dosis altas podrían paradójicamente ser ineficientes o incluso inducir fibrosis hepática [297].

Otros estudios han demostrado un potencial efecto protector y regenerativo de las CTM ante un **daño hepático o una hepatectomía parcial**. Un trabajo reciente en un modelo de trasplante hepático ortotópico reducido al 50% en rata investigó si las CTM inyectadas por vía periférica directamente tras el trasplante podían proteger a los hepatocitos y a los sinusoides y promover su regeneración. Así, vieron que comparado con el grupo control, el grupo con CTM mostró una liberación de marcadores de daño hepático significativamente menor y una mayor supervivencia, además de más proliferación de hepatocitos y células endoteliales sinusoidales y menos apoptosis. Además disminuyeron los niveles de citoquinas inflamatorias y la infiltración por neutrófilos, así como la activación de las células de Kupffer. Por otro lado, aumentó la expresión de VEGF y de MMP-9 en el injerto.

Otros recientemente demostraron que MO-CTM alogénicas inyectadas por vía intraportal en ratas fueron capaces de proteger al hígado del **daño IR** (clampaje durante 60 min) durante las primeras 24 horas tras la reperfusión al comparar la severidad del daño, la respuesta oxidativa al estrés, y la apoptosis en el hígado con un grupo trasplantado sham [299]. Otro modelo en ratones demostró también un efecto protector significativo contra el daño IR al usar Ad-CTM por vía periférica [300]. Sin embargo, se vio en otro modelo de **daño IR en hígado** que las CTM iv tienen una vida media muy corta, que las CTM viables no van más allá de los pulmones, y que permanecen en la circulación muy poco tiempo [203]. Por tanto, de nuevo se sugiere que otras células podrían estar implicadas en las propiedades inmunomoduladoras y regenerativas de las CTM en sus órganos diana.

Acerca del **rechazo**, hay pocos estudios, pero casi todos demuestran algún efecto de las CTM. Así, *Wang Y et al* observaron que MO-CTM inhibían el rechazo agudo asociado a una expansión de células Tregs [217]. Otros demostraron, en un modelo ortotópico de trasplante hepático en rata, una disminución significativa del grado de rechazo agudo al administrar Ad-CTM iv 7 días antes y 3 días después del trasplante, así como durante el mismo por vía intraportal, basándose en marcadores

séricos de rechazo y en la apoptosis de hepatocitos, así como una disminución de los niveles de IL2 y un aumento de la IL10 [301]. En otro estudio, las CTM también demostraron un papel protector de rechazo en un modelo de xenotrasplante hepático [302]. Otro grupo estudió la capacidad de las MO-CTM para inhibir el rechazo agudo tras un trasplante alogénico hepático en ratas. Las CTM se administraron de forma iv en el momento de la cirugía, así como durante los tres días siguientes, una vez al día. Los receptores tratados con CTM sobrevivieron más que los controles, siendo esta diferencia significativa, independientemente de que procedieran del receptor, del donante o de third party. Estas observaciones se acompañaron de un incremento de las Tregs en los receptores que recibieron CTM, sugiriendo un importante papel de estas células en la inmunomodulación mediada por CTM [217].

#### **Trasplante pulmonar:**

Aunque hay menos experiencia, existen estudios que evalúan la utilidad de las CTM en el trasplante pulmonar; por ej. h-CTM fueron capaces de restablecer la capacidad del epitelio alveolar al devolver el líquido alveolar a un nivel normal, sugiriendo que esta terapia puede ser efectiva para acelerar la resolución del edema en pulmones humanos que están algo dañados y se rechazan para donación [303].

#### **Trasplante corneal:**

Existen varias publicaciones acerca del uso de las CTM, concretamente Ad-CTM, en el trasplante corneal, algunas procedentes del Hospital La Paz [304-306]: *Arnalich et al* en 2008 investigan si las Ad-CTM regeneraban el estroma corneal en conejos. En el primer set de experimentos, demostraron la bioseguridad e inmunogenicidad de las mismas, no viendo una respuesta inmune incluso usándolas en animales competentes, y vieron que sobrevivieron unas 10 semanas tras el trasplante. En el segundo set vieron que las células habían regenerado el estroma corneal, al disponerse en varias capas y diferenciarse en queratocitos funcionales [304]. En 2011, *Lopez-Iglesias et al* investigan la capacidad de las Ad-CTM humanas procedentes de third-party de sobrevivir a corto y largo plazo, su biodistribución y su bioseguridad in vivo en ambientes procancerígenos. Para ello, las inyectan subcutáneamente en ratones propensos a realizar tumores. Vieron que no desarrollaron teratomas en ningún momento, tampoco migraron sino que permanecieron en el lugar de la inyección y no se fusionaron con las células del huésped; sobrevivieron in vivo al menos 17 meses tras la inyección, y se diferenciaron en fibroblastos del tejido conectivo subdérmico y en adipocitos maduros [306].

## INTRODUCCIÓN

Sin embargo, *Fuentes-Julian S et al* en 2015, en su modelo de trasplante de cornea en conejo, vio más daño que beneficio con las Ad-CTM, tanto si se inyectaban antes, durante o después de la cirugía, de forma local o sistémica. Así, lejos de prolongar la supervivencia del injerto, aumentaba la inflamación y la neovascularización rompiendo así el privilegio inmune ocular innato [305]. Por tanto, los datos son controvertidos.

Existen más estudios que avalan el papel inmunomodulador y/o regenerativo de las CTM en otros tipos de TOS, como el **trasplante de islotes** [218, 307] [308] [309] o de **tejido compuesto (cara, piernas...)** [310, 311], aunque por ser órganos “sólidos” con características especiales o por tratarse de casos anecdóticos, no nos detendremos en ellos en esta tesis doctoral.

### **Trasplante Intestinal:**

En el momento de la elaboración del proyecto de esta tesis doctoral, no existía ningún artículo que evaluara el efecto de las CTM en el trasplante intestinal, pese a resultar una idea muy atractiva, al ser el intestino uno de los órganos más inmunogénicos y con peores resultados a largo plazo en cuanto a rechazo. En el año 2014 un grupo procedente de China publica sus resultados en un modelo de trasplante intestinal heterotópico en rata, observando un efecto claramente modulador y preventivo del rechazo por parte de las MO-CTM administradas *iv*, y un aumento de la supervivencia [312].

## IV. ENSAYOS CLÍNICOS CON CTM EN TOS

En EEUU, en el año 2011, se estaban realizando más de 3400 **ensayos con terapia celular**, todos ellos utilizando células obtenidas de sujetos adultos. La gran mayoría eran células hematopoyéticas, pero había más de 100 con células no hematopoyéticas. En concreto, con CTM en ese momento había más de 140 ensayos en marcha. La mayoría usaban **células derivadas del estroma** de la médula ósea, ya que utilizaban la infraestructura que los servicios de hematología tienen para el trasplante. Estos datos resultaban más impresionantes sobre todo si se comparaban con 8 años atrás, momento en el que sólo había un ensayo con CTM. La mayoría en 2011 estaban en fases iniciales y ningún grupo había publicado ningún ensayo clínico avanzado (fase III) terminado con éxito, por lo que los resultados eran inciertos [313].

Durante la realización de esta tesis doctoral, estos ensayos se han triplicado habiendo 493 registrados en el año 2015, bien completos o bien iniciados. Sin embargo, sólo 11 de éstos estaban

relacionados con el **trasplante**, por lo que en este terreno aún estamos empezando. Ante los resultados positivos en modelos animales de TOS, y de forma paralela, ante la aparente seguridad y accesibilidad de las CTM en otras patologías, surgen los primeros ensayos clínicos en TOS con CTM en 2011 ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)), y desde entonces se han registrado varios más, aunque el número total en el mundo de estudios sea probablemente mayor. Algunos se han publicado y otros están pendientes. Los ensayos clínicos publicados en trasplante renal y hepático proceden fundamentalmente de Bergamo, Leiden (Holanda), Liege (Bélgica), y de China [127, 150, 159, 313, 314]. En las próximas páginas se resumen los realizados y publicados hasta el momento (algunos resumidos en la Tabla 4).

**Tabla 4:** Ensayos clínicos con CTM y TOS registrados hasta enero de 2017

<b>Autor, fecha</b>	<b>Ensayo clínico</b>	<b>Tipo de TOS</b>	<b>Tipo de ensayo</b>	<b>Grupo</b>	<b>Publicación</b>
<i>Vanikar 2011</i>	No registrado	Renal	-----	India	si
<i>Perico et al 2011. Remuzzi G 2008</i>	NCT00752479	Renal	Fase I	Bergamo	si
<i>Tan J 2012</i>	NCT00659620	Renal	Fase I	China	si
<i>Reinders 2013</i>	NCT00734396	Renal	Fase I	Leiden (Holanda)	si
<i>Peng 2013</i>		Renal	Fase I	China	si
<i>Lee 2013</i>	No registrado	Renal	Fase I	China	si
<i>Popp 2011 Dahlke (Regensburg)</i>	NCT01429038	Renal y hepático	Fase I-II	Liege (Bélgica)	pendiente
<i>Detry O</i>		Hepático	Fase I-II		si
<i>MiSOT</i>	NCT01841632	Hepático	Fase I	MiSOT	pendiente
	NCT01690247	Hepático	Fase I	Beijing	
<i>Popp 2011</i>		Hepático	Fase I	Liege (Bélgica)	Un caso
<i>Estudio Neptuno (Reinders)</i>	NCT02387151	Renal	Fase I	Leiden (Holanda)	si

### 1) Ensayos Clínicos con CTM en EICH

Antes de centrar la búsqueda en el “Rechazo” conviene mencionar estudios pioneros acerca del uso de las CTM para el tratamiento de la “Enfermedad Injerto contra Huésped” (EICH), ya que son

## INTRODUCCIÓN

parte de una misma enfermedad, la “no tolerancia entre el huésped y el injerto”, cada una en un extremo de la balanza. Se debe a que los primeros estudios se centraron en el trasplante de médula ósea, donde el EICH es más frecuente que en el TOS, y se puede aprender de ellos.

El grupo sueco del Hospital Karolinska, es referencia obligada al respecto. En 2004, *Katarina Le Blanc et al*, basándose en evidencias previas en trasplante de piel, trasplantan MO-CTM haploidénticas en un paciente con EICH intestinal y hepático grado IV refractario a tratamiento, obteniendo unos resultados espectaculares, ya que el paciente estaba bien al año, y son los primeros en sugerir que las CTM tienen un potente efecto inmunosupresor in vivo [315]. El mismo grupo amplía el estudio a 9 pacientes con EICH grado III-IV refractario, y uno de ellos crónico y extenso, de los cuales 6 pacientes se trataron una vez y 3 dos veces; 2 recibieron CTM de gemelos HLA idénticos (autólogas), 6 de familiares haploidenticos (alogénicas del donante) y 4 de donantes no relacionados (alogénicas third-party). No observaron complicaciones tras la infusión de las CTM, y el EICH agudo se resolvió en 6 de los 8 pacientes, especialmente el intestinal (6), aunque también el hepático (1) y el cutáneo (1), quienes seguían vivos tras un seguimiento de entre 2 meses y 3 años tras el trasplante, porcentaje significativamente mejor que los controles sin CTM [316]. Como complicaciones, describen una gastroenteritis por CMV, y 2 pacientes fallecieron. Uno de los dos presentaba DNA de las CTM del donante en el colon y en un ganglio. El paciente con EICH crónico mejoró sólo transitoriamente en el hígado, pero no en la piel y falleció por una infección.

Este trabajo aporta varias novedades, como que las CTM humanas pueden suprimir a los linfocitos T aun cuando están lejos, mientras que las CTM de ratón parecen depender más del contacto celular para actuar. También sugiere que las CTM son eficaces incluso aún procedentes de donantes con HLA incompatible. Las respuestas en su trabajo no parecieron estar influidas tampoco por la edad del donante o por el número de pases, aunque la mayoría recibieron CTM expandidas en menos de 30 días. Por tanto, aunque no es un estudio prospectivo randomizado, es útil saber que existe esta terapia alternativa en casos muy graves, y sugiere que se podría contemplar su uso si el paciente no responde a otros tratamientos.

Finalmente, el *European Group for Blood and Marrow Transplantation* publica en el 2008 el primer ensayo clínico doble ciego fase II en pacientes con EICH tras recibir un TPH. Administran las CTM expandidas in vitro entre 2001 y 2007 a 55 pacientes (27 recibieron una dosis, 22 dos dosis, y 6 de tres a cinco dosis). Los donantes fueron gemelos HLA idénticos en 5, familiares haploidenticos en 18 y third party en 69. Tras 5 años de seguimiento, 30 pacientes mostraron una respuesta total y 9 mejoraron. En 3 recidivó la enfermedad y uno desarrolló una leucemia de novo



de origen del receptor. Los respondedores presentaron además menos mortalidad relacionada con el trasplante, y una mayor supervivencia global 2 años tras el TPH. Al igual que en sus estudios previos, la respuesta fue independiente de la compatibilidad HLA y no hubo complicaciones con la infusión [138].

Otros estudios han mostrado resultados similares con diferentes grados de EICH, sugiriendo seriamente el potencial de las CTM en el tratamiento de esta patología. *Lazarus et al* publican en 2005 otro pequeño estudio piloto similar al de Le Blanc con dos pacientes [317]. *Fang Y. et al* publican dos estudios similares en China, en el 2006 y 2007, pero con Ad-CTM, sin problemas con la infusión. En este último, emplea 4 infusiones de Ad-CTM en 6 pacientes con EICH grado III-IV refractarios, a la misma dosis que el grupo del Karolinska. 2 donantes fueron familiares haploidénticos y 4 donantes fueron diferentes. Aunque un paciente requirió repetir el tratamiento, los otros 5 respondieron, y 4 estaban vivos tras un seguimiento de 40 meses (uno de los respondedores presentó una recaída)[318, 319].

En resumen, aunque los estudios preclínicos para prevención o tratamiento de la EICH con CTM dieron lugar a resultados conflictivos, lo cierto es que han demostrado ser eficaces en ensayos clínicos, especialmente en casos refractarios al tratamiento con corticoides [320, 321].

## 2) Ensayos Clínicos con CTM y Rechazo

### Trasplante renal:

Aunque no estaba registrado como ensayo clínico y algunas revisiones no lo nombran, *Vanikar et al* fueron los primeros en describir el uso de Ad-CTM, procedentes del donante, en 100 receptores renales de donante vivo (TRDV) en situación de insuficiencia renal terminal (IRT), como parte de un protocolo no randomizado, viendo que disminuía la respuesta frente al donante [322]. El tratamiento era complejo ya que incluía una transfusión de leucocitos específicos del donante en el día -27 y -25, Rituximab® en el día -18; rATG el día -17, células hematopoyéticas de la médula del donante en el día -16, condicionamiento no mieloablativo con irradiación corporal total 5 días, infusión intraportal de Ad-CTM, células de médula osea cultivadas 10 días y células madre de sangre periférica (con G-CSF para movilización en el donante, en el día -9); metilprednisolona en el día -1, 0 y +1; CNI y prednisona durante el primer trimestre, y posteriormente azatioprina y prednisona. Los controles (otros 100 pacientes) recibieron el mismo tratamiento, pero sin Ad-CTM.

## INTRODUCCIÓN

El grupo con Ad-CTM presentó mejor supervivencia, y unos niveles prolongados de quimerismo usando inmunosupresión a dosis bajas, mayores que los controles, en un período de seguimiento de 18 meses.

Similares resultados se obtuvieron en un estudio posterior del mismo autor también con pacientes de TRDV a mayor escala, donde, además de la triple inmunosupresión convencional, 606 pacientes recibieron CTM frente a 310 controles, observando nuevamente la inducción de la hiporrespuesta con las Ad-CTM. Sin embargo, pese a los resultados prometedores, la limitación fue que no fue randomizado, ya que los pacientes que rechazaron entrar en el protocolo se utilizaron como controles [323].

El primer estudio piloto registrado que publica los resultados de la aplicación clínica de las CTM en TOS es el de **Perico et al** en 2011, del **grupo de Bergamo** [79], demostrando por primera vez la seguridad y la tolerabilidad de la infusión de CTM peritrasplante, concretamente en dos receptores de TRDV.

Utiliza MO-CTM autólogas expandidas exvivo, extraídas 4 meses antes del trasplante, y las administra el día 7 tras el trasplante, tras una terapia de inducción con Basiliximab y Timoglobulina. El tratamiento de mantenimiento fue con ciclosporina, MMF y esteroides (éstos solo 7 días). Tres pacientes más sirvieron como controles.

Darlas el día 7 fue por dos motivos: en primer lugar, existía la posibilidad de lisis de las CTM in vivo al unirse a la Timoglobulina si se infundían en una fase muy temprana del trasplante y de la inducción, como se había descrito por otros autores; en segundo lugar, la administración de CTM al final de la terapia de inducción deplecionante de linfocitos T podría maximizar sus efectos en la expansión de Tregs durante la proliferación homeostática de células T residuales, lo cual se también se había descrito previamente [324].

La infusión de las CTM fue factible, y se vio una buena función del injerto al año en los dos pacientes, aunque ambos desarrollaron insuficiencia renal aguda 7-14 días tras la infusión de las células. El análisis histológico e inmunohistoquímico de las células que infiltraban el injerto descartaron un rechazo agudo celular o humoral; además, ninguno de los dos pacientes desarrolló anticuerpos antiHLA ni de clase I ni II durante todo el seguimiento; en cambio, se vio un reclutamiento de neutrófilos y depósito de complemento C3 dentro del injerto, pese a no verse las CTM.

Ya en este momento, el autor sugiere que el ambiente inflamatorio subclínico del injerto en los primeros días tras el trasplante, pudo haber favorecido el reclutamiento y activación de las CTM en

el injerto, promoviendo un ambiente proinflamatorio con disfunción renal aguda, descrito por otros autores en el trasplante combinado de médula ósea y riñón [325], y este efecto inesperado quizá se podría haber evitado administrando las células antes del trasplante. Estos hallazgos iniciales representaron una mejora del conocimiento para modificar el protocolo clínico, ayudando a crear condiciones favorables para la inmunomodulación promovida por CTM, como se demuestra en sus artículos posteriores [215, 326].

Pese al resultado clínico mediocre obtenido, sí demostraron que las CTM promovieron un ambiente protolerogénico a largo plazo comparado con los controles, caracterizado por una menor ratio de células CD8+ de memoria efectoras, una reducción de la citotoxicidad de las CD8 donante específicas y una expansión de linfocitos Tregs en sangre periférica, pese a que los dos pacientes estaban recibiendo ciclosporina, que impide el desarrollo de Tregs al inhibir la IL2.

Analizando estos resultados en el tiempo, vieron que tras la profunda depleción de CD4 y CD8 secundaria a la Timoglobulina, los CD8 se recuperaron a los 180 y 360 días del trasplante, pero los CD4 continuaron siendo más bajos que los niveles normales, tanto en los pacientes con CTM como en los que no. Sin embargo, pese a la proliferación homeostática anticipada de las subpoblaciones de células T restantes, se vio una disminución llamativa a partir del día 7 del porcentaje CD8 de memoria, frente a los CD8 totales en los dos pacientes con CTM, permaneciendo más bajo que los niveles pretrasplante durante el año de seguimiento, a diferencia de los controles, donde este porcentaje aumentó con el tiempo. Con respecto al porcentaje de Tregs frente a los CD4 totales, éste disminuyó llamativamente durante los primeros 30 días en todos los pacientes, pero después subió más en los tratados con CTM, alcanzando los niveles pretrasplante el día 30, frente a los días 180 y 360 que tardaron los controles.

En cuanto a los ensayos inmunológicos *ex vivo* post trasplante, observaron que la frecuencia de CD8 de memoria contra el donante productoras de IFN y productoras de granzime-B no alcanzaron los niveles pretrasplante en los dos pacientes tratados con CTM, siendo este cambio de perfil menos llamativo en los controles, sugiriendo esta reducción de su actividad que las CTM podrían aportar algo más desde el punto de vista terapéutico que la simple inmunosupresión en el escenario del trasplante. Por otro lado, la función citolítica de las CD8 tras el trasplante se vio más suprimida frente a los antígenos del donante que frente a los third party en ambos pacientes tratados con CTM, a diferencia de los controles donde estas respuestas no cambiaron apenas frente a los niveles pretrasplante. Esta experiencia clínica inicial con CTM en el TRDV sugiere que las CTM son

## INTRODUCCIÓN

capaces de controlar la proliferación de las CD8 efectoras de memoria y la función citolítica de las CD8 específicas contra el donante a largo plazo, independientemente de si la infusión fue pre o posttrasplante.

En el año 2013, inspirado en los resultados previos, el **mismo autor** publica un nuevo estudio para evaluar el efecto del momento de administración de las CTM (misma dosis, procedencia, vía de administración) en dos receptores adicionales de TRDV, esta vez en el día previo al trasplante, antes de comenzar con la terapia de inducción con timoglobulina y compara los resultados con controles históricos [326]. Además, retiran el Basiliximab (antiCD25) para evitar cualquier posible efecto deletéreo sobre las Tregs [327] usando sólo como inducción la timoglobulina.

En el primer paciente, el tratamiento con CTM fue sin incidencias y la función del injerto permaneció normal durante un año de seguimiento. En el segundo, se produjo un rechazo celular agudo a las dos semanas del trasplante, que se resolvió con bolos de esteroides, y se explicó por una alta histoincompatibilidad en el HLA unida a la terapia de inducción sólo con timoglobulina a bajas dosis sin basiliximab en este paciente, a diferencia del primero. Por tanto, aunque basado sólo en los hallazgos de un único paciente, estos resultados avalan una vez más la capacidad de las CTM autólogas para controlar la respuesta inmune inmediata tras el trasplante en un ambiente de alta alorreactividad.

De nuevo en este trabajo, en ambos pacientes tratados con CTM, disminuyó la proporción de CD8 de memoria/CD8 totales, así como el recuento de CD8 de memoria en sangre periférica, incluso en ausencia de Basiliximab, comparado con los controles, donde aumentaron progresivamente hasta alcanzar niveles muy altos un año después del trasplante. Además, la proporción entre Tregs y CD8 de memoria aumentó en los tratados con CTM, sugiriendo un desvío de la respuesta inmune del huésped hacia la regulación.

Estos resultados en trasplante renal, concuerdan con algunos ensayos clínicos que usan las CTM para tratar el EICH [328, 329]. En concreto, en un estudio controlado randomizado con infusión de CTM third party tras un TMO, la ratio Tregs/células Th17 efectoras fue mayor en los tratados con CTM que en los controles. Además, los niveles en suero de IL4 e IFN $\gamma$ , consideradas prototipo de Th1 y Th2, respectivamente, indicaron un desvío hacia una respuesta Th2 en los pacientes tratados con CTM, sugiriendo el desarrollo de un ambiente inmune protolerogénico.

Pese a la pequeña muestra y a no ser randomizados, los dos estudios pilotos de *Perico et al* confirmaron la seguridad y proporcionaron observaciones mecánicas prometedoras tras la infusión

de las CTM en pacientes con TOS inmunosuprimidos. Además, remarcaron el valor añadido de las propiedades inmunomoduladoras de las MO-CTM sobre las células T efectoras de memoria persistentemente inhibidas en el contexto del trasplante, un efecto que no tienen los inmunosupresores actuales.

En 2012, *Tan et al*, del **grupo del Instituto Fuzhou, en China**, publicaron el primer ensayo clínico a gran escala prospectivo randomizado, realizado entre 2008 y 2009, con 159 receptores de TRDV con el objeto de comparar el perfil riesgo/beneficio de la infusión de CTM frente a una terapia de inducción con Basiliximab (antiCD25) en la **prevención del rechazo agudo** [330]. Al igual que el grupo de Bergamo, emplean MO-CTM autólogas, aunque las administran en el momento de la reperusión renal y dos semanas después ( $1-2 \times 10^6/\text{kg}$ ). Todos los pacientes recibieron MMF y corticoides de mantenimiento. Los controles recibieron Basiliximab y CNI a dosis estándar ( $n=51$ ). En los dos brazos experimentales, el Basiliximab se sustituyó por la infusión de CTM con CNI a dosis estándar ( $n=52$ ) o a dosis reducida solo el 80% ( $n=52$ ) con el fin de prevenir toxicidad del órgano.

El uso de CTM presentó menor incidencia de rechazo agudo a los 6 meses post-trasplante comparado con el grupo en el que se utilizó Basiliximab como terapia de inducción. Además, disminuyó el riesgo de infecciones oportunistas, y mejoró la función renal estimada al año. También aceleró la recuperación de la función del injerto renal en el primer mes del trasplante, sugiriendo un posible efecto en el fenómeno de IR, factor de riesgo reconocido para fallo del injerto y rechazo agudo. Así, los investigadores concluyeron que las CTM podían reemplazar la inducción con Basiliximab, permitiendo el uso de CNI a menos dosis de lo convencional como terapia de mantenimiento sin comprometer la seguridad del paciente ni los resultados del injerto.

Cuando Perico et al. contrastan sus resultados con los de esta gran cohorte de pacientes en 2013, que con CTM únicas como inducción no rechazan, observa que la compatibilidad HLA fue de media mas baja que la del paciente de su estudio que desarrolló el rechazo, lo que sugiere que, en situaciones de mayor incompatibilidad, una adecuada terapia de inducción como podría ser el basiliximab, podría favorecer el desarrollo de una función inmunomoduladora de las CTM en el periodo inmediato posttrasplante, disminuyendo el riesgo de rechazo agudo.

Hasta este artículo, la tasa de supervivencia similar con la reducción de CNIs de mantenimiento en TRDV sólo se había descrito en receptores que habían recibido un trasplante de células de médula

## INTRODUCCIÓN

ósea específicas del donante [331], o con el uso de antiCD52 en ausencia de terapia celular, aunque esta última terapia aumentaba la tasa de infecciones oportunistas [332]. La secreción de moléculas inmunomoduladoras y antimicrobianas por parte de las CTM pudo contribuir, según los autores, al menos en parte, a la menor tasa de infecciones oportunistas en los pacientes que recibieron CTM con menores dosis de CNI.

Sin embargo, la menor tasa de rechazo agudo y la mejoría de la función renal a los 6 meses no se confirmó al año en este estudio, lo que ha provocado críticas [333]. Por otro lado, no aportan ningún dato en profundidad sobre los efectos in vivo de las CTM en el sistema inmune del huésped, en particular de las funciones de las células T efectoras y Tregs mediante tests inmunológicos, lo cual parece necesario antes de sugerir la aplicación clínica de una terapia celular innovadora tan incipiente en programas de trasplante.

Otro ensayo clínico es el publicado por **Reinders et al** del **grupo de Leiden** en 2013 (registrado en 2010) [314]. Utilizan también MO-CTM autólogas ( $1-2 \times 10^6$  /Kg) iv en 6 receptores de TRDV con diferente HLA-DR, pero en este caso las plantean para **tratar episodios de rechazo agudo** y fibrosis intersticial y atrofia tubular (rechazo agudo subclínico). La inmunosupresión de estos pacientes consistió en Basiliximab, CNI, MMF y esteroides, con profilaxis antiviral durante 3 meses. Recibieron CTM aquellos que desarrollaron un rechazo agudo o un aumento de la fibrosis o de la atrofia tubular en la biopsia de rutina a los 6 meses del trasplante, comparado con la biopsia de rutina realizada en la 4ª semana, sin modificar la inmunosupresión.

En dos pacientes se resolvió la tubulitis (rechazo celular subclínico) en la siguiente biopsia tras las CTM. Las respuestas de proliferación de leucocitos específicas frente al donante in vitro fueron más reducidas 12 semanas después de la infusión en 5 de 6 pacientes. Sin embargo, 3 pacientes desarrollaron una infección oportunista viral, dos por CMV y uno por virus BK, sugiriendo que las CTM podrían inducir una excesiva inmunosupresión, a diferencia de lo publicado por *Tan et al* [330].

Se trata del primer estudio con datos sobre la aplicabilidad, seguridad y eficacia de las CTM como tratamiento del rechazo agudo, y abre las puertas a un posible uso clínico de enorme potencial, aunque hacen falta más estudios con más casos y controles concomitantes que puedan reproducir estos efectos positivos de las CTM en las biopsias, así como definir mejor la relación entre las CTM y las infecciones oportunistas.

En 2015, el mismo grupo ha diseñado un nuevo ensayo clínico (fase Ib), conocido como “**Estudio Neptuno**”, donde quieren evaluar las MO-CTM alogénicas, en lugar de autólogas, en 10 receptores de un trasplante renal (dos dosis de  $1.5 \times 10^6$ /kg, en las semanas 25 y 26 tras el trasplante), con el objetivo de evaluar la seguridad, comparar el grado de fibrosis, el desarrollo de anticuerpos antiHLA de novo, función renal y funciones oportunistas. Sus resultados aún no se han publicado [334].

Otro estudio registrado del **Instituto Fuzhou**, es el publicado por **Peng et al** en 2013, donde evalúan el efecto de las CTM sobre la **prevención del rechazo crónico** en el trasplante renal. Así, investigan la eficacia y seguridad de las CTM para reducir la dosis de Tacrolimus o incluso retirarlo a largo plazo y mejorar los resultados del trasplante [47].

Se trata de un estudio piloto, prospectivo, no randomizado, realizado entre 2009 y 2011 en un hospital de China con 12 receptores de un TRDV, 6 con CTM y 6 controles. Utiliza MO-CTM, pero esta vez del donante, y las administra en dos dosis, una de forma intrarterial en la arteria renal durante el trasplante (dos minutos tras la reperfusión,  $5 \times 10^6$  diluidos en suero) y otra intravenosa ( $2 \times 10^6$  /kg) al mes del trasplante. Todos recibieron la misma terapia de inducción con citoxan y metilprednisolona, y de mantenimiento con Tacrolimus a partir del cuarto día, MMF y prednisona, pero el grupo con CTM recibió menos dosis de Tacrolimus, sólo dosis alternas. No se detectaron problemas con la infusión ni intraarterial ni iv.

Durante los 12 meses de seguimiento tras el trasplante, los receptores fueron monitorizados clínicamente y analíticamente, y se observó menor incidencia de rechazo, menores niveles de Tacrolimus en sangre y el mismo nivel de creatinina, aunque la supervivencia fue del 100% en ambos grupos. Por tanto, desde un punto de vista clínico, el estudio sugiere que las CTM derivadas de la donante en combinación con Tacrolimus a dosis bajas tienen el mismo efecto para prevenir el rechazo agudo que el Tacrolimus sólo a dosis estándar.

Sin embargo, en los estudios linfocitarios de sangre periférica, no se observaron diferencias en la proporción de células T totales periféricas, ni CD4, CD8 o NK. Se vio un leve cambio en las proporciones de Tregs, pero sin diferencias significativas. Sólo se vieron diferencias con respecto a las células B (CD19+), que aumentaron a los 3 meses del trasplante en el grupo con CTM de forma significativa, para luego disminuir, a diferencia del grupo control donde fueron disminuyendo progresivamente desde el trasplante. En cuanto a las CD27+ o células B de memoria también aumentaron a los 3 meses para luego disminuir a los 6 y aumentar finalmente al año, siendo mayor

## INTRODUCCIÓN

la proporción al año del trasplante que en el momento del mismo, frente al grupo control, donde fueron disminuyendo progresivamente.

Respecto a las citoquinas pro/antiinflamatorias, sus variaciones tampoco fueron significativas: en el tercer mes, el IFN $\gamma$  aumentó en el grupo con CTM frente al control donde disminuyó, para disminuir en ambos grupos a los 6 y a los 12 meses, a niveles inferiores incluso que los del pretrasplante. Con el TNF $\alpha$ , ocurrió algo similar, subiendo a los 3 meses para luego disminuir progresivamente a los 6 y a los 12 meses, frente al grupo control donde primero disminuyó y posteriormente se incrementó. Los niveles de IL4 fueron aumentando en ambos grupos y los de IL10 aumentaron a los 6 meses, pero luego disminuyeron a los 12 meses.

En cuanto a la RLM, la proliferación de los leucocitos del receptor frente a los del donante aumentó al tercer mes del trasplante, disminuyó levemente a los seis meses y aumentó de nuevo al año, siendo algo mayor en los pacientes con CTM, aunque no de forma significativa. De hecho, es conocido que los leucocitos del donante pueden detectarse en el receptor muchos años tras el TOS, con un injerto que sobrevive a largo plazo, y esto ayuda a decidir la reducción o supresión de la inmunosupresión [335]; sin embargo, en este estudio el quimerismo resultó indetectable, por lo que las CTM no contribuyeron al microquimerismo.

En resumen, estos hallazgos no permiten extraer ninguna conclusión sobre la posibilidad y la eficacia de las CTM derivadas del donante en un ambiente alogénico, al menos en el contexto del trasplante renal.

También en **2013**, **Lee et al** publican otro ensayo clínico que no estaba registrado, en 7 receptores de TRDV HLA incompatibles [336]. En él, se administraron MO-CTM del donante ( $1 \times 10^6$ /kg), esta vez de forma intraósea en el hueso ilíaco del receptor, el día del trasplante, sin incidencias. Todos recibieron además una inducción con rATG fraccionada (8-10 días a 1.5 mg/Kg/día) y mantenimiento con CNI, MMF y esteroides. Entre sus resultados, 3 pacientes presentaron rechazo agudo confirmado por biopsia, aunque se controló bien con bolos de esteroides; 2 pacientes más presentaron cambios histológicos sin signos clínicos del rechazo y sin precisar tratamiento. Un paciente recibió Ig iv y plasmaféresis por rechazo agudo humoral el día 9 del trasplante. Sólo en 2 pacientes se observó una reducción de los linfocitos específicos del donante, y de la proliferación de células T inducidas por mitógenos, aunque nunca se llegó a detectar quimerismo. Aunque el estudio apoya la factibilidad de la administración intraósea de las CTM, una vez más se necesitan más estudios.



En **2015**, **Mudrabetu et al** publicaron otro estudio piloto demostrando la seguridad y eficacia de las CTM autólogas en pacientes con TRDV [337]. Se trataba de 4 pacientes que recibieron una inducción con ATG a dosis bajas y mantenimiento con triple terapia basada en CNIs. Se les administró CTM autólogas de forma iv antes del trasplante y al mes del mismo. El seguimiento fue de 6 meses. Desde el punto de vista clínico, no hubo complicaciones relacionadas con la infusión de las CTM. Ningún paciente desarrolló rechazo clínico con excelente función del injerto, ni subclínico en las biopsias de rutina al mes y a los 3 meses. Desde el punto de vista analítico, se observó un aumento de las Tregs y una menor proliferación de las CD4, frente a los niveles basales, en diferentes momentos del seguimiento. Estos hallazgos corroboran lo descrito hasta el momento, aunque siguen faltando ensayos clínicos mayores para poder confirmar el rol inmunomodulador de las CTM y valorar la reducción de algún fármaco inmunosupresor.

#### **Trasplante hepático:**

Pese a la evidencia en trasplante renal, hay muy poca experiencia con las CTM en el trasplante hepático [122]. Aunque podrían ser una alternativa al trasplante en el fallo hepático, o una solución temporal manteniendo las condiciones hepáticas mientras los pacientes esperan a un trasplante hepático, las CTM sólo se han probado en muy pocos ensayos clínicos para tratar cirrosis, y con resultados contradictorios: En un ensayo fase I-II, pacientes con cirrosis se trataron con una infusión de CTM autólogas vía periférica y vía portal. El tratamiento fue bien tolerado, sin efectos secundarios importantes y la función hepática mejoró significativamente [338]. Sin embargo, en otro ensayo randomizado controlado con placebo usando CTM para el tratamiento de cirrosis descompensada (15 tratados con CTM y 12 placebos), no se vio un efecto beneficioso tras la infusión de MO-CTM autólogas, a efectos de MELD, Child-Pugh score, o tests de función y volumetría hepática.

Mas enfocado en el **rechazo**, existían 3 ensayos en marcha, alguno de los cuales ya ha finalizado: El primero es el del **grupo de Liege**, quienes publicaron en el 2011 el diseño de un primer estudio prospectivo fase I-II para explorar la seguridad y tolerabilidad de infusiones de CTM third party tras un trasplante hepático o renal [339]. El artículo es interesante al proporcionar una guía de aplicación clínica de las CTM en el TOS. Recientemente se han publicado parte de los resultados en los 10 pacientes trasplantados de hígado, a quienes se les infundió las CTM iv ( $1.5-3.0 \times 10^6/\text{kg}$ ) en el día postoperatorio  $3 \pm 2$ , además de su tratamiento inmunosupresor estándar (Tacrolimus, MMF y esteroides), y se compararon con controles, sin CTM [340]. Tras un seguimiento de 12 meses

## INTRODUCCIÓN

concluyen la ausencia de toxicidad y de complicaciones como neoplasias e infecciones. Sin embargo, no ven diferencias en la tasa de rechazo ni en la biopsia a los 6 meses del trasplante con respecto a los controles. Tampoco ven diferencias en las citoquinas en sangre ni en las poblaciones linfocitarias periféricas. Tampoco consiguen disminuir la inmunosupresión gracias a la terapia celular. Por tanto, no pueden demostrar que promuevan la tolerancia en el TOS. Los resultados de este ensayo en los 10 pacientes trasplantados renales, no se han publicado por el momento

El segundo ensayo se inició en el 2013, a raíz de un encuentro internacional del **grupo MiSOT-I** (Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation) con el fin de estudiar la seguridad de la infusión de MultiStem®, producto derivado de las MAPCs, tras un trasplante hepático. En el diseño, los pacientes se dividían en 4 cohortes, e iban a recibir dos dosis, la primera intraportal en el momento del trasplante, la segunda en el día 3 postoperatorio, además de la inmunosupresión (que, en este caso, era sin CNI, sólo Basiliximab, MMF y esteroides). Desde la cohorte 1 hasta la 4, se irían dando progresivamente más dosis (3-6 pacientes por grupo). Inicialmente se iba a estudiar la seguridad, acerca de la infusión y de la toxicidad aguda, intraportal, pulmonar o sistémica, y posteriormente la incidencia de rechazo, transformación maligna o crecimiento tumoral, y la seguridad a largo plazo con un seguimiento de hasta 6 años. Los resultados finales se esperaban para el 2016. Sin embargo, hasta la fecha sólo se ha publicado el primer caso del estudio, en un paciente receptor de un trasplante hepático de donante vivo, que corrobora que la infusión fue técnicamente factible y sin toxicidad asociada [341].

El tercero y último es un **ensayo fase I**, randomizado, aun pendiente de publicación, que incluirá un total de 50 pacientes, asignados en dos grupos: en el primero, los pacientes recibirán inmunosupresión convencional más CTM derivadas de cordón umbilical el día del trasplante y después una vez cada 4 semanas durante 12 semanas ( $1 \times 10^6$  /kg); al segundo grupo, en similares condiciones, se les administrará un placebo en lugar de las CTM. Tras un seguimiento de 48 semanas, se evaluará la incidencia de rechazo agudo y recuperación precoz de la función hepática tras el trasplante, así como la supervivencia del injerto y el paciente, y de forma secundaria, la prevalencia de efectos adversos.

En **trasplante pulmonar** se está analizando actualmente la seguridad de las infusiones de CTM ( $2 \times 10^6$  /Kg) procedentes de donantes relacionados o no, HLA idénticos o no, para el manejo de la

bronquiolitis obliterante en pacientes trasplantados de pulmón. En el 2011 era un estudio en fase I, aunque no se ha publicado todavía.

*Como resumen de las páginas anteriores, en 2012 el grupo MiSOT compartió la experiencia obtenida con los primeros ensayos clínicos realizados en CTM en TOS y nuevos estudios experimentales y preclínicos, y posteriormente se han realizado otras revisiones [342]: Los resultados animan a continuar pero hace falta un mejor entendimiento antes de que las CTM puedan ser ampliamente aplicadas a los pacientes. Ensayos bien diseñados, más grandes, randomizados y controlados, con objetivos claramente definidos, controles adecuados, y extensa monitorización inmune son la clave del éxito para que la terapia con CTM avance.*

En **trasplante intestinal** no se ha registrado ningún ensayo clínico hasta la fecha. Sólo existe un artículo de un grupo de Turquía, en el que administraron MO-CTM autólogas ( $1 \times 10^6/\text{kg}$ ) a 6 receptores de un TI, dos de ellos eran niños. Las administraron por la arteria en el momento de la reperusión y en los días 15 y 30 tras el trasplante, a través de un catéter arterial. La inducción se realizó además con Timoglobulina y corticoides y el mantenimiento con Tacrolimus y Sirolimus. Tras un seguimiento medio de 10 meses, 4 de ellos desarrollaron rechazo agudo (3 graves y uno leve), uno de ellos refractario a corticoides, y 3 pacientes por distintos motivos fallecieron. Los otros tres (los dos niños) se encontraban bien al final del estudio. Este estudio no puede concluir que las CTM hayan mejorado los resultados, y además no se registró como ensayo clínico [343]. El grupo de Birmingham también las han utilizado para el tratamiento de EICH refractario (datos no publicados).

De forma paralela a su uso en trasplante, otro grupo emplea MO-CTM autólogas como terapia de rescate en un paciente de 61 años con enteropatía autoinmune del adulto (2 infusiones iv de  $1 \times 10^6/\text{kg}$  separadas entre ellas dos semanas), observando una mejoría clínica aunque transitoria en las dos inyecciones, con un aumento de las células Tregs y de inmunoglobulinas secretadas en la mucosa, sugiriendo que se pueden plantear en casos con EAI corticorresistente y que pueden disminuir aunque de forma transitoria el insulto autoinmune [344].

En este punto, merece la pena mencionar algunos artículos pioneros del grupo de Garcia Olmo, inicialmente en el Hospital La Paz, y posteriormente en la Fundación Jimenez Diaz, que utiliza Ad-CTM para el tratamiento de enfermedades digestivas, como las fístulas intestinales en pacientes con

## *INTRODUCCIÓN*

Enfermedad de Crohn [313, 345-348]. Aunque se escapa del objeto de esta tesis, el desarrollo de la terapia celular por este grupo en nuestro centro, mediante el uso de Ad-CTM, es en parte responsable de este proyecto, y probablemente de otros muchos en las distintas especialidades médicoquirúrgicas, al partir de un laboratorio capaz de producir estas células.

### 3. TRASPLANTE INTESTINAL EXPERIMENTAL Y RECHAZO/TOLERANCIA

De la misma forma que se ha hecho con nuevos inmunosupresores y protocolos inductores de tolerancia, a la hora de **plantear las CTM como opción terapéutica** en el **Trasplante Intestinal**, es necesario demostrar su seguridad y su eficacia en **modelos animales de experimentación**.

Previo a la redacción de esta tesis, publicamos una revisión extensa de la literatura científica acerca del TI experimental, concretamente en rata, y de los modelos de rechazo descritos en las últimas décadas, argumentando las discrepancias entre los grupos [349]. En el artículo se discuten múltiples aspectos a tener en cuenta como el tipo de cepa, la dosis de inmunosupresión, el modelo de trasplante.... que van a tener relevancia a la hora de trasladar los resultados a la clínica.

Revisar toda la literatura referente al TI experimental sería interminable y el objetivo de otra tesis. Este apartado sólo se limita a mencionar algunas aportaciones relevantes en el campo del TI y el rechazo, así como algunos intentos de buscar la tolerancia mediante tratamiento de la rata receptora.

El artículo de *Tanabe et al* del grupo de Pittsburgh en 1994 es de referencia obligada, puesto que habla de la influencia de las combinaciones de las cepas donante y receptora en la creación de respuestas inmunes [350]. Realiza un estudio comparativo en TI ortotópico con drenaje portocava, entre Lewis (Lew), Brown-Norway (BN), Piebald Viro Glaxo (PVG) y August Copenhagen Irish (ACI). Observa que sin inmunosupresión no hay diferencias en cuanto a la muerte por rechazo, que ocurre entre los 5 y los 14 días, y que el tratamiento con TAC prolongó en general la supervivencia. Las receptoras BN sobrevivieron menos que el resto de cepas independientemente de quien fuera la donante; sin embargo, murieron antes si la donante era LEW o PVG (fallecían por EICH entre los días 32 y 42), que si eran ACI (morían por rechazo tras una media de 91 días). Curiosamente, la aparición de EICH no ocurría cuando se usaban otras cepas con TAC como receptoras, lo cual resulta muy interesante para futuros estudios dentro de nuestra línea de investigación. La supervivencia de las Lewis también dependió de la cepa donante: así, rechazaron antes los injertos de ACI (media 133 días), que los de BN o PVG, con los que sobrevivieron más de 150 días, aunque no todas. Sin embargo, todas las receptoras ACI y PVG vivieron más de 150 días excepto 3 que fallecieron por causas obstructivas.

*Orloff et al* en 1999 establece un modelo de rechazo crónico, heterotópico, usando un ciclo corto de CsA a bajas dosis con las cepas Fisher 344 y Lewis y describe muy bien las características

## INTRODUCCIÓN

histopatológicas del rechazo, incluido el agudo en los controles sacrificados precozmente entre el día 9 y 14. El mismo grupo publica en el 2000 un artículo muy interesante que demuestra con el mismo modelo que la **tolerancia inducida por el quimerismo tras un trasplante de médula ósea (TMO) del donante** previene la esclerosis vascular del rechazo crónico, pero sólo cuando se usan células del donante para el TMO. Así, las receptoras tratadas previamente con un TMO singénico, o con un TMO alogénico third party, o alogénico del donante pero fallido, rechazaron al igual que los controles, mientras que las tratadas con un TMO alogénico del donante que prendió formando quimeras, no rechazaron, viendo un quimerismo al final del estudio. Estos resultados, sin embargo, son de difícil aplicación clínica en el donante cadáver, que es el habitual en el TI, puesto que sería necesario infundirle células de la MO del donante días antes del trasplante. En ese sentido, las CTM se plantean en esta tesis como una alternativa, al ser unas células “inmunoprivilegiadas”, que no necesiten ser del donante para conseguir una quimera [351, 352].

Otros intentos por el año 2000 de inducción de tolerancia en el TI, disminuyendo la incidencia tanto de EICH como de rechazo proceden de Pittsburgh [353]. Ya se había observado que los **linfocitos pasajeros** en el intestino tenían un perfil de linaje que predisponía al EICH en algunos modelos animales y menor capacidad tolerogénica que los de otros órganos, como el hígado o la médula ósea. De hecho, la eliminación ex vivo de estos linfocitos maduros mediante irradiación de los injertos intestinales, se había visto previamente que reducía el riesgo de EICH, aunque no de rechazo. *Murase et al*, basados en este fundamento, estudian si la **infusión de células de la MO (BMC) del donante en receptores con intestino irradiado** podría mejorar la tolerancia sin aumentar el riesgo de EICH. Para ello, desarrolla un modelo de EICH refractario en TI ortotópico (Lew-BN), con un ciclo corto de Tacrolimus, irradia los injertos ex vivo, y en los grupos seleccionados infunde BMC del donante el día del trasplante. Las dosis de irradiación se ajustaron para eliminar o reducir los linfocitos maduros sin destruir las células epiteliales ni las hematopoyéticas. Como resultado, todos los animales con el intestino no irradiado murieron de EICH tras dos meses del trasplante con independencia de las BMC. Sin embargo, aquellos con intestinos irradiados no desarrollaron EICH pero sí rechazo crónico en todos, lo cual se pudo prevenir con la infusión de BMCs (supervivencia media alrededor de 90 días).

En el mismo trabajo, desarrolla también un modelo de rechazo crónico al realizar los trasplantes en la dirección opuesta (BN-Lew), consiguiendo una supervivencia del 100% de más de 150 días. Sin embargo, aquellos con irradiación sólo presentaron rechazo crónico, los que no se irradiaron rechazo moderado y los que se irradiaron y recibieron BMC, presentaron rechazo leve. La arteritis

moderada que se veía a los 150 días del trasplante en ambas combinaciones de cepas pudo deberse a la irradiación, pero esto se pudo prevenir manteniendo el Tacrolimus hasta el sacrificio. Concluyen que la combinación de radiación del injerto con BMCs del donante pudo prevenir tanto el rechazo como la EICH, siendo esta una prueba más de que la tolerancia era posible, sin necesidad de una depleción absoluta de linfocitos [353]. Sin embargo, esto de nuevo resulta de difícil aplicación clínica.

En el año 2003, el mismo grupo investiga si dicho rechazo crónico, que aparecía tras un tratamiento de Tacrolimus durante 28 días, se asocia a la cantidad o calidad de los linfocitos pasajeros contenidos en el intestino donante en el momento del trasplante por la subsiguiente migración o persistencia de estos leucocitos pasajeros a las receptoras. Así, establece cuatro grupos donde ratas Lewis reciben 1) un intestino inalterado; 2) un intestino procedente de un donante deplecionado de linfocitos, 3) un intestino deplecionado, pero asociado a BMCs procedentes de un donante BN naïve 4) un intestino inalterado con BMCs de un donante naïve. Así, observan que el quimerismo en sangre durante las primeras dos semanas fue más bajo en los injertos deplecionados probablemente por la casi completa eliminación de los leucocitos pasajeros del donante. Desde las dos semanas hasta los 5 meses, aquellos que recibieron BMC del donante presentaban más de un 2% de las células del donante circulantes y no desarrollaron rechazo crónico. En cambio, los grupos que no recibieron BMC presentaron menos niveles de quimerismo, y rechazo crónico moderado, aunque mantuvieron la misma ganancia de peso hasta el día 150 que aquellos sin rechazo (grupos con BMC). Al estudiar mejor el quimerismo se vio que aunque la mayoría de las células del donante en los tejidos linfoides asociados al intestino se reemplazaban rápidamente, las residuales del donante eran mucho más en los grupos con BMC a los 150 días del trasplante. Así, concluyen diciendo que la disminución en el tiempo del quimerismo en receptores parcialmente tolerantes se asocia al rechazo intestinal crónico. Y este quimerismo se consigue mejor infundiendo **BMCs del donante** que con los leucocitos pasajeros normales del intestino. La diferencia podría explicarse porque hay un mayor número de precursores y CTM pluripotentes entre las BMCs. Esta aportación resulta muy interesante, ya que se trata de sugerencia muy precoz sobre el uso de las CTM en la inducción de la tolerancia [354].

En el año 2004, un grupo de Japón explora la posibilidad de inducir tolerancia mediante el **uso de CD inmaduras** (derivadas de la médula ósea) **específicas del donante** en un modelo de TI en rata, observando un aumento de la supervivencia del injerto, lo cual plantea una estrategia muy atractiva

## INTRODUCCIÓN

con potencial terapéutico para prevenir el rechazo del injerto. Sin embargo, estos intentos no trascienden a la clínica.

Con respecto al desarrollo de **modelos de rechazo en trasplante intestinal**, encontramos varios artículos en la literatura. Entre los más recientes, *Li et al* en 2013 comparan el Tacrolimus con la Ciclosporina para el desarrollo de un modelo de rechazo crónico tras TI ortotópico en rata, usando las mismas cepas que Orloff et al. Observa que ambas opciones son válidas, aunque el TAC aumentó la supervivencia y mostró más características clásicas de rechazo crónico que la CsA. Este artículo aporta además la dosis más idónea de TAC (la más alta de las que evalúa), consiguiendo una patología similar a la que se observa en clínica [355].

*Hu et al*, en 2012, consigue también un buen modelo de rechazo crónico, esta vez tras un TI heterópico con cepas BN-Lewis y utilizando 1 mg/Kg/día de Tacrolimus durante 5 días; adicionalmente describe también el rechazo agudo al sacrificar a los controles a los 7 y 14 días del trasplante, encontrando rechazo leve el día 7 y rechazo agudo intenso en el día 14, lo que discrepa con otros grupos [349].

Este trabajo es doblemente interesante ya que demuestra que la infusión de BMCs del donante via intraportal en el momento del trasplante produce chimerismo mixto y desvía el balance Th1/Th2 hacia el Th2, facilitando así la inducción de la tolerancia inmune [49]. Para ello establecen 3 grupos: uno sin tratamiento, otro con Tacrolimus, y el tercer grupo con Tacrolimus y BMC, observando una mayor supervivencia en este grupo, con mayor ganancia de peso, daños histológicos más leves y menor grado de rechazo. Además, este grupo no hizo un pico tan elevado de IL2, acentuándose esta diferencia en los días 30 y 60 del trasplante, mientras que la IL10 se mantuvo elevada a diferencia de los otros. El ratio IL2/IL10, representativo del Th1/Th2, también decreció en ambos grupos con Tacrolimus, aunque sólo se mantuvo bajo en el grupo con BMCs. Este grupo también mostró una mayor la tasa de quimerismo, encontrando las células del donante preferentemente en los sinusoides hepáticos y esplénicos y en la submucosa intestinal.

Existen otros aspectos interesantes de este trabajo: así, desde el punto de vista clínico, el autor sugiere la monitorización de IL2, IL10 y su ratio como novedad para incluirlo en el protocolo de diagnóstico de rechazo en IT, dada la escasez de biomarcadores séricos. Desde el punto de vista de la metodología, aporta también la idea de utilizar cepas de distinto sexo para poder realizar estudios de quimerismo mediante ensayos de PCR del gen SRY. Como puntos discutibles, llama la atención



que los resultados son demasiado espectaculares y que no se mueren los controles a causa del rechazo agudo.

*En resumen, la mayoría de los artículos referentes al trasplante intestinal experimental y a la búsqueda de la tolerancia inmunológica, demuestran los beneficios de las células derivadas del donante para inducir un quimerismo, y disminuir el riesgo de rechazo. Desgraciadamente, al tratarse de una donación cadavérica y no poder disponer de estas células previo al trasplante, estos intentos han fallado en llevarse a la clínica. Llegados a este punto, y tras revisar la experiencia in vitro e in vivo con las CTM, tanto autólogas como alogénicas, estas podrían ser una alternativa más sencilla a largo plazo.*

Una vez situados en el escenario clínico y experimental del trasplante intestinal y en concreto del rechazo, se deduce la falta de integración de los conocimientos inmunológicos, lo que se traduce en unos resultados mediocres a largo plazo. La preocupación por estos pacientes, muchos de los cuales fallecen por estos problemas, hace que esta tesis resulte de interés; la interrelación entre la clínica y la investigación experimental, es, en mi criterio, parte de la originalidad y riqueza del trabajo, ya que, por extraño que pueda parecer, no existen apenas grupos internacionales donde combinen ambas bien áreas, y correlacionen resultados. Y esta situación es probablemente la responsable de que no se avance más rápido. Concretamente, en esta tesis doctoral, se pretende estudiar el efecto inmunomodulador de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un modelo de rechazo agudo tras un trasplante intestinal en rata, con el fin de evaluar tras los resultados la proximidad real de esta terapia a la traslación clínica.



# OBJETIVOS

---



### 3. OBJETIVOS

---

#### 1. GENERALES

Estudiar el papel inmunomodulador de las células troncales mesenquimales de origen adiposo (Ad-CTM) en la prevención del rechazo agudo en un modelo experimental de TI, ya que esta función inmunomoduladora se ha descrito ampliamente en la literatura, tanto in vitro como in vivo, como hemos visto, pero apenas en el ámbito del TI, paradigma del conflicto inmunológico en el TOS.

#### 2. ESPECÍFICOS

- Objetivo preliminar (antes del estudio del papel de las CTM): Descripción de un modelo experimental de rechazo agudo en un TI alogénico en rata, y estudio de los mecanismos del rechazo.
- Estudio histológico del injerto intestinal con y sin CTM en busca de signos de rechazo.
- Estudio de las diferencias en cuanto a subpoblaciones del sistema inmune procedentes del receptor en el intestino injertado de los grupos con y sin CTM.
- Determinar la producción de citoquinas por las células inmunes del receptor. Estudiar diferencias entre los grupos con y sin CTM.
- Búsqueda de otros posibles mediadores del efecto inmunomodulador de las CTM.
- Análisis de la influencia de la inmunosupresión recibida (Tacrolimus) sobre el papel de las CTM una vez administradas.
- Análisis de la supervivencia a corto plazo de las ratas tratadas o no con CTM. En caso de demostrarse un papel preventivo y/o terapéutico del rechazo por parte de las CTM, estudios posteriores consistirían en analizar dicho rol a largo plazo.



# HIPÓTESIS

---





## **4. HIPÓTESIS**

---

### **1. CONCEPTUALES**

A nivel experimental:

1. La administración de CTM previene el rechazo agudo (RA) en ratas receptoras de un Trasplante intestinal Alogénico (TIA).
2. El tratamiento con CTM combate el RA y/o potencia la acción del Tacrolimus para combatir el RA en ratas receptoras de TIA.
3. El tratamiento con CTM reduce la mortalidad por RA en ratas receptoras de TIA.

A nivel clínico, en el caso de demostrarse, las hipótesis experimentales, y de acuerdo con lo descrito en la literatura:

- 1- La administración de CTM podría jugar un papel inmunomodulador previniendo el RA en pacientes que reciben un TOS, y en concreto, un TI.
- 2- La administración de CTM podría jugar un papel inmunomodulador potenciando la acción del Tacrolimus para tratar el rechazo agudo en pacientes que reciben un TI, permitiendo disminuir su dosis y por tanto sus efectos secundarios.
- 3- Su obtención podría proceder del panículo adiposo de pacientes que están esperando un TI, o incluso de pacientes ajenos a ellos, para minimizar mecanismos inmunológicos adicionales.

## **2. OPERATIVAS**

A nivel experimental:

- 1- Los signos histológicos de RA en el injerto intestinal durante las biopsias de control tras el trasplante serán negativos o menos llamativos en aquellas ratas receptoras de TIA que han recibido CTM frente a aquellas no tratadas, tanto si han recibido tratamiento inmunosupresor como si no.
- 2- La migración de linfocitos T del receptor al injerto intestinal se reducirá en animales tratados con CTM, observando una mayor proporción de linfocitos reguladores y menor de linfocitos efectores, fomentando así el fenómeno de “tolerancia”.
- 3- La liberación local así como su expresión en plasma de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias se invertirá en el intestino injertado en aquellos grupos que hayan recibido CTM, a favor de un ambiente más tolerogénico.

A nivel clínico, en el caso de demostrarse, las hipótesis experimentales y de acuerdo con lo descrito en la literatura:

- 1- Los signos histológicos de RA en el injerto intestinal durante las biopsias de control tras el trasplante serían negativos o menos llamativos en aquellos pacientes que reciben un TI y que han recibido CTM tanto si han recibido tratamiento inmunosupresor como si no.
- 2- Las subpoblaciones linfocitarias y otras células del sistema inmune se modificarían en los pacientes con un trasplante intestinal tras la administración de CTM, hacia un perfil de linfocitos T del receptor más regulador y menos efector, fomentando así el fenómeno de “tolerancia”. La proliferación del resto de células inmunes se vería inhibida, de acuerdo con lo descrito en la literatura.
- 3- La liberación local así como su expresión en plasma de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias estaría invertida en aquellos pacientes trasplantados que hayan recibido CTM, a favor de un ambiente más tolerogénico.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS: ESTUDIO DEL PAPEL INMUNOMODULADOR DE LAS AD-CTM EN LA PREVENCIÓN DEL RECHAZO AGUDO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE TI

---

### 1. DISEÑO EXPERIMENTAL; PLAN DE TRABAJO

Se definen tres etapas:

- En primer lugar, y como estudio preliminar, la *descripción de un modelo experimental de TIA en rata*. Se describe la curva de aprendizaje, así como los pasos, recomendaciones y guías de actuación para obtener una muestra homogénea de tamaño aceptable y una alta tasa de supervivencia.
- En segundo lugar y también como estudio preliminar, se describe el *desarrollo de un modelo de rechazo agudo en un TIA en rata*. Pese a no ser el principal objetivo de la tesis, es importante definir bien este modelo para poder reproducirlo de forma fiable en futuros estudios relacionados con el rechazo, tanto si participan CTM como si no.
- Por último y como objetivo principal de la tesis, se *estudia el rol inmunomodulador de las CTM en la prevención del rechazo agudo en el modelo* descrito en las fases previas.

### 2. ANIMALES. CUIDADOS PREOPERATORIOS

Se compraron 360 ratas macho de estirpe consanguínea, de peso comprendido entre 250 y 300 gramos procedentes de los laboratorios Janvier (Francia): 180 de la cepa Brown Norway (BN) que mayoritariamente usamos como donantes y 180 Lewis (o inicialmente Wistar) que usamos como receptoras. Los roedores llegaron entre 4 y 6 días previos a los procedimientos, fueron alojados en jaulas individuales en las instalaciones del animalario en el Edificio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz, a una temperatura de  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ , y una humedad relativa de  $45\pm 15\%$ , y mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas; fueron alimentados con pienso comercial (Safe A04, Panlab) y agua ad libitum. Las ratas donantes se dejaron en ayunas durante las 12 horas previas a la cirugía. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los principios de la Ley Federal RD 56/2013 que trata sobre la protección de los animales.

### **3. TÉCNICA MICROQUIRÚRGICA DEL TI**

Se realizó un trasplante intestinal alotópico (TIA) mediante técnicas estándar de microcirugía, como previamente hemos descrito en publicaciones previas [356]. Se utilizó el microscopio WILD Typ 384000 (Heerbrugg Switzerland) a 10, 25 y 40 aumentos. Durante la primera etapa, en plena curva de aprendizaje, se diseñó un modelo de trasplante ortotópico, pasando posteriormente a un modelo heterotópico al observar una mayor tasa de éxito en términos de supervivencia a largo plazo y permitir estudiar también el rechazo. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de Bienestar Animal (CEBA) del Hospital Universitario La Paz.

#### **I. ANESTESIA**

La anestesia fue inhalada con sevoflurano al 5% durante la inducción y la laparotomía, y al 2% de mantenimiento el resto de la intervención. Se utilizaron mantas térmicas tanto para la donante como para la receptora.

#### **II. OPERACIÓN DEL DONANTE**

Se perfundieron un total de 5ml de suero salino fisiológico (SF) subcutáneo al comienzo de la intervención. Mediante procedimiento limpio pero no estéril, se realizó una laparotomía media con manipulación intestinal, evisceración de asas, y desrotación de las mismas. Se seccionó el intestino delgado a 3 cm del ángulo de Treitz. El extremo terminal se seccionó a 3 cm de la válvula ileocecal. A continuación se preparó un pedículo de la arteria mesentérica superior incluyendo un parche de aorta y de la porta inmediatamente por debajo de la vena pilórica. Para esta disección se utilizó la pinza bipolar, seccionando todas las ramas vasculares arteriales y venosas necesarias. Previa administración intravenosa de heparina y clampaje un minuto después de la aorta infradiafragmática, la aorta se canuló a nivel infrarrenal con un abbocath (24Fr) y se perfundió el injerto con Ringer Lactato (RL), hasta ver que el efluente por la vena porta seccionada era claro. El injerto se enfrió con hielo tal y como se hace en el trasplante de órgano sólido en humanos. La luz intestinal se lavó también con RL y fue conservado en la nevera a 4° C en la misma solución hasta su implante en el receptor 30-45 minutos después.

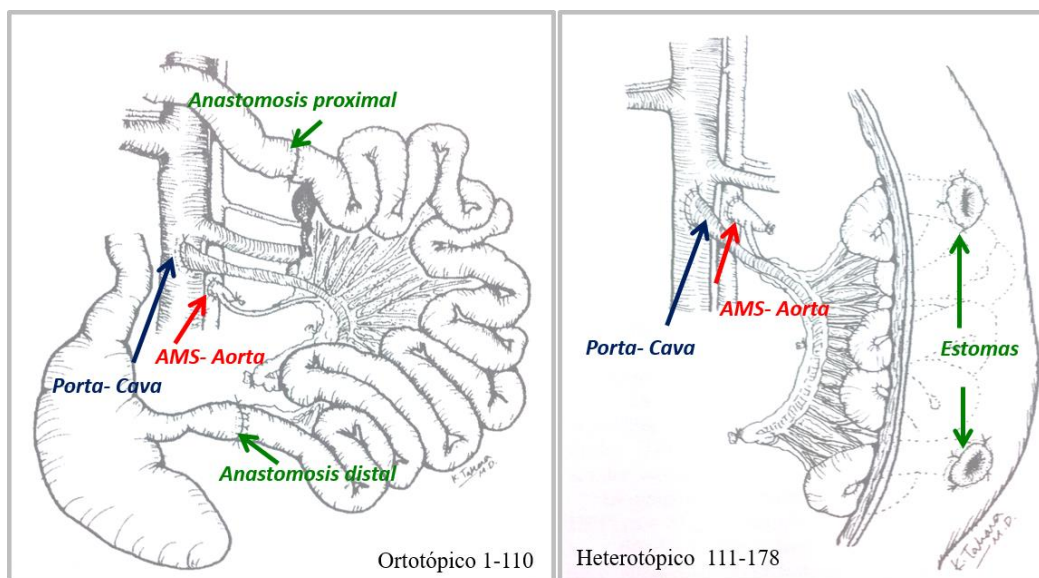
#### **III. OPERACIÓN DEL RECEPTOR (TRASPLANTE INTESTINAL)**

Se canalizó la vena de la cola extrayendo 1 ml de sangre para estudio de citoquinas como control pre trasplante, y se dejó la vena canalizada para la perfusión de SF durante la intervención en el

caso de que fuera necesario. Esto resultó útil en los primeros trasplantes durante la curva de aprendizaje para mantener vivo al animal, ya que el sangrado era importante y su control difícil, especialmente tras el desclampaje. Una vez superada esta fase, el sangrado pasó a ser mínimo y fácilmente controlable mediante presión suave sobre la anastomosis con una torunda, y bastó simplemente con inyectar 5ml de SF subcutáneo al comienzo de la intervención para mantener al animal hidratado, minimizando así también los riesgos de embolia o edema pulmonar. Se realizó una laparotomía media, algo más limitada que la del donante, y tras movilizar la vena cava y la aorta, liberándolas del tejido conjuntivo adyacente, se restableció el flujo venoso anastomosando la porta del donante a la cava inferior del receptor por debajo de las venas renales y después el flujo arterial mediante anastomosis aorto-aórtica; ambas anastomosis fueron latero-terminales, y realizadas con técnicas microquirúrgicas con suturas continuas absorbibles (Dafilon® 9/0). Una vez bien perfundido el injerto se comprobó la ausencia de un sangrado significativo.

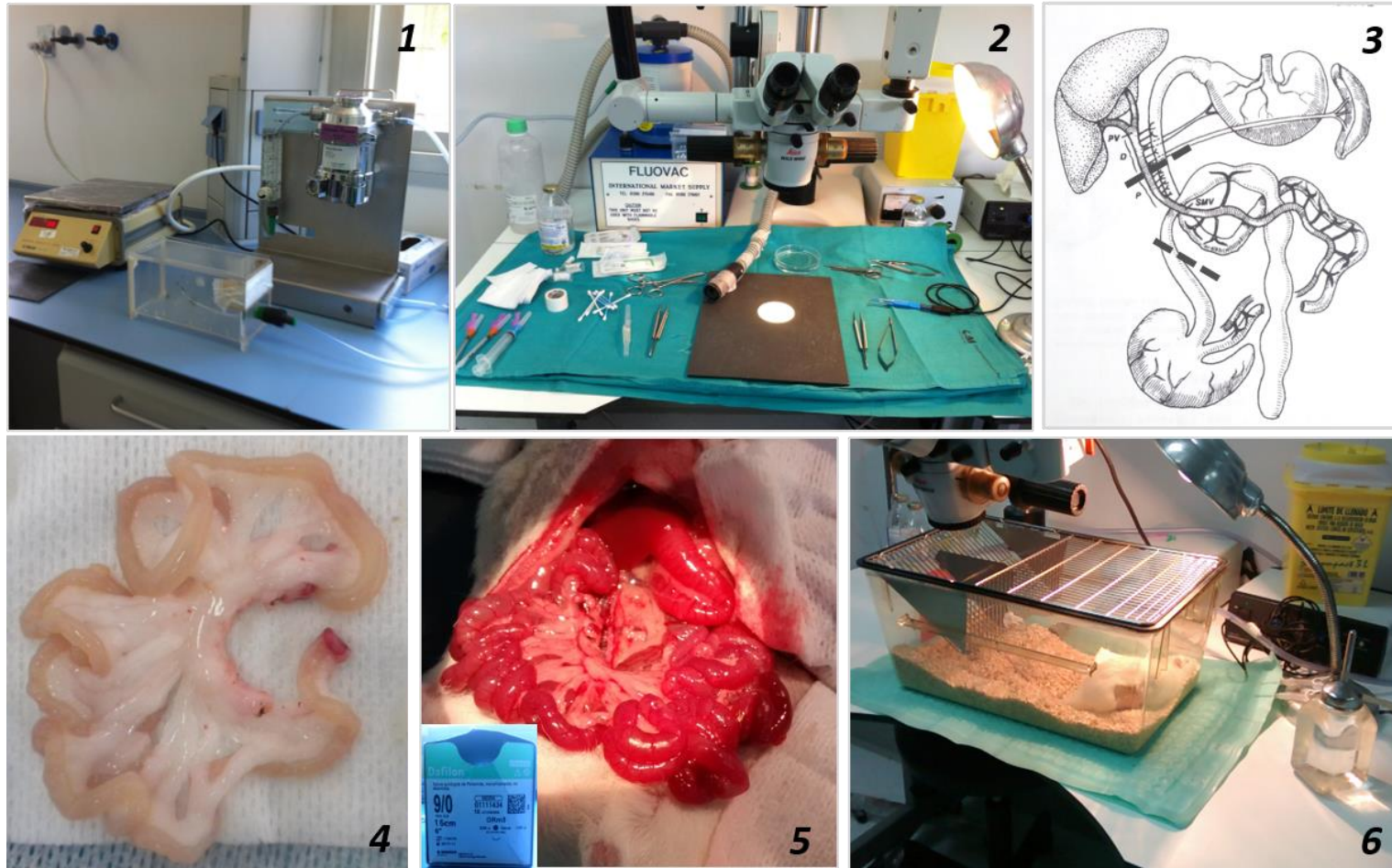
En los trasplantes ortotópicos, en el receptor se extirpó la totalidad del intestino delgado dejando unos 5 cm de yeyuno y 5 cm de ileon terminal. Tras restablecer el flujo sanguíneo soltando los clamps se anastomosaron ambos extremos proximal y distal del intestino trasplantado con los correspondientes del receptor, con puntos sueltos (Prolene® 7/0).

En el trasplante heterotópico, el intestino nativo no se extirpó; tras restablecer el flujo sanguíneo y comprobar hemostasia se ostomizaron los dos extremos del injerto, en la pared abdominal derecha (Prolene® 7/0) (Figura 11 y Figura 12). Por último, el cierre de la pared abdominal se realizó en dos planos de sutura continua de 3/0 (Vicryl® 3/0).



**Figura 11:** Esquema de las técnicas ortotópica y heterotópica en el TIA

## MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura 12:** Imágenes representativas del procedimiento quirúrgico del TIA: 1. Anestesia; 2. Preparación del campo quirúrgico; 3. Esquema de la anatomía de la rata donante; 4. Injerto perfundido con RL, antes del implante; 5. Intestino reperfundido de buen aspecto tras el desclampaje; 6. Recuperación del animal en el postoperatorio.



#### 4. GRUPOS EXPERIMENTALES

- 1) En la **primera fase del estudio**, no se realizaron grupos experimentales, sino que se trató de superar la curva de aprendizaje. Algunos cambios que se fueron realizando con el objetivo de mejorar la supervivencia quedan registrados en la siguiente tabla (Tabla 5) y los motivos del cambio se explican a continuación.

**Tabla 5:** Tipos de trasplante y cepas utilizadas a lo largo del estudio, dividido en etapas.

Etapa*	Numero TI	Tipo TI	Tipo Cepa	Observaciones
1	1-53	Ortotópico	Alogénico: Wistar-BN	
2	54-65	Ortotópico	Alogénico: BN-Wistar	
3	66-110	Ortotópico	Alogénico: BN-Lewis	
4	94-95-96-97	Ortotópico	Singénico:BN-BN; Lew-Lew	
5	111-135	Heterotópico	Alogénico: BN-Lewis	TAC SI/NO, diferente momento de sacrificio
6	136-178	Heterotópico	Alogénico: BN-Lewis	TAC SI/NO, sacrificio en el día 14; CTM/placebo

**\*Motivos para cambiar de etapa:**

1. Inicialmente se utilizaron ratas de cepa Wistar basadas en la experiencia de nuestro centro [357].
2. Aunque la alta tasa de mortalidad estaba en probable relación con la técnica quirúrgica, observamos que las Brown Norway eran más vulnerables a las agresiones y de menor peso que las Wistar a igual edad, por lo que decidimos utilizar la BN como donante y Wistar como receptora.
3. Finalmente, y de acuerdo con lo descrito en la literatura internacional, optamos por sustituir la cepa Wistar por Lewis, ya que el modelo de rechazo estaba descrito por algunos grupos como Pittsburgh con esta combinación. Como ya hemos comentado, cuando se realiza el trasplante de Lewis a BN, es decir, de forma inversa, se produce un EICH.
4. En una etapa en la que conseguíamos supervivencia sólo de 3 ó 4 días, decidimos realizar varios singénicos para descartar que la mortalidad no se debiera a un rechazo precoz con esta combinación, aunque ninguno sobrevivió a largo plazo tampoco.
5. Finalmente, cambiamos al modelo heterotópico, observando un giro radical en nuestros resultados, pasando a ser la supervivencia a largo plazo la norma, pudiendo **definir el modelo de rechazo.**
6. Definido el rechazo, pudimos comenzar a administrar **CTM para estudiar su rol inmunomodulador**, lo cual era el objetivo inicial del estudio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- 2) En la **segunda fase del estudio**, todos los trasplantes incluidos se habían realizado en las etapas 5 y 6 de la curva de aprendizaje (desde 111 hasta el 178); por tanto, todos fueron homogéneos en cuanto a:
- Duración del procedimiento y despertar: una vez alcanzada la curva de aprendizaje, todos los trasplantes tenían una duración muy similar, así como el sangrado, y la recuperación.
  - Tipo de trasplante: todos realizados según el modelo heterotópico, con los cuidados postoperatorios apropiados para este modelo.
  - Cepa utilizada: en todos, la donante fue Brown-Norway y la receptora Lewis.

Etapa	Numero Tx	Tipo Tx	Tipo Cepa	Observaciones
5	111-135	Heterotópico	Alogénico: BN-Lewis	TAC SI/NO, diferente momento de sacrificio
6	136-178	Heterotópico	Alogénico: BN-Lewis	TAC SI/NO, sacrificio en el día 14; CTM/placebo

Los criterios de inclusión para pertenecer a la segunda fase (“Desarrollo de un modelo de rechazo”) fueron que sobrevivieran más de 6 días, y que no llevaran CTM

Los receptores se dividieron en 5 grupos experimentales, en función del protocolo de inmunosupresión utilizado y el día del sacrificio (n total de 26):

**Tabla 6:** Descripción de los grupos de “Desarrollo de un modelo de rechazo”

GRUPOS	TACROLIMUS 0.5 mg/Kg/día s.c.	DIA DE SACRIFICIO (TRAS EL TI)	N
<b>TIA Control_7</b>	No	7°	7
<b>TIA Control_14</b>	No	14°	6
<b>TIA TAC_7</b>	Diario	7°	3
<b>TIA TAC_14</b>	Diario	14°	6
<b>TIA TAC5_14</b>	Los 5 primeros días tras el TI	14°	4

Los dos primeros grupos permitieron establecer el modelo de rechazo agudo en diferentes momentos después del trasplante y analizar los mecanismos implicados en el mismo. Los tres últimos permitieron estudiar los efectos del Tacrolimus en el mismo.

En cuanto al día del sacrificio, inicialmente se decidió el 7° día postoperatorio puesto que algunos grupos describen que es el momento en el que la rata desarrolla un rechazo agudo grave. En nuestra experiencia y tras sacrificarlas entonces, observamos un rechazo agudo indeterminado o leve, por lo que basándonos en los hallazgos descritos por *Hu et al* [49] y en nuestra propia experiencia decidimos sacrificarlas en el día 14, momento en el que sí observamos un rechazo agudo grave [349].

3) En la **tercera fase del estudio**, o “Estudio del Rol Inmunomodulador de las CTM en la prevención del rechazo agudo” en el modelo descrito, todos los trasplantes se habían desarrollado en la etapa 5 y 6 de la curva de aprendizaje.

Los receptores se dividieron en 5 grupos experimentales, en función si recibieron CTM o no y de si recibieron Tacrolimus o no (n total de 38):

**Tabla 7:** Descripción de los grupos de “Estudio de las CTM en la prevención del rechazo”

GRUPOS	TACROLIMUS 0.5 mg/Kg/día s.c.	DÍA DE SACRIFICIO (TRAS EL TI)	CTM	N
<b>TIA TAC_14</b>	Diario	14°	NO	6
<b>TIA Control_14</b>	No	14°	NO	6
<b>TIA TAC5_14</b>	Los 5 primeros días tras el TI	14°	NO	4
<b>TIA Control_14 + AD-CTM</b>	Diario	14°	SI	11
<b>TIA TAC5_14 + AD-CTM</b>	Los 5 primeros días tras el TI	14°	SI	11

A su vez, cada uno de los grupos que recibieron CTM procedentes de tejido adiposo se subdividieron en dos brazos de estudio, con el fin de estudiar si influía la procedencia de origen de las CTM extraídas de tejido adiposo; un grupo de células se aislaron y cultivaron de una cepa diferente a la donante y a la receptora (third party, Sprague), y un grupo de células se aislaron de la

## MATERIAL Y MÉTODOS

misma cepa que la receptora (Lewis). Esta distinción se realizó en un intento de trasladar en un futuro esta terapia a la clínica, ya que una posibilidad podría ser aislar CTM “autólogos”, esto es, procedentes de los propios receptores que se encuentran en lista de espera para un TI, frente a otra posibilidad que sería utilizar CTM “alógenicas”, ya sean de un receptor desconocido (third.party, como ocurriría en el caso de utilizar preparados comerciales), o del propio donante (esta opción no se contempló en la investigación porque tratándose de un donante cadáver, no hay tiempo real para usarlas en la clínica).

**Tabla 8:** Subdivisión de los grupos tratados con CTM en función de su procedencia (Alogénicas y Autólogas)

GRUPOS	TACROLIMUS 0.5 mg/Kg/día s.c.	DIA DE SACRIFICIO (TRAS EL TI)	CTM	N
<b>TIA Control_14 + AD-CTM</b>	Diario	14°	De cepa Sprague (Alogénico)	6
<b>TIA Control_14 + AD-CTM</b>	Diario	14°	De cepa Lewis (Autólogo)	5
<b>TIA TAC5_14 + AD-CTM</b>	Los 5 primeros días tras el TI	14°	De cepa Sprague (Alogénico)	5
<b>TIA TAC5_14 + AD-CTM</b>	Los 5 primeros días tras el TI	14°	De cepa Lewis (Autólogo)	6

## 5. CUIDADOS POSTOPERATORIOS. PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN

Tras la operación, los animales fueron reanimados, calentados con mantas térmicas y repuestos en sus jaulas. Durante la intervención se les administró Tramadol (adolonta®) 25 mg/kg vía subcutánea para disminuir el dolor postoperatorio y en los días sucesivos si fuese necesario. Se les ofreció agua “ad libitum” inmediatamente y alimentos desde 24 horas después. Se mantuvieron controlados en jaulas individuales. Las ratas supervivientes fueron observadas y pesadas diariamente, prestando especial atención a la apariencia, postura, alimentación, presencia de deposiciones....El rechazo del injerto se diagnosticó clínicamente al palpar un abdomen indurado y/o observar el aspecto de los estomas.

En aquellos animales que perdieron peso significativamente debido a la escasa ingesta durante los primeros días postoperatorios, se sustituyó el agua por un suero glucosado 5% hasta que

comenzaron a ganar peso. Asimismo, se les administró a todos Ceftriaxona 75 mg/Kg/día (diluida en SF) y 3-5 ml extra de SF subcutáneo diario para prevenir la infección y mantener la hidratación. El Tacrolimus (TAC) (Astellas Pharma S.A. España) 0.5 mg/Kg/día (solución diluida también en SF) también se administró diariamente en aquellos casos en los que estuviese indicado. En aquellos animales con mal estado general, mostrando signos de fallo del injerto en las primeras 48 horas (postura antiálgica, malestar general, anorexia, etc.) o antes del día previsto, el sacrificio se realizó en ese momento, anotando todas las observaciones.

## **6. RECOGIDA DE DATOS**

### **I. PRIMERA FASE: DESCRIPCIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE TRASPLANTE INTESTINAL ALOGÉNICO (TIA) EN RATA. CURVA DE APRENDIZAJE**

Con el objetivo de describir la puesta a punto así como la curva de aprendizaje, se midió la supervivencia de los animales tras el procedimiento, a las 24 horas del mismo y en el momento del sacrificio.

Todos los datos referentes a los 178 trasplantes se recogieron en una base de datos llamada “Base de datos Curva de Aprendizaje”: peso del donante y del receptor, cirugía del donante, del receptor, tipo de trasplante, administración o no de TAC, administración o no de CTM, vía de administración, duración de las anastomosis, duración de la isquemia fría y caliente, complicaciones intra y postoperatorias, incidencias anestésicas, recuperación tras el procedimiento y supervivencia, así como datos evolutivos en las ratas supervivientes hasta el día del sacrificio (por ej. peso diario, bienestar, efectos adversos de los fármacos...).

Todos los problemas y dificultades surgidos a lo largo del estudio en relación al procedimiento, así como a los cuidados pre y postoperatorios se describen y discuten en los resultados, así como las modificaciones y estrategias utilizadas en cada momento para solucionarlos.

### **II. SEGUNDA FASE: DESARROLLO DE UN MODELO DE RECHAZO AGUDO EN UN TIA EN RATA. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DEL RECHAZO**

Una vez conseguida una alta tasa de supervivencia, tras modificar todos los detalles mencionados a lo largo de la curva de aprendizaje, se pudo crear una nueva base de datos llamada “Base de datos Rechazo”, incluyendo sólo a los 26 trasplantes, con supervivencia mayor de 6 días y realizados mediante técnica heterotópica, a los que no se les administró CTM. Al administrar estas células de una forma ciega, los placebos se incluyeron como controles en esta base de datos que, por tanto,

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

sólo se pudo completar al final del estudio. Además de los datos anteriores, se recogieron todos los datos histológicos obtenidos de las muestras.

### **III. TERCERA FASE: ESTUDIO DEL PAPEL INMUNOMODULADOR DE LAS CTM EN LA PREVENCIÓN DEL RECHAZO AGUDO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE TIA EN RATA**

Una vez superada la curva de aprendizaje, y en proceso de desarrollar el modelo de rechazo agudo, y superada la morbilidad asociada a la administración de la CTM, éstas se administraron en 22 trasplantes. Se realizó de forma ciega, se forma que un investigador diferente al cirujano entregaba una jeringa con 1 ml de RL como placebo o de CTM diluidas en RL, durante el implante. Una vez finalizado el estudio, se incluyeron en una base de datos llamada “Base de datos Estudio CTM”, donde se incluyeron aquellos trasplantes heterotópicos con placebo o con CTM sacrificados en el día 14 postoperatorio (los placebos se incluyeron retrospectivamente como controles en la “Base de datos Rechazo”. Además de los datos anteriores (datos relativos al trasplante y al postoperatorio, así como datos histológicos del injerto), se estudiaron también las citoquinas plasmáticas antes y después del trasplante, así como las subpoblaciones celulares inmunes, con el fin de analizar la influencia de las CTM sobre las mismas.

## **7. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (AD-CTM)**

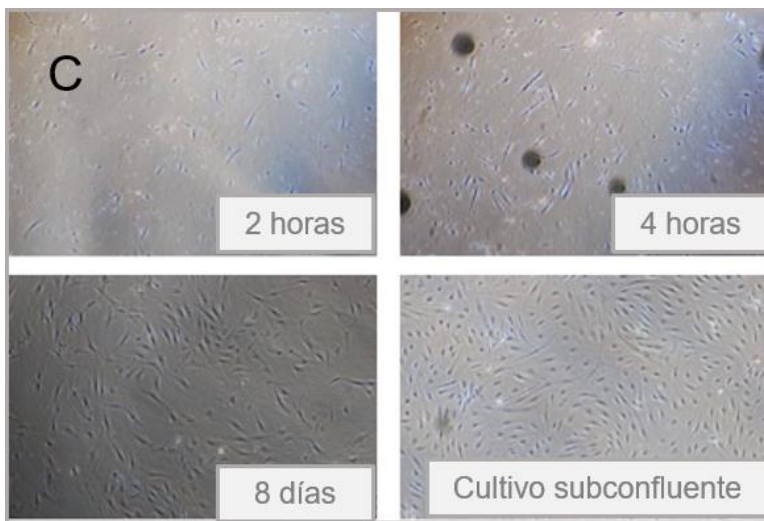
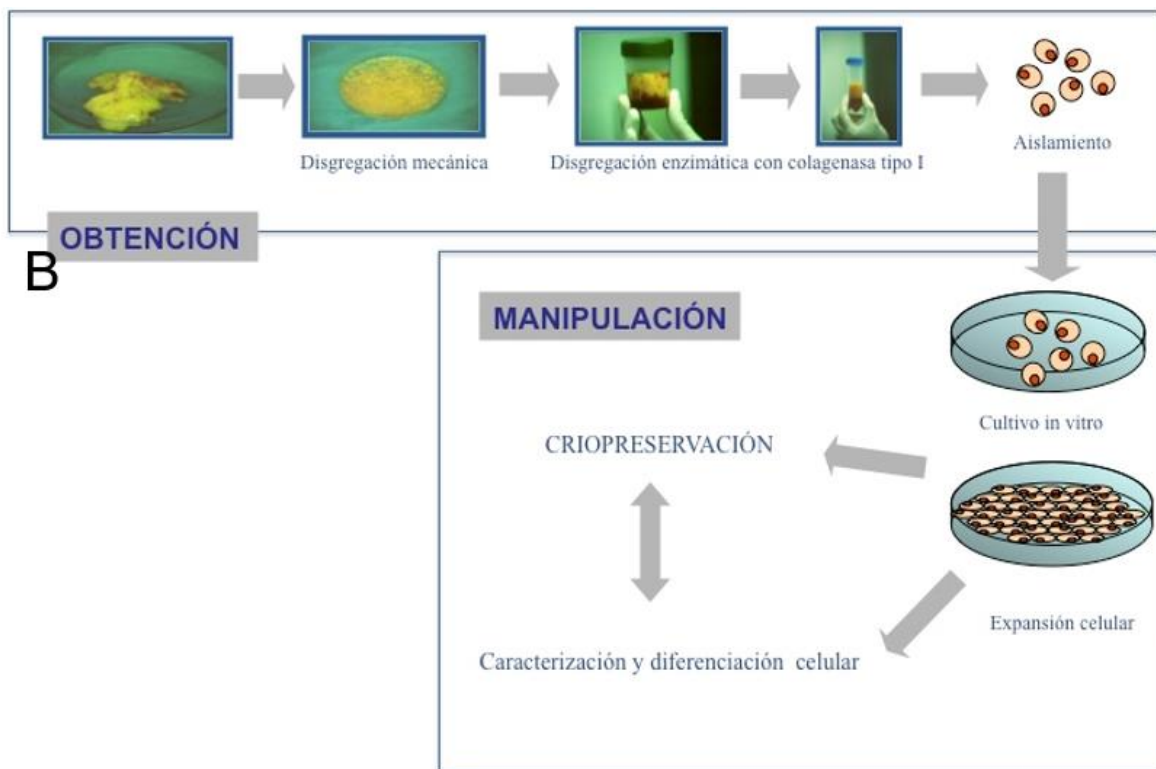
### **I. AISLAMIENTO Y CULTIVO**

Se realizó de acuerdo al protocolo habitual de nuestro laboratorio: se aislaron adipocitos de la grasa abdominal o subdérmica (Ad) de ratas hembras adultas de la cepa correspondiente (Sprague en el grupo “third party” o “allogénico” o Lewis en el grupo “autólogo”) (ver Figura 13) según protocolo de Zuk et al. modificado [124, 358]. Brevemente, el tejido adiposo se extrae tras incisión abdominal de la rata bajo anestesia, se lava con tampón salino fosfato estéril bajo el flujo de una cabina clase II y posteriormente se trocea con tijeras en condiciones estériles; los fragmentos obtenidos se lavan nuevamente y centrifugan a 250g para posteriormente digerirlos con colagenasa tipo II (0.075% en solución salina) durante 30 min a 37°C con suave agitación constante. La colagenasa se inactiva mediante la adición de medio de cultivo conteniendo un 10% de suero fetal bovino, posteriormente y tras centrifugar a 250g 10 minutos el producto de la digestión, se recoge el precipitado y se filtra a través de membranas de nylon de 70 µm. El resultado final se resuspende en

medio de cultivo completo y se siembran las células resultantes a una densidad de  $10\text{-}15 \times 10^3$  cels/cm<sup>2</sup>.

El medio de cultivo se cambia a las 24 horas para eliminar las células no adheridas y restos celulares. Las células adheridas a la placa de cultivo, propiedad por las que se seleccionan las células troncales mesenquimales (Ad-CTM), se cultivan hasta subconfluencia, una vez alcanzado el 80% de confluencia sobre la placa de cultivo se lavan con solución salina fosfato y se tripsinizan con tripsina-EDTA al 0.5% para volver a subcultivar a la misma densidad de siembra hasta obtener un número suficiente para todos los ensayos. Para prevenir la diferenciación espontánea se mantiene el cultivo con DMEM + 10% de Suero fetal bovino + 1% de penicilina/estreptomicina; una vez se ha obtenido suficiente número de células (pase 3) se criopreservan en suero fetal bovino con un 10% DMSO a nitrógeno líquido tras una rampa de congelación de isopropano a  $-80^{\circ}\text{C}$ .





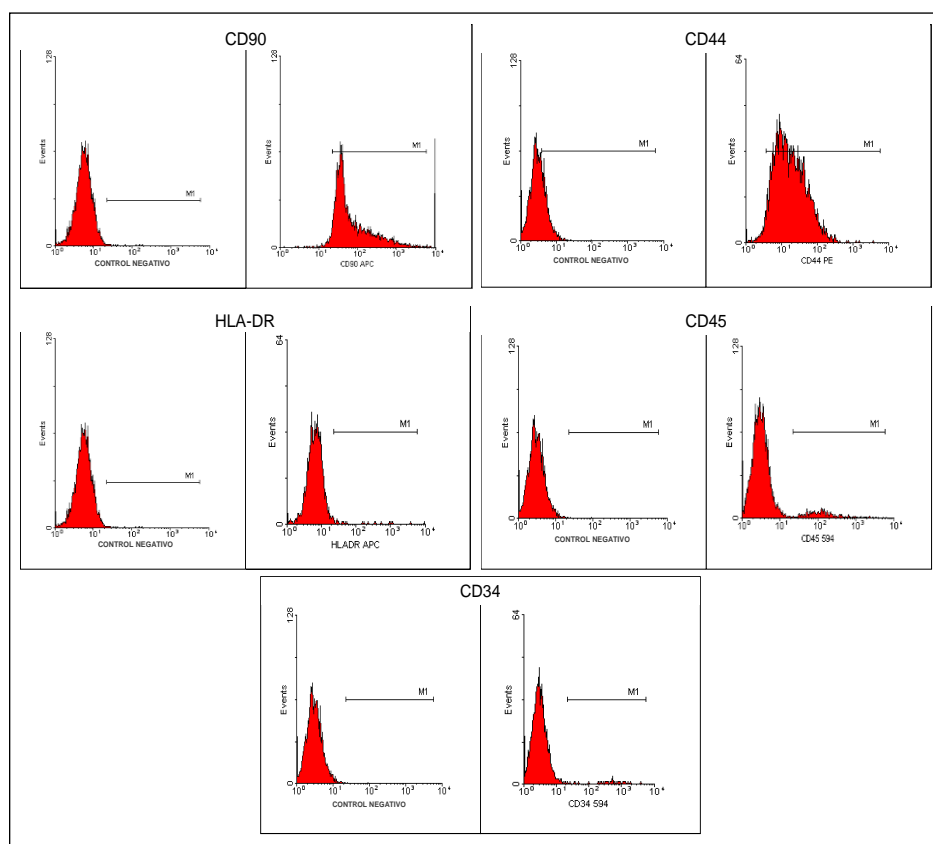
**Figura 13:** Proceso de obtención de las Células Troncales Mesenquimales derivadas de tejido adiposo: A) Extracción de tejido adiposo del animal; B) Esquema de la obtención y manipulación de las CTM; C) Disgregación celular



## II. CARACTERIZACIÓN DE LAS AD-CTM

Las células fueron caracterizadas acorde a las recomendaciones publicadas por la IFATS (International Federation for Adipose Therapeutics and Science) y la ISCT (International Society for Cellular Therapy), como ya se ha comentado [126].

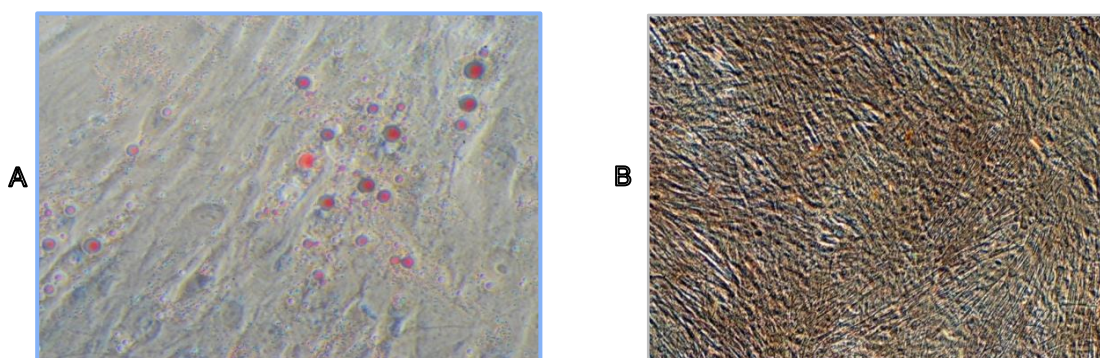
Las células en cultivo se caracterizaron por citometría de flujo por la expresión de marcadores de células madre mesenquimales (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105) y la no expresión de otros marcadores (hematopoyéticos CD11b, CD45 y/o endoteliales CD31) (Figura 14). Las células se despegan de los frascos de cultivo por digestión con tripsina 0.05%-EDTA, se lavan y se resuspenden en PBS conteniendo albúmina bovina al 1%. Alícuotas ( $\sim 10^5$  cells) se incuban en oscuridad a 4°C durante 30 minutos con anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluoróforos y se analizan en un citómetro láser de argon FACScalibur (Becton/Dickinson Biosciences; BDB, San José, CA, EEUU). Se utilizó el soporte informático CellQuest™ Pro (BDB) para la adquisición y el análisis de las muestras.



**Figura 14:** Caracterización de las CTM en el citómetro de flujo

## MATERIAL Y MÉTODOS

Paralelamente se realizaron diferenciaciones celulares a adipocito y osteocito según los protocolos descritos previamente por *Zuk et al* en 2001. Para ello, se sembraron placas de 6 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo y se mantuvieron en cultivo renovando el medio cada 3-4 días hasta llegar a confluencia. El medio de cultivo adipogénico (medio de inducción) se componía de: medio completo suplementado con isobutil-metilxantina 0,5 mM, dexametasona 1  $\mu$ M, insulina 10  $\mu$ M, e indometacina 200  $\mu$ M durante 14 días, renovándolo cada 2 días. Tras fijar las células con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente, la acumulación de lípidos se visualizó mediante la tinción con Oil Red O (ORO) al 0,3% en isopropanol 60% durante 30 minutos en agitación suave. El medio de cultivo osteogénico se compone de medio completo suplementado con dexametasona 0,01  $\mu$ M, ascorbato-2-fosfato 50  $\mu$ M, y  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM durante 28 días. Tras el periodo de incubación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los depósitos ricos en calcio secretados por los osteocitos a la matriz extracelular se visualizaron mediante la tinción de Alizarin Red S (ARS). Las células se observaron en un microscopio invertido de contraste de fases Nikon DIAPHOT-TMD y se fotografiaron con cámara Nikon D80 acoplada al microscopio.



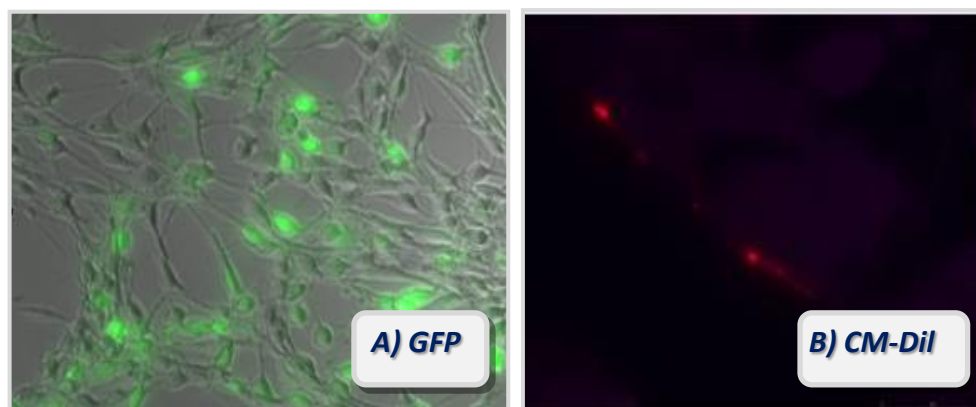
**Figura 15:** Identificación de las CTM teñidas en el microscopio óptico: A) Tinción adipogénica con Oil Red O (ORO); B) Tinción osteogénica con Alizarin Red S (ARS)

### III. MIGRACIÓN E IMPLANTACIÓN DE LAS CTM CON DIL O GREEN FLUORESCENCE PROTEIN (GFP)

Las Ad-CTM *third party* se marcaron con Green Fluorescence Protein (Santacruz Biotechnology) en las instalaciones del CNIC acorde al protocolo establecido por el Departamento de virología celular. Para comprobar el marcaje de las células se solicitó un sorting frente a GFP previo a la recepción de las células, asegurando de esta manera que el 100% de las células recibidas en pase 5

eran GFP positivas (paralelamente se solicitó una caracterización celular por citometría de flujo demostrándose que mantenían los marcadores típicos de células “stem” mesenquimales).

Las Ad-CTM *autólogas* se marcaron con CM-Dil labeling (Celltracker CM-Dil, Invitrogen) minutos antes de su administración en el receptor del trasplante, acorde al protocolo de la casa comercial.



**Figura 16:** Identificación de las CTM teñidas con GFP (A) o con CM-Dil (B) en el microscopio óptico

#### IV. DOSIS DE CTM, MOMENTO Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN

**Momento y vía de administración:** Las Ad-CTM o el placebo se infundieron como profilaxis del rechazo en el momento del trasplante, durante la fase de isquemia caliente, a través de la arteria mesentérica superior, una vez finalizada la anastomosis venosa, y justo antes de comenzar la anastomosis arterial. Una vez desclampada la vena cava, y clampada la porta post-anastomótica para impedir el paso de la sangre retrógrada al injerto, en ese momento las CTM o placebo diluidas con una jeringa de insulina se inyectaron muy despacio a través de la luz arterial del injerto para llegar al intestino a través del mesenterio. Una vez infundidas, otro “*clamp*” pequeño se colocó en la arteria para cerrar el circuito e impedir el escape de las células durante la anastomosis arterial, que se realizó a continuación. De esta forma, aseguramos que las CTM llegaron al órgano diana, justo tras la perfusión. El procedimiento añadió entre 5 y 8 minutos a la isquemia caliente. La razón de inyectarlas de forma intraarterial fue doble: En primer lugar, prevenir posibles complicaciones tromboembólicas provocadas por la infusión intravenosa a través de la vena de la cola en modelos con roedores; esto nos había ocurrido en varias ocasiones, al igual que lo descrito en la literatura, provocando la muerte súbita del animal por tromboembolismo pulmonar, pese a asegurarnos que no había apenas grumos al cargarlas en la jeringa y a inyectarlas despacio a través

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

de la vena. En segundo lugar, de esta forma, asegurábamos que las CTM alcanzaban el órgano diana. Por último, en caso de obtener resultados favorables con las CTM, esta vía también resultaba factible para trasladarla a la clínica, administrándolas justo en la fase de banco, del trasplante, aunque hay poco descrito sobre ello.

**Dosis:** La dosis fue de  $1.5 \times 10^6$  CTM por trasplante y se infundieron lentamente durante dos minutos, diluidas en 1 ml de Ringer Lactato, usado como vehículo control. El desclampaje arterial y reperfusión del injerto ocurrió tras una media de 15 minutos tras la infusión de las células.

### **V. CTM Y ADMINISTRACIÓN. ESTUDIOS PRELIMINARES**

Merece la pena dedicar un apartado en Material y Métodos a comentar unos estudios preliminares realizados antes de decidir la dosis de las CTM empleadas:

#### **a. ESTUDIO 1 EN RELACIÓN A LA DOSIS**

Antes de comentar con los Trasplantes, se diseñó un estudio preliminar SHAM con 11 ratas Wistar. A todas ellas se les realizó una laparotomía bajo anestesia general similar a lo que se haría después en los trasplantes, y a continuación un clampaje mesentérico para provocar un daño intestinal. A continuación se les inyectó Ad-CTM a través de la vena cava infrarrenal. En 8 ratas se infundieron 1'5 millones y en las 3 restantes, se infundieron 4 millones. La infusión se hizo lentamente a lo largo de 5 minutos y con una jeringa de insulina. Las Ad-CTM, procedentes de cepa Sprague se aislaron, cultivaron y procesaron de la misma forma que después en los trasplantes y estaban marcadas con GFP. Tras cerrar la laparotomía, todas las ratas despertaron y los cuidados postoperatorios se realizaron igual que en las ratas que se trasplantarían en el futuro. Todas sobrevivieron con muy buen estado general a partir del segundo-tercer día postoperatorio hasta el día 11 en el que se sacrificaron, realizándose autopsia y extracción de muestras de tejido para su estudio. Se eligió el día 11, intermedio entre el día 7 y el 14 que son los días en los que se sacrificaron los animales trasplantados, supuestamente con un rechazo ya establecido. Las muestras se procesaron en formol, convertidas en bloques en parafina, se realizaron cortes y se tiñeron en HE, y a continuación se buscaron las Ad-CTM mediante técnicas de inmunofluorescencia. Al microscopio óptico observamos algunos elementos fluorescentes en ambos grupos, predominantemente en hígado y pulmón, por lo que optamos por administrar 1,5 millones en el estudio definitivo, para minimizar las complicaciones trombóticas. Sin embargo, se vieron pocas células, interpretando que el día 11 de sacrificio quizá era algo tardío, y probablemente las CTM ya

habrían hecho su trabajo y se habrían ido en esta fase, al tratarse de animales que en momento del sacrificio presentaban un excelente estado general. Asumimos también que el hecho de no ver muchas CTM, no significaba que no estuviesen o que no hubiesen ejercido una acción, tal y como se describe en la literatura.

**b. ESTUDIO 2 EN RELACIÓN A LA VÍA Y RITMO DE ADMINISTRACIÓN**

Durante la Etapa 1, a lo largo de la curva de aprendizaje, comenzamos a infundir CTM a través de la vena de la cola, justo antes de realizar la laparotomía a la rata receptora. Se hizo de forma ciega, 3-5 millones de CTM o placebo diluidas en una jeringa de insulina de 1ml con HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution / Gibco).

Este procedimiento se realizó en 37 trasplantes (entre el 73 y la 110). Se trataba de una etapa en la que las ratas comenzaban a sobrevivir durante varios días y los resultados que obtuvimos, al analizar posteriormente qué ratas llevaban CTM y cuáles no, fue que aquellas con CTM se morían con más frecuencia que las que llevaban placebo durante el trasplante o justo al despertar unas horas después por sangrado incontrolable durante las anastomosis o el desclamplaje ( $n= 18$ )

Tabla 9).

Una vez descartadas y solucionadas algunas causas como hipótesis, como por ejemplo el ritmo de infusión que se enlentenció al máximo, o la presencia de burbujas en el sistema de goteo, se llegó a una probable conclusión, y es que al desclampar la cava, las células agrupadas por la estasis venosa, migraban hacia el pulmón de forma brusca provocando un tromboembolismo pulmonar con coagulopatía asociada. A posteriori, revisando la bibliografía vimos que las dosis empleadas con éxito en clínica y en otros modelos animales había sido menor que la nuestra ( $1 \times 10^6 / \text{Kg}$  frente a  $1.5 \times 10^6$  totales en animales de 250 gr), y probablemente este fuera el problema, aunque habría que demostrarlo en proyectos futuros.

Desarrollado el modelo de rechazo con el modelo heterotópico, y obteniendo una supervivencia casi total de los trasplantes sin infusión de CTM (desde el 110 hasta el 146, 87% supervivencia, con sólo 3 fallecidas por mala técnica), volvimos a observar este fenómeno en nuestros primeros intentos por infundir las CTM a través de la vena de la cola (148-149-151; que no ocurrió en los dos siguientes con placebo), por lo que decidimos cambiar el estudio e infundir las células o el placebo a través de la arteria mesentérica superior a partir del trasplante 152, observando una supervivencia franca con esta vía (96%, sólo una falleció por una trombosis venosa secundaria a mala técnica quirúrgica). Si es cierto, que en los dos primeros casos, el injerto, tardó unos segundos más de lo

## MATERIAL Y MÉTODOS

normal en reperfundirse, esta incidencia se resolvió con la infusión más lenta de las células, pasando a observar una reperfusión inmediata, totalmente indistinguible del grupo placebo. Como ya se ha comentado, adicionalmente con esta vía conseguíamos asegurar que las células llegaban al injerto.

**Tabla 9:** Estudio preliminar en relación a la vía de administración \*Era en la que no se ponía antibiótico.

CTM iv	N	VIVAS 24 h	OBSERVACIONES
SI	12	1* (0%)	Todas fallecen por sangrado incontrolable, y sólo en 2 podría deberse a la técnica. En la única superviviente, hubo resistencia al infundir las células (¿extravasadas en la cola?)
NO	28	16* (57%)	De las 12 que fallecen: 6 por probable mala técnica quirúrgica. 3 por probables problemas anestésicos (embolia pulmonar, apnea mal controlada). Los otros 3 causa desconocida, pero a diferencia de aquellos con CTM, se despertaban bien, poco sangrado quirúrgico. Probable sepsis*.

### c. MOMENTO DE ADMINISTRACIÓN

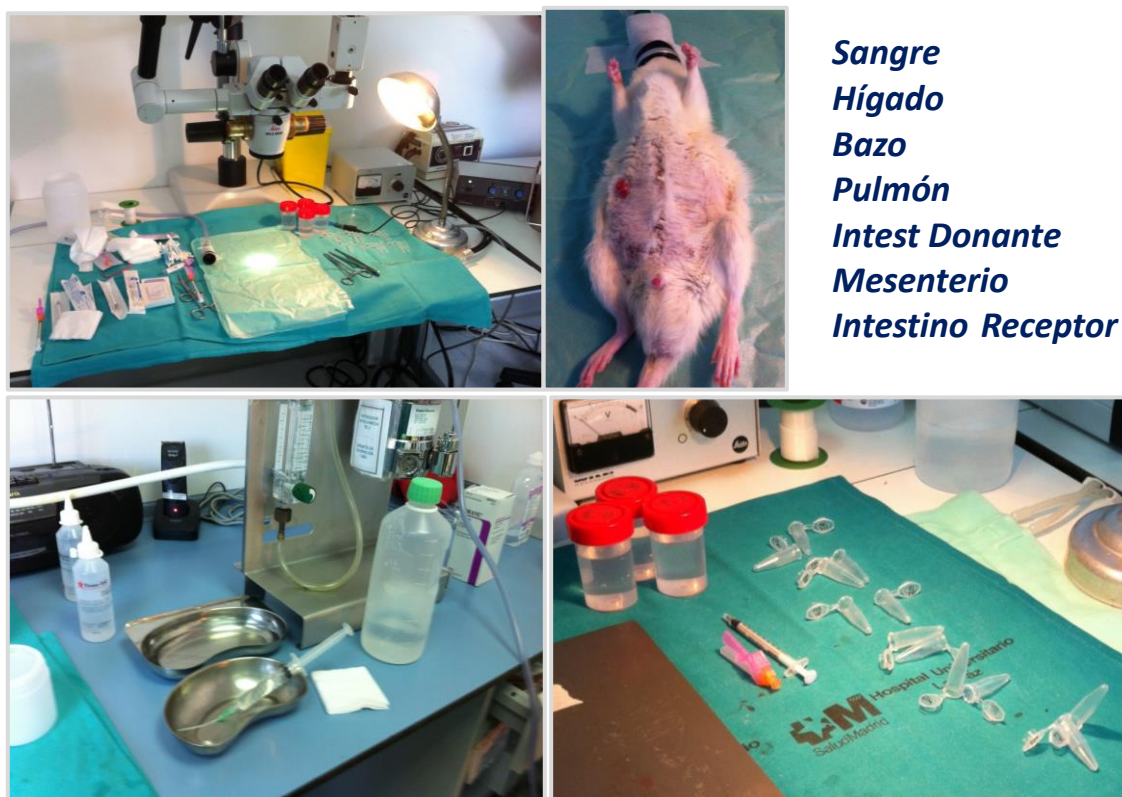
El momento de administración se planteó igualmente como estudio preliminar, aunque nunca se llevó a cabo, puesto que se decidió infundir las CTM por vía arterial, a través de la arteria mesentérica superior del injerto, y por tanto el único momento óptimo y seguro para infundirlas fue el momento del implante o del banco, tal y como hicimos, y como podría plantearse a la hora de una traslación clínica, siempre en el contexto de un planteamiento preventivo más que terapéutico del rechazo.

Sin embargo, posteriormente a nuestro estudio, han surgido algunos estudios acerca de las CTM y el trasplante de órgano sólido, como se discutirá en resultados y discusión, que justifican la falta de acción de las CTM precisamente por un momento erróneo de administración, abogando por administrarlas días antes del trasplante y no en el momento del mismo, consiguiendo así una modulación del sistema inmune del receptor que podría contribuir a conseguir un estado de tolerancia. Son necesarios muchos estudios antes de confirmar estas hipótesis, y sería deseable contestar a estas preguntas en proyectos de investigación futuros, una vez llegados a esta fase. En este caso, la vía óptima de administración de las CTM sería la intravenosa, para poder aplicarlo en

clínica. El problema en el trasplante intestinal de donante cadáver, es que el paciente no sabe cuándo se va a trasplantar, a diferencia de otros trasplantes programados de donante vivo.

#### **8. SACRIFICIO, EVALUACIÓN DEL INJERTO Y RECOGIDA DE MUESTRAS.**

Los animales fueron sacrificados de acuerdo con el diseño experimental, en los días 7 ó 14 tras el trasplante, dependiendo del grupo. Para ello, se anestesiaron de nuevo con isofluorano y se realizó una nueva laparotomía. Se inspeccionaron los distintos órganos y se hizo una primera valoración macroscópica del grado de rechazo, basada en la apariencia de la superficie del injerto, las placas de Peyer, así como el engrosamiento de los ganglios linfáticos y del mesenterio en general. Se observó asimismo la cavidad abdominal prestando atención a la existencia de ascitis, adherencias o signos macroscópicos de peritonitis o abscesos. A continuación, se extrajeron un mínimo de 2 ml de sangre del corazón, usando jeringas estériles. Y se continuó exanguinando al animal hasta su muerte. Mientras, se extrajeron rápidamente muestras del injerto y de diferentes tejidos del animal, y se fijaron en formaldehído 10% para estudios histológicos e inmunohistoquímicos: hígado, bazo, pulmón, intestino nativo, injerto intestinal, mesenterio del injerto... De estos tejidos también se extrajeron muestras en nitrógeno líquido que se congelaron directamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posibles estudios bioquímicos futuros. La luz intestinal, tanto del injerto como del intestino nativo se irrigó y lavó con SF. Los 2 ml de sangre extraída se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm, para posteriormente recoger el plasma y congelarlo directamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 17:** Imágenes representativas del momento de sacrificio del animal y recogida de muestras de diferentes tejidos

## 9. ESTUDIO DE LAS MUESTRAS.

### I. HISTOLOGÍA

#### TINCIONES CONVENCIONALES

**Hematoxilina-eosina:** Las muestras procedentes de los injertos intestinales, incluyendo el mesenterio, se fijaron en formaldehído al 10%, se embebieron en parafina y se seccionaron a 5  $\mu$ m, para ser posteriormente teñidos mediante técnica Hematoxilina-Eosina estándar.

Las preparaciones fueron revisadas de forma ciega por un patólogo experto en Trasplante Intestinal, buscando signos histológicos de rechazo agudo al microscopio óptico, el cual se evaluó de acuerdo a los criterios establecidos en el workshop durante el XIII International Small Bowel Symposium (2003) y que posteriormente fueron publicados por *Wu et al* [312]. Están resumidos en la Tabla 10. La puntuación histológica oscila entre 0 y 3, donde el 0 significa que no existen cambios



patológicos y el 3 que existen cambios extremos. Entre los 5 parámetros valorados, se incluyen el grado de infiltración linfocitaria, el número de cuerpos apoptóticos en las criptas, el daño del epitelio de la mucosa así como la distorsión de la arquitectura intestinal y la ulceración de la mucosa. De esta forma, se puede valorar si se trata o no de un rechazo, y, si lo es, de un rechazo indeterminado, leve, moderado o grave.

**Tabla 10:** Clasificación histológica del rechazo (*Wu et al, 2003*).

	<b>Indeterminado</b>	<b>RA leve</b>	<b>RA moderado</b>	<b>RA grave</b>
<b>Grado</b>	Indiferenciado	1	2	3
<b>Infiltrado inflamatorio*</b>	Mínimo y localizado, superficial	Leve y localizado, con linfocitos activados	Amplio y disperso, en la lamina propia	Amplio y disperso, en la lamina propia
<b>Daño epitelio de las criptas**</b>	Mínimo	Leve	Difuso	Difuso
<b>Apoptosis del epitelio de las criptas***</b>	Aumentado (generalmente <6 cuerpos apoptóticos/ 10 criptas)	Aumentado (generalmente >6 cuerpos apoptóticos/ 10 criptas)	Aumentado con confluencia focal de apoptosis	Aumentado con confluencia focal de apoptosis
<b>Arquitectura distorsionada****</b>	No o mínimamente	Leve	Importante. Posible arteritis de la intima leve a moderada	Importante. Posible arteritis de la intima grave o transmural
<b>Mucosa ulcerada</b>	No	No	No	Si

## II. INMUNOHISTOQUÍMICA: ESTUDIO DE POBLACIONES DEL SISTEMA INMUNE

Para la búsqueda de poblaciones celulares inmunes en el injerto intestinal y en el mesenterio, así como de las diferencias entre los grupos sin CTM y los grupos con CTM, se utilizaron métodos inmunohistoquímicos.

Del sistema inmune innato, se estudiaron los macrófagos (CD68+). En cuanto al sistema inmune adquirido, de entre las subpoblaciones linfocitarias, se estudiaron los linfocitos T Helper (CD4+), los linfocitos T citotóxicos (CD8+) y los linfocitos B (CD20+) en el injerto. Basados en la literatura buscamos también la presencia de linfocitos T con perfil regulador (FoxP3+), independientemente de que fueran CD4+ o CD8+, tal y como vimos en la introducción. Además los Foxp3 se buscaron también en el bazo, por la posible influencia de las CTM en la inmunomodulación del rechazo a nivel sistémico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### a. TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

Los distintos reactivos para las técnicas de inmunohistoquímica y las diluciones empleadas se describen en las tablas Tabla 11 y Tabla 12.

#### Anticuerpos primarios:

**Tabla 11:** Reactivos utilizados para estudios inmunohistoquímicos

Referencia	Descripción	Huésp.	Clonalidad	Reac	Isotipo	Casa comercial	Dilución
MCA341GA	CD68	Ratón	Monoclonal	Rata	IgG	AbD Serotec	1:50
MCA48R	CD8 Alpha	Ratón	Monoclonal	Rata	IgG1	Bio-RAD	1:200
bs-0080R	CD20	Conejo	Policlonal	Rata	IgG	Bioss Antibodies	1:300
NBP1-19371	CD4	Conejo	Policlonal	Rata	IgG	Novusbio	1:500
orb34127	FOXP3	Conejo	Policlonal	Rata	IgG	Biorbyt	1:100

#### Anticuerpos secundarios y otros reactivos:

**Tabla 12:** Reactivos utilizados para estudios inmunohistoquímicos

Referencia	Descripción	Huésped	Reac	Isotipo	Casa comercial
4054-08	Goat F(ab') <sub>2</sub> Anti-Rabbit	Cabra	Conejo	IgG(H+L)	ads-BIOT
1034-08	Goat Anti-Mouse	Cabra	Ratón	IgG(H+L)	ads-BIOT
7100-05	Streptavidin-HRP				SouthernBiotech
NCH-414191F	Histofine				Vitro

. **Macrófagos:** Para el estudio de la reacción macrofágica se usó como marcador general de los macrófagos el CD68. Se bloqueó la peroxidasa endógena tratando los cortes de tejido con 100 microlitros de una disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-TWEEN. PBS (Sigma-Aldrich, Alemania). Tween 20 (Calbiochem, Alemania). Se realizó el bloqueo cubriendo los cortes de tejido con 100 microlitros 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 añadió 100 microlitros del anticuerpo primario y se realizó 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 se utilizó como sistema de revelado el KIT MASVISION UNIVERSAL POLIVALENTE (Master Diagnostica, España), 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 inmoglobulina F(ab) de inmunoglobulina que proporciona el kit. Se incubó a temperatura ambiente 15 minutos. A continuación se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Se deshidrataron las muestras 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.

. **CD4, CD8, CD20 y Foxp3:** Se estudiaron en el intestino injertado, pero además el Foxp3 se buscó también en las preparaciones del bazo, basados en la literatura reciente de que una posibilidad de actuación de las CTM es que migren al bazo, y otros órganos linfoides y modulen desde allí.

Las preparaciones se colocaron en una estufa 60° durante 30 minutos. La desparafinación y la recuperación antigénica se realizaron en el equipo PT Link (Dako) con un buffer citrato pH 6 (Dako) en el caso de los CD4, CD8 y CD20. Para el Foxp3 la desparafinación se realizó pasando las muestras por una concentración decreciente de alcoholes (xilano – 100-70% Etanol – Agua) 5 minutos cada una y la recuperación antigénica se realizó en olla a alta presión en una solución de citrato de sodio pH 6 durante 3 minutos.

Para el bloqueo de la peroxidasa endógena, los cortes de tejido se trataron con agua destilada durante 5 minutos, peróxido de hidrógeno y metanol durante 30 minutos, y de nuevo agua destilada 5 minutos. Los cristales se colocaron en un equipo de inmunotinción automática en horizontal (Autostainer) de Dako. El protocolo es el siguiente: 1) Bloqueo de uniones inespecíficas con BSA y suero de cabra; 2) Anticuerpo primario a la dilución correspondiente; 3) Lavado con tampón Tris pH 7,4; 4) Anticuerpo secundario; 4) Lavado; 5) Streptavidina conjugada a peroxidasa; 6) Nuevo lavado; 7) Revelado con Diaminobencidina (DAB); 8) Lavado; 9) Contraintinción con hematoxilina; 10) Lavado con agua destilada. Finalmente las preparaciones se deshidrataron con alcoholes, y se montaron los cristales con DPX.

#### b. VALORACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el estudio de todas las subpoblaciones celulares, se realizó una **primera valoración global cualitativa** de forma ciega y por un mismo observador experto, para minimizar errores de interpretación. Así, se realizó una inspección completa de la preparación (una por trasplante) a 10x, 20 y 40x, evaluando la calidad de la técnica y eligiendo áreas bien conservadas y teñidas con

## MATERIAL Y MÉTODOS

máximos signos de inflamación, siguiendo los criterios establecidos de rechazo por *Wu et al* [312]. Se desestimaron las muestras no valorables (una minoría).

A continuación, se realizó un **análisis cuantitativo**:

Para el conteo de **macrófagos** se valoró el número de células **CD68+** en un campo de 40x, obteniendo una media tras contarlos en 10 campos diferentes, tanto del intestino como del mesenterio.

Para el conteo de los **linfocitos T CD4+** y **CD8+**, así como de los **linfocitos B (CD20+)**, se optó por valorar el porcentaje de células marcadas en cada capa intestinal, puntuando desde 0 a 3, en los diferentes estratos (Tabla 13 y Tabla 14; Figura 17), obteniendo la media de cinco mediciones en áreas representativas de cada capa (25 valoraciones por cada preparación). Se utilizó el programa Image-Pro Plus (Version 6.3.0.512 for Windows XP/Vista; Media Cybernetics®, Inc), para fotografiar las imágenes en las mismas condiciones, a 20 y 40 aumentos.

El conteo de las células marcadas **Foxp3**, se realizó a partir de una selección de fotos a 20 aumentos de 4 áreas bien conservadas y teñidas representativas del resto de la muestra tanto del bazo como del intestino donante (con el mismo programa ImageJ), y se cuantificaron mediante programa CellProfiler™ (v.9777), proporcionando un porcentaje respecto al número total de células en cada fotografía.

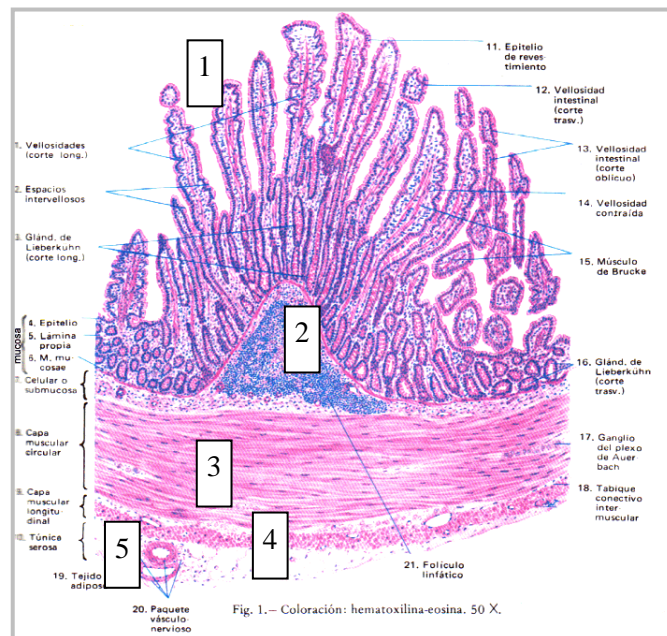
Seleccionamos los trasplantes más representativos de los grupos Control\_14, TAC5\_14, Control\_14 + AD-CTM y TAC5\_14 + AD-CTM de la “Base de datos Estudio CTM” y simplificamos su nombre a CONTROL, TAC, CTM, Y TAC+CTM. El mismo análisis se realizó comparando los grupos CONTROL, TAC, CTM autólogas, CTM alogénicas, TAC+CTM autólogas y TAC + CTM alogénicas.

**Tabla 13:** Criterio de Puntuación utilizado en la valoración de los CD4, CD8 y CD20.

PUNTUACIÓN	Area bien conservada de máxima inflamación en un campo de 20x
0	Infiltración del <10%
1	10-30%
2	30-60 %
3	60-90%

**Tabla 14:** Recuerdo anatómico-histológico de las capas del intestino delgado, para evaluar mejor la distribución de las distintas poblaciones celulares en el rechazo.

Capas anatómicas del Intestino Delgado:	Capas Puntuadas por su relevancia inmunológica:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Mucosa: epitelio, lamina propia y muscularis mucosae:</b> incluye las vellosidades y las glándulas o criptas de Lieberkuhn.</li> <li>• <b>Submucosa</b></li> <li>• <b>Capa muscular (circular y longitudinal):</b> incluye los plexos de Meissner y Auerbach.</li> <li>• <b>Tunica serosa:</b> Aquí hay tejido adiposo y vasos</li> <li>• <b>Mesenterio:</b> ya no es capa como tal, pero es fundamental en el rechazo ver que pasa a este nivel. Aquí también hay tejido adiposo y vasos.</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Epitelio de la Mucosa</b> que incluye las células caliciformes, las de borde estriado y las de Paneth... Sólo se puntuó en aquellos casos donde se veía bien y estaba integro por tener poco rechazo; en aquellas tinciones con mucho moco teñido, no se valoró.</li> <li>2. <b>Lamina propia y submucosa:</b> Se incluyó toda la zona que hay entre las criptas de Lieberkuhn, y en la submucosa, siendo la más representativa.</li> <li>3. <b>Muscular:</b> casi siempre se ve sin teñir o muy poco, lo cual hizo de control.</li> <li>4. <b>Serosa</b></li> <li>5. <b>Mesenterio</b></li> </ol>



**Figura 18:** Recuerdo anatómico-histológico de las capas del intestino delgado, para evaluar la distribución de las distintas poblaciones celulares en el rechazo.

### **III. INMUNOFLUORESCENCIA: PROTOCOLOS Y CONTAJE**

Mediante técnicas de inmunofluorescencia, se buscó la presencia de las CTM en diferentes tejidos, extraídos durante el sacrificio (día 14 tras el trasplante), con el fin de analizar también la migración y la implantación de las mismas: hígado, pulmón, bazo, injerto intestinal, intestino nativo... Los protocolos de inmunofluorescencia se describen en los Anexos II y III. Se utilizó el reactivo Dapi (Dapi Fluoromont-G®, de Southern Biotech), para teñir los núcleos y poder identificar mejor las células.

### **IV. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS PLASMÁTICAS: ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)**

La producción de citoquinas por los linfocitos del animal receptor en plasma se analizaron mediante técnica de ELISA, pudiendo así estudiar las que se han visto más relacionadas con los fenómenos de rechazo en la literatura. Contamos con 1 ml de plasma procedente de sangre venosa de la cola justo antes del trasplante y 2 ml del ventrículo derecho, justo antes del sacrificio, congelado en nitrógeno líquido en el momento de su obtención y conservado a -80°C.

#### **a. KIT Y LECTURA DE LAS MUESTRAS:**

Las citoquinas pro y antiinflamatorias estudiadas se ordenan y describen en la

Tabla **15** y Anexo IV, en función de su actividad y su origen. La lectura de las mismas y comparación con las curvas estándar se describen por el fabricante (kit Affymetrix EPX220-301212-901 leído en Luminex; Procartaplex (LabClinics), S.A; en el software que proporcionan en ([www.ebioscience.com/resources/procartaplex-analyst-1.0-software.htm](http://www.ebioscience.com/resources/procartaplex-analyst-1.0-software.htm)).

Las concentraciones y sensibilidades, que vienen en el kit, junto con los rangos en que los datos son aceptables, así como un esquema descriptivo de la técnica, se describen en el Anexo V.

#### **b. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:**

Se estudiaron las diferencias en cuanto a citoquinas plasmáticas secretadas entre los diferentes grupos, con y sin CTM, con y sin TAC, así como en diferentes momentos en el mismo animal (pretrasplante vs día 14). Cada muestra se midió por duplicado. Para ello seleccionamos los trasplantes más representativos de los grupos Control\_14, TAC5\_14, Control\_14 + AD-CTM y

TAC5\_14 + AD-CTM de la “Base de datos Estudio CTM”, simplificando su nombre a CONTROL, TAC, CTM, Y TAC+CTM, igual que para el estudio inmunohistoquímico.

**Tabla 15:** Resumen de las citoquinas estudiadas (y términos equivalentes) y actuación predominante.

Tipo		Nombre de la citoquina	Actuación predominante
Interleuquinas	Proinflamatorias	<b>IL1<math>\alpha</math></b> <b>IL1<math>\beta</math></b> <b>TNF <math>\alpha</math></b>	Actúan sobre el SII: Respuesta aguda inflamatoria generalizada
		<b>IL2</b> <b>IFN<math>\gamma</math></b> <b>IL17</b>	Actúan sobre el SIA (antígeno-específico): Respuesta celular o citotóxica
		<b>IL5</b> <b>IL6*</b> <b>IL12*</b> <b>IL13</b>	Actúa sobre el SIA (antígeno-específico): Respuesta humoral. *IL6 y IL12 también actúan en el SII
	Antiinflamatorias	<b>IL4</b> o “Factor estimulante de linfocitos B” <b>IL10</b>	
Factores estimuladores de colonias	<b>G-CSF</b> <b>GM-CSF</b>		
Quimoquinas	De la familia de las CXC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Gro-<math>\alpha</math></b> (CXCL1)</li> <li>• <b>MIP2</b>: (CXCL2): o Proteína 2-alfa inflamatoria de macrófagos; o GroBeta (proteína Beta reguladora del crecimiento) o Gro2 (Gro oncogen).</li> <li>• <b>IP10</b> (CXCL10): Proteína 10 inducida por el interferon gamma o citokina B10 pequeña inducible.</li> </ul>	
	De la familia de las CCL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>MCP1</b> (CCL2): “proteína 1 quimiotáctica para monocitos”</li> <li>• <b>MIP 1alpha</b> (CCL3): “proteína inflamatoria de macrófagos 1 alpha”</li> <li>• <b>RANTES</b> (CCL5): “Regulated on Activation, normal T cell expressed and secreted”</li> <li>• <b>MCP3</b> (CCL7): “citoquina 3 específica de monocitos”</li> <li>• <b>Eotaxina</b>(CCL11): “proteína quimiotáctica para eosinófilos”</li> </ul>	

## 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la **Fase 1**, de “**Curva de Aprendizaje**”, se realizó un análisis descriptivo de los tiempos empleados así como de las complicaciones encontradas. Asimismo, se describe la curva de aprendizaje estándar así como la tasa de supervivencia a las 24 horas del trasplante de los últimos 10 trasplantes realizados.

En la **Fase 2**, de “**Desarrollo del modelo**”, se analizó la validez del modelo de rechazo agudo, comparando la incidencia acumulada de rechazo entre los diferentes grupos, mediante el test de Log-Rank, así como la correlación clínica-histológica y macro-microscópica.

En la **Fase 3** o “**Estudio del papel inmunomodulador de las CTM**”, se analizaron:

1. Las **diferencias histológicas** entre los distintos grupos tratados con CTM o no, así como la influencia de la inmunosupresión recibida (Tacrolimus) sobre el papel de las CTM administradas. Para ello se analizó la incidencia acumulada de rechazo, mediante el test de Log-Rank, que compara curvas de supervivencia entre los grupos.
2. El análisis comparativo entre los grupos de las **diferentes subpoblaciones celulares del sistema inmune** se realizó mediante pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis), y en aquellos que fue significativa, se utilizó el ajuste para comparaciones múltiples Dwass, Steel, Critchlow-Fligner, con el NPAR1WAY Procedure del programa SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Se analizó también su correlación con el grado de rechazo mediante pruebas paramétricas (correlación de Pearson) y no paramétricas (Rho de Spearman).
3. Para evaluar las **diferencias** de los promedios **en cuanto a citoquinas secretadas** a la sangre entre los diferentes grupos, así como en diferentes momentos en el mismo animal, es decir, antes del trasplante y el día del sacrificio, se utilizó también la prueba de Kruskal Wallis, y en los casos que resultaron significativos ( $p < 0.05$ ) se realizaron estudios pos-hoc, comparando las distribuciones de los promedios de cada grupo usando el test de Dunn para comparaciones múltiples de muestras independientes, con la corrección de Bonferroni, con la librería PMCMR del software libre R. Además se crearon gráficos de barras con la media y el error estándar, tanto para los niveles como para las diferencias, con la librería ggplot2 del software libre R.



El análisis de la supervivencia del grupo de Trasplante Intestinal del Hospital La Paz, se realizó mediante curvas de Kaplan-Meier, mediante el programa IBM SPSS Statistics v.19, comparando los distintos tipos de trasplante y protocolos de inmunosupresión.

Durante todo el trabajo, los resultados de cada grupo se expresan en media $\pm$ DS y/o mediana (rango). Se consideraron significativos valores de  $P < 0.05$ .



# RESULTADOS

---



## 6. RESULTADOS: ESTUDIO DEL PAPEL INMUNOMODULADOR DE LAS AD-CTM EN LA PREVENCIÓN DEL RECHAZO AGUDO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE TI

---

### 1. PRIMERA FASE: DESCRIPCIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE TIA EN RATA.

Desde marzo de 2013 hasta noviembre de 2014 se realizaron 178 TIA por la misma cirujana (doctoranda) recogidos en la “Base de datos Curva de Aprendizaje”: los datos más relevantes han sido recientemente publicados [349] (Anexo 6).

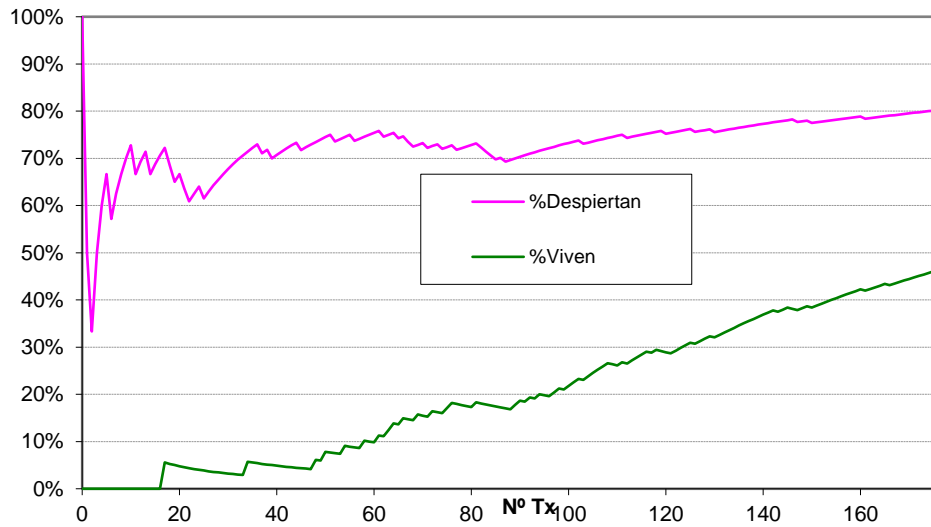
Supervivencia: 143 receptoras despertaron tras la cirugía; (70% de la primera mitad del estudio, 92% de la segunda); 83 vivían al día siguiente (17% de la primera mitad, 76% de la segunda); 49 sobrevivieron  $\geq 6$  días y 42 (86%) se sacrificaron con éxito en el día previsto para evaluar rechazo y/o resultados con CTM. Por tanto, una vez se consigue una tasa de supervivencia buena, se mueren pocos animales. Los principales factores que influyeron en la supervivencia, fueron *los tiempos medios quirúrgicos*, significativamente descendentes a lo largo del estudio, y el tipo de trasplante. Otros se fueron detectando y modificando para conseguir la puesta a punto. La Figura 19 muestra el porcentaje global de éxito a lo largo del tiempo (A), y de forma más gráfica, el porcentaje de éxito de los últimos 10 trasplantes realizados o “curva de aprendizaje” (B).

Respecto al *tipo de trasplante*, los primeros 110 fueron ortotópicos; 29 vivieron más de 24 horas, y de éstos, 11 vivieron entre 4 y 6 días sin tratamiento, aunque ninguno de las ratas se pudo sacrificar viva. Debido a la elevada mortalidad al tercer/cuarto día en una fase en que ya sobrevivían un gran porcentaje más de 48 horas, se optó por pasar al trasplante heterotópico, también válido para evaluar el rechazo. La supervivencia mejoró drásticamente, en la mayoría de los casos, hasta el día 7 ó 14, día programado del sacrificio. Por esta razón, los últimos 68 fueron heterotópicos, y de ellos 48 pudieron incluirse en las dos siguientes fases del estudio: el desarrollo de un modelo de rechazo (n=26) y el estudio de las CTM en la prevención del mismo (n=22); De los pocos que no valieron en esta última fase, analizamos las causas de exitus: 6 vivieron más de 48 horas (rango 2-5 días), y de ellos 5 fallecieron por sepsis en una fase inicial donde aun no se administraba Ceftriaxona profiláctica, otro animal se sacrificó al tercer día al presentar evisceración de un estoma blanquecino, probablemente por trombosis arterial.

## RESULTADOS

Las 14 restantes fallecieron en las primeras 24 horas y en 7 se debió a problemas con la infusión de las CTM, provocando un sangrado incontrolable o un tromboembolismo pulmonar masivo al desclampar con parada cardiorrespiratoria y muerte en el acto. Sólo en las 7 restantes fue debido a fallos en la técnica quirúrgica o anestésica.

### A. %Éxito



### B. %Éxito en los últimos 10 trasplantes

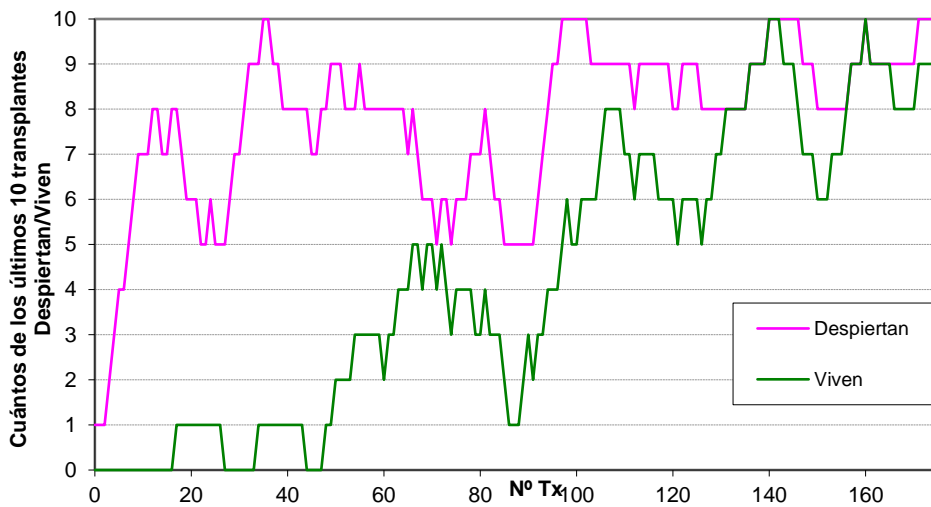


Figura 19: Curva de aprendizaje: A) Porcentaje de éxito ; B) Curva del aprendizaje en relación a los últimos 10 trasplantes realizados

Otros factores que pudieron influir en la supervivencia: Probablemente hubo estenosis o fugas de las anastomosis intestinales que no se diagnosticaron pero que produjeron sepsis de origen abdominal, y finalmente, exitus. Sin embargo, la autopsia de las 11 receptoras que vivieron entre 4 y 6 días, no mostró fugas sino más bien, un intestino normal o muy dilatado, probablemente debido a estenosis, aunque la posibilidad de que estuviesen iniciando un rechazo no pudo ser descartada. Por último, un sinnúmero de pequeños detalles pudieron ser también responsables del giro tomado a tener en cuenta para futuros estudios, tales como no perfundir la luz intestinal con demasiada fuerza durante la isquemia fría, usar mejores soluciones de preservación (como el Wisconsin, por ej.), usar antibióticos profilácticos para evitar la sepsis y la inanición... El no considerar estos detalles fue crucial en el modelo ortotópico, y algo menos en el heterotópico, aunque el daño de las vellosidades, y la translocación bacteriana podrían también influenciar los resultados en el modelo heterotópico y deberían de tenerse en cuenta.

Otras consideraciones: a tener en cuenta para superar la curva de aprendizaje:

- a) **Infección e inmunosupresión:** Una vez obtenidas supervivencias prolongadas con el trasplante heterotópico, observamos que los primeros *animales tratados con Tacrolimus* sufrían un deterioro grave y progresivo hacia la muerte entre el 5° y 7° día por sepsis (n=6), algo que no habíamos observado previamente en los primeros controles, probablemente debido a la inmunosupresión; el problema se resolvió incluyendo en el protocolo ceftriaxona diaria subcutánea, no observando más sepsis hasta el final del estudio.
- b) Como se ha explicado en el apartado de Metodología, la **vía de administración** de las CTM también implicó una curva de aprendizaje, contribuyendo al fallecimiento del animal durante los inicios.
- c) En cuanto a las *complicaciones intraoperatorias*, estas quedan reflejadas en la Tabla 16, destacando los **problemas anestésicos**, como embolia, shock hipovolémico o apnea central. Éstos se resolvieron mediante la infusión de SF subcutáneo (5 ml) al comienzo de la intervención, control exhaustivo de la hemorragia con presión con una torunda a nivel de las anastomosis, y retirada del sevoflurano durante unos segundos e incremento del oxígeno con el fin de recuperar el reflejo respiratorio. En cuanto a las complicaciones relacionadas con **técnica microquirúrgica**, destacaron algunos donantes “malos” porque sangraron o porque se reperfundieron mal, complicaciones venosas (sangrados y/o estenosis

## RESULTADOS

con congestión y trombosis), y complicaciones arteriales (fundamentalmente sangrado, aunque también trombosis aguda).

- d) Respecto a las *complicaciones tardías*, surgidas a partir de las 48 horas, destacaron la trombosis arterial, obstrucción intestinal (en el modelo ortotópico), evisceración del estoma precisando reintervención quirúrgica (en el heterotópico), y la sepsis, confirmada posteriormente tras la autopsia (Tabla 16).

Los cuidados del estoma prolongaron la supervivencia en aquellas ratas que a partir del séptimo día comenzaron a desarrollar rechazo, ya que en ese momento dejaron de echar moco con facilidad y a distenderse. Un simple masaje abdominal o apertura con pinzas del estoma para ayudar a vaciar el moco, impidió que algunos animales fallecieran por dificultad respiratoria antes de tiempo.



**Figura 20:** Evisceración del estoma que precisó reintervención quirúrgica

**Tabla 16:** Complicaciones Intraoperatorias o inmediatas y Tardías

<b>COMPLICACIONES INTRAOPERATORIAS</b>	<b>n</b>
• Anestésicas: embolia, shock hipovolémico, apnea central	16
• Venosas:	26
○ sangrado	13
○ estenosis, congestión, trombosis	13
• Arteriales:	19
○ sangrado	13
○ trombosis aguda	2
• Donantes malos/mala perfusión	13
<b>COMPLICACIONES TARDIAS</b>	
• Trombosis Arterial	4
• Obstrucción Intestinal	4
• Evisceración del Estoma	6
• Sepsis	9



## 2. SEGUNDA FASE: DESARROLLO DE UN MODELO DE RECHAZO AGUDO. ESTUDIOS DE LOS MECANISMOS DE RECHAZO

Tras superar la curva de aprendizaje, 26 trasplantes fueron incluidos en el estudio, constituyendo una muestra muy homogénea (“Base de datos Rechazo”: supervivencia mayor de 6 días, realizados mediante técnica heterotópica, y a los que no se les administró CTM). De estos, los 16 sacrificados el día 14 fueron también utilizados posteriormente, en la tercera fase del estudio, como controles para comparar con los grupos con CTM.

### I. TIEMPOS MEDIOS QUIRÚRGICOS

Los tiempos medios quirúrgicos fueron más cortos que en la base general, obviamente tras la mejoría de la técnica microquirúrgica, así como del manejo anestésico y postoperatorio, como se refleja en la Tabla 17.

**Tabla 17:** Tiempos medios quirúrgicos

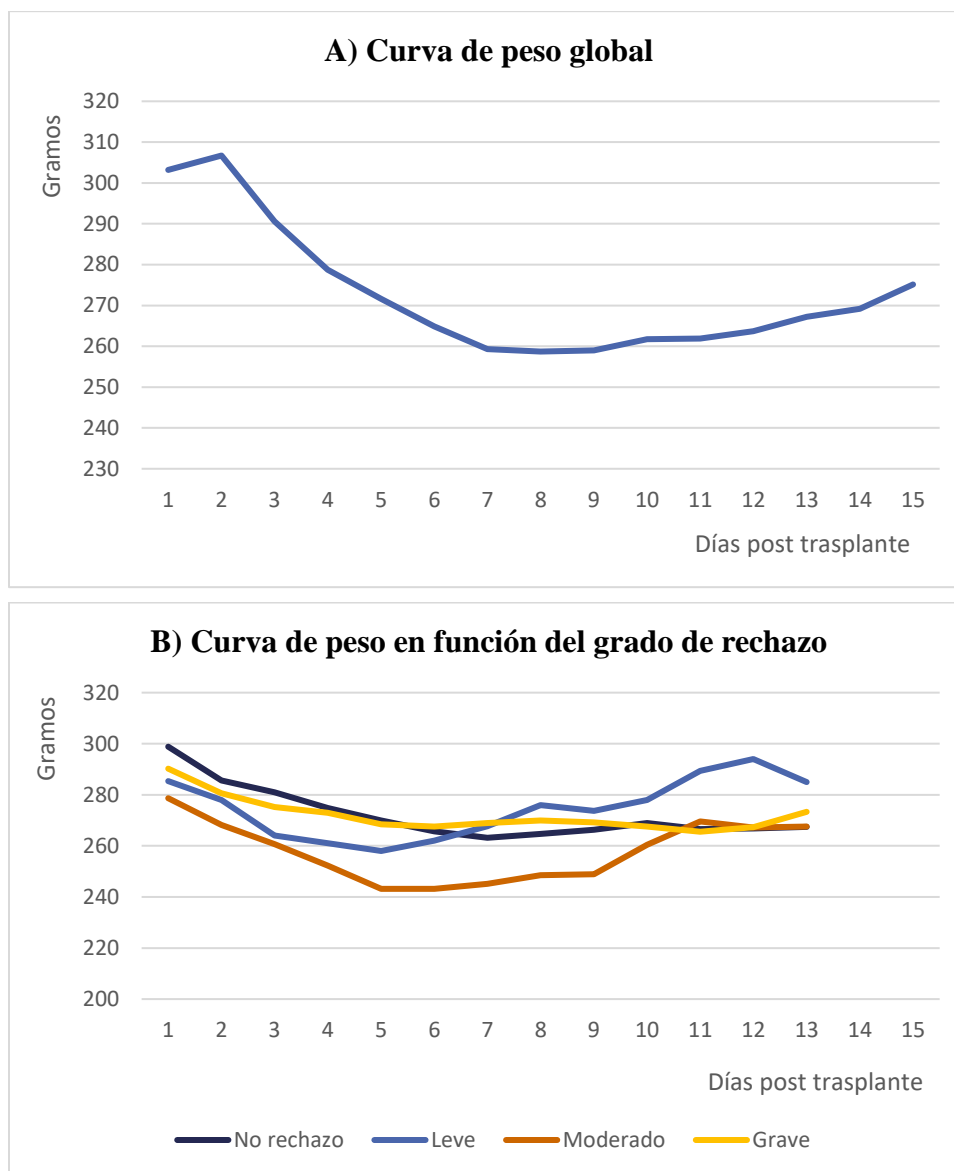
	Base de datos “Curva de aprendizaje” (n=178)	Bases de datos “Estudio de Rechazo” (n=26)
<b>Donante</b>	38 min (18-64)	32 min (23-48)
<b>Anastomosis venosa</b>	18 min (10-54)	15 min (11-25)
<b>Anastomosis arterial</b>	16 min (6-36)	14 min (10-24)
<b>Isquemia caliente</b>	38 min (18-73)	30 min (22-49)
<b>Isquemia total</b>	79 min (58-182)	78 min (62-130)
<b>Receptor</b>	99 min (60-164)	81 min (60-97)
<b>Trasplante total</b>	153 min (108-244)	130 min (110-181)

### II. SEGUIMIENTO POSTOPERATORIO DE LOS ANIMALES

El peso medio de las donantes y receptoras al trasplante fue de 253±23 gr; y 301±39gr, respectivamente. El primer día postoperatorio todos los animales aumentaron de peso (media 3 gr) debido a la inyección de suero fisiológico subcutáneo durante la intervención y al injerto adicional alojado en su abdomen (peso medio del injerto 8±2 gr). A partir del segundo día recuperaron su peso previo al trasplante y comenzaron a perder peso (media 10gr/día) hasta el 5-6 día. A partir de

## RESULTADOS

entonces los animales se estabilizaron y comenzaron a ganar peso (media 3 gr /dia), debido a la ingesta de comida confirmado por la presencia de heces de buena consistencia en la jaula. Sin embargo, los receptores que comenzaron a desarrollar rechazo dejaron de ganar peso, perdieron grasa y masa muscular mientras el perímetro abdominal aumentaba (Figura 21).



**Figura 21:** Ganancia de peso postoperatoria. A) curva de peso global; B) curva de peso en función del grado de rechazo que desarrollaron.

Los estomas presentaron buen aspecto en la mayoría de los casos excepto en 2 animales, que se reintervinieron por prolapso. La mayoría expulsaron moco a través del estoma durante la primera

semana, momento a partir del cual, aquellas que desarrollaron rechazo comenzaron a presentar distensión abdominal e induración que fue aumentando progresivamente a lo largo de los siguientes días hasta el momento del sacrificio, siendo necesario vaciarles el estoma mediante masaje abdominal. Esto fue necesario sobre todo en aquellos grupos sin Tacrolimus, seguido de aquellos con Tacrolimus solo 5 días, a diferencia de aquellos con Tacrolimus diario hasta el sacrificio, que presentaron un abdomen normal en todo momento (Figura 22).

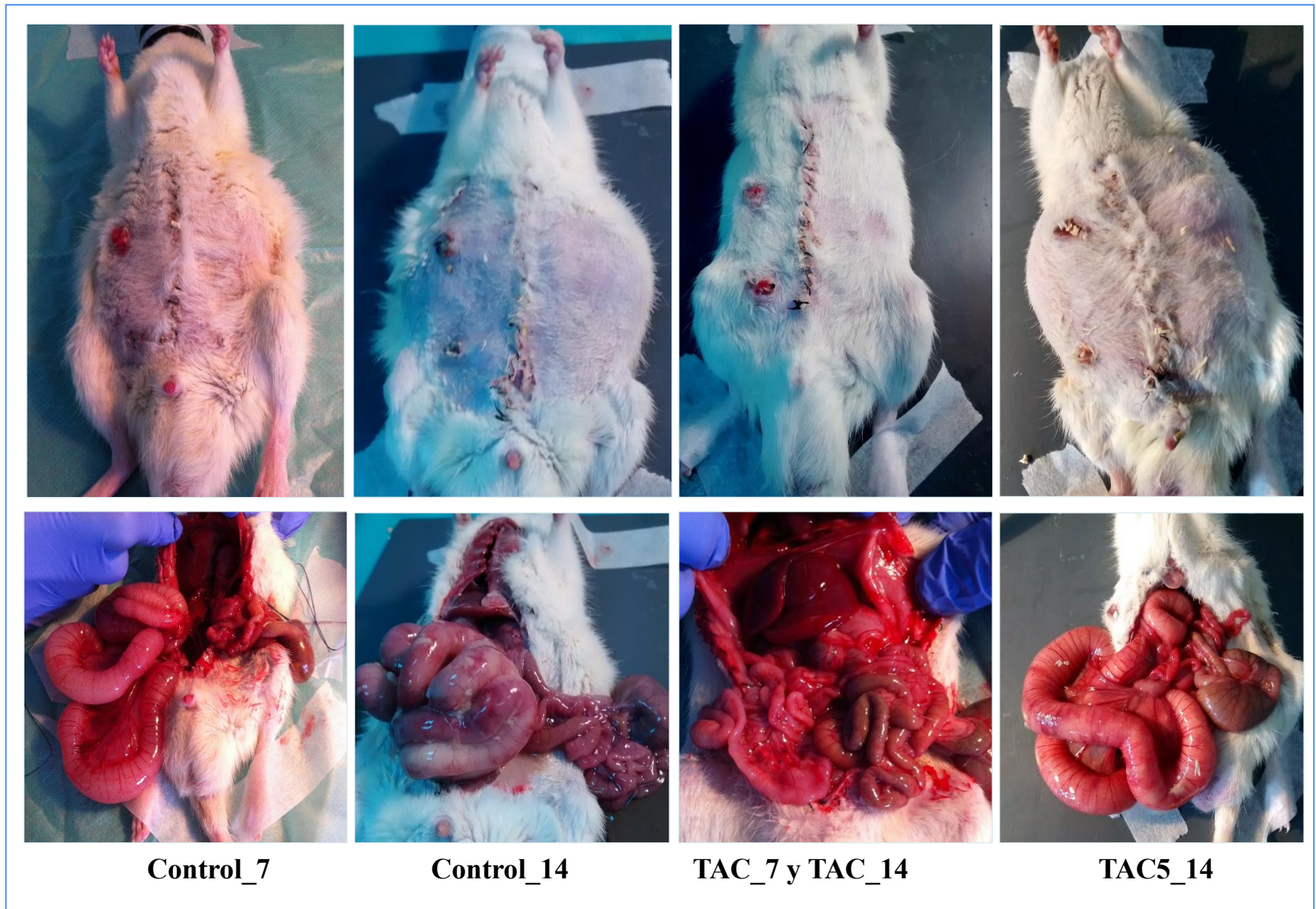


**Figura 22:** Moco generado en el injerto intestinal tras un TIA heterotópico (sacrificio en el 7º día)

### III. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES; ESTUDIO MACROSCÓPICO DEL INJERTO

En total, todos los animales del estudio estaban vitales en el momento del sacrificio excepto 3, que acababan de fallecer minutos o escasas horas antes. Aquellos con rechazo intenso presentaban una distensión abdominal muy importante que les impedía moverse con facilidad. En ningún caso observamos alteraciones macroscópicas en otros órganos del animal a excepción del injerto, que en función del grupo, presentaba diferentes grados de rechazo con afectación importante del mesenterio en los casos más graves. En el **grupo control sacrificado al 7º día**, el injerto aparecía dilatado y lleno de moco, con un mesenterio normal o levemente engrosado, muy llamativo frente a un intestino nativo normal. En el **grupo control sacrificado al día 14**, el intestino presentaba una fibrosis intensa sin permitir despegar unas asas de otras y con un mesenterio muy engrosado, siendo en ocasiones difícil diferenciar ambos tejidos. El bazo de aquellos animales que presentaban macroscópicamente un rechazo grave estaba aumentado de tamaño. El intestino nativo del receptor estaba normal en todos los casos. Todos los animales tratados con una dosis baja de Tacrolimus diaria hasta el sacrificio presentaron una vitalidad mayor que los demás, y un intestino macroscópicamente normal (Figura 23).

RESULTADOS



170 **Figura 23:** Aspecto general del animal y de su abdomen así como la inspección general del intestino donante y nativo tras la laparotomía al sacrificio en función de cada grupo de tratamiento.

#### IV. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS (HEMATOXILINA-EOSINA)

**INJERTO INTESTINAL:** La puntuación de rechazo macroscópico al sacrificio se correlacionó muy bien con la histológica (Ver Figura 24). Todos los controles sacrificados alrededor del 7 ° día postoperatorio presentaban un rechazo indeterminado o muy leve, con infiltración linfocitaria difusa y mínimas apoptosis, pese a tratarse de una luz intestinal muy dilatada y llena de moco. Sin embargo, todos los controles (excepto 1, que no presentaba rechazo) sacrificados alrededor del 14 día postoperatorio presentaban un rechazo muy grave con ulceración de la mucosa y arquitectura totalmente distorsionada. Curiosamente, el control que se sacrificó por malestar del animal el día 11 presentaba un rechazo leve-moderado por lo que quizá no es hasta este momento cuando el rechazo evoluciona a grave. Todos los animales tratados con Tacrolimus (TAC\_7 y TAC\_14) presentaban un injerto histológicamente normal. Sin embargo, aquellos tratados con Tacrolimus un periodo corto de tiempo (TAC5\_14) desarrollaron un rechazo leve-moderado con > 6 cuerpos apoptóticos por campo.

Las pequeñas diferencias encontradas dentro de cada grupo podrían explicarse por dos motivos: en primer lugar, las variaciones entre individuos con respecto a la absorción del Tacrolimus. En segundo lugar, podrían deberse a pequeños errores al hacer la dilución que se magnifican cuando se trata de animales con tan poco peso, aunque éstos se pesaron diariamente para calcular la dosis de la forma más exacta posible y se usaron jeringas de 1ml para minimizarlos.

RESULTADOS

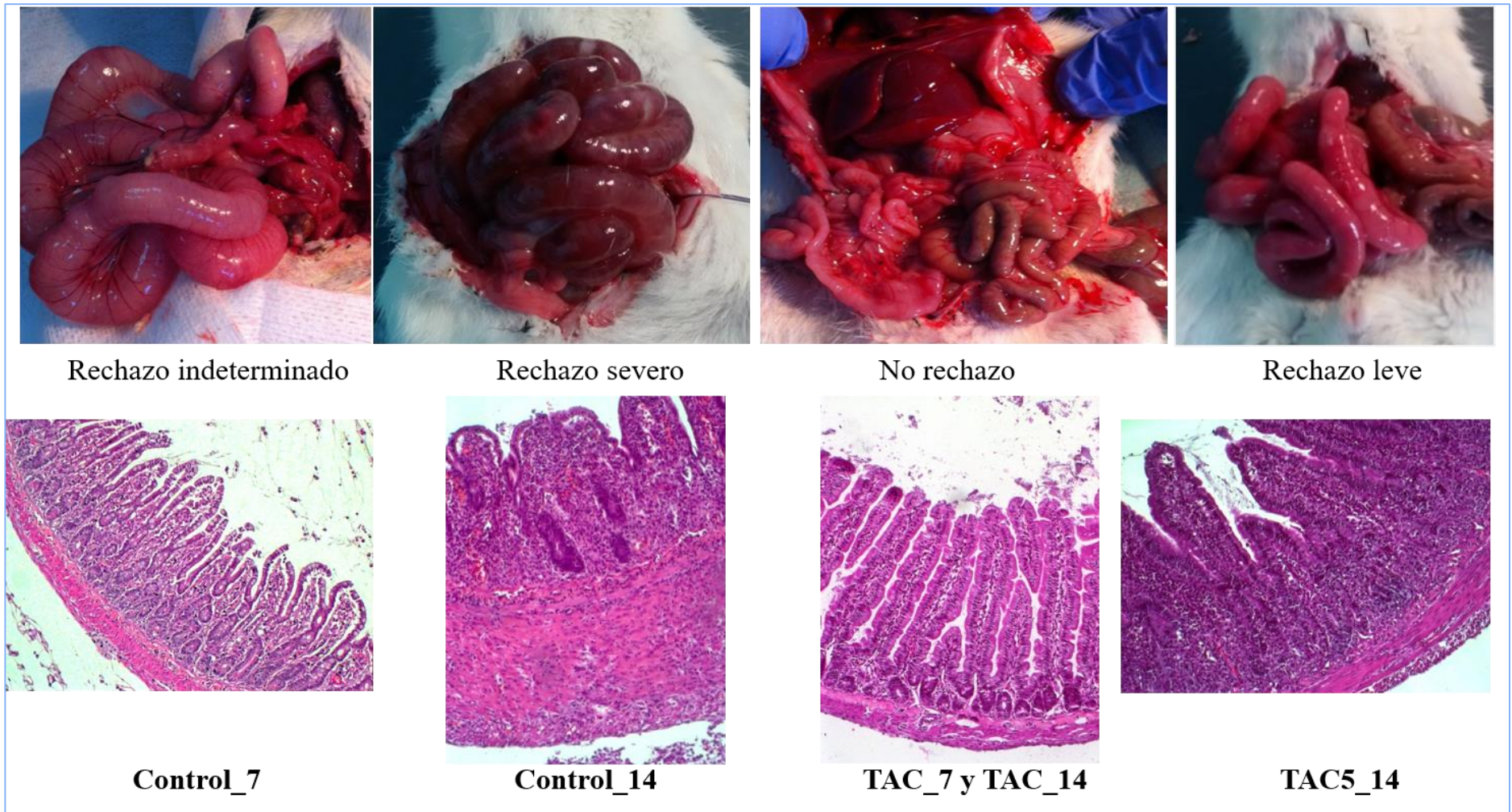
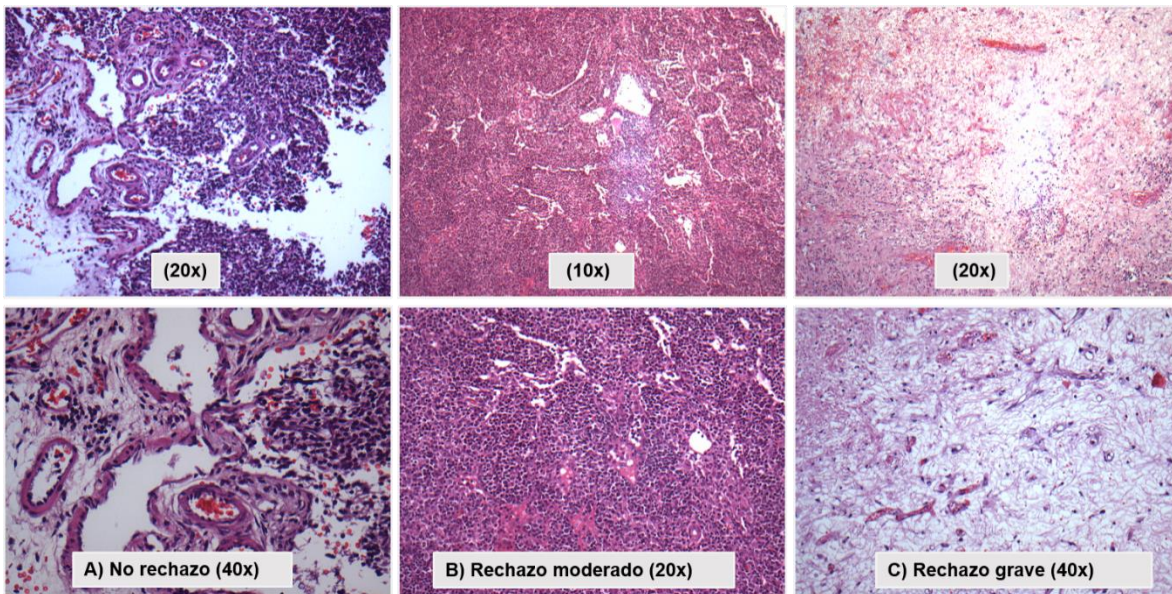


Figura 24: Aspecto macroscópico e histológico del injerto al sacrificio en función de cada grupo de tratamiento

**MESENTERIO:** Aquellos animales tratados con Tacrolimus diario hasta el sacrificio (Grupos TAC\_7 y TAC\_14), no presentaron rechazo y tenían ganglios normales no reactivos. Aquellos que presentaron rechazo leve o indeterminado mostraron leve inflamación y poca fibrosis a nivel del mesenterio. Conforme avanzaba el grado de rechazo, dichos ganglios se vieron más deplecionados de linfocitos y sustituidos por abundantes macrófagos. Sin embargo, aquellos animales que desarrollaron rechazo grave mostraron depleción absoluta del ganglio, con mucha arteritis necrotizante y fibrosis (Figura 25).

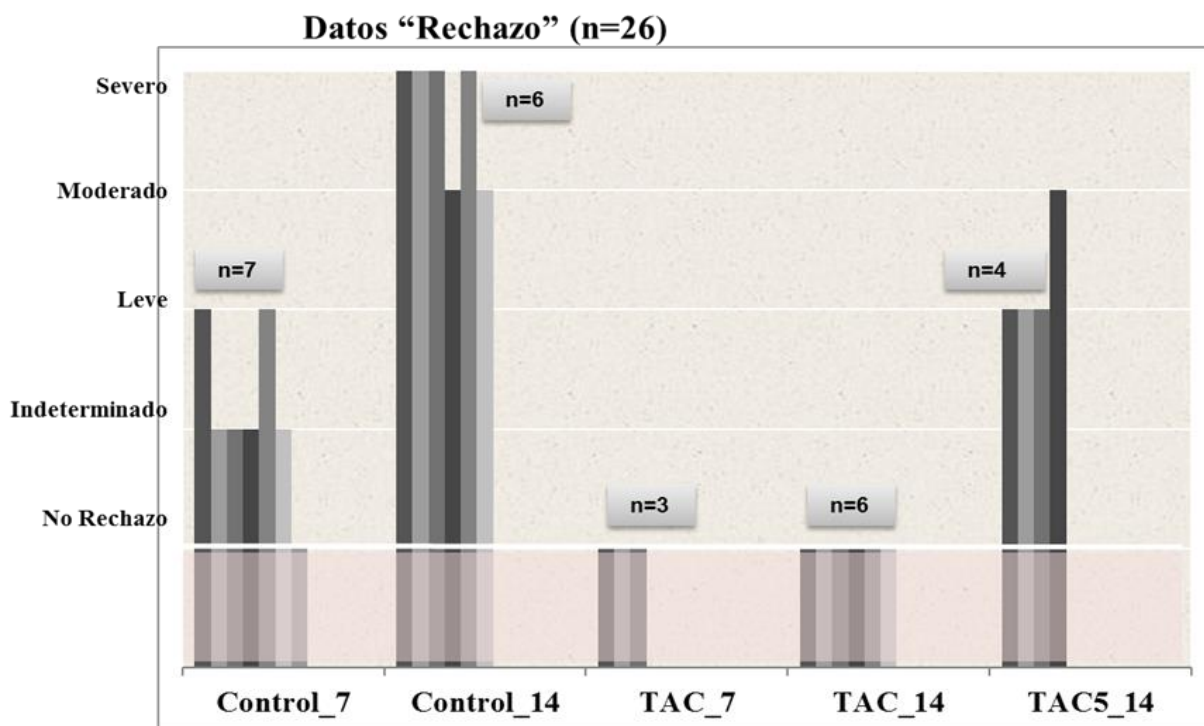


**Figura 25:** Mesenterio de un injerto A) sin rechazo; B) con rechazo leve-moderado; y c) con Rechazo grave.

## RESULTADOS

### V. ANALISIS DE LA VALIDEZ DEL MODELO

En la Figura 26 se muestran los grados de rechazo agrupando los trasplantes en los diferentes grupos.



**Figura 26:** Grado de rechazo en función de la inmunosupresión recibida y el día del sacrificio. “Desarrollo del modelo de rechazo agudo”.

La comparación de la incidencia de rechazo entre los 4 grupos en conjunto mediante el método log-rank, juntando los grupos TAC\_7 y TAC\_14 (grupo TAC), dio un valor significativo ( $p = 0.0000619$ ). Al comparar los grupos de dos en dos, observamos algunas diferencias significativas:

	Control_14	TAC	TAC5
Control_7	$p = 0,00696$	$p = 0,0306$	$p = 0,00572$
Control_14		$p = 0,0762$	$p = 0,0334$
TAC			$p = 0,513$



### 3. TERCERA FASE: ESTUDIO DEL ROL INMUNOMODULADOR DE LAS CTM EN LA PREVENCIÓN DEL RECHAZO AGUDO EN EL MODELO DESCRITO EN LAS FASES PREVIAS

En la **tercera fase del estudio**, o “Estudio del Rol Inmunomodulador de las CTM en la prevención del rechazo agudo” en el modelo descrito, todos los trasplantes se habían desarrollado en la etapa 5 y 6 de la curva de aprendizaje.

Los receptores se dividieron en 5 grupos experimentales, en función si recibieron Ad-CTM o no y de si recibieron Tacrolimus o no (n total de 38). A su vez, dentro de los grupos con Ad-CTM, estas procedían de ratas *third party* o autólogas.

#### I. TIEMPOS MEDIOS QUIRÚRGICOS

Los tiempos medios quirúrgicos fueron más cortos que en la base de datos general y en la del rechazo, y por tanto, las muestras aun más homogéneas, como se refleja en la Tabla 18. Tres receptoras murieron antes del implante por problemas técnicos y se utilizó el injerto para otro animal, por lo que aumentó ligeramente el tiempo de isquemia fría. Como ya se ha comentado, no hubo complicaciones trombóticas por la infusión intraarterial de las CTM en ningún caso, todos los trasplantes se realizaron con éxito.

**Tabla 18:** Tiempo medios quirúrgicos (rango) comparando las tres fases de la curva de aprendizaje.

	Datos “Curva de aprendizaje” (n=178)	Datos “Estudio de Rechazo” (n=26)	Datos “Estudio de las CTM” (n=38)
<b>Donante</b>	38 min (18-64)	32 min (23-48)	30 min (18-43)
<b>Anast venosa</b>	18 min (10-54)	15 min (11-25)	13 min (10-25)
<b>Anast arterial</b>	16 min (6-36)	14 min (10-24)	13 min (6-23)
<b>Isquemia caliente</b>	38 min (18-73)	30 min (22-49)	34 min (18-49)
<b>Isquemia total</b>	79 min (58-182)	78 min (62-130)	76 min (62-130)
<b>Receptor</b>	99 min (60-164)	81 min (60-97)	85 min (60-125)
<b>Trasplante total</b>	153 min (108-244)	130 min (110-181)	128 min (108-203)

II. SEGUIMIENTO POSTOPERATORIO DE LOS ANIMALES

El postoperatorio de los animales que recibieron CTM fue similar al de los que recibieron placebo, sin ninguna complicación ni mejoría aparente añadida. La ganancia de peso se refleja en la Figura 27 y la aparición de la distensión abdominal por el rechazo a partir del día 7-8, junto con una menor respuesta vital a estímulos, en aquellos sin Tacrolimus y mucho menos evidente en aquellos con Tacrolimus, fue similar en los grupos con y sin CTM.

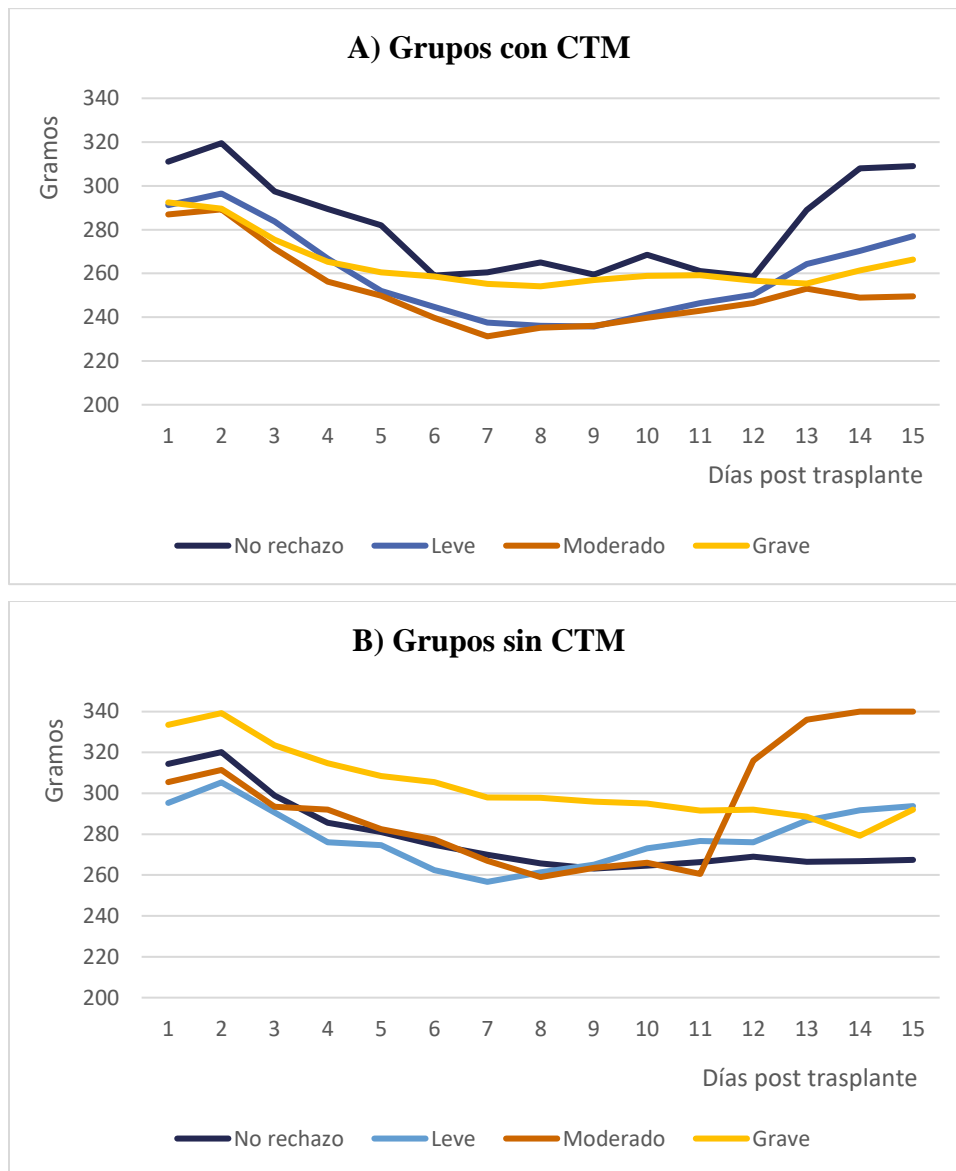


Figura 27: Curva de peso en función del grado de rechazo comparando los grupos A) con CTM, frente a los B) sin CTM.

### III. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES; ESTUDIO MACROSCÓPICO DEL INJERTO

No observamos una mejoría clara macroscópica del rechazo en los animales tratados adicionalmente con CTM (independientemente de la cepa de origen). De hecho, hubo un animal que no desarrolló nada de rechazo en el grupo placebo control, mientras que esto no se vio en ningún animal con CTM. Sin embargo, observamos algunos datos curiosos:

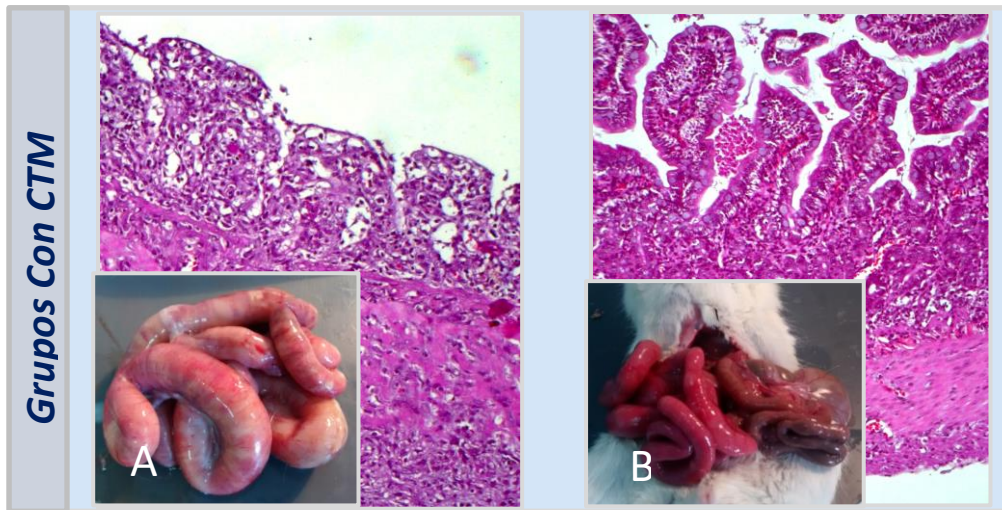
Respecto a los controles con CTM, éstos desarrollaron un rechazo grave a los 14 días excepto 3 que desarrollaron un rechazo moderado (a diferencia de los grupos sin CTM, donde sólo un rechazo fue moderado). Curiosamente cuatro animales inicialmente asignados en estos grupos con CTM fueron sacrificados antes de tiempo (días 8, 9, 7 y 11 tras el trasplante, los tres primeros, para simplificar, se incluyeron en un grupo denominado TAC\_7 + CTM), y ninguno de ellos presentaba signos de rechazo, ni siquiera el sacrificado en el día 11.

En el grupo TAC5\_14 + CTM, hubo un animal que presentó rechazo intenso, en contra del papel inmunomodulador de las CTM. Sin embargo, revisando retrospectivamente los datos del animal, se trataba de un trasplante donde hubo mucha congestión venosa y sangre por el estoma durante los primeros días postoperatorios, que además precisó reintervención, por lo que no debería ser considerado a efectos de rechazo.

### IV. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS (HEMATOXILINA-EOSINA)

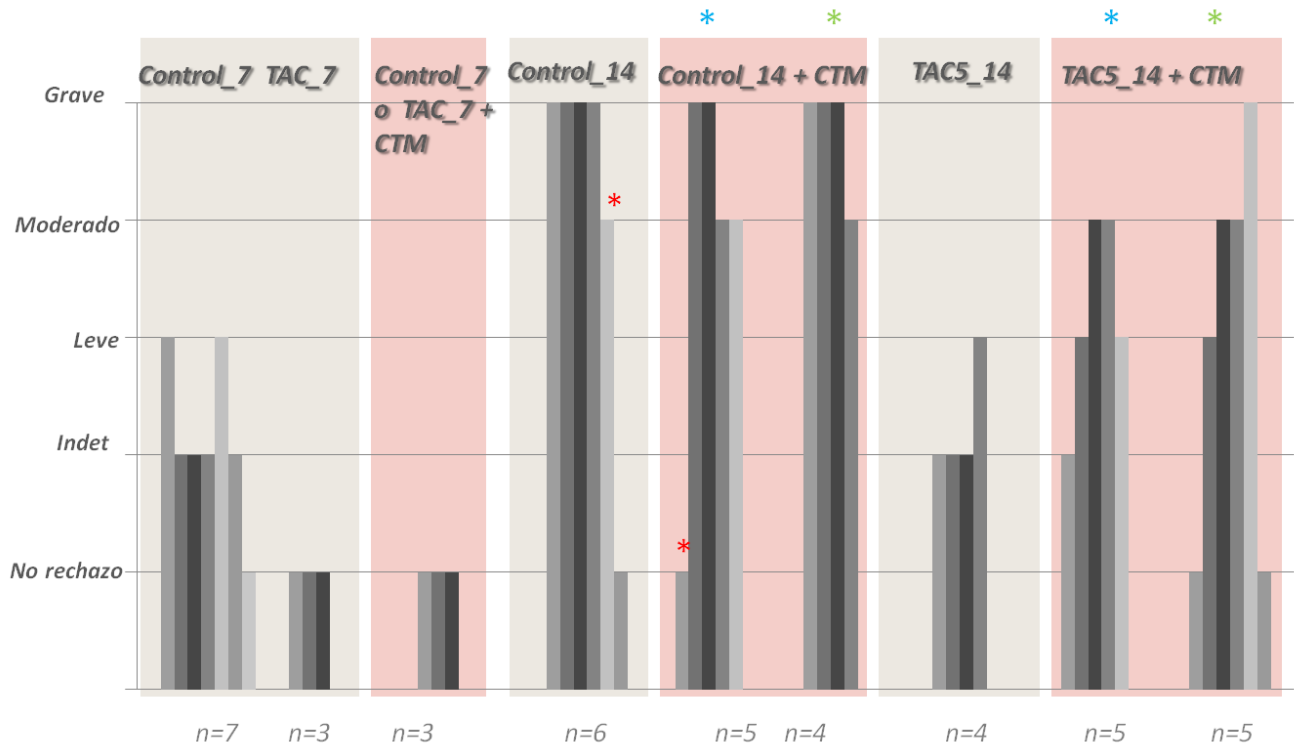
#### INJERTO INTESTINAL Y MESENTERIO:

Al igual que en la fase previa, la puntuación de rechazo macroscópico al sacrificio se correlacionó muy bien con la histológica (Ver Figura 28). Cuando analizamos el **grado de rechazo en los diferentes grupos** (CONTROL, CONTROL + CTM, TAC, TAC+ CTM), seleccionando sólo las muestras más representativas de cada grupo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $\text{CHI}^2$ : 14,37;  $P= 0,11$ ).



*Buena correlación macroscópica e histológica*

**Figura 28:** Aspecto macro y microscópico del injerto en los grupos con CTM: (A) Rechazo grave; (B) Rechazo leve-moderado.



\* sacrificio el día 11 tras el trasplante, 3 días antes del previsto.

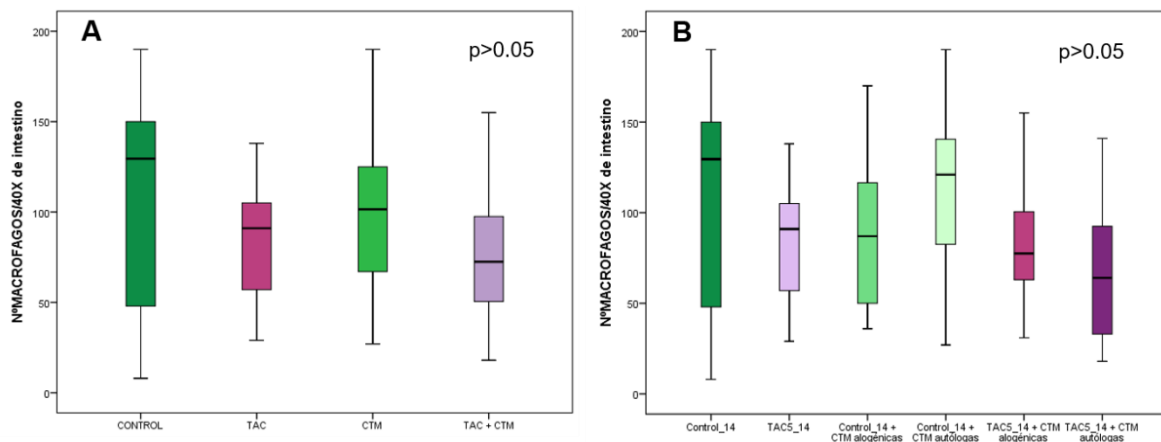
\* CTM procedentes de cepa third party (Sprague); \* CTM procedentes de cepa receptora (Lewis)

**Figura 29:** Puntuación del grado de rechazo en los grupos de “Estudio del rol de las CTM”, de acuerdo con los criterios de *Wu et al* [312]

V. INMUNOHISTOQUÍMICA: ESTUDIO DE POBLACIONES DEL SISTEMA INMUNE

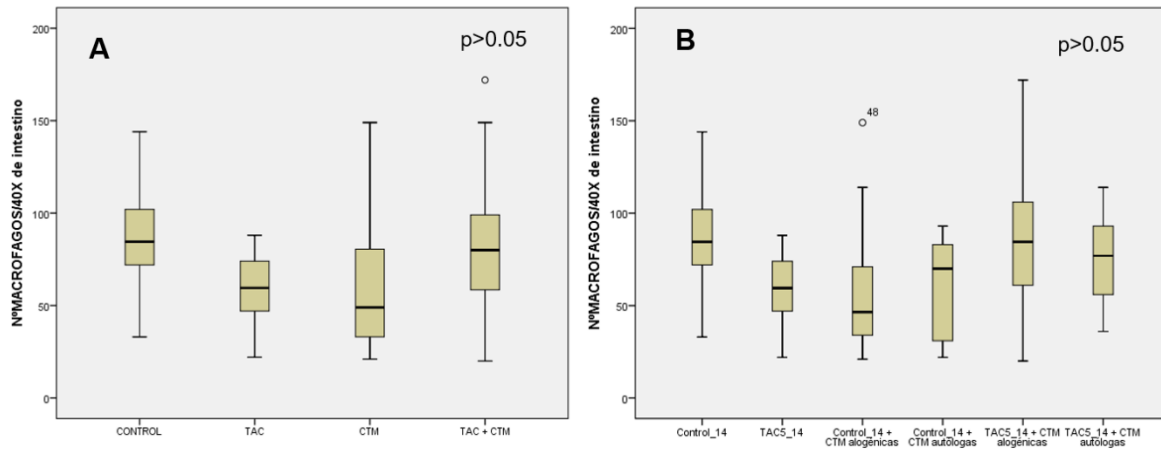
a. SISTEMA INMUNE INNATO: MACRÓFAGOS CD68+

En la Figura 30 y Figura 31, se comparan la media de macrófagos en las preparaciones de intestino y de mesenterio de los trasplantes más representativos de cada grupo. En general, en ambos observamos una disminución en el número de macrófagos en el grupo control con CTM, frente al grupo sin CTM, aunque debido al escaso número de muestras, esta diferencia no fue significativa ( $p>0,05$ ). Esto no fue tan evidente en los grupos tratados adicionalmente con Tacrolimus ( $p>0,05$ ). Tampoco lo fue al subdividir los grupos con CTM en función de si eran autólogas o alogénicas (Figura B). La presencia de abundantes macrófagos se vio ya en el día 7, en especial en el mesenterio, como corresponde a una población característica del sistema inmune innato. Lo que sí se correlacionó fue el tratamiento con Tacrolimus, y consecuentemente el menor grado de rechazo, con el descenso de macrófagos, siendo esta correlación significativa en las muestras de intestino ( $p=0,016$ ; coeficiente Rho de Spearman =0,499), aunque no en las de mesenterio ( $p=0.512$ ) (Figura 32).

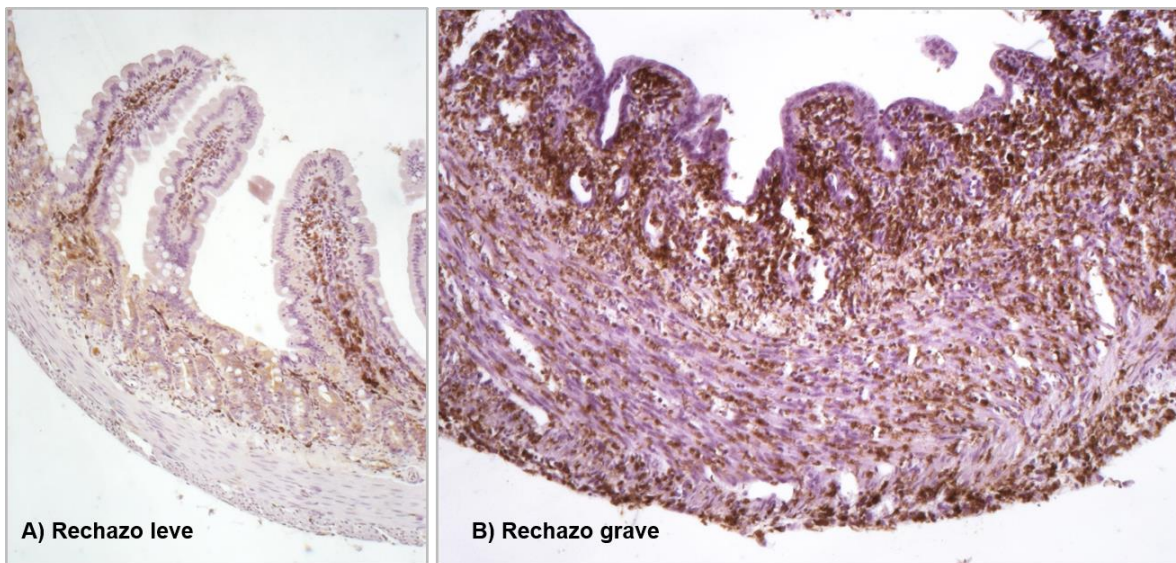


**Figura 30:** Promedio de macrófagos CD68+ en el **injerto intestinal** (A) comparando los cuatro grupos de tratamiento, y (B) especificando si las CTM fueron autólogas o alogénicas.

## RESULTADOS



**Figura 31:** Promedio de macrófagos CD68+ en el **mesenterio del injerto** (A) comparando los cuatro grupos de tratamiento, y (B) especificando si las CTM fueron autólogas o alogénicas.



**Figura 32:** Técnica de inmunohistoquímica para macrófagos CD68+ en el injerto intestinal, en una muestra con rechazo leve (A) y con rechazo grave (B).

## b. SISTEMA INMUNE ADQUIRIDO: LINFOCITOS CD4, CD8, CD20

- **Observaciones generales:**

La inmunohistoquímica permitió muy bien ver y contar los CD8, muy predominantes, especialmente en las muestras con rechazo. Resultó más difícil con el CD4, al haber mucho fondo, aunque al final sí se identificaron zonas más o menos teñidas, especialmente en la submucosa. Todo lo contrario, ocurrió con el CD20, donde se teñió bastante poco, aunque al final también pudieron observarse diferencias entre las muestras, dentro de una puntuación siempre bastante baja.

En el **epitelio de la mucosa**, en general, se vieron pocas células teñidas. Los CD4 parecían secretarse hacia la luz, especialmente cuanto mayor grado de rechazo y menos íntegra la mucosa (tanto en los grupos control como en los grupos con CTM). Sin embargo, los CD8 parecían quedarse infiltrando entre las criptas y la submucosa (sólo en los rechazos más graves parecían también infiltrar el epitelio). Las CD20 se vieron también excretándose, sobre todo en los rechazos más graves, pero al ser minoritarias, en los casos más leves se observaban más en la serosa y en el mesenterio.

Donde más células teñidas se observaron fue en la **lamina propia y muscularis mucosae de la mucosa** (en las vellosidades y, especialmente en las glándulas o criptas de Lieberkuhn), y en la **submucosa**.

En la **capa muscular**, apenas se observaron linfocitos, sólo en los casos de rechazo muy severo y gran desestructuración de la arquitectura intestinal. Los escasos visibles en rechazos menos graves probablemente estaban migrando a infiltrar la submucosa.

En la **serosa**, donde existe abundante tejido adiposo y vasos, también se observaron linfocitos llegando hacia las criptas.

En el **mesenterio** se observaron muchas células teñidas, algunas dentro de los vasos, y otras próximas a ellos, formando parte de la grasa. Esta zona resultó de difícil interpretación al existir otras células endoteliales que podrían ser falsos positivos. No obstante, la medición se hizo de la misma forma en todos los casos.

### **Observaciones específicas de cada subpoblación linfocitaria:**

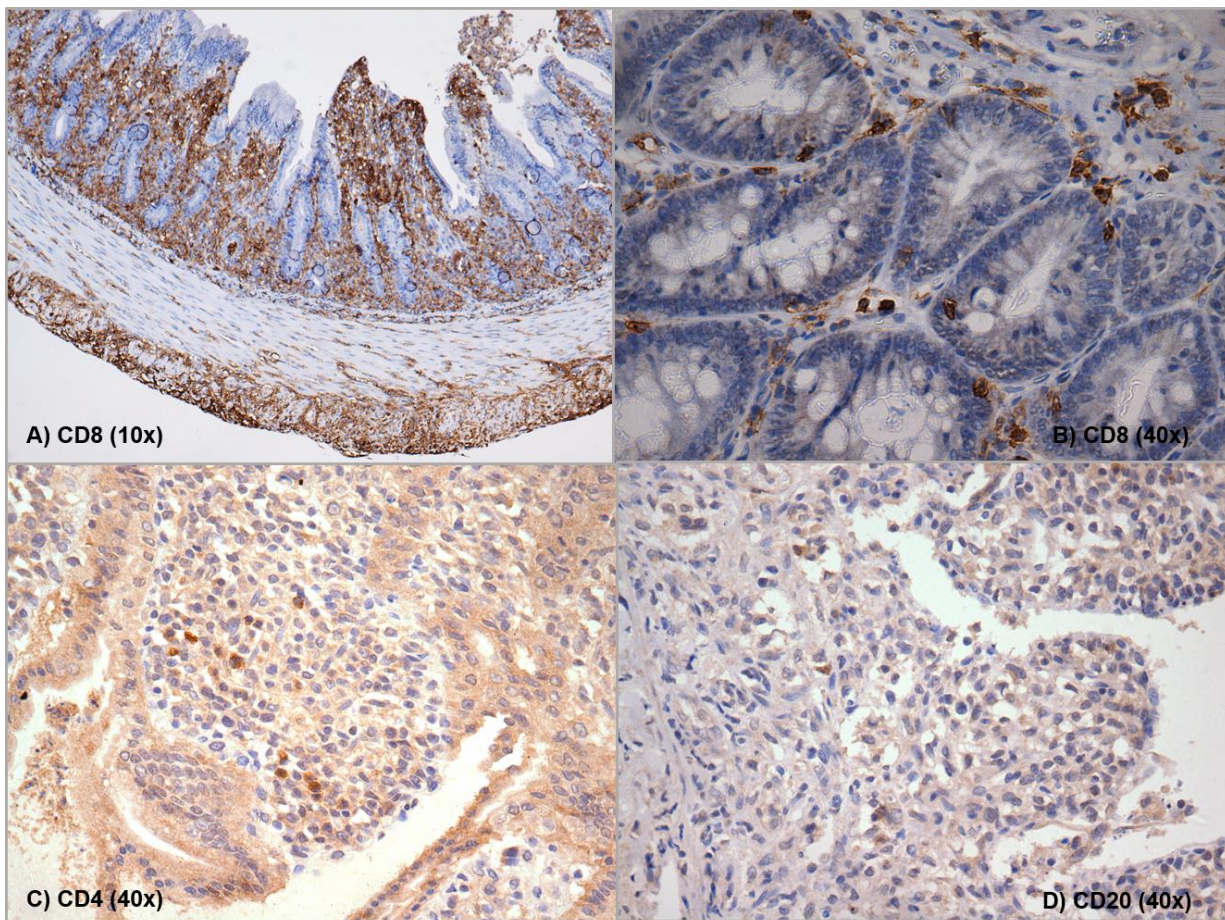
Los **CD4** disminuyeron mucho en los grupos con CTM y con mucho rechazo, sin embargo, se mantuvieron igual o incluso aumentaron ligeramente en los grupos con menos rechazo tratados con

## RESULTADOS

Tacrolimus. Esto se observó en general en todas las capas del intestino, aunque fue más evidente en la submucosa y en el mesenterio, donde predominan más. En los rechazos más graves, se vieron a nivel de la mucosa rota secretándose hacia la luz. Los **CD8**, en cambio, fueron muy abundantes y aumentaron en los grupos con CTM y mucho rechazo, especialmente en la submucosa, en la serosa y en el mesenterio. Sin embargo, en los grupos con rechazo intermedio por el Tacrolimus, se mantuvieron parecidos en los grupos con y sin CTM. En general, no parecieron excretarse tanto hacia la luz como los CD4, y se observó una mayor diferencia entre lo poblada de CD8 que estaba la submucosa frente al resto de capas, a diferencia de los CD4 o CD20. El comportamiento de los **CD20** fue similar al de los CD4, disminuyeron en los grupos con CTM, especialmente aquellos que desarrollaron mucho rechazo; en los que presentaron rechazo intermedio se mantuvieron igual. De todas formas, no parecen tener un papel muy protagonista en el rechazo ya que se obtuvieron puntuaciones muy bajas.

Pese a todas estas observaciones, las diferencias entre los grupos tratados con y sin CTM o con o sin TAC no fueron significativas ( $p>0.05$ ). Tampoco se vieron diferencias en cuanto a la procedencia de las células en ninguno de los grupos estudiados. Sí fue significativa la correlación entre el grado de rechazo y el conteo de las distintas poblaciones en algunas capas del intestino, como por ej., los CD4 en mucosa, serosa y mesenterio, y los CD8 en muscular y serosa (Tabla 19, Tabla 20, Figura 33, Figura 34).





**Figura 33:** Imágenes del intestino tras tinción inmunohistoquímica para CD4, CD8 y CD20

RESULTADOS

**Tabla 19:** Se describen las medias obtenidas de cada grupo (A), y con el fin de simplificar, la de los grupos comparables (B) (CONTROL, TAC, CONTROL + CTM, TAC + CTM).

**Tabla A**

<b>CD4</b>	MUCOSA	SUBMUCOSA	MUSCULAR	SEROSA	MESENTERIO	PROMEDIO
Control 7d	1,1	0,8	0,6	1,3	1,5	1,06
Control14d	2	2,4	1,4	1,9	2	1,94
Control TAC7d	0,1	0,6	0,2	0,6	0,5	0,4
Control TAC14d	0,3	0,5	0,1	0,4	0,6	0,38
Control TAC_5 14d	0,3	0,6	0,2	0,3	0,5	0,38
CTM ALOGÉNICAS	0,5	0,4	0,2	0,3	0,7	0,42
TAC_5 + CTM ALOGENICAS	0,4	0,6	0,1	0,4	0,5	0,4
CTM AUTÓLOGAS	0,7	0,9	0,3	0,7	0,8	0,68
TAC_5 + CTM AUTÓLOGAS	0,6	0,6	0,1	0,6	0,6	0,5
<b>CD8</b>	MUCOSA	SUBMUCOSA	MUSCULAR	SEROSA	MESENTERIO	
Control 7d	0,5	1,3	0,5	1,2	0,9	0,88
Control14d	0,4	2,1	1	1,7	1,4	1,32
Control TAC7d	0,1	0,7	0,1	0,5	0,6	0,4
Control TAC14d	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2
Control TAC_5 14d	0,3	2,6	0,2	0,5	1,3	0,98
CTM ALOGÉNICAS	0,1	2,4	0,6	2,4	2,3	1,56
TAC_5 + CTM ALOGENICAS	0,3	2,5	0,3	1,8	1,3	1,24
CTM AUTÓLOGAS	0,5	2,5	1,2	2	1,7	1,58
TAC_5 + CTM AUTÓLOGAS	0,1	2,5	0,9	1,1	0,9	1,1
<b>CD20</b>	MUCOSA	SUBMUCOSA	MUSCULAR	SEROSA	MESENTERIO	
Control 7d	0,1	0,4	0,1	0,6	0,7	0,38
Control14d	0,7	1	0,4	0,9	0,7	0,74
Control TAC7d	0,2	0,3	0,1	0,4	0,4	0,28
Control TAC14d	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,16
Control TAC-5 14d	0,1	0,4	0,1	0,4	0,4	0,28
CTM ALOGÉNICAS	0,3	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2
TAC_5 + CTM ALOGENICAS	0,1	0,5	0,1	0,5	0,4	0,32
CTM AUTÓLOGAS	0,5	0,5	0,1	0,4	0,6	0,42
TAC_5 + CTM AUTÓLOGAS	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,16

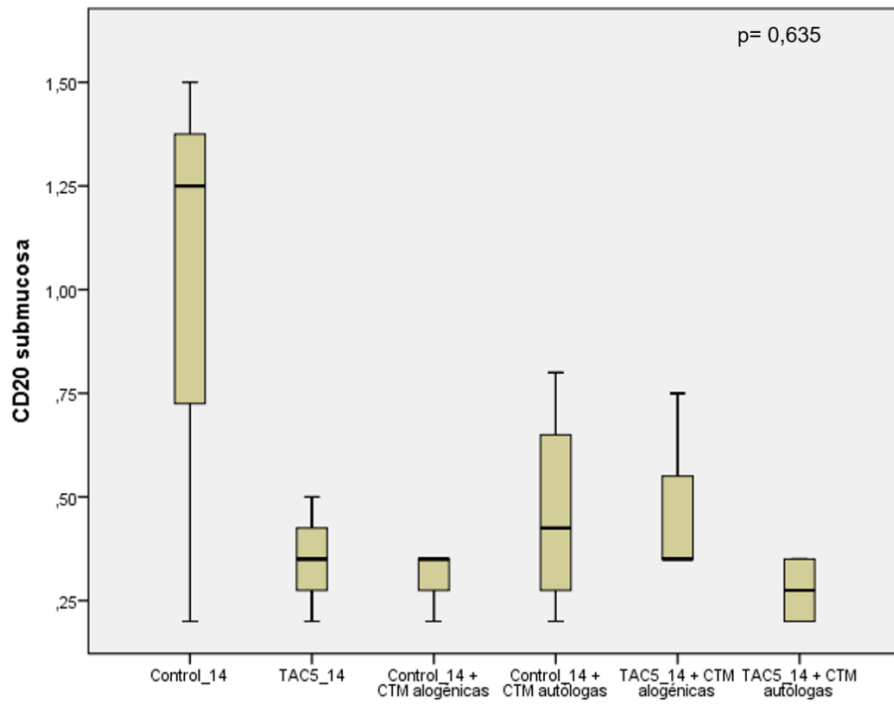
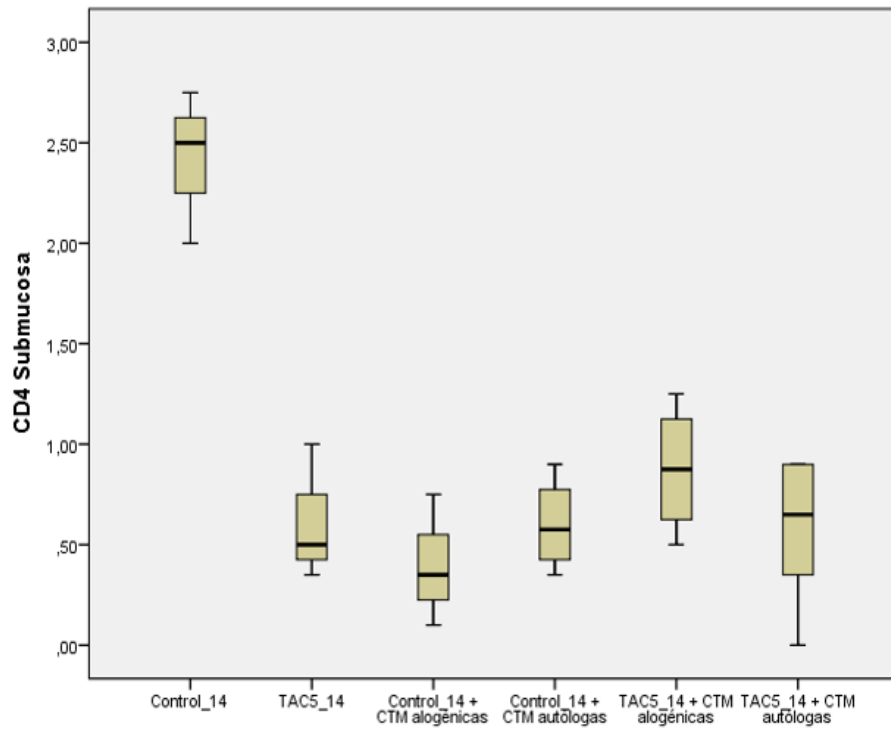
Tabla B

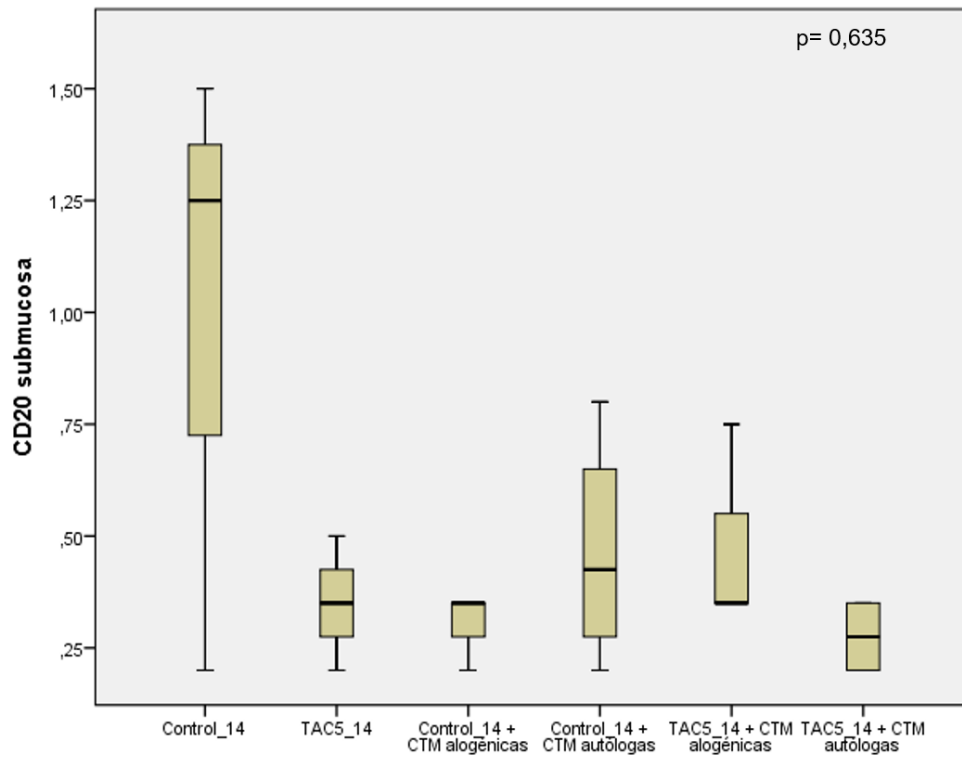
<b>CD4</b>	MUCOSA	SUBMUCOSA	MUSCULAR	SEROSA	MESENTERIO	PROMEDIO
CONTROL	2	2,4	1,4	1,9	2	1,94
TAC	0,3	0,6	0,2	0,3	0,5	0,38
CTM	0,6	0,6	0,3	0,5	0,8	0,56
TAC + CTM	0,5	0,6	0,1	0,5	0,6	0,46
<b>CD8</b>	MUCOSA	SUBMUCOSA	MUSCULAR	SEROSA	MESENTERIO	
CONTROL	0,4	2,1	1	1,7	1,4	1,32
TAC	0,3	2,6	0,2	0,5	1,3	0,98
CTM	0,3	2,4	0,9	2,2	2	1,56
TAC + CTM	0,2	2,5	0,6	1,4	1,1	1,16
<b>CD20</b>	MUCOSA	SUBMUCOSA	MUSCULAR	SEROSA	MESENTERIO	
CONTROL	0,7	1	0,4	0,9	0,7	0,74
TAC	0,1	0,4	0,1	0,4	0,4	0,28
CTM	0,4	0,4	0,1	0,3	0,4	0,32
TAC + CTM	0,1	0,4	0,1	0,3	0,3	0,24

Tabla 20: Correlación entre el grado de rechazo y la puntuación obtenida de cantidad de CD4, CD8, y CD20 en las distintas capas intestinales.

<b>CD4</b>	MUCOSA	SUBMUCOSA	MUSCULAR	SEROSA	MESENTERIO
Rho de Spearman	0,53	0,31	0,31	0,48	0,64
(p)	0,028	0,138	0,177	0,035	0,002
<b>CD8</b>	MUCOSA	SUBMUCOSA	MUSCULAR	SEROSA	MESENTERIO
Rho de Spearman	0,23	0,23	0,77	0,60	0,46
(p)	0,361	0,262	0,000	0,006	0,061
<b>CD20</b>	MUCOSA	SUBMUCOSA	MUSCULAR	SEROSA	MESENTERIO
Rho de Spearman	0,77	0,44	0,36	0,13	0,36
(p)	0,000	0,053	0,127	0,654	0,137

RESULTADOS





**Figura 34:** Diferencias entre los grupos a nivel de la submucosa, capa más representativa a la hora de estudiar las poblaciones linfocitarias

c. **CÉLULAS FOXP3+**

En el **intestino** el promedio de células Foxp3+ disminuyó en los controles con CTM, especialmente las autólogas, pero subió en los grupos con Tacrolimus y CTM, y de forma más llamativa con las CTM alogénicas, lo cual resulta interesante a favor la mediación de las CTM en rechazos leves o moderados, pero no tanto en los graves.

En el **bazo**, las diferencias fueron más por el hecho de haber sido tratadas con Tacrolimus (menos rechazo frente a más rechazo) que por haber sido tratadas con CTM (nivel de significación bajo,  $p=0,15$ , pero sin cumplir los estándares).

Ninguna de estas diferencias de fueron significativas, ni comparando los 4 grupos ni diferenciando el tipo de CTM, como se muestra en la Figura 35 y Figura 36. El coeficiente de correlación (Rho de Spearman) entre el grado de rechazo y el porcentaje de Foxp3 fue de  $-0,165$  para el intestino ( $p=0,4999$ ), y de  $-0,330$  para el bazo ( $p=0,155$ ).

RESULTADOS

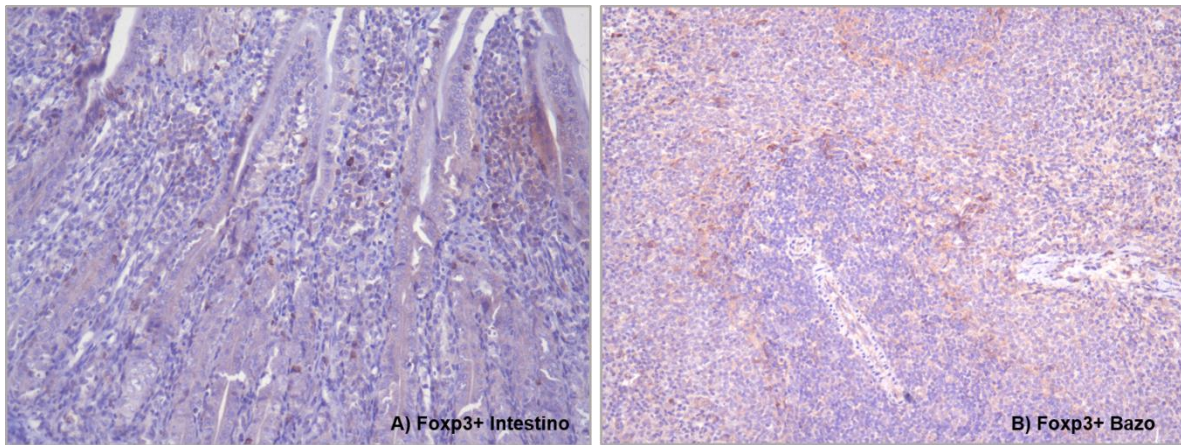


Figura 35: Imágenes del intestino y del bazo tras tinción inmunohistoquímica para Foxp3.

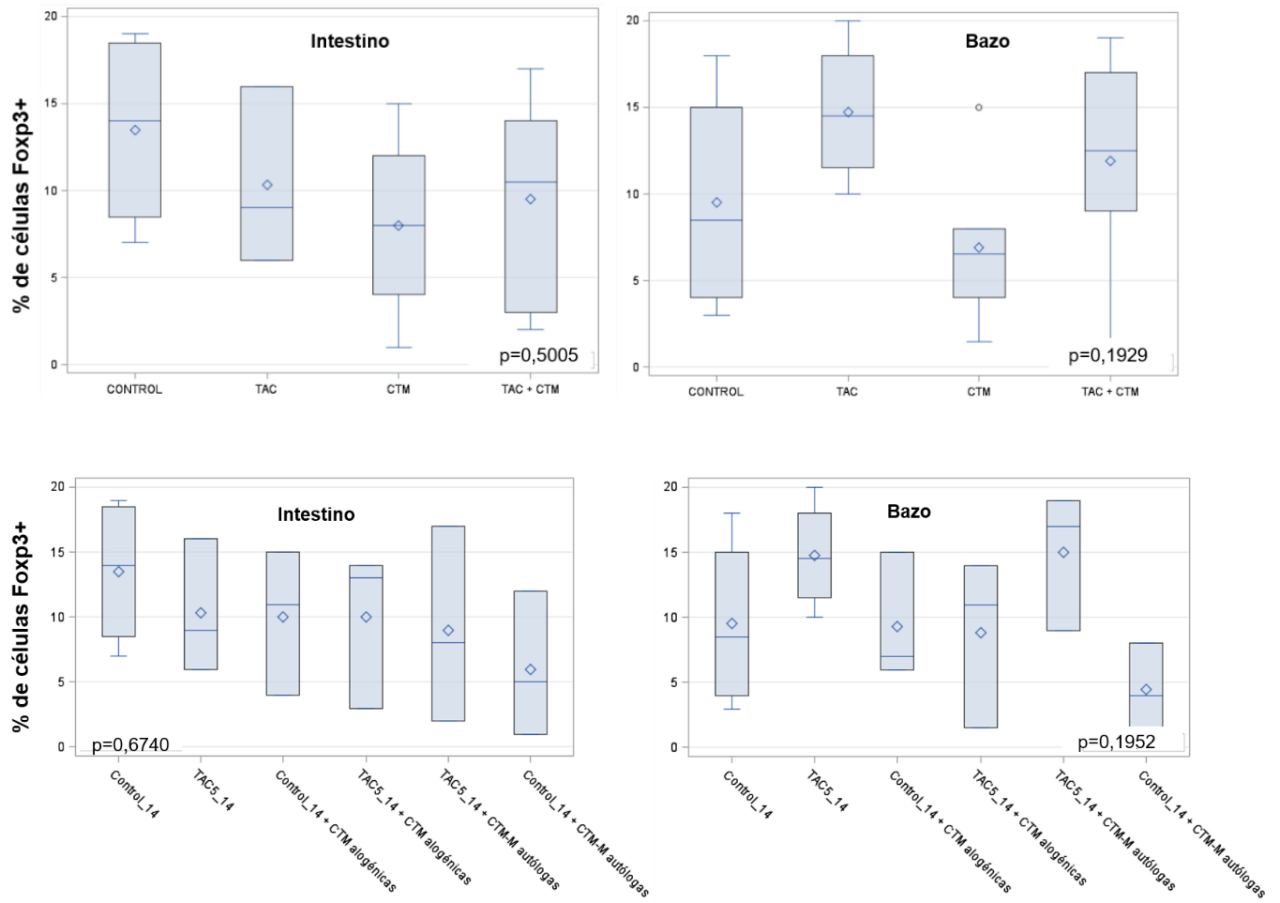


Figura 36: Diferencias de porcentaje de Foxp3 frente a la celularidad global, entre los distintos grupos a nivel del intestino y del bazo.

*En resumen, se vio una correlación entre el número de macrófagos, CD4 y CD8 y el grado de rechazo, y observamos algunas diferencias aunque no significativas, entre los grupos, especialmente en los casos de rechazo grave: así, tanto los macrófagos, como los CD4, como los CD20, disminuyeron más en los animales que fueron tratados con CTM, mientras que los CD8 subieron más en los tratados con CTM. El porcentaje de células reguladoras Foxp3+, sin embargo, fue menor en los rechazos graves, pero mayor en los rechazos leves tratados con CTM, sugiriendo esto último un papel de las CTM a favor de la regulación en los casos menos evolucionados..*

## VI. INMUNOFLUORESCENCIA (GFP; CM-DIL)

Las CTM se buscaron mediante técnicas de inmunofluorescencia, en todos los tejidos muestreados (bazo, pulmón, hígado, injerto), encontrando mucho fondo y muy pocos elementos fluorescentes que pudieran hacernos pensar que estaban ejerciendo su función inmunomoduladora.

## VII. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS PLASMÁTICAS

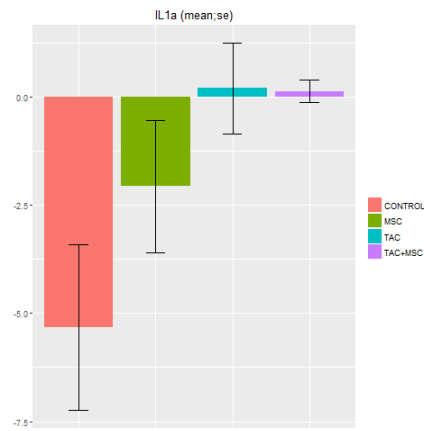
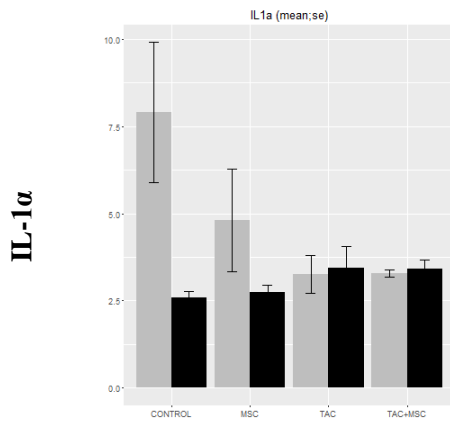
### a. INTERLEUQUINAS PROINFLAMATORIAS: IL1A, IL1B, TNFA, IL2, IL6; IFN $\gamma$ ; IL5, IL12, IL13, IL17

Los resultados se muestran en la Figura 37. En general, presentaron un comportamiento similar, obteniendo unos niveles inferiores de citoquinas en sangre al día 14 en los grupos control con respecto a los niveles pretrasplante, como si se hubiesen consumido parcialmente en este momento de rechazo grave establecido. Sin embargo, en general los niveles subieron en los grupos con TAC, coincidiendo con el momento de rechazo leve-moderado en plena fase de activación y de respuesta inmune florida. El IFN $\gamma$ , sin embargo, subió en ambos casos. A diferencia de las otras interleuquinas, características de la respuesta inmune innata o inespecífica, el IFN $\gamma$  quizá se encontraba más aumentado en los grupos control porque es más tardío, al actuar sólo una vez las células inmunológicas están activadas, y participar además también en la producción de IgG.

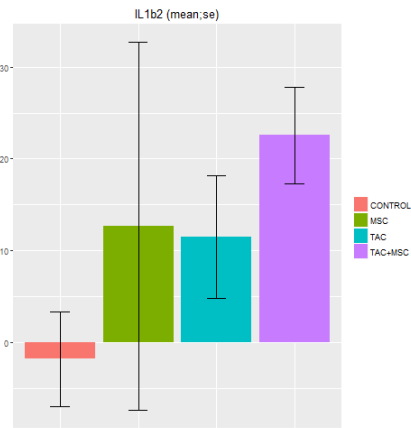
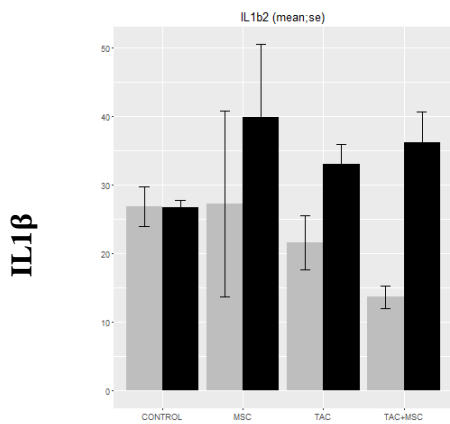
Al comparar entre grupos con y sin CTM, observamos que en la mayoría la diferencia fue más evidente en los controles que en los grupos con TAC. En general bajaron menos en los controles con CTM, como si no se hubieran consumido tanto, excepto la IL2 y el TNF $\alpha$ , sugiriendo una posible respuesta positiva a favor de las CTM. La IL1 $\beta$  incluso no bajó en los controles con CTM sino que estaba aumentada con respecto al basal. También subieron menos en los grupos con TAC,

## RESULTADOS

sugiriendo una menor reacción inflamatoria gracias a las CTM. EL  $IFN\gamma$  también subió más en los controles con CTM, como si aun no se estuviese consumiendo, y subió menos en el grupo con CTM y TAC, sugiriendo una menor reacción inflamatoria, al igual que las demás citoquinas. La IL17, sin embargo, que en controles se había comportado como el resto, se había consumido también en los grupos con TAC, pero no en el grupo de TAC con CTM, lo cual resulta interesante y sugiere una disminución de su actividad mediada por las CTM .



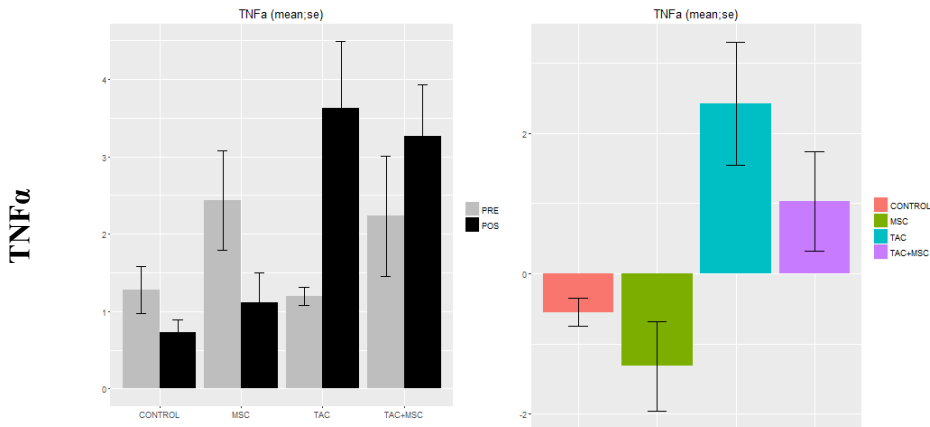
$\text{Chi}^2 = 7.5357$ ,  $\text{df} = 3$ ,  
 $p = 0.05665$



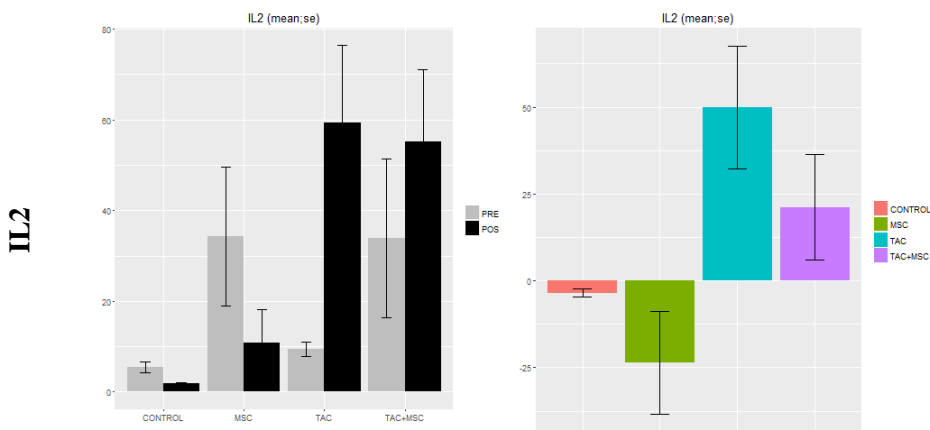
$\text{Chi}^2 = 4.449$ ,  $\text{df} = 3$ ,  
 $p = 0.2169$



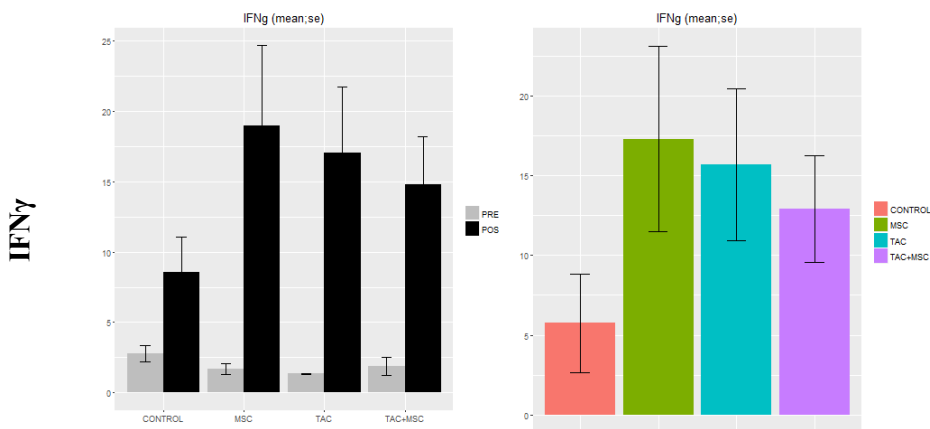
**RESULTADOS**



Chi<sup>2</sup> = 10.53, df = 3,  
**p = 0.01456**

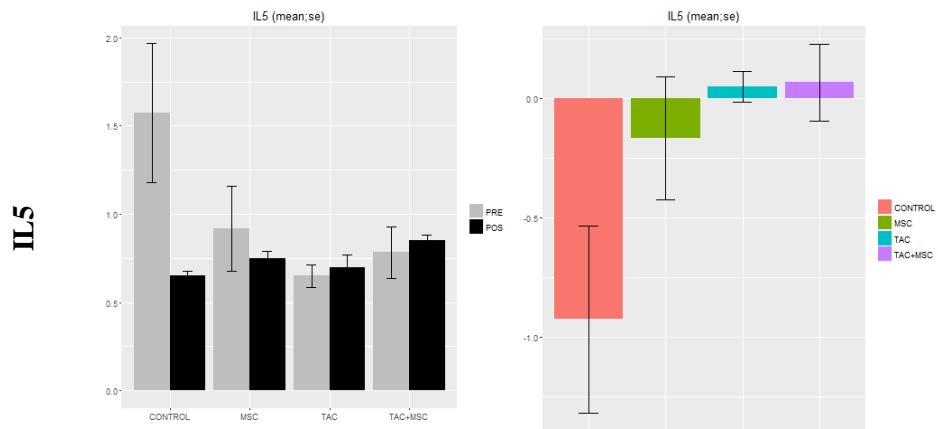


Chi<sup>2</sup> = 9.4762, df = 3,  
**p = 0.02359**

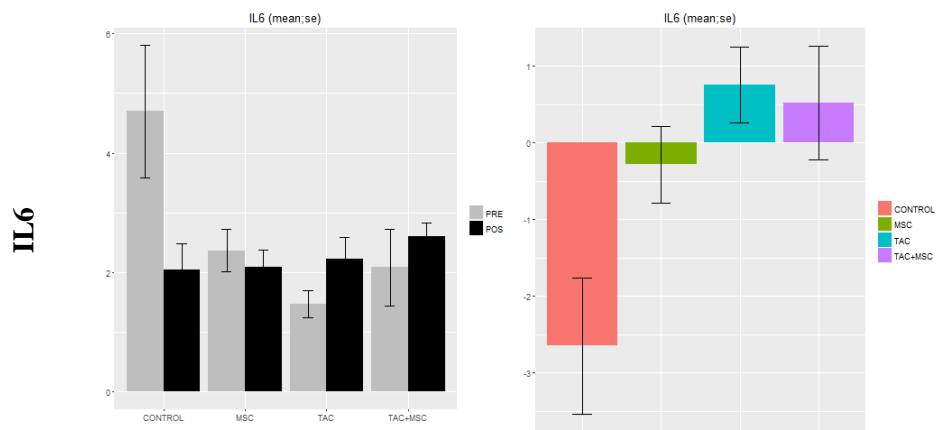


Chi<sup>2</sup> = 3.0976, df = 3,  
 p = 0.3768

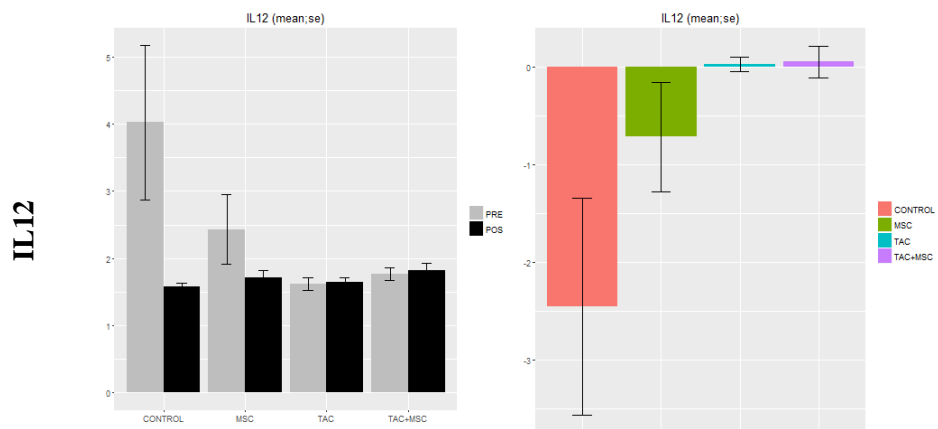
RESULTADOS



Chi<sup>2</sup> = 7.658, df = 3,  
p = 0.05363

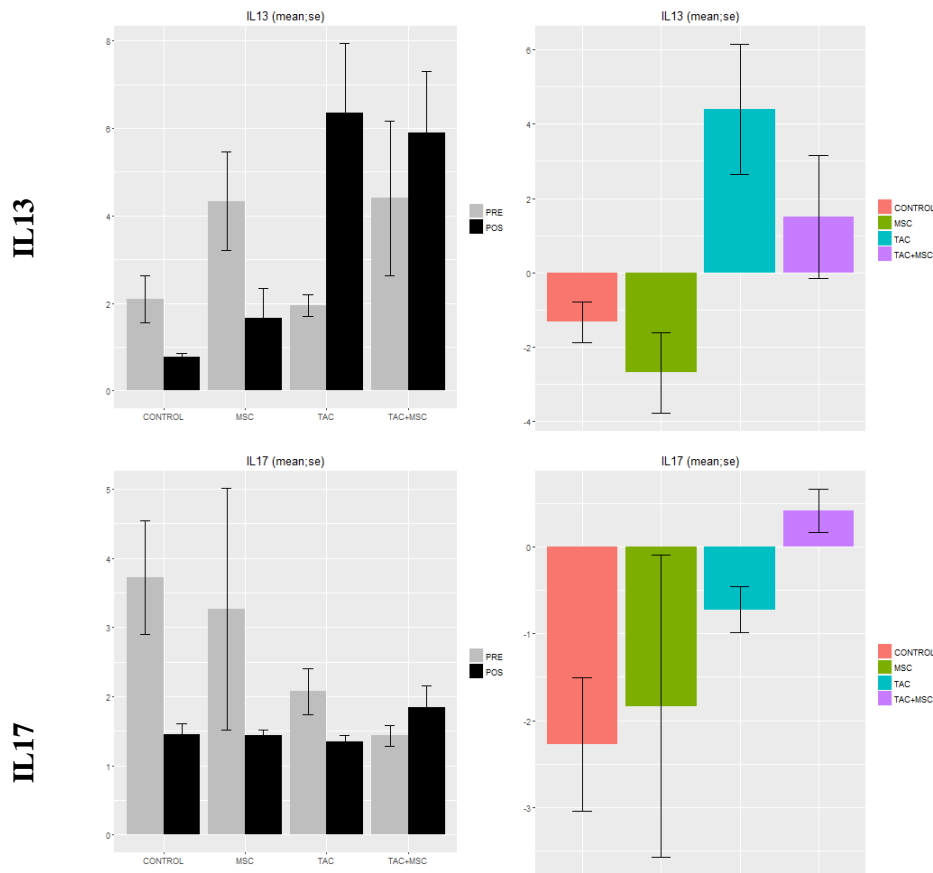


Chi<sup>2</sup> = 8.4975, df = 3,  
**p = 0.0367**



Chi<sup>2</sup> = 7.2794, df = 3,  
p = 0.06351

RESULTADOS



Chi<sup>2</sup> = 10.132, df = 3,

p = 0.01748

Chi<sup>2</sup> = 9.8917, df = 3,

p = 0.01951

**Figura 37:** Gráficas comparativas de los niveles en plasma de las citoquinas proinflamatorias estudiadas antes del trasplante (niveles basales) y al sacrificio (día 14), entre los distintos grupos con y sin CTM, con y sin Tacrolimus.

\* No se realizó estudio pos-hoc, en las interleuquinas donde no se vieron evidencias para concluir que las distribuciones de los promedios eran diferentes por grupo ( $p > 0.05$ ). Sí se realizó en aquellos donde  $p < 0.05$ , comparando las distribuciones de estos promedios de cada grupo, mediante un test de comparaciones múltiples con la corrección de Bonferroni, observando diferencias entre los grupos marcados (1=control; 2=control + CTM; 3=TAC; 4=TAC + CTM).

TNF $\alpha$

Chi<sup>2</sup> = 10.53, df = 3, p = 0.01456

	1	2	3
2	1.00	-	
3	0.25	0.02	-
4	1.00	0.15	1.00

IL2

Chi<sup>2</sup> = 9.4762, df = 3, p = 0.02359

	1	2	3
2	1.000	-	
3	0.335	0.018	-
4	1.000	0.382	1.000

## RESULTADOS

### IL6

Chi<sup>2</sup> = 8.4975, df = 3, p = 0.0367

	1	2	3
2	0.792	.	
3	0.093	1.000	
4	0.053	1.000	1.000

### IL13

Chi<sup>2</sup> = 10.132, df = 3, p = 0.01748

	1	2	3
2	1.000	-	
3	0.173	0.018	-
4	1.000	0.321	1.000

### IL17

Chi<sup>2</sup>=9.8917,df=3,p=0.01951

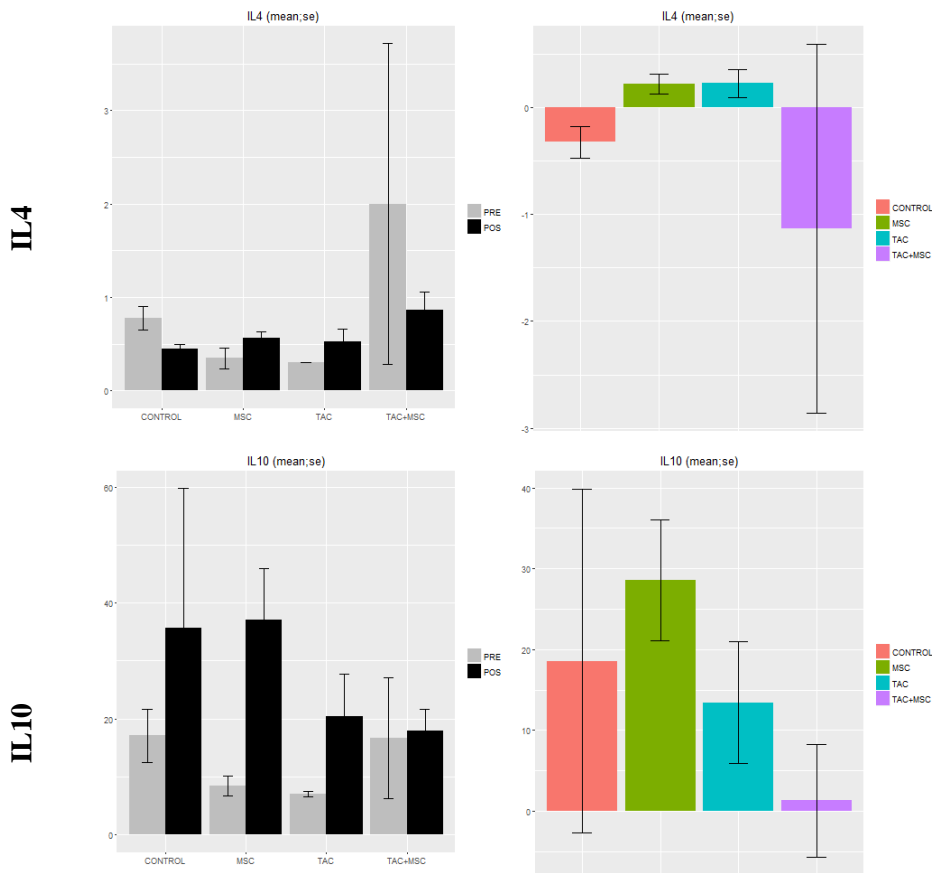
	1	2	3
2	1.000	-	
3	1.000	1.000	-
4	0.025	0.580	0.116

#### b. INTERLEUQUINAS ANTIINFLAMATORIAS: IL4, IL10

En los controles (grupos con rechazo grave), observamos que, aunque no de forma significativa, el incremento de las interleuquinas reguladoras fue mayor en aquellos grupos con CTM, lo cual coincide con el descenso de las proinflamatorias, probablemente consumidas en este momento de rechazo grave establecido. La IL4 incluso pasó de estas más baja que antes del trasplante en los controles sin CTM (quizá consumida también) a estar más alta en los grupos con CTM.

Esto resulta muy interesante a favor del fenómeno inmunomodulador de las CTM. Podría ser un signo indirecto de que hay más linfocitos T reguladores (Tr1).

Sin embargo, en los grupos con Tacrolimus, estos niveles no subieron tanto con respecto a los niveles previos al trasplante, especialmente en los grupos con CTM, e incluso bajaron en el caso de la IL4, quizá porque la respuesta de ésta es más tardía. Estos resultados se pueden interpretar de varias formas. Por un lado, se podría pensar que las CTM no ejercieron un papel inmunomodulador en este momento de rechazo leve-moderado. Por otro, se podría plantear que quizá todavía no habían subido, al no haber tanto rechazo en estos grupos. Por último, podríamos pensar que se pudieron haber consumido tras ejercer su papel combatiendo la respuesta del rechazo, a favor de las CTM, pero es raro entonces que en los grupos con más rechazo estuviesen aumentadas (Figura 38).



Chi<sup>2</sup> = 5.4302, df = 3,  
p = 0.1429

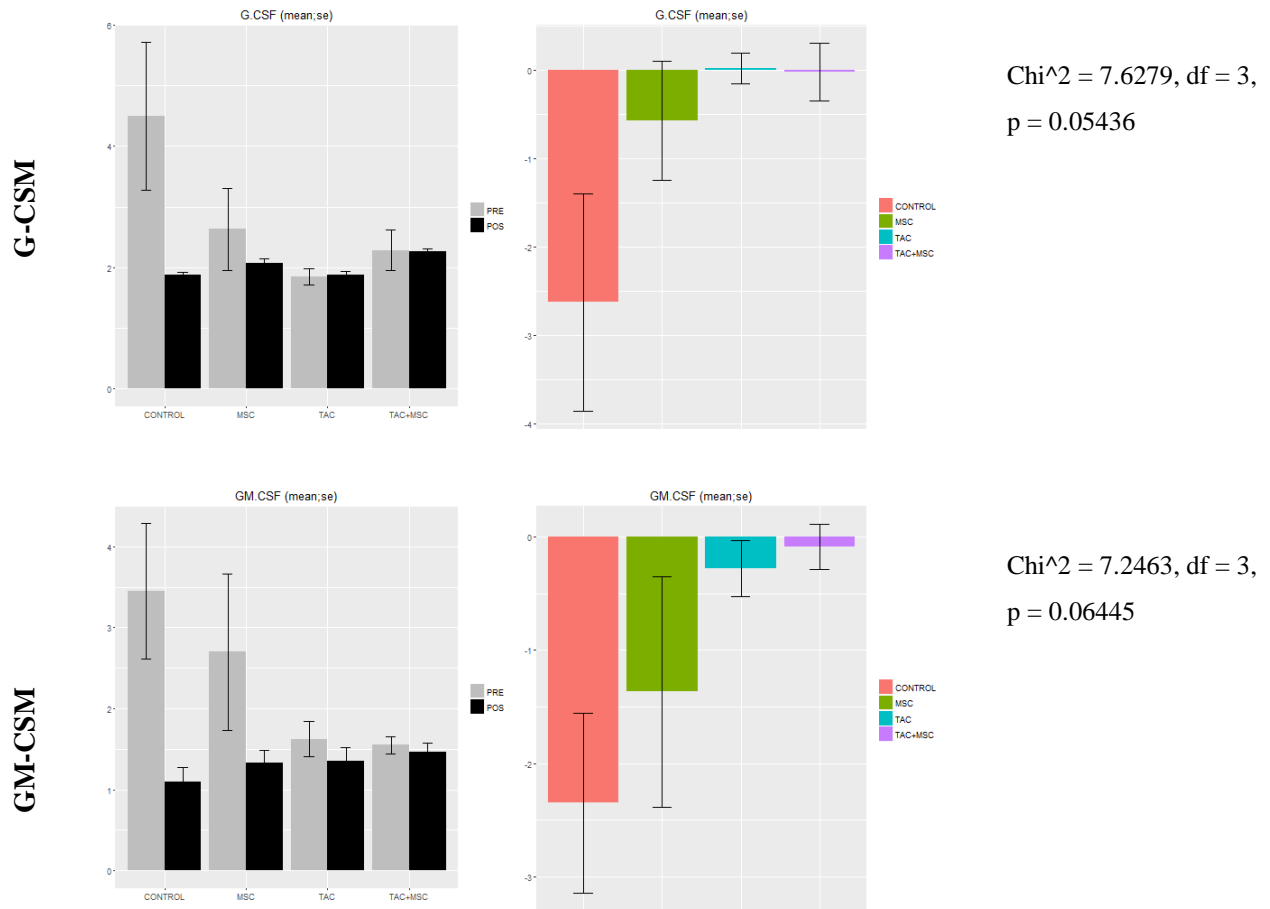
Chi<sup>2</sup> = 6.0238, df = 3,  
p = 0.1105

**Figura 38:** Gráficas comparativas de los niveles en plasma de las citoquinas antiinflamatorias estudiadas antes del trasplante (niveles basales) y al sacrificio (día 14), entre los distintos grupos con y sin CTM, con y sin Tacrolimus.

**b. FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS: G-CSM; GF-CSM**

Mostraron un patrón muy similar, bajando en los controles, como si se consumieran en el contexto de un rechazo grave, y manteniéndose en los grupos con TAC. Bajaron menos en los grupos con CTM en general, muy interesante a favor del rol inmunomodulador de las CTM (Figura 39).

## RESULTADOS

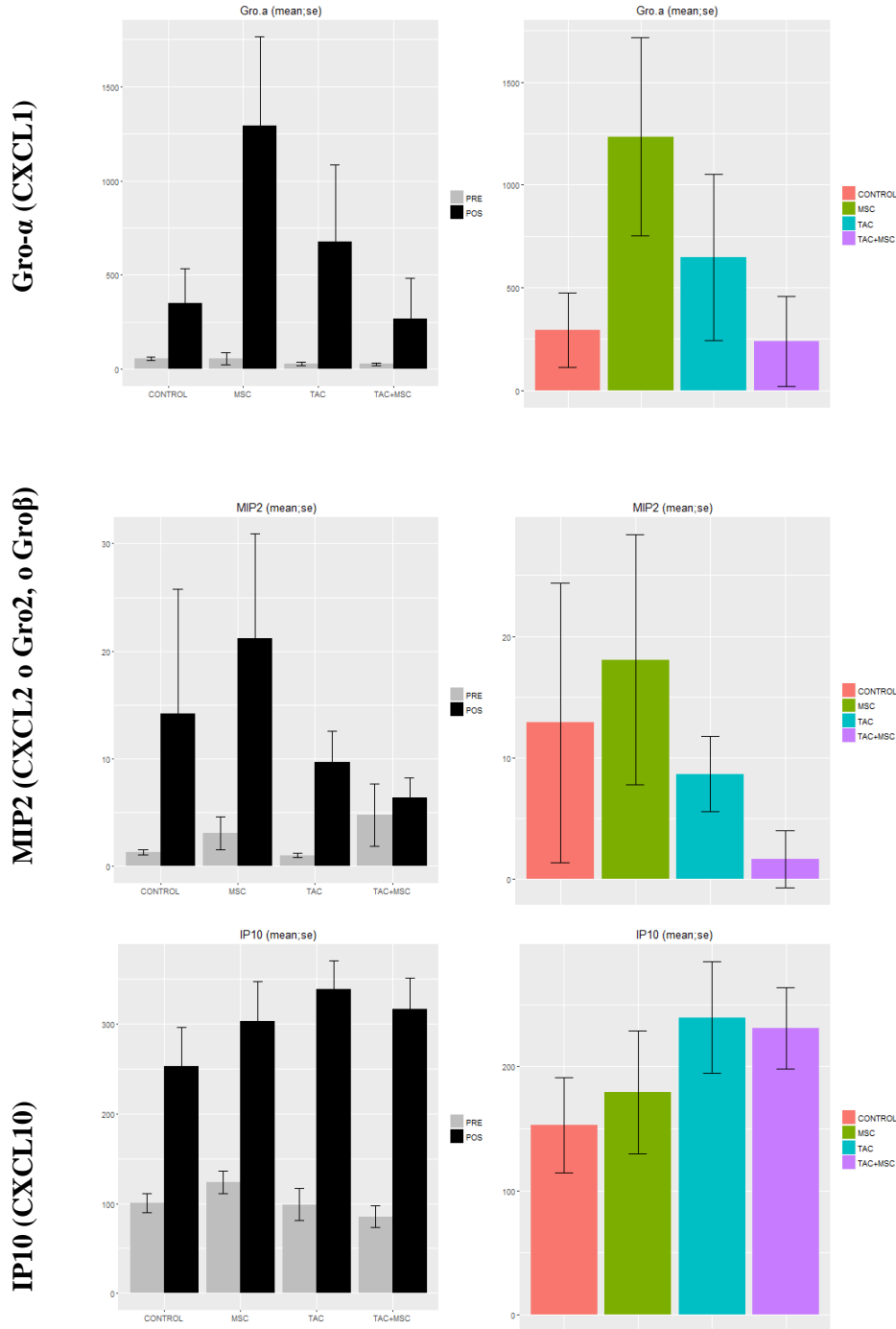


**Figura 39:** Gráficas comparativas de los niveles en plasma de los factores estimuladores de colonias estudiados antes del trasplante (niveles basales) y al sacrificio (día 14), entre los distintos grupos con y sin CTM, con y sin Tacrolimus.

### c. CITOQUINAS QUIMIOTÁCTICAS

#### 1. De la familia de las CXC:

Subieron en todas tras el trasplante, más con las CTM en los controles y menos con las CTM en tratados con Tacrolimus. Esto es interesante a favor de su rol inmunomodulador en un conexto de rechazo leve-moderado, pero quizá no tanto en un rechazo grave (Figura 40).

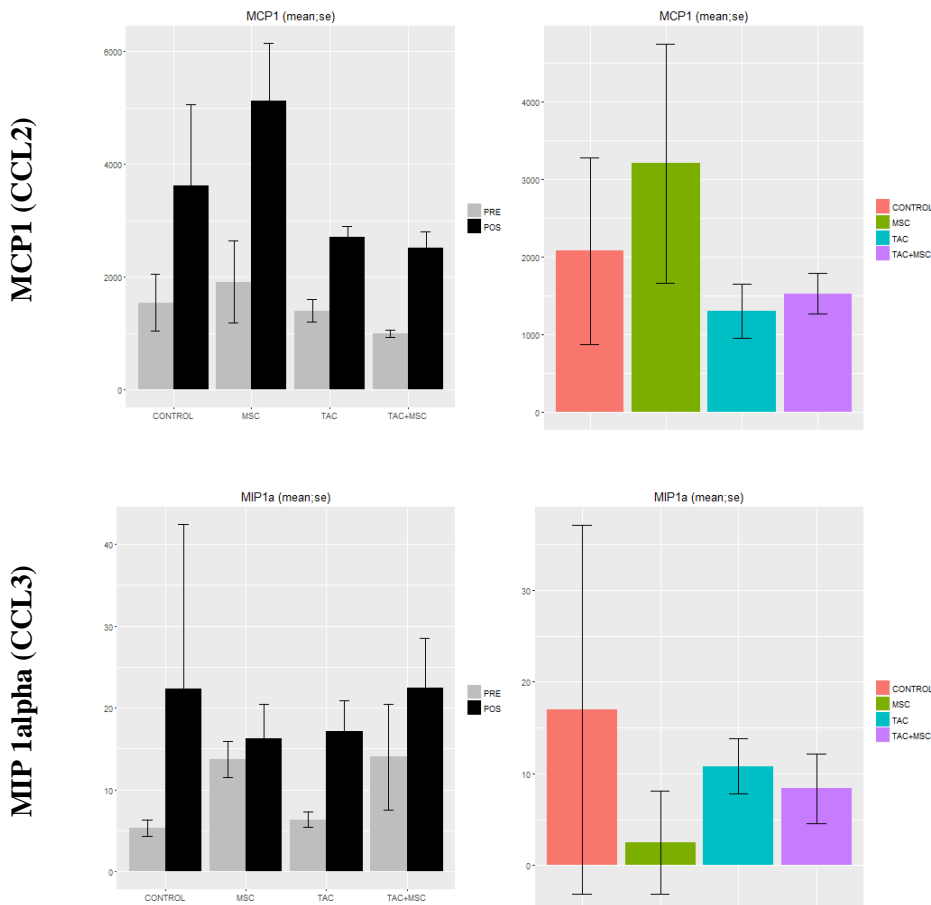


**Figura 40:** Gráficas comparativas de los niveles en plasma de las quimocinas CXC estudiadas antes del trasplante (niveles basales) y al sacrificio (día 14), entre los distintos grupos con y sin CTM, con y sin Tacrolimus.

## RESULTADOS

### 2. De la familia de las CCL (Quimoquinas):

También subieron todas tras el trasplante excepto la eotaxina, ya que los eosinófilos no están muy implicados en el rechazo, pero en general, aumentaron más en los grupos con CTM, siendo esto compatible con los hallazgos histológicos encontrados e iría en contra del efecto inmunomodulador de las CTM, probablemente justificado porque un contexto tan proinflamatorio impediría a las CTM ejercer la acción deseada (Figura 41). Sin embargo, observamos un comportamiento diferente en la MIP1 $\alpha$ , atrayente de macrófagos, que disminuyó en los grupos con CTM, lo que concuerda con lo observado por técnicas inmunohistoquímicas, y va a favor de una disminución en el número de macrófagos mediado por CTM.

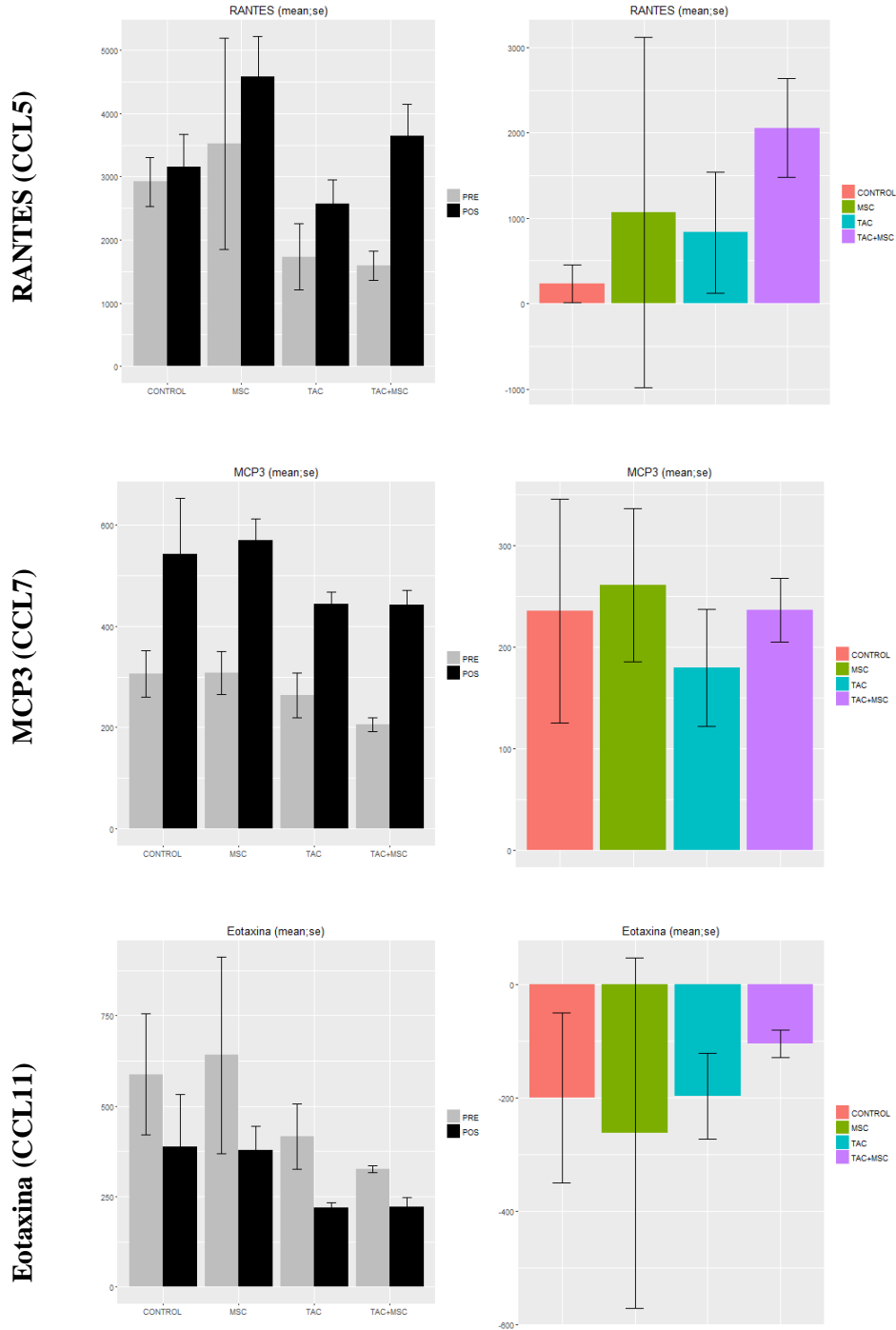


Chi<sup>2</sup> = 3.3571, df = 3,  
p = 0.3398

Chi<sup>2</sup> = 2.1117, df = 3,  
p = 0.5495



RESULTADOS



Chi<sup>2</sup> = 4.069, df = 3,  
p = 0.2541

Chi<sup>2</sup> = 0.87619, df = 3,  
p = 0.8312

Chi<sup>2</sup> = 2.2381, df = 3,  
p = 0.5245

**Figura 41:** Gráficas comparativas de los niveles en plasma de las quimoquinas CCL estudiadas antes del trasplante (niveles basales) y al sacrificio (día 14), entre los distintos grupos con y sin CTM, con y sin Tacrolimus.

## RESULTADOS

*En resumen, sí se observaron diferencias entre los grupos en la expresión plasmática de algunas citoquinas, sugiriendo una actuación a favor de la regulación: Por un lado, tanto las citoquinas proinflamatorias como las quimoquinas CXC no subieron tanto tras el trasplante en aquellos grupos tratados con CTM, y esto fue más evidente en los grupos que habían desarrollado un rechazo leve-moderado, que en los rechazos graves; esto no ocurrió en las quimoquinas CCL, que en general aumentaron en los grupos tratados con CTM. Una excepción de este grupo fue la MIPa1, atrayente de macrófagos que disminuyó en los grupos con CTM, a favor de una disminución en el número de macrófagos mediado por las CTM. Por otro lado, las citoquinas antiinflamatorias sí tendieron a aumentar en los grupos tratados con CTM, especialmente en los rechazos más graves; además, los factores estimuladores de colonias no se consumieron tanto tras el trasplante en los grupos con CTM.*

# DISCUSIÓN

---



## 7. DISCUSIÓN

---

Tal y como demuestran los datos internacionales, similares a los de nuestra propia serie, podemos afirmar que la supervivencia y función a largo plazo del injerto continúa siendo un problema en el TOS, y en particular en el TI [359].

Hemos visto como la introducción del Tacrolimus motivó un nuevo impulso al desarrollo del TI, hasta ese momento con resultados desalentadores con inmunosupresores clásicos. Sin embargo, pese a su eficacia previniendo el rechazo y mejorando la supervivencia a corto plazo, los importantes efectos adversos, como la nefrotoxicidad, la diabetogenicidad o neurotoxicidad, entre otros, limitan su uso a largo plazo. Por otro lado, el empleo de inmunosupresores potentes en la terapia de inducción previene el rechazo, pero a costa de afectar a la función de todos los linfocitos T que responden, independientemente de la especificidad del antígeno, lo cual puede llevar a infecciones graves o al desarrollo de tumores. Por tanto, sigue siendo necesario buscar regímenes inmunosupresores óptimos que maximicen los efectos beneficiosos de la inducción en la búsqueda de la tolerancia y que minimicen dichos efectos adversos [1].

A lo largo de esta tesis se han comentado las numerosas evidencias científicas acerca de los potentes efectos reparadores e inmunomoduladores de las CTM in vitro, que las convierten en una posible alternativa terapéutica. Estudios preliminares han demostrado su ausencia de toxicidad [360]. Para comenzar a hablar sobre su aplicación clínica, es importante el hecho de que las CTM pueden ser aisladas fácilmente gracias a su adherencia al plástico, a su potencial de proliferación y expansión en cultivos. Además, se pueden criopreservar sin cambios en el fenotipo ni potencial para diferenciarse [361].

Hemos visto resultados esperanzadores in vivo en la Enfermedad Injerto contra Huésped (EICH), aunque se trata de series con pocos pacientes, refractarios al tratamiento estándar y tras TPH [138, 315, 316, 362-364] y en enfermedades autoinmunes, como la Enfermedad de Crohn [365], encefalitis autoinmune [366], Parkinson, insuficiencia cardíaca, isquemia miocárdica, lupus, daño medular, esclerosis múltiple... entre otros.

En TOS, las terapias con CTM están sólo empezando, se han usado en varios ensayos preclínicos, y van llegando lentamente datos de los primeros ensayos clínicos [158, 326, 367, 368] [330]. En realidad, la transfusión de sangre procedente del donante, podría considerarse la primera terapia

## DISCUSIÓN

celular en TOS, en 1980 [369]. Aunque se vio una menor incidencia de rechazo en la mayoría de los pacientes, una minoría no menos considerable desarrolló sensibilización frente al donante, impidiendo que esta terapia se estableciera como práctica clínica de rutina. Las peculiaridades de las CTM, especialmente el hecho de ser inmunoprivilegiadas al menos en parte, las convierten en candidatas prometedoras para tratar el daño isquemia-reperfusión, el rechazo agudo, y quizás la mayoría de la patología del injerto a largo plazo.

Existen varias revisiones acerca del impacto de las CTM sobre el sistema inmune en el contexto del rechazo, y en general acerca de su aplicación clínica en el TOS [33, 159] [128, 147] [370]. Concluyen que, aunque muchos estudios *in vitro* e *in vivo* son muy alentadores, no se ha demostrado aún un efecto reproducible beneficioso con la terapia con CTM avalado por ensayos de fase III, y que los resultados a largo plazo son todavía mejorables, antes de pensar en ellas como tratamiento o prevención del rechazo, sustituyendo a los inmunosupresores clásicos. Asimismo, el grupo MiSOT publica a raíz de su cuarto encuentro en 2012 una revisión con las lecciones aprendidas de los primeros ensayos clínicos [371].

Más allá de prevenir el rechazo, otros autores sugieren que las CTM podrían inducir la tolerancia en el trasplante [141]. El grupo de Bérghamo también publica varios trabajos y revisiones interesantes al respecto, algunos de ellos ya comentados [372]: Así, en 2008 enfocan su revisión en el uso de las CTM para promover la tolerancia en el TOS, y revisan su capacidad para modificar el balance entre las células T efectoras y las Tregs, así como la seguridad y la eficacia de la terapia basada en CTM, tanto en modelos experimentales de trasplante como incipientes experiencias en la clínica en trasplante renal [79, 193, 202]. Tras publicar la importancia del momento de la administración de éstas en 2012 [215], artículo que es clave desde mi punto de vista para justificar los resultados de esta tesis, actualizan el tema en el 2013 enfocándolo a la tolerancia y a la generación de Tregs o CD tolerogénicas inducidas por las CTM [127]. Un año después acotan la revisión al trasplante renal, en el que existe más experiencia [150]. En el 2015 añaden la evidencia *in vitro* y en estudios preclínicos de la capacidad de las CTM para inhibir la respuesta de las células T de memoria específicas del donante, las cuales, como hemos visto, resultan más difíciles de inhibir por los inmunosupresores estándar que otras células T, en el TOS [25]. Todos estos trabajos tan seguidos discurren en paralelo con los primeros intentos de aproximación a la clínica, y van aportando sugerencias sobre los mecanismos de acción y células diana, aunque muy lentamente. Es importante destacar que muchos de estos artículos surgen posteriormente al planteamiento de esta tesis en el año 2010.

Todas estas revisiones y muchos otros trabajos experimentales confirman el potencial inmunomodulador de las CTM en el TOS, y su papel prometedor en la aceptación a largo plazo del injerto, solas o en asociación con otros inmunosupresores. Sin embargo, todavía hay muchas cuestiones sin respuesta antes de dar el salto a la clínica y que sin duda contribuirían a mejorar los modelos y a observar resultados más llamativos. De hecho, aunque no pudimos demostrar un papel beneficioso en nuestro modelo, basándonos en el conocimiento adquirido sí podemos responder a muchas de las preguntas que surgieron para el desarrollo de este estudio, justificar nuestros resultados, y diseñar proyectos futuros, para establecer finalmente conclusiones realistas y plantear su introducción en la clínica en el área del trasplante intestinal, terreno aún no explorado.

## I. OTRAS ALTERNATIVAS A LAS CTM EN TERAPIA CELULAR EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO

El primer tema de debate es por qué usamos CTM, ya que no son las primeras en llegar a la clínica en un intento de buscar la aceptación del injerto en el TOS.

La aplicación clínica de **transfusiones de sangre del donante** ya se ha comentado como algo anecdótico; algo después, la transfusión **de leucocitos específicos procedentes del donante** se abandonó también al ver que podía hipersensibilizar al paciente [373]. Actualmente, con mayor conocimiento inmunológico ha vuelto a resurgir la investigación de nuevas terapias basadas en leucocitos para inducir tolerancia, y que compiten con las CTM, aunque ya vimos como *Popp et al* demostraron que las CTM administradas conjuntamente con el MMF podían inducir supervivencia a largo plazo tan eficientemente como los leucocitos [374, 375], ya que ambas terapias produjeron el mismo efecto [141]. Otras terapias propuestas en investigación son la administración de **Tregs CD4+CD25<sup>high</sup>purificados o células T supresoras CD8+CD28-**, de las que se ha sugerido que podrían suprimir el rechazo [35].

Por otra parte, el uso de **células derivadas de la médula ósea (BMC o bone marrow cells)** como herramienta protolerogénica en TOS se había intentado ya con buenos resultados en modelos experimentales y clínicos. De hecho, la tasa de supervivencia similar con la reducción de CNIs de mantenimiento en TRDV sólo se había descrito hasta el momento en 2002 en receptores que habían recibido un trasplante de células de médula ósea específicas del donante [331]. Algunos autores incluso sugieren en sus trabajos que podrían ser más eficientes que las CTM para reducir la progresión de la enfermedad renal y cardíaca crónica [293, 376, 377]. Entre los estudios aquí revisados, vimos como *Hu et al* también usaban BMC derivadas del donante para conseguir el

## DISCUSIÓN

quimerismo en un modelo heterotópico de TI similar al nuestro, observando muy buenos resultados [49].

*Franquesa et al.*, sin embargo, las usan como grupo control frente a las CTM, ya que las BMC en su totalidad incluyen también las CTM, constituyendo un grupo control aún mejor que la inyección sham. Elige las CTM por su baja inmunogenicidad, ya que no expresan el CMH tipo II y tienen muy poca expresión de CMH tipo I, a diferencia de las BMC que expresan CMH tipo II, y especialmente tipo I. Además, observó que los animales tratados con CTM no desarrollaron DSA en el postrasplante inmediato ni de tipo I ni II, mientras que sí lo hicieron las tratadas con BMC, de clase I, la primera semana tras la inyección de las células [243].

Recientemente, han surgido nuevas posibilidades terapéuticas en terapia celular que merecen una mención en esta tesis, para establecer conclusiones y perspectivas futuras. Así, experimentos pioneros que merecieron incluso un premio nobel [378], demostraron la posibilidad de inducir Células Troncales (CT) a partir de fibroblastos de ratón por medio de transducción retroviral, y posteriormente lentiviral en 2006, y las denominaron “*Induced Pluripotent Stem Cells*” o **Células Troncales Pluripotentes Inducidas (iPSC)**, capaces de diferenciarse en células de las tres hojas germinales. Desde entonces, el interés creciente ha llevado a descubrir otros métodos alternativos para producirlas, como la transfección de mRNA, ya que los primeros protocolos, al integrar material genético exógeno dentro de las iPSCs, como el protooncogen c-Myc, podían aumentar el riesgo de tumorigénesis. Actualmente, podemos obtener células con una gran pluripotencialidad mediante reprogramación genética de células diferenciadas (iPs) tan solo añadiendo tres genes que codifican factores de transcripción a las células diferenciadas. Estos y otros avances podrían llevar a un sistema para obtener CT que se parezcan aún más a las **CT del adulto** y a las “**células troncales embrionarias**” (CTE, ESC en inglés).

Aún más, las iPSCs tienen varias ventajas frente a las CTE en investigación y para diseño de terapias: en primer lugar, derivan del paciente, por lo que habría menos riesgo de rechazo comparado con aloinjertos o xenoinjertos de CTE. Por otro lado, es más fácil obtenerlas desde el punto de vista ético y legislativo. Por último, las iPSC son epigenéticamente diferentes de las CTE y retienen su predisposición a rediferenciarse en un tipo celular original. Sin embargo, la reprogramación de las iPSCs a partir de células somáticas normales es muy compleja, está todavía muy lejos de su aplicación clínica, y su inestabilidad es mucho mayor que las CTM y necesita ser estudiada también. No obstante, ya existen algunos estudios que las plantean como alternativa en el



TOS, como potencial fuente de células del donante que pudieran crear un ambiente protolerogénico [379].

Finalmente, tras una polémica sobre si eran mejores las CTE o las **CT adultas**, entre ellas las **CTM**, la realidad científica demostró que la seguridad de los pacientes sólo permitía el uso de éstas últimas [313]; aquí si se ha avanzado en cuanto a verificar su seguridad y poderlas aplicar en diversas enfermedades y se han visto más seguras que las CTE y las iPSCs en cuanto al riesgo de carcinogénesis. Posteriormente, se han descubierto también otras **células troncales de adultos**, como las mamarias, intestinales, del oído interno, y testiculares. En concreto, las intestinales podrían participar en la restauración de la función intestinal tras una resección [380], y tendrían un papel en el tratamiento del síndrome de intestino corto, aunque hacen falta más estudios para comprender los mecanismos moleculares que regulan este mecanismo regenerativo, y este tema se aleja de nuestra tesis, enfocada en las CTM y el TOS.

Otra puerta abierta en investigación surge tras los estudios de Doris Taylor basados en la **descelularización de órganos y posterior recelularización** de los mismos con **células madre adultas** [381], siendo la cardiología una disciplina pionera en esta área [313].

## II. ¿DÓNDE ESTÁN LAS CTM? ¿DÓNDE MIGRAN? ¿CUÁNTO TIEMPO SOBREVIVEN TRAS SU ADMINISTRACIÓN? ¿POR QUÉ MECANISMOS ACTÚAN?

En nuestro estudio no encontramos las CTM al sacrificio, pese a estar teñidas y a buscarlas insistentemente en varios órganos muestreados, como le ha ocurrido a muchos autores, y es que, pese a su capacidad de migrar a zonas de inflamación y de diferenciarse en diferentes tejidos, las CTM exhiben unos niveles muy bajos y transitorios de “*engraftment*” in vivo [382, 383]. Por ej. en un modelo murino de infarto agudo de miocardio, mejoró significativamente la función miocárdica tras la inyección de CTM humanas, pero éstas no se pudieron detectar 3 semanas tras la infusión. Contradictoriamente, en su ensayo clínico para tratar un infarto agudo de miocardio con una inyección intracoronaria de CTM, las CTM estaban todavía viables 3 meses después de su inyección [133]. En otro estudio en primates, las CTM se detectaron 19 meses tras la inyección iv en varios tejidos [384].

El grupo de *Popp et al* muestran resultados contradictorios en sus diferentes trabajos en ratas, encontrando en algunos las CTM en el hígado del receptor hasta 7 días después de su inyección intraportal y en otros no [141, 385]. Entre todas las hipótesis, se inclinan más por pensar, al igual

## DISCUSIÓN

que otros autores, que las CTM inducen una respuesta inmune en el receptor y que no son tan inmunoprivilegiadas como clásicamente se había pensado [141].

*Franquesa et al* tampoco encontraron ni las CTM ni las BMC inyectadas en el riñón, hígado o bazo, ni a las 12 ni a las 24 semanas, en ninguno de los grupos tratados [243], ni tampoco 3 días después de la inyección; al igual que otros autores, sugieren que pudieron quedarse atrapadas y morir tempranamente en los pulmones [382] [289, 339, 386], o que fueron eliminadas del torrente por células inmunes del receptor, no siendo tan inmunoprivilegiadas como se pensaba, o al menos, si lo son frente al sistema inmune adquirido al expresar estas células muy poco CMH I y nada de CMH clase II, no lo son tanto frente al innato, de acuerdo con *Popp et al* [122, 387, 388].

Por otro lado, algunos autores han demostrado una “*up regulación*” de ambos CMH I y II tras la estimulación con IFN $\gamma$  in vitro, pasando a funcionar como CPAs, aunque en su trabajo no pudieron confirmar un cambio fenotípico de las CTM.

Otra hipótesis descrita es que las CTM fuesen eliminadas por las CD8, al presentarles el antígeno a través del CMH I de su superficie, como se ha demostrado in vitro [389]. Sin embargo, los animales tratados con CTM no generaron anticuerpos específicos frente a células third party del donante, a diferencia de lo que ocurrió con las BMC, lo cual confirma que ejercieron su acción pese a no verse y que por tanto, no fueron rechazadas por el receptor.

Como ya se ha comentado, *Casirhagi et al*, a diferencia de los autores previos, aporta dos ideas fundamentales: por un lado, sí encuentra las CTM a las 48 horas de la inyección, y por otro, observa que la localización depende del momento de la infusión; así, cuando éstas se infundieron el día antes del trasplante o al infundirlas sin trasplante, se localizaron abundantemente en el bazo, mientras que cuando se infundieron post-trasplante, se localizaron al injerto. Por tanto, cambia totalmente el concepto clásico acerca de sus mecanismos de actuación, ya que su función inmunomoduladora parece depender más de la interacción de las CTM con células inmunes en los órganos linfoides, donde se inicia la respuesta de las T efectoras, que de su propia actuación sobre el tejido dañado. Este hecho se ha evidenciado en otros modelos de encefalomiелitis, enteropatía autoinmune, infartos cerebrales, cardíacos, tumores, diabetes, EICH... [215].

Aun más, el mismo grupo sugiere posteriormente que no necesitaron incorporarse al injerto para ejercer su función y que desaparecieron muy rápidamente, sugiriendo un mecanismo de “*touch and go*” induciendo Tregs, las cuales, una vez establecidas se convirtieron en el principal mecanismo de tolerancia [127]. Basados en estas publicaciones, en nuestro estudio se estudiaron las Tregs

(representadas por Foxp3+), tanto en el injerto como en el bazo, observando un aumento de las mismas en el injerto intestinal de los grupos tratados con CTM, pero solamente en los grupos con un rechazo leve-moderado, no en los que presentaban un rechazo grave, donde disminuyeron, lo cual resulta interesante a favor la mediación de las CTM en una fase precoz de la enfermedad, pero no en una fase avanzada. En el **bazo**, las diferencias se atribuyeron más al hecho de haber sido tratadas con Tacrolimus (menos rechazo frente a más rechazo) que a las CTM, lo cual concuerda con los resultados publicados, ya que en nuestro caso se administraron durante el trasplante, no unos días antes.

Todos estos conceptos podrían justificar porqué las CTM no previnieron el rechazo. Al infundirse justo tras el desclampaje hacia el órgano diana, el contexto proinflamatorio generado por el insulto inicial del trasplante (cirugía, isquemia-reperfusión...) no les habría dado oportunidad de ejercer sus propiedades inmunorreguladoras, que podríamos haber conseguido en caso de haberlas administrado unas horas o algún día antes del trasplante.

Sin embargo, nuestros resultados se contradicen con otro estudio reciente, donde sí vieron las células marcadas con CFSE a los 7 días de un trasplante intestinal heterotópico en el injerto, bazo y timo, tras infundirlas iv el día del trasplante, y no las vieron sin embargo en corazón, hígado o pulmón [390]. Estas discrepancias entre los estudios y la dificultad en detectar las CTM, también en nuestro modelo, dificultan el avance con estas terapias al no poder concretar sus mecanismos de acción.

En cuanto a la capacidad de **migración**, inicialmente se pensó que las CTM acudían al lugar del daño, lo cual sugería un enorme potencial al llegar allí y secretar suficientes niveles de factores inmunomoduladores y regenerativos. En un estudio in vitro, por ej., las CTM de ratón migraban hacia células aisladas de pulmones dañados con bleomicina, mientras que no hacia las células de pulmones sanos [279]. Por ello, la administración intraarterial de las CTM en nuestro modelo parecía muy buena alternativa, evitaba el paso por el pulmón, y aseguraba que llegaran al injerto.

Actualmente, esto no está tan claro, ni tampoco que sea clínicamente relevante [391]. Por otro lado, se han descrito las CTM circulantes en sangre periférica, pero en muy baja frecuencia. Sí se han observado niveles más elevados en situación de estrés fisiológico [392, 393], sugiriendo que las CTM podrían ser movilizadas y migrar desde su nicho in vivo [159]. Sin embargo, no son las mismas condiciones in vitro (adheridas) que in vivo (en suspensión), pudiendo responder de forma diferente a los estímulos migratorios, por lo que no se pueden extrapolar los resultados.

## DISCUSIÓN

Se han descrito multitud de receptores para quimoquinas y factores de crecimiento expresados por las CTM, como el CCR1, CCR4, CCR7, CCR10, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CX3CR1, c-Kit, c-MET, VEGF, PDGF, HGF y bFGF, entre otros, sugiriendo que no sólo son capaces de migrar en respuesta al gradiente de quimoquinas inducidas por la inflamación estimuladas por el  $TNF\alpha$ , sino también cuando ocurre cualquier otro tipo de daño tisular. Dicho tejido dañado a su vez también expresa receptores específicos facilitando la adhesión y migración de las CTM, de forma dosis dependiente, por lo que esta migración debe estar parcialmente controlada por mecanismos reguladores ajenos a ellas. Las células endoteliales parecen tener aquí un papel fundamental, ya que se activan ante condiciones de daño, y expresan moléculas en su superficie que atraen a las células circulantes, entre ellas VCAM-1 o CD62E. Las condiciones de hipoxia también parecen influenciar en migración de las CTM, aunque hay datos contradictorios al respecto.

En nuestro modelo estudiamos los niveles plasmáticos de algunas de estas quimoquinas y sí observamos algunas diferencias entre los grupos, de acuerdo con algunos estudios *in vitro*. En general, las CCL estaban aumentadas con respecto a la situación pretrasplante, especialmente en los grupos tratados con CTM, compatible con los hallazgos histológicos encontrados y con que las CTM no ejercieran la acción deseada. Sin embargo, las quimoquinas CXC subieron menos en los grupos tratados con CTM en un contexto de rechazo leve-moderado (no en el rechazo grave), lo cual de nuevo sí apoyaría su efecto inmunomodulador, en una fase temprana de la enfermedad.

Por el contrario, la  $MIP\alpha$ , atrayente de macrófagos, disminuyó en los grupos con CTM, lo cual resulta interesante y concuerda con el menor número de macrófagos encontrados mediante técnicas inmunohistoquímicas. Dada la relación tan íntima entre macrófagos y CTM descrita (algunos han llegado a sugerir que se podrían transformar en macrófagos para ejercer su acción), sería muy interesante diseñar estudios futuros al respecto.

### III. ¿CUÁL ES EL MOMENTO ÓPTIMO DE ADMINISTRACIÓN?

Las CTM se pueden inyectar antes, durante o tras el trasplante, en una única dosis o en dosis repetidas, y esto supone un punto de enorme discusión actualmente, aunque se solapa con el anterior. En esta tesis, nosotros elegimos el momento del trasplante porque parecía una opción factible a la hora de trasladarlo a la clínica, durante la cirugía de banco. Además, tratándose de una

donación cadavérica, como ocurre en el TI, las únicas opciones serían, durante el trasplante (máximo un par de horas antes), o tras el mismo.

Sin embargo, las CTM no consiguieron prevenir el rechazo de forma significativa, frente a lo descrito por otros autores, y el momento de infusión pudo ser la razón, como hemos visto, y se ha descrito incluso en la clínica [79]. Por el contrario, otros han observado que las CTM son efectivas en el momento más crítico de la enfermedad del ECIH.

*Popp et al* son pioneros en describir la importancia de este tema en su modelo de trasplante cardíaco, al observar que tanto las **CTM como los leucocitos derivados del donante** administrados 4 días antes del trasplante, indujeron una no respuesta o aceptación del órgano trasplantado más de 100 días, mientras que dadas tras el trasplante no produjeron ningún efecto [141], corroborado posteriormente por el grupo de Bergamo [215].

Así, aunque el mayor enfoque en los últimos años ha sido sobre las propiedades inmunosupresoras/antiinflamatorias de las CTM, poco a poco va surgiendo más evidencia de que en determinadas condiciones, las CTM pueden adquirir un fenotipo proinflamatorio que afecta negativamente a la función del injerto y podría suponer una barrera para la inducción de la tolerancia en el trasplante [122, 150, 215]. En un modelo murino de trasplante renal, por ej., la administración de CTM durante el trasplante llevó a la acumulación de granulocitos y coagulación intravascular diseminada del injerto, pese a ser efectivas en la respuesta inmune adquirida de las células B y T [295], hallazgos que podrían también explicar lo que ocurrió en nuestro estudio.

Pese a todo, sí encontramos algunas diferencias entre los grupos con respecto a las citoquinas pro y antiinflamatorias secretadas, que apoyan la hipótesis de esta tesis, y que pueden resultar de interés para comprender los mecanismos de acción. *Casirhagi et al* describen como las CTM localizadas en el injerto en respuesta al ambiente proinflamatorio postquirúrgico, una vez activadas localmente, produjeron IL6 y TNF $\alpha$  que amplificó el ambiente inflamatorio del injerto facilitando la infiltración de neutrófilos y el depósito de complemento con eventual disfunción aguda del injerto, con muy poca expansión de las Tregs. En nuestro estudio, en general, todas las citoquinas proinflamatorias se compartaron de forma similar: en los grupos con rechazo grave ya se habían consumido en el momento del sacrificio, pero se consumieron menos en los grupos con CTM; en los grupos con rechazo leve, sí estaban aumentadas, pero también menos en los grupos con CTM. Observamos también algunas particularidades de cada citoquina: así, por ejemplo, el TNF $\alpha$  y la IL2, no notaron tanto el efecto de las CTM, quizá por ser más precoces. Sin embargo, el IFN, que es más tardío y

## DISCUSIÓN

actúa sólo cuando las células inmunológicas están activadas, no se vio consumido en los grupos de rechazo grave. Por último, la IL17, que al ser precoz y potente antiinflamatoria se había consumido en los grupos con mucho rechazo, pero también en los grupos con poco rechazo, no se consumió en el grupo con Tacrolimus y CTM, sugiriendo una disminución muy interesante de su actividad mediada por las CTM, descrito previamente por otros autores. Nuestros resultados, en general más llamativos en los casos de rechazo leve que en los casos severos, retrospectivamente hacen pensar que habría sido más interesante realizar el sacrificio del animal en un día intermedio entre el siete, donde apenas había rechazo, y el 14, donde el rechazo era tan grave que no se podían distinguir tan claramente las células y moléculas implicadas.

En cuanto a las citoquinas antiinflamatorias, sí tendieron a aumentar en los grupos tratados con CTM, en este caso de forma más llamativa en los rechazos más graves, a favor de un rol inmunomodulador.

En resumen, aunque encontramos diferencias entre los grupos a favor de nuestra hipótesis, nuestros resultados globales estarían mejor justificados por los artículos ya mencionados. Aunque son demasiado recientes y posteriores a nuestro proyecto de tesis, nos dan la clase para plantear futuros proyectos en la misma línea de investigación, por ejemplo, repetir el modelo administrando las CTM unos días previos al trasplante para dirigir la migración de éstas al bazo e inducir allí la generación de Tregs y otras células reguladoras.

#### IV. ¿CUÁL ES LA PROCEDENCIA ÓPTIMA DE LAS CTM PARA PLANTEARLAS COMO TERAPIA EN TOS?

##### a. ¿DONANTE, RECEPTOR O THIRD PARTY?

Esta cuestión sigue siendo un tema de debate en los ensayos clínicos publicados hasta el momento [79, 150] y surgió durante la elaboración del proyecto de tesis. Desde un punto de vista práctico clínico y terapéutico enfocado al trasplante, las CTM pueden ser **autólogas**, si se obtienen de los tejidos del propio paciente, o de gemelos HLA idénticos, o **alogénicas**, si proceden de otro, ya sean específicas **del donante** (si también donan el órgano sólido), o **third party** (que a su vez pueden ser individuos con HLA compatible o no). En clínica, antes de un trasplante, las CTM se podrían obtener en grandes cantidades, bien de un donante programado en el donante vivo, o bien del receptor, y podrían usarse frescas o criopreservadas, o bien de third party.

Por ello, diseñamos el estudio con grupos diferentes, uno con CTM procedentes de ratas Sprague (lo que supondría “células third party”), y otro con CTM procedente de ratas Lewis (considerándose “autólogas”, al proceder de la misma cepa que las receptoras), ambos a su vez con o sin Tacrolimus. Ambas posibilidades resultaban de fácil aplicabilidad clínica futura en caso de prevenir el rechazo en nuestro modelo, las primeras a modo de preparado comercial y las segundas mediante la extracción de una pequeña cantidad de tejido adiposo del receptor que se encuentra en lista de espera para un trasplante intestinal, de la cual podrían obtenerse grandes cantidades de CTM y criopreservarse. Dado que el trasplante intestinal de donante vivo es anecdótico y en los pocos centros que se ha realizado alguna vez, se ha abandonado su uso, la utilización de CTM derivadas del donante no la contemplamos en este estudio. Lo cierto es que no vimos diferencias significativas entre ambos grupos.

La literatura tampoco nos saca de dudas, aunque resulta tranquilizador leer trabajos que describen el efecto beneficioso de las CTM en el TOS, con cualquiera de las alternativas, dada la baja inmunogenicidad que parecen tener las CTM. Así, en un modelo de osteogénesis imperfecta no se vio ningún signo de alorreactividad en el receptor tras la infusión de CTM alogénicas altamente incompatibles [394]. El mismo grupo también demostró posteriormente que el origen de las CTM no era importante en el tratamiento del EICH en un ensayo clínico fase II [138].

La mayoría de los trabajos experimentales, especialmente al principio, han empleado CTM **derivadas del donante** [157], más parecidas y con el mismo criterio que terapias previas, como la transfusión de leucocitos del donante, y pocos sugerían que las CTM autólogas o third party eran igual de capaces de inhibir la respuesta inmune antidonante [202, 206]. *Popp et al* observaron que las CTM derivadas del donante resultaron más efectivas para inducir tolerancia que las derivadas del receptor y ambas más que las third party, que no prolongaron la supervivencia del injerto, sugiriendo que las CTM no pueden ser usadas procedentes de cualquier donante en el escenario del trasplante. No obstante, que sobrevivieran los injertos de 2 de 7 animales tratados con CTM derivadas del receptor, sugiere que la influencia de las CTM en los injertos no pudo ser un mero producto del procesamiento de antígenos del donante, sino que implica una interacción específica de las CTM con el sistema inmune del huésped, y a la vista de los resultados, el autor incita a enfocar más la investigación en aumentar la eficiencia de las CTM derivadas del receptor, mucho más interesante desde el punto de vista práctico, como ya hemos comentado [141]. El mismo grupo ha demostrado que las CTM del donante no son rechazadas y que son capaces de inhibir la

## DISCUSIÓN

alorreactividad en pacientes trasplantados renales cuando se infunden pretrasplante, sugiriendo un papel prometedor en la inducción de la tolerancia y supresión del rechazo [296].

Otros, sin embargo, demuestran que ambas CTM, alogénicas y autólogas, son capaces de inhibir la alorreactividad con una eficacia similar [296, 302]. En el otro extremo, otros autores han observado que las CTM derivadas del donante o third-party pueden inducir alorreactividad y acelerar el rechazo [395] [396].

En clínica, por el contrario, los primeros estudios pilotos se realizaron con **CTM autólogas** para minimizar el riesgo de activación del sistema inmune y sensibilización del huésped frente a la introducción de antígenos extraños con CTM alogénicas siendo la seguridad el primer objetivo, aun a riesgo de disminuir su potencial efecto inmunomodulatorio [79, 314, 330]. Sin embargo, otros más recientes han demostrado la eficacia de las CTM del donante, sobre todo cuando se trata de un trasplante de donante vivo [47], y otros están usando CTM alogénicas producidas por sus instalaciones de GMP (“*good manufacturing practice*”) o bien obtenidas de compañías comerciales [339]. El desarrollo de un producto obtenido de esta forma facilitaría mucho la logística y la accesibilidad de todos los centros para su uso, y permitiría estandarizar el producto y comparar entre diferentes estudios, limitación importante hasta el momento, y esto a su vez, permitiría avanzar en investigación y en su introducción en la clínica. Los resultados de los ensayos clínicos, como el estudio Neptuno, por ej., que están ahora en marcha quizá nos den la solución a este debate [334].

### b. ¿MÉDULA ÓSEA O TEJIDO ADIPOSO? ¿OTROS?

Los autoinjertos de CTM humanas derivadas de médula ósea (MO-CTM) fueron de las primeras terapias celulares en tener éxito ya que hay poco riesgo de rechazo y su uso continúa siendo la principal fuente de CTM. Sin embargo, no siempre se acepta su uso debido al riesgo de exposición viral, a la posibilidad de morbilidad del donante, y a la disminución significativa del número de células y de su capacidad de diferenciación y proliferación con la edad, y por ello han surgido alternativas. Aunque las CTM se han aislado en multitud de tejidos, en la práctica, sin embargo, sólo las células derivadas de tejido adiposo (Ad-CTM) y de cordón umbilical (CU-CTM) parecen ser alternativas para uso clínico, al ser fácilmente accesibles. El sinovial también se ha usado con éxito en algunos estudios



Aunque han demostrado poseer unas propiedades fenotípicas e inmunomoduladoras comparables [397] [398] [160, 249], muestran algunas diferencias que deberían tenerse en cuenta para ver si modifican su función en la clínica, en términos de frecuencia de colonias (más en tejido adiposo y menos en cordón), inmunofenotipo (menos expresión de CD106 en tejido adiposo y de CD90 y CD105 en las derivadas de cordón), potencial de diferenciación (más reducido en las de cordón) y expresión génica [124, 188, 399, 400]. Así, mientras las MO-CTM tienen un potencial condrogénico mayor [401], las Ad-CTM se diferencian mejor en cardiomiocitos; por ej. es importante señalar que las Ad-CTM son CD34+ y las MO-CTM no, lo cual implica que son poblaciones diferentes [160]. Sin embargo, esto no es así en las generadas *in vitro*, más parecidas a las MO-CTM [249].

*Keon Hee Yoo et al* realizan un estudio comparativo entre las CTM humanas procedentes de tejido adiposo, de cordón umbilical, de gelatina de Wharton y de médula ósea [402]. Observa que son todas capaces de inhibir la proliferación de células T inducida por mitógenos y que el mecanismo es similar, mediado por IDO, responsable de la supresión de la liberación de IFN y de TNF $\alpha$  por parte de las células T activadas. Así, defiende que las Ad-CTM son una interesante alternativa sobre todo si se usan autólogas. Las CTM derivadas de cordón o de gelatina de wharton son todavía mejor, en cuanto a que no tiene riesgos para el donante, pero obviamente sólo se pueden usar *third-party*.

Las **Ad-CTM** fueron identificadas por primera vez por *Zuk et al* en 2001. El tejido adiposo es una fuente rica en CTM capaces de regenerar huesos y cartílagos en humanos y mediar parcialmente en el tratamiento de osteoartritis y osteonecrosis. Entre sus ventajas destacan que se puede obtener fácilmente de una liposucción, método mínimamente invasivo. Además, es más rico en CTM que la MO y se pueden obtener grandes cantidades en 2-3 semanas de cultivo [124], por lo que reduce también la necesidad de muchos pases, aunque a costa de reducir la tasa de proliferación y la pureza de las células por la pérdida de la multipotencialidad [403]. Otros estudios observan que las Ad-CTM son supresores más potentes de la diferenciación de las CD que las MO-CTM [404].

Entre sus inconvenientes, aunque no está del todo claro, las Ad-CTM parecen ser más vulnerables a desarrollar anomalías cromosómicas que las MO-CTM, después de muchos pases en cultivo [405, 406], por lo tanto estos pases se deberían minimizar a la hora de aplicarlas en clínica.

Existen muchas publicaciones acerca de la seguridad de las Ad-CTM *in vivo* usando modelos animales [407-410], e incluso en ensayos clínicos, como los del Dr García Olmo para el tratamiento de fístulas intestinales. En el área del trasplante, sin embargo, hay muy poco descrito y menos en el

## DISCUSIÓN

intestinal, y de aquí la originalidad de esta tesis. *Yañez et al* publican por primera vez que las Ad-CTM de ratón, pueden controlar el EICH letal tras un TMO haploidéntico en ratón, y que es un efecto parcialmente mediado por la PGE2. Sin embargo, es más importante su efecto en la prevención que en la curación, ya que infusiones más tempranas son más eficientes (menos EICH y más leve) que las tardías [160]. Al hilo del tema, ésta es también la impresión de nuestra tesis, que las Ad-CTM parecieron ser más útiles en el rechazo menos evolucionado que en el más severo.

Todo lo comentado, sumado al hecho de que las CTM third party son bien toleradas y efectivas, abren nuevas perspectivas al uso de las Ad-CTM, puesto que se desechan diariamente grandes cantidades de tejido adiposo procedentes de liposucción. En nuestro centro, al comienzo de tesis, existía una Unidad de Terapia Celular pionera en el Hospital La Paz, con experiencia en las Ad-CTM, tanto in vitro como en la clínica, que motivó a decidimos por ellas, sumado al hecho de que, en el TI pediátrico, parece menos invasivo extraer tejido adiposo del receptor que médula ósea.

### c. ¿ALOGÉNICAS O XENOGÉNICAS?

Durante el desarrollo de esta tesis, se planteó la opción de comprar las CTM a modo de preparado comercial, en lugar de obtenerlas en el laboratorio, y de si era razonable infundir CTM humanas en roedores para estudiar su efecto inmunomodulador, como han hecho algunos autores y así ganar un paso en el proceso de traslación a la clínica. También se plantea la duda de si es posible tratar con CTM procedentes de animales, como es el cerdo, en la clínica humana.

Conviene tener en cuenta las diferencias y peculiaridades de las CTM humanas frente a las de otras especies; así, los cultivos con CTM de ratón pueden contaminarse mas fácilmente con células hematopoyéticas, incluso después de muchos pases, frente a la relativa facilidad para aislar y expandir CTM humanas. Las de ratón no se han caracterizado todavía formalmente con respecto a la expresión de sus antígenos de superficie, aunque generalmente se siguen los criterios de las CTM humanas. El tamaño de las células es también diferente.

No hay información relevante en la literatura, aunque se aprecia una heterogeneidad en la especie procedente de las CTM producidas por diferentes laboratorios [411], que contribuye a diferentes resultados y que dificulta extraer conclusiones.

## V. ¿CUÁL ES LA FORMA MÁS ÓPTIMA DE ADMINISTRACIÓN DE LAS CTM PARA PLANTEARLAS COMO TERAPIA EN TOS?

Otro punto crucial de debate es si la vía de administración de las CTM influye en su actuación, antes de plantear grandes ensayos clínicos [79, 412].

La mayoría de referencias encontradas en la literatura hablan de una administración iv de las CTM, aunque ésta no está exenta de efectos secundarios, como el tromboembolismo pulmonar y precisa de una gran experiencia. Algunos estudios han observado que las CTM se podrían quedar atrapadas en el pulmón tras la infusión iv [382]. En nuestro modelo, inicialmente se planteó la administración de CTM por vía intravenosa, a través de la vena de la cola de la rata. Previo al trasplante, se canalizaba una vía en el receptor y se administraban a continuación las CTM diluidas en Ringer Lactato, muy despacio, para evitar complicaciones. Posteriormente se dejaba la vía a un ritmo de infusión lento para asegurar que las CTM no se quedaran acantonadas en la cola. En un momento en el que la curva de aprendizaje del modelo se había superado, tuvimos mala experiencia al comenzar la administración de las CTM, ya que, en la mayoría de los animales, se produjo un tromboembolismo pulmonar inmediatamente posterior al desclampaje que no respondió a masaje, o bien un sangrado incontrolable a lo largo de la hora siguiente a la administración, conduciendo en ambas situaciones a la muerte del animal.

Retrospectivamente, y tras una extensa revisión de la literatura, quizá fue un problema de exceso de dosis y no de vía, puesto que en estudios clínicos hablan de  $1-3 \times 10^6$  por kilo de peso, y nuestros animales apenas rondaban los 250 gramos. Además, es importante señalar que el riesgo de embolia por atrapamiento de estas CTM en la arteria pulmonar de una rata es mucho mayor que en un humano.

De cualquier forma, se comenzaron a administrar a través de la arteria del injerto, con una supervivencia del 100% y sólo en el primer caso, el injerto pareció blanquecino en los primeros segundos, recuperando el color rosado instantes después. De esta forma nos aseguramos la supervivencia del animal, y que las CTM llegaran al injerto. Sin embargo, esta vía sólo estaría indicada si la terapia se hace durante el trasplante, lo cual no parece el momento más óptimo, como hemos visto, por lo que sería interesante plantear nuevas formas de administración en proyectos futuros.

De cualquier forma, la literatura proporciona evidencias in vitro e in vivo de que la administración intrarterial es beneficiosa; así, experimentos en ratas demostraron que la inyección de CTM en la arteria en un modelo de trasplante renal, disminuía la frecuencia de glomerulonefritis previniendo así del rechazo agudo [291, 413]. Por otro lado, ya hemos comentado algunos ensayos clínicos que

## DISCUSIÓN

utilizan la inyección intraarterial en trasplante renal, con buenos resultados. En resumen, la vía intraarterial parece factible y segura, aunque hacen falta más estudios [47].

Existen otras vías de administración menos estudiadas en el campo del TOS. *Lee et al* en 2013 administran las CTM vía intraosea el día del trasplante renal, sin observar incidencias; los resultados mediocres del estudio, ya que un alto porcentaje de pacientes desarrolla rechazo, podrían ir más bien relacionados con otros aspectos, como el momento de administración, por ej, aunque no pueden extraer más conclusiones [336]. En el caso de trasplante hepático, las CTM se pueden inyectar también por vía intraportal durante la cirugía para aumentar la cantidad de CTM que llegan al órgano diana.

Es evidente que para decidir cual es la mejor vía de administración es necesario entender mejor la capacidad de migrar de las CTM, y si realmente las CTM requieren un contacto cercano con el órgano diana para ser efectivas.

## VI. ¿CUÁL ES LA DOSIS ÓPTIMA DE CTM?

Hay muy poca bibliografía al respecto. En general la mayoría de los trabajos experimentales, con ratas, utilizan una dosis similar a la nuestra, pero la dosis ideal aun no se ha estudiado, y menos en el contexto de TOS [122]. En los ensayos clínicos con CTM, la dosis suele referirse por kg de peso, y oscila entre  $1-10 \times 10^6$  células/kg, viendo que este rango de concentración ha sido bien tolerado y efectivo en EICH o en Crohn [191, 365].

Si tenemos en cuenta que las ratas suelen pesar unos 250 g, esta dosis es bastante inferior a la utilizada en nuestro estudio, y es que al ver muy escasos elementos fluorescentes en el grupo SHAM, inicialmente se pensó que podría ser una dosis insuficiente. Analizando retrospectivamente los resultados, quizá fue todo lo contrario, una dosis demasiado elevada, la que provocó las complicaciones mortales tras la administración iv. Es importante recordar que el efecto de las CTM sobre las células T parece depender de la dosis, aunque no se le da la importancia que merece y cada grupo usa una dosis diferente; así, en un modelo de encefalomiелitis autoinmune, mientras un ratio elevado de CTM/células T ejercía potentes efectos inhibitorios, un ratio bajo fomenta la proliferación de células T [414].

## VII. INTERACCIÓN DE LAS CTM CON OTROS FÁRMACOS

En el área del trasplante es importante el régimen de inmunosupresión en el que las CTM van a actuar, y ver, por un lado, que no interaccionen negativamente sobre los fármacos, ya que ambos inhiben la misma diana (fundamentalmente los linfocitos T), y por otro, que los fármacos no disminuyan la viabilidad, potencia y eficacia de las CTM [147]. Algunos trabajos, atrevidos como el de *Zhou et al.*, por ej. proponen que las CTM son capaces de prolongar la supervivencia del injerto cardiaco sin necesidad de ningún inmunosupresor adicional; quizá se debe a que, en su trabajo, las administraban pre trasplante y después postrasplante en grandes dosis y repetidas [286]. Sin embargo, esto resulta poco trasladable en la clínica. *Tan et al*, por ej., sugieren que las CTM pueden sustituir el Basiliximab, mientras que Perico et al usan concomitantemente Timoglobulina y Basiliximab junto a las CTM para facilitar su función.

A pesar de numerosos estudios, los datos son controvertidos, probablemente por la diferente metodología. Algunos sugieren que los **anticalcineurínicos (CNI)** y los **inhibidores de mTOR**, pueden interferir e incluso antagonizar las propiedades inmunoreguladoras de las CTM y viceversa [79, 141, 386, 415-417], siendo incluso más susceptibles las AdCTM que las MO-CTM por algunos autores [418]. Sin embargo, otros como *Hoogduijn et al* observaron que ni el Tacrolimus, ni la Rapamicina ni el MPA producían toxicidad o apoptosis de las CTM.

Con respecto a los **anticalcineurínicos**, hay evidencia clínica y experimental de que al bloquear la expresión de la IL2 en las células T, impiden el desarrollo de las Tregs y la homeostasis [419], aunque en dosis bajas estos fármacos pueden hacer el efecto contrario [420]. Otra hipótesis sugerida es que los CNI inhiben el microambiente inflamatorio, esto es, la activación de linfocitos y su liberación de citoquinas proinflamatorias, las cuales, en especial el IFN $\gamma$ , son necesarias para activar a las CTM y que ejerzan sus efectos inmunosupresores [117, 415] [244].

Así, algunos estudios demuestran que la **ciclosporina (CsA)**, interfiere en la función de las CTM: por ej, vieron en un modelo de trasplante cardíaco en rata que, administradas conjuntamente, las CTM no mejoraban la supervivencia, e incluso se aceleró el rechazo [157]. En modelos de trasplante renal también se demostró que, combinadas con ciclosporina a bajas dosis, las CTM protegían la función del injerto, pero no prolongaban la supervivencia [290], e incluso la CsA antagonizaba la eficacia de las CTM, y que esta combinación no tenía ventajas en términos de supervivencia del injerto comparado con la CsA sola [215]. En su modelo murino, *Eggenhofer et al*

## DISCUSIÓN

ven en la RLM in vivo, que la CsA inhibía la supresión mediada por CTM de la proliferación de los CD4+ [417]. *Buron F et al* en su estudio con RLM ven que la CsA usada a altas dosis antagoniza la función inhibitoria de las CTM, pero la promueve si se emplea a dosis muy bajas [415]. Lo mismo observan con el TAC y con el Rapamune.

Sin embargo, estos estudios contrastan con otros en los cuales la eficacia de las CTM no se vio alterada por la CsA [285, 421], ni tampoco la generación de Tregs inducida por las CTM [207], e incluso con otros donde las CTM sinergizaban con la CsA para inhibir la actividad de los linfocitos T activados [206, 422, 423]. También, en modelos de trasplante de islotes, la combinación de CTM y CsA a dosis subterapéuticas ejercía un efecto inmunosupresor sinérgico, induciendo una expansión temprana de IL10 y produciendo células CD11b+, las cuales mediaban la poca respuesta de las células T y permitían la expansión de células Foxp3 en los ganglios linfáticos y en el injerto, que se traducían en aceptación del injerto a largo plazo [307, 308]. Además, en trasplante de extremidades posteriores en cerdos, la combinación de múltiples infusiones de CTM con CsA a corto plazo conseguía supervivencia indefinida, y en un trasplante hemifacial prolongaba la supervivencia [310, 311]. En ambos estudios, los animales supervivientes a largo plazo presentaban niveles aumentados de Foxp3 en la periferia y en el injerto.

Con respecto al **Tacrolimus**, no hay gran evidencia de que pueda interferir con las CTM, excepto lo ya comentado, y de hecho se utilizan en los ensayos clínicos como inmunosupresión concomitante. Nosotros tampoco observamos un claro efecto del TAC sobre la actuación de las CTM en nuestro trabajo, obviamente sí sobre el grado de rechazo y también sobre la proporción de células Foxp3 en el injerto. Sin embargo, al analizar las poblaciones linfocitarias, observamos que los **CD4** y de los **CD20** disminuyeron mucho en los grupos con CTM y con mucho rechazo (sin Tacrolimus), lo cual cuadra con lo descrito en la literatura, ya que las CTM inhiben la proliferación de linfocitos T, y también B; pero resultó extraño que esto no ocurriera en los grupos con menos rechazo tratados con Tacrolimus, y, como describen algunos autores, hay que tener en cuenta la posible interferencia entre ambos tratamientos.

Los **CD8**, en cambio, fueron muy abundantes y aumentaron en los grupos con CTM y sin Tacrolimus, algo que no ocurrió en los grupos con Tacrolimus, independiente de que estuvieran tratados con CTM o no. Esto resulta interesante, y se puede interpretar de diferentes formas: o bien que las CTM atrajeron a los linfocitos CD8 citotóxicos (probablemente por el momento de administración de las células), o que esos CD8 eran realmente supresores o reguladores (Foxp3+) y estaban realmente ejerciendo un rol inmunomodulador mediado por la CTM. Aunque la

modificación del perfil de los CD8+ hacia un fenotipo más regulador ya se ha descrito, en el terreno del TOS hay pocos trabajos experimentales, y menos en el trasplante intestinal.

Por el contrario, se ha visto de forma consistente que los **inhibidores de mTOR** promueven la expansión de Tregs in vitro y in vivo en modelos animales y en receptores de trasplante renal [424]. Como ya hemos comentado, la infusión de CTM y rapamicina resultaron sinérgicas para atenuar la respuesta aloimmune y para promover la tolerancia del injerto en un modelo murino de trasplante cardíaco [167], apoyando estos resultados su uso combinado en el trasplante clínico.

Por otro lado, en un modelo similar, *Eggenhofer et al* encontraron un efecto sinérgico con el **MMF** a bajas dosis combinado con CTM del donante, que inducían tolerancia del injerto a largo plazo y, por otro lado, contrario a otros artículos, no encuentra un efecto beneficioso en la supervivencia del injerto cuando se administran solas, e incluso se adelantaba el rechazo, siendo esta observación compartida por otros autores [141, 416, 417]. Así, los inhibidores de la síntesis de purina/pirimidina (MMF o MPA) parecen el mejor inmunosupresor para asociar a las CTM en el trasplante, lo cual tiene su lógica al inhibir la proliferación de linfocitos por distintos mecanismos.

Las dosis también parecen importantes: así, in vitro, una dosis alta de TAC resultó tóxica para las CTM, mientras que una dosis terapéutica de MPA y la Rapamicina fue suficiente para inhibir la proliferación de las CTM [425].

Con respecto a la **Timoglobulina (ATG)**, algunos estudios in vitro han observado que la ésta se une a las CTM humanas de forma dosis dependiente, y se asocia con la muerte de las CTM, disfunción de sus efectos inmunosupresores, y susceptibilidad a la lisis por NK y CD8 citotóxicas activadas por citoquinas [426]. Estos efectos también se han visto en clínica y deben ser tenidos en cuenta para el diseño de ensayos clínicos [79]. Los **corticoides**, en cambio, no parecen alterar la función de las CTM.

En resumen, los distintos resultados in vitro e in vivo, indican que la infusión de CTM podría actuar de forma sinérgica con algunos fármacos para inducir la tolerancia a largo plazo del injerto, permitiendo minimizar el tratamiento de mantenimiento antirechazo. Sin embargo, sigue siendo tema de debate y hacen falta más ensayos clínicos.

### VIII. OTRAS CONSIDERACIONES DE LAS CTM

Quedan todavía muchos aspectos mejorables a la hora de trasladar la experimentación a la clínica, antes de poder hablar de perspectiva clínicas futuras en el trasplante, y en concreto en el Trasplante Intestinal [427].

Con respecto al **proceso de obtención**, las CTM para uso clínico deberían ser recogidas y expandidas ex vivo en centros especializados, con filtros de flujo laminar para el aire ambiente y acceso controlado de acuerdo con las reglas del “**Good Manufacturing Practice**” (GMP), que son las que se usan normalmente para la producción industrial de drogas administradas por vía iv [188] y aseguran un producto seguro y puro, y un proceso reproducible y consistente. Este proceso se puede dividir en varios estadios: **aislamiento, expansión, recogida y preservación**. La unificación de los métodos empleados en cada uno de estos estadios, aunque han mejorado desde las guías de las ISCT en 2006 [126], aún no están totalmente estandarizados entre los centros, y falta ponerse de acuerdo en muchos detalles [147], por ejemplo, a la hora de elegir la fuente tisular de origen, el tipo de cultivo, el medio de cultivo, ...Actualmente existen preparados comerciales que solventan todos estos problemas.

El número de pases es también un tema de debate: En general, el consenso es que cuantos menos mejor [411], y además, para producir a gran escala en clínica, lo que interesaría sería conseguir muchas células en poco tiempo para reducir los riesgos potenciales de contaminación o transformación y para disminuir costes derivados de las GMP. Sin embargo, altas densidades celulares pueden reducir la tasa de proliferación y la pureza de las células por la pérdida de la multipotencialidad, convirtiendo al procedimiento en menos reproducible. En nuestro estudio, por ejemplo, obtuvimos las CTM tras el tercer pase.

Hasta la fecha **no se han descrito efectos adversos graves** a medio plazo dentro de un número considerable de ensayos clínicos usando CTM, tanto en TOS como en TMO como en otras enfermedades con ensayos clínicos más avanzados, a excepción de algún efecto secundario transitorio relacionado con el momento de la inyección [428], aunque hacen falta estudios a largo plazo. Por otro lado, queda pendiente estudiar si las **comorbilidades** (por ej, enfermedades crónicas, como diabetes, IRC...) de las CTM del donante y/o del receptor pueden afectar negativamente a la eficacia y potencia de los productos celulares [213] y si estos efectos se pueden revertir de alguna forma, ya sea con tratamientos in vitro o in vivo [147, 159].



La seguridad, desde el punto de vista de **promoción del tumor**, es otro tema fundamental. La expansión in vitro de las CTM, podría suponer un riesgo por alteraciones genéticas. Esta se atribuye a la inestabilidad cromosómica, pérdida de la inhibición por contacto y la expresión aberrante del c-myc. Aunque en esta tesis no apareció ningún tumor tras la administración de las CTM, existe una gran controversia sobre este tema. **A favor del miedo**, se han descrito transformaciones espontáneas de estas células [406, 429]. Sin embargo, estos estudios fueron discutidos y rechazados por la evidente contaminación de los cultivos con CTM por líneas celulares tumorales [430, 431]. Otros estudios experimentales declaran que cuando las CTM son inyectadas subcutáneamente o de forma intravenosa en ratones inmunocomprometidos, se producen fibrosarcomas en diferentes localizaciones. Además de la generación directa, las CTM pueden promover el desarrollo de tumores no derivados de las CTM. Se ha visto que las CTM migran de forma selectiva y se injertan en localizaciones de tumores cuando se infunden de forma sistémica. Las células del mieloma B16 permanecen sin rechazar e inducen la formación de tumores en ratones sólo cuando las CTM se inyectan al mismo tiempo. De la misma forma, Ad-CTM coinyectadas con células del melanoma favorecen el asentamiento y crecimiento del tumor incluso cuando las CTM se inyectan posteriormente. En este estudio se vio que IDO está sobreexpresado tanto en los nódulos linfáticos del tumor como en el microambiente tumoral por sí mismo, favoreciendo la supresión de la primera respuesta inmune. Asimismo, las células tumorales transfectadas con IDO se volvían resistentes al rechazo. En otro estudio, las Ad-CTM de un paciente con un tumor de mama expresaban altos niveles de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y el TGB- $\beta$ . En vista de estos hallazgos, es razonable suponer que las CTM favorecen fisiológicamente el crecimiento del tumor y que esta propiedad ha de tenerse en cuenta.

Un estudio francés observó in vitro unas aberraciones cromosómicas transitorias en 20 preparaciones de MO-CTM obtenidas bajo GMP con dos procesos diferentes de cultivo. Sin embargo, estas células mostraron la misma senescencia que las CTM normales y no llevaron a procesos tumorales tras la inyección en ratones inmunocomprometidos [432]. Esto sugiere que la aneuploidia ocurre en cultivos de CTM in vitro sin necesidad de transformación, independientemente del tipo de cultivo [403]. Además, las CTM sometidas a duplicación hasta 20-25 veces o las CTM que se vuelven senescentes no han mostrado ninguna transformación in vitro o in vivo en estudios de toxicidad en animales [401, 432].

**A favor de la tranquilidad**, parece que la expansión in vitro de las CTM humanas es más estable que las murinas y no parece generar inestabilidad genómica incluso a largo plazo en el cultivo.

## DISCUSIÓN

Además se ha visto que no se transforman en células malignas cuando se trasplantan en ratones [401, 433]. Distintas revisiones no han encontrado ninguna evidencia para afirmar un potencial de CTM humanas para transformación maligna [433, 434]. Un metaanálisis con una muestra de 1012 receptores de CTM confirmó también la seguridad clínica recientemente [435]. Hasta la fecha no se ha descrito ninguna transformación maligna en la clínica con el uso de CTM humanas; sin embargo, la heterogeneidad de los artículos con diferentes condiciones y protocolos sugiere que seamos cautos.

Curiosamente, otros estudios han demostrado que la transfección de CTM con genes que codifiquen moléculas con una actividad antiproliferativa, como el IFN $\beta$ , no sólo inhibe el crecimiento neoplásico in vitro, sino también **disminuye el riesgo de cáncer** in vivo [436], y similares resultados se han visto con los gliomas [437]. Por tanto, la terapia celular con CTM orientada mediante ingeniería tisular a producir moléculas antiproliferativas podría ser una estrategia eficiente en tratamientos contra el cáncer específicos con pocos efectos secundarios [438].

Estos temas merecen especial importancia a la hora de dar los **primeros pasos en clínica en TOS, y en concreto en el Trasplante Intestinal** [159], ya que las propiedades inmunomoduladoras y de multipotencialidad de las CTM suponen una amenaza especial en pacientes inmunosuprimidos [147], donde hay que tener en cuenta la posible maldiferenciación in vivo y su potencial para facilitar el crecimiento de tumores preexistentes pero ocultos [79, 439, 440]. En este sentido, es evidente que la estabilidad genética se merece mucha atención, que la senescencia de los cultivos con CTM, lo cual supone un riesgo para la transformación debería ser evitado con pocos pasos y que un test de estabilidad más exhaustivo que un cariotipo estándar así como la caracterización fenotípica, funcional y genética de las CTM antes de administrarlas debería ser necesario [431, 434].

La potenciación de la inmunosupresión por las CTM puede acentuar el riesgo de **infecciones virales oportunistas**, ya sean de novo o reactivaciones, enfermedades linfoproliferativas y leucoencefalopatía multifocal progresiva [147, 159]. Los resultados de los primeros estudios clínicos no pueden concluir que la terapia con CTM conduzca un aumento de las recaídas de leucemia. *Ning et al* publicó un riesgo aumentado de recaída, aunque se trataban de un número muy limitado de pacientes [441]; un estudio con 31 pacientes con EICH y seguimiento a largo plazo tratados con CTM no encontró ninguna evidencia de recaída [442], aunque si

observaron varias complicaciones infecciosas a largo plazo. Estos riesgos potenciales de la terapia con CTM se deberían comparar con las que ocurren con regímenes inmunosupresores estándar actuales para poder establecer conclusiones. En nuestra serie por ejemplo de trasplante intestinal, varios pacientes con inmunosupresión muy potente como el Alemtuzumab, la mayoría por tratarse de retrasplantes por rechazo del injerto previo, desarrollaron linfomas y otras neoplasias. Otros estudios recientes muestran que la muerte por infección es común al menos en pacientes tratados con CTM por EICH agudo o cistitis hemorrágicas [442] y que la terapia con CTM es un factor de riesgo para la muerte por neumonía en pacientes que han recibido un TPH alogénico [443].

En los ensayos clínicos hasta el momento en TOS, *Tan et al* objetivaron un menor número de infecciones en los pacientes con CTM, que se contradice con los resultados de *Reinders* [128, 330, 367]. Así, este punto debe priorizarse a la hora de establecer los criterios de inclusión de los ensayos clínicos propuestos.

Por encima de todo, más de 10 años de experiencia con terapia con CTM y sin ninguna complicación seria publicada hasta el momento, hace pensar que el riesgo de esta terapia es asumible. No obstante, en pacientes trasplantados crónicamente inmunosuprimidos, con riesgo alto de infección y malignidad, es aun más importante si cabe establecer profilaxis como protocolo de rutina de estas entidades, así como una vigilancia estrecha y monitorización viral para minimizar riesgos.

Por último, hay que tener cuenta los **aspectos legislativos**. Cultivar CTM humanas en un laboratorio convencional estándar es relativamente fácil. Trasladar protocolos usados en investigación a los protocolos requeridos para obtener CTM utilizables en el ámbito clínico es mucho más difícil, y algo que los investigadores con frecuencia infravaloran. Hay que considerar muchos aspectos: el tipo de tejido que se va a aislar, materiales usados para cultivo, equipos, procedimiento de cultivo, validación... y sin mencionar los costes implicados en todos estos procesos.

El uso de CTM comercializadas está sometido a unas regulaciones que incluyen normas referentes a la seguridad del producto, validación, eficacia y trazabilidad y producción que tienen que acomodarse a las Prácticas de Buen Hacer (Good Manufacturing Practice, GMP). Conviene saber que existen normativas diferentes entre los países, EU y USA. implican un proceso de producción de las CTM enormemente controlado con el fin de asegurar un producto seguro y puro, con una eficacia consistente, y un proceso de producción consolidado y reproducible.

## *DISCUSIÓN*

Como el número de ensayos clínicos con CTM aumenta exponencialmente, la necesidad de consenso es clara. Pequeñas variaciones en la producción pueden derivar en resultados inconsistentes de los ensayos clínicos y pueden amenazar el uso de las CTM en la clínica. La terapia celular es relativamente nueva en la salud, y todavía esta desarrollándose la infraestructura, incluyendo aquí la producción, la regulación, los costes y la aceptación clínica.

Se ha sugerido desarrollar un consenso internacional para el cultivo de las CTM. El problema es que tienen que realizarse de acuerdo a los objetivos clínicos y en combinación con el tipo de tejido seleccionado. Por ej. Le Blank publica su estudio multicéntrico en EICH en 2008, donde las CTM se produjeron en distintos centros europeos pero la expansión *ex vivo* se realizó de acuerdo a los criterios definidos por la European Group for Blood and Marrow. Esto sería lo deseable también en el uso de CTM en TOS. Otra opción es convertirlos en “off the shelf products” por distintas compañías farmacéuticas, como se esta viendo con Athersys, Genzyme o Osiris, que ya han aprobado algunos (Prochymal) como CTM para el tratamiento de EICH. Esto también sería útil en el TOS.

### **IX. PERSPECTIVAS CLÍNICAS FUTURAS DE LAS CTM EN EL TRASPLANTE INTESTINAL**

A estas alturas de la tesis, la seguridad global de la terapia con CTM parece deducirse de todos los ensayos clínicos mencionados hasta el momento, si bien es cierto que la heterogeneidad en el diseño (fuente de CTM, vía de administración, inmunosupresión concomitante y objetivos del estudio) entre las distintas publicaciones limita la comparación entre ellos y la posibilidad de sacar conclusiones.

De la revisión bibliográfica se deduce que se va avanzando muy despacio en el conocimiento de los mecanismos de acción de las CTM, y se observan resultados muy discretos, en particular en el área del TOS. Cada vez hay más evidencia de que el problema para obtener buenos resultados con ellas no son las CTM en sí mismas, sino un sinfín de detalles como administrarlas en el momento adecuado y por la vía correcta, entre otras. El motivo de ello es que se comportan de forma distinta en función del ambiente más o menos inflamatorio en el que se encuentren.

Tanto desde el área del TI, con sus resultados mediocres, como desde el área de las CTM, donde observamos discretamente su rol inmunomodulador aunque con muchas controversias en los distintos estudios, llegamos al mismo punto de reflexión: el sistema inmune es uno de los sistemas

más desconocidos y complejos para la medicina y aunque constantemente se describen células y moléculas nuevas, sigue sin estar claro cómo actuar sobre ellas, ya que están interrelacionadas y modifican su perfil en función del contexto.

Esto explica que no dispongamos por el momento de un método de diagnóstico precoz no invasivo para el rechazo en este tipo de trasplante, aparte de la toma de biopsias; que el tratamiento del rechazo se haga con frecuencia “matando moscas a cañonazos”, interfiriendo y modificando excesivamente el sistema inmune del huésped; y por ello, que intentar buscar un mecanismo de acción claro sobre el rechazo por parte de las CTM resulte tan difícil.

Hace falta mucha investigación, pero debe estar organizada, con ensayos clínicos registrados y diseñados bajo protocolos aprobados por un comité ético y estar registrados en una base de datos monitorizada segura. Que los avances en la investigación y la práctica clínica se combinen para optimizar los conocimientos. Sería útil establecer un registro de “Terapia celular en TOS” para buscar parámetros clínicos importantes y resultados a corto y largo plazo. Esto nos permitiría también asesorar la seguridad y la eficacia de estos protocolos, y diseñar estudios futuros.

En el trasplante intestinal, por sus peculiaridades, esta terapia resulta prometedora, y es probable que las CTM se usen en clínica antes de lo esperado. De hecho algunos grupos las han usado para el tratamiento del EICH basándose en los resultados del grupo de Le Blank (Birmingham, datos no publicados) o del rechazo [343], aunque sin tratarse de ensayos clínicos registrados. Aunque se deben establecer bien los mecanismos de actuación, para huir del empirismo, es probable que, una vez extendido su uso comercial con otros fines, y dada la inocuidad de las CTM, se empleen en casos donde la inmunosupresión estándar haya fallado en conseguir la tolerancia, y que aprendamos más sobre ellas de forma retrospectiva.

Aunque nuestro trabajo experimental falló en demostrar su rol inmunomodulador, y que los trabajos discrepan en sus resultados, tras una extensa revisión podemos afirmar que las CTM sí tienen un papel inmunomodulador y un futuro en el área del trasplante intestinal, pero que es necesario entender el contexto de cómo emplearlas para obtener el resultado esperado.



# CONCLUSIONES

---





## 8. CONCLUSIONES

---

1. La **falta de comprensión de los fenómenos inmunológicos** impide mejorar los resultados del trasplante intestinal a largo plazo.
2. Es necesario **integrar los conocimientos en investigación con los adquiridos con la experiencia clínica**. Tanto los receptores como los donantes, son individuos enormemente complejos y heterogéneos, a diferencia de lo que ocurre con los animales de experimentación o estudios in vitro. Hay muy pocos centros punteros en Trasplante Intestinal en clínica que además posean un potente grupo de investigación.
3. Clásicamente la búsqueda de la tolerancia se ha intentado con diferentes estrategias, bien sobre el donante o sobre el injerto, o sobre el receptor. Esta tesis doctoral **aporta una nueva estrategia inmunomoduladora con Celulas Troncales Mesenquimales** para prevenir el rechazo tras un trasplante intestinal, aunque abre puertas para plantear su uso en otras complicaciones inmunológicas, como es la Enfermedad Injerto contra huésped.
4. Una **extensa revisión de la literatura** acerca del uso de las **CTM en Trasplante de Órgano Sólido** evidencia ampliamente sus propiedades inmunosupresoras e inmunorreguladoras **in vitro**, de forma más controvertida en **estudios preclínicos** y con gran dificultad en **ensayos clínicos**. No obstante, todos coinciden en la inocuidad y ausencia de complicaciones.
5. Hay muy poca experiencia en el uso de esta **terapia celular en el TI**, tanto a nivel clínico como experimental, y sin embargo, sería unos de los órganos que más se beneficiarían por su características inmunogénicas.
6. Se ha publicado un sólo artículo, y con posterioridad al desarrollo de esta tesis, que avala el rol inmunomodulador de las CTM para prevenir el rechazo en un modelo similar de trasplante intestinal en rata; no obstante, obtuvimos **resultados opuestos**, y aportamos peculiaridades no descritas como es el uso de **CTM procedentes de tejido adiposo** frente a las de médula ósea, más rico en CTM, y de más fácil obtención.
7. En este trabajo, las **CTM no previnieron el rechazo agudo**. Una probable hipótesis es que al administrarlas durante el trasplante, fueran al daño y actuaran defendiendo al receptor, liberando citoquinas proinflamatorias y estimulando a poblaciones celulares efectoras, provocando el efecto contrario. **Un estudio futuro de gran interés** sería infundirlas unos días

## CONCLUSIONES

antes del trasplante para que migraran a los órganos linfoides, orientando la maduración de los linfocitos hacia un perfil más regulador. Sin embargo, esto resultaría de difícil aplicación clínica en el TI, con donación cadavérica.

8. No encontramos diferencias en cuanto a la prevención del rechazo en función de la **procedencia de las CTM** (del donante o third-party). La literatura tampoco se decanta por ninguna de las opciones en el contexto de TOS, aunque la comercialización de las CTM disminuiría la responsabilidad de cada laboratorio individual, aseguraría el buen estado y facilitaría el análisis de resultados.
9. Aporta otra idea original, que es la **administración factible de las CTM por vía intraarterial**, asegurando su llegada al órgano diana, el injerto intestinal. Minimiza los riesgos de embolia pulmonar descritos con la infusión intravenosa, y descarta algunas hipótesis descritas acerca de que no llegan al daño. Sin embargo, no es la vía ideal si en un futuro se plantea infundirlas días previos al trasplante.
10. Sí observamos **diferencias en cuanto a citoquinas en plasma y poblaciones celulares** en los animales que fueron tratados con CTM, abriendo la puerta a numerosas preguntas para responder en trabajos futuros: Probablemente obtendríamos resultados positivos con las CTM si diéramos con la tecla correcta en todas ellas.
11. Pese al optimismo generado y la impaciencia por emplear las CTM en el TOS, es necesario **responder antes algunas cuestiones en estudios preclínicos** y describir mejor los mecanismos de actuación de estas CTM en el contexto de rechazo, para definir mejor las bases de los ensayos clínicos. No obstante, no resulta descabellado usarlas en situaciones críticas sin más opciones terapéuticas, aunque sea empíricamente, como muchas otras veces se ha hecho en medicina, y en alguna ocasión con resultados sorprendentes dando un salto gigante en la ciencia.

# BIBLIOGRAFÍA

---



## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Sayegh, M.H. and G. Remuzzi, *Clinical update: immunosuppression minimisation*. Lancet, 2007. **369**(9574): p. 1676-8.
2. Murray, J.E., J.P. Merrill, and J.H. Harrison, *Renal homotransplantation in identical twins*. 1955. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(1): p. 201-4.
3. Bach, F. and K. Hirschhorn, *Lymphocyte Interaction: A Potential Histocompatibility Test in Vitro*. Science, 1964. **143**(3608): p. 813-4.
4. Patel, R. and P.I. Terasaki, *Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation*. N Engl J Med, 1969. **280**(14): p. 735-9.
5. Curtoni, E.S., P.L. Mattiuz, and G. Scudeller, *Correlation between host's HL-A phenotype and strength of allograft reactions*. Tissue Antigens, 1973. **3**(2): p. 108-14.
6. Park, M.S., et al., *Sensitization after transplantation*. Clin Transpl, 1987: p. 393-7.
7. Fishbein, T.M., *Intestinal transplantation*. N Engl J Med, 2009. **361**(10): p. 998-1008.
8. Pondrom, S., *The AJT Report. Survival rates increase in bowel transplantation: seldom-done procedure comes of age*. Am J Transplant, 2010. **10**(3): p. 438-40.
9. Abu-Elmagd, K.M., et al., *Evolution of the immunosuppressive strategies for the intestinal and multivisceral recipients with special reference to allograft immunity and achievement of partial tolerance*. Transpl Int, 2009. **22**(1): p. 96-109.
10. English, K. and K.J. Wood, *Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(5): p. a015560.
11. Verreck, F.A., et al., *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, 2006. **79**(2): p. 285-93.
12. Grant, D., et al., *Graft-versus-host disease associated with intestinal transplantation in the rat. Host immune function and general histology*. Transplantation, 1989. **48**(4): p. 545-9.
13. Wu, Z., et al., *Viral FLIP impairs survival of activated T cells and generation of CD8+ T cell memory*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6313-23.
14. Krummey, S.M. and M.L. Ford, *Heterogeneity within T Cell Memory: Implications for Transplant Tolerance*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 36.
15. Farber, D.L., N.A. Yudanin, and N.P. Restifo, *Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(1): p. 24-35.
16. Page, A.J., M.L. Ford, and A.D. Kirk, *Memory T-cell-specific therapeutics in organ transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2009. **14**(6): p. 643-9.
17. Gallon, L., et al., *Immunophenotypic analysis of cellular infiltrate of renal allograft biopsies in patients with acute rejection after induction with alemtuzumab (Campath-1H)*. Clin J Am Soc Nephrol, 2006. **1**(3): p. 539-45.
18. Noris, M., et al., *Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(3): p. 1007-18.
19. Pearl, J.P., et al., *Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion*. Am J Transplant, 2005. **5**(3): p. 465-74.
20. Afzali, B., et al., *Relative resistance of human CD4(+) memory T cells to suppression by CD4(+) CD25(+) regulatory T cells*. Am J Transplant, 2011. **11**(8): p. 1734-42.
21. Yang, J., et al., *Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(50): p. 19954-9.

## BIBLIOGRAFÍA

22. Adams, A.B., et al., *Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance*. J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1887-95.
23. Zhai, Y., et al., *Allograft rejection by primed/memory CD8+ T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4667-73.
24. Bestard, O., et al., *Prospective assessment of antidonor cellular alloreactivity is a tool for guidance of immunosuppression in kidney transplantation*. Kidney Int, 2013. **84**(6): p. 1226-36.
25. Cortinovis, M., et al., *Mesenchymal stromal cells to control donor-specific memory T cells in solid organ transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2015. **20**(1): p. 79-85.
26. Poggio, E.D. and J.J. Augustine, *Alloreactive T cells and 'the persistence of memory'*. Kidney Int, 2013. **84**(6): p. 1074-6.
27. Li, X.C., M. Kloc, and R.M. Ghobrial, *Memory T cells in transplantation - progress and challenges*. Curr Opin Organ Transplant, 2013. **18**(4): p. 387-92.
28. Heeger, P.S., et al., *Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes*. J Immunol, 1999. **163**(4): p. 2267-75.
29. Parish, C.R., *The relationship between humoral and cell-mediated immunity*. Transplant Rev, 1972. **13**: p. 35-66.
30. Romagnani, S., *Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response?* Immunol Today, 1992. **13**(10): p. 379-81.
31. Romagnani, S., *Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology*. Int Arch Allergy Immunol, 1992. **98**(4): p. 279-85.
32. Yang, J.J., et al., *Interleukin-17 plays a critical role in the acute rejection of intestinal transplantation*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(5): p. 682-91.
33. Franquesa, M., M.J. Hoogduijn, and C.C. Baan, *The impact of mesenchymal stem cell therapy in transplant rejection and tolerance*. Curr Opin Organ Transplant, 2012. **17**(4): p. 355-61.
34. Li, X.C. and L.A. Turka, *An update on regulatory T cells in transplant tolerance and rejection*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(10): p. 577-83.
35. Wood, K.J. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in transplantation tolerance*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 199-210.
36. Yang, Y., et al., *Reduction of acute rejection by bone marrow mesenchymal stem cells during rat small bowel transplantation*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e114528.
37. Heidt, S., et al., *The impact of Th17 cells on transplant rejection and the induction of tolerance*. Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(4): p. 456-61.
38. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1142-51.
39. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
40. Sakaguchi, S. and N. Sakaguchi, *Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease*. Int Rev Immunol, 2005. **24**(3-4): p. 211-26.
41. Mauri, C. and A. Bosma, *Immune regulatory function of B cells*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 221-41.
42. Mauri, C. and M. Menon, *The expanding family of regulatory B cells*. Int Immunol, 2015. **27**(10): p. 479-86.
43. Franquesa, M., et al., *Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 212.

44. Le Texier, L., et al., *Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile*. Am J Transplant, 2011. **11**(3): p. 429-38.
45. Newell, K.A., et al., *Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans*. J Clin Invest, 2010. **120**(6): p. 1836-47.
46. Pallier, A., et al., *Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype*. Kidney Int, 2010. **78**(5): p. 503-13.
47. Peng, Y., et al., *Donor-derived mesenchymal stem cells combined with low-dose tacrolimus prevent acute rejection after renal transplantation: a clinical pilot study*. Transplantation, 2013. **95**(1): p. 161-8.
48. Farmer, D.G., et al., *Intragraft expression of messenger RNA for interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha is a predictor of rat small intestine transplant rejection*. J Surg Res, 1994. **57**(1): p. 138-42.
49. Hu, A., et al., *Donor-derived bone marrow transfusion produces mixed chimerism and promotes a Th2 shift in Th1/Th2 balance in rat heterotopic small bowel transplantation*. Dig Liver Dis, 2012. **44**(12): p. 988-94.
50. Imagawa, D.K., et al., *The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. I. Evidence that elevated levels of tumor necrosis factor-alpha predict rejection following orthotopic liver transplantation*. Transplantation, 1990. **50**(2): p. 219-25.
51. Wiggins, M.C., et al., *Tumour necrosis factor levels during acute rejection and acute tubular necrosis in renal transplant recipients*. Transpl Immunol, 2000. **8**(3): p. 211-5.
52. van Emmerik, N., et al., *Cytokine gene expression profiles in human endomyocardial biopsy (EMB) derived lymphocyte cultures and in EMB tissue*. Transpl Int, 1994. **7 Suppl 1**: p. S623-6.
53. Cottrez, F., et al., *T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 4848-53.
54. Beinbauer, B.G., et al., *Interleukin 10 regulates cell surface and soluble LIR-2 (CD85d) expression on dendritic cells resulting in T cell hyporesponsiveness in vitro*. Eur J Immunol, 2004. **34**(1): p. 74-80.
55. Dallman, M.J., *Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(5): p. 632-8.
56. Josien, R., et al., *Fas ligand, tumor necrosis factor-alpha expression, and apoptosis during allograft rejection and tolerance*. Transplantation, 1998. **66**(7): p. 887-93.
57. Nickerson, P., et al., *Manipulation of cytokine networks in transplantation: false hope or realistic opportunity for tolerance?* Transplantation, 1997. **63**(4): p. 489-94.
58. Wang, M., et al., *Intestinal tight junction in allograft after small bowel transplantation*. Transplant Proc, 2007. **39**(1): p. 289-91.
59. Yamataka, A., et al., *Ultrastructural changes in the microvilli as a marker of small bowel rejection*. Surg Today, 1993. **23**(11): p. 984-7.
60. Gondolesi, G., et al., *The value of plasma citrulline to predict mucosal injury in intestinal allografts*. Am J Transplant, 2006. **6**(11): p. 2786-90.
61. Sudan, D., et al., *Calprotectin: a novel noninvasive marker for intestinal allograft monitoring*. Ann Surg, 2007. **246**(2): p. 311-5.
62. Mercer, D.F., et al., *Stool calprotectin monitoring after small intestine transplantation*. Transplantation, 2011. **91**(10): p. 1166-71.
63. Talukdar, A., et al., *Lymphocyte subset reconstitution in pediatric liver recipients induced with steroid-free rabbit anti-human thymocyte globulin*. Pediatr Transplant, 2008. **12**(7): p. 804-8.

## BIBLIOGRAFÍA

64. Talukdar, A.J., et al., *Lymphocyte subset reconstitution patterns in children with small bowel transplantation induced with steroid-free rabbit anti-human thymocyte globulin*. *Pediatr Transplant*, 2009. **13**(3): p. 353-9.
65. Zeevi, A., et al., *Monitoring immune function during tacrolimus tapering in small bowel transplant recipients*. *Transpl Immunol*, 2005. **15**(1): p. 17-24.
66. Sindhi, R., et al., *Immune monitoring in small bowel transplantation*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2010. **15**(3): p. 349-56.
67. Gupta, A., et al., *Elevated myeloid: plasmacytoid dendritic cell ratio associates with early acute cellular rejection in pediatric small bowel transplantation*. *Transplantation*, 2010. **89**(1): p. 55-60.
68. Gebauer, B.S., et al., *Evolution of the enzyme-linked immunosorbent spot assay for post-transplant alloreactivity as a potentially useful immune monitoring tool*. *Am J Transplant*, 2002. **2**(9): p. 857-66.
69. Ashokkumar, C., et al., *Proliferative alloresponse of T cytotoxic cells identifies rejection-prone children with small bowel transplantation*. *Transplantation*, 2010. **89**(11): p. 1371-7.
70. Ashokkumar, C., et al., *Allospecific CD154+ T cells associate with rejection risk after pediatric liver transplantation*. *Am J Transplant*, 2009. **9**(1): p. 179-91.
71. Bestard, O., et al., *Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts*. *J Am Soc Nephrol*, 2008. **19**(10): p. 2020-6.
72. Suthanthiran, M., *Transplantation tolerance: fooling mother nature*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(22): p. 12072-5.
73. Billingham, R.E. and P.B. Medawar, *Desensitization to skin homografts by injections of donor skin extracts*. *Ann Surg*, 1953. **137**(4): p. 444-9.
74. Durham, M.M., et al., *Cutting edge: administration of anti-CD40 ligand and donor bone marrow leads to hemopoietic chimerism and donor-specific tolerance without cytoreductive conditioning*. *J Immunol*, 2000. **165**(1): p. 1-4.
75. Sykes, M., Y. Zhao, and Y.G. Yang, *Tolerance induction for xenotransplantation*. *World J Surg*, 1997. **21**(9): p. 932-8.
76. Pilat, N., et al., *Treg-therapy allows mixed chimerism and transplantation tolerance without cytoreductive conditioning*. *Am J Transplant*, 2010. **10**(4): p. 751-62.
77. Kirk, A.D., et al., *Solid organ transplantation at the National Institutes of Health: development of a research-based transplantation practice*. *Clin Transpl*, 2005: p. 131-44.
78. Millan, M.T., et al., *Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation*. *Transplantation*, 2002. **73**(9): p. 1386-91.
79. Perico, N., et al., *Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011. **6**(2): p. 412-22.
80. Kawai, T., et al., *HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(4): p. 353-61.
81. Tattersall, C., et al., *Lymphocyte responsiveness after irradiation in canine and human intestinal allografts*. *Curr Surg*, 1989. **46**(1): p. 16-9.
82. Yamada, K. and J. Scalea, *Current progress in xenogeneic tolerance*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2012. **17**(2): p. 168-73.
83. Yamada, Y., et al., *Use of CTLA4Ig for induction of mixed chimerism and renal allograft tolerance in nonhuman primates*. *Am J Transplant*, 2014. **14**(12): p. 2704-12.
84. Xia, W., M.H. Sayegh, and R.L. Kirkman, *Intrathymic injection of allogeneic cells induces indefinite survival of cardiac but not small bowel grafts*. *Transplant Proc*, 1994. **26**(3): p. 1581.



85. Murase, N., et al., *Lymphocyte traffic and graft-versus-host disease after fully allogeneic small bowel transplantation*. Transplant Proc, 1991. **23**(6): p. 3246-7.
86. Mitsuoka, N., et al., *The impact of portal infusion with donor-derived bone marrow cells and intracellular cytokine expression of graft-infiltrating lymphocytes on the graft survival in rat small bowel transplant model*. Transpl Immunol, 2004. **13**(3): p. 155-60.
87. Morin, N., et al., *Donor-specific portal transfusion augments microchimerism in a porcine model of small bowel transplantation*. Transplant Proc, 2000. **32**(6): p. 1290-1.
88. Bakonyi Neto, A., et al., *Correlation between allograft survival and chimeric state after bone marrow infusion in rat small bowel transplantation*. Pediatr Transplant, 1999. **3**(1): p. 67-73.
89. Nakafusa, Y., et al., *The effect of portal venous tolerance on the survival of small bowel allografts in the rat*. Transplantation, 1993. **56**(5): p. 1279-82.
90. Sun, D.S., et al., *Intraportal donor bone marrow transplantation improves intestinal allograft survival in rats under FK506-based immunosuppression*. J Int Med Res, 2003. **31**(4): p. 281-9.
91. Nakagawa, K., et al., *Donor dendritic cells and recipient Kupffer cells in the induction of donor-specific immune hyporesponsiveness*. J Int Med Res, 2001. **29**(2): p. 119-30.
92. Westerhuis, G., et al., *Chimerism levels after stem cell transplantation are primarily determined by the ratio of donor to host stem cells*. Blood, 2011. **117**(16): p. 4400-1.
93. Fabre, J.W. and P.J. Morris, *The effect of donor strain blood pretreatment on renal allograft rejection in rats*. Transplantation, 1972. **14**(5): p. 608-17.
94. Starzl, T.E., et al., *Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance*. Hepatology, 1993. **17**(6): p. 1127-52.
95. Isobe, M., et al., *Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1*. Science, 1992. **255**(5048): p. 1125-7.
96. Goldrath, A.W., et al., *The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(48): p. 16885-90.
97. Van Bekkum, D.W., *Present status of bone marrow transplantation following whole body irradiation*. Oncology, 1966. **20**: p. Suppl:60-72.
98. Slavin, S. and S. Strober, *Mechanisms of transplantation tolerance to allogeneic bone marrow cells following total lymphoid irradiation (TLI)*. Haematol Blood Transfus, 1980. **25**: p. 323-31.
99. Heeger, P.S., *T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update*. Am J Transplant, 2003. **3**(5): p. 525-33.
100. Issa, F., A. Schiopu, and K.J. Wood, *Role of T cells in graft rejection and transplantation tolerance*. Expert Rev Clin Immunol, 2010. **6**(1): p. 155-69.
101. Valujskikh, A., *Memory T cells in allograft rejection*. Adv Exp Med Biol, 2007. **601**: p. 247-56.
102. Murphy, S.P., P.M. Porrett, and L.A. Turka, *Innate immunity in transplant tolerance and rejection*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 39-48.
103. Bolling, S.F., et al., *Preventing allograft rejection with CTLA4IG: effect of donor-specific transfusion route or timing*. J Heart Lung Transplant, 1996. **15**(9): p. 928-35.
104. Yin, D.P., et al., *Induction of tolerance to small bowel allografts in high-responder rats by combining anti-CD4 with CTLA4Ig*. Transplantation, 1996. **62**(11): p. 1537-9.
105. Yin, D.P., et al., *Anti-CD4 therapy in combined heart-kidney, heart-liver, and heart-small bowel allotransplants in high-responder rats*. Transplantation, 1998. **66**(1): p. 1-5.
106. Song, J., et al., *Inhibition of donor-derived T cells trafficking into target organs by FTY720 during acute graft-versus-host disease in small bowel transplantation*. Clin Exp Immunol, 2006. **146**(1): p. 85-92.

## BIBLIOGRAFÍA

107. Maeda, A., et al., *Intravenous infusion of syngeneic apoptotic cells by photopheresis induces antigen-specific regulatory T cells*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 5968-76.
108. Suchin, K.R., et al., *Extracorporeal photochemotherapy does not suppress T- or B-cell responses to novel or recall antigens*. J Am Acad Dermatol, 1999. **41**(6): p. 980-6.
109. Feito-Rodríguez, M., et al., *Cutaneous graft versus host disease in pediatric multivisceral transplantation*. Pediatr Dermatol, 2013. **30**(3): p. 335-41.
110. Hutchinson, J.A., et al., *Human regulatory macrophages*. Methods Mol Biol, 2011. **677**: p. 181-92.
111. Sng, J. and T. Lufkin, *Emerging stem cell therapies: treatment, safety, and biology*. Stem Cells Int, 2012. **2012**: p. 521343.
112. Horwitz, E.M., et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2005. **7**(5): p. 393-5.
113. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
114. Owen, M. and A.J. Friedenstein, *Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors*. Ciba Found Symp, 1988. **136**: p. 42-60.
115. Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons, *Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(4): p. 313-9.
116. Meirelles Lda, S., et al., *Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(5-6): p. 419-27.
117. Krampera, M., et al., *Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells*. Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(4): p. 435-41.
118. Jiang, Y., et al., *Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain*. Exp Hematol, 2002. **30**(8): p. 896-904.
119. Friedenstein, A.J., *Precursor cells of mechanocytes*. Int Rev Cytol, 1976. **47**: p. 327-59.
120. Friedenstein, A.J., et al., *Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo*. Transplantation, 1974. **17**(4): p. 331-40.
121. Friedenstein, A.J., et al., *Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method*. Exp Hematol, 1974. **2**(2): p. 83-92.
122. Vandermeulen, M., et al., *Rationale for the potential use of mesenchymal stromal cells in liver transplantation*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(44): p. 16418-32.
123. Roufosse, C.A., et al., *Circulating mesenchymal stem cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 585-97.
124. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
125. Crisan, M., et al., *Purification and long-term culture of multipotent progenitor cells affiliated with the walls of human blood vessels: myoendothelial cells and pericytes*. Methods Cell Biol, 2008. **86**: p. 295-309.
126. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
127. Casiraghi, F., N. Perico, and G. Remuzzi, *Mesenchymal stromal cells to promote solid organ transplantation tolerance*. Curr Opin Organ Transplant, 2013. **18**(1): p. 51-8.
128. Reinders, M.E., T.J. Rabelink, and J.W. de Fijter, *The role of mesenchymal stromal cells in chronic transplant rejection after solid organ transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2013. **18**(1): p. 44-50.
129. Henig, I. and T. Zuckerman, *Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives*. Rambam Maimonides Med J, 2014. **5**(4): p. e0028.

130. Horwitz, E.M., et al., *Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta*. *Nat Med*, 1999. **5**(3): p. 309-13.
131. Young, R.G., et al., *Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair*. *J Orthop Res*, 1998. **16**(4): p. 406-13.
132. De Bari, C., et al., *Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane*. *J Cell Biol*, 2003. **160**(6): p. 909-18.
133. Chen, S.L., et al., *Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction*. *Chin Med J (Engl)*, 2004. **117**(10): p. 1443-8.
134. Maitra, B., et al., *Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation*. *Bone Marrow Transplant*, 2004. **33**(6): p. 597-604.
135. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. *Blood*, 2005. **105**(4): p. 1815-22.
136. Franquesa, M., et al., *Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation (MiSOT) Fourth Meeting: lessons learned from first clinical trials*. *Transplantation*, 2013. **96**(3): p. 234-8.
137. Leuning, D.G., et al., *Clinical translation of multipotent mesenchymal stromal cells in transplantation*. *Semin Nephrol*, 2014. **34**(4): p. 351-64.
138. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study*. *Lancet*, 2008. **371**(9624): p. 1579-86.
139. Jorgensen, C., *Mesenchymal stem cells immunosuppressive properties: is it specific to bone marrow-derived cells?* *Stem Cell Res Ther*, 2010. **1**(2): p. 15.
140. Krampera, M., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide*. *Blood*, 2003. **101**(9): p. 3722-9.
141. 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*, 2008. **20**(1-2): p. 55-60.
142. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(9): p. 726-36.
143. Singer, N.G. and A.I. Caplan, *Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation*. *Annu Rev Pathol*, 2011. **6**: p. 457-78.
144. Liechty, K.W., et al., *Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep*. *Nat Med*, 2000. **6**(11): p. 1282-6.
145. Almeida-Porada, G., et al., *Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation*. *Blood*, 2000. **95**(11): p. 3620-7.
146. Crop, M.J., et al., *Human mesenchymal stem cells are susceptible to lysis by CD8(+) T cells and NK cells*. *Cell Transplant*, 2011. **20**(10): p. 1547-59.
147. Pileggi, A., et al., *Mesenchymal stromal (stem) cells to improve solid organ transplant outcome: lessons from the initial clinical trials*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2013. **18**(6): p. 672-81.
148. Le Blanc, K. and D. Mougiakakos, *Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(5): p. 383-96.
149. Wood, K.J. and R. Goto, *Mechanisms of rejection: current perspectives*. *Transplantation*, 2012. **93**(1): p. 1-10.

## BIBLIOGRAFÍA

150. Casiraghi, F., G. Remuzzi, and N. Perico, *Mesenchymal stromal cells to promote kidney transplantation tolerance*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2014. **19**(1): p. 47-53.
151. English, K., F.P. Barry, and B.P. Mahon, *Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation*. *Immunol Lett*, 2008. **115**(1): p. 50-8.
152. Jiang, X.X., et al., *Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4120-6.
153. Nauta, A.J., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells*. *J Immunol*, 2006. **177**(4): p. 2080-7.
154. Zhang, W., et al., *Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells*. *Stem Cells Dev*, 2004. **13**(3): p. 263-71.
155. Spaggiari, G.M., et al., *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*, 2009. **113**(26): p. 6576-83.
156. Djouad, F., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism*. *Stem Cells*, 2007. **25**(8): p. 2025-32.
157. Inoue, S., et al., *Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model*. *Transplantation*, 2006. **81**(11): p. 1589-95.
158. English, K., *Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation*. *Immunol Cell Biol*, 2013. **91**(1): p. 19-26.
159. Roemeling-van Rhijn, M., W. Weimar, and M.J. Hoogduijn, *Mesenchymal stem cells: application for solid-organ transplantation*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2012. **17**(1): p. 55-62.
160. Yanez, R., et al., *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease*. *Stem Cells*, 2006. **24**(11): p. 2582-91.
161. Chiesa, S., et al., *Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(42): p. 17384-9.
162. Chen, H.W., et al., *Mesenchymal stem cells tune the development of monocyte-derived dendritic cells toward a myeloid-derived suppressive phenotype through growth-regulated oncogene chemokines*. *J Immunol*, 2013. **190**(10): p. 5065-77.
163. Zhao, Z.G., et al., *Immunomodulatory function of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells*. *Immunol Invest*, 2012. **41**(2): p. 183-98.
164. Aldinucci, A., et al., *Inhibition of immune synapse by altered dendritic cell actin distribution: a new pathway of mesenchymal stem cell immune regulation*. *J Immunol*, 2010. **185**(9): p. 5102-10.
165. Zhang, X., C. Jiao, and S. Zhao, *Role of mesenchymal stem cells in immunological rejection of organ transplantation*. *Stem Cell Rev*, 2009. **5**(4): p. 402-9.
166. Choi, Y.S., J.A. Jeong, and D.S. Lim, *Mesenchymal stem cell-mediated immature dendritic cells induce regulatory T cell-based immunosuppressive effect*. *Immunol Invest*, 2012. **41**(2): p. 214-29.
167. Ge, W., et al., *Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance*. *Am J Transplant*, 2009. **9**(8): p. 1760-72.
168. Eggenhofer, E., *Mesenchymal stem cells in organ and tissue transplantation: one for all seasons?* *Curr Opin Organ Transplant*, 2013. **18**(1): p. 22-3.

169. Huang, Y., et al., *Kidney-derived mesenchymal stromal cells modulate dendritic cell function to suppress alloimmune responses and delay allograft rejection*. *Transplantation*, 2010. **90**(12): p. 1307-11.
170. Obermajer, N., et al., *Conversion of Th17 into IL-17A(neg) regulatory T cells: a novel mechanism in prolonged allograft survival promoted by mesenchymal stem cell-supported minimized immunosuppressive therapy*. *J Immunol*, 2014. **193**(10): p. 4988-99.
171. Mannon, R.B., *Macrophages: contributors to allograft dysfunction, repair, or innocent bystanders?* *Curr Opin Organ Transplant*, 2012. **17**(1): p. 20-5.
172. Fleming, B.D. and D.M. Mosser, *Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy*. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(9): p. 2498-502.
173. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(3): p. 787-95.
174. Akiyama, K., et al., *Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis*. *Cell Stem Cell*, 2012. **10**(5): p. 544-55.
175. Francois, M., et al., *Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation*. *Mol Ther*, 2012. **20**(1): p. 187-95.
176. Kim, J. and P. Hematti, *Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages*. *Exp Hematol*, 2009. **37**(12): p. 1445-53.
177. Nemeth, 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*, 2009. **15**(1): p. 42-9.
178. Dayan, V., et al., *Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction*. *Basic Res Cardiol*, 2011. **106**(6): p. 1299-310.
179. Nakajima, H., et al., *Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury*. *J Neurotrauma*, 2012. **29**(8): p. 1614-25.
180. Ylostalo, J.H., et al., *Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype*. *Stem Cells*, 2012. **30**(10): p. 2283-96.
181. Melief, S.M., et al., *Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages*. *Stem Cells*, 2013. **31**(9): p. 1980-91.
182. Hof-Nahor, I., et al., *Human mesenchymal stem cells shift CD8+ T cells towards a suppressive phenotype by inducing tolerogenic monocytes*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 19): p. 4640-50.
183. 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+CD25highFOXP3+ regulatory T cells*. *Stem Cells*, 2008. **26**(1): p. 212-22.
184. Sotiropoulou, P.A., et al., *Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells*. *Stem Cells*, 2006. **24**(1): p. 74-85.
185. 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*, 2008. **111**(3): p. 1327-33.
186. Spaggiari, G.M., et al., *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*, 2006. **107**(4): p. 1484-90.

## BIBLIOGRAFÍA

187. Rasmusson, I., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells*. *Transplantation*, 2003. **76**(8): p. 1208-13.
188. Krampera, M., et al., *Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use*. *Blood Transfus*, 2007. **5**(3): p. 120-9.
189. Bartholomew, A., et al., *Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(1): p. 42-8.
190. Di Nicola, M., et al., *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli*. *Blood*, 2002. **99**(10): p. 3838-43.
191. Le Blanc, K., *Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells*. *Cytotherapy*, 2003. **5**(6): p. 485-9.
192. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex*. *Scand J Immunol*, 2003. **57**(1): p. 11-20.
193. Casiraghi, F., M. Noris, and G. Remuzzi, *Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells in solid organ transplantation*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2010. **15**(6): p. 731-7.
194. Duffy, M.M., et al., *Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways*. *Stem Cell Res Ther*, 2011. **2**(4): p. 34.
195. Reading, J.L., et al., *Clinical-grade multipotent adult progenitor cells durably control pathogenic T cell responses in human models of transplantation and autoimmunity*. *J Immunol*, 2013. **190**(9): p. 4542-52.
196. Ghannam, S., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype*. *J Immunol*, 2010. **185**(1): p. 302-12.
197. Tatara, R., et al., *Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation*. *Cytotherapy*, 2011. **13**(6): p. 686-94.
198. Meisel, R., et al., *Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation*. *Blood*, 2004. **103**(12): p. 4619-21.
199. Han, K.H., et al., *Immunosuppressive mechanisms of embryonic stem cells and mesenchymal stem cells in alloimmune response*. *Transpl Immunol*, 2011. **25**(1): p. 7-15.
200. Engela, A.U., et al., *Mesenchymal stem cells control alloreactive CD8(+) CD28(-) T cells*. *Clin Exp Immunol*, 2013. **174**(3): p. 449-58.
201. Ciccocioppo, R., et al., *Tolerogenic effect of mesenchymal stromal cells on gliadin-specific T lymphocytes in celiac disease*. *Cytotherapy*, 2014. **16**(8): p. 1080-91.
202. 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*, 2008. **181**(6): p. 3933-46.
203. Eggenhofer, E., et al., *Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 297.
204. Zafranskaya, M., et al., *PGE2 contributes to in vitro MSC-mediated inhibition of non-specific and antigen-specific T cell proliferation in MS patients*. *Scand J Immunol*, 2013. **78**(5): p. 455-62.
205. Mazar, J., et al., *Cytotoxicity mediated by the Fas ligand (FasL)-activated apoptotic pathway in stem cells*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(33): p. 22022-8.
206. Maccario, R., et al., *Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype*. *Haematologica*, 2005. **90**(4): p. 516-25.

207. Prevosto, C., et al., *Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction*. Haematologica, 2007. **92**(7): p. 881-8.
208. Svobodova, E., et al., *The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(6): p. 901-10.
209. Darlington, P.J., et al., *Reciprocal Th1 and Th17 regulation by mesenchymal stem cells: Implication for multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2010. **68**(4): p. 540-5.
210. 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, 2009. **156**(1): p. 149-60.
211. Di Ianni, M., et al., *Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells*. Exp Hematol, 2008. **36**(3): p. 309-18.
212. Engela, A.U., et al., *On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 126.
213. Crop, M.J., et al., *Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. Clin Exp Immunol, 2010. **162**(3): p. 474-86.
214. Carrion, F., et al., *Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4+ T cell activation*. Immunol Lett, 2011. **135**(1-2): p. 10-6.
215. Casiraghi, F., et al., *Localization of mesenchymal stromal cells dictates their immune or proinflammatory effects in kidney transplantation*. Am J Transplant, 2012. **12**(9): p. 2373-83.
216. Berman, D.M., et al., *Mesenchymal stem cells enhance allogeneic islet engraftment in nonhuman primates*. Diabetes, 2010. **59**(10): p. 2558-68.
217. Wang, Y., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit acute rejection of rat liver allografts in association with regulatory T-cell expansion*. Transplant Proc, 2009. **41**(10): p. 4352-6.
218. Ding, Y., et al., *Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogenic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9*. Diabetes, 2009. **58**(8): p. 1797-806.
219. Abdi, R., et al., *Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(7): p. 1759-67.
220. Bouffi, C., et al., *IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14247.
221. Park, M.J., et al., *Transforming growth factor beta-transduced mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune arthritis through reciprocal regulation of Treg/Th17 cells and osteoclastogenesis*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(6): p. 1668-80.
222. Sun, L., et al., *Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans*. Stem Cells, 2009. **27**(6): p. 1421-32.
223. Zhou, B., et al., *Administering human adipose-derived mesenchymal stem cells to prevent and treat experimental arthritis*. Clin Immunol, 2011. **141**(3): p. 328-37.
224. Bassi, E.J., et al., *Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes*. Diabetes, 2012. **61**(10): p. 2534-45.
225. Asari, S., et al., *Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation*. Exp Hematol, 2009. **37**(5): p. 604-15.
226. Corcione, A., et al., *Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions*. Blood, 2006. **107**(1): p. 367-72.

## BIBLIOGRAFÍA

227. Rasmusson, I., et al., *Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells*. Scand J Immunol, 2007. **65**(4): p. 336-43.
228. 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, 2008. **26**(2): p. 562-9.
229. Rafei, M., et al., *Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction*. Blood, 2008. **112**(13): p. 4991-8.
230. Schena, F., et al., *Interferon-gamma-dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(9): p. 2776-86.
231. Comoli, P., et al., *Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(4): p. 1196-202.
232. Tabera, S., et al., *The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes*. Haematologica, 2008. **93**(9): p. 1301-9.
233. Youd, M., et al., *Allogeneic mesenchymal stem cells do not protect NZBxNZW F1 mice from developing lupus disease*. Clin Exp Immunol, 2010. **161**(1): p. 176-86.
234. English, K. and B.P. Mahon, *Allogeneic mesenchymal stem cells: agents of immune modulation*. J Cell Biochem, 2011. **112**(8): p. 1963-8.
235. Bauer, T.M., et al., *Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo*. Transpl Int, 2005. **18**(1): p. 95-100.
236. Hainz, U., B. Jurgens, and A. Heitger, *The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in transplantation*. Transpl Int, 2007. **20**(2): p. 118-27.
237. 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, 2010. **90**(12): p. 1312-20.
238. English, K., et al., *IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells*. Immunol Lett, 2007. **110**(2): p. 91-100.
239. Ren, G., et al., *Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression*. Stem Cells, 2009. **27**(8): p. 1954-62.
240. Morelli, A.E. and A.W. Thomson, *Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(8): p. 610-21.
241. Munn, D.H., et al., *Dendritic cells have the option to express IDO-mediated suppression or not*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2618.
242. Puccetti, P. and F. Fallarino, *Generation of T cell regulatory activity by plasmacytoid dendritic cells and tryptophan catabolism*. Blood Cells Mol Dis, 2008. **40**(1): p. 101-5.
243. Franquesa, M., et al., *Mesenchymal stem cell therapy prevents interstitial fibrosis and tubular atrophy in a rat kidney allograft model*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(17): p. 3125-35.
244. Ren, G., et al., *Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 141-50.
245. Sato, K., et al., *Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells*. Blood, 2007. **109**(1): p. 228-34.
246. Carosella, E.D., et al., *HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance*. Adv Immunol, 2003. **81**: p. 199-252.
247. Nasef, A., et al., *Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G*. Transplantation, 2007. **84**(2): p. 231-7.



248. Matysiak, M., et al., *Immunoregulatory function of bone marrow mesenchymal stem cells in EAE depends on their differentiation state and secretion of PGE2*. J Neuroimmunol, 2011. **233**(1-2): p. 106-11.
249. Yanez, R., et al., *Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells*. Exp Cell Res, 2010. **316**(19): p. 3109-23.
250. Maggini, J., et al., *Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9252.
251. Rasmusson, I., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms*. Exp Cell Res, 2005. **305**(1): p. 33-41.
252. Tse, W.T., et al., *Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation*. Transplantation, 2003. **75**(3): p. 389-97.
253. Yang, S.H., et al., *Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10*. Exp Mol Med, 2009. **41**(5): p. 315-24.
254. 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, 2012. **53**(2): p. 786-93.
255. Choi, H., et al., *Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages*. Blood, 2011. **118**(2): p. 330-8.
256. Kota, D.J., et al., *TSG-6 produced by hMSCs delays the onset of autoimmune diabetes by suppressing Th1 development and enhancing tolerogenicity*. Diabetes, 2013. **62**(6): p. 2048-58.
257. Oh, J.Y., et al., *Intravenous mesenchymal stem cells prevented rejection of allogeneic corneal transplants by aborting the early inflammatory response*. Mol Ther, 2012. **20**(11): p. 2143-52.
258. Augello, A., et al., *Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway*. Eur J Immunol, 2005. **35**(5): p. 1482-90.
259. Xue, Q., et al., *The negative co-signaling molecule b7-h4 is expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mediates its T-cell modulatory activity*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(1): p. 27-38.
260. Batten, P., et al., *Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves*. Tissue Eng, 2006. **12**(8): p. 2263-73.
261. Fierabracci, A., et al., *Recent advances in mesenchymal stem cell immunomodulation: the role of microvesicles*. Cell Transplant, 2015. **24**(2): p. 133-49.
262. Mokarizadeh, A., et al., *Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: potent organelles for induction of tolerogenic signaling*. Immunol Lett, 2012. **147**(1-2): p. 47-54.
263. Hoogduijn, M.J., et al., *The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy*. Int Immunopharmacol, 2010. **10**(12): p. 1496-500.
264. Tomchuck, S.L., et al., *Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 99-107.
265. Bunnell, B.A., A.M. Betancourt, and D.E. Sullivan, *New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther, 2010. **1**(5): p. 34.
266. Romieu-Mourez, R., et al., *Mesenchymal stromal cells expressing ErbB-2/neu elicit protective antibreast tumor immunity in vivo, which is paradoxically suppressed by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha priming*. Cancer Res, 2010. **70**(20): p. 7742-7.

## BIBLIOGRAFÍA

267. Hwa Cho, H., Y.C. Bae, and J.S. Jung, *Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells*. Stem Cells, 2006. **24**(12): p. 2744-52.
268. Liotta, F., et al., *Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 279-89.
269. Lombardo, E., et al., *Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(7): p. 1579-89.
270. Pevsner-Fischer, M., et al., *Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1422-32.
271. Raicevic, G., et al., *The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties*. Cell Immunol, 2011. **270**(2): p. 207-16.
272. Waterman, R.S., et al., *A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10088.
273. Rowart, P., et al., *Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Ischemia/Reperfusion Injury*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 602597.
274. Souidi, N., M. Stolk, and M. Seifert, *Ischemia-reperfusion injury: beneficial effects of mesenchymal stromal cells*. Curr Opin Organ Transplant, 2013. **18**(1): p. 34-43.
275. de Vries, D.K., A.F. Schaapherder, and M.E. Reinders, *Mesenchymal stromal cells in renal ischemia/reperfusion injury*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 162.
276. Ohnishi, S., et al., *Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions*. FEBS Lett, 2007. **581**(21): p. 3961-6.
277. Ninichuk, V., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice*. Kidney Int, 2006. **70**(1): p. 121-9.
278. Ortiz, L.A., et al., *Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8407-11.
279. Rojas, M., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(2): p. 145-52.
280. Li, T., et al., *Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis*. Stem Cells Dev, 2013. **22**(6): p. 845-54.
281. Reinders, M.E., W.E. Fibbe, and T.J. Rabelink, *Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(1): p. 17-24.
282. Chen, L., et al., *Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1886.
283. Caplan, A.I., *Why are MSCs therapeutic? New data: new insight*. J Pathol, 2009. **217**(2): p. 318-24.
284. Lee, S.M., S.C. Lee, and S.J. Kim, *Contribution of human adipose tissue-derived stem cells and the secretome to the skin allograft survival in mice*. J Surg Res, 2014. **188**(1): p. 280-9.
285. Sbano, P., et al., *Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model*. Arch Dermatol Res, 2008. **300**(3): p. 115-24.
286. Zhou, H.P., et al., *Administration of donor-derived mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft*. Transplant Proc, 2006. **38**(9): p. 3046-51.
287. Wu, G.D., et al., *Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection*. Transplantation, 2003. **75**(5): p. 679-85.

288. Wu, G.D., et al., *Contribution of mesenchymal progenitor cells to tissue repair in rat cardiac allografts undergoing chronic rejection*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(12): p. 2160-9.
289. Eggenhofer, E., et al., *Mesenchymal stem cells together with mycophenolate mofetil inhibit antigen presenting cell and T cell infiltration into allogeneic heart grafts*. Transpl Immunol, 2011. **24**(3): p. 157-63.
290. Zhang, W., C. Qin, and Z.M. Zhou, *Mesenchymal stem cells modulate immune responses combined with cyclosporine in a rat renal transplantation model*. Transplant Proc, 2007. **39**(10): p. 3404-8.
291. De Martino, M., et al., *Mesenchymal stem cells infusion prevents acute cellular rejection in rat kidney transplantation*. Transplant Proc, 2010. **42**(4): p. 1331-5.
292. Cavaglieri, R.C., et al., *Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model*. Transplant Proc, 2009. **41**(3): p. 947-51.
293. Caldas, H.C., et al., *Effect of whole bone marrow cell infusion in the progression of experimental chronic renal failure*. Transplant Proc, 2008. **40**(3): p. 853-5.
294. Prodromidi, E.I., et al., *Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome*. Stem Cells, 2006. **24**(11): p. 2448-55.
295. Koch, M., et al., *Isogeneic MSC application in a rat model of acute renal allograft rejection modulates immune response but does not prolong allograft survival*. Transpl Immunol, 2013. **29**(1-4): p. 43-50.
296. Crop, M.J., et al., *Donor-derived mesenchymal stem cells suppress alloreactivity of kidney transplant patients*. Transplantation, 2009. **87**(6): p. 896-906.
297. van Poll, D., et al., *Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo*. Hepatology, 2008. **47**(5): p. 1634-43.
298. Parekkadan, B., et al., *Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e941.
299. Jin, G., et al., *Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and inhibiting apoptosis in rats*. Int J Mol Med, 2013. **31**(6): p. 1395-401.
300. Sun, C.K., et al., *Systemic administration of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats*. Crit Care Med, 2012. **40**(4): p. 1279-90.
301. Wan, C.D., et al., *Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2008. **7**(1): p. 29-33.
302. Wang, J.W., et al., *[The study on immunomodulation of donor mesenchymal stem cells on discordant liver xenotransplantation]*. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2005. **43**(19): p. 1254-8.
303. McAuley, D.F., et al., *Clinical grade allogeneic human mesenchymal stem cells restore alveolar fluid clearance in human lungs rejected for transplantation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **306**(9): p. L809-15.
304. Arnalich-Montiel, F., et al., *Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma*. Stem Cells, 2008. **26**(2): p. 570-9.
305. Fuentes-Julian, S., et al., *Adipose-derived mesenchymal stem cell administration does not improve corneal graft survival outcome*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0117945.
306. Lopez-Iglesias, P., et al., *Short and long term fate of human AMSC subcutaneously injected in mice*. World J Stem Cells, 2011. **3**(6): p. 53-62.

## BIBLIOGRAFÍA

307. Kim, Y.H., et al., *Interleukin (IL)-10 induced by CD11b(+) cells and IL-10-activated regulatory T cells play a role in immune modulation of mesenchymal stem cells in rat islet allografts*. Mol Med, 2011. **17**(7-8): p. 697-708.
308. Solari, M.G., et al., *Marginal mass islet transplantation with autologous mesenchymal stem cells promotes long-term islet allograft survival and sustained normoglycemia*. J Autoimmun, 2009. **32**(2): p. 116-24.
309. Li, F.R., et al., *Immune modulation of co-transplantation mesenchymal stem cells with islet on T and dendritic cells*. Clin Exp Immunol, 2010. **161**(2): p. 357-63.
310. Kuo, Y.R., et al., *Immunomodulatory effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a swine hemi-facial allotransplantation model*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35459.
311. Kuo, Y.R., et al., *Prolongation of composite tissue allotransplant survival by treatment with bone marrow mesenchymal stem cells is correlated with T-cell regulation in a swine hind-limb model*. Plast Reconstr Surg, 2011. **127**(2): p. 569-79.
312. Wu, T., et al., *A schema for histologic grading of small intestine allograft acute rejection*. Transplantation, 2003. **75**(8): p. 1241-8.
313. Garcia-Olmo, D. and M. Garcia-Arranz, *[Cells for curing. From the heart to everything]*. An Pediatr (Barc), 2011. **74**(4): p. 215-7.
314. Reinders, M.E., et al., *Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study*. Stem Cells Transl Med, 2013. **2**(2): p. 107-11.
315. Le Blanc, K., et al., *Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells*. Lancet, 2004. **363**(9419): p. 1439-41.
316. Ringden, O., et al., *Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease*. Transplantation, 2006. **81**(10): p. 1390-7.
317. Lazarus, H.M., et al., *Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**(5): p. 389-98.
318. Fang, B., et al., *Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease*. Transplant Proc, 2007. **39**(10): p. 3358-62.
319. Fang, B., et al., *Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. Bone Marrow Transplant, 2006. **38**(5): p. 389-90.
320. Baron, F., et al., *Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning*. Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(6): p. 838-47.
321. Baron, F. and R. Storb, *Mesenchymal stromal cells: a new tool against graft-versus-host disease?* Biol Blood Marrow Transplant, 2012. **18**(6): p. 822-40.
322. Vanikar, A.V., et al., *Effect of co-transplantation of mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells as compared to hematopoietic stem cell transplantation alone in renal transplantation to achieve donor hypo-responsiveness*. Int Urol Nephrol, 2011. **43**(1): p. 225-32.
323. Vanikar, A.V. and H.L. Trivedi, *Stem cell transplantation in living donor renal transplantation for minimization of immunosuppression*. Transplantation, 2012. **94**(8): p. 845-50.
324. Zhang, J., et al., *Autologous mesenchymal stem cells transplantation in adriamycin-induced cardiomyopathy*. Chin Med J (Engl), 2005. **118**(1): p. 73-6.

325. Farris, A.B., et al., *Acute renal endothelial injury during marrow recovery in a cohort of combined kidney and bone marrow allografts*. Am J Transplant, 2011. **11**(7): p. 1464-77.
326. Perico, N., et al., *Mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: pretransplant infusion protects from graft dysfunction while fostering immunoregulation*. Transpl Int, 2013. **26**(9): p. 867-78.
327. Bluestone, J.A., et al., *The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation*. Am J Transplant, 2008. **8**(10): p. 2086-96.
328. Dander, E., et al., *Mesenchymal stromal cells for the treatment of graft-versus-host disease: understanding the in vivo biological effect through patient immune monitoring*. Leukemia, 2012. **26**(7): p. 1681-4.
329. Jitschin, R., et al., *Alterations in the cellular immune compartment of patients treated with third-party mesenchymal stromal cells following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Stem Cells, 2013. **31**(8): p. 1715-25.
330. Tan, J., et al., *Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial*. JAMA, 2012. **307**(11): p. 1169-77.
331. Ciancio, G., et al., *Effect of living-related donor bone marrow infusion on chimerism and in vitro immunoregulatory activity in kidney transplant recipients*. Transplantation, 2002. **74**(4): p. 488-96.
332. Hanaway, M.J., et al., *Alemtuzumab induction in renal transplantation*. N Engl J Med, 2011. **364**(20): p. 1909-19.
333. Riella, L.V. and A. Chandraker, *Stem cell therapy in kidney transplantation*. JAMA, 2012. **308**(2): p. 130; author reply 130-1.
334. Reinders, M.E., et al., *Safety of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stromal cell therapy in renal transplant recipients: the neptune study*. J Transl Med, 2015. **13**: p. 344.
335. Ferlicot, S., et al., *Microchimerism in renal allografts: clinicopathological associations according to the type of chimeric cells*. Histopathology, 2010. **56**(2): p. 188-97.
336. Lee, H., et al., *Intra-osseous injection of donor mesenchymal stem cell (MSC) into the bone marrow in living donor kidney transplantation; a pilot study*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 96.
337. Mudrabettu, C., et al., *Safety and efficacy of autologous mesenchymal stromal cells transplantation in patients undergoing living donor kidney transplantation: a pilot study*. Nephrology (Carlton), 2015. **20**(1): p. 25-33.
338. Kharaziha, P., et al., *Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009. **21**(10): p. 1199-205.
339. Popp, F.C., et al., *Safety and feasibility of third-party multipotent adult progenitor cells for immunomodulation therapy after liver transplantation--a phase I study (MISOT-I)*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 124.
340. Detry, O., et al., *Infusion of mesenchymal stromal cells after deceased liver transplantation: A phase I-II, open-label, clinical study*. J Hepatol, 2017.
341. Soeder, Y., et al., *First-in-Human Case Study: Multipotent Adult Progenitor Cells for Immunomodulation After Liver Transplantation*. Stem Cells Transl Med, 2015. **4**(8): p. 899-904.
342. Johnson, C.L., Y. Soeder, and M.H. Dahlke, *Mesenchymal stromal cells for immunoregulation after liver transplantation: the scene in 2016*. Curr Opin Organ Transplant, 2016. **21**(6): p. 541-549.
343. Doğan, S.M., et al., *Mesenchymal stem cell therapy in patients with small bowel transplantation: single center experience*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(25): p. 8215-20.

## BIBLIOGRAFÍA

344. Ciccocioppo, R., et al., *Mesenchymal stromal cell infusions as rescue therapy for corticosteroid-refractory adult autoimmune enteropathy*. Mayo Clin Proc, 2012. **87**(9): p. 909-14.
345. Garcia-Olmo, D., M. Garcia-Arranz, and D. Herreros, *Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease*. Expert Opin Biol Ther, 2008. **8**(9): p. 1417-23.
346. Garcia-Olmo, D., et al., *A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation*. Dis Colon Rectum, 2005. **48**(7): p. 1416-23.
347. Garcia-Olmo, D. and D.C. Garcia-Olmo, *Stem cells: promises and realities in cancer research*. Clin Transl Oncol, 2006. **8**(5): p. 301-2.
348. Garcia-Olmo, D., et al., *Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion*. Int J Colorectal Dis, 2009. **24**(1): p. 27-30.
349. Andres, A.M., et al., *Difficulties, guidelines and review of developing an acute rejection model after rat intestinal transplantation*. Transpl Immunol, 2016. **36**: p. 32-41.
350. Tanabe, M., et al., *Influence of donor-recipient strain combinations on immunologic responses after allogeneic rat small bowel transplantation*. Transplant Proc, 1994. **26**(3): p. 1569-70.
351. Orloff, S.L., et al., *A rat small bowel transplant model of chronic rejection: histopathologic characteristics*. Transplantation, 1999. **68**(6): p. 766-79.
352. Orloff, S.L., et al., *Tolerance induced by bone marrow chimerism prevents transplant vascular sclerosis in a rat model of small bowel transplant chronic rejection*. Transplantation, 2000. **69**(7): p. 1295-303.
353. Murase, N., et al., *Immunomodulation for intestinal transplantation by allograft irradiation, adjunct donor bone marrow infusion, or both*. Transplantation, 2000. **70**(11): p. 1632-41.
354. Nakao, A., et al., *Chimerism and tolerance in rat recipients of intestinal allografts from ALS-treated donors with and without adjunct naive-donor-strain bone-marrow cells*. Transplantation, 2003. **75**(9): p. 1575-81.
355. Li, Y., et al., *Long-term comparison of rat model of chronic allograft rejection of orthotopic small bowel transplantation induced by cyclosporine versus tacrolimus*. Transplant Proc, 2013. **45**(5): p. 1811-5.
356. Lopez-Fernandez, S., et al., *[Technical aspects of experimental intestinal transplant]*. Cir Pediatr, 2012. **25**(2): p. 103-8.
357. Zou, Y., et al., *Bacterial translocation in acute rejection after small bowel transplantation in rats*. Pediatr Surg Int, 2005. **21**(3): p. 208-11.
358. Garcia-Olmo, D., et al., *Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy*. Int J Colorectal Dis, 2003. **18**(5): p. 451-4.
359. Lodhi, S.A., K.E. Lamb, and H.U. Meier-Kriesche, *Solid organ allograft survival improvement in the United States: the long-term does not mirror the dramatic short-term success*. Am J Transplant, 2011. **11**(6): p. 1226-35.
360. Giordano, A., U. Galderisi, and I.R. Marino, *From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells*. J Cell Physiol, 2007. **211**(1): p. 27-35.
361. Lazarus, H.M., et al., *Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use*. Bone Marrow Transplant, 1995. **16**(4): p. 557-64.

362. Weng, J.Y., et al., *Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD*. Bone Marrow Transplant, 2010. **45**(12): p. 1732-40.
363. Lucchini, G., et al., *Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population*. Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(9): p. 1293-301.
364. Battiwalla, M. and P. Hematti, *Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation*. Cytotherapy, 2009. **11**(5): p. 503-15.
365. Duijvestein, M., et al., *Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study*. Gut, 2010. **59**(12): p. 1662-9.
366. Zappia, E., et al., *Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1755-61.
367. Reinders, M.E., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with end-stage renal disease are suitable for autologous therapy*. Cytotherapy, 2013. **15**(6): p. 663-72.
368. Roemeling-van Rhijn, M., et al., *Human Bone Marrow- and Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal Cells are Immunosuppressive and in a Humanized Allograft Rejection Model*. J Stem Cell Res Ther, 2013. **Suppl 6**(1): p. 20780.
369. Salvatierra, O., et al., *Deliberate donor-specific blood transfusions prior to living related renal transplantation. A new approach*. Ann Surg, 1980. **192**(4): p. 543-52.
370. Benseker, V., et al., *MSC-based therapies in solid organ transplantation*. Hepatol Int, 2014. **8**(2): p. 179-84.
371. Franquesa, M., et al., *Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation (MiSOT) Fourth Meeting: lessons learned from first clinical trials*. Transplantation, 2013. **96**(3): p. 234-8.
372. Casiraghi, F., et al., *Mesenchymal stromal cells in renal transplantation: opportunities and challenges*. Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(4): p. 241-53.
373. Brennan, D.C., T. Mohanakumar, and M.W. Flye, *Donor-specific transfusion and donor bone marrow infusion in renal transplantation tolerance: a review of efficacy and mechanisms*. Am J Kidney Dis, 1995. **26**(5): p. 701-15.
374. Cavinato, R.A., et al., *Pretransplant donor peripheral blood mononuclear cells infusion induces transplantation tolerance by generating regulatory T cells*. Transplantation, 2005. **79**(9): p. 1034-9.
375. Oluwole, S.F., et al., *Mechanisms of immunologic unresponsiveness induced by ultraviolet-irradiated donor-specific blood transfusions and peritransplant cyclosporine*. Transplantation, 1988. **46**(3): p. 352-8.
376. Mazo, M., et al., *Transplantation of mesenchymal stem cells exerts a greater long-term effect than bone marrow mononuclear cells in a chronic myocardial infarction model in rat*. Cell Transplant, 2010. **19**(3): p. 313-28.
377. Ghanem, A., et al., *Functional impact of targeted closed-chest transplantation of bone marrow cells in rats with acute myocardial ischemia/reperfusion injury*. Cell Transplant, 2009. **18**(12): p. 1289-97.
378. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
379. Imberti, B., M. Monti, and F. Casiraghi, *Pluripotent stem cells and tolerance induction in organ transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2015. **20**(1): p. 86-93.
380. Dekaney, C.M., et al., *Expansion of intestinal stem cells associated with long-term adaptation following ileocecal resection in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(5): p. G1013-22.

## BIBLIOGRAFÍA

381. Taylor, D.A., *From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs*. Curr Opin Biotechnol, 2009. **20**(5): p. 598-605.
382. 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, 2003. **108**(7): p. 863-8.
383. Devine, S.M., et al., *Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion*. Exp Hematol, 2001. **29**(2): p. 244-55.
384. Devine, S.M., et al., *Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates*. Blood, 2003. **101**(8): p. 2999-3001.
385. Popp, F.C., et al., *No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury*. Stem Cells, 2007. **25**(3): p. 639-45.
386. Hoogduijn, M.J., et al., *Immunological aspects of allogeneic and autologous mesenchymal stem cell therapies*. Hum Gene Ther, 2011. **22**(12): p. 1587-91.
387. Marigo, I. and F. Dazzi, *The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(6): p. 593-602.
388. Stagg, J., et al., *Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2570-7.
389. Francois, M., et al., *Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties*. Blood, 2009. **114**(13): p. 2632-8.
390. Li, F., et al., *[Location of bone marrow mesenchymal stem cells in rats after small intestinal transplantation]*. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, 2015. **18**(11): p. 1158-62.
391. Hoogduijn, M.J., et al., *No evidence for circulating mesenchymal stem cells in patients with organ injury*. Stem Cells Dev, 2014. **23**(19): p. 2328-35.
392. Maijenburg, M.W., C.E. van der Schoot, and C. Voermans, *Mesenchymal stromal cell migration: possibilities to improve cellular therapy*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(1): p. 19-29.
393. Rochefort, G.Y., et al., *Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia*. Stem Cells, 2006. **24**(10): p. 2202-8.
394. Le Blanc, K. and O. Ringden, *Use of mesenchymal stem cells for the prevention of immune complications of hematopoietic stem cell transplantation*. Haematologica, 2005. **90**(4): p. 438.
395. 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, 2006. **108**(6): p. 2114-20.
396. Eliopoulos, N., et al., *Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4057-65.
397. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1294-301.
398. Puissant, B., et al., *Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells*. Br J Haematol, 2005. **129**(1): p. 118-29.
399. Lee, R.H., et al., *Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue*. Cell Physiol Biochem, 2004. **14**(4-6): p. 311-24.
400. Wagner, W., et al., *Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood*. Exp Hematol, 2005. **33**(11): p. 1402-16.
401. Bernardo, M.E., et al., *Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources*. Connect Tissue Res, 2007. **48**(3): p. 132-40.



402. Yoo, K.H., et al., *Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues*. Cell Immunol, 2009. **259**(2): p. 150-6.
403. Verbeek, R., *Generation of mesenchymal stem cells as a medicinal product in organ transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2013. **18**(1): p. 65-70.
404. 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, 2009. **126**(1-2): p. 37-42.
405. Meza-Zepeda, L.A., et al., *High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(2): p. 553-63.
406. Rubio, D., et al., *Spontaneous human adult stem cell transformation*. Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3035-9.
407. Gimble, J.M. and F. Guilak, *Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells*. Curr Top Dev Biol, 2003. **58**: p. 137-60.
408. Gimble, J.M., et al., *In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells*. Transfus Med Hemother, 2008. **35**(3): p. 228-238.
409. Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell, *Adipose-derived stem cells for regenerative medicine*. Circ Res, 2007. **100**(9): p. 1249-60.
410. Locke, M., J. Windsor, and P.R. Dunbar, *Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery*. ANZ J Surg, 2009. **79**(4): p. 235-44.
411. English, K., A. French, and K.J. Wood, *Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation?* Cell Stem Cell, 2010. **7**(4): p. 431-42.
412. Zonta, S., et al., *Which is the most suitable and effective route of administration for mesenchymal stem cell-based immunomodulation therapy in experimental kidney transplantation: endovenous or arterial?* Transplant Proc, 2010. **42**(4): p. 1336-40.
413. Kunter, U., et al., *Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(6): p. 1754-64.
414. 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, 2009. **158**(1): p. 37-44.
415. Buron, F., et al., *Mesenchymal stem cell and immunosuppressive drug interactions*. Transplantation, 2009. **87**(12): p. 1899-900; discussion 1900-1.
416. Hoogduijn, M.J., et al., *Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin*. Transplantation, 2008. **86**(9): p. 1283-91.
417. Eggenhofer, E., et al., *Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model*. Transpl Immunol, 2011. **25**(2-3): p. 141-7.
418. Tsuji, W., et al., *Effects of immunosuppressive drugs on viability and susceptibility of adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 131.
419. Zeiser, R., et al., *Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production*. Blood, 2006. **108**(1): p. 390-9.
420. Song, Y., et al., *Use of FK506 and bone marrow mesenchymal stem cells for rat hind limb allografts*. Neural Regen Res, 2012. **7**(34): p. 2681-8.
421. Du, Z., et al., *Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation*. J Surg Res, 2013. **183**(2): p. 907-15.

## BIBLIOGRAFÍA

422. Shi, D., et al., *Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate the immunosuppressive effect of cyclosporin A on T lymphocytes through Jagged-1-mediated inhibition of NF-kappaB signaling*. *Exp Hematol*, 2011. **39**(2): p. 214-224 e1.
423. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes*. *Scand J Immunol*, 2004. **60**(3): p. 307-15.
424. Battaglia, M., A. Stabilini, and M.G. Roncarolo, *Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells*. *Blood*, 2005. **105**(12): p. 4743-8.
425. Buron, F., et al., *Human mesenchymal stem cells and immunosuppressive drug interactions in allogeneic responses: an in vitro study using human cells*. *Transplant Proc*, 2009. **41**(8): p. 3347-52.
426. Franquesa, M., et al., *The effect of rabbit antithymocyte globulin on human mesenchymal stem cells*. *Transpl Int*, 2013. **26**(6): p. 651-8.
427. Haarer, J., et al., *Caveats of mesenchymal stem cell therapy in solid organ transplantation*. *Transpl Int*, 2015. **28**(1): p. 1-9.
428. Otto, W.R. and N.A. Wright, *Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic*. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011. **4**: p. 20.
429. Rosland, G.V., et al., *Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation*. *Cancer Res*, 2009. **69**(13): p. 5331-9.
430. Torsvik, A., et al., *Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter*. *Cancer Res*, 2010. **70**(15): p. 6393-6.
431. Garcia, S., et al., *Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells*. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(9): p. 1648-50.
432. Tarte, K., et al., *Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation*. *Blood*, 2010. **115**(8): p. 1549-53.
433. Casiraghi, F., et al., *Multipotent mesenchymal stromal cell therapy and risk of malignancies*. *Stem Cell Rev*, 2013. **9**(1): p. 65-79.
434. Prockop, D.J., et al., *Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy*. *Cytotherapy*, 2010. **12**(5): p. 576-8.
435. Lalu, M.M., et al., *Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47559.
436. Studeny, M., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors*. *Cancer Res*, 2002. **62**(13): p. 3603-8.
437. Nakamizo, A., et al., *Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas*. *Cancer Res*, 2005. **65**(8): p. 3307-18.
438. Krampera, M., *Mesenchymal stromal cells: more than inhibitory cells*. *Leukemia*, 2011. **25**(4): p. 565-6.
439. Feng, B. and L. Chen, *Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator?* *Cancer Biother Radiopharm*, 2009. **24**(6): p. 717-21.
440. Motaln, H., et al., *Human mesenchymal stem cells exploit the immune response mediating chemokines to impact the phenotype of glioblastoma*. *Cell Transplant*, 2012. **21**(7): p. 1529-45.
441. Ning, H., et al., *The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study*. *Leukemia*, 2008. **22**(3): p. 593-9.

442. von Bahr, L., et al., *Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy*. Biol Blood Marrow Transplant, 2012. **18**(4): p. 557-64.
443. Forslow, U., et al., *Treatment with mesenchymal stromal cells is a risk factor for pneumonia-related death after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Eur J Haematol, 2012. **89**(3): p. 220-7.



# ANEXOS

---

## 10. ANEXOS

---

### I. ANEXO 1: QUIMOQUINAS DESCRITAS, DISTINTAS NOMENCLATURAS Y RECEPTORES

Nombre	Otros nombres	Receptor
CCL1	I-309, TCA-3	CCR8
CCL2	MCP-1 proteína 1 quimioatrayente de monocitos	CCR2, CCR2
CCL3	MIP-1a	CCR1
CCL4	MIP-1B	CCR1, CCR5
CCL5	RANTES	CCR5
CCL6	C10, MRP-2	CCR1
CCL7	MARC, MCP-3	CCR2
CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2B, CCR5
CCL9/CCL10	MRP-2, CCF18, MIP-1?	CCR1
CCL11	Eotaxin	CCR2, CCR3, CCR5
CCL12	MCP-5	
CCL13	MCP-4, NCC-1, Ckβ10	CCR2, CCR3, CCR5
CCL14	HCC-1, MCIF, Ckβ1, NCC-2, CCL	CCR1
CCL15	Leukotactin-1, MIP-5, HCC-2, NCC-3	CCR1, CCR3
CCL16	LEC, NCC-4, LMC, Ckβ12	CCR1, CCR2, CCR5, CCR8
CCL17	TARC, dendrokine, ABCD-2	CCR4
CCL18	PARC, DC-CK1, AMAC-1, Ckβ7, MIP-4	
CCL19	ELC, Exodus-3, Ckβ11	CCR7
CCL20	LARC, Exodus-1, Ckβ4, MIP-3α	CCR6
CCL21	SLC, 6Ckine, Exodus-2, Ckβ9, TCA-4	CCR7
CCL22	MDC, DC/β-CK	CCR4
CCL23	MPIF-1, Ckβ8, MIP-3, MPIF-1	CCR1
CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2, Ckβ6	CCR3
CCL25	TECK, Ckβ15	CCR9
CCL26	Eotaxin-3, MIP-4a, IMAC, TSC-1	CCR3
CCL27	CTACK, ILC, Eskine, PESKY, skinkine	CCR10
CCL28	MEC	CCR3, CCR10
Nombre	Otros nombres	Receptor
CXCL1	Gro-a, GRO1, NAP-3, KC	CXCR2
CXCL2	Gro-β, GRO2, MIP-2a	CXCR2
CXCL3	Gro-?, GRO3, MIP-2B	CXCR2
CXCL4	PF-4	CXCR3B
CXCL5	ENA-78	CXCR2
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2, CTAPIII, β-Ta, PEP	
CXCL8	IL-8, NAP-1, MDNCF, GCP-1	CXCR1, CXCR2

CXCL9	MIG, CRG-10	CXCR3
CXCL10	IP-10, CRG-2	CXCR3
CXCL11	I-TAC, $\beta$ -R1, IP-9	CXCR3
CXCL12	SDF-1, PBSF	CXCR4
CXCL13	BCA-1, BLC	CXCR5
CXCL14	BRAK, bolekine	
CXCL15	Lungkine, WECHÉ	
CXCL16	SRPSOX	CXCR6
CXCL17	DMC, VCC-1	

Nombre	Otros nombres	Receptor
XCL1	Lymphotactin $\alpha$ , SCM-1a, ATAC	XCR1
XCL2	Lymphotactin $\beta$ , SCM-1 $\beta$	XCR1
Nombre	Otros nombres	Receptor
CX3CL1	Fractalkine, Neurotactin, ABCD-3	CX3CR1

II. **ANEXO 2: PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (MARCAJE CON CM-DIL)**

1. **Desparafinar:** Se meten los portas con los cortes toda la noche a 60°C
2. **Hidratar:** Xilol 10' → EtOH100°-5' → EtOH96°-5' → EtOH70°-5' → H<sub>2</sub>O destilada 5'
3. Montar con **Vectashield Mounting Medium with DAPI** (10 ml) 1,5 ug/ml. Ref.: H-1200 (Palex), dejar secar aprox 1 h, protegidos de la luz y sellar con esmalte. (Dejar tapados en una bandeja con papel plata y meterlos en la nevera hasta que se vayan a mirar al micro de fluorescencia)



### III. ANEXO 3: PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA GFP (GREEN FLUORESCENCE PROTEIN)

**Desparafinar:** Se meten los portas con los cortes toda la noche a 60°C

**Hidratar:** : Xilol 10' → EtOH100°-5' → EtOH96°-5' → EtOH70°-5' → H<sub>2</sub>O destilada 5'

**Desenmascaramiento antigénico:**

***OLLA A PRESIÓN:*** Se prepara el citrato sódico (1L.) y se mete en la olla, ésta se coloca sobre la placa en la posición 3 y antes de que empiece a hervir se meten los cristales y se cierra la olla. Cuando suba la 1ª anilla aprox. Se empieza a contar *1 minuto.*

Luego se atempera en el fregadero y se saca toda la presión antes de abrir. Y una vez abierta se deja atemperar aprox. *10-15 minutos.*

**2 lavados de TBS 1x.** (*2x5 minutos*)

**Cámara Húmeda:** Se prepara una cámara húmeda, que consiste en poner bastante papel entre los carriles y humedecerlo abundantemente con H<sub>2</sub>O destilada. Todo el proceso, a partir de ahora, se realiza en la cámara húmeda.

**Inhibición de la autofluorescencia:** (*10 minutos*).

Borohidruro ..... 0,02 g.

TBS 1x ..... 5 ml.

Con el Borohidruro hay que tener mucho cuidado al añadirle el TBS 1x, ya que es bastante exotérmico y, además de calentarse, si se añade muy deprisa puede estallar.

**2 lavados de TBS 1x.** (*2x5 minutos*)

**Sol. Bloqueo 1:10** (30 minutos)

SNC (Suero Normal de Cabra) ..... 100 µl.

Tritón 10% ..... 10 µl.

TBS 1X ..... 1890 µl.

**¡NO LAVAR!!** : Escurrir la solución de bloqueo y secar el filo contra papel de manos

**Anticuerpo primario** (*toda la noche en oscuridad y en cámara fría*)

**TBS 1x** (*2x5 minutos, en oscuridad*)

**Anticuerpo secundario** (*1 hora, a temperatura ambiente, en oscuridad*)

**TBS 1x** (*2x5 minutos, en oscuridad*)

Montar con **Vectashield Mounting Medium with DAPI** (10 ml) 1,5 ug/ml. Ref.: H-1200 (Palex), dejar secar aprox 1 h, protegidos de la luz y sellar con esmalte. (Dejar tapados en una bandeja con papel plata y meterlos en la nevera hasta que se vayan a mirar al micro de fluorescencia)

## IV. ANEXO 4: RESUMEN DE LAS CITOQUINAS ESTUDIADAS

<b>PROINFLAMATORIAS</b>
<p><b>IL1a:</b> Sintetizada por mononucleares y macrófagos; Induce reacción de fase aguda y la activación y reconocimiento por parte de los linfocitos T y de los macrófagos del lugar donde se desarrolla la respuesta inmunitaria.</p> <p><b>IL1b:</b> Producida por macrófagos activados como una proproteína, que es procesada por la caspasa a su forma activa. Es un importante mediador de la respuesta inflamatoria, implicada en muchos procesos celulares, de proliferación, diferenciación y apoptosis.</p> <p><b>IL6:</b> Proinflamatoria y antiinflamatoria, sintetizada por monocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos; inducida por IL1 y endotoxinas. Es pirógeno, y induce la síntesis de inmunoglobulinas. Activa la síntesis de proteínas de fase aguda. Estimula crecimiento y diferenciación tanto de linfocitos B como de T.</p> <p><b>IL2:</b> Sintetizada por Th1. Actúa como factor de crecimiento de los linfocitos T que inducen la proliferación de todas las subpoblaciones linfocitarias. Estimula la síntesis de IFN<math>\gamma</math>, IL1, TNF<math>\alpha</math> y <math>\beta</math>.</p> <p><b>IFN<math>\gamma</math>:</b> principal activador de macrófagos y linfocitos Tc o CD8+ y NK. Interesantemente actúa también en la inmunidad humoral, induciendo la producción de IgG. Implicados en las respuestas de los Th1</p> <p><b>IL5:</b> producida por linfocitos T y mastocitos, estimula el crecimiento y proliferación de eosinófilos.</p> <p><b>IL12:</b> proinflamatorio; se llamó <b>factor de maduración de linfocito citotóxico o factor estimulador de célula NK</b>. Sintetizado predominantemente por linfocitos B y macrófagos. Su síntesis se inhibe por la IL4 y la IL10. Promueve la proliferación de Linfocitos T y NK activados, aumentando en estos últimos su capacidad lítica. Inductor potente de la producción de IFN<math>\gamma</math> por parte de estas células tanto en reposo como activadas. Induce selectivamente la diferenciación de los linfocitos Th0 en Th1, pero suprime las funciones dependientes de Th2, como la producción de IL4, IL10 e IgE. Produce GMCSF.</p> <p><b>IL13:</b> producido por Th2, NK y mastocitos. Cambio de isotipo a IgE en los linfocitos B, aumenta la producción de moco en las células epiteliales y la síntesis de colágeno de los fibroblastos y macrófagos.</p> <p><b>IL17 (CTLA8 en roedores):</b> es una citoquina proinflamatoria producida por las Thelper e inducida por la IL23. Se une a receptores específicos, y actúa como un potente mediador en reacciones tardías aumentando la producción de citoquinas en varios tejidos. Recluta monocitos y neutrófilos a las áreas de inflamación respondiendo a la invasión de patógenos, similar al IFN<math>\gamma</math>. Para promover la inflamación, actúa sinérgicamente con el TNF<math>\alpha</math> y la IL1. Esta actividad se puede también redirigir contra el huésped y resultar en procesos autoinmunes que implican inflamación crónica como la psoriasis cutánea. Se ha asociado también con respuestas alérgicas. La IL17 induce la producción de muchas otras citoquinas: IL6, GCSF, GMCSF, IL1<math>\beta</math>, TGB<math>\beta</math>, TNF<math>\alpha</math>; quimoquinas: IL8, GRO<math>\alpha</math>, MCP1; y prostaglandinas (PGE2) procedentes de diferentes células (fibroblastos, endoteliales, epiteliales, queratinocitos, y macrófagos...). La producción de otras citoquinas atrae a otras células incluyendo neutrófilos pero no eosinófilos. La</p>

función de la IL17 es esencial en el subtipo de CD4 llamadas Th17. Se han relacionado en muchas enfermedades inmunes y autoinmunes.
<b>ANTIINFLAMATORIAS</b>
<p><b>IL4</b> o “<b>Factor estimulante de linfocitos B</b>”: es inducida por los linfocitos B diferenciados, y sintetizada por Thelper, mastocitos y basófilos, por lo que su respuesta es más tardía; Entre sus acciones más importantes, bloquea la síntesis de novo de citoquinas. Antagoniza la función del IFN<math>\gamma</math>, por lo que inhibe las células Th1.</p> <p><b>IL10</b> o “<b>factor inhibidor de la síntesis de citoquinas</b>”: parece algo más precoz ya que es producida por Th2, CD8, monocitos....inhibe a los macrófagos y células dendríticas activadas, por tanto participa en las reacciones inmunes innatas y en la inmunidad celular.</p>
<b>De la familia de las CXC</b>
<p><b>Gro-<math>\alpha</math> (CXCL1)</b>: expresado por macrófagos, neutrófilos y células epiteliales, y atrae a los neutrófilos.</p> <p><b>MIP2 (CXCL2) o Proteína 2-<math>\alpha</math> inflamatoria de macrófagos o Gro<math>\beta</math> (proteína Beta reguladora del crecimiento) o Gro2 (Gro oncogen)</b>: Es un 90% idéntica a la Gro-<math>\alpha</math> (CXCL1). Se secreta por monocitos y macrófagos y es quimiotáctica para PMN y células totipotenciales hematopoyéticas.</p> <p><b>IP10 o Proteína 10 inducida por el IFN<math>\gamma</math> o citoquina B10 pequeña inducible</b>: Se secreta por varios tipos celulares (monocitos, endoteliales, fibroblastos) en respuesta al IFN<math>\gamma</math>. Atrae monocitos y macrófagos, linfocitos T, NK, células dendríticas, promueve la adhesión de los linfocitos T a las células endoteliales, actividad antitumoral, inhibe la formación de colonias de la médula ósea, y angiogénesis. Se han visto niveles basales elevados en plasma en pacientes crónicamente infectados por virus con hepatitis C, HIV... y su medición predice una respuesta al tratamiento.</p>
<b>De la familia de las CCL</b>
<p><b>MCP1 (CCL2) o “proteína 1 quimiotáctica para monocitos”</b>: Lo secretan primariamente monocitos, macrófagos y células dendríticas. El factor de crecimiento derivado de plaquetas es el mayor inductor de CCL2. Recluta monocitos, linfocitos T de memoria y células dendríticas a las zonas de inflamación que se produce en cualquier daño tisular o infección. Atrae también a los basófilos, pero no a los neutrófilos ni a los eosinófilos. El CCL2 aumenta la actividad antitumoral de los monocitos y es esencial para la formación de granulomas. Implicada en la patogénesis de varias enfermedades caracterizadas por infiltraciones de monocitos, como psoriasis, artritis reumatoide o arterioesclerosis. Se ha visto su uso en modelo de glomerulonefritis y también en procesos neuroinflamatorios, diabetes, obesidad....</p> <p><b>MIP 1<math>\alpha</math> (CCL3) o “proteína inflamatoria de macrófagos 1 <math>\alpha</math>”</b>: implicada en el estado inflamatorio agudo en el reclutamiento y activación de los PMN; Atrae macrófagos, monocitos y neutrófilos. Produce una fiebre monofásica de rápido desarrollo y de una magnitud similar a la fiebre que produce la IL1 o el TNF<math>\alpha</math>. Sin embargo, a diferencia de estos dos pirógenos endógenos, esta fiebre no se inhibe con los</p>

inhibidores de la ciclooxigenasa (ibuprofeno), por lo que CCL3 puede participar en la respuesta febril no mediada por la síntesis de prostaglandinas.

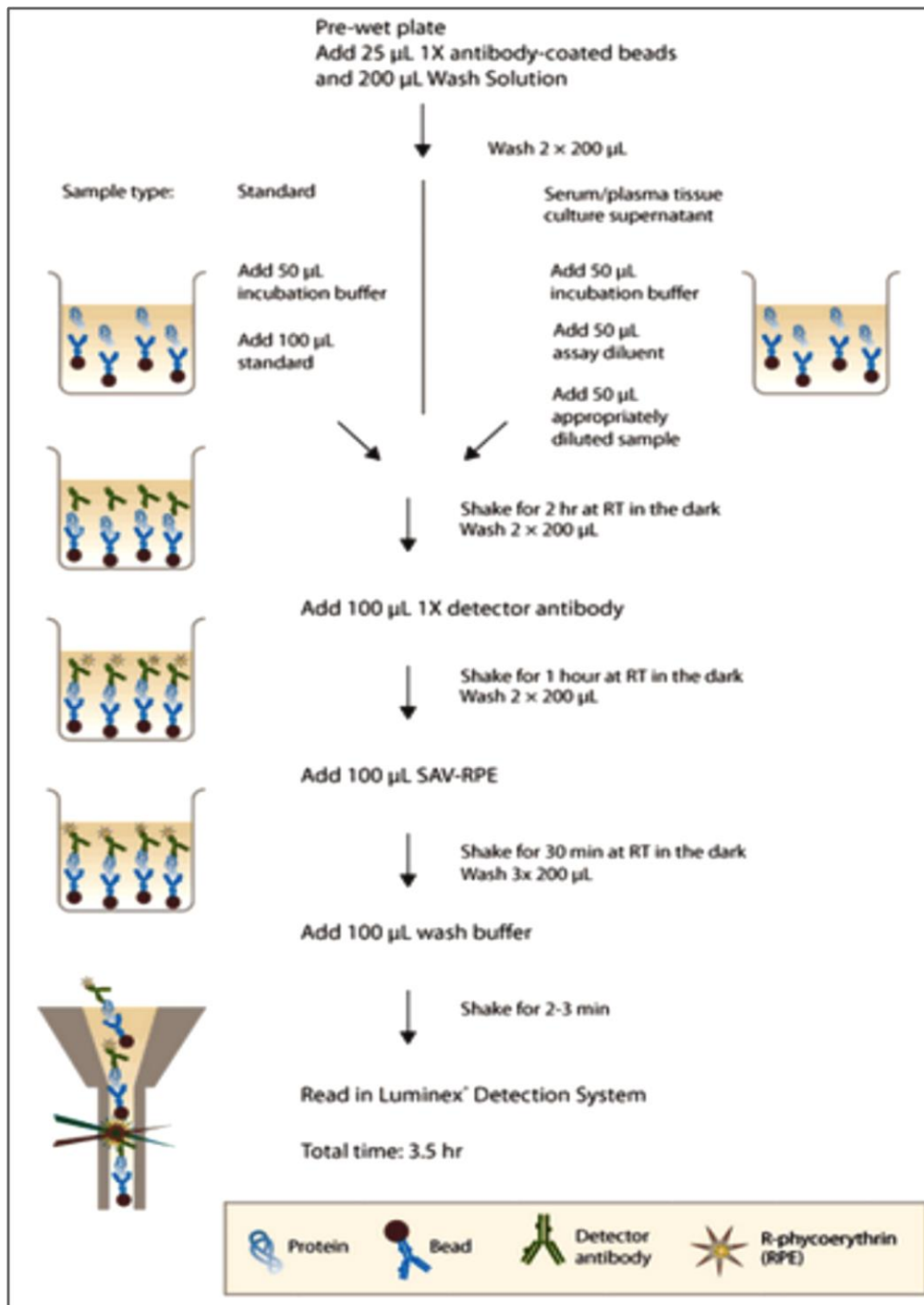
**RANTES (CCL5)** o “**Regulated on Activation, normal T cell expressed and secreted**”: Descrita por primera vez en una búsqueda de genes expresados “tardíamente” (3-5 días) tras la activación de las células T. Por tanto, se consideró una citoquina quimiotáctica y se vio que se expresaba en más de 100 enfermedades en humanos. Atrae a los linfocitos T, eosinófilos, y basófilos, y juega un papel activo en reclutar linfocitos en zonas de inflamación. Con la ayuda de determinadas citoquinas liberadas por los linfocitos T (IL2 o IFN $\gamma$ , por ej.), CCL5 también induce la proliferación y activación de ciertas NK para formar células CHAK (células CC-Chemokine-Activated killer). RANTES, junto con MIP1 $\alpha$  y MIP1 $\beta$ , se han identificado como un factor inhibidor natural del VIH, secretado por las CD8+ activadas y otras células inmunes.

**MCP3 (CCL7)** o “**citoquina 3 específica de monocitos**”: En íntima relación con la CCL2, atrae específicamente monocitos y regula la función de los macrófagos. Es producida por determinadas líneas celulares tumorales y por los macrófagos.

**Eotaxina (CCL11)** o “**proteína quimiotáctica para eosinófilos**”: Implicada en respuestas alérgicas. Su aumento en plasma se asocia a la edad en ratones y humanos

## V. ANEXO 5: DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS PLASMÁTICAS: ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Las concentraciones y sensibilidades, que vienen en el kit, junto con los rangos en que los datos son aceptables, así como un esquema descriptivo de la técnica.



<b>Sensitivity</b>	<p>As determined for Lot 1:</p> <p>IL-1 alpha: 3.5 pg/mL</p> <p>C-CSF (CSF-3): 0.3 pg/mL</p> <p>IL-10: 1.6 pg/mL</p> <p>IL-17A: 0.2 pg/mL</p> <p>IL-1 beta: 1.1 pg/mL</p> <p>IL-6: 1.9 pg/mL</p> <p>TNF alpha: 0.4 pg/mL</p> <p>IL-4: 0.1 pg/mL</p> <p>GM-CSF: 1.3 pg/mL</p> <p>IFN gamma: 0.6 pg/mL</p> <p>IL-2: 1.9 pg/mL</p> <p>IL-5: 0.3 pg/mL</p> <p>IL-13: 0.3 pg/mL</p> <p>IL-12p70: 5.9 pg/mL</p> <p>Eotaxin: 1.1 pg/mL</p> <p>GRO alpha: 1.4 pg/mL</p> <p>IP-10: 0.9 pg/mL</p> <p>MCP-1: 10.9 pg/mL</p> <p>MCP-3: 1.1 pg/mL</p> <p>MIP-1 alpha: 1.0 pg/mL</p> <p>MIP-2: 0.1 pg/mL</p> <p>Rantes: 6.1 pg/mL</p>
--------------------	---

<b>Standard Curve Range</b>	<p>As determined for Lot 1:</p> <p>IL-1 alpha: 12.2-50000 pg/mL</p> <p>C-CSF (CSF-3): 3.7-15000 pg/mL</p> <p>IL-10: 9.8-40000 pg/mL</p> <p>IL-17A: 3.7-15000 pg/mL</p> <p>IL-1 beta: 15.9-65000 pg/mL</p> <p>IL-6: 4.9-20000 pg/mL</p> <p>TNF alpha: 4.9-20000 pg/mL</p> <p>IL-4: 1.2-5000 pg/mL</p> <p>GM-CSF: 9.8-40000 pg/mL</p> <p>IFN gamma: 9.8-40000 pg/mL</p> <p>IL-2: 4.9-20000 pg/mL</p> <p>IL-5: 2.4-10000 pg/mL</p> <p>IL-13: 4.9-20000 pg/mL</p> <p>IL-12p70: 9.8-40000 pg/mL</p> <p>Eotaxin: 1.9-7700 pg/mL</p> <p>GRO alpha: 11.4-46500 pg/mL</p> <p>IP-10: 4.9-20100 pg/mL</p> <p>MCP-1: 18.03-75000 pg/mL</p> <p>MCP-3: 3.5-14200 pg/mL</p> <p>MIP-1 alpha: 2.3-9500 pg/mL</p> <p>MIP-2: 0.6-2400 pg/mL</p> <p>Rantes: 85.5-350000 pg/mL</p>
-----------------------------	---

**VI. ANEXO 6: PUBLICACIONES SURGIDAS DE LA TESIS**



## Difficulties, guidelines and review of developing an acute rejection model after rat intestinal transplantation☆



Ane Miren Andres<sup>a,\*</sup>, Monica Santamaria<sup>b</sup>, Francisco Hernandez-Oliveros<sup>a</sup>, Laura Guerra<sup>c</sup>, Sergio Lopez<sup>a</sup>, Pablo Stringa<sup>d</sup>, Maria Teresa Vallejo<sup>e</sup>, Carlota Largo<sup>b</sup>, Jose Luis Encinas<sup>a</sup>, Maria Soledad Garcia de las Heras<sup>f</sup>, Manuel Lopez-Santamaria<sup>a</sup>, Juan Antonio Tovar<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pediatric Surgery Department, La Paz University Hospital, Paseo La Castellana, 261, 28046 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Experimental Surgery Department, La Paz University Hospital, Paseo La Castellana, 261, 28046 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Pathology Department, La Paz University Hospital, Paseo La Castellana, 261, 28046 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Fundacion Favaloro Buenos Aires: Experimental Transplant Department, Buenos Aires, Argentina

<sup>e</sup> Idipaz Institute, Immunohistochemistry Department, Paseo La Castellana, 261, 28046 Madrid, Spain

<sup>f</sup> King Juan Carlos University, Madrid: Histology Department, Alcorcon, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 January 2016

Received in revised form 12 April 2016

Accepted 15 April 2016

Available online 19 April 2016

### ABSTRACT

Experimental small bowel transplantation (SBT) in rats has been proven to be a useful tool for the study of ischemia-reperfusion and immunological aspects related to solid organ transplantation. However, the model is not completely refined, specialized literature is scarce and complex technical details are typically omitted or confusing. Most studies related to acute rejection (AR) use the orthotopic standard, with small sample sizes due to its high mortality, whereas those studying chronic rejection (CR) use the heterotopic standard, which allows longer term survival but does not exactly reflect the human clinical scenario. Various animal strains have been used, and the type of rejection and the timing of its analysis differ among authors. The double purpose of this study was to develop an improved unusual AR model of SBT using the heterotopic technique, and to elaborate a guide useful to implement experimental models for studying AR. We analyzed the model's technical details and expected difficulties in overcoming the learning curve for such a complex microsurgical model, identifying the potential problem areas and providing a step-by-step protocol and reference guide for future surgeons interested in the topic. We also discuss the historic and more recent options in the literature.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Background

Small bowel transplantation (SBT) continues to be an immunological enigma with a high mortality rate [1]. The mechanisms of rejection are not completely understood, and treatment is frequently empiric. Thus, animal research models are still necessary to study immunological pathways and therapeutic alternatives to those currently used.

Experimental SBT in rats has been the most commonly used model due to ethical and economic advantages [2]. However, this technique requires excellent microsurgical skills to overcome a steep learning

curve before achieving survival, and worldwide only a few groups of surgeons perform it. Furthermore, mortality during the early postoperative days is high, particularly in the orthotopic model if there is no close monitoring similar to that performed on humans [3]. These complications appear to diminish in the heterotopic model [3–6], although this will never provide the same information as an orthotopic model, which is similar to that experienced in human clinical practice [3,7–9].

An ideal acute rejection (AR) model is difficult to find in the literature for several reasons: only a few groups have published their experience in rat SBT, thus sample sizes are limited; most do not provide many details about the model itself and there are no data regarding the time consumption and cost-effectiveness of the procedure, particularly when starting to reproduce it; most groups use the orthotopic model for AR whereas the heterotopic is more frequently used for chronic rejection (CR); each group uses different strains according to the availability in their respective countries—therefore histoincompatibility and the timing of rejection varies depending on each strain; and the euthanasia day varies among authors. For these reasons, it is difficult to compare the various publications and to establish conclusions before starting as a novice in the field [4–6,8–18].

☆ Grant support: FIS grant (Fondo de Investigacion Sanitaria, Spain, P110/02507)

\* Corresponding author at: Pediatric Surgery Department, Hospital Universitario La Paz, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain.

E-mail addresses: [aneandresmo@hotmail.com](mailto:aneandresmo@hotmail.com) (A.M. Andres), [monica.santamariamiro@gmail.com](mailto:monica.santamariamiro@gmail.com) (M. Santamaria), [fhernandezo.hulp@salud.madrid.org](mailto:fhernandezo.hulp@salud.madrid.org) (F. Hernandez-Oliveros), [lauraguerrap@gmail.com](mailto:lauraguerrap@gmail.com) (L. Guerra), [sergio\\_lopez\\_fdez@hotmail.com](mailto:sergio_lopez_fdez@hotmail.com) (S. Lopez), [Pablo\\_stringa@hotmail.com](mailto:Pablo_stringa@hotmail.com) (P. Stringa), [teresa.vallejo@salud.madrid.org](mailto:teresa.vallejo@salud.madrid.org) (M.T. Vallejo), [carlota.largo@salud.madrid.org](mailto:carlota.largo@salud.madrid.org) (C. Largo), [encinas.j@tiscali.it](mailto:encinas.j@tiscali.it) (J.L. Encinas), [soledad.garcia@urjc.es](mailto:soledad.garcia@urjc.es) (M.S. Garcia de las Heras), [mlsantamaria@salud.madrid.org](mailto:mlsantamaria@salud.madrid.org) (M. Lopez-Santamaria), [juan.tovar@salud.madrid.org](mailto:juan.tovar@salud.madrid.org) (J.A. Tovar).



In our hospital, where rat SBT has been performed by various surgeons for two decades, the surgical technique has been previously described [6,16,18–20]. When studying rejection, however, there are still important questions about the ideal strain, type of transplant and anastomosis, which was the reason we searched for the ideal AR model in the literature. We also previously published the major complications that occurred during the procedure, which led to finding some significant prognostic factors for success, such as the total transplant duration—particularly the warm ischemia time—and lack of postoperative bleeding, as has been described by others [7]. However, the results were limited by the surgeons who participated with varying skill levels, experience and dedication, and the procedure was not always performed for studying rejection, but also for ischemia preconditioning, bacterial translocation or technical details [17,19–21].

## 2. Objective

Therefore, the goal of this study is threefold. First, we aim to describe an unusual AR model using the heterotopic technique, providing a step-by-step protocol and guidelines to answer the questions that could help the beginner to make the right decisions. Second, we report the difficulties in developing such a complex microsurgical model, with the aim of shortening the learning curve. Third, we summarize and discuss the historic and more recent options in the literature.

## 3. Materials and methods

An AR model was developed after SBT. We initially began with the orthotopic model, but we switched to a heterotopic model, which resulted in a higher success rate and longer-term survival. All the experiments were approved by La Paz University Hospital's animal welfare ethics committee.

### 3.1. Animals/preoperative care

A total of 320 male inbred rats weighing 250–300 g were purchased from Janvier Labs (France): 160 Brown Norway (BN) rats served as donors and 160 Lewis rats as recipients. All the procedures were performed in accordance with the principles of the federal law regarding the protection of animals (RD 56/2013). All the rodents were housed individually in standard animal facilities at La Paz University Hospital until transplantation, at a room temperature of  $21 \pm 2$  °C, relative humidity of  $45 \pm 15\%$ , maintained at a 12-hr light/dark cycle, and fed commercially available chow (Safe A04, Panlab) and tap water ad libitum. Food was withheld from the donor for 24 h prior to surgery.

### 3.2. Surgical procedures

Allogeneic SBT was performed using standard microvascular techniques as previously described [22,23].

#### 3.2.1. Anesthesia

General anesthesia was used, with sevoflurane 5% during the induction and laparotomy and 2% for the rest of the procedure, as maintenance.

#### 3.2.2. Donor operation

The procedure was clean but not sterile. Five milliliters of physiological saline was perfused subcutaneously just before the incision. A median laparotomy was performed and the entire small bowel from the ligament of Treitz to 3 cm from the ileocecal valve was prepared on a vascular pedicle consisting of the superior mesenteric artery (SMA) on an aortic cuff and the portal vein (PV). Just before removal, heparin was intravenously administered (0.2 ml 5%), the infrarenal aorta was cannulated, the infradiaphragmatic aorta was clamped and the graft was perfused with Ringer's lactate (RL) until the exiting effluent was

clear through the PV. At this point the graft was removed, and the intestinal lumen was flushed with RL (4 °C). The graft was cooled with ice, as is performed in humans, and stored at 4 °C in the same solution until implantation into the recipient after 30–45 min.

#### 3.2.3. Recipient operation (SBT)

We initially began by placing a catheter in the tail vein to keep the animal hydrated during the procedure, particularly just after unclamping. This was useful to keep the animal alive in the first transplants, which had significant bleeding. Once the transplant success rate increased, with very little bleeding, a total of 5 ml of physiological saline perfused subcutaneously at the beginning of the procedure was sufficient, thus minimizing the risks of pulmonary emboli. After mobilization of the cava vein and the aorta from the surrounding connective tissue, transplantation was performed by anastomosing the graft SMA on an aortic cuff to the recipient infrarenal aorta, and anastomosing the PV to the recipient infrarenal cava vein in an end-to-side fashion with 9–0 absorbable suture (Dafilon®). Blood flow was restored after unclamping and the absence of significant bleeding was checked.

In the orthotopic model, the entire native small bowel was resected, leaving only 5 cm of jejunum and 5 cm of terminal ileum. After unclamping and restoring blood flow, both bowel ends of the graft were anastomosed with the corresponding ends of the recipient with interrupted sutures (Prolene 7/0). In the heterotopic model, the native intestine was not removed. After restoring blood flow, the bowel ends were exteriorized as ostomies on the right abdominal wall (Prolene 7/0). Finally, the wound was closed with 3/0 running sutures in two planes.

### 3.3. Postoperative care

After the procedure, the animals were resuscitated, heated with thermal blankets and placed in individual cages. During the intervention, they were subcutaneously administered tramadol 25 mg/Kg (Adolonta®) to reduce postoperative pain, and again in the following days if necessary. They were immediately offered water ad libitum and food after 24 h.

The animals were observed and weighed daily until euthanization. Their clinical status was assessed daily: appearance, posture, feeding, activity and body weight. Allograft rejection was determined clinically by palpation of induration of the abdomen and by gross examination of the exteriorized stomas. For those with significant weight loss due to low food intake, the water was replaced with 5% dextrose until they began to gain weight. Ceftriaxone 75 mg/Kg/day (saline carrier) and an extra 4–5 ml of physiological saline was subcutaneously administered daily to prevent infection and maintain hydration. Tacrolimus (TAC) (Astellas Pharma S.A. Spain) 0.5 mg/Kg/day (saline carrier) was also subcutaneously administered when indicated. Those animals with poor health, showing graft failure symptoms (e.g., antalgic posture, general discomfort, anorexia) before the scheduled day were euthanized immediately, and all the data were recorded.

### 3.4. Data collection

With the aim of describing the setup as well as the learning curve, we measured the survival of the animals after the procedure, at 24 h after the procedure and at the time of euthanasia. All the data concerning transplantation were recorded (*learning curve database*,  $n = 160$  SBT): donor and recipient weight, data regarding the donor surgery, recipient surgery, administration of TAC, duration of anastomosis, duration of warm and cold ischemia and surgery recovery. We registered all intra- and postoperative complications, incidents and survival, as well as evolutive data in the survivors until euthanasia (e.g., daily weight, welfare and treatment toxicity). All problems and difficulties during the study were also recorded, as well as the modifications and strategies employed at each moment to improve results.

Finally, a new database was created including only those surviving >6 days under the heterotopic model (*rejection study group*). All the results provided by the pathologist were recorded.

### 3.5. Experimental groups

Euthanasia was initially scheduled for the survivors on the 7th post-operative day (POD), the time at which some groups report that animals develop severe AR. However, what we observed at that time was only a mild or indeterminate histologically confirmed AR; thus, based on the findings described by others and our own experience, we euthanized on the 14th POD, when we observed severe AR.

Thus, the recipients were divided into 5 experimental groups (all under the heterotopic model), according to the immunosuppression and observation time:

1. ALLO Control \_7: euthanize at 7th POD ( $n = 9$ )
2. ALLO Control \_14: euthanize at 14th POD ( $n = 17$ )
3. ALLO + TAC\_7: TAC group (daily); euthanize at 7 POD ( $n = 3$ )
4. ALLO + TAC\_14: TAC group (daily); euthanize at 14 POD ( $n = 6$ )
5. ALLO + TAC5\_14: TAC short-course group (5 days, from POD 0 to POD 4); euthanize at 14 POD ( $n = 15$ )

Groups 1 and 2 would allow us to establish the AR model at different times and to analyze the mechanisms involved in rejection; groups 3, 4 and 5 would allow us to study the effects of TAC on AR.

### 3.6. Euthanasia, graft evaluation and sample collection

The animals were again anesthetized with isoflurane and a new laparotomy was performed at the end of the observation period. At the time of necropsy, a general inspection of various organs was made and rejection was evaluated macroscopically according to the appearance of the graft surface, Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and mesentery thickness. The recipient's abdominal cavity was inspected for the presence of ascites, adhesions and macroscopic signs of peritonitis or abscesses. Samples from allografts and various tissues were obtained for histological and immunohistochemical analysis, just after exsanguination. The bowel lumen (native and graft) was flushed and washed with saline.

### 3.7. Sample studies/histopathological analysis

Grafts harvested from the rats, including the mesentery with lymph nodes, were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and cut into 5  $\mu\text{m}$  sections, which were stained with hematoxylin-eosin following standard methods for routine morphological analysis. The slides were blindly reviewed by an expert pathologist for histological signs of AR, and were graded as described by Wu et al., according to the criteria established at the workshop at the XIII International Small Bowel Symposium (2003) (Table 1) [24]. Tissues were also frozen in liquid nitrogen and placed directly into a 80 °C freezer for future biochemical studies.

### 3.8. Statistical analysis

The statistical analysis was performed with IBM SPSS Statistics 19. The quantitative data were expressed as mean values  $\pm$  standard deviation. The chi-squared test was selected for comparison between groups. A  $P$ -value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. The validity of the acute rejection model was analyzed.

**Table 1**

Histologic grading for small intestine allograft acute rejection: Established criteria at the workshop at the XIII International Small Bowel Symposium.

	Indeterminate*	Mild ACR	Moderate ACR	Severe ACR
Grade	Ind	1	2	3
Inflammatory infiltrate	Minimal and localized	Mild and localized, with activate lymphocytes	Widely dispersed, in lamina propria	Widely dispersed, in lamina propria
Crypt epithelial injury	Minimal	Mild	Diffuse	Diffuse
Crypt epithelial apoptosis	Increased (usually with <6 apoptotic bodies/ 10 crypts)	Increased (usually with >6 apoptotic bodies/ 10 crypts)	Increased with focal confluent apoptosis	Increased with focal confluent apoptosis
Architectural distortion	None to minimal	Mild	More prominent. Possible mild to moderate intimal arteritis	More prominent. Possible mild to moderate intimal arteritis
Mucosal ulceration	No	No	No	Yes

\*Changes insufficient for the diagnosis of mild acute rejection.

## 4. Results

### 4.1. Learning curve

- a) *Average surgical times* (Table 2): Curves were significantly descending throughout the study (Fig. 1). The success rate for the time or "learning curve" is shown in Fig. 2. From a total of 160 SBT performed by the same surgeon (March 2013–November 2014), 135 recipients recovered after the surgery: 73% from the first half of the procedures ( $n = 68$ ), 96% from the second ( $n = 77$ ); 52% were alive 24 h later ( $n = 83$ ): 17% from the first half ( $n = 14$ ), 86% from the second ( $n = 69$ ).
- b) *Type of transplant*: The first 95 transplants were orthotopic; 11 of them survived between 4 and 6 days with no treatment, although none of them could be sacrificed alive. Due to high mortality at the 3rd or 4th postoperative day when most of the rats had already survived >48 h after the transplant, we switched to the heterotopic model. Survival drastically improved: Thus, the last 65 SBTs were heterotopic, 50 of them (77%) survived  $\geq 6$  days and 46 (92%) were successfully euthanized at the scheduled day and included in the rejection study. Only 7 of the 15 not included were due to technical defaults (2 thrombosis, 5 bleeding).
- c) *Factors influencing survival*: Reasons for premature death in the orthotopic transplants were searched for: first, the accumulated expertise probably provoked a sudden change in survival at that moment; secondly, early underdiagnosed anastomotic stenosis or leaks could lead to sepsis and death; however, the autopsy of the 11 recipients who survived between 4 and 6 days after orthotopic

**Table 2**

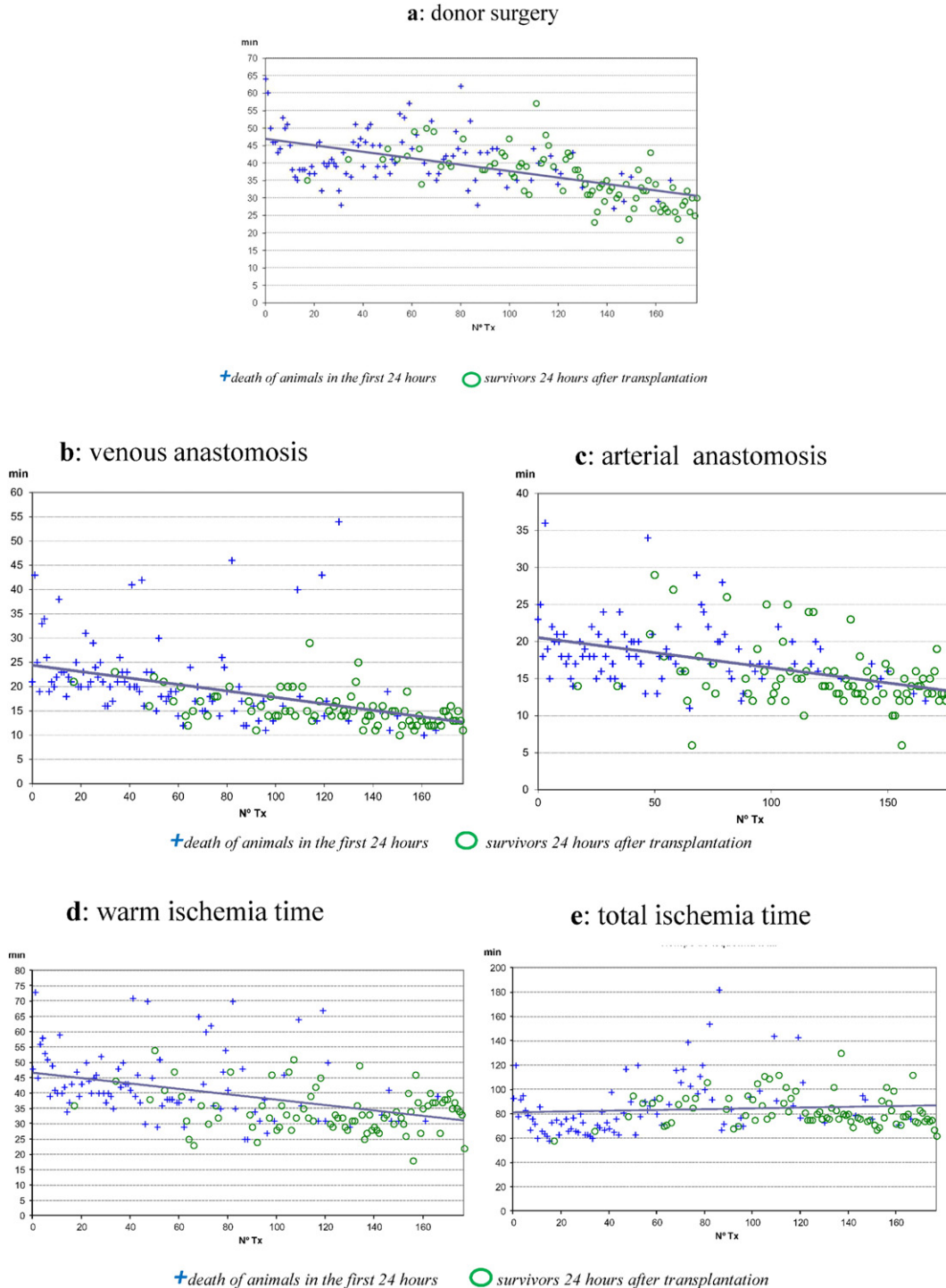
Average surgical times.

	Learning curve ( $n = 160$ )	Rejection study group ( $n = 50$ )
Donor surgery	38 $\pm$ 8 min	32 $\pm$ 6 min
Venous anastomosis	18 $\pm$ 6 min	15 $\pm$ 6 min
Arterial anastomosis	16 $\pm$ 4 min	14 $\pm$ 3 min
Warm ischemia	38 $\pm$ 9 min	35 $\pm$ 7 min
Recipient surgery	98 $\pm$ 20 min	86 $\pm$ 15 min
Total transplantation	152 $\pm$ 23 min	138 $\pm$ 20 min

SBT did not show leaks, but dilated or normal bowel, probably due to stenosis, although rejection could be beginning at that point. Third, other technical hurdles could be also responsible and should be taken account for future studies: to prevent paralytic ileus not flushing the bowel lumen too strongly, use better preservation solutions, such as UW, prophylactic antibiotics in order to prevent sepsis and starvation, ...These technical details seem to be crucial in the orthotopic model, although the microvilli damage, bacterial translocation... could also influence results in the heterotopic model and should also be taken into account

d) *Other considerations:* Other several factors were detected during the experiments and consequently modified:

I. *TAC treatment:* The first animals treated with TAC showed clinical sepsis and ongoing decline leading to death between the 5th and 7th POD after heterotopic SBT, which had not occurred with the first controls; this was attributed to immunosuppression, thus daily ceftriaxone was included in the protocol to prevent infection, with great success, given no sepsis recurred from this time forward.



**Fig. 1.** Learning curves related to the duration of the procedures: 1a: donor surgery; 1b: venous anastomosis; 1c: arterial anastomosis; 1d: warm ischemia time; 1e: total ischemia time; 1f: recipient surgery; 1g: total transplant surgery.

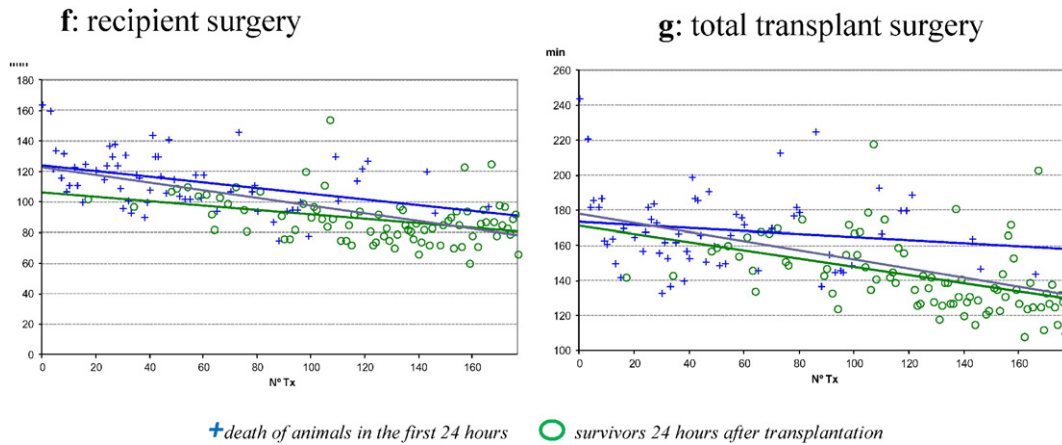


Fig. 1 (continued).

- II. *Intraoperative complications* are described in Table 3; these include anesthetic problems, such as emboli, hypovolemic shock and central apnea. These complications were overcome by infusing physiological saline subcutaneously (5 ml) before beginning the procedure, employing exhaustive hemorrhage control by pressing gently with a cotton swab at the anastomosis site, removing sevoflurane for several seconds and increasing oxygen flow to recover the respiratory reflex. Regarding the surgical technique, 13 donors were scored as “poor” because of bleeding or poor perfusion. Venous complications (bleeding, stenosis) predominated over arterial complications (bleeding, thrombosis), all leading to death.
- III. *Late complications (survivors > 24 h)*: These included arterial thrombosis, intestinal obstruction (in the orthotopic model), stoma problems with evisceration requiring surgery (in the heterotopic model) and clinical sepsis, confirmed in the autopsy (Table 3). The reason for death remained unknown in 18 cases, although it was most probably multifactorial, including bleeding, particularly during the first half of the procedures. Ostomy care prolonged survival in these long-term survivors when they began to develop rejection, with mucus obstruction and abdominal distension. A simple abdominal massage or opening the stoma with microforceps was effective to empty the mucus, preventing premature death secondary to abdominal distress and consequently respiratory distress.

#### 4.2. Rejection study group

##### 4.2.1. Small bowel transplantation

Fifty transplants were successfully performed with the heterotopic technique and included in the Rejection Study Group, obtaining an homogenous sample. Average surgical times were shorter than that of the entire database group (Table 2).

##### 4.2.2. Postoperative care and observation

Donor and recipient average weight just prior to transplant was  $253 \pm 23$  g and  $301 \pm 39$  g, respectively. All the recipients gained weight at 24 h (average 3 g) due to the saline injection during the surgery and to the additional graft placed in the abdomen. After the second day, the animals recovered their previous weight before transplant and began to lose weight (average 10 g/day) until the 5th or 6th day. After that, the animals stabilized and began to regain weight (average 3 g/day), and food intake was confirmed by the presence of well-formed feces in their cages. However, the recipients that started to develop rejection stopped regaining weight, lost fat and muscle mass and the abdominal circumference increased (Fig. 2). The stomas had a good appearance in most of the animals, except for 2 recipients, requiring new surgery due to stoma prolapse. Most of the animals expelled mucus through the stoma during the first week, during which those who developed rejection began to present abdominal distension and induration, which increased progressively throughout the following days

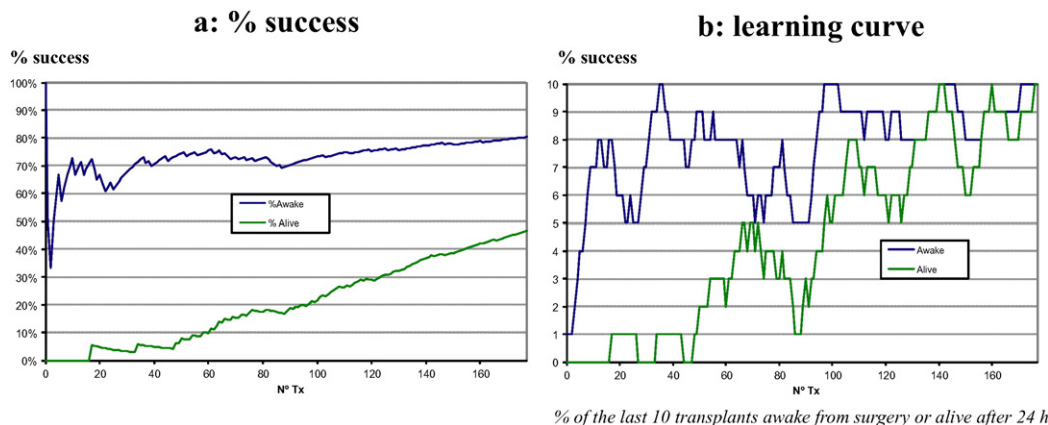


Fig. 2. Learning curves related to survival: 1a: success rate until the time of measurement; 1b: % of the last 10 transplants awake from surgery or alive after 24 h.

**Table 3**  
Surgical complications (intraoperative and after transplantation).

Intraoperative complications	
• Anesthetic: emboli, hypovolemic shock, central apnea	16
• Venous:	26
o bleeding	13
o stenosis, congestion, thrombosis	13
• Arterial:	19
o bleeding	13
o acute thrombosis	2
• Poor donor/poor reperfusion	13
Late complications	
• Arterial thrombosis	4
• Intestinal obstruction	4
• Stoma prolapse/evisceration	6
• Sepsis	9

until euthanasia, and it became necessary to empty the stoma by abdominal massage. This need was particularly evident in those groups without tacrolimus treatment, followed by those with tacrolimus treatment for only 5 days, and compared with those without tacrolimus. This last group had a normal abdomen throughout the observation time until euthanasia.

4.2.3. Euthanasia and macroscopic graft evaluation

All the animals were alive until euthanasia except 3 rats, which had just died a few minutes or hours before. Those with severe rejection had important abdominal distension preventing them from moving easily. No macroscopic abnormalities were observed in the remaining organs in any case, except for the graft, which showed varying degrees of rejection depending on each group, with important mesenteric involvement in the most severe cases. In group 1, the graft was dilated and full of mucus, with a normal or mildly thickened mesentery, strikingly different from a normal native intestine. In group 2, the graft presented severe fibrosis not allowing separation of the bowel loops, with a thickened mesentery, making it difficult to differentiate both tissues. The mucus appeared extraluminal in one case, secondary to a perforation in the setting of rejection. The spleen size of those animals with severe rejection was bigger than in those with normal grafts. The native bowel was normal in all cases. All the animals from groups 3 and 4

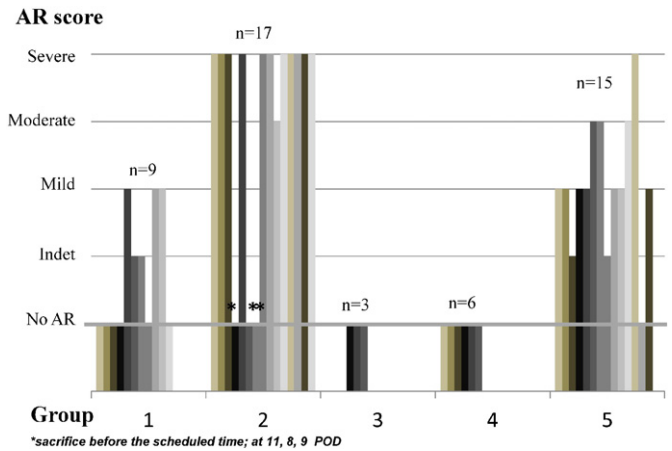


Fig. 4. Acute rejection score according to the Miami classification (n = 50).

appeared to be healthier than the rest, with a macroscopically normal graft (Fig. 3).

4.2.4. Histological study of the graft

a) Small bowel

Macroscopic appearance of the rejection correlated well with the histological score (Figs. 3 and 4). All the controls from group 1 showed indeterminate or mild AR—even no rejection in some cases—most with diffuse lymphocyte infiltration and minimal apoptosis, despite the severe dilation and the large amount of mucus in the bowel lumen. However, all the controls from group 2 showed severe AR with mucosal ulceration and distorted architecture, except for one recipient that developed only moderate rejection ( $p < 0.05$ ). Interestingly, 3 animals from this group were euthanized before time (POD 8, 9 and 11 after transplant), and none showed signs of acute rejection. Also note that the control animal that was sacrificed at 11 POD due to poor clinical status showed moderate rejection, so this might indicate when rejection progresses from moderate to severe.

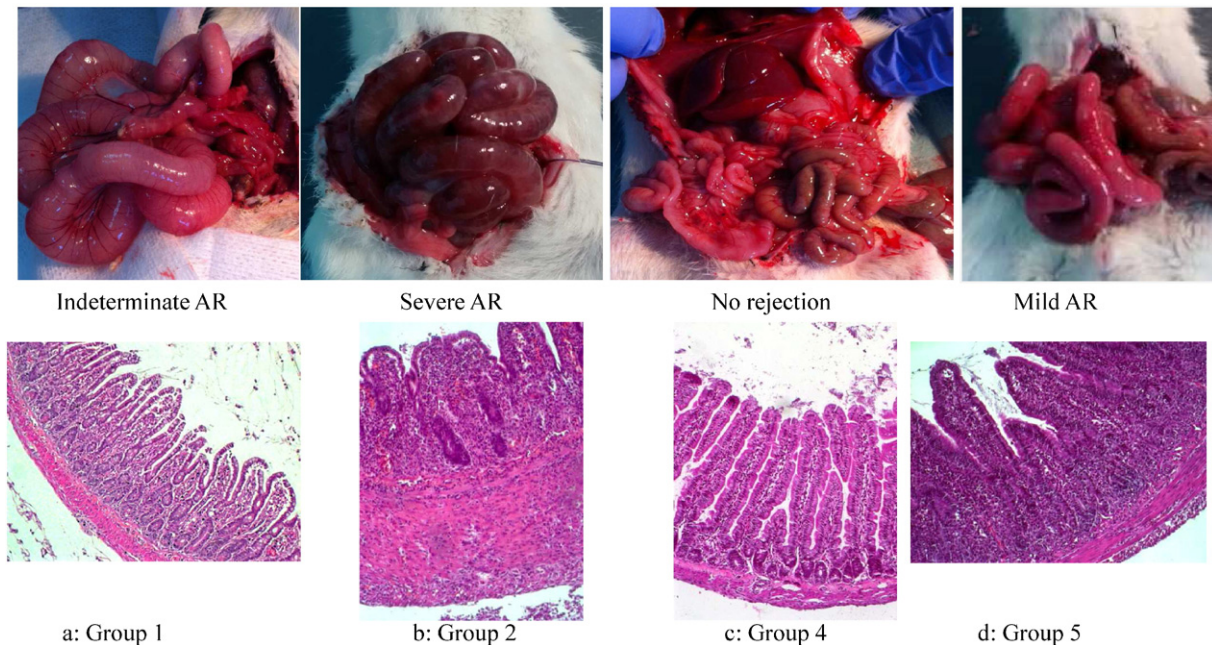


Fig. 3. Macroscopic and histologic graft appearance at euthanasia. 3a: ALLO Control\_7 (group 1); 3b: ALLO Control\_14 (group 2); 3c: Tacrolimus group (group 3 and 4); 3d: Tacrolimus short-course group (group 5), only 5 days.

All the animals from groups 3 and 4 showed a histologically normal graft. However, all those treated with TAC for a short time (group 5) developed mild rejection with >6 apoptotic bodies per 10 crypts. The degree of rejection ranged from indeterminate to moderate ( $p < 0.05$ ); one animal did not develop rejection at all. These small differences could be explained by variations among individuals with respect to the absorption of TAC. Animals were weighed daily to calculate the dose, and 1 ml syringes were used to minimize errors by making the dilution. Only one animal showed severe rejection and this was probably due to the venous congestion during the procedure, given the rat was bleeding through the stoma during the first postoperative days. The animal also required a new surgery, so the rejection score could have been overestimated.

#### b) Mesentery

Animals from groups 3 and 4 did not develop rejection and had normal nonreactive lymph nodes. Those groups with mild or indeterminate rejection showed mild inflammation and little fibrosis at the mesentery. With the advancing degree of rejection, these lymph nodes appeared microscopically more lymphocyte-depleted and were replaced by macrophages. Those with severe rejection were lymphocyte depleted, showing empty lymph nodes, with severe necrotizing enterocolitis and fibrosis.

## 5. Discussion

Small bowel transplantation has been one of the last organ transplants to be used in humans because of the risk of developing rejection due to its immunogenic characteristics. Schraut et al. were the first to publish the transition from the experimental to the clinical field [25]. Since the first successful clinical transplant in 1989, >5000 SBTs have been performed around the world [1,26,27].

Results improved with the introduction of TAC in the early 1990s, with more centers beginning to perform SBT, although still far from the success achieved with other solid organs [1,28–30]. Once the surgical technique and the patient selection improved, problems with SBTs are primarily immunological, such as rejection or graft-versus-host disease, among others [31,32]. When these complications appear, treatment is frequently empiric, beginning with steroids, but second and third therapeutic lines are often necessary, along with powerful immunosuppressants that sometimes do not achieve the necessary tolerance between graft and host [31,33–35]. This rejection leads to retransplantation and sometimes to death, with survival approximately 60% after 5–10 years [1,27,36]. Research studies in the clinical as well as in the experimental field are therefore crucial to understanding the mechanisms involved and for designing therapeutic strategies.

Experimental SBT was described several decades ago, but few surgeons have achieved prolonged survival [10]; thus, sample sizes are usually reduced, infrequently applicable, and conclusions are difficult to establish. Historic experimental SBT series were searched in this study, examining the technical aspects, postoperative care and strains; few studies were found explaining the multiple problem areas to enable successful SBT and shorten the learning curve.

In 1971, Monchick et al. were the first to describe the heterotopic SBT technique (HSBT) in rats [22]. Prior to this report and throughout the 1970s, we also find experimental studies on dogs [37–43]; however, the rat soon became the ideal animal for research due to obvious ethical and economic reasons [41,44,45]. Later in 1973, Kort et al. published the orthotopic model (OSBT) [44], which was later modified and simplified by Harmel et al. in 1984 [46]. From the 1980s, we found numerous papers contributing to advances in model development, primarily focused on diminishing the complexity of the procedure, improving surgical times and achieving higher success rates. Sonnino et al. described a simplified and shorter technique of HSBT in 1986, working only on a 15 cm

jejunal segment with no dissection of the other donor branches. Although they mentioned some of the surgical complications and tips such as slowly washing the bowel lumen, no further details are provided in the paper, including the rat strains. There was also a small sample, with only 8 survivors [14].

Two years later, Wallander et al. described the cuff method to simplify the heterotopic model, in which warm ischemia time was reduced [47]. Several articles from the Kobayashi group subsequently supported this technique for various models such as rejection [48]. Later, Nakao et al. made a comparison between the cuff method and the traditional method (hand-suture), in effect confirming a reduction in operation time, but also observing two remarkable limitations: the required recipient nephrectomy and the limited use for short segment SBT, given only 40 cm of the graft could be supported [49]. They also concluded that theirs was not the ideal technique for someone trying to develop microsurgical skills; however, use of this technique by others has resulted in useful liver and multivisceral transplantation, as observed in the orthotopic model. More recent publications have reported improved surgical times by performing the anastomoses to the renal vessels instead of the aorta and cava, with subtle modifications [4].

During the 1980s and 1990s, several studies emerged comparing portoportal with portacaval anastomosis, but no relevant differences were found; thus, experiments in rats using portoportal anastomosis, which is a more complex technique, have been reserved for specific objectives [19,50]. In our center, we traditionally opted for the complete and orthotopic hand-sutured SBT. The use of bipolar and improved microsurgical devices has significantly reduced surgical time compared with 20 years ago.

Regarding surgical and anesthetic complications, articles are scarce and would be useful for the beginner. In our study, we observed how most of the recipients began to survive from one point in the number of procedures performed, which should motivate researchers to persevere. We previously reported that the first transplant successfully performed in our center occurred after a median of 46 transplant procedures [7]. In 2007, Galvao also reported that only 5% of students were able to achieve survival, since it required the surgeon to have a considerable amount of training and perseverance [10]. Improvements in small details will likely be necessary before achieving a homogeneous model, which will require repeated and meticulously studied surgical and anesthetic maneuvers.

### 5.1. Heterotopic vs. orthotopic model

Some studies emerged in the 1990s comparing OSBT with HSBT [2]. Each has its advantages and disadvantages, and it is important to choose appropriately according to the purpose of the study [3,51]. In expert hands, there are no significant differences regarding transplant duration [52,53]; however, differences regarding timing and evolution of rejection must be kept in mind. In syngeneic combinations, all the recipients survived >60 days with intact grafts. The HSBT recipients survived longer after a fully allogeneic combination, despite developing severe rejection due to graft encapsulation. This evolution is different from OSBT, in which conditions such as intestinal obstruction and weight loss due to rejection led the controls to death.

Another advantage of HSBT over OSBT is the lack of intestinal anastomoses, in which complications are commonly observed. However, refinement of the surgical technique and other maneuvers, such as gently washing the lumen to prevent paralytic ileus, as well as the appropriate use of antibiotics can minimize these complications. The maintenance of the stomas, however, requires the recipients to be housed individually to prevent stoma cannibalism [52], as well as the removal of the mucous secretion from the transplanted intestinal lumen by irrigation to prevent excessive dilatation.

On the other hand, a disadvantage of HSBT is that the heterotopically transplanted graft is disconnected from the normal gastrointestinal transit displaying mucosal atrophy and severe changes in the microbiome

that can impact on the degree of intestinal wall inflammation and, also, rejection. It is known from IBD and transplant research that the mucosal immunity and inflammation is closely regulated by nutrients, commensals, enteric glia cells and other intraluminal trophic factors, and all these regulative mechanisms are bypassed in the heterotopically situation. A higher overgrowth of pathogens with bacterial translocations and sepsis in the heterotopic model has also been described [54]. However, intestinal permeability was described to be higher after HSBT than after OSBT by others, which would allow use of the model for several research purposes [51].

To date, HSBT has not been used to study early graft changes secondary to rejection [14]. In our experience, HSBT resulted in a valid and technically easier model, since long-term survival improved dramatically once we switched to HSBT at a time when most of the animals were already living at least 3 or 4 days after OSBT. Therefore, although the orthotopic model would be the ideal since it is more similar to human clinical practice, and should be attempted, the heterotopic one has also its advantages and at least the two methods can give complementing results about the molecular mechanisms of AR after SBT.

### 5.2. Preservation solution

Cold normal saline or Ringer Lactate (RL) have been the most typically used preservation solutions, probably due to economical advantages. Orloff et al., Li et al., Nakao et al. use normal saline in their models. On the contrary, studies from Pittsburgh have historically used RL often combined with neomycin sulphate solution. As RL seems to be the most widely accepted choice, we have traditionally used it in our center, with good results. However, Pech et al. and more studies from Germany, used UW satisfactorily in the orthotopic model, and it would be a good model to imitate, since this solution or similar is used in the human clinical setting, minimizing reperfusion injury and it will definitely impact results, particularly after OSBT.

### 5.3. Acute rejection

Many rejection studies emerged, coinciding with the first SBT in the clinical setting. During the era before TAC use, studies focused on the ideal cyclosporine (CsA) dose were performed by Lee et al. in isolated SBT [55] and later by Murase et al., who studied multivisceral grafts including the liver [56]. An interesting histological description of rejection can be found in the Murase study, particularly in the controls with no immunosuppression, as well as many references from the 1980s related to bowel rejection. Fishbein also described apoptosis in rat SBT [57].

The first evidence for the superiority of TAC over CsA dates back to the early 1990s; Lee et al. developed a rejection OSBT model with low-dose TAC [58–60], although results differ with later publications. Several studies regarding the ideal dose appeared at this time [61]. Murase et al. observed the ability of TAC to prevent rejection in liver transplantation, which developed spontaneous tolerance after a transient rejection crisis [62]; this was also described later by Thiede et al. using the same rat strains [63]. This tolerance was not as strong in heart transplants and was even less in SBT, independently of the rat strain, particularly when using low doses to reduce immunosuppression [62]. Meyer et al. described absence of rejection in liver/small bowel transplant using 1 and 2 mg/Kg/d of TAC, and 80% survival when using 0.5 mg/Kg for only the first 5 postoperative days; thus—and similarly to our research—this is the dose that was used for rejection studies [63].

Pech et al. from Germany published 3 studies between 2011 and 2012 using a BN-Lewis combination to develop AR after OSBT, similarly to studies from Pittsburgh, with the technique described previously by Schaefer. This group performed studies related to the intestinal muscularis and the relationship between dysmotility and immunological events [64–66]. We used the same score (0–3) to determine rejection

[24]. First, Pech et al. studied the effects of the immunosuppressive agents when AR appeared; they then studied the specific combination of TAC and infliximab to reduce the inflammatory response and dysmotility; finally, they studied the regeneration, residual function and immunological status after treating rejection [8,9,13]. We initially attempted to reproduce the Pech model in our experiments. Interestingly, they euthanized the control group at the 7th day to prevent extreme suffering of the rats after developing severe AR. Pech and Schaefer described the onset of AR from the 4th postoperative day, mild at that time, and severe from the 7th day. When we began to euthanize the recipients at the 7th day, however, we did not find relevant histological signs of AR, but minimal or insignificant changes. In addition, when they administered TAC 1 mg/kg/d for 14 days until euthanasia, with or without sirolimus, the autopsy showed indeterminate rejection; however, this finding was not observed by our pathologist using an even lower dose for 14 days, showing an absolutely normal bowel.

These differences might be explained by the fact that these studies used the orthotopic model compared with the heterotopic one that we ultimately used. However, this approach differs with prior articles from Nakao et al. [3], in which rejection appeared to occur earlier in the heterotopic model. Finally, in 2012, Hu et al. published the characteristics of chronic rejection (CR) using Lewis-BN rats as well, and they were similar to our findings [67]. Although this was a study related to donor-derived bone marrow transfusion and CR, the description of the findings in the controls helped us to develop our model because they also described mild AR observed in those controls that were euthanized at the 7th day, which became severe AR by the time they were euthanized at the 14th day and before starting to develop CR, as in our findings. However, it is remarkable in this study that they could keep the rats alive for months. In our experience, we observed that the animals with severe AR at the 14th day had poor clinical status, malnourishment, severe abdominal distension and induration, which did not allow them to breathe properly and makes it difficult to imagine that these animals could survive longer. Despite the results, the sample size in this study is again small and the conclusions are not significant.

### 5.4. Rat strain

It was difficult to determine which was the best strain to use to establish a useful AR model and the ideal moment to determine the typical histological features [67–72]. We initially used Wistar rats as recipients based on previous publications from our center (not directly related to rejection) [17,19–21]. Because we did not find signs of rejection at the 6th day, we changed to Lewis rats, based on the previously described models [8,9,13,73,74], and given the fully allogeneic BN-to-Lewis combination appears to be histoincompatible and rejection has been described as the dominant immunologic response either without or with immunosuppression [56,75]. BN rats have been reported to have “universal donor” qualities for unknown reasons. The most solid clue was evidence of a defect in the invariant chain of MHC class II molecules in this strain, which could lead to inefficient processing of donor antigens without necessarily implying immune abnormalities [76].

In 1994, Tanabe et al. studied the influence on intestinal transplant outcome of 12 donor-recipient combinations of 4 fully allogeneic rats (LEW, BN, August Copenhagen Irish [ACI] and Piebald Viro Glaxo [PVG]) [73,74]. Differences were only found in long-term survival depending on the strain and the duration and dose of FK-506. According to this study, if we had maintained the short-dose TAC longer in our study, we would have found CR, which is interesting for future studies. In all combinations, the untreated recipients died of rejection between 5 and 14 days, meaning that all could be useful for developing an AR model. In another study, Sheng Sun found graft loss between days 4 and 6 in controls when using a heterotopic model with ACI-Lewis rats to study the role of immature dendritic cells in preventing rejection; this again differs with our results, in which rejection at the 7th day was indeterminate [77].

Interestingly, several studies found that the Lewis-to-BN combination resulted in a useful graft-versus-host-disease (GVHD) model; here, Murase et al. explained the different immunologic reaction, describing the variations in lymphocyte populations for each strain, although they did not provide much more information. It is also important to consider the higher weight and strength of Lewis rats compared with BN rats of the same age, which are more labile and vulnerable, which is crucial to know when planning a difficult postoperative period. Based on previous studies, Ye et al. described a similar GVHD model with ACI-Lewis combination rats, although they also did not provide details [76,78–83].

### 5.5. Chronic rejection (CR)

Since the late 1960s, transplant models involving Lewis and Fisher 344 rats have been used to develop CR [84–87] because these strains differ at “weak histocompatibility loci” [5,12,88]. Further modification of these models by the use of short-term, low-dose CsA achieved the consistently reproducible vascular lesions typifying CR [89]. In 1990, Lee et al. developed a heterotopic model of CR, to compare TAC and CsA effects [59]. Orloff developed a reproducible HSBT model of CR in 1999 based on the work of White et al. [86], with excellent survival rates; she described the clinical features of AR in controls appearing after a median of 11 days after transplantation: progressive weight loss, decreased physical activity and graft induration; histologically, AR was characterized by apoptosis and mesenteric lymph node enlargement, probably representing lymphocyte expansion associated with mononuclear proliferation as part of the early immunological response in both AR and CR, similar to our findings despite the different rat strains [5,88]. However, differences with this F344-Lew combination were found in the long-term follow-up: although all the animals treated with low-dose CsA for 15 days showed histological CR (villous blunting, lamina propria fibrosis, mesenteric inflammation and fibrosis, epithelial cell apoptosis and lymphocyte depletion in the mesentery), only a few showed clinical and macroscopic signs of rejection, such as shrunken or scarred lymph nodes, whereas others gained weight and appeared healthy with no clinical signs of rejection at the predetermined endpoint of 120 days. In this study, Orloff emphasized the transplant vascular sclerosis, present in the majority of mesenteric vessels, as likely responsible for ultimate graft failure, and the importance of macrophages, CD4 and CD8+ cells in the development of CR.

## 6. Conclusion

In summary, numerous articles regarding rat SBT and rejection have been published in recent decades; however, most do not provide details about the model itself or the difficulties in achieving survival, which would be useful for the beginner. There are few studies to help make the learning curve shorter. The orthotopic model to study AR has been the rule, despite the lower sample size and higher technical difficulties, whereas the heterotopic model has been reserved to study CR. Various strains have been used, and the exact time when AR appears differs between authors. In this study, we developed a simpler unusual AR model for SBT using the heterotopic technique, with excellent survival rates, obtaining a wide spectrum of rejection scores depending on the dose and the sacrifice day. Therefore, although the orthotopic model would be the ideal since it is more similar to human clinical practice, and should be attempted, the heterotopic one has also its advantages and at least the two methods can provide complementing information about the molecular mechanisms of AR after SBT.

## References

- [1] K.M. Abu-Elmagd, et al., Long-term survival, nutritional autonomy, and quality of life after intestinal and multivisceral transplantation, *Ann. Surg.* 256 (3) (2012) 494–508.
- [2] A. Nakao, et al., Experimental models of rat small intestinal transplantation: cuff method and suture method, *Transplant. Proc.* 35 (1) (2003) 571–572.
- [3] A. Nakao, et al., Experimental models of small intestinal transplantation in rats: orthotopic versus heterotopic model, *Acta Med. Okayama* 56 (2) (2002) 69–74.
- [4] X.Q. Zhang, et al., Simplified techniques in rat heterotopic small bowel transplantation, *Transplant. Proc.* 38 (6) (2006) 1840–1841.
- [5] S.L. Orloff, et al., A rat small bowel transplant model of chronic rejection: histopathologic characteristics, *Transplantation* 68 (6) (1999) 766–779.
- [6] Y. Li, et al., Long-term comparison of rat model of chronic allograft rejection of orthotopic small bowel transplantation induced by cyclosporine versus tacrolimus, *Transplant. Proc.* 45 (5) (2013) 1811–1815.
- [7] S. Lopez-Fernandez, et al., Technical aspects of experimental intestinal transplant, *Cir. Pediatr.* 25 (2) (2012) 103–108.
- [8] T. Pech, et al., Combination therapy of tacrolimus and infliximab reduces inflammatory response and dysmotility in experimental small bowel transplantation in rats, *Transplantation* 93 (3) (2012) 249–256.
- [9] T. Pech, et al., Effects of immunosuppressive therapy after experimental small bowel transplantation in rats, *Transpl. Immunol.* 25 (2–3) (2011) 112–118.
- [10] F.H. Galvao, T. Bacchella, M. Cerqueira Machado, Teaching intestinal transplantation in the rat for medical student, *Microsurgery* 27 (4) (2007) 277–281.
- [11] F.H. Galvao, et al., Modified multivisceral transplantation in the rat, *Transplantation* 96 (2) (2013) e3–e4.
- [12] S.L. Orloff, et al., Tolerance induced by bone marrow chimerism prevents transplant vascular sclerosis in a rat model of small bowel transplant chronic rejection, *Transplantation* 69 (7) (2000) 1295–1303.
- [13] T. Pech, et al., Intestinal regeneration, residual function and immunological priming following rescue therapy after rat small bowel transplantation, *Am. J. Transplant.* 12 (Suppl. 4) (2012) S9–17.
- [14] R.E. Sonnino, et al., A modified technique for small-bowel transplantation in the rat, *J. Pediatr. Surg.* 21 (12) (1986) 1073–1077.
- [15] D.R. Waisberg, et al., Small bowel transplantation in outbred rats, *Acta Cir. Bras.* 26 (6) (2011) 496–502.
- [16] J. Wang, Y. Li, J. Li, Attenuation of rat chronic small bowel allograft rejection by *n*-3 polyunsaturated fatty acids is associated with reduced expression of graft IL-15, *Pediatr. Transplant.* 17 (6) (2013) 561–566.
- [17] Z. Wang, et al., Ischemic preconditioning of the graft for intestinal transplantation in rats, *Pediatr. Transplant.* 15 (1) (2011) 65–69.
- [18] R. Zhong, et al., The effect of donor-recipient strain combination on rejection and graft-versus-host disease after small bowel/liver transplantation in the rat, *Transplantation* 56 (2) (1993) 381–385.
- [19] F. Hernandez, et al., Is portal venous outflow better than systemic venous outflow in small bowel transplantation? Experimental study in syngeneic rats, *J. Pediatr. Surg.* 40 (2) (2005) 336–340.
- [20] Y. Zou, et al., Bacterial translocation in acute rejection after small bowel transplantation in rats, *Pediatr. Surg. Int.* 21 (3) (2005) 208–211.
- [21] Y. Zou, et al., Organ changes and bacterial translocation in a rat model of chronic rejection after small bowel transplantation, *Transplant. Proc.* 38 (5) (2006) 1569–1572.
- [22] G.J. Monchik, P.S. Russell, Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations, *Surgery* 70 (5) (1971) 693–702.
- [23] N. Toyama, et al., Small bowel transplantation in rats: endoscopic and histological evaluation of graft rejection, *Gastroenterol. Jpn.* 28 (2) (1993) 209–217.
- [24] T. Wu, et al., A schema for histologic grading of small intestine allograft acute rejection, *Transplantation* 75 (8) (2003) 1241–1248.
- [25] W.H. Schraut, Current status of small-bowel transplantation, *Gastroenterology* 94 (2) (1988) 525–538.
- [26] K.M. Abu-Elmagd, et al., Five hundred intestinal and multivisceral transplantations at a single center: major advances with new challenges, *Ann. Surg.* 250 (4) (2009) 567–581.
- [27] D. Grant, et al., Intestinal transplant registry report: global activity and trends, *Am. J. Transplant.* 15 (1) (2015) 210–219.
- [28] A.M. Andres Moreno, et al., Intestinal transplant: in what phase are we? *Cir. Pediatr.* 23 (3) (2010) 177–183.
- [29] D. Grant, Intestinal transplantation: 1997 report of the international registry. Intestinal transplant registry, *Transplantation* 67 (7) (1999) 1061–1064.
- [30] A. Langnas, et al., Intestinal transplantation at the University of Nebraska Medical Center: 1990 to 2001, *Transplant. Proc.* 34 (3) (2002) 958–960.
- [31] K.M. Abu-Elmagd, et al., Evolution of the immunosuppressive strategies for the intestinal and multivisceral recipients with special reference to allograft immunity and achievement of partial tolerance, *Transpl. Int.* 22 (1) (2009) 96–109.
- [32] G.V. Mazariegos, et al., Current status of pediatric intestinal failure, rehabilitation, and transplantation: summary of a colloquium, *Transplantation* 92 (11) (2011) 1173–1180.
- [33] A. Zeevi, et al., Monitoring immune function during tacrolimus tapering in small bowel transplant recipients, *Transpl. Immunol.* 15 (1) (2005) 17–24.
- [34] A. Nakao, et al., Chimerism and tolerance in rat recipients of intestinal allografts from ALS-treated donors with and without adjunct naive-donor-strain bone-marrow cells, *Transplantation* 75 (9) (2003) 1575–1581.
- [35] T.E. Starzl, et al., Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation, *Lancet* 361 (9368) (2003) 1502–1510.
- [36] K. Abu-Elmagd, et al., Clinical intestinal transplantation: a decade of experience at a single center, *Ann. Surg.* 234 (3) (2001) 404–416 (discussion 416–7).
- [37] K. Iwanami, et al., Long-term function and morphology of intestinal allografts in outbred canine transplantation model, *Transplant. Proc.* 34 (3) (2002) 994–995.
- [38] H. Fujiwara, S. Raju, J. Grogan, Cyclosporine absorption in total orthotopic small bowel transplantation in dogs, *Transplant. Proc.* 19 (1 Pt 2) (1987) 1125–1127.
- [39] H. Fujiwara, et al., Total orthotopic small bowel allotransplantation in the dog. Features of atypical rejection and graft-versus-host reaction, *Transplantation* 44 (6) (1987) 747–753.



- [40] H. Fujiwara, J.B. Grogan, S. Raju, Total orthotopic small bowel transplantation with cyclosporine, *Transplantation* 44 (4) (1987) 469–474.
- [41] U.G. Stauffer, et al., Transplantations of small intestines, *J. Pediatr. Surg.* 9 (1) (1974) 21–28.
- [42] G.N. Craddock, et al., Small bowel transplantation in the dog using cyclosporine, *Transplantation* 35 (4) (1983) 284–288.
- [43] A. Ferguson, D.M. Parrott, Histopathology and time course of rejection of allografts of mouse small intestine, *Transplantation* 15 (6) (1973) 546–554.
- [44] W.J. Kort, et al., Orthotopic total small bowel transplantation in the rat, *Eur. Surg. Res.* 5 (2) (1973) 81–89.
- [45] A. Thiede, E. Deltz, Morphological reaction in transplanted small intestines using immunogenetically defined rat strain combinations, *Langenbecks Arch. Chir.* 346 (2) (1978) 119–127.
- [46] R.P. Harmel Jr., A simplified technique of small intestinal transplantation in the rat, *J. Pediatr. Surg.* 19 (4) (1984) 400–403.
- [47] J. Wallander, et al., Small-bowel transplantation in the rat with a nonsuture cuff technique. Technical and immunological considerations, *Transpl. Int.* 1 (3) (1988) 135–139.
- [48] J. Fujishiro, et al., Immunologic benefits of longer graft in rat allogenic small bowel transplantation, *Transplantation* 79 (2) (2005) 190–195.
- [49] A. Nakao, et al., Rat small intestinal transplantation: a comparison of the cuff and hand-suture methods, *Acta Med. Okayama* 54 (6) (2000) 259–264.
- [50] P. Balaz, et al., Model of small bowel transplantation with systemic venous drainage in rats, *Ann. Transplant.* 8 (4) (2003) 36–38.
- [51] D. Grant, et al., A comparison of heterotopic and orthotopic intestinal transplantation in rats, *Transplantation* 51 (5) (1991) 948–954.
- [52] W.C. Preissner, E. Deltz, A. Thiede, Results of orthotopic small intestine transplantation in rats in the MHC and non-MHC different systems, *Z. Exp. Chir. Transplant. Kunstliche Organe* 19 (6) (1986) 370–372.
- [53] R. Zhong, et al., Refined technique for intestinal transplantation in the rat, *Microsurgery* 12 (4) (1991) 268–274.
- [54] B.A. Price, et al., The effect of rejection and graft-versus-host disease on small intestinal microflora and bacterial translocation after rat small bowel transplantation, *Transplantation* 56 (5) (1993) 1072–1076.
- [55] K.K. Lee, W.H. Schraut, Structure and function of orthotopic small bowel allografts in rats treated with cyclosporine, *Am. J. Surg.* 151 (1) (1986) 55–60.
- [56] N. Murase, et al., Rejection of multivisceral allografts in rats: a sequential analysis with comparison to isolated orthotopic small-bowel and liver grafts, *Surgery* 108 (5) (1990) 880–889.
- [57] T.M. Fishbein, et al., Increased apoptosis is specific for acute rejection in rat small bowel transplant, *J. Surg. Res.* 119 (1) (2004) 51–55.
- [58] A.L. Hoffman, et al., The effect of FK 506 on small intestine allotransplantation in the rat, *Transplant. Proc.* 22 (1) (1990) 76–77.
- [59] K.K. Lee, et al., Comparison of short-term immunosuppressive therapy with cyclosporine and FK 506 in small-bowel transplantation, *Transplant. Proc.* 22 (6) (1990) 2485–2486.
- [60] K.K. Lee, et al., Successful orthotopic small bowel transplantation with short-term FK 506 immunosuppressive therapy, *Transplant. Proc.* 22 (1) (1990) 78–79.
- [61] M.A. Nalesnik, et al., Toxicology of FK-506 in the Lewis rat, *Transplant. Proc.* 19 (5 Suppl. 6) (1987) 89–92.
- [62] N. Murase, et al., Induction of liver, heart, and multivisceral graft acceptance with a short course of FK 506, *Transplant. Proc.* 22 (1) (1990) 74–75.
- [63] D. Meyer, et al., Orthotopic liver/small bowel transplantation in rats: a microsurgical model inducing tolerance, *Microsurgery* 21 (4) (2001) 156–162.
- [64] N. Schaefer, et al., Inducible nitric oxide synthase expression in the intestinal muscularis mediates severe smooth muscle dysfunction during acute rejection in allogenic rodent small bowel transplantation, *J. Surg. Res.* 150 (2) (2008) 159–168.
- [65] N. Schaefer, et al., Acute rejection and the muscularis propria after intestinal transplantation: the alloresponse, inflammation, and smooth muscle function, *Transplantation* 85 (10) (2008) 1465–1475.
- [66] N. Schaefer, et al., Role of resident macrophages in the immunologic response and smooth muscle dysfunction during acute allograft rejection after intestinal transplantation, *Transpl. Int.* 21 (8) (2008) 778–791.
- [67] A. Hu, et al., Donor-derived bone marrow transfusion produces mixed chimerism and promotes a Th2 shift in Th1/Th2 balance in rat heterotopic small bowel transplantation, *Dig. Liver Dis.* 44 (12) (2012) 988–994.
- [68] J. Song, et al., Regulation of donor T cells in the tolerant rats to graft-versus-host disease by FTY720 following small bowel transplantation, *Transplant. Proc.* 38 (10) (2006) 3181–3183.
- [69] R. Olofsson, M. Oltean, M. Olausson, Intestinal preservation injury: a comparison between different rat strains, *Transplant. Proc.* 38 (6) (2006) 1789–1791.
- [70] J.J. Yang, et al., Interleukin-17 plays a critical role in the acute rejection of intestinal transplantation, *World J. Gastroenterol.* 19 (5) (2013) 682–691.
- [71] A. Klaus, et al., Histamine-degrading enzymes as cellular markers of acute small bowel allograft rejection, *Transpl. Int.* 16 (8) (2003) 474–479.
- [72] M. Navarro-Zorraquino, et al., Role of thymostimulin in activating rejection in an experimental small bowel allograft, *Transplant. Proc.* 28 (5) (1996) 2479–2481.
- [73] M. Tanabe, et al., The influence of donor and recipient strains in isolated small bowel transplantation in rats, *Transplant. Proc.* 26 (6) (1994) 3733–3740.
- [74] M. Tanabe, et al., Influence of donor-recipient strain combinations on immunologic responses after allogeneic rat small bowel transplantation, *Transplant. Proc.* 26 (3) (1994) 1569–1570.
- [75] N. Murase, et al., Long survival in rats after multivisceral versus isolated small-bowel allotransplantation under FK 506, *Surgery* 110 (1) (1991) 87–98.
- [76] N. Murase, et al., Graft-versus-host disease after brown Norway-to-Lewis and Lewis-to-Brown Norway rat intestinal transplantation under FK506, *Transplantation* 55 (1) (1993) 1–7.
- [77] D. Sheng Sun, et al., Prolonged survival of donor-specific rat intestinal allograft by administration of bone-marrow-derived immature dendritic cells, *Transpl. Immunol.* 14 (1) (2005) 17–20.
- [78] N. Murase, et al., Lymphocyte traffic and graft-versus-host disease after fully allogeneic small bowel transplantation, *Transplant. Proc.* 23 (6) (1991) 3246–3247.
- [79] F.H. Galvao, et al., Experimental animal model of graft-versus-host disease (GVHD) after small-bowel transplantation: characteristics of the model and application to developing treatment strategies, *Transplant. Proc.* 29 (1–2) (1997) 700.
- [80] R. Lull, et al., Chimerism, graft-vs-host disease, rejection, and their association with reciprocal donor-host immune reactions after cell, organ, and composite tissue transplantation, *Transplant. Proc.* 29 (1–2) (1997) 1203–1204.
- [81] F.H. Galvao, et al., Cytokine profile in graft-versus-host disease after small bowel transplantation, *Transplant. Proc.* 28 (5) (1996) 2455.
- [82] Q. Ye, et al., Persistence of donor cells and incidence of graft-versus-host disease after simultaneous small bowel and bone marrow transplantation, *Transplant. Proc.* 28 (5) (1996) 2453.
- [83] N. Murase, et al., Variable chimerism, graft-versus-host disease, and tolerance after different kinds of cell and whole organ transplantation from Lewis to brown Norway rats, *Transplantation* 60 (2) (1995) 158–171.
- [84] R. de Bruin, et al., Chronic rejection after small-bowel transplantation, *Transplant. Proc.* 27 (6) (1995) 3580.
- [85] J.M. Langrehr, et al., Clinical course, morphology, and treatment of chronically rejecting small bowel allografts, *Transplantation* 55 (2) (1993) 242–250.
- [86] E. White, W.H. Hildemann, Y. Mullen, Chronic kidney allograft reactions in rats, *Transplantation* 8 (5) (1969) 602–617.
- [87] P.F. Heckct, et al., Small bowel transplantation and chronic rejection alter rat intestinal smooth muscle structure and function, *Surgery* 114 (2) (1993) 449–456 (discussion 456–7).
- [88] M.S. Orloff, et al., Induction of specific tolerance to small-bowel allografts, *Surgery* 116 (2) (1994) 222–228.
- [89] D.H. Adams, et al., Experimental graft arteriosclerosis. I. The Lewis-to-F-344 allograft model, *Transplantation* 53 (5) (1992) 1115–1119.

## Research Article

# Small bowel transplantation in rats, a multicenter experience summarizing the pitfalls to be overcome

Pablo Stringa<sup>1,2,3\*</sup>, Ane M. Andrés Moreno<sup>4#</sup>, Natalia Lausada<sup>2</sup>, Cristina Pastor Oliver<sup>5</sup>, Juan C. Abate<sup>2</sup>, Leandro Vecchio<sup>2</sup>, Martin Rumbo<sup>3</sup>, Marta Navarro Zorraquino<sup>5</sup>, Francisco Hernández Oliveros<sup>4</sup>, and Gabriel Gondolesi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Translational Medicine Institute, Transplantation and Bioengineering (IMeTTyB), Favaloro University-CONICET, Argentina

<sup>2</sup>Organ and Tissue Transplant Laboratory, Medical Sciences School, National University of La Plata, Buenos Aires, Argentina

<sup>3</sup>Immunology and Pathophysiology Studies Institute, La Plata, Argentina

<sup>4</sup>Pediatric Surgery Department, La Paz University Hospital, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Biomedical Research Center from Aragón, Zaragoza, Spain

\*Contributed equally to the work

## Abstract

Small Bowel transplantation in rats is a highly complex microsurgical procedure because several technical complications may lead to recipient mortality and transplant failure. Our aim is to report the most common complications associated with orthotopic and heterotopic intestinal transplantation in rats in order to identify the “pitfalls” of the procedure and prevent them. A retrospective multicenter study was performed. All participant centers have established rodent transplant procedures and trained surgeons. Two hundred ninety-three complications from 264 unsuccessful intestinal transplants were reported, representing an overall failure rate of 15% of the procedures performed. Recipient complications were most frequent than donor (257 *vs.* 36  $p < 0.0001$ ). Excessive surgical time (11/36); severe hemorrhage (12/36) and inappropriate infusion of the preservation solution in the intestinal graft (11/36) were the most common donor complications. Arterial anastomosis bleeding (50/257), venous anastomosis bleeding (35/257) and portal vein stenosis (26/257) were the most common intraoperative complications in the recipient.

To maximize success rate, surgeons should optimize time and avoid bleeding during graft dissection in the donor surgery. After performing a bloodless vascular anastomosis an adequate post-operative management of the animal is mandatory to guarantee survival.

## Introduction

Since Monchik and Rusell first described the technique to perform small bowel transplantation (SBTx) in rats, it has become one of the most commonly used in experimental models [1]. In general terms, it is used to study intestinal ischemia-reperfusion injury, graft rejection and assess immunosuppressive therapies [2-4]. SBTx in rats is a feasible, replicable and inexpensive procedure when compared to large animals models [5].

In spite of these advantages, SBTx in rats is a highly complex microsurgical procedure. Several technical complications and non-optimized animal care may lead to recipient mortality and transplant failure [6]. Therefore, surgeons should be trained not only in microsurgery but also in both pre and post-transplant management of the rodents to achieve prolonged recipient survival.

The difficulties to succeed in this challenging procedure urged the design of different surgical techniques; considering how the engraftment is performed in relation to the native organs, intestinal transplantation (ITx) may be performed orthotopically or heterotopically when the graft is placed in the anatomical location of the native organ removed during the surgery or if it is placed in a non-native location, respectively [7]. Orthotopic intestinal transplantation (OITx) is the approach of choice for physiological SBTx studies, and it may be performed in one step (as reported by Kort *et al.*) or, as described by Deltz and Thiede, in two surgical stages [8-10]. In the two-stage OITx, the intestinal graft is first placed in a heterotopic position, and then anastomosed

to the recipient's naïve intestine three weeks after the first procedure. Heterotopic intestinal transplantation (HITx) is the best option to obtain successive samples of the graft, and have permanent access to the transplanted intestine lumen [11].

Other differences in experimental SBTx models are based on the vascular anastomosis. Although the hand-sewn vascular anastomosis is the most frequently reported, other techniques were developed in order to shorten warm ischemia time. In general terms, these techniques replace the sutures for cuffs [12,13]. In addition, improvements in terms of anesthesia, analgesia, pre and post-surgical care, proper handling of animal environment, recipient end-point application, among others have contributed to better outcomes [14].

Despite the different reported ITx techniques and the improvement in rat handling, SBTx remains a challenging procedure and many complications may lead to failure. The manuscript published along with the development of this technique reports clearly the measures taken for a successful procedure, as well as some of the complications during the learning curve. However, to the best of our knowledge,

**Correspondence to:** Stringa P, Immunology and Pathophysiology Studies Institute, La Plata, Argentina, E-mail: pablo\_stringa@hotmail.com

**Key words:** intestinal transplantation, surgical complications, rats, microsurgery

**Received:** December 05, 2016; **Accepted:** December 20, 2016; **Published:** December 26, 2016

very few manuscripts have focused on the complications that lead to procedure failure once learning curve has been completed. In order to identify the most common complications and provide a useful guide for surgeons or researchers wanting to perform SBTx in rats, we have retrieved information from four centers where expert microsurgions have performed the procedure on a regular basis.

## Materials and methods

This is a retrospective study performed by 4 active microsurgical research laboratories (Multiorgan Transplant Institute, Argentina; Organ and Tissue Transplant Laboratory, Argentina; La Paz University Hospital, Spain and Biomedical Research Center from Aragón, Spain) with extensive experience in experimental microsurgery and microsurgical SBTx techniques [10,15,16-20].

All animal experiments were performed according to guidelines set by USPHS and/or European Union policy (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, and/or European Union Directive for Animal Experiments 2010/63/EU).

In all cases, OITx and HITx procedures were performed identically by all participant surgeons in the four participating centers. The graft was obtained following the same surgical steps in OITx and HITx procedures. Briefly, a median laparotomy was performed and the small bowel from the Treitz to 3 cm from the ileocecal valve was dissected. Ileocecolic, colic and duodenal vessels, pyloric vein, splenic vein and celiac trunk were transected to prepare a graft vascular pedicle consisting of superior mesenteric artery and portal vein. Finally, infrarenal aorta was cannulated and the graft was perfused with 5-7 ml of cold Ringer Lactate.

In the recipient surgery, engraftment by end-to-side arterial and vein anastomosis was performed. In HITx, the graft was externalized by two ostomies on the recipient right flank. On the other hand, after a recipient enterectomy, reperfused graft was incorporated to the recipient gastrointestinal tract by two end-to-end intestinal anastomosis.

A common database was designed. The information requested included: donor surgery time, use of bipolar coagulator or ties for intestinal donor dissection, anesthetic protocol (donor and recipient), type of preservation solution, description of donor surgery complications, graft use (if transplanted or not), cold and warm ischemia times, suture material, type of SBTx (OITx or HITx), recipient complications and outcome from the intrasurgical stage to 5th post-transplant day.

Data were reported from procedures that fulfilled the following conditions:

- 1- Unsuccessful SBTx procedures, defined as non-accepted graft for transplant, intraoperative recipient death and recipient sacrifice or death within the first 5 post-transplant days.
- 2- Unsuccessful SBTx procedures performed in an experimental context were considered. No practice procedures developed during surgeon's learning curve were reported.
- 3- Isolated ITx (graft should include Jejunum-Ileum).
- 4- Transplanted intestines were preserved in Ringer Lactate at 4°C. Cold ischemia time should not be longer than 90 minutes.
- 5- Engraftments were performed in one stage, HITx and OITx's performed by hand-sewn end-to-side arterial (donor superior

mesenteric artery with recipient infrarenal aorta) and vein (donor portal vein (PV) with recipient infrarenal vena cava) anastomosis with 8-0 or 9-0 monofilament Nylon. All the procedures were performed under microscopic magnification (6, 10 and 26X). Also, ostomies in HITx and intestinal anastomosis in OITx procedures were performed with 7-0 monofilament nylon.

6- Inhalation anesthesia (2% Isoflurane or 4% Sevoflurane for intrasurgical maintenance) was used for donors and recipient procedures. Moreover, post-transplant antibiotic and analgesics were administered to the recipient.

SBTx procedure data not meeting these criteria were not included in the database.

The eight microsurgions who participated in the study were all high proficient in performing experimental transplantation. They all received basic training in microsurgery and specific-intensive training in rats SBTx, achieving successful results regarding graft and recipient survival. We only included data provided by surgeons who currently achieve more than 70% recipient survival. Also, these surgeons participate actively and regularly in experimental protocols that involve OITx and HITx in rats.

*Statistics:* Continuous variables were analyzed using T-Test (GraphPad software version 5.00, San Diego, Calif, United States). Discrete variables were analyzed using z-Test (website <http://epitools.ausvet.com.au/>).

## Results

Considering all the participating institutions, the current global average of recipient prolonged survival (more than 5 days after surgery) is 85%. From 2007 to 2015, 293 complications from 264 unsuccessful ITx procedures were reported (Figure 1) with an average of 1.1 complications / surgery. Considering the different stages in a transplant procedure, 12.3% of the complications occurred in the donor, while 87.7 % occurred in the SBTx recipient.

### Complications observed during the donor operation or procurement

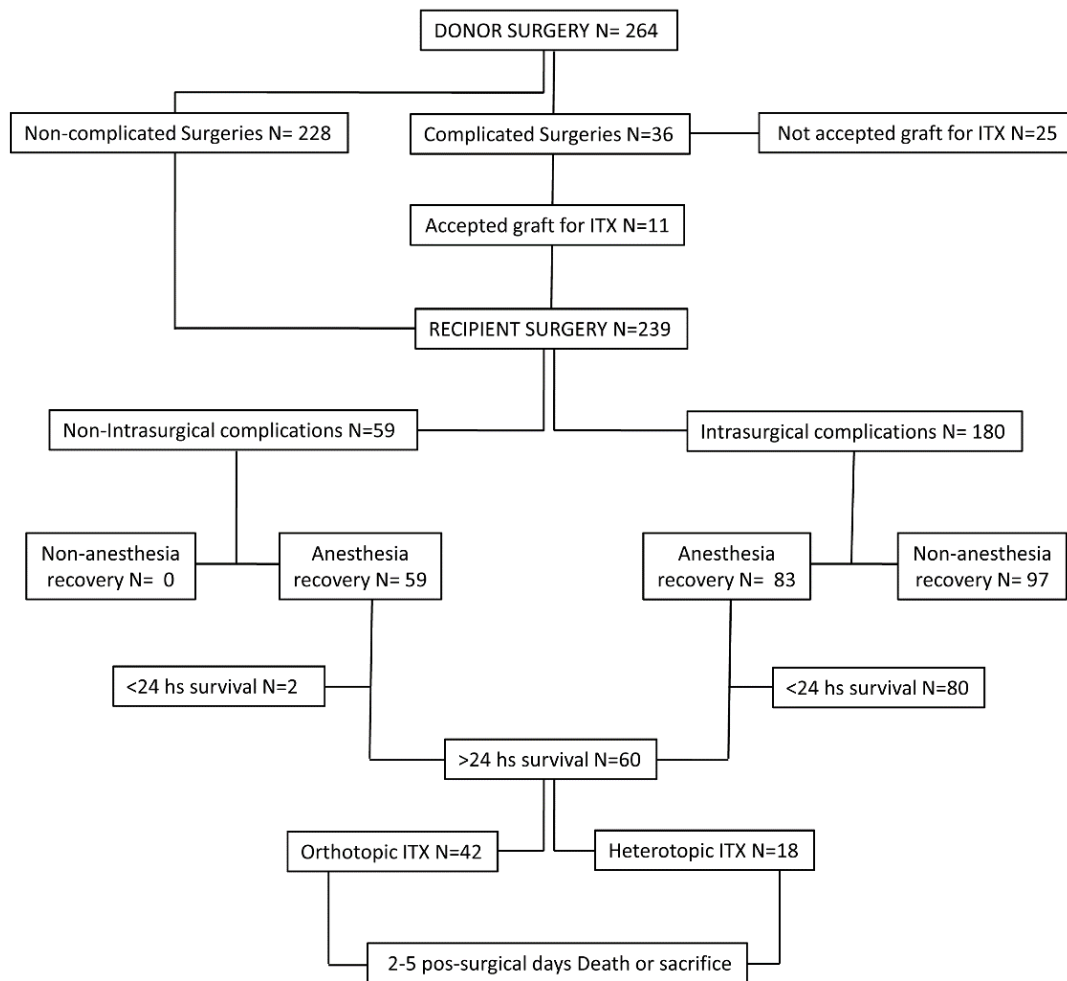
As for the recovery procedure in the donor, excessive surgical time (more than 60 minutes) (11/36); severe hemorrhage, defined as loss of 20% of the volemia approximately, (12/36) and inappropriate infusion of the preservation solution in the intestinal graft (11/36) were the 3 most common complications (Figure 2-A).

When severe hemorrhage occurs the transplant procedure must be stopped. A detailed study of severe donor-bleeding showed that PV and splenic vein bleeding were the most frequent cause to stop the procedure (Figure 2-B).

As for donor surgical time, significant differences regarding the use of ties or bipolar coagulator for graft dissection were observed (Figure 2-C.1). Moreover, one procedure performed with bipolar coagulator was excluded due to excessive surgical time (Figure 2-C.2). Inappropriate infusion of the preservation solution was considered as a remnant of blood in the graft after washing. In all cases, this complication was managed during cold storage by further graft perfusion, and intestinal grafts were accepted for transplant.

### Recipient complications observed during and after surgery

Two hundred and fifty-seven complications leading to SBTx failures were reported. Arterial anastomosis bleeding (50/257),



**Figure 1.** Algorithm showing unsuccessful SBTx procedures included in the analysis.

venous anastomosis bleeding (35/257) and PV stenosis (26/257) were the most common complications (Figure 3A). AA and VA bleeding is considered when hemorrhage is not controlled by compression maneuvers with swabs. Therefore, a new vascular clamping and extra sutures are needed [10].

Considering the stage when the complication occurred, 77% were intra operative and 23% were observed in the post-surgical period (from anesthesia recovery to 5 post-transplant day) (Figure 3B). Intraoperative complications were related to recipient's death within the first post-surgical day. Only 1.66% of the animals in 180 complicated procedures achieved more than 24 hour- survival after surgery (Figure 3C).

Other reported complications were PV thrombosis, inadequate graft reperfusion (graft abnormal and heterogeneous color), intrasurgical cardiopulmonary arrest (CPA), wrong clamping of VC and aorta, excessive for vascular anastomosis (more than 40 minutes), arterial anastomosis stenosis, PV rotation, severe hemorrhage during VC and aorta dissection, SMA irreversible damage during AA and embolism at reperfusion time (Figure 4).

After recovery from anesthesia, several low incidence complications (less than 10 times) were reported in the recipient. In this period,

HITx and OITx complications were discriminated. Regarding HITx, graft prolapse was the most common complication. Moreover, severe diarrhea with weight loss was the most common OITx observed complication. In both cases the end-point was applied and animals were sacrificed.

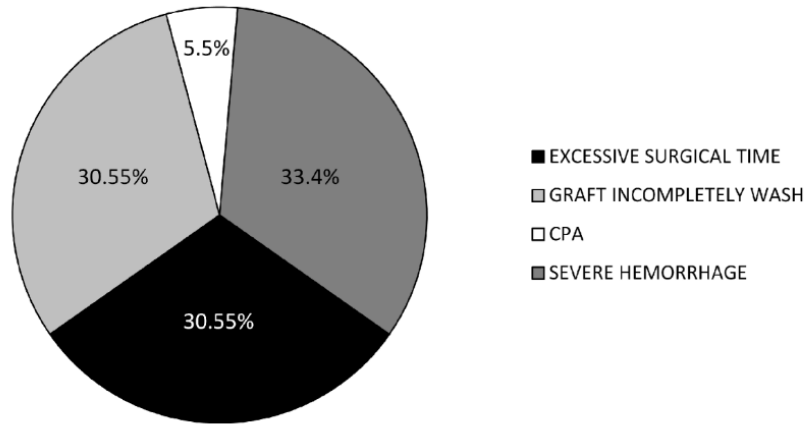
The cause of death (15/257) could not be determined in several cases, i.e. recipients that died during the post-surgical period without failures reported until death and no abnormalities observed during necropsy. This was reported as a common post-surgical complication, and might be associated with an inadequate post surgical intensive care of the animal.

Regarding deaths or sacrifices occurred between the 2nd and 5th pos-SBTx days, most of OITx and HITx recipients died on the 2nd (HITx 7/18 and OITx 16/42) or 5th (HITx 6/18 and OITx 12/42) post-transplant day. On the last day considered for this study, graft prolapsed in HITx recipients and severe diarrhea with weight loss (more than 20%) in OITx recipients were the most common complications reported (Table 1).

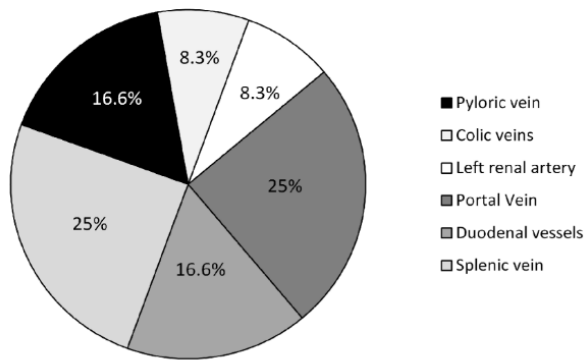
## Discussion

SBTx in rats represents a complex procedure that requires training in microsurgery and good handling of rodents to obtain prolonged

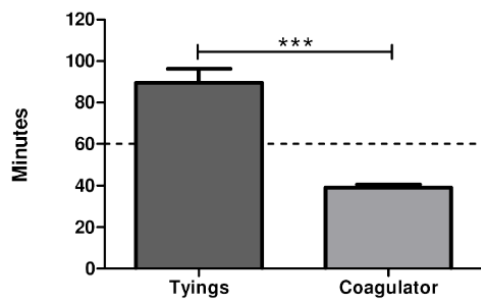
2-A



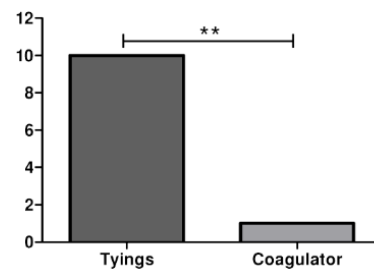
2-B



2-C.1

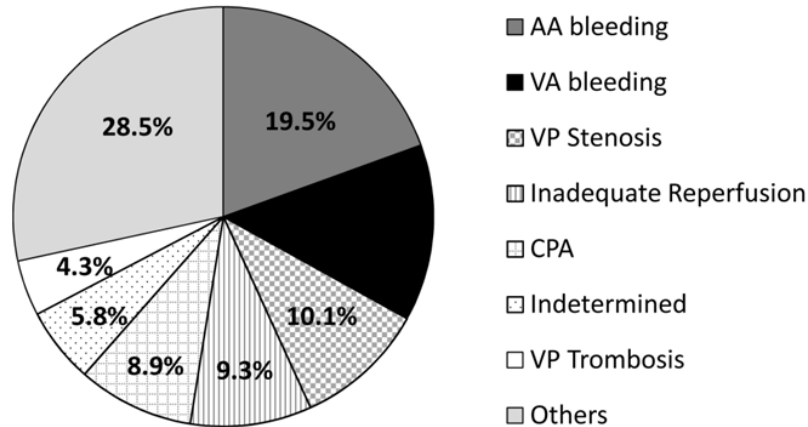


2-C.2

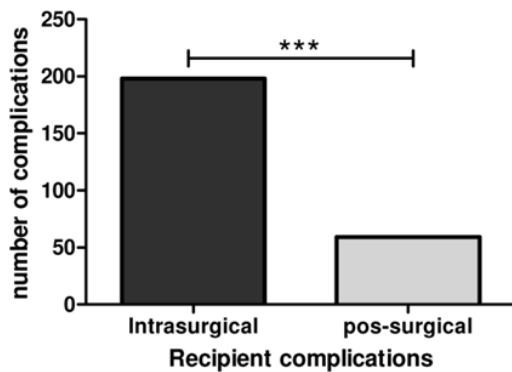


**Figure 2.** 2-A: Donor surgery complications. 2-B: Most frequent sites of bleeding. 2-C-1: Time used for donor surgical procedure depending on the use of tyings or coagulator. Statistically significant differences were observed ( $p < 0.0001$  T-test). 2-C-2: Number of cases of excessive surgical time depending on the use of coagulator or tyings ( $P < 0.0005$  z-test to compare sample proportion).

3-A



3-B



3-C

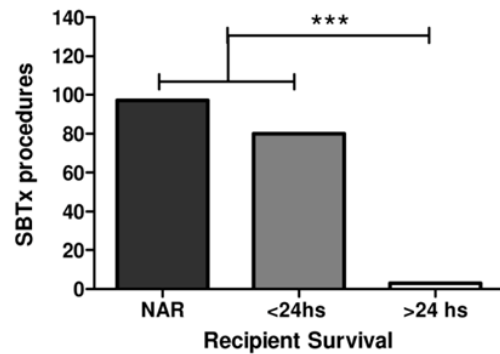


Figure 3. 3-A: distribution of recipient complications 3-B: Number of Intra and post-surgical complications reported ( $P<0.0001$  z-test to compare sample proportion). 3-C: Recipient first 24 post-operative hours survival after an intra-surgical complication (NAR= no anesthetic recovery) ( $P<0.0001$  z-test).

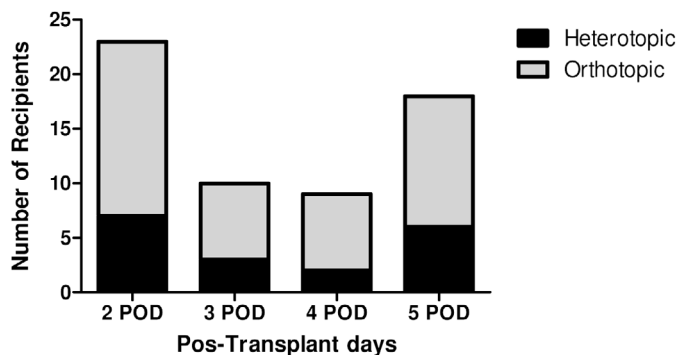


Figure 4. Time distribution of OITx or HITx recipient sacrifice or post-transplant death. Most of deaths and sacrifices on both ITx types occurred in the 2nd or 5th post-operative day.

survival, because many complications may lead to an unsuccessful procedure [21,22]. The learning curve of SBTx in rats was well described, and some experimental centers have reported their single experiences related to SBTx complications and long-term recipient survival [10,23]. However, this is the first multicenter study focusing on unsuccessful SBTx cases, detailing the intra and post-surgical complications that

may occur during OITx and HITx procedures, accounting for 15% of the total number of SBTx performed. All centers that participate in the study follow the same technical procedures and all transplantations included were performed by specialist microsurgeons that received extensive training. The number of procedures performed in each center was equivalent; consequently we consider that no bias depending on differences on techniques, training or technical skills of the personnel participating in the study affected the data.

Donor complications are less common, and procurement is as difficult as engraftment. Among the most frequent complications, excessive surgical time was one of the most common causes leading to failure of the procedure. It has been reported that donor surgical time is important because it can directly impact on the graft quality (more time, less graft quality). For this reason it is recommended to discard the grafts obtained from prolonged surgeries. As shown in the results section (Figure 2C.1), the use of bipolar coagulator significantly improves this stage of the transplant. Donor bleeding becomes the most common complication reported during the procurement; 85 % of the cases of donor bleeding occurred during PV dissection (PV, splenic, pyloric and duodenal veins hemorrhage were reported). Considering these results, we may conclude that PV isolation is a critical step to be

**Table 1.** Low-incidence complications in the recipient.

Complication	Incidence	Type of ITX	Stage
Severe diarrhea and weight loss	8/257 3.11%	OM(	Pos-surgical
Wrong clamping of VC and Aorta	7/257 2.72%	OITX-HITX	Intrasurgical
Excessive time for vascular anastomosis	7/257 2.72%	OITX-HITX	Intrasurgical
Graft Prolapse	6/257 2.33%	HITX	Pos-surgical
Graft Ischemia	4/257 1.55%	OITX-HITX	Intrasurgical
AA stenosis	4/257 1.55%	OITX-HITX	Intrasurgical
Hypovolemia	4/257 1.55%	HITX	Pos-surgical
Graft obstruction	4/257 1.55%	OITX	Pos-surgical
Volvulus	3/257 1.16%	OITX	Pos-surgical
Abdominal hemorrhage	3/257 1.16%	OITX-HITX	Pos-surgical
Dyspnea/lung edema	3/257 1.16%	OITX	Pos-surgical
Peritonitis	3/257 1.16%	OITX-HITX	Pos-surgical
Enteroanastomotic Dehiscence	2/257 0.76%	OITX	Pos-surgical
Donor-recipient size disproportion	2/257 0.76%	OITX-HITX	Intrasurgical
Hypothermia	2/257 0.76%	OITX-HITX	Pos-surgical
Paralysis of hind limbs	2/257 0.76%	OITX-HM(	Pos-surgical
VP rotation in VA	2/257 0.76%	OITX-HM(	Intrasurgical
Intra-abdominal abscess	2/257 0.76%	OITX-HITX	Pos-surgical
Graft intraluminal hemorrhage	1/257 0.38%	OITX	Pos-surgical
Graft intussusception	1/257 0.38%	max	Intrasurgical
Hemorrhage during VC-Aorta dissection	1/257 0.38%	HITX	Intrasurgical
SMA irreversible damage during AA	1/257 0.38%	HITX	Intrasurgical
Air embolism during graft repedusion	1/257 0.38%	HM(	Intrasurgical

especially attentive during the donor surgery.

Inappropriate infusion of the preservation solution in the graft was reported as a possible complication during the second donor surgical stage. However, this is a reversible complication and the remaining graft blood may be removed with a slow and delicate additional intravascular wash with 5 ml of preservation solution administered in approximately 30 seconds during cold storage. This maneuver may be performed manually with a syringe and a catheter 24 G inserted into SMA.

In agreement with Lee *et al.*, arterial anastomosis bleeding was the most common intra-operative complication in the recipient [5]. A successful vascular anastomosis is achieved following the microsurgery principles recommended by Guity *et al.* [24]. Despite hand-sewn sutures remains the most widely use, alternative methods to reduce complications associated with vascular anastomosis such as the 3-cuff technique was developed and published [12]. This technique replaces the traditional hand-sewn approach by the use of synthetic sleeves in order to reduce surgery time in the recipient [25,26].

Considering the common stages shared by OITx and HITx procedures before reperfusion, complications related to the type of SBTx were considered separately. Weight loss and diarrhea were the most characteristic post-operative complication in OITx, indicating that post-surgical feeding of the recipient is a critical aspect in this type of procedure. Our experience suggests that post-surgical feeding is very important for a good OITx recipient recovery. During the 1st 12 post-ITx hours a liquid diet (Dextrose) should be administered and no solid food should be given. Twelve hours after surgery, a waste-free, protein-rich diet was introduced. Finally, recipients return to their commercial standardized food on the 3rd post-transplant day.

In the case of HITx, ostomy prolapse was a post-surgical complication, outlining the importance of ostomy care in HITx. Daily

cleaning of stomas to remove secretions and proper pain management are good practices to avoid graft prolapse. It is also very important to check the color and appearance of ostomies periodically. Our experience suggests that the use of tramadol (20 mg/kg every 12 hours during the first 72 post-ITx hours) is appropriate for the management of post-surgical pain, avoiding stress related death.

Post-surgical and intensive care monitoring of rodents is not as frequent as in large experimental animals or humans. For this reason, some clinical signs and metabolic abnormalities in the SBTx recipient after surgery were not recorded. Therefore, as reported in the results, death from indeterminate cause was frequently observed during post-surgical stage. Implementing better care or performing basic laboratory testing during the post-transplant period might identify the causes of death.

In summary, several causes of unsuccessful SBTx were reported, that proves that SBTx in rats requires a fine surgical technique as well as careful post transplant care. A single complication may lead to failure. To obtain an acceptable survival rate, surgeons should consider the following: minimize operating time and bleeding during graft dissection in the donor surgery; a bloodless microsurgical technique to perform AA and VA is imperative considering that vascular anastomosis represents the key point to success. Finally, an adequate post-operative management of the animal is mandatory to guarantee survival after this challenging surgical procedure. To identify which complications can be early reversed without affecting the aim of the experiment are mandatory in order not to have any confounding factor in the result. We expect that results reported here may become a useful guide to maximize success rate in experimental SBTx.

## References

1. Monchik GJ, Russell PS (1971) Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery* 70: 693-702. [[Crossref](#)]

2. Pech T, von Websky M, Ohsawa I, Kitamura K, Praktijnjo M, et al. (2012) Intestinal regeneration, residual function and immunological priming following rescue therapy after rat small bowel transplantation. *Am J Transplant* 12 Suppl 4: S9-17. [[Crossref](#)]
3. Oltean M, Joshi M, Herlenius G, Olausson M (2010) Improved intestinal preservation using an intraluminal macromolecular solution: evidence from a rat model. *Transplantation* 89: 285-290. [[Crossref](#)]
4. Oltean M, Pullerits R, Zhu C, Blomgren K, Hallberg EC, Olausson M (2007) Donor pretreatment with FK506 reduces reperfusion injury and accelerates intestinal graft recovery in rats. *Surgery* 141: 667-77.
5. Lee AD, Gama-Rodrigues J, Galvao FH, Waitzberg DL (2002) Study of morbidity in orthotopic small intestine transplantation with Wistar rats. Experimental study. *Arquivos de gastroenterologia* 39: 39-47. [[Crossref](#)]
6. Zhong R, Grant D, Sutherland F, Wang PZ, Chen HF, et al. (1991) Refined technique for intestinal transplantation in the rat. *Microsurgery* 12: 268-274. [[Crossref](#)]
7. Nakao A, Tahara K, Inoue S, Tanaka N, Kobayashi E (2002) Experimental models of small intestinal transplantation in rats: orthotopic versus heterotopic model. *Acta medica Okayama* 56: 69-74.
8. Kort WJ, Westbroek DL, MacDicken I, Lameijer LD (1973) Orthotopic total small bowel transplantation in the rat. *Eur Surg Res* 5: 81-9. [[Crossref](#)]
9. Schroeder P, Deltz E, Seifert J, Sandforth F, Thiede A (1987) Absorptive capacity of the transplanted small bowel. *Gut* 28 Suppl: 275-279. [[Crossref](#)]
10. Lopez-Fernandez S, Hernandez F, Hernandez-Martin S, Barrena S, Wang Z, et al. (2012) Technical aspects of experimental intestinal transplant. *Cirurgia pediatrica* 25: 103-8.
11. Grant D, Zhong R, Hurlbut D, Garcia B, Chen HF, et al. (1991) A comparison of heterotopic and orthotopic intestinal transplantation in rats. *Transplantation* 51: 948-954. [[Crossref](#)]
12. Wallander J, Holtz A, Larsson E, Gerdin B, Lackgren G, et al. (1988) Small-bowel transplantation in the rat with a nonsuture cuff technique. Technical and immunological considerations. *Transplant International* 1: 135-139.
13. Waisberg DR, Galvao FH, De Castro Galvao R, Chaib E, D'Albuquerque LA (2011) Intestinal transplantation using cuff-glue sutureless technique for microanastomosis in rats. *Microsurgery* 31: 584-585.
14. Campronon RA, Bowles MJ (2006) Perioperative analgesia in experimental small bowel transplantation. *Transplantation proceedings* 38: 1857-1858.
15. Lausada N, Stringa P, Cabanne A, Ramisch D, Machuca M, Galvao F, et al. (2011) Impact of ischemia-reperfusion injury on long survival rate in intestinal transplantation in rats. *Acta gastroenterologica Latinoamericana* 41: 129-136.
16. Stringa P, Romanin D, Lausada N, Machuca M, Raimondi JC, et al. (2013) Ischemic preconditioning and tacrolimus pretreatment as strategies to attenuate intestinal ischemia-reperfusion injury in mice. *Transplantation proceedings* 45: 2480-2485.
17. Wang Z, Hernandez F, Pederiva F, Andres AM, Leal N, et al. (2011) Ischemic preconditioning of the graft for intestinal transplantation in rats. *Pediatric transplantation* 15: 65-69.
18. Hernandez F, Zou Y, Lopez G, Romero M, Martinez L, et al. (2005) Is portal venous outflow better than systemic venous outflow in small bowel transplantation? Experimental study in syngeneic rats. *Journal of pediatric surgery* 40: 336-340.
19. Navarro-Zorraquino M, Guemes A, Pastor C, Soria J, Sousa R, et al. (2002) Apoptosis and CD8 and CD54 cell expression in rat small bowel transplantation. *The Journal of surgical research*. 103: 37-40.
20. Andres AM, Santamaria M, Hernandez Oliveros F, Guerra L, Lopez S, et al. (2016) Difficulties, guidelines and review of developing an acute rejection model after rat intestinal transplantation. *Transplant Immunology* 36: 32-41.
21. Squiers EC, Kelley SE, West JC (1992) Small bowel transplantation in the mouse: development of a model. *Microsurgery* 13: 345-347. [[Crossref](#)]
22. Liu X, Song P, Tian J, Zhou S, Yan S, et al. (2013) A simple novel technique for heterotopic intestinal transplantation in mice. *Transplant Proc* 45: 654-658. [[Crossref](#)]
23. Galvão FH, Bacchella T, Cerqueira Machado M (2007) Teaching intestinal transplantation in the rat for medical student. *Microsurgery* 27: 277-281. [[Crossref](#)]
24. Guity A, Young PH, Fischer VW (1990) In search of the "perfect" anastomosis. *Microsurgery* 11: 5-11. [[Crossref](#)]
25. Xue L, Lu Y, Qiu W, Zhou H, Zhang G, Jin Z, et al. (2009) Surgical experience of refined 3-cuff technique for orthotopic small-bowel transplantation in rat: a report of 270 cases. *American journal of surgery* 198: 110-121.
26. Nakao A, Mitsuoka N, Shen SD, Tanaka N, Kobayashi E (2000) Rat small intestinal transplantation: a comparison of the cuff and hand-suture methods. *Acta Med Okayama* 54: 259-264. [[Crossref](#)]



*“... la imaginación, aunque es buen motor para la ciencia, requiere del contraste riguroso y metódico para llegar a realidades válidas para el paciente y en tanto no se demuestren, no deberían comunicarse infundidas esperanzas”.*

*(García Olmo, Mariano García Arranz; Células para curar. Del corazón al todo)*