



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**EFECTO DE LA MOVILIZACIÓN  
FARMACOLÓGICA DE CÉLULAS MADRE DE  
MÉDULA ÓSEA SOBRE LA EXPRESIÓN DE  
CITOQUINAS, EL QUIMERISMO REVERSO Y LA  
VASCULOPATÍA CRÓNICA DEL ALOINJERTO  
EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE  
TRASPLANTE DE TEJIDOS COMPUESTOS**

**Memoria presentada por**  
**Pedro Bolado Gutiérrez**

**Para optar al grado de Doctor en Medicina**

**2019**





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**EFFECTO DE LA MOVILIZACIÓN  
FARMACOLÓGICA DE CÉLULAS MADRE DE  
MÉDULA ÓSEA SOBRE LA EXPRESIÓN DE  
CITOQUINAS, EL QUIMERISMO REVERSO Y LA  
VASCULOPATÍA CRÓNICA DEL ALOINJERTO  
EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE  
TRASPLANTE DE TEJIDOS COMPUESTOS**

**Memoria presentada por**  
**Pedro Bolado Gutiérrez**

**Directores:**

**Dr. Luis Landín Jarillo**

**Dr. César Casado Pérez**

**2019**





A Esther, por su amor incondicional



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Luis Landín Jarillo, por introducirme en el mundo de la microcirugía y ser mi maestro, por enseñarme a valorar el trabajo realizado y persistir hasta conseguir el objetivo. Gracias por instruirme, orientarme y co-dirigir este trabajo que sin tu ayuda no hubiese sido posible. Gracias por tu apoyo incondicional en todo momento y tu amistad.

Al Dr. César Casado Pérez, por asumir la co-dirección de esta tesis, prestarme su apoyo y darme facilidades en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. César Casado Sánchez, por tutorizar esta memoria.

A la Dra. Carlota Largo Aramburu, por el tiempo dedicado en mi formación sobre el manejo animal.

A la Dra. María Teresa Vallejo Cremades, por tu colaboración amable y desinteresada ayuda en el procesado de las muestras.

Al equipo de celadores del Servicio de Cirugía Experimental del IdiPAZ, por participar en el cuidado de los animales.

A todos mis compañeros del Servicio de Cirugía Plástica, Reparadora y Quemados del Hospital Universitario La Paz, por su ánimo y todos los conocimientos transmitidos.

A mi familia, por haberme ofrecido todas las oportunidades para conseguir mis objetivos, por enseñarme que el esfuerzo siempre lleva consigo una grata recompensa y por confiar en mi y apoyarme en todo momento.



Por último, y de manera muy especial a mi mujer, Esther, tu apoyo ha sido el más incondicional de todos, gracias por calmar mis nervios, darme ánimos y apoyarme en la realización de este trabajo.

# TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
2.1	TRASPLANTES DE TEJIDOS COMPUESTOS .....	25
2.1.1	<i>Antecedentes históricos.....</i>	26
2.1.2	<i>Origen del trasplante clínico.....</i>	28
2.1.3	<i>Origen del trasplante de tejidos compuestos.....</i>	29
2.1.4	<i>Inicios del trasplante de mano.....</i>	30
2.1.5	<i>La era moderna en el trasplante de tejidos compuestos.....</i>	30
2.1.6	<i>Trasplante de miembro superior.....</i>	32
2.2	INMUNOLOGÍA DE LOS TRASPLANTES .....	34
2.2.1	<i>Reconocimiento del aloinjerto.....</i>	34
2.2.1.1	Genética del rechazo del aloinjerto .....	34
2.2.1.2	Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad .....	35
2.2.1.3	Presentación de aloantígenos.....	36
2.2.1.4	Interacción entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T.....	38
2.2.1.5	La lesión inflamatoria y la isquemia en la alorrespuesta.....	39
2.2.1.6	Inmunidad innata y adaptativa .....	39
2.2.1.7	Reclutamiento leucocitario.....	40
2.2.2	<i>Activación linfocitaria.....</i>	41
2.2.2.1	Linfocitos T.....	41
2.2.2.2	Linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .....	43
2.2.2.3	Respuestas tipo 1 y tipo 2 de los linfocitos T .....	44
2.2.2.4	Coestimulación del linfocito T: El modelo de la triple señal.....	45
2.2.2.5	Linfocitos B.....	49
2.2.3	<i>Mecanismos efectores en la destrucción del aloinjerto.....</i>	50
2.3	TIPOS DE RECHAZO .....	52
2.3.1	<i>Rechazo agudo.....</i>	52
2.3.2	<i>Rechazo crónico.....</i>	57
2.3.2.1	Rechazo crónico en TOS.....	57
2.3.2.2	Rechazo crónico experimental en trasplantes de tejidos compuestos.....	58

## Tabla de Contenido

2.3.2.3	Rechazo crónico clínico en trasplantes de tejidos compuestos.....	62
2.3.2.4	Mecanismos patogénicos del rechazo crónico.....	64
2.4	CITOQUINAS.....	67
2.4.1	<i>Definición</i> .....	67
2.4.1.1	Interleucina 2.....	68
2.4.1.2	Interleucina 3.....	68
2.4.1.3	Interleucina 4.....	69
2.4.1.4	Interleucina 5.....	69
2.4.1.5	Interleucina 7.....	70
2.4.1.6	Interleucina 9.....	70
2.4.1.7	Interleucina 10.....	70
2.4.1.8	Interleucina 12.....	71
2.4.1.9	Interleucina 13.....	72
2.4.1.10	Interleucina 14.....	72
2.4.1.11	Interleucina 15.....	72
2.4.1.12	Factor de crecimiento transformante $\beta$ .....	73
2.4.1.13	Interferones.....	73
2.4.1.14	Factor inductor del IFN- $\gamma$ .....	74
2.4.2	<i>Citoquinas y rechazo crónico</i> .....	74
2.4.3	<i>Citoquinas y tolerancia</i> .....	77
2.5	INHIBIDORES DE LA CALCINEURINA: TACROLIMUS.....	80
2.6	CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS CD34 <sup>+</sup> .....	82
2.7	PLERIXAFOR.....	85
2.8	TOLERANCIA Y QUIMERISMO.....	88
2.8.1	<i>Quimerismo reverso</i> .....	90
2.8.1.1	Quimerismo reverso en trasplante de órgano sólido y trasplante de tejidos compuestos.....	90
2.8.1.2	Quimerismo óseo.....	92
2.8.1.3	Quimerismo endotelial.....	93
2.8.1.4	Quimerismo muscular.....	94
2.8.1.5	Quimerismo cutáneo.....	95
2.8.1.6	Quimerismo reverso en otros tejidos del aloinjerto.....	97
2.8.1.7	Tolerancia y quimerismo reverso.....	98
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>101</b>

<b>4</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>105</b>
4.1	PROTOCOLO QUIRÚRGICO .....	107
4.2	EXTRACCIÓN DEL ALOINJERTO .....	108
4.3	TÉCNICA QUIRÚRGICA EN EL ANIMAL RECEPTOR .....	109
4.4	PROTOCOLO DE INMUNOSUPRESIÓN .....	111
4.5	PROTOCOLO DE MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA CD34+ .....	111
4.6	SEGUIMIENTO CLÍNICO .....	111
4.7	PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE LOS ALOINJERTOS.....	111
4.8	PROCESADO Y ESTUDIO DE LAS MUESTRAS .....	113
4.9	VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS.....	114
4.10	VALORACIÓN DEL INFILTRADO LEUCOCITARIO .....	116
4.10.1	<i>Cualitativa</i> .....	116
4.10.2	<i>Cuantitativa</i> .....	116
4.11	VALORACIÓN DEL RECHAZO CRÓNICO.....	118
4.12	VALORACIÓN DEL QUIMERISMO REVERSO ENDOTELIAL .....	121
4.13	VALORACIÓN DEL QUIMERISMO REVERSO EN LA MÉDULA ÓSEA .....	124
4.14	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	127
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>129</b>
5.1	SUPERVIVENCIA Y SEGUIMIENTO CLÍNICO.....	131
5.2	RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS .....	132
5.3	RESULTADOS DEL INFILTRADO LEUCOCITARIO.....	135
5.3.1	<i>Cualitativa</i> .....	135
5.3.2	<i>Cuantitativa</i> .....	136
5.4	RESULTADOS DEL RECHAZO CRÓNICO .....	137
5.5	RESULTADOS DEL QUIMERISMO REVERSO ENDOTELIAL.....	139
5.6	RESULTADOS DEL QUIMERISMO REVERSO EN LA MÉDULA ÓSEA .....	139
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>143</b>
6.1	LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....	159
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>161</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>165</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>205</b>
9.1	PREMIOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS.....	207

## Tabla de Contenido

9.2	BECAS CONCEDIDAS A LA PRESENTE TESIS .....	210
9.3	ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS.....	212
9.4	COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS .....	228
9.5	NOTAS, PERMISOS Y DERECHOS DE AUTOR .....	229

## ABREVIATURAS

- Ac: anticuerpo.
- ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
- BCGFII: en inglés, *B cell growing factor II*; factor II de crecimiento de linfocitos B.
- CD: en inglés, *cluster of differentiation*; cúmulo de diferenciación.
- CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.
- CMHe: células madre hematopoyéticas.
- CM: célula madre.
- CPA: células presentadoras de antígeno.
- CSF: en inglés, *colony-stimulating factor*; factor estimulante de colonias.
- CTLA-4: en inglés, *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*; antígeno 4 del linfocito T citotóxico.
- CXCR4: en inglés, *C-X-C chemokine receptor type 4*; receptor 4 de CXC Motif.
- EICH: enfermedad injerto contra huésped.
- FGF: en inglés, *fibroblast growth factor*; factor de crecimiento fibroblástico.
- FISH: en inglés, *fluorescence in situ hybridation*, hibridación fluorescente in situ.
- FKBP: en inglés, *FK506 binding protein*; proteína de unión al tacrólimus.
- G-CSF: en inglés, *granulocyte colony-stimulating factor*; factor estimulante de colonias de granulocitos.
- GM-CSF: en inglés, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*; factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.

## Abreviaturas

- Gro- $\alpha$ : en inglés, *growth-related oncogene  $\alpha$* ; oncogen regulador del crecimiento  $\alpha$ .
- Gro- $\beta$ : en inglés, *growth-related oncogene  $\beta$* ; oncogen regulador del crecimiento  $\beta$ .
- HLA: en inglés, *human leukocyte antigen*; antígeno leucocitario humano.
- ICAM: en inglés, *intercellular adhesion molecule*; molécula de adhesión intercelular.
- IFN: interferón.
- Ig: inmunoglobulina.
- IGF: en inglés, *insulin-like growth factor*; factor de crecimiento insulínico.
- IGIF: en inglés, *IFN- $\gamma$ -inducing factor*; factor inductor del IFN- $\gamma$ .
- IHQ: inmunohistoquímico.
- IL: interleucina.
- IP-10: en inglés, *IFN- $\gamma$ -induced protein 10*; proteína 10 inducida por IFN- $\gamma$ .
- IS: inmunosupresión.
- kDa: kilodalton.
- LAK: en inglés, *limphokine-activated killer cells*; células “killer” activadas por linfoquinas.
- L<sub>B</sub>: linfocito B.
- LFA-1: en inglés, *lymphocyte function-associated antigen 1*; antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos.
- L<sub>T</sub>: linfocito T.
- L<sub>Th</sub>1: linfocito T cooperador de tipo 1.
- L<sub>Th</sub>2: linfocito T cooperador de tipo 2.
- NK: en inglés, *natural killer*; asesino natural.

- MAF: en inglés, *macrophage activating factor*; factor activador de los macrófagos.
- MCP: en inglés, *monocyte chemoattractant protein 1*; proteína quimiotáctica de monocitos 1.
- MICA: en inglés, *major histocompatibility complex class I-related chain A*; cadena A del CMH de clase I.
- MIP: en inglés, *macrophage inflammatory protein*; proteína inflamatoria de macrófagos.
- µl: microlitro.
- MO: médula ósea.
- MMF: ácido micofenólico o micofenolato mofetilo.
- MMIF: en inglés, *macrophage migration inhibitory factor*; factor inhibidor de la migración de los macrófagos.
- mTOR: en inglés, *mammalian target of rapamycin*; diana de la rapamicina de los mamíferos.
- ng: nanogramo.
- PCR: en inglés, *polymerase chain reaction*; reacción en cadena de la polimerasa.
- PDGF: en inglés, *platelet derived growth factor*; factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PI: proliferación intimal.
- PPA: porcentaje de permeabilidad arterial.
- QR: quimerismo reverso.
- RA: rechazo agudo.



## Abreviaturas

- RANTES: en inglés, *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*; quimiocina expresada y secretada por células T normales reguladas tras la activación.
- RC: rechazo crónico.
- R-L<sub>T</sub>: receptor de linfocitos T.
- RT-PCR: en inglés, *real time polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
- SCF: en inglés, *stem cell factor*; factor de células madre.
- SDF-1: en inglés, *stromal cell-derived factor 1*; factor derivado del estroma.
- TGF- $\beta$ : en inglés, *transforming growth factor  $\beta$* ; factor de crecimiento transformante  $\beta$ .
- TNF: en inglés, *tumor necrosis factor*; factor de necrosis tumoral.
- TOS: trasplante de órgano sólido.
- TRF: en inglés, *T cell-replacing factor*; factor de reemplazo de linfocitos T.
- TTC: trasplante de tejidos compuestos.
- VCAM: en inglés, *vascular cell adhesion molecule*; molécula de adhesión vascular.
- VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.
- VLA-4: en inglés, *very late antigen 44*.

## **1 RESUMEN.**



**Introducción:** Los trasplantes de tejidos compuestos sufren rechazo crónico modulado por citoquinas. El quimerismo reverso o quimerismo del aloinjerto se define como la repoblación del tejido trasplantado por células circulantes del receptor. Plerixafor produce la movilización de células madre de médula ósea CD34<sup>+</sup> hacia la sangre periférica, y podría tener un papel facilitador de la repoblación de los aloinjertos.

**Objetivo:** Conocer los mecanismos moleculares que intervienen en el rechazo crónico y el quimerismo reverso tras la administración de plerixafor.

**Material y método:** Se realizaron dieciséis trasplantes osteomusculares heterotópicos de pata posterior entre ratas Brown-Norway hembra y Wistar Lewis macho bajo inmunosupresión sub-terapéutica con tacrólimus. Se establecieron dos grupos de estudio: el grupo I solo recibió inmunosupresión sub-terapéutica con tacrólimus, mientras que el grupo II además recibió tratamiento con plerixafor. Transcurridas 9 semanas se estudiaron la expresión de citoquinas y el infiltrado leucocitario en distintas localizaciones musculares, así como el grado de rechazo crónico y porcentaje de quimerismo reverso en diferentes tejidos del aloinjerto.

**Resultados:** Se encontraron diferencias estadísticas en la expresión de factor estimulante de colonias granulocíticas e interleucina 12 a nivel de los tercios medio y distal del aloinjerto, y de interleucina 6 a nivel del tercio medio del aloinjerto. La intensidad del infiltrado leucocitario fue mayor en el grupo que no recibió plerixafor. Ambos grupos desarrollaron rechazo crónico y se pudo observar la aparición de quimerismo reverso. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el infiltrado leucocitario, el rechazo crónico ni el quimerismo reverso.

**Conclusiones:** La movilización de células madre de médula ósea CD34<sup>+</sup> se asoció con una menor expresión de ciertas citoquinas como el factor estimulante de

## Resumen

colonias granulocíticas, interleucina 6 e interleucina 12, pero no evitó el desarrollo de rechazo crónico. No se encontraron diferencias en la repoblación de los aloinjertos.

## **2 INTRODUCCIÓN.**



## 2.1 TRASPLANTES DE TEJIDOS COMPUESTOS

Los aloinjertos compuestos vascularizados, inicialmente referidos como aloinjertos de tejidos compuestos, se han convertido en una opción clínica real en la cirugía reconstructiva para reemplazar estructuras corporales perdidas o gravemente dañadas que no pueden ser reparadas adecuadamente con técnicas quirúrgicas convencionales. De acuerdo con la United Network for Organ Sharing, los aloinjertos compuestos vascularizados son un trasplante que involucra diferentes partes del cuerpo y cumplen todos los siguientes criterios (1):

- Está vascularizado y requiere de la conexión quirúrgica de los vasos sanguíneos para funcionar tras el trasplante.
- Contiene múltiples tipos de tejidos.
- Se obtiene de un donante humano como una unidad anatómica/estructural.
- Se trasplanta a un receptor humano como una unidad anatómica/estructural.
- Está mínimamente manipulado, es decir, el procesamiento no altera las características relevantes originales del órgano en relación con la función que poseerá en la reconstrucción, reparación o reemplazo.
- Está destinado al uso homólogo, es decir el reemplazo o suplementación de un órgano receptor por aquel que realiza las mismas funciones básicas que en el donante.
- No se combina con dispositivos.
- Es susceptible a la isquemia y, por lo tanto solo se almacena temporalmente y no se crioconserva.



## Introducción

- Es susceptible al rechazo, que generalmente requiere tratamiento inmunosupresor pudiendo incrementar el riesgo de enfermedades infecciosas en el receptor.

### **2.1.1 Antecedentes históricos**

El mito de los médicos gemelos San Cosme y San Damián representa el primer trasplante de tejidos compuestos (TTC), realizado en el siglo III d. C. Estos médicos amputaron la pierna gangrenada de un sacristán y mientras dormía le realizaron un trasplante de pierna procedente de un moro etíope (*Figura 1*). Mientras un hermano amputaba la pierna enferma con una sierra, el otro se dirigió a un cementerio de gladiadores paganos del Circo de Nerón en la Colina Vaticana y exhumó el cuerpo de un hombre etíope recientemente enterrado para tomar una de sus piernas y unírsela al muñón del sacristán (2,3).



**Figura 1.** Milagros de los santos médicos Cosme y Damián. Fernando del Rincón. Museo del Prado, Madrid.

La sustitución de un órgano enfermo por uno sano ha sido un sueño para los cirujanos. John Hunter fue el fundador de la cirugía experimental y el llamado padre de la cirugía británica. Fue cirujano y anatomista que reportó en el siglo XVIII la realización de aloinjertos de testículos en pollos y de tendón de Aquiles en otras especies animales (4). En 1804, Baronia realizó aloinjertos de tendón entre ovejas, y en el año 1880 se realizaron trasplantes de córnea de forma estable tanto en animales como en humanos.

## Introducción

Las técnicas necesitaban combinar el trasplante de tejidos con la microcirugía vascular. Este obstáculo fue superado por el cirujano francés Alexis Carrel, quien en 1902 introdujo la sutura vascular. Sin embargo encontró el problema que el órgano del donante era rechazado por el organismo receptor (5). Los esfuerzos de Carrel y el cirujano estadounidense Charles Guthrie sirvieron como base de la cirugía vascular y el trasplante de órganos (6). En 1905, Carrel y Guthrie realizaron el primer trasplante cardíaco en animales. Paul Ehrlich sugirió en 1906 que la teoría inicial sobre el mecanismo de rechazo era la malnutrición del tejido transferido (7).

En 1910, Alexis Carrel observó que las alteraciones fisiológicas de los órganos trasplantados podrían estar producidas por factores biológicos. Poco después, el patólogo vienés K. Landsteiner descubrió el sistema de agrupación de la sangre ABO que condujo a la introducción de la transfusión clínica.

Los trasplantes comenzaron a lo largo de la Segunda Guerra Mundial con el uso de aloinjertos de piel para la reconstrucción de lesiones por quemadura. El biólogo Peter Medawar, ganador del Premio Nobel en 1960, junto con el cirujano plástico Thomas Gibson realizaron experimentos pioneros en inmunología de los aloinjertos cutáneos en la Unidad de Cirugía Plástica en Glasgow, donde fueron trasladadas algunas víctimas de la guerra (8).

### **2.1.2 Origen del trasplante clínico**

En el año 1954, Joseph E. Murray, John P. Merrill y J. Hartwell Harrison realizaron en Boston el primer isotrasplante renal en humanos (9,10), para realizar en 1959 el primer alotrasplante renal con éxito en humanos tras la irradiación corporal total

(11,12). El éxito del trasplante comenzó en 1960 con la inmunosupresión (IS) farmacológica mediante estudios fundamentales por Charles Zukoski y Roy Calne con la 6-mercaptopurina (13,14). Su aplicación clínica se desarrolló por George Hitchings y Gertrude Elion con la azatioprina, un profármaco emparentado con la 6-mercaptopurina (15-17). Durante las tres últimas décadas del siglo XX se ampliaron las indicaciones de los trasplantes de órgano sólido (TOS) incluyendo el hígado, corazón, pulmón, páncreas e intestino delgado, gracias al avance en los regímenes farmacológicos inmunosupresores (15-18).

### **2.1.3 Origen del trasplante de tejidos compuestos**

Peacock fue el primero en realizar clínicamente una transferencia no vascularizada de tejidos compuestos en 1957. Se trató de aloinjertos de cadáver que incluían la membrana sinovial que recubría los tendones flexores superficial y profundo de los dedos, las poleas y la vaina sinovial, las vínculas vasculares y las placas volares, y se revascularizaban por inosculación (19). Estas transferencias se realizaron sin inmunosupresión (20). Para diferenciar estos injertos estructuralmente complejos de las múltiples líneas de tejido que forman los órganos sólidos, Peacock originó el término “aloinjertos de tejidos compuestos”.

Transcurrieron más de 25 años entre los trabajos de Peacock y el siguiente éxito clínico en los TTC. En 1992 J. C. Guimberteau realizó la transferencia vascularizada de los tendones flexores de los dedos con IS temporal (21) (22).

### **2.1.4 Inicios del trasplante de mano**

El éxito del trasplante renal condujo al primer intento por parte de Robert Gilbert de realizar un trasplante de mano en 1964 (23). Se trasplantó una mano a un amputado bilateral con éxito técnico e IS con azatioprina y prednisona. Sin embargo, el rechazo agudo (RA) irreversible que se produjo acabó con la amputación del aloinjerto a las 3 semanas (24). Este desenlace, asociado a los fracasos experimentales en animales llevó a la conclusión que tanto la piel como aquellos aloinjertos que incluían piel eran demasiado antigénicos para su trasplante (25). Posteriormente Peacock y John W. Madden estuvieron cerca de realizar un trasplante de mano entre dos gemelas idénticas; una de ellas se encontraba con soporte vital por una lesión cerebral irreversible y la otra presentaba quemaduras en la mano. La receptora rechazó el trasplante de mano en el último momento debido al estrés psicológico que le generaba utilizar la mano de su hermana (Comunicaciones personales con Erle E. Peacock Jr. y John W. Madden). Este hecho dejó patente la importancia de la identidad personal y los problemas psicológicos que podría desencadenar realizar un TTC que posteriormente no se identificase como propio.

### **2.1.5 La era moderna en el trasplante de tejidos compuestos**

Tras la aparición de nuevos fármacos inmunosupresores como los inhibidores de la calcineurina, el uso establecido de la ciclosporina A en la década de 1980 y del tacrólimus en la década de 1990, aumentó el éxito clínico de los TOS y se observaron beneficios en TTC experimentales (25-27). A mediados de 1990 emergió el ácido micofenólico (MMF), un análogo de las purinas (28). Su uso junto con los inhibidores de la calcineurina aumento la supervivencia a largo plazo de TTC de pata en ratas (29).

Tras la confirmación de estos resultados experimentales se desarrollaron modelos en animales superiores (30,31).

Al mismo tiempo que comenzaron los estudios experimentales de TTC de manos, Gunther Hofmann y su equipo fueron pioneros en Alemania en realizar en 1997 el primer TTC de rodilla y fémur (32,33).

Posteriormente, todos estos avances, condujeron a la organización de equipos clínicos de TTC de mano en Lyon y Luoisville, realizándose en septiembre de 1998 y en enero de 1999 sus primeros TTC de mano, respectivamente (34-36). En enero del 2000 se llevó a cabo en Lyon por el equipo de Dubernard el primer TTC bilateral de manos (37). También Marshal Strome y su equipo realizaron en Cleveland estudios experimentales de TTC de laringe (38). Estos TTC iniciales llevaron a la organización de más programas internacionales de trasplante que incluyeron cara, pared abdominal, nervio periférico, lengua, cuero cabelludo, útero y pene (38-51).

### **2.1.6 Trasplante de miembro superior**

Tras los TTC realizados en Lyon y Louisville se organizaron diferentes equipos en Europa y China que realizaron más de 45 trasplantes de mano en más de 35 receptores, dividiéndose por igual entre procedimientos uni o bilaterales (52). Todos los aloinjertos, excepto dos que fueron para amputaciones de mano en China y uno que fue para una amputación transhumeral en Alemania, se realizaron en pacientes amputados a nivel del antebrazo (52).

Los dos primeros TTC fueron los paradigmas que definieron la experiencia posterior. El paciente de Louisville fue cuidadosamente seleccionado mediante un examen psicológico, preparación y participación familiar exhaustivos (53-55). El receptor se comprometió con el programa de rehabilitación posterior, el tratamiento inmunosupresor y los controles médicos postoperatorios, consiguiéndose un resultado funcionalmente comparable a los mejores reimplantes de mano en mediciones objetivas y en la realización de las actividades de la vida diaria (55). Este patrón se ha repetido en receptores posteriores en Estados Unidos y Europa (56). Por el contrario, el primer receptor del equipo de Lyon fue una excepción a la experiencia occidental en TTC (34,35). El paciente era un amputado unilateral de Nueva Zelanda que solicitó la amputación de su mano reimplantada. Finalmente fue trasplantado en septiembre de 1998. El procedimiento quirúrgico no tuvo incidencias pero el paciente abandonó el seguimiento médico y la rehabilitación, y el tratamiento inmunosupresor fue irregular y con mal control. Como resultado, solo recuperó una función motora mínima y desarrolló un rechazo progresivo que acabó con la viabilidad del aloinjerto, solicitando la amputación de los miembros dos años después del trasplante (35,57). Esta selección de paciente y el consiguiente resultado mantuvieron la controversia inicial de los TTC (55,58-60).

El patrón de rechazo progresivo y atrofia de los aloinjertos debido a la IS subterapéutica ocurrió en todos los TTC de China. Aunque todos los procedimientos quirúrgicos fueron inicialmente exitosos, el sistema sanitario de China hizo que los receptores quedaran como responsables de adquirir su tratamiento inmunosupresor que era inaccesible.

Por lo tanto, todas las pérdidas de los aloinjertos han provenido de una valoración psicológica o acceso al tratamiento inmunosupresor deficientes, y el éxito se correlaciona con la evaluación psicosocial y educación preoperatorias exhaustivas, una rehabilitación intensa, la adherencia al tratamiento inmunosupresor y el seguimiento estrecho (61).



## **2.2 INMUNOLOGÍA DE LOS TRASPLANTES**

La respuesta inmunológica frente a un aloinjerto puede dividirse en el reconocimiento de antígenos extraños, la activación linfocitaria específica y la fase efectora del rechazo del aloinjerto.

### **2.2.1 Reconocimiento del aloinjerto**

#### *2.2.1.1 Genética del rechazo del aloinjerto*

Los resultados obtenidos en estudios para la evaluación de la aceptación y el rechazo de los aloinjertos en ratones consanguíneos manifestaron que el rechazo de los aloinjertos está controlado por genes con patrón de herencia mendeliana (62,63). Los genes que regulan el rechazo o la tolerancia de los aloinjertos se localizan en el cromosoma 6 y se conoce como complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (64). En humanos, los trasplantes singénicos sobreviven sin necesidad de IS ya que el donante y el receptor comparten las mismas moléculas del CMH. Cuando donante y receptor difieren en sus antígenos de histocompatibilidad, es necesario el tratamiento inmunosupresor para evitar o disminuir los episodios de rechazo. También hay genes diferentes de los del CMH que desempeñan un papel menor en el rechazo del aloinjerto y se denominan genes menores de histocompatibilidad. Las incompatibilidades del CMH producen un rechazo más vigoroso que las incompatibilidades menores y, en general, cuanta mayor diferencia en el CMH, más rápido se desencadena el rechazo (65).

### 2.2.1.2 Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad

El CMH codifica un grupo diverso de proteínas de superficie celular que otorgan la identidad inmunológica del individuo. El evento principal para el inicio de la alorespuesta inmunitaria es el reconocimiento de identidades mediante la unión del CMH/péptido al receptor de los linfocitos T (R-L<sub>T</sub>).

En los humanos, los genes del CMH se llaman genes del antígeno leucocitario humano o human leukocyte antigen (HLA). Hay dos tipos de moléculas del CMH, clase I y clase II. Los genes de clase I son HLA-A, HLA-B y HLA-C; y los genes de clase II son HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR (66). Cada uno de ellos presenta dos alelos, por lo que el genotipo de un individuo está compuesto por 12 moléculas del CMH diferentes.

Una de las características fundamentales de las moléculas del CMH es su alto polimorfismo ya que cada locus puede codificar potencialmente cientos de moléculas diferentes. El conjunto de las diferentes moléculas del CMH o alelos expresado en un cromosoma se llama haplotipo. La suma de dos haplotipos se denomina genotipo. La segunda característica del CMH es que sus genes tienen una expresión codominante ya que se expresan ambos alelos.

El beneficio evolutivo del polimorfismo del CMH es la amplia variedad de péptidos microbianos que se pueden presentar al R-L<sub>T</sub> para iniciar una respuesta inmunitaria frente a las infecciones. Sin embargo, esta característica crea una barrera en la inmunología del trasplante ya que las posibilidades de emparejar los CMH de donante y receptor son bajas. Este grado de emparejamiento es determinante en la supervivencia del aloinjerto. En la práctica clínica, los genes del CMH que mayor efecto tienen en la respuesta efectora del rechazo si no están emparejados entre donante-receptor son HLA-

## Introducción

A, HLA-B Y HLA-DR. Los determinantes antigénicos de estos seis alelos son el foco para lograr la compatibilidad y mejorar la supervivencia del aloinjerto.

Las moléculas del CMH de clase I están compuestas por una cadena polimórfica  $\alpha$  o cadena pesada y una cadena ligera no polimórfica o  $\beta_2$ -microglobulina, y se unen a péptidos que tienen entre 9 a 11 aminoácidos de longitud. Las moléculas del CMH de clase II están compuestas por cadenas polimórficas  $\alpha$  y  $\beta$  de similar peso molecular, y se unen a péptidos que tienen entre 13 a 30 aminoácidos de longitud. (67)

Las moléculas del CMH de clase I se expresan en todas las células nucleadas, mientras que el CMH de clase II lo hace en células presentadoras de antígeno (CPA), incluyendo células dendríticas,  $L_B$  y macrófagos (67). Las citoquinas juegan un papel fundamental en la regulación de la expresión del CMH. El interferón (IFN), particularmente el IFN- $\gamma$ , aumenta los niveles del CMH de clase I y los niveles del CMH de clase II en macrófagos e induce su expresión en células no consideradas CPA como las endoteliales y epiteliales. Todas las células del aloinjerto pueden expresar ambos CMH y ser objeto potencial de una respuesta alogénica (68).

Las moléculas del CMH se expresan de forma estable en la superficie celular únicamente si hay péptidos presentes en sus surcos de unión para ser presentados. El CMH de clase I une péptidos derivados de proteínas citoplasmáticas (vía citosólica o endógena) mientras que el CMH de clase II une péptidos de proteínas extracelulares que han sido endocitadas (vía vesicular o exógena).

### 2.2.1.3 Presentación de aloantígenos

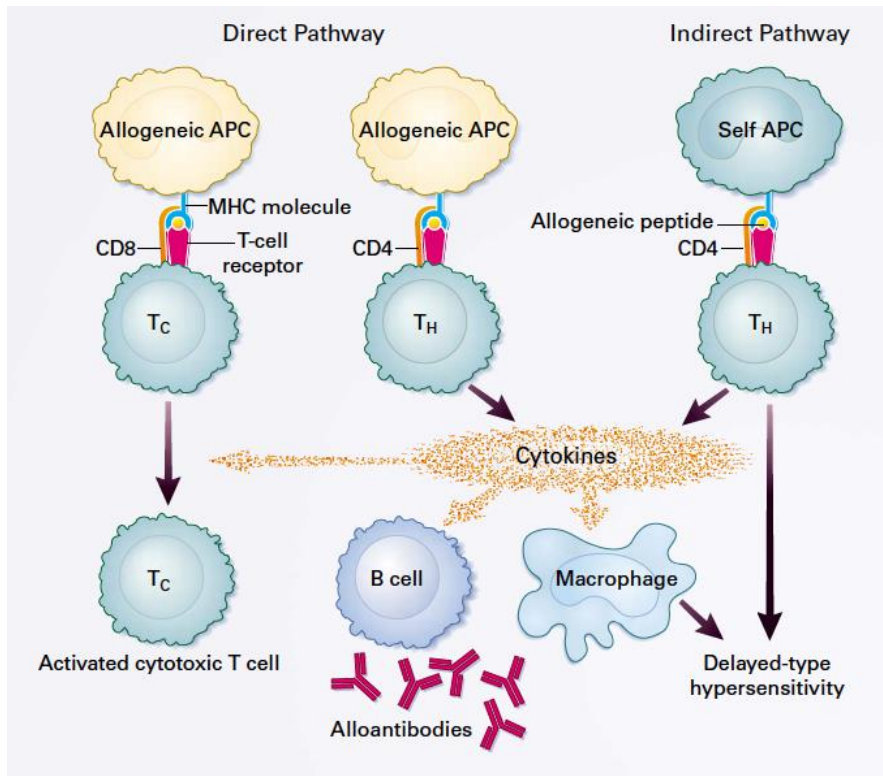
En los humanos, entre el 1 y el 10% de los  $L_T$  reaccionan a la presentación de una molécula del CMH distinta del individuo (alogénica). Durante su maduración en el

timo, los linfocitos T ( $L_T$ ) que reaccionan frente a autoantígenos son eliminados (selección negativa), mientras que aquellos específicos para péptidos exógenos presentados en moléculas del CMH del propio individuo siguen su desarrollo (selección positiva). La naturaleza del CMH reconocido por  $L_T$  aloreactivos varía en función de las vías de presentación de los aloantígenos (69).

- Presentación directa del antígeno: La respuesta de los  $L_T$  del receptor al complejo formado por el CMH-péptido en las CPA del aloinjerto se denomina alorreconocimiento directo (*Figura 2*) (70).

- Presentación indirecta del antígeno: Los  $L_T$  del receptor pueden responder a los péptidos del CMH del aloinjerto procesados y presentados en las CPA del receptor, denominándose alorreconocimiento indirecto. La vía indirecta de la presentación de antígenos es más importante para la activación de los  $L_T$   $CD4^+$  que de los  $L_T$   $CD8^+$  (*Figura 2*) (70).

El RA del aloinjerto depende principalmente del alorreconocimiento directo, estimándose una proporción de activación de  $L_T$  vía directa:indirecta de 100:1. Sin embargo, la evidencia experimental sugiere que el alorreconocimiento indirecto puede ser más importante para el desarrollo del rechazo crónico (RC), una de las causas principales de pérdida del aloinjerto. Por ello, hay un gran interés en conocer la vía indirecta de presentación del antígeno con el objetivo de desarrollar terapias para bloquearla (71).



**Figura 2. Vías de reconocimiento de moléculas alogénicas del CMH y mecanismos de rechazo.** El rechazo del aloinjerto generalmente se inicia por los  $L_{Th} CD4^+$  que se unen a péptidos en complejos con el CMH de clase II de en las CPA. En la presentación directa, una molécula del CMH en una célula alogénica se une al  $L_{Th}$ . En la presentación indirecta, la molécula del CMH alogénico se procesa en péptidos que son presentados a los  $L_{Th}$  por un CMH de clase II propio en las CPA. En ambos casos, los  $L_{Th}$  activados proliferan y secretan diferentes citoquinas que sirven como factores de crecimiento y activación de los  $L_T CD8^+$ ,  $L_B$  y macrófagos, produciendo la destrucción del aloinjerto por lisis directa de células diana, producción de Ac y mecanismos de hipersensibilidad retardada, respectivamente. (Reproducido con permiso: Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. Epstein FH, editor. *N Engl J Med*. 1998 Jun 18;338(25):1813–21, Copyright Massachusetts Medical Society).

#### 2.2.1.4 Interacción entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T

Tras el trasplante, los antígenos que van a encontrarse los  $L_T$  receptores están presentes en el endotelio vascular, que en reposo expresa CMH de clase I y tras su activación también expresa CMH de clase II. Una de las características del RA es la inflamación del endotelio, conocida como endotelitis o vasculitis.

Además, en el aloinjerto se transfieren leucocitos del donante hacia el receptor. Los leucocitos del donante juegan un papel importante en el rechazo del aloinjerto y en diferentes modelos experimentales su eliminación previa al trasplante prolonga la supervivencia del aloinjerto. Estos leucocitos del donante pueden estimular la alorrespuesta directa e indirecta de los  $L_T$  del receptor (72). También puede haber una migración de células dendríticas del donante hacia el tejido linfoide del receptor, pudiendo estimular de nuevo una alorrespuesta directa o indirecta. Las células dendríticas son las CPA más importantes y potentes debido a su capacidad de expresar altos niveles de CMH y de moléculas accesorias para la activación de los  $L_T$ . Por lo tanto, los órganos linfoides del receptor son también un lugar importante de interacción entre  $L_T$  y CPA.

### 2.2.1.5 La lesión inflamatoria y la isquemia en la alorrespuesta

La cirugía y la isquemia a la que se somete el aloinjerto producen una inflamación como respuesta a esta lesión, lo que conocemos como isquemia-reperfusión, que conduce a la producción de citoquinas inflamatorias y al reclutamiento en el aloinjerto de células inflamatorias como los macrófagos (73). Su importancia clínica radica en que a mayor tiempo de isquemia del aloinjerto, más frecuentes son los episodios de RA (74).

### 2.2.1.6 Inmunidad innata y adaptativa

La lesión por isquemia-reperfusión es un ejemplo de respuesta inmunitaria antígeno-independiente conocida como inmunidad innata, a diferencia de las respuestas específicas al CMH de la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata es la forma de respuesta inmunitaria más primitiva y la que primero ocurre, pudiendo afectar a la naturaleza de la respuesta adaptativa subsiguiente. Las células implicadas en la

## Introducción

inmunidad innata son los neutrófilos, macrófagos, células “natural killer” (NK), citoquinas y factores del complemento. La respuesta adaptativa está mediada por  $L_B$  y  $L_T$  antígeno-específicos que interactúan íntimamente con la inmunidad innata ya que tras su activación producen citoquinas y activan células y mediadores del sistema innato.

### 2.2.1.7 Reclutamiento leucocitario

La salida leucocitaria desde un vaso sanguíneo hasta la zona de lesión tisular se debe a una serie de complejas interacciones entre moléculas de adhesión. La activación de las células endoteliales produce la expresión de selectinas, que al unirse a sus ligandos en la membrana leucocitaria ralentiza su flujo y comienzan a rodar sobre el endotelio. A continuación, se secretan citoquinas quimiotácticas que atraen más leucocitos al lugar de la inflamación y se produce su adhesión al endotelio, mediada por integrinas. Por último, se produce la extravasación de leucocitos al tejido circundante.

La lesión isquémica aumenta la producción de diferentes citoquinas entre las que se encuentra la interleuquina 1 (IL-1) que eleva la expresión de selectinas. Además, tras el trasplante se induce la expresión de moléculas de adhesión como la selectina E, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) o la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1).

## 2.2.2 Activación linfocitaria

### 2.2.2.1 Linfocitos T

El reconocimiento de los aloantígenos por los  $L_T$  es el evento principal para la activación, proliferación y diferenciación que desembocan en el rechazo celular dependiente de  $L_T$ .

El R- $L_T$  es un heterodímero compuesto por una cadena polipeptídica  $\alpha$  y  $\beta$  con dominios variables y constantes, y está implicado en la mayor parte de las respuestas inmunitarias. Se ha descrito un segundo heterodímero compuesto por cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  que se involucra en la respuesta antigénica compleja frente a infecciones víricas, bacterianas o reacciones antitumorales (72). Los R- $L_T$  se asocian en la superficie de los  $L_T$  al complejo CD3, implicado en la transmisión de señales intracelulares. La importancia de las células CD3<sup>+</sup> se demuestra porque uno de los inmunosupresores más potentes utilizados en el trasplante clínico es el muromonab OKT3, se une a la molécula CD3 e inactiva la función de los  $L_T$ .

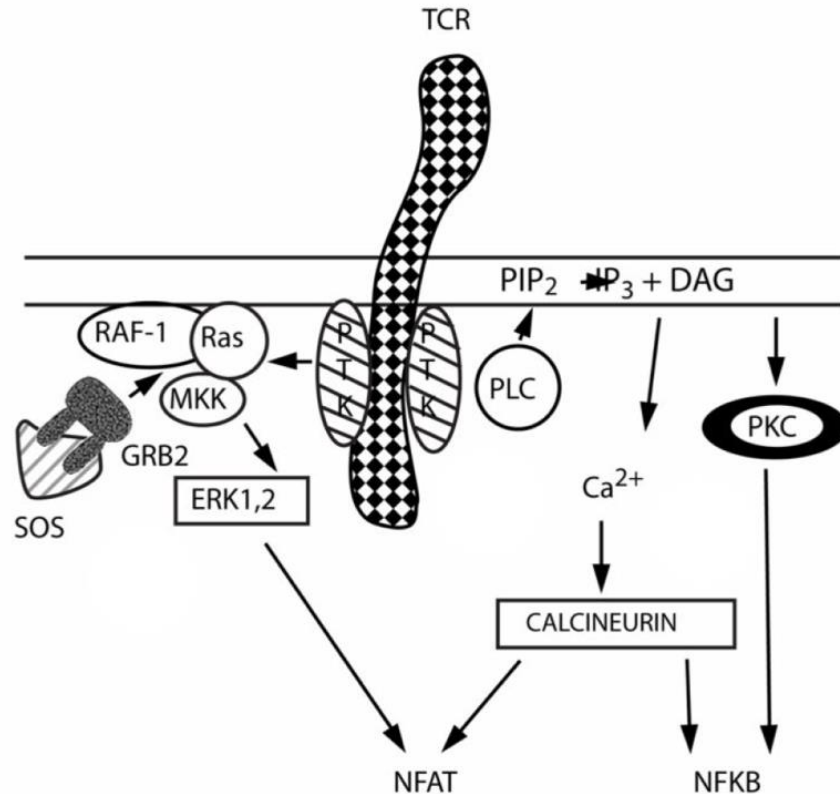
Se han identificado diferentes vías de señalización de los  $L_T$  para modificar la expresión génica y regular su función celular, siendo muchos de los pasos de estas vías objeto de bloqueo de la alorespuesta (*Figuras 3 y 4*). El R- $L_T$  induce la fosforilación de proteínas asociadas al R- $L_T$  como la cadena  $\zeta$  u otras proteínas adaptadoras, conduciendo a la activación de la vía de la calcineurina, la de la proteína quinasa C o la de la proteína quinasa activada por mitógenos Ras y Rac.

Tras la unión antigénica al R- $L_T$  se induce la fosforilación de la proteína asociada a  $\zeta$  de 70 kDa que conduce a la fosforilación de la fosfolipasa C  $\gamma$ 1 que hidroliza el fosfolípido de membrana fosfatidil 4,5-bifosfato en inositol 1,4,5-trifosfato



## Introducción

y diacilglicerol. El inositol 1,4,5-trifosfato conduce al aumento del calcio citosólico que se une a la calmodulina y forma un complejo que activa enzimas como la fosfatasa calcineurina. La calcineurina defosforila el factor nuclear de  $L_T$  activados permitiendo su traslocación intranuclear y su unión a secuencias reguladoras que aumentan la transcripción génica de diferentes citoquinas como el factor de crecimiento de  $L_T$  o IL-2. De estas vías intracelulares, la ruta de la calcineurina es la mejor caracterizada ya que es el lugar de acción de potentes agentes inmunosupresores como la ciclosporina A y el tacrólimus, conocidos como inhibidores de la calcineurina. La ciclosporina A y el tacrólimus inhiben la actividad de la calcineurina mediante su unión a proteínas intracelulares, la ciclofilina y la proteína de unión de FK, respectivamente (75).



**Figura 3. Señalización intracelular del R-L<sub>T</sub>.** (PKC: proteína quinasa C, TCR: receptor de L<sub>T</sub>, PLC: fosfolipasa C, PTK: proteína tirosín quinasa, NFAT: factor nuclear de L<sub>T</sub> activados). (Reproducido con permiso: Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591–619).

#### 2.2.2.2 Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>

La mayor parte de los L<sub>T</sub> maduros expresan en su superficie celular la proteína CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Las moléculas CD4 definen el subconjunto de L<sub>T</sub> conocido como cooperadores y se unen directamente al CMH de clase II. Las moléculas CD8 definen el subconjunto de L<sub>T</sub> citolíticos y se unen directamente al CMH de clase I. Sin embargo, existen excepciones en determinados sistemas en los que los L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> tienen función citotóxica y los L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> producen citoquinas reguladoras propias de los L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup>.

En general, los L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> median el reconocimiento inicial del aloinjerto y ayudan a amplificar y coordinar la respuesta inmunitaria posterior de los L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> y

## Introducción

CD8<sup>+</sup> efectores. Por ejemplo, en un modelo experimental de trasplante cardiaco, los ratones deficientes en L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> no podían rechazar los aloinjertos, mientras que los deficientes en L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> sí. Este es uno de los diferentes modelos en los que una respuesta de hipersensibilidad diferida mediada por L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> es suficiente para generar rechazo sin la función citolítica de los L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> (76). Sin embargo, en otros modelos experimentales, el bloqueo de los L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> previene el rechazo, sugiriendo la necesidad de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> para destruir el aloinjerto (77). Estos datos sugieren la superposición o redundancia de diferentes componentes en la respuesta inmunitaria frente a los aloinjertos para compensar los déficits específicos manteniendo la capacidad de rechazo del tejido trasplantado.

### 2.2.2.3 Respuestas tipo 1 y tipo 2 de los linfocitos T

Los L<sub>T</sub> activados producen diferentes citoquinas para regular el sistema inmunitario. La estimulación antigénica mantenida de los L<sub>T</sub> hace que se diferencien hacia uno de los dos perfiles celulares existentes en función de su producción de citoquinas. Los L<sub>T</sub> cooperadores de tipo 1 (L<sub>Th1</sub>) secretan citoquinas que incluyen la IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF). Estas citoquinas estimulan la respuesta de hipersensibilidad diferida, la actividad citolítica y la producción de inmunoglobulinas (Ig) G opsonizantes y fijadoras del complemento. Los L<sub>T</sub> cooperadores de tipo 2 (L<sub>Th2</sub>) secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 necesarias para la activación de los eosinófilos y la estimulación de la producción de Ig E. El IFN- $\gamma$  y la IL-12 promueven la diferenciación a respuestas de tipo 1, mientras que la IL-4 a tipo 2. Adicionalmente, el IFN- $\gamma$  inhibe la respuesta tipo 2 y la IL-4 la respuesta tipo 1 por lo que una vez iniciada, la respuesta se polariza (78).

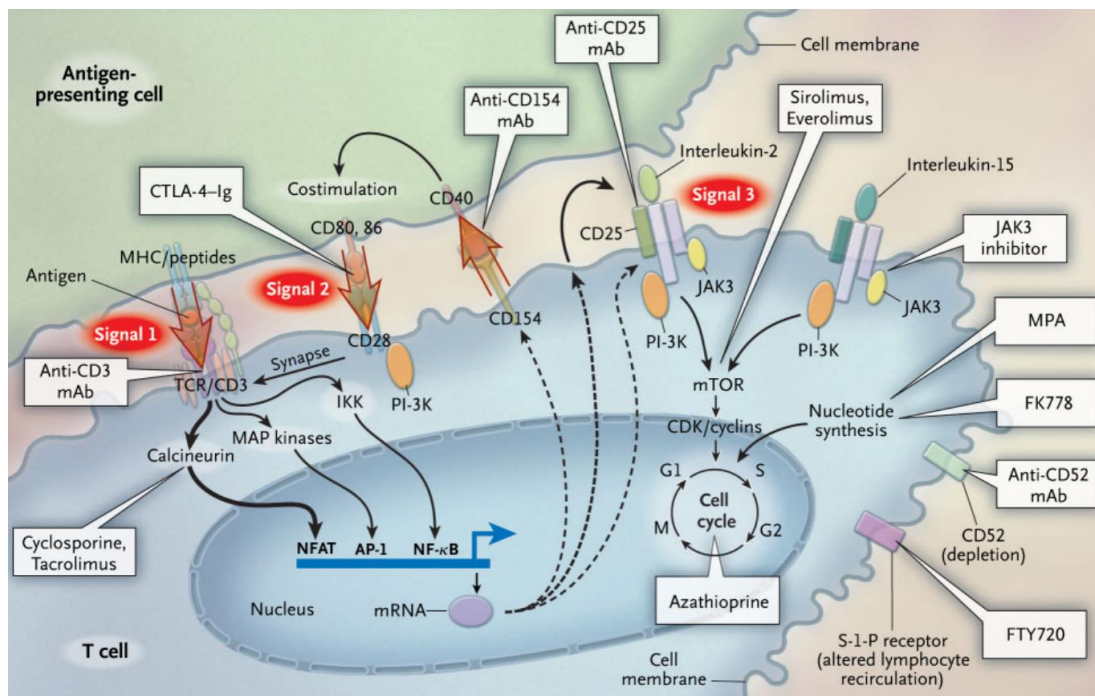
Se ha hipotetizado que las respuestas por  $L_{Th1}$  conducen al rechazo mientras que las respuestas por  $L_{Th2}$  pueden mediar en la tolerancia. Esta hipótesis se basa en parte en los hallazgos que las citoquinas implicadas en la respuesta tipo 1 promueven funciones efectoras como la respuesta de hipersensibilidad diferida y la actividad citolítica, mientras que las implicadas en la respuesta tipo 2 antagonizan estas acciones (78,79). Varios estudios experimentales han mostrado que el RA se asociaría con una expansión de las citoquinas tipo 1 mientras que la supervivencia prolongada del aloinjerto se asociaría con niveles reducidos de estas citoquinas (80). Sin embargo, otros estudios han mostrado que el rechazo estaría asociado con la producción de citoquinas tanto de tipo 1 como de tipo 2, mientras que la tolerancia se asociaría con una disminución de ambos tipos de citoquinas (80). Se ha reportado un tercer tipo de perfil en la producción de citoquinas mediante la producción de IL-17 por los  $L_T$ . Esta respuesta  $Th17$  parece tener un fuerte efecto inflamatorio, pudiéndose convertir en una de las dianas farmacológicas frente al rechazo (81).

#### 2.2.2.4 Coestimulación del linfocito T: El modelo de la triple señal

La activación y proliferación de los  $L_T$  se desarrolla a través de una secuencia de pasos conocidos como el “modelo de la triple señal”. La primera señal se produce por el reconocimiento específico entre el  $R-L_T$  y la unión del antígeno al CMH en una CPA, siendo transducida a través del complejo CD3 (82). La segunda señal es una señal coestimuladora no específica proporcionada por moléculas accesorias que mantienen la adhesión celular y cooperación con las señales iniciadoras del  $R-L_T$  en el proceso de activación linfocitaria. La adhesión celular se produce entre los  $L_T$  y las CPA durante el tiempo que dura el muestreo antigénico entre el  $R-L_T$  y la CPA. Entre las moléculas de adhesión más importantes para la activación celular se encuentran las integrinas, particularmente el antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1) presente

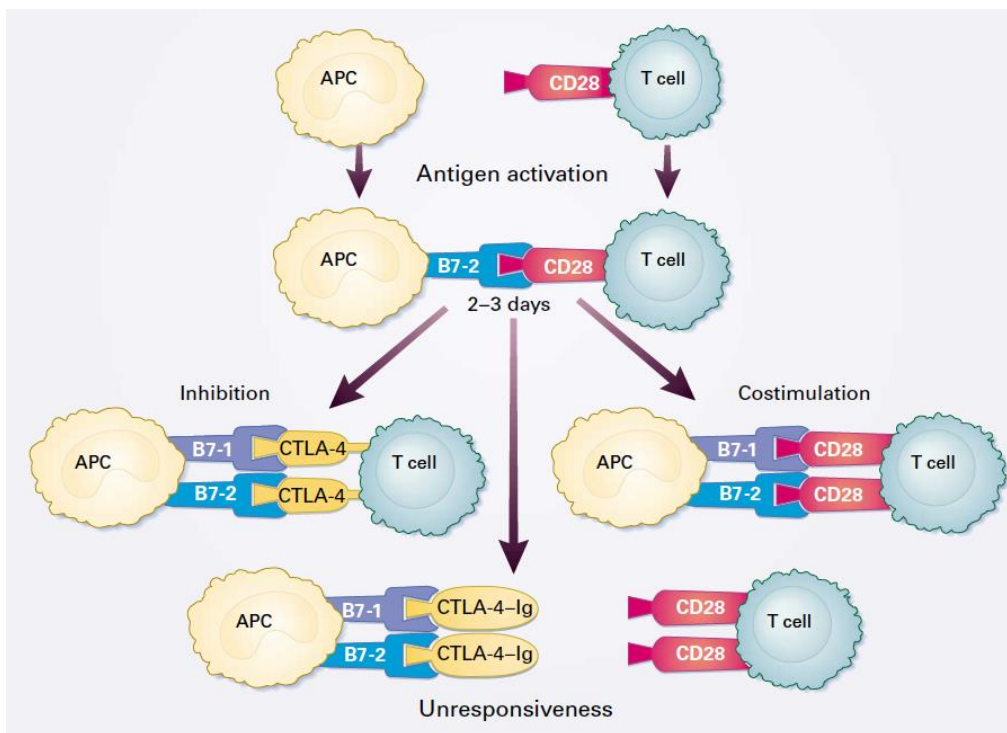
## Introducción

en los  $L_T$  que se une a ICAMs en las CPA. La segunda señal regula la expansión clonal y diferenciación de los  $L_T$  a través de la familia de moléculas B7/CD28 (83). Estas dos señales activan la vía intracelular que conduce a la expresión de IL-2 y otras citoquinas promotoras del crecimiento celular. La estimulación del receptor de la IL-2 (CD25) conduce a la activación de mTOR y proporciona la tercera señal que desencadena la proliferación celular (*Figura 2*) (82).



**Figura 4. Dianas de los fármacos inmunosupresores integradas en el modelo de la triple señal.** Las tres señales aparecen marcadas en rojo (signal). Antigen-presenting cell: célula presentadora de antígenos; mAb: anticuerpo monoclonal; T cell: célula T; MHC/peptides: complejo mayor de histocompatibilidad/péptidos; TCR: receptor de linfocito T; synapse: sinapsis; nucleus: núcleo; costimulation: coestimulación; cell membrane: membrana celular; signal: señal; interleukin: interleuquina; inhibitor: inhibidor; nucleotide synthesis: síntesis de nucleótidos; cell cycle: ciclo celular; depletion: depleción; mTOR: diana de la rapamicina de los mamíferos; MPA: ácido micofenólico; NF: factor nuclear (Reproducido con permiso: Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715-29, Copyright Massachusetts Medical Society).

CD28 se expresa en la mayoría de los  $L_T$  y su unión al ligando aumenta la proliferación de  $L_T$  mediante una variedad de mecanismos que incluyen la producción de IL-2, entre otras citoquinas. Las CPA expresan dos ligandos para CD28 que son B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86). La expresión de ambas moléculas B7 tiene una regulación positiva en las CPA que han sido activadas por una variedad de estímulos inflamatorios incluidas infecciones microbianas y citoquinas. Las moléculas B7-1 y B7-2 también inhiben la proliferación de los  $L_T$  al unirse al antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) (Figura 5) (70).



**Figura 5. Funciones de las moléculas CD28, B7-1, B7-2 y CTLA-4.** Los  $L_T$  en reposo expresan CD28, pero las CPA en reposo no expresan B7. Dentro de las seis horas posteriores a la activación, B7-2 es expresado por CPA, estando disponible para unirse a CD28, transmitiendo una señal coestimuladora al  $L_T$ . De 48 a 72 horas después de la activación, las CPA también expresan B7-1, mientras que los  $L_T$  expresan el receptor inhibitorio de CTLA-4. Tanto B7-1 como B7-2 pueden unirse a CD28 o CTLA-4, proporcionando una estimulación continua o una nueva señal inhibitoria, respectivamente. Debido a que CTLA-4 se une a las moléculas B7 con una afinidad más alta que la de CD28, su interacción inhibitoria predomina, finalizando la respuesta inmunitaria. La proteína de fusión CTLA-4-Ig puede competir con CD28 y CTLA-4 por el enlace de B7, evitando así las interacciones coestimuladoras. (Reproducido con permiso: Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. Epstein FH, editor. *N Engl J Med*. 1998 Jun 18;338(25):1813–21, Copyright Massachusetts Medical Society).

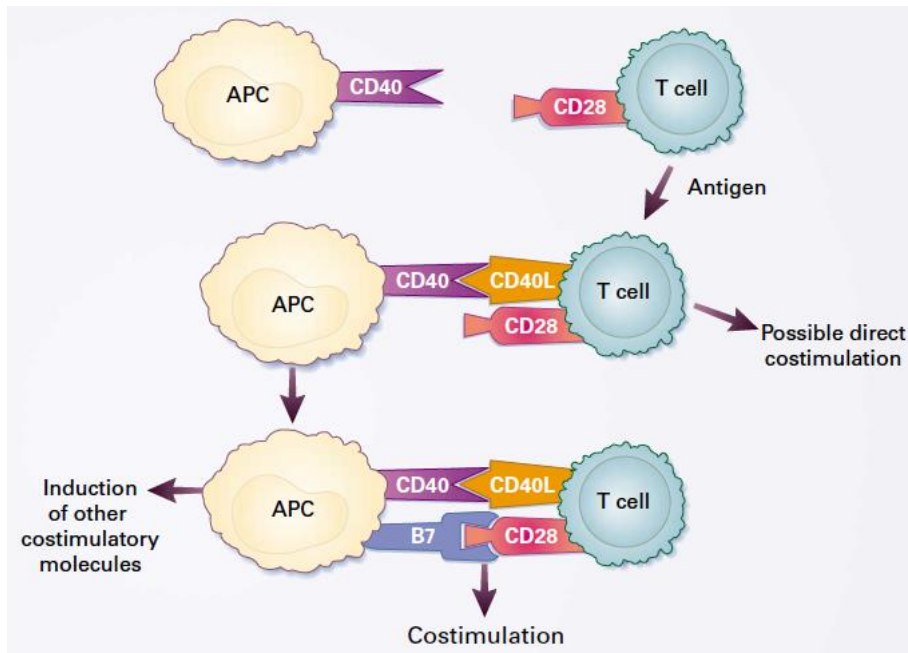
## Introducción

Los fármacos inmunosupresores actuales son extremadamente potentes y bloquean el rechazo del aloinjerto, pero ninguno de ellos es específico frente al antígeno, por lo que también suprimen la respuesta inmunitaria frente a otros antígenos.

El objetivo de la inmunología del trasplante es bloquear específicamente la respuesta frente a antígenos del aloinjerto sin producir IS global. Un enfoque para este objetivo es inducir anergia de los  $L_T$  o falta de respuesta específica frente a antígenos. Los modelos in vitro demuestran que una forma de inducir anergia es proporcionar una señal antigénica específica a través del R- $L_T$  en ausencia de coestimulación CD28. En estos modelos, la posterior exposición celular a las señales del R- $L_T$  y su coestimulación a través del CD28 ya no podrían activar al  $L_T$  (70).

En una amplia variedad de modelos experimentales animales y en ensayos clínicos preliminares en humanos, el bloqueo de las moléculas B7 prolonga significativamente la supervivencia del aloinjerto. (84,85) Sin embargo, en la mayor parte de los modelos in vivo, la anergia limitada a antígenos específicos ha sido difícil de demostrar. Una razón de esta dificultad puede ser la complejidad de la señal coestimuladora. Por ejemplo, cada vez hay mayor evidencia sobre la unión a CTLA-4 y la inducción de tolerancia debido a la señal inhibitoria de CTLA-4 (86).

Otra interacción molecular crítica en la respuesta inmunitaria es la que se produce entre la molécula CD40 en las CPA y su ligando (CD154, CD40L) presente en los  $L_T$ . Su unión juega un papel crítico en la activación de los  $L_B$ , las células dendríticas y los monocitos, además de producir una regulación positiva en la expresión de B7 (*Figura 6*) (70).



**Figura 6. Relaciones entre las vías de CD28 y CD40LCD40L.** Las CPA en reposo expresan CD40. Cuando los  $L_T$  se activan expresan CD40L. Las interacciones entre CD40 y CD40L son importantes para la ayuda de los  $L_B$  previniendo la apoptosis e induciendo la producción de Ig y el cambio de isotipo. La activación de CD40 en las CPA proporciona una señal para la inducción de moléculas B7, particularmente B7-2. CD40L puede actuar en la coestimulación de los  $L_T$  proporcionando directamente su estimulación, induciendo B7 o induciendo otros ligandos estimuladores. (Reproducido con permiso: Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. Epstein FH, editor. *N Engl J Med*. 1998 Jun 18;338(25):1813–21, Copyright Massachusetts Medical Society).

### 2.2.2.5 Linfocitos B

La importancia de los  $L_B$  y los Ac en el rechazo del aloinjerto tiene su mayor expresión en el rechazo hiperagudo. Este tipo de rechazo se produce a las pocas horas del trasplante en pacientes sensibilizados. Los anticuerpos desarrollados por el receptor pueden surgir tras embarazos, transfusiones entre grupos ABO no compatibles o trasplantes previos (87). Actualmente el rechazo hiperagudo es raro debido a que se realiza la tipificación sanguínea ABO y pruebas cruzadas para detectar estos Ac antes de llevar a cabo el trasplante. Sin embargo, algunos episodios de rechazo mediado por Ac pueden ocurrir tras 24 horas del trasplante, presumiblemente por bajos niveles de Ac



## Introducción

circulantes que se hayan pasado por alto tras el ensayo cruzado o debido a la reactivación de  $L_B$  de memoria. Sin embargo, más frecuente que el rechazo puro mediado por Ac es el rechazo mixto, celular y mediado por Ac. El componente celular se debe fundamentalmente a  $L_T$  que activan los  $L_B$  para producir Ac y contribuir a la destrucción del aloinjerto. El componente de rechazo mediado por Ac se identifica en muestras de biopsia mediante la presencia de la proteína del complemento C4d (88). Aunque los hallazgos histológicos son variables, la presencia del C4d parece correlacionarse con la presencia de Ac específicos del donante. Los Ac también pueden jugar un papel importante en el RC (89).

### **2.2.3 Mecanismos efectores en la destrucción del aloinjerto**

Los  $L_T$   $CD4^+$  juegan un papel crítico en la regulación de la respuesta efectora tras el reconocimiento de las moléculas del CMH de clase II en las CPA. La activación antigénica específica de los  $L_T$   $CD4^+$  conduce a la expresión de moléculas de superficie celular y de citoquinas que, a su vez estimulan aún más a los monocitos. Esta cooperación entre los  $L_T$   $CD4^+$  y los monocitos, o respuesta de hipersensibilidad diferida, juega un papel importante en la destrucción del aloinjerto (90).

La activación de los  $L_T$   $CD4^+$  y la producción de citoquinas también estimula la activación y proliferación de  $L_T$   $CD8^+$  citolíticos y células NK. Los  $L_T$   $CD8^+$  producen la muerte celular del aloinjerto mediante la liberación de factores citotóxicos solubles como granzimas y perforinas, y mediante la regulación positiva del ligando de Fas en los  $L_T$ , que se une a Fas (CD95) en las células diana produciendo apoptosis o muerte celular programada (91).

La producción de citoquinas por los  $L_T CD4^+$  también estimulan a los  $L_B$ . La unión de un antígeno específico al receptor de los  $L_B$  o Ig de superficie produce su proliferación y diferenciación a células plasmáticas, las cuales liberan Ig solubles que se pueden unir a las células alogénicas. Las Ig pueden producir daño celular mediante la fijación del complemento o mediante citotoxicidad celular dependiente de Ac (92).

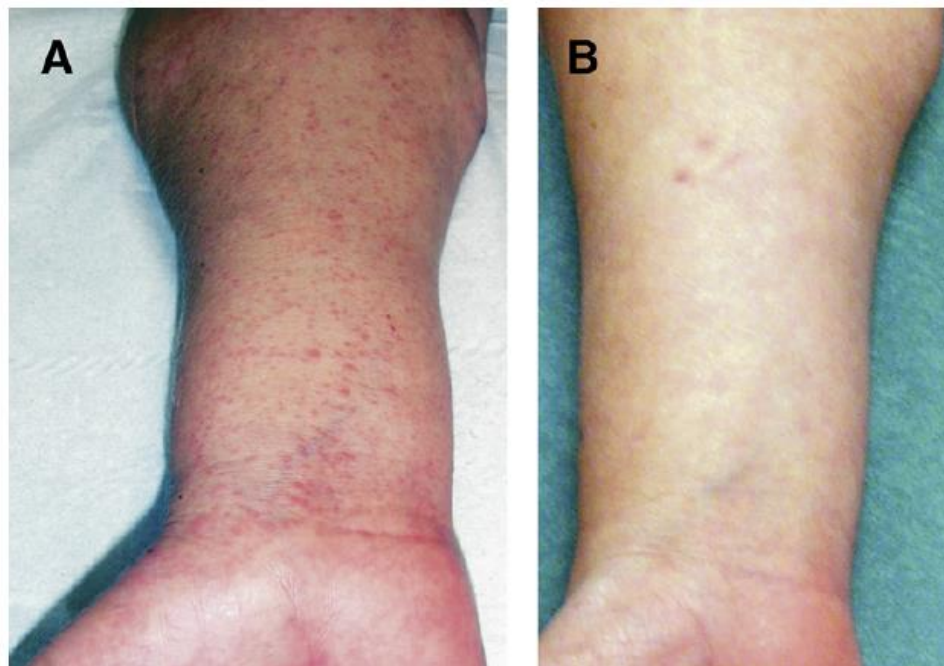
## **2.3 TIPOS DE RECHAZO**

### **2.3.1 Rechazo agudo**

Los TTC están formados por tejidos histogenéticamente diferentes que incluyen piel, tejido conectivo, músculo, hueso, médula ósea, nervios y vasos sanguíneos (93). La piel ha sido considerada la más antigénica de todos ellos en la escala relativa de antigenicidad de tejidos y órganos propuesta por Murray (25). Sin embargo, en base a estudios experimentales, algunos autores han concluido que no hay un tejido antigénicamente dominante en un TTC sino que todo el aloinjerto produce una respuesta inmunitaria menos intensa que cada tejido que lo compone por separado (94).

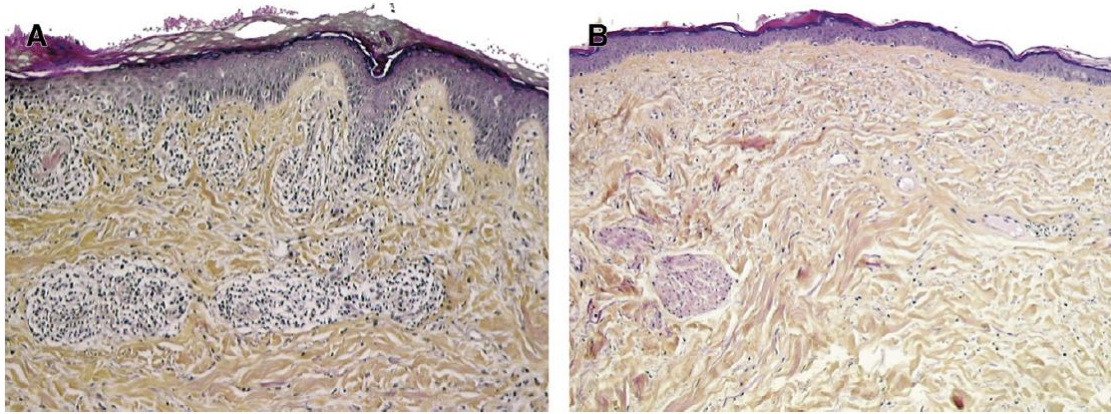
Los primeros signos clínicos de RA se manifiestan en la piel, la sospecha se basa en la inspección visual y la confirmación es mediante su examen histológico. Sin embargo, es incierto si la respuesta inmunitaria dominante está realmente dirigida hacia la piel ya que la información de la participación de los demás componentes del aloinjerto es difícil de obtener. De hecho, hay mucha menos información disponible en los hallazgos patológicos de los tejidos profundos durante los episodios de RA; e incluso parece que durante los episodios de rechazo severo, los cambios encontrados en músculos, nervios, huesos y tendones, son menos severos que los presentes en la piel (57,95).

Los episodios de RA en la piel se manifiestan clínicamente como máculas eritematosas, enrojecimiento difuso o pápulas asintomáticas sobre la piel del aloinjerto. (95,96) Microscópicamente muestran cambios característicos, aunque no específicos, que afectan principalmente a la dermis y epidermis, pudiendo extenderse a la hipodermis en casos de rechazo severo (*Figuras 7 y 8*) (93). Los cambios iniciales son un infiltrado linfocitario perivascular en la dermis superficial y media, predominantemente de  $L_T$   $CD3^+/CD4^+$ , con proporciones menores de  $L_T$  citotóxicos  $CD8^+$  y  $TIA-1^+$ ,  $L_T$  reguladores  $FoxP3^+$  y, ocasionalmente, células histiomonocíticas  $CD68^+$  del receptor (97).



**Figura 7.** (A) Rechazo de un aloinjerto de tejido compuesto manifestándose como una erupción maculopapulosa eritematosa en. (B) Mismo paciente después del tratamiento del rechazo. (Reproducido con permiso: Morelon E, Kanitakis J, Petruzzo P. Immunological Issues in Clinical Composite Tissue Allotransplantation. *Transplantation*. 2012 May;93(9):855–9.)

## Introducción



**Figura 8. Histología de la piel durante el episodio de RA.** (A) Rechazo que se manifiesta con un denso infiltrado dérmico perivascular que llega a la epidermis (grado 3 de Banff). (B) Mismo paciente después del tratamiento del rechazo. La piel muestra un aspecto normal (grado 0 de Banff). (Reproducido con permiso: Morelon E, Kanitakis J, Petruzzo P. Immunological Issues in Clinical Composite Tissue Allotransplantation. *Transplantation*. 2012 May;93(9):855–9.)

En episodios severos de rechazo este infiltrado puede ocupar la dermis e invadir la epidermis (exocitosis). En las fases iniciales del RA la epidermis está preservada, sin embargo, en fases más avanzadas muestra exocitosis y necrosis de queratinocitos o apoptosis asociada a la vacuolización de queratinocitos basales. Es más rara la presencia de espongiosis (edema intercelular) o cambios liquenoides (hiperqueratosis ortoqueratósica, hipergranulosis, acantosis e infiltrado subepidérmico en forma de banda), similar a los observados en la enfermedad injerto contra huésped (EICH) liquenoide. En episodios muy severos de rechazo, la epidermis y sus apéndices como los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas muestran necrosis extensa, e incluso este infiltrado puede extenderse a la hipodermis y contener eosinófilos. Se ha establecido una clasificación específica en cinco grados de severidad para evaluar la gravedad del RA, conocida como Banff Score 2007 (*Tabla 1*) (98).

<b>Tabla 1. Banff Score 2007</b>	
<b>Grado 0 (sin rechazo)</b>	Sin infiltrados inflamatorios o poco frecuentes
<b>Grado I (rechazo leve)</b>	Infiltrado perivascular leve. No afectación de la epidermis suprayacente.
<b>Grado II (rechazo moderado)</b>	Inflamación perivascular moderada-severa con o sin afectación leve epidérmica y anexial (limitada a espongiosis y exocitosis). No hay disqueratosis epidérmica o apoptosis.
<b>Grado III (rechazo severo)</b>	Inflamación dérmica densa asociada con afectación epidérmica (vacuolización de queratinocitos basales, apoptosis de queratinocitos, necrosis).
<b>Grado IV (RA necrosante)</b>	Necrosis franca de la epidermis u otras estructuras de la piel

Los cambios patológicos producidos no son específicos para el RA, pudiendo encontrarse también en diferentes dermatosis inflamatorias, infecciosas o proliferativas.

(99) Las técnicas auxiliares se aplican para intentar aumentar la especificidad diagnóstica del RA, mediante el inmunofenotipado de las células del infiltrado o la detección de C4d en la piel del aloinjerto. La composición del infiltrado celular no es discriminatoria ya que es similar al encontrado en la mayoría de las reacciones cutáneas inflamatorias. La presencia de L<sub>T</sub> reguladores FoxP3+, detectados en el aloinjerto años después del trasplante no tiene un factor pronóstico claro (100). La presencia de depósitos de C4d en la piel tiene un significado controvertido. Algunos autores detectan estos depósitos excepcionalmente en la piel y mucosa del aloinjerto (101). Algunos estudios han reportado estos depósitos en la piel con y sin signos de RA, en ausencia de Ac específicos del donante (102,103). Por otra parte, los depósitos vasculares de C4d se pueden encontrar en dermatosis inflamatorias no relacionadas con el rechazo. Por lo tanto, parece que los mecanismos humorales no juegan un papel significativo en el RA de TTC y que la detección de C4d en el diagnóstico de rechazo de los TTC es cuestionable. Además, en estudios experimentales de TTC, no hay clara evidencia de una alorespuesta mediada por Ac (104).

## Introducción

Aunque los fármacos inmunosupresores utilizados en el TOS generalmente aseguran la viabilidad de los TTC, la mayor parte de los pacientes experimentan al menos un episodio de RA en el primer año tras el trasplante. De acuerdo con el Registro Internacional de Trasplantes de Mano y de Tejidos Compuestos el 85% de los trasplantes de mano y el 54,5% de los trasplantes de cara presentan al menos un episodio de RA durante el primer año postrasplante (105). Por otra parte, la alta tasa de episodios de RA en TTC podría deberse al fácil diagnóstico de estos episodios ya que las lesiones se visualizan y se confirman histológicamente de forma relativamente sencilla en muestras de biopsia tomadas tras la inspección visual directa. A pesar de la alta incidencia de episodios de RA, la tasa de supervivencia de los aloinjertos alcanza el 96% tras 1 año (105).

Los episodios tardíos de RA suelen ocurrir en pacientes con falta de adherencia al tratamiento inmunosupresor, tras la disminución de su dosis o después de una infección viral, sobre todo por citomegalovirus (106,107). Es interesante destacar que la infección por virus herpes simplex precedió los episodios de RA en los receptores de trasplante de cara, lo que sugiere que la infección viral podría activar las células presentadoras de antígeno durante un proceso inflamatorio que conduce al RA (105,108). Todos los episodios de RA fueron reversibles en aquellos pacientes en los que fue diagnosticado y tratado de forma precoz. La elección del tratamiento en los episodios de RA se basa en el grado de la clasificación de Banff, la frecuencia de los episodios y la sensibilidad al tratamiento esteroideo (105). En la mayoría de los casos, los episodios se revirtieron tras aumentar la dosis de esteroides orales (12,9%), tras su administración intravenosa (87%) o con la administración de Ac policlonales (Timoglobulina) o monoclonales (Campath-1H).

En la actualidad no hay evidencia suficiente para afirmar que el rechazo subclínico, definido por infiltración microscópica de la piel en ausencia de signos clínicos de rechazo, deba tratarse para reducir el riesgo de RC, sin embargo estos pacientes deben ser cuidadosamente monitorizados (93).

### **2.3.2 Rechazo crónico**

#### *2.3.2.1 Rechazo crónico en TOS*

Aunque no existe una definición formal y universal de RC en TOS, este término generalmente designa el fracaso terminal del aloinjerto, que suele suceder meses o años tras el trasplante, después de una disminución progresiva de la función del órgano (109). El RC en TOS constituye la causa principal de la pérdida tardía del aloinjerto y puede manifestarse de diferentes maneras según el tipo de órgano trasplantado. El RC se debe principalmente a una lesión inmunológica del receptor frente al aloinjerto, aunque también hay mecanismos no inmunológicos implicados, como lo demuestran los casos de pérdida tardía del aloinjerto en gemelos idénticos (110). La susceptibilidad del órgano trasplantado al RC varía de acuerdo a su inmunogenicidad y su capacidad para resistir y reparar el daño tisular inducido por los mediadores celulares o humorales del proceso (111). Entre los factores inmunológicos implicados en el RC de aloinjertos renales se incluyen los episodios repetidos de RA, la sensibilización del receptor, incompatibilidades en el CMH, tratamiento inmunosupresor insuficiente, y toxicidad de los inhibidores de la calcineurina. Los factores no inmunológicos incluyen tiempos prolongados de isquemia del aloinjerto previos al trasplante, infección o reactivación del citomegalovirus, hipertensión, tabaquismo e hiperlipidemia. Aunque los cambios



## Introducción

patológicos difieren según el órgano considerado, una característica frecuente del RC es la lesión de los vasos sanguíneos, principalmente el endotelio, que conduce a la vasculopatía del aloinjerto y se manifiesta como proliferación miointimal y estrechamiento progresivo de la luz arterial, lo que resulta en cambios isquémicos en el parénquima del aloinjerto, fibrosis, disfunción y eventualmente pérdida del órgano trasplantado (112). Se cree que el rechazo mediado por Ac es uno de los principales mecanismos que conducen al RC en el trasplante renal y posiblemente también en el cardíaco (113). Los anticuerpos específicos frente al CMH del donante presentes en el receptor se unen a las células endoteliales del aloinjerto e inducen el daño vascular a través de la activación de la vía del complemento, sugeridos por los depósitos de C4d en el endotelio del aloinjerto, sin embargo también existe el rechazo sin depósitos de C4d (112,114). En los órganos susceptibles, el rechazo mediado por Ac puede manifestarse por diferentes fenotipos que van desde la disfunción clínicamente aparente del aloinjerto en los episodios de rechazo mediado por Ac agudo, generalmente en relación con la lesión mediada por el complemento de los vasos del aloinjerto; a la inflamación persistente del árbol vascular que conduce al desarrollo progresivo de arteriosclerosis del aloinjerto y su pérdida de función en los episodios de rechazo mediado por Ac crónico (115-118).

### 2.3.2.2 Rechazo crónico experimental en trasplantes de tejidos compuestos

Un número limitado de estudios han abordado el tema del RC en modelos animales de TTC (ratas y primates no humanos), donde el rechazo fue inducido bien por la discontinuación periódica del tratamiento inmunosupresor o por la ausencia de tratamiento (119-121).

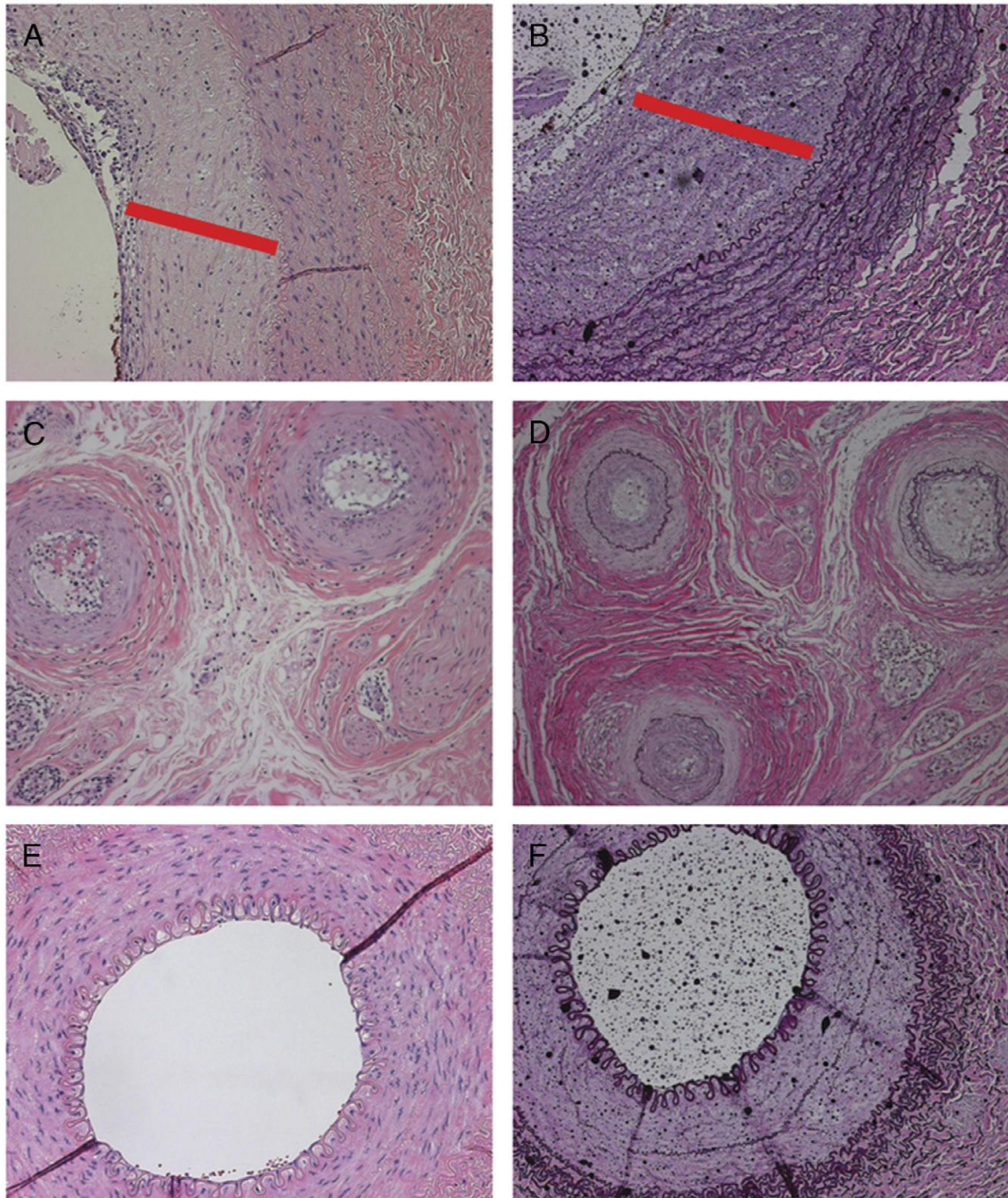
En un modelo experimental de trasplante ortotópico de pata posterior de rata, los episodios repetidos de RA producidos por ciclos de discontinuación/reintroducción de la terapia inmunosupresora produjo episodios consecutivos de RA y finalmente a los 90 días tras el trasplante se observó vasculopatía de aloinjerto con proliferación miointimal vascular distal y oclusión luminal, atrofia del pelo, adelgazamiento dérmico, fibrosis de las glándulas sebáceas, fibrosis atrófica de los miocitos, y esclerosis ósea. No se encontró una asociación entre estas características claramente sugestivas de RC y la presencia de Ac específicos frente al donante o depósitos tisulares de C3 (C4d no fue estudiado). Los resultados de este trabajo sugieren que los episodios múltiples de RA favorecen el desarrollo de RC (119).

Un modelo experimental de trasplante heterotópico de pata posterior de rata observó una asociación entre la isquemia fría y el RC. La intensidad del rechazo y su progresión vascular distal se relacionó significativamente con el frío (122).

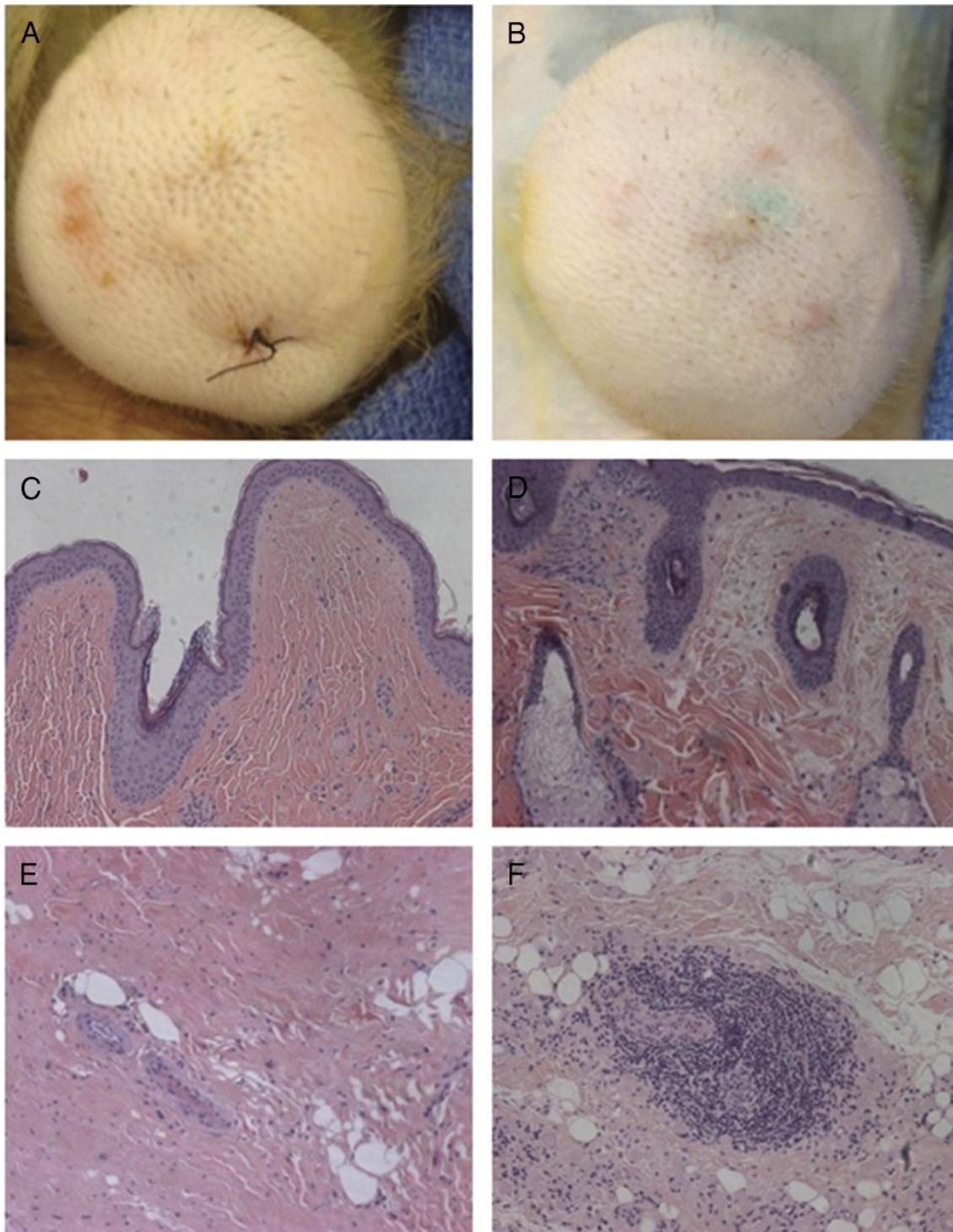
También se identificaron cambios sugestivos de RC en dos modelos experimentales de TTC en primates no humanos, uno de ellos fue un trasplante de peroné y el otro un trasplante facial heterotópico (120,121). En estos modelos, los cambios sugestivos de RC incluyeron la hiperplasia miointimal (presente tanto en vasos de pequeño como de gran calibre del aloinjerto), fibrosis de la pared vascular, oclusión luminal, desarrollo de nódulos linfoides similares a órganos linfoides terciarios en el tejido subcutáneo, y linfedema y fibrosis del aloinjerto evidenciado por imágenes de resonancia magnética y examen histopatológico (*Figura 9*). Estos cambios sugestivos de RC se desarrollaron ocasionalmente a pesar de una estabilidad clínica y la ausencia de episodios cutáneos de RA, sugiriendo que el RC puede desarrollarse en ausencia de

## Introducción

RA en la piel (*Figura 10*) (98,120,123). En ambos trabajos, la presencia de aloanticuerpos IgG e IgM y los depósitos de C4d no fueron prominentes.



**Figura 9. Imágenes representativas de la hiperplasia de la íntima arterial.** A y B, aloinjerto de carótida común. Arteria que muestra una hiperplasia intimal marcada (barras rojas). Tinción hematoxilina-eosina (A) y tinción elástica (B), aumento original, x10. C y D, hiperplasia de la íntima en vasos distales de pequeño calibre. Tinción hematoxilina-eosina (C) y tinción elástica (D), aumento original, x20. E y F, arteria femoral receptora (control) con íntima inalterada. Tinción hematoxilina-eosina (E) y tinción elástica (F), aumento original, x10. (Reproducido con permiso: Munding GS, Munivenkatappa R, Drachenberg CB, Ha JS, Vaca EE, Shipley ST, et al. Histopathology of Chronic Rejection in a Nonhuman Primate Model of Vascularized Composite Allotransplantation. *Transplantation*. 2013 May 27;95(10):1204–10.)



**Figura 10. Discrepancia en los hallazgos entre tejidos superficiales y profundos en animales con RC.** A pesar de una apariencia clínica estable (A y B) y ausencia de rechazo cutáneo (grado 0 de Banff 0; C y D) entre los días 260 (columna izquierda) y 312 (columna derecha) del postoperatorio, las biopsias profundas que obtienen tejido subcutáneo (E y F) revelan el desarrollo de folículos linfoides terciarios. Tinción hematoxilina-eosina, aumento de piel original, x 2,5; Ampliación de tejido profundo original, x 10. (Reproducido con permiso: Mundinger GS, Munivenkatappa R, Drachenberg CB, Ha JS, Vaca EE, Shipley ST, et al. Histopathology of Chronic Rejection in a Nonhuman Primate Model of Vascularized Composite Allotransplantation. *Transplantation*. 2013 May 27;95(10):1204–10.)

### 2.3.2.3 Rechazo crónico clínico en trasplantes de tejidos compuestos

Hasta el momento no existe una definición formal de RC en TTC en humanos debido a la limitación de los datos clínicos disponibles (57,124-127). En comparación con el TOS, los datos relativos al RC en TTC en humanos son mucho más escasos debido al menor número de pacientes y al seguimiento más corto disponible. Las características clinicopatológicas del RC se han reportado en algunos TTC clínicos pero la verdadera incidencia del RC en este contexto aún no se ha establecido. Inicialmente se consideró que la incidencia era menor que en el TOS, a pesar de una frecuencia aparentemente mayor de episodios de RA. Una explicación posible podría ser el diagnóstico y tratamiento precoz de los episodios de RA en los TTC ya que se manifiestan principalmente en la piel y es fácil de detectar macroscópicamente y confirmar mediante biopsia. Esto contrasta con el TOS, donde el diagnóstico de rechazo no se realiza macroscópicamente y se basa principalmente en datos analíticos que reflejan la disfunción del aloinjerto, ya que las biopsias en estos tipos de trasplante son más difíciles de obtener en comparación con la piel.

Por otra parte, muchos TTC contienen médula ósea que podría inducir quimerismo en la sangre periférica, y así promover la tolerancia del TTC al menos en modelos animales (128). En humanos, el quimerismo en sangre periférica generalmente no es detectable o detectable solo de manera transitoria (93,129). A pesar de estos hechos, con un número creciente de TTC y un mayor tiempo de seguimiento, se podrían esperar más casos de RC, de hecho pacientes receptores de trasplantes de mano y cara muestran en sus aloinjertos cambios histopatológicos sugestivos de RC similares a los del TOS y modelos experimentales de TTC (125,130,131). El RC se produjo en la mayoría de los casos por una disminución o interrupción del tratamiento

inmunosupresor, por falta de adherencia terapéutica del paciente o por complicaciones relacionadas con el tratamiento (127).

Las características clínicopatológicas del RC en los TTC humanos son variables y sobre todo afectan a la piel y los vasos. Las lesiones incluyen placas escamosas psoriasiformes, lesiones cutáneas purpúricas o equimóticas, úlceras necróticas, induración cutánea esclerodermiforme con lesiones discrómicas similares a la EICH, afinamiento de los dedos y pérdida ungueal (124,125,127,130). Patológicamente, una de las características más comunes y más grave del RC en los TTC es el daño vascular, manifestándose en modelos animales y en TOS como proliferación miointimal de las arterias, disminución de la luz vascular y obstrucción al flujo arterial que se traduce en un daño isquémico al aloinjerto. Estos cambios, referidos como vasculopatía del aloinjerto se han documentado histopatológicamente en arterias radial y cubital, en el injerto de piel centinela y en los vasos sinoviales del aloinjerto de rodilla (124-126). Se ha observado vasculopatía del aloinjerto en vasos de mediano calibre de la piel de dos pacientes trasplantados de mano. Uno de los pacientes discontinuó voluntariamente el tratamiento y el otro lo desarrolló tras 10 años de evolución favorable con solo dos episodios documentados de RA (125,132). Este último caso sugiere que el RC en el TTC humano puede desarrollarse de manera insidiosa en ausencia de varios episodios o episodios graves de RA.

Respecto al trasplante facial se han informado recientemente cambios de RC que se desarrollaron como resultado de discontinuaciones repetidas en el tratamiento inmunosupresor debido a complicaciones neoplásicas (linfoma inducido por el virus de Epstein-Barr y tumor de células lisas postrasplante asociado al virus de Epstein-Barr) que necesitaron tratamiento quimioterápico (127). El RC fue favorecido probablemente por el control insuficiente de la respuesta inmunitaria debido al inadecuado tratamiento

## Introducción

inmunosupresor que condujo a la aparición de un RA continuo. El RC se manifestó progresivamente por cambios discrómicos en la piel de la cara y el injerto de piel centinela e induración esclerótica significativa que condujo a la pérdida de función del aloinjerto. Patológicamente, la piel mostró esclerosis dérmica difusa, esclerosis y adelgazamiento de los capilares dérmicos, atrofia epidérmica y de las glándulas sudoríparas, vacuolización de las células basales e incontinencia melánica en ausencia de infiltración celular significativa. Este paciente no presentaba anticuerpos específicos frente al donante circulantes ni depósitos de C4d en los vasos de la piel.

### 2.3.2.4 Mecanismos patogénicos del rechazo crónico

Estos mecanismos siguen siendo poco conocidos y posiblemente incluyen factores inmunológicos y no inmunológicos (*Tabla 2*) (133,134).

<b>Tabla 2. Factores propuestos e interrelacionados con el desarrollo de RC en TTC</b>	
<b>Inmunológicos</b>	<b>No inmunológicos</b>
Diferencias en el CMH donante-receptor	Tipo de trasplante
Número y grado de episodios de RA	Traumatismo mecánico
Rechazo mediado por L <sub>T</sub>	Grado de resistencia vascular del flujo del aloinjerto
Rechazo mediado por Ac	Grado de regeneración linfática donante-receptor
Contenido relativo de piel del aloinjerto	Denervación del aloinjerto
Contenido relativo de MO del aloinjerto	Lesión isquémica por oclusión de la luz arterial
Estado inmunológico frente a citomegalovirus	
Infección	

El tratamiento inmunosupresor en dosis insuficientes puede conducir al desarrollo de RC (124,125,127,130,131). En TTC experimentales, el RC puede

producirse tras episodios repetidos de RA y parece probable que este escenario también sea válido en algunos casos de TTC en humanos (119). Sin embargo, algunos pacientes desarrollaron RC sin haber sufrido episodios frecuentes o graves de RA. Este hecho sugiere que la ausencia de episodios frecuentes de RA no previene necesariamente el desarrollo de RC; y que el RA y el RC podrían deberse en parte a mecanismos diferentes (124).

Los factores inmunológicos que podrían favorecer el RC en TTC incluyen incompatibilidad CMH entre donante-receptor, número y grado de episodios de RA, rechazo mediado por  $L_T$ , rechazo mediado por anticuerpos, contenido relativo de piel y médula ósea del aloinjerto, estado inmunológico frente a citomegalovirus, e infecciones (133). Como en los TOS, los mecanismos inmunológicos implican tanto a la inmunidad celular ( $L_T$ , CPA, células de la inmunidad innata) como a la inmunidad humoral, mediada por Ac específicos frente al donante que reconocen antígenos del CMH u otros antígenos de histocompatibilidad menores (111).

Los mecanismos no inmunológicos también pueden jugar un papel favorable en la producción de RC (133,135). Estos factores que no están directamente asociados a una respuesta inmunitaria incluyen la lesión por isquemia reperfusión, la toxicidad farmacológica, el tipo de órgano trasplantado, la resistencia vascular al flujo sanguíneo en el aloinjerto, el grado de regeneración de canales linfáticos entre donante y receptor, la denervación del aloinjerto, la lesión isquémica por oclusión arterial, y las cirugías de revisión. El trauma repetido parece ser capaz de inducir características de RC en modelos experimentales de TTC (136). Este mecanismo podría jugar un papel especialmente importante en los aloinjertos de mano en humanos sometidos a



## Introducción

microtraumatismos diarios, especialmente en el postoperatorio precoz cuando la sensibilidad protectora no se ha restablecido.

Parece que el RC afecta principalmente a los vasos sanguíneos de tamaño medio y grande de la piel y los tejidos subyacentes, y se manifiesta como vasculopatía del aloinjerto. La vasculopatía del aloinjerto es difícil de revertir y puede acabar con la pérdida del aloinjerto. Por el contrario, el RA generalmente se puede revertir con inmunosupresores y su diana principal es la piel, incluyendo los vasos de pequeño calibre.

## 2.4 CITOQUINAS

### 2.4.1 Definición

Las citoquinas son polipéptidos solubles que funcionan como mediadores paracrinos o autocrinos que actúan a distancias cortas y regulan una variedad de respuestas inflamatorias o inmunitarias. Desde el descubrimiento en 1978 del factor de crecimiento de  $L_T$ , conocido actualmente como IL-2, diferentes mediadores solubles son objeto de investigación (137). Las citoquinas afectan a la proliferación, diferenciación y función de las células implicadas en procesos fisiológicos. Su actividad está mediada por receptores de membrana específicos que pueden ser expresados en diferentes tipos celulares. Las citoquinas pueden tener propiedades estimuladoras o inhibitoras, y pueden sinergizar o antagonizar la acción de otros mediadores. Un factor puede reemplazar o compensar la falta de otra citoquina, lo que se conoce como redundancia. En 1991, Romagnani mostró que los  $L_{Th}$  humanos, al igual que los del ratón expresaban perfiles de citoquinas funcionalmente diferentes (138,139). De acuerdo con este paradigma Th1/Th2, los  $L_{Th1}$  producen IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$  y favorecen la respuesta inmunitaria celular, la hipersensibilidad retardada y la activación de los macrófagos; por otra parte los  $L_{Th2}$  secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, favoreciendo la tolerancia y estimulando la diferenciación de  $L_B$  y la respuesta de Ac (140). Esta dicotomía no se limita a los  $L_T$  CD4 (141). Los  $L_T$  CD8 efectores y los  $L_T$   $\delta$  también pueden secretar citoquinas de una forma polarizada. Esto ha conducido a una nomenclatura más generalizada de citoquinas tipo 1 y tipo 2 (142).

Las citoquinas conocidas por mediar en los procesos inflamatorios crónicos pueden dividirse en aquellas que participan en la inmunidad humoral como IL-3, IL-4,

## Introducción

IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13 y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ).

Otras participan en la inmunidad celular como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IFNs, factor inductor del IFN- $\gamma$  (IGIF), TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$  y  $\beta$ .

### 2.4.1.1 Interleucina 2

La IL-2 es una glicoproteína conocida como factor de crecimiento de  $L_T$ . Se secreta principalmente por los  $L_{Th}$  activados. Actúa como un factor de crecimiento/activador para  $L_T$ , células NK y  $L_B$ , y promueve el desarrollo de las células LAK (143,144). Juega un papel crítico en la regulación humoral y celular de la respuesta inflamatoria crónica. La unión a su receptor en los  $L_T$  conduce a la proliferación celular, el aumento de la secreción de linfoquinas (IFN- $\gamma$ , linfotoxina, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF) y una mayor expresión de moléculas del CMH de clase II.

### 2.4.1.2 Interleucina 3

La IL-3, también conocida como multi-CSF, es producida por los  $L_T$  activados y mastocitos. Su peso molecular oscila entre 14 y 36 kDa. La clonación del correspondiente ADNc se realizó en el año 1984 y su gen está localizado en el cromosoma 5 (144). Esta interleucina estimula los eosinófilos y la diferenciación de los  $L_B$ , e inhibe la actividad de las células “killer” activadas por linfoquinas (LAK). La IL-3 comparte actividad biológica con GM-CSF (145).

#### 2.4.1.3 Interleucina 4

La IL-4 se expresa como un dímero de 15-19 kDa. Su gen se ha mapeado en el cromosoma 5 y su ADNc fue clonado en el año 1986 (146). La IL-4 se produce por  $L_{Th} CD4^+$ , mastocitos y basófilos. Induce la diferenciación de los  $L_T CD4^+$  en  $L_{Th2}$  mientras suprime el desarrollo de  $L_{Th1}$ . También actúa como un factor de crecimiento de los  $L_B$ ,  $L_T$  y mastocitos, aumenta la expresión del CMH de clase II en los  $L_B$ , y propicia el cambio de clase de Ig a IgG1 e IgE (147). De hecho, es necesaria para la inducción de la respuesta de IgE, y su ausencia también conduce a niveles significativamente más bajos de IgG1 y de la respuesta inmunitaria dependiente de  $L_T$  (148). El efecto estimulador sobre la producción de IgG1 e IgE, y sobre la inducción del CMH de clase II está regulado negativamente por el IFN- $\gamma$ . La IL-4 también estimula la síntesis de colágeno e IL-6 por los fibroblastos dérmicos humanos, y puede desempeñar un papel en la patogénesis de enfermedades como la esclerosis sistémica (149,150).

#### 2.4.1.4 Interleucina 5

Clonada en 1987, el ADNc de la IL-5 codifica una proteína de 20-22 kDa tras su dimerización. Al igual que la IL-4, el gen de la IL-5 se localiza en humanos en el cromosoma 5 (147). La IL-5 también se conoce como factor II de crecimiento de  $L_B$  (BCGFII) y factor de reemplazo de  $L_T$  (TRF), y es producida por los  $L_{Th} CD4^+$  y las células NK (144). La IL-5 está involucrada en la diferenciación y activación de los eosinófilos así como en la estimulación del cambio de Ig hacia IgA. Otras propiedades de la IL-5 incluyen una mayor activación de la proliferación de los  $L_B$  y de la citotoxicidad de los  $L_T$  (147). La producción combinada de IL-4 e IL-5 por los  $L_{Th2}$

## Introducción

CD4<sup>+</sup> deriva en una producción de IgE e IgA y una estimulación de mastocitos y eosinófilos.

### 2.4.1.5 Interleucina 7

La IL-7 es una citoquina de aproximadamente 25 kDa cuyo ADNc fue clonado en 1989. Su gen ha sido mapeado en el cromosoma 8 humano. La IL-7 es un factor de crecimiento de las células pre-B, producida en la médula ósea (MO) y en el estroma del timo (151). Estimula el desarrollo de las células pre-B y pre-T y actúa como factor de crecimiento para los L<sub>B</sub>, L<sub>T</sub> y timocitos (151).

### 2.4.1.6 Interleucina 9

La IL-9 es otra citoquina producida por los L<sub>Th2</sub> CD4<sup>+</sup> así como por algunos linfomas B. El ADNc de la IL-9 fue clonado por primera vez en 1989 y su codificación genética se encuentra en el cromosoma humano 5 (152,153). Su producción es dependiente de la IL-4 e IL-10, y por lo tanto de la IL-2. La IL-9 tiene una naturaleza reguladora inhibiendo la producción de IFN- $\gamma$  por los L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> y aumenta el crecimiento de los L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> (154). Además, promueve la producción de Ig por los L<sub>B</sub> y la proliferación de los mastocitos (143).

### 2.4.1.7 Interleucina 10

También conocida como factor de crecimiento de L<sub>T</sub> derivado de las células B y como factor inhibidor de la síntesis de citoquinas porque inhibe la producción de IFN- $\gamma$

en los L<sub>T</sub> activados. El ADNc humano para la IL-10 fue clonado en 1990 y codifica una proteína de 18 kDa. La IL-10 es producida por diferentes tipos celulares incluyendo L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup>, L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> activados y L<sub>B</sub> (155). Sus efectos incluyen la reducción de la proliferación celular antígeno-específica en los L<sub>T</sub>, la inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  inducido por la IL-2 en las células NK, y la inhibición de la expresión del CMH de clase II inducido por IL-4 e IFN- $\gamma$  en monocitos (156). Dado que la IL-10 puede ser producida por L<sub>Th</sub>2 e inhibe la función de los L<sub>Th</sub>1, se considera un factor de regulación. La IL-10 también actúa como un factor de co-diferenciación para los L<sub>T</sub> citotóxicos (157).

#### *2.4.1.8 Interleucina 12*

La IL-12 fue aislada originalmente de los L<sub>B</sub> transformados por el virus de Epstein-Barr. Es un heterodímero compuesto por dos subunidades. Su actividad biológica incluye una mayor activación de L<sub>T</sub> citotóxicos y células LAK, una mayor citotoxicidad de las células NK, un incremento en la proliferación de los L<sub>T</sub> activados y células NK, inducción de la producción de IFN- $\gamma$  por los L<sub>T</sub> y las células NK, y una inhibición de la síntesis de IgE por linfocitos estimulados por la IL-4 a través de mecanismos dependientes e independientes del IFN- $\gamma$  (158-160). La IL-12 es secretada por L<sub>B</sub> activados, macrófagos y otras CPA, pero su producción se inhibe por la IL-4 y la IL-10. Además, el efecto estimulador de la IL-12 en el desarrollo de L<sub>Th</sub>1 se antagoniza por la IL-4, una citoquina que estimula el desarrollo de L<sub>Th</sub>2. Por lo tanto, la IL-12 juega un importante papel en la inflamación mediada por células y contribuye a la regulación de la producción de Ig.

## Introducción

### *2.4.1.9 Interleucina 13*

El gen de la IL-13 ha sido mapeado en el cromosoma 5 humano, estrechamente relacionado con el gen que codifica la IL-4 (161). La IL-13 presenta propiedades antiinflamatorias ya que inhibe la producción de IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$ , la IL-8 y la IL-6 (161). La inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias es también otra característica de otras dos citoquinas producidas por los L<sub>Th2</sub> como la IL-4 y la IL-10. Además, la IL-13 mejora la diferenciación y proliferación de monocitos y L<sub>B</sub>, aumenta la expresión de CD23, e induce el cambio de IgG4 e IgE (162).

### *2.4.1.10 Interleucina 14*

Es un producto de los L<sub>B</sub> y L<sub>T</sub> malignos y de los L<sub>T</sub> no malignos. Al igual que la IL-4, se ha visto que la IL-14 induce la proliferación de L<sub>B</sub>, considerándose un factor de crecimiento de los L<sub>B</sub> (143). Sin embargo, la IL-14 inhibe la secreción de Ig. Se ha sugerido que tiene un papel importante en los linfomas no Hodgkin agresivos de células B (163).

### *2.4.1.11 Interleucina 15*

La IL-15 comparte muchas de sus propiedades biológicas con la IL-2 y su actividad está mediada a través de un receptor de alta afinidad compuesto por una cadena  $\alpha$  única y las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor de la IL-2. Sin embargo, no presenta ninguna secuencia homóloga con la IL-2 (164). La IL-15 se produce por una gran variedad de células que incluyen L<sub>T</sub> y monocitos. Estimula la proliferación de L<sub>T</sub> y

células NK (143). Mejora la expansión de los  $L_B$  y la producción de Ig (165). Es además un importante quimiotáctico para  $L_T$ . La IL-15 puede ser responsable del reclutamiento y activación de los  $L_T$  en la sinovial de pacientes con artritis reumatoide (166).

#### 2.4.1.12 Factor de crecimiento transformante $\beta$

La familia de citoquinas del TGF- $\beta$  incluye tres isoformas, codificadas por genes separados, con alta afinidad por su unión al mismo receptor. Estas citoquinas son producidas por  $L_T$ , plaquetas y monocitos, y actúa inhibiendo la proliferación y activación de los  $L_T$  y las células NK (167). En el lugar de la lesión, el TGF- $\beta$  es almacenado en las plaquetas y liberado tras su degranulación. Actúa atrayendo monocitos y otros leucocitos al lugar de la lesión, participando en los pasos iniciales de la inflamación crónica. El TGF- $\beta$  además tiene una regulación positiva sobre su propia producción, la producción y depósito de componentes de la matriz extracelular así como la expresión de integrinas promotoras de la adhesión celular. También inhibe la producción de colagenasa y su expresión prolongada en el tiempo puede conducir a una fibrosis progresiva del tejido (168).

#### 2.4.1.13 Interferones

Los IFN son un grupo de citoquinas originalmente identificadas y nombradas por su actividad antiviral (169). Los IFN de tipo I incluyen el IFN- $\alpha$  producido por los leucocitos y el IFN- $\beta$  producido por los fibroblastos. Tienen actividad antiviral y antiproliferativa y regulan positivamente la expresión de moléculas del CMH de clase I. El IFN de tipo II, IFN inmune o IFN- $\gamma$  es un homodímero producido por  $L_T$  y células



## Introducción

NK activadas. El IFN- $\gamma$  aumenta la expresión de moléculas del CMH de clase I y II en las células nucleadas. También estimula muchas de las funciones efectoras de los fagocitos mononucleares. Mientras que el IFN- $\alpha$  y el IFN- $\beta$  se unen a un receptor común, el IFN- $\gamma$  reconoce un receptor de superficie diferente y específico. El IFN- $\gamma$  está implicado en la patogénesis de una gran variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas que incluyen modelos experimentales de lupus eritematoso sistémico o diabetes mellitus tipo I (170-173).

### 2.4.1.14 Factor inductor del IFN- $\gamma$

En células Kupffer murinas y macrófagos activados se identificó una molécula inductora del IFN- $\gamma$ , refiriéndose a ella como factor inductor del IFN- $\gamma$  (IGIF) (174). IGIF induce la producción de IFN- $\gamma$  de forma más potente que la IL-12 y está involucrado en el desarrollo de L<sub>Th1</sub>. El homólogo humano comparte funciones con la citoquina murina tal como la inducción de la producción de IFN- $\gamma$  por células mononucleares estimuladas y potencia la citotoxicidad de las células NK (175). Además, IGIF aumenta la producción de GM-CSF y disminuye la de IL-10. Se ha propuesto designarlo como IL-18 (175).

## 2.4.2 Citoquinas y rechazo crónico

Desde hace años se reconoce el papel de las citoquinas en la patogenia de la arteriosclerosis del aloinjerto. La relación entre la lesión por isquemia y reperfusión y el desarrollo de RC también está bien establecido. Adams et al. mostró que la isquemia/reperfusión conducía a la secreción de las citoquinas MIP-1 $\alpha$  y  $\beta$  por las

células endoteliales del aloinjerto hepático (176). Las citoquinas producidas por los  $L_T$  activados y los macrófagos también pueden mediar el desarrollo de lesiones arterioscleróticas. La quimiocina expresada y secretada por células T normales reguladas tras la activación (RANTES) está regulada positivamente en arterias coronarias de pacientes con rechazo crónico terminal tras un trasplante cardiaco (177). Mediante sistemas de hibridación in situ e inmunohistoquímica (IHQ), RANTES fue localizada en las células mononucleares infiltrantes y en las células endoteliales. Estudios in vitro muestran que RANTES se produce por células endoteliales tras su exposición a  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$  o  $IFN-\gamma$  (178). Por lo tanto, los procedimientos de medición de citoquinas en el aloinjerto en el minuto cero tras el trasplante y en las biopsias posteriores podrían proporcionar información sobre cómo la producción de citoquinas por las células endoteliales o los macrófagos regulan los mecanismos que conducen al RA y RC.

Aparte de factores inespecíficos como la lesión por isquemia/reperfusión, la respuesta inmunitaria específica frente al aloinjerto puede producir un proceso inflamatorio crónico. Esto se basa en la observación que una alta incidencia de episodios de RA se asocian con el RC. Las citoquinas derivadas de los  $L_T$  como el  $IFN-\gamma$  no sólo pueden mediar en el RA sino que también aumentan la expresión del CMH y moléculas de adhesión, y estimulan la proliferación de células musculares lisas. Sin embargo, la evidencia de que el RC del aloinjerto esté mediada por citoquinas tipo 1 o tipo 2 es limitada (*Tabla 3*). El desarrollo precoz de RC se asoció con la expresión de  $IL-2$  en el primer episodio de RA y de  $IFN-\gamma$  en los 6 primeros meses tras el trasplante (179,180). A largo plazo, la infiltración linfocítica endomiocárdica es común, pero estas células no transcriben ARNm detectable de  $IL-2$  ni  $IL-4$ , lo que sugiere que las células

## Introducción

productoras de citoquinas tipo 1 están involucradas en la iniciación pero no en el mantenimiento de la arteriosclerosis del aloinjerto cardiaco (179). En aloinjertos hepáticos, Hayashi encontró una asociación entre las citoquinas tipo 1 y el RC (181). Sin embargo, el análisis de aloinjertos renales mostró una asociación con la arteriosclerosis del aloinjerto con las citoquinas tipo 2 (182-184). Estos estudios demuestran que tanto las citoquinas de tipo 1 como de tipo 2 están involucrados en la patogénesis del RC. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) básico, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y TNF- $\alpha$  y  $\beta$  son reguladores del crecimiento tanto de células endoteliales como musculares lisas. Se ha reportado una asociación entre el RC y la presencia de uno o más de estos factores en el aloinjerto (*Tabla 3*). El ARNm de FGF ácido y básico está regulado positivamente en la mayor parte de los aloinjertos cardiacos independientemente del RC, lo que implica que estos mediadores desempeñan un papel en los procesos tras el trasplante; sin embargo, su participación específica en el desarrollo del RC aún no ha sido elucidada (185,186). El papel de TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  y PDGF en el RC está algo más claro. En biopsias y en necropsias de aloinjertos de pacientes, la expresión de TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  y PDGF se relacionó con el fracaso del aloinjerto por RC (181,182,187-191). Sin embargo, la interpretación de la mayoría de estos datos es limitada ya que los hallazgos fueron comparados con tejidos no trasplantados en lugar de aloinjertos sin signos de RC. Además, la producción de citoquinas puede verse afectada por el periodo de hipotensión e isquemia caliente durante la fase terminal de la vida.

<b>Tabla 3. Perfiles de citoquinas en el aloinjerto asociados con el RC tras el TOS clínico</b>				
<b>Referencia</b>	<b>Órgano trasplantado</b>	<b>Perfil de citoquinas asociado</b>	<b>Perfil de citoquinas no asociado</b>	<b>Comentarios</b>
Sharma et al.(190)	Riñón	TGF- $\beta$		Comparado con ejemplares con signos de RA
Strehlau et al.(192)	Riñón	IL-15	IL-2, IL-7	Artículo de revisión; solo en 2 de 4 muestras
Bishop et al.(193)	Hígado	IL-1 $\beta$ , IL-10	IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$	Disminución de la expresión de ARNm de citoquinas comparado con tejido hepático no trasplantado
Hayashi et al.(181)	Hígado	IL-2, IL-5, IFN- $\gamma$ , PDGF	IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$	En comparación con aloinjertos estables
Demirci et al.(188)	Hígado	TGF- $\beta$		Comparado con tejido no trasplantado
Zhao et al.(191) Zhou et al.(185)	Corazón	FGF ácido, PDGF		Comparado con tejido no trasplantado
Pattison et al.(177)	Corazón	RANTES		Comparado con tejido no trasplantado
Baan et al.(179)	Corazón	IL-2	IL-4, IL-6	Las características del primer RA se asocian con el diagnóstico de RC a 1 año
			IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , PDGF	En el momento de diagnóstico de RC a 1 año
Ationu et al.(186)	Corazón	FGF básico		Comparado con tejido no trasplantado

### 2.4.3 Citoquinas y tolerancia

La tolerancia del aloinjerto suele asociarse con una disminución de las citoquinas tipo 1 y un aumento de las citoquinas tipo 2 (194-197). Estos hallazgos han planteado que la inducción de una respuesta de tipo 2 frente a los antígenos podría producir una tolerancia específica del donante. Sin embargo, la naturaleza redundante y

## Introducción

pleiotrópica de la red de citoquinas sugiere que la inducción y el mantenimiento de la tolerancia del aloinjerto dependen de mecanismos más complejos y no puede explicarse por la dicotomía entre citoquinas tipo 1 y tipo 2 (198). En el año 1996, Strom publicó la “hipótesis del semáforo” para la tolerancia, que postulaba que la inducción de tolerancia podría producirse por la presencia autocrina de IL-2 e IL-4 (luz verde), mientras que la inducción paracrina de IL-2, IL-7 e IL-15 no (luz roja) (199). En su opinión, no era la naturaleza de las citoquinas la que determina la tolerancia sino la jerarquía de los factores de crecimiento de los  $L_T$ , y su habilidad para mediar en la tolerancia y el rechazo, lo que determinaba la producción de citoquinas.

Se ha medido la expresión de ARNm de IL-4 en modelos clínicos de TOS tanto en episodios de rechazo como en su ausencia (*Tabla 4*) (200-206). Se ha descrito que la resolución espontánea de episodios de rechazo en aloinjertos hepáticos se asoció a una expresión de IL-4 en el aloinjerto y ausencia de IL-2 (204,207). Kusaka mostró que tras el trasplante renal, las células de sangre periférica de un paciente que discontinuó el tratamiento inmunosupresor producían altas concentraciones de IL-4 (208). La IL-10 también regularía negativamente la respuesta inmunitaria específica frente al donante. Sin embargo, la expresión de ARNm de IL-10 en el aloinjerto solo se asociaba ocasionalmente con la quiescencia inmunológica. La IL-10 está presente en aloinjertos cardíacos y hepáticos con función estable y en ausencia de rechazo (202,209). Sin embargo, la mayoría de los estudios in vivo que han analizado la expresión de IL-10 en el aloinjerto no han encontrado evidencia de una función inmunosupresora y si una correlación positiva con episodios de RA (192,210-212).

La presencia de citoquinas de tipo 2 en los aloinjertos durante los episodios de RA pueden significar que están involucradas en la respuesta de RA o que participan en la creación de un ambiente de falta de respuesta inmunológica frente al aloinjerto.

Como tal, la producción de citoquinas de tipo 2 puede ser la respuesta del sistema inmunológico a la respuesta inflamatoria inducida por las citoquinas de tipo 1, manteniendo el equilibrio de la red de citoquinas.

<b>Tabla 4. Perfiles de citoquinas en el aloinjerto asociados con la tolerancia tras el TOS clínico</b>				
<b>Referencia</b>	<b>Órgano trasplantado</b>	<b>Perfil de citoquinas asociado</b>	<b>Perfil de citoquinas no asociado</b>	<b>Comentarios</b>
Cozenza et al.(80)	Hígado	IL-10	IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$	En aloinjertos estables; la IL-10 estuvo ausente durante el RA
Baan et al.(200)	Hígado	IL-4	IL-2, IL-15	En la resolución espontánea del rechazo
Gorzynski et al.(204)	Hígado	IL-4	IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$	En ausencia de signos histológicos y clínicos de rechazo
Grant et al.(209)	Corazón	IL-10	IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$	Comparado con biopsias que muestran rechazo severo

## 2.5 INHIBIDORES DE LA CALCINEURINA: TACROLIMUS

El término inhibidores de la calcineurina enfatiza la similitud en el mecanismo de acción de los dos medicamentos incluidos en este grupo, la ciclosporina A y el tacrólimus, que han servido como eje inmunosupresor en el TOS durante las últimas décadas.

Los inhibidores de la calcineurina difieren de sus fármacos inmunosupresores predecesores por su inhibición selectiva de la respuesta inmunitaria. Estos fármacos no inhiben la actividad fagocítica neutrofílica como lo hacen los corticosteroides, ni tampoco tienen efecto mielosupresor. Los eventos de superficie celular y el reconocimiento de antígenos también permanecen intactos (213).

El tacrólimus o FK506 es un compuesto antibiótico macrólido aislado del *Streptomyces tsukubaensi* (214). El efecto inmunosupresor del tacrólimus depende de la formación de un complejo con su proteína receptora citoplasmática, la proteína de unión al tacrólimus (FKBP). Este complejo se une a la calcineurina, que actúa defosforilando el factor nuclear de  $L_T$  activados, y facilita su paso a través de la membrana nuclear. De este modo, la inhibición de la calcineurina dificulta la expresión de citoquinas críticas para promover la activación de los  $L_T$ , como la IL-2, IL-4, el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  (215,216).

Los pacientes con IS terapéutica con inhibidores de la calcineurina conservan un grado de respuesta inmunitaria suficiente para mantener las defensas, lo que permite que potentes señales inmunitarias puedan activar la expresión de citoquinas y generar una respuesta efectiva (217).

Tacrolimus tiene una alta afinidad por los elementos sanguíneos formes pero difiere de la ciclosporina en que se une con gran afinidad a proteínas pero no se asocia significativamente a lipoproteínas y tiene un perfil más favorable en los niveles de colesterol. Tiene una vida media de alrededor de 8 horas se metaboliza a múltiples metabolitos por el citocromo P-450 IIIA (CYP3A) que se encuentra en el sistema gastrointestinal y los enzimas microsomales hepáticos. Algunos de los metabolitos del fármaco pueden tener efectos inmunosupresores y potencial nefrotóxico (218). Su secreción principal es biliar con mínima excreción renal, no siendo necesario modificar las dosis del fármaco en presencia de nefropatía.

Tacrólimus (Prograf) está disponible en formulación intravenosa y como cápsulas de 5 mg, 1 mg y 0,5 mg. Normalmente se administra dos veces al día. Existe una formulación de acción prolongada y administración una vez al día (Advagraf) que está disponible en Europa pero no en Estados Unidos. La absorción gastrointestinal es dependiente de las sales biliares. Debido a la efectividad y la relativa consistencia en su absorción vía oral, rara vez es necesario utilizar su formulación intravenosa. Se absorbe principalmente en el intestino delgado y su biodisponibilidad oral es de alrededor del 25%, con gran variabilidad inter e intrapaciente, particularmente en enfermedades del sistema digestivo.



## **2.6 CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS CD34<sup>+</sup>**

A finales de la década de los 60, se hipotetizó que las células precursoras endoteliales circulantes derivadas de la MO podrían contribuir a la reparación de los vasos de aloinjertos renales (219). Sin embargo, recientemente se ha confirmado mediante el rastreo del linaje celular que la MO proporciona células para la reparación tisular de diferentes órganos (220).

Los tejidos en organismos adultos tienen la capacidad de auto mantenimiento por la presencia de una pequeña población de células madre (CM) multipotenciales (221-225).

La médula ósea adulta contiene células madre hematopoyéticas (CMHe) y células madre mesenquimales, que pueden derivar de un precursor primitivo común. (226) Las células madre mesenquimales son capaces de contribuir a la regeneración de hueso, cartílago y músculo cardíaco, mientras que las CMHe pueden contribuir a la regeneración hepática, de músculo cardíaco, epitelio tubular y árbol vascular (227).

Las CMHe residen en la MO en un microambiente altamente organizado formado por células estromales de la MO, osteoblastos, osteoclastos y sus proteínas de matriz extracelular. Las células hematopoyéticas expresan diferentes moléculas de adhesión como el receptor 4 de CXC Motif (CXCR4), very late antigen-4 (VLA-4) y CD117, que permite que estas células interactúen con los componentes celulares y extracelulares del microambiente. La interacción de SDF-1 (CXCL12) con su receptor CXCR4 juega un papel crítico en la retención de las CMHe en la MO. SDF-1 es una quimiocina CXC que se expresa de constitutivamente en el estroma de la MO y funciona como quimioatrayente de CMHe (228).

La MO se ha considerado históricamente como fuente de CMHe. Estas células también pueden reclutarse en sangre periférica tras la administración de quimioterapia y/o citoquinas en un proceso denominado movilización de CM (229). Una pequeña población de CMHe también circula en sangre periférica, aunque sus niveles se ven incrementados en respuesta a determinados factores como la infección, el trauma o la quimioterapia. Además, numerosas citoquinas como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), GM-CSF y el factor de CM (SCF); quimiocinas como la IL-8, el factor derivado del estroma 1 (SDF-1) y el oncogen regulador del crecimiento  $\beta$  (Gro- $\beta$ ); y Ac para moléculas de adhesión (VLA-4 y VCAM1) pueden movilizar CM a la circulación periférica (230).

A mediados de los años 80, varios grupos consiguieron demostrar que era posible recolectar CMHe de la sangre periférica mediante aféresis tras la administración de fármacos quimioterápicos o citoquinas como G-CSF o GM-CSF (231). Este hecho derivó en el tratamiento mediante el trasplante autólogo de CMHe, siendo la principal forma para la reconstitución del sistema hematopoyético en pacientes sometidos a quimiosupresión por enfermedades como el linfoma no Hodgkin o el mieloma múltiple (231).

La sangre periférica es la principal fuente de CMHe CD34+ gracias a su movilización, demostrándose una mayor eficacia y duración del injerto que tras el trasplante de médula ósea. La sangre periférica es el medio principal para la recolección de CMHe CD34+ en los autotrasplantes realizados en Europa para pacientes con enfermedades linfoproliferativas (232).

Actualmente se encuentran disponibles diferentes fármacos para la movilización de CMHe CD34+ desde la médula ósea a la sangre periférica. Las terapias estándar

## Introducción

consisten en el uso conjunto de fármacos quimioterápicos como la ciclofosfamida con G-CSF (231). Se ha estudiado el uso aislado de G-CSF, GM-CSF o SCF observándose una menor eficacia en la movilización (233). A raíz de estos resultados, surgió la posibilidad de emplear Plerixafor en aquellos pacientes malos movilizadores con las terapias estándar.

## 2.7 PLERIXAFOR

Plerixafor es un derivado biciclamo desarrollado inicialmente para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), demostrando in vitro una inhibición CXCR4, el correceptor que permite la entrada del virus en el  $L_T$  (234). Debido a la leucocitosis transitoria monitorizada tanto en individuos sanos como en pacientes VIH positivos, condujo a un cambio importante en su uso (235).

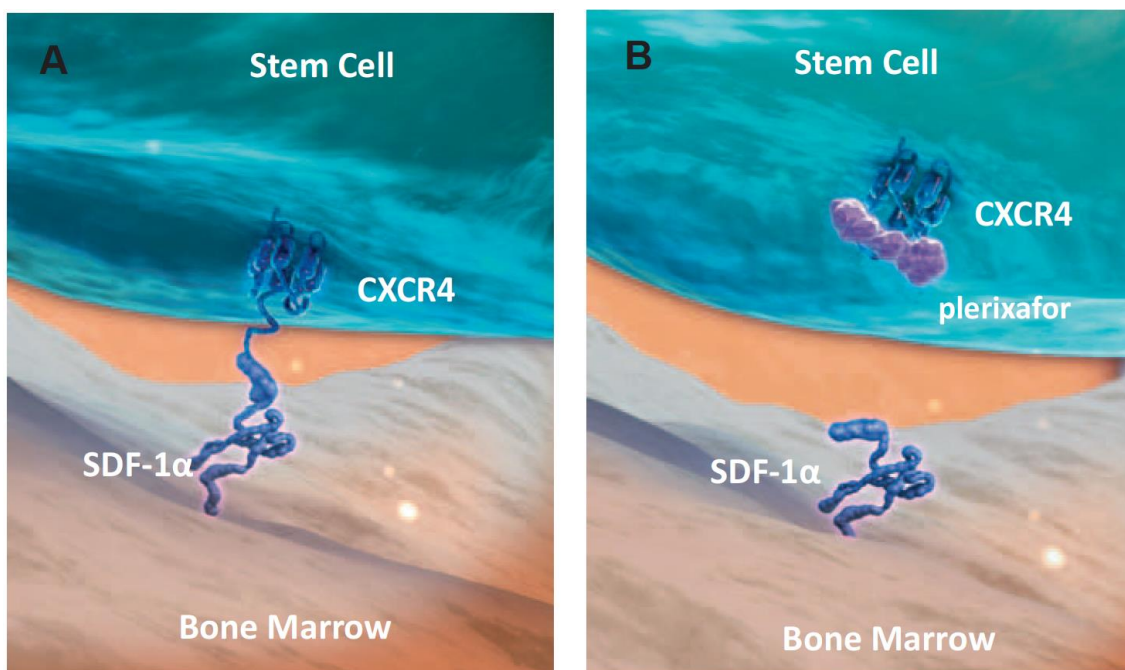
Los estudios farmacodinámicos del plerixafor en pacientes sanos mostraron un aumento de entre 1,5 y 3 veces los valores de CMHe  $CD34^+$  en sangre periférica (236,237). Este incremento celular en sangre periférica se debe a la acción de  $SDF-1\alpha$ , una quimiocina que se une específicamente a CXCR4 y facilita el tráfico y la retención de CMHe en la MO. En su movilización, plerixafor bloquea de forma reversible la unión entre  $SDF-1\alpha$  y CXCR4, liberando CMHe  $CD34^+$  a sangre periférica (*Figura 11*) (234,236).

El perfil farmacocinético del plerixafor se caracteriza por una rápida absorción por vía subcutánea y una distribución fundamentalmente por el espacio extravascular, uniéndose en un 60% a proteínas plasmáticas. Su metabolismo no interacciona con el sistema citocromo P450. La vida media de eliminación es de entre 3-5 horas y se realiza por vía urinaria, por lo que se requieren datos de función renal antes de su uso, ya que su vida media aumenta en pacientes que tienen un aclaramiento de creatinina disminuido (238).

El uso de plerixafor en combinación con G-CSF se aprobó en 2008 en Estados Unidos y en 2009 en Europa para la movilización desde MO a sangre periférica,

## Introducción

recolección y trasplante autólogo de CMHe en pacientes con linfoma no Hodgkin o mieloma múltiple (235).



**Figura 11. Mecanismo de movilización de CMHe por plerixafor.** (A) Las CMHe se retienen en la MO por la interacción CXCR4/CXCL12. (B) Unión de plerixafor a CXCR4 inhibiendo su unión a CXCL12 y liberando las CMHe de la MO a sangre periférica. (Reproducido con permiso: Fricker SP. Physiology and pharmacology of plerixafor. *Transfus Med Hemother*. 2013 Aug;40(4):237–45.)

Se ha demostrado que el número de células CD34+ circulantes en la sangre periférica se correlaciona con el número de células CD34+ recolectadas. Por ello se ha establecido que, para iniciar la recolección, como mínimo debe haber  $\geq 10$  CD34+/ $\mu$ L en sangre periférica, siendo lo ideal  $\geq 20$  CD34+/ $\mu$ L (239). Aproximadamente, entre el 15-35% de los pacientes son considerados malos movilizados, es decir,  $< 10$  CD34+/ $\mu$ L tras la movilización o  $< 2 \times 10^6$  CD34+/ $\text{kg}$  en un máximo de 4 aféresis tras la colección (240).

En base a estos resultados, se ha estudiado la presencia de posibles factores de riesgo para el fracaso en la movilización, siendo los más extendidos la edad avanzada (mayor de 60 años), la quimioterapia previa (más de 3 líneas previas o el uso de determinados agentes como los alquilantes, la fludarabina o la linalidomida), la radioterapia previa, la afectación de MO por enfermedades malignas, la progresión de la enfermedad o un recuento de plaquetas menor de  $150 \times 10^9/L$  (241).

La introducción de estrategias con plerixafor y G-CSF adaptadas al riesgo individual de cada paciente han reducido sustancialmente las tasas de fracaso en la movilización, así como el número de aféresis necesarias para conseguir los objetivos, dando la posibilidad de acceder al trasplante autólogo de CMHe a un mayor número de pacientes (242).

## 2.8 TOLERANCIA Y QUIMERISMO

La tolerancia consiste en la ausencia de respuesta inmunitaria frente a antígenos específicos. Durante el desarrollo del sistema inmunitario, una de sus funciones críticas es evitar las respuestas dirigidas hacia los antígenos propios, previniendo el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Esto se logra tanto por la tolerancia central en el timo como por la tolerancia periférica en el tejido linfóide extratímico. Durante su desarrollo en el timo, una gran parte de los  $L_T$  son eliminados debido a una reactividad no deseada, mediante procesos de selección negativa. Los  $L_T$  que reconocen antígenos en el CMH son seleccionados positivamente y se les permite su circulación en sangre periférica. Debido a que el proceso de selección negativa es imperfecto, puede haber  $L_T$  autorreactivos en sangre. La tolerancia periférica previene la autoinmunidad (243). La tolerancia periférica se mantiene por procesos de delección clonal, anergia y supresión. En contraste con la delección clonal, los  $L_T$  anérgicos siguen estando presentes pero son incapaces de responder, por ejemplo, por ausencia de señal coestimuladora. El fenómeno de supresión celular se ha demostrado durante mucho tiempo mediante experimentos de transferencia adoptiva, en donde la transferencia de células de animales tolerantes puede inducir tolerancia en animales salvajes (243).

En el contexto del trasplante, la tolerancia se puede definir como la ausencia de una respuesta inmunitaria destructiva frente al aloinjerto en un anfitrión con respuesta inmunitaria intacta y sin tratamiento inmunosupresor de mantenimiento (244). Los primeros estudios animales demostraron que la inyección intratímica de un antígeno soluble podía inducir tolerancia central (244). La tolerancia también ha sido inducida mediante la ablación o IS del sistema inmunitario del receptor y su reconstitución con

células de MO tanto del donante como del receptor, generando un sistema inmunitario quimérico que no rechazaría los órganos del donante. Se han obtenido algunos éxitos con el uso de tratamientos no mieloablativos en receptores de trasplante renal y de MO (245). Estos receptores fueron capaces de dejar el tratamiento inmunosupresor por completo (244).

Se han adoptado diferentes enfoques para inducir tolerancia periférica. Por ejemplo, la eliminación de los  $L_T$  mediante apoptosis o muerte celular programada, la inducción de anergia mediante el bloqueo de las señales coestimuladoras, o la supresión de la activación de los  $L_T$  mediante la manipulación de las citoquinas. A pesar del éxito de diferentes potentes regímenes inmunosupresores en la prolongación de la supervivencia del aloinjerto, la generación de tolerancia específica frente a antígenos sigue pendiente (243,244).

El conocimiento actual sugiere que el rechazo en el trasplante puede ser controlado por diferentes vías (246). La IS convencional está diseñada para mantener al receptor en un estado de reducción o inhibición de la respuesta inmunitaria. Este enfoque es el responsable del éxito actual del trasplante clínico. El tratamiento inmunosupresor crónico es necesario para evitar episodios de rechazo. Otro paradigma de la interacción entre aloinjerto y receptor es aquel en el que el receptor adquiere algunas de las propiedades del donante, por ejemplo el “quimerismo mixto” (247,248). Este escenario puede ser involuntario cuando los leucocitos del donante migran desde el aloinjerto a la circulación o puede facilitarse con fines terapéuticos con la transferencia de CMHe del donante generando un estado de falta de respuesta inmunitaria frente al donante o “tolerancia del trasplante” (249-251). Los enfoques que utilizan las



## Introducción

estrategias de quimerismo mixto parecen generar un estado de falta de respuesta específica frente al donante en el receptor dejando su sistema inmunitario en gran parte intacto. La durabilidad y el mecanismo de la tolerancia depende del régimen utilizado. Una tercera posible interacción entre donante y receptor es aquella en la que el receptor repuebla significativamente el aloinjerto, lo que se conoce como quimerismo reverso (QR). Medawar fue el primero en hipotetizar que la aceptación del aloinjerto podría ser el resultado de la sustitución del endotelio por células del receptor (252).

### **2.8.1 Quimerismo reverso**

El QR se define como la repoblación del aloinjerto por células del receptor, siendo publicado por primera vez en un modelo de trasplante aórtico hace más de 40 años (219,253).

El reemplazo de las células del donante por células del receptor ha sido publicado en diferentes TOS (254-259). Actualmente se especula que las CM de MO del receptor podrían diferenciarse en células del aloinjerto (260,261). Sin embargo, se desconocen las implicaciones clínicas de este proceso denominado QR.

#### *2.8.1.1 Quimerismo reverso en trasplante de órgano sólido y trasplante de tejidos compuestos*

Hay dos sentidos posibles de tráfico celular tras un trasplante: desde el donante hacia el receptor y desde el receptor hacia el donante (262,263).

Numerosos artículos se han centrado en la movilización celular desde el donante hacia el receptor para la generación de tolerancia, lo que se conoce como quimerismo sistémico (264-267).

El QR se centra en el tráfico celular desde el receptor hacia el donante mediante el reemplazo del aloinjerto por células del receptor. Kashiwagi et al. utilizó el cariotipado de aloinjertos hepáticos humanos para demostrar que los hepatocitos y el endotelio de los vasos de gran calibre mantuvo la especificidad del donante mientras que el sistema macrofágico fue reemplazado por el receptor (268). Hruban et al. utilizó la hibridación in situ frente al cromosoma Y para demostrar que los cardiomiocitos y la mayor parte del endotelio mantenía la especificidad del donante (254). Theise et al. observaron que las CM extrahepáticas, probablemente derivadas de la MO, contribuían a la proliferación de los hepatocitos (269).

En los TTC, se sabe poco acerca del linaje celular presente en los aloinjertos así como de la regulación del reemplazo celular tras el trasplante. Este reemplazo es posible por células circulantes o de los tejidos contiguos. Las células multipotenciales indiferenciadas pueden alcanzar el aloinjerto por migración directa desde los tejidos adyacentes o a través de las anastomosis arteriales, siendo posible la proliferación y diferenciación celular de estas células dentro del aloinjerto (270). Los TTC están formados por varias combinaciones tisulares que incluyen músculo, nervio, tendón, piel, hueso, cartílago y MO. La tasa de recambio celular puede ser diferente en cada uno de los tejidos así como por las condiciones de daño postrasplante. Debido a ello, los tejidos con las tasas de recambio celular son menores como el músculo, cartílago y periosteo, las células del donante se mantienen permanentemente; mientras que aquellos tejidos

## Introducción

con mayor tasa de recambio celular como el hueso, la piel, la MO y las células endoteliales, las células del receptor migran gradualmente hacia ellos (261,270). Hasta la fecha ha habido muy pocos estudios científicos que describan el linaje celular de los aloinjertos de miembros.

### *2.8.1.2 Quimerismo óseo*

El tejido óseo está en remodelación celular constante. Las células osteoprogenitoras se originan a partir de una línea de CM mesenquimales que reside fundamentalmente en el periostio y la MO (271-273). El tráfico celular desde el receptor hacia el hueso del aloinjerto parece habitual si consideramos este mecanismo de remodelación ósea.

Se ha intentado definir el linaje celular óseo en modelos experimentales de trasplante de pata en ratas y de hueso vascularizado (260,274). La repoblación celular del aloinjerto se ha evaluado mediante técnica PCR semicuantitativa utilizando los cebadores Sry en trasplantes cruzando el sexo. Muramatsu et al. demostraron que las células óseas del donante eran reemplazadas gradualmente por las del receptor. Curiosamente, esta repoblación comenzó simultáneamente en todas las porciones analizadas del hueso, lo que sugiere que las células se suministran a través de la arteria nutricia en lugar de la médula adyacente o el periostio. El proceso de reemplazo a las 24 semanas postrasplante fue del 99% de las células inicialmente presentes en el aloinjerto. Por lo tanto, este reemplazo celular es un proceso rápido. La remodelación de las osteonas es probable que sea más lenta en humanos (271). Es probable que la

osteotomía realizada en la extracción de los aloinjertos estimule la migración, proliferación y diferenciación de células indiferenciadas en osteoblastos.

### *2.8.1.3 Quimerismo endotelial*

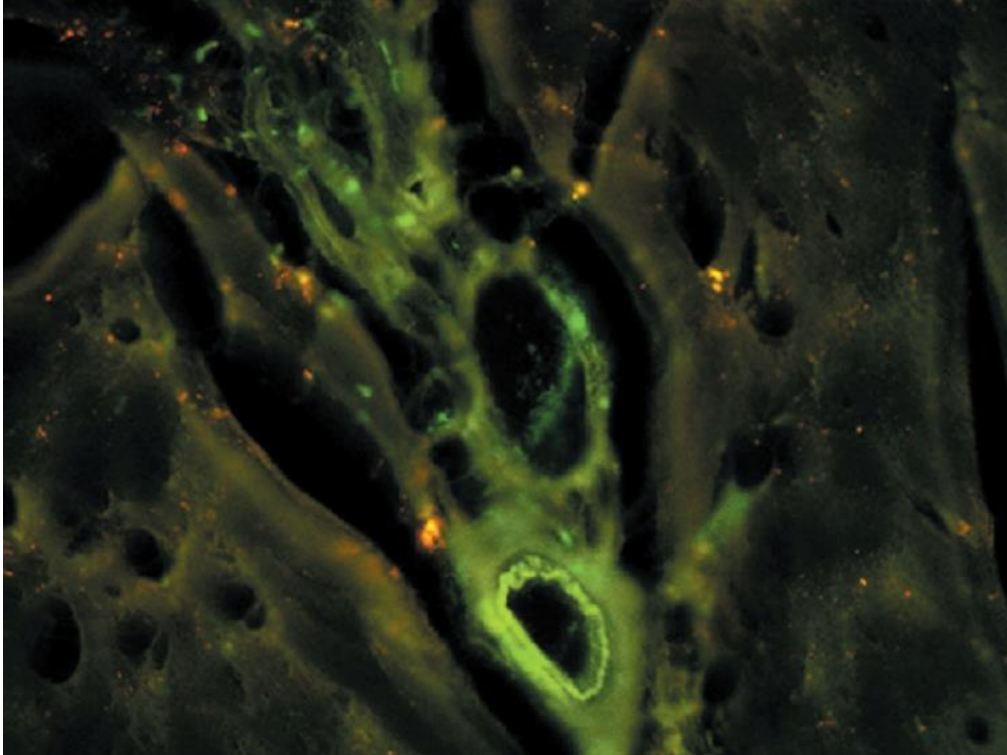
Varios estudios han abordado el reemplazo endotelial en TOS, llegando a la conclusión que el endotelio mantenía fundamentalmente células del donante (256-259).

Clouston et al. no encontraron QR endotelial en aloinjertos hepáticos hasta 410 días postrasplante (275). Sin embargo, otros estudios han encontrado QR endotelial en biopsias hepáticas dentro del primer año postrasplante (257). Koestner et al. y O'Connell et al. demostraron QR endotelial en aloinjertos cardiacos (276,277). Tanaka et al. mostró un aumento tiempo dependiente del QR endotelial en capilares portales tras el trasplante hepático (257). Muramatsu et al. demostraron la presencia de QR endotelial en aloinjertos de pata en ratas (*Figura 12*) (169,181). En un estudio de trasplante renal, Sedmak et al. mostraron la asociación entre el daño endotelial inducido por el rechazo y el quimerismo endotelial (255).

El endotelio vascular se daña tras la lesión por isquemia-reperfusión. Hristov et al. reportaron que la reparación endotelial tras la isquemia podría ocurrir por la migración y proliferación de células endoteliales maduras circundantes (278). Sin embargo, las células endoteliales diferenciadas tienen un bajo potencial de proliferación y sustitución de las células dañadas. Se sabe que la sangre periférica contiene células progenitoras derivada de la MO con el potencial para diferenciarse en nuevas células

## Introducción

endoteliales, pudiendo contribuir a la renovación de las células endoteliales dañadas (278).



**Figura 12.** Expresión de proteína verde fluorescente tras el TTC de aloinjertos de pata de rata positivos para proteína verde fluorescente en receptores Lewis negativos para proteína verde fluorescente. Puede observarse la expresión marcada de proteína verde fluorescente en el endotelio capilar. (Reproducido con permiso: Muramatsu K, Suzuki H, You-Xin S, Hashimoto T, Matsunaga T, Taguchi T. Donor cell repopulation of whole-limb allografts in the rat: detection with green fluorescent protein. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Jul;120(1):100–7).

### 2.8.1.4 Quimerismo muscular

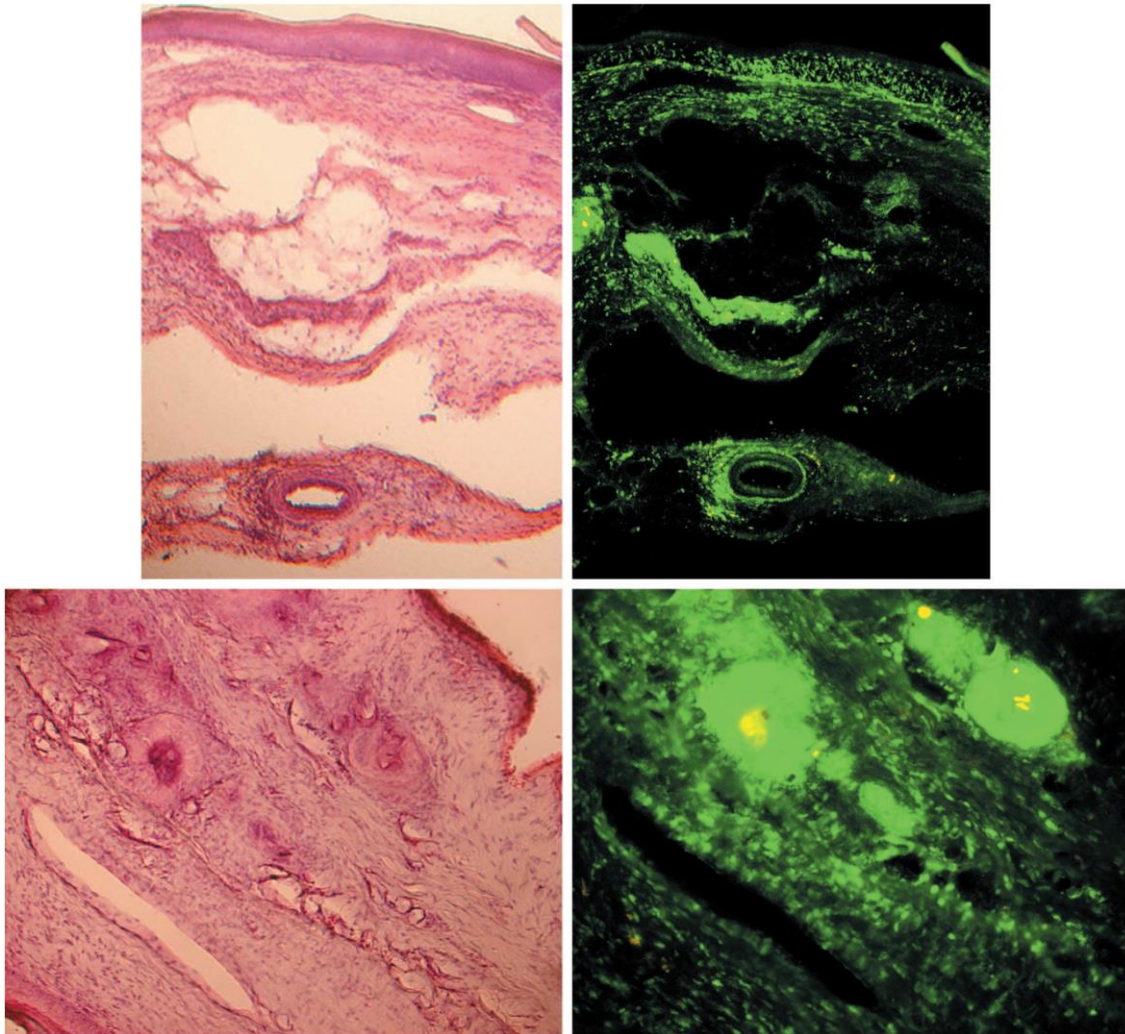
El músculo esquelético está formado por tejidos que se autorregeneran. En condiciones normales, el crecimiento y la reparación están mediados por una población residente de CM miogénicas llamadas células satélite (279). Las células satélite están situadas entre la lámina basal y la membrana plasmática, y se activan localmente por la degeneración de las miofibrillas inducida por la isquemia o la agresión quirúrgica.

Muramatsu et al. informaron que el tejido muscular de los aloinjertos se dañaba por la isquemia caliente y la lesión por reperfusión debido a que los aloinjertos presentaban inflamación durante las 2 semanas postrasplante (261,270). Bajo la influencia de factores de crecimiento liberados por células inflamatorias y macrófagos, las células satélite proliferan y se diferencian en mioblastos que posteriormente se diferencian y fusionan para formar los miofilamentos y las miofibras, promoviendo la regeneración muscular. Sin embargo, el potencial de autorrenovación de las células satélite es limitado (279,280). Estudios recientes sugieren que las células miogénicas pueden derivarse de CM presentes en la MO ectópica, aunque su participación en la regeneración muscular sea menor (281). Muramatsu et al. observaron que el componente muscular del aloinjerto permaneció inalterado hasta al menos 1 año postrasplante (261). Sin embargo, otros estudios han observado un QR parcial por fibras musculares del receptor localizadas alrededor de vasos de pequeño calibre, pudiendo ser estos vasos los suministradores de nuevas CM hacia el aloinjerto (270).

### 2.8.1.5 Quimerismo cutáneo

La literatura reciente sugiere que el crecimiento y la reparación del tejido cutáneo están mediados por las regiones superiores de la raíz externa de los folículos pilosos (221). Estas células se dividen a un ritmo lento para mantener tanto la autorrenovación como el crecimiento del tejido diferenciado. Muramatsu et al. demostraron que las células de la piel del donante eran reemplazadas gradualmente por las del receptor, centrándose alrededor de los folículos pilosos (*Figura 13*) (261,270).

## Introducción



**Figura 13.** Expresión de proteína verde fluorescente en la piel de ratas receptoras Lewis negativas para proteína verde fluorescente a los 18 meses del trasplante. (**Superior**) Expresión de proteína verde fluorescente en la epidermis y el endotelio de los capilares subcutáneos. (**Inferior**) Mediante microscopía confocal, se observó expresión de proteína verde fluorescente especialmente en los folículos pilosos. (Reproducido con permiso: Muramatsu K, Suzuki H, You-Xin S, Hashimoto T, Matsunaga T, Taguchi T. Donor cell repopulation of whole-limb allografts in the rat: detection with green fluorescent protein. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Jul;120(1):100–7).

Estudios recientes muestran que las células derivadas de la MO pueden encontrarse en la epidermis y los folículos pilosos, pero no parecen experimentar una expansión clonal a menos que el tejido se lesione. Merad et al. investigaron la renovación de las células de Langerhans en la piel, observando que las células derivadas del donante podían proliferar y regenerar en condiciones estacionarias. Sin embargo, en

aquellos casos de depleción de células de Langerhans epidérmicas, estas células podían reemplazarse rápidamente por células circulantes en sangre periférica (282). Kanitakis et al. realizaron el primer trasplante clínico de mano e investigaron la repoblación de las células de Langerhans en la epidermis del aloinjerto (283). Sus resultados demostraron que las células de Langerhans presentes en la piel del aloinjerto mantenían el origen del donante durante un periodo de 4 a 5 años, sugiriendo una tasa de repoblación lenta de las células de Langerhans del receptor.

#### 2.8.1.6 Quimerismo reverso en otros tejidos del aloinjerto

La renovación celular y la remodelación de los condrocitos articulares es bien conocida. Los condrocitos derivan de células mesenquimales que se diferencian durante la morfogénesis esquelética (94). Debido a que el cartílago adulto carece de vasos sanguíneos, no hay migración de células indiferenciadas desde la sangre. Además, el cartílago carece de células indiferenciadas dentro del propio tejido. La única estirpe celular que se encuentra en el cartílago articular es el condrocito, que tiene una capacidad de proliferación y migración limitadas debido a que se encuentra encerrado dentro de la densa matriz extracelular formada por colágeno y proteoglicanos. Muramatsu et al. observaron que al menos durante 1 año tras el trasplante, los condrocitos seguían siendo del donante, un hecho previsible debido a las características morfogenéticas de la célula (284).

Diferentes estudios han demostrado que las CM de MO del receptor migraban a la médula ósea del aloinjerto, repoblándolo de forma rápida y mantenida en el tiempo (121,260,270,285).



## Introducción

La renovación celular en el periostio sugiere que se produce a expensas de células del donante que se autorrenuevan (270).

### 2.8.1.7 Tolerancia y quimerismo reverso

Se ha observado en modelos experimentales de trasplante hepático en ratas cruzando el CMH que tras la invasión leucocitaria del aloinjerto, los animales sobrevivían a los episodios de rechazo sin tratamiento inmunosupresor y vivían hasta su sacrificio al cabo de un año o posterior (286). La repoblación de los aloinjertos hepáticos parecía que se producía por transdiferenciación o reprogramación celular en lugar de fusión celular, y se veía acelerada en aloinjertos hepáticos de tamaño reducido al 50% (286). Las células receptoras observadas en los aloinjertos eran inicialmente de menor tamaño que los hepatocitos, estaban agrupadas alrededor de las venas centrales y su citoplasma era positivo para la albúmina. No se encontraron CM de MO repoblando aloinjertos singénicos. Del mismo modo, la IS inhibía el proceso de repoblación, creyendo que era necesario un bajo grado de rechazo para permitir que las CM del receptor reemplazasen aquellas células del aloinjerto lesionadas por los episodios de rechazo. Para probar esta teoría se diseñó un modelo de trasplante entre especies de ratas con un rechazo intenso de los aloinjertos, un modelo que se asemeja más a la situación clínica. Las estrategias que se emplearon en este caso para promover la tolerancia a largo plazo a través de la movilización de CM fueron: trasplante de un 50% del tejido hepático, administración de dosis bajas de tacrólimus durante la primera semana para prevenir el RA, y la administración de plerixafor para liberar CM de MO a sangre periférica. Los resultados confirmaron que el plerixafor movilizaba adecuadamente la población de CM de MO, que la adición de dosis bajas de tacrólimus

evitaba los episodios de RA, y que la combinación de plerixafor y dosis bajas de tacrólimus durante la primera semana postrasplante obtenía una mayor supervivencia a largo plazo sin necesidad de más tratamiento farmacológico (287).

Además de su capacidad para diferenciarse en múltiples linajes celulares y su participación en la reconstrucción del nicho hematopoyético, las CM de MO ejercen un potente efecto inmunomodulador, incluida la inhibición de la proliferación y la función efectora de los L<sub>B</sub>, L<sub>T</sub> y células NK (288-291). Se ha reconocido que las CM mesenquimales aisladas de la MO adulta son capaces de modificar la respuesta inmunitaria *in vitro* e *in vivo* (292). Para probar si la combinación de plerixafor y tacrólimus inducían la supresión o tolerancia de la respuesta inmunitaria, se realizaron aloinjertos cutáneos en el animal receptor 3 semanas tras el cese del tratamiento con tacrólimus y se observó que los aloinjertos sobrevivieron durante de más de un mes tras el cual comenzaron a perderse (293). Un tercio de los aloinjertos fue rechazado agresivamente de forma habitual mostrando que la combinación del tratamiento inducía una IS específica autopetruante frente a determinados antígenos pero no frente a todos los aloantígenos.

La extensión de esta estrategia de Okabayashi a otros TOS diferentes al hepático plantea dificultades en cuanto a que la movilización endógena de CMHe para reemplazar o reparar el tejido dañado del aloinjerto pueda no ser eficaz en aquellos órganos de origen epitelial o que tienen tasas de recambio celular lentas (294). El riñón, como la mayoría de los órganos, presenta células derivadas de la MO en respuesta al daño tisular, sin embargo el linaje de estas células no está claro y su capacidad para producir transdiferenciación celular y su conversión a células tubulares renales es

## Introducción

controvertida (220,295-297). En consecuencia, Hu et al. no tuvieron éxito con la el tratamiento en un modelo experimental de trasplante renal en ratas tras la administración de dosis bajas de tacrólimus y plerixafor durante la primera semana post trasplante debido a la muerte por fallo renal entre los 30 y 90 días tras el trasplante. Sin embargo, al repetir la misma pauta terapéutica en los meses 1, 2 y 3 tras el trasplante obtuvieron una 92% de aceptación del aloinjerto a los 7 meses, con función renal e histología normal sin tratamiento adicional (294). Cameron et al. también observaron estos resultados en un modelo experimental de trasplante renal en cerdos (293).

Nosotros realizamos una revisión sistemática para identificar y analizar la evidencia clínica actual en QR y la presencia de QR endotelial y QR órgano específico. Observamos que los aloinjertos hepáticos presentaban el mayor porcentaje de QR endotelial y los aloinjertos pulmonares el menor. El QR órgano específico pudo detectarse en la mayor parte de los aloinjertos pero con niveles muy bajos, no siendo posible identificar la funcionalidad de las células del receptor en el aloinjerto. Sin embargo, no fuimos capaces de determinar si el QR era el origen o el resultado de los episodios de RA (298).

### **3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**



El objetivo del estudio fue evaluar la expresión de citoquinas en un modelo experimental de RC en aloinjertos osteomusculares heterotópicos de pata posterior de rata sometidos a IS sub-terapéutica con tacrólimus, tras la movilización de CMHe CD34<sup>+</sup> con plerixafor.

Se estableció como hipótesis nula ( $H_0$ ) que la movilización de CMHe CD34<sup>+</sup> no modifica la expresión de citoquinas en los aloinjertos de TTC con RC. Se estableció como hipótesis alternativa ( $H_1$ ) que la movilización de CMHe CD34<sup>+</sup> modifica la expresión de citoquinas en los aloinjertos de TTC con RC.

Además, se establecieron los siguientes objetivos secundarios:

- Analizar el infiltrado leucocitario cualitativamente y cuantitativamente en el tercio medio del tejido muscular del aloinjerto.
- Analizar el grado de RC en los vasos femorales y del tercio medio y distal del tejido muscular del aloinjerto.
- Analizar el porcentaje de QR endotelial de los vasos femorales del aloinjerto.
- Analizar el porcentaje de QR en la MO del aloinjerto.



## **4 MATERIAL Y MÉTODO.**





#### 4.1 PROTOCOLO QUIRÚRGICO

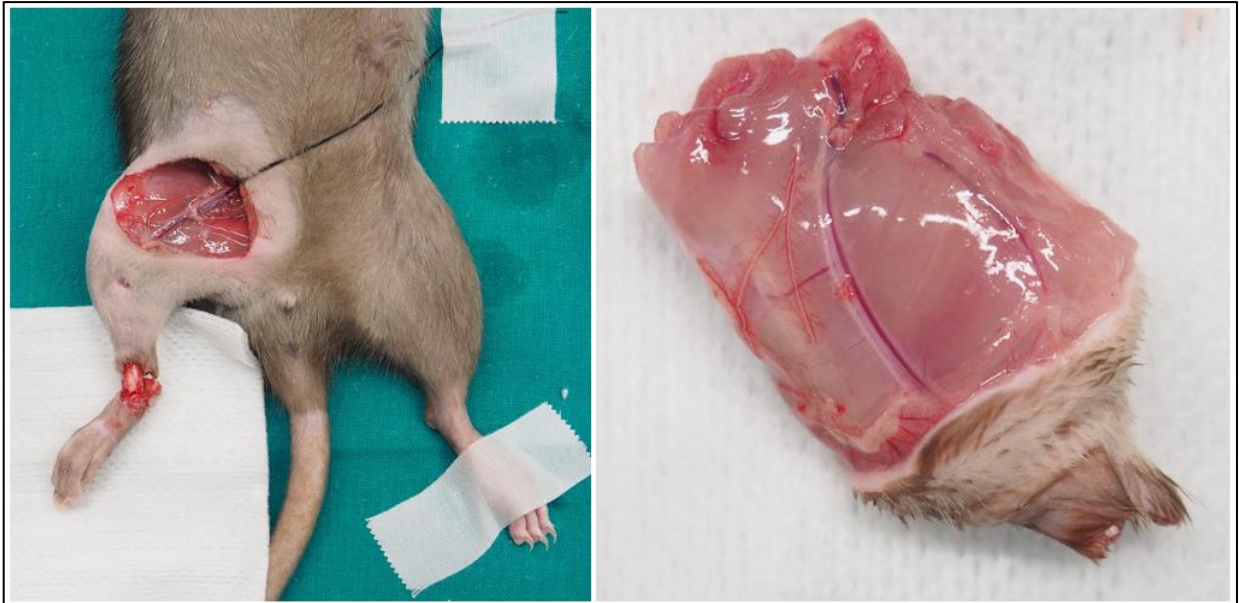
Todos los animales recibieron un trato de acuerdo a la Directiva del Consejo de Europa del 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE). El proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Bienestar Animal del Hospital Universitario La Paz, con fecha 27 de febrero de 2012, del cual se anexa autorización.

Se realizaron 16 transferencias de pata posterior entre ratas (*Rattus Norvegicus*), divididas en dos grupos de experimentación con 8 animales en cada grupo. Se seleccionaron ratas entre 237 y 468 gramos de peso de dos familias no consanguíneas: ratas macho Wistar-Lewis haplotipo RT1<sup>1</sup> como receptoras y ratas hembra Lewis Brown-Norway RT1<sup>n</sup> como donantes (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Francia). Todos los animales se sometieron a trasplante inmediato y posterior IS sub-terapéutica con tacrólimus (Prograf<sup>®</sup>, Astellas Pharma, Chūō, Tokyo, Tokio, Japón). El grupo II además se sometió a terapia movilizadora de CMHe CD34<sup>+</sup> con plerixafor (Mozobil<sup>®</sup>, Genzyme, Cambridge, Massachusetts, E.E.U.U.) (Tabla 5).

Tabla 5. Grupos de experimentación.					
Grupo	n	Donante → Receptor	Terapia IS (días post-trasplante)	Terapia movilizadora de CMHe CD34 <sup>+</sup> (días post-trasplante)	Supervivencia (días)
I	8	RT1 <sup>n</sup> → RT1 <sup>1</sup>	Tacrólimus 0,1 mg/kg (0,1,2,3,7)	No	63
II	8	RT1 <sup>n</sup> → RT1 <sup>1</sup>	Tacrólimus 0,1 mg/kg (0,1,2,3,7)	Plerixafor 1 mg/kg (0, 1, 2, 3, 7)	63

## 4.2 EXTRACCIÓN DEL ALOINJERTO

Se realizó una incisión circunferencial a nivel de la raíz de la pata posterior de la rata. Tomando como límite proximal el ligamento inguinal se disecaron los vasos femorales como vasos donantes, se realizó la miotomía de la musculatura del muslo y neurotomía de los nervios femoral y ciático. Los vasos tibiales anteriores y posteriores fueron ligados distalmente. El pie fue amputado a nivel de la sindesmosis tibioperonea. Tras la ligadura de los vasos femorales se realizó la osteotomía en el tercio medio del fémur. La *Figura 14* muestra el aloinjerto.



**Figura 14.** Extracción del aloinjerto. **Izquierda:** Disección de los vasos femorales a nivel de la ingle y de los vasos tibiales anteriores y posteriores a nivel del tobillo; **Derecha:** Aspecto del aloinjerto.

### 4.3 TÉCNICA QUIRÚRGICA EN EL ANIMAL RECEPTOR

Se realizó una incisión longitudinal siguiendo la línea oblicua que unía la sínfisis del pubis con la espina iliaca anterosuperior y se prepararon los vasos femorales. La anastomosis arterial y venosa a los vasos femorales se realizó mediante técnica termino-terminal con sutura monofilamento no reabsorbible de tamaño 10/0 (S&T, Synovis Micro Co Alliance Inc., Birmingham, E.E.U.U.). No se realizaron neurorrafias, miorrafias ni osteosíntesis. Tras comprobar la patencia vascular del aloinjerto se eliminó el componente cutáneo y se acomodó en posición heterotópica subcutánea a nivel abdominal (*Figuras 15 y 16*).



*Figura 15.* Mesa de trabajo experimental.



**Figura 16.** Técnica quirúrgica en el animal receptor. **Superior izquierda:** Fijación del aloinjerto; **Superior derecha:** Desepidermización del aloinjerto tras patencia vascular positiva; **Inferior izquierda:** Acomodación heterotópica subcutánea abdominal del aloinjerto; **Inferior derecha:** Cierre de la zona receptora.

#### **4.4 PROTOCOLO DE INMUNOSUPRESIÓN**

Todos los animales receptores recibieron terapia IS sub-terapéutica con tacrólimus (Prograf<sup>®</sup>, Astellas Pharma, Chūō, Tokyo, Tokio, Japón) a dosis de 0,1 mg/kg/24 horas por vía subcutánea los días 0, 1, 2, 3 y 7 post-trasplante (287).

#### **4.5 PROTOCOLO DE MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA CD34<sup>+</sup>**

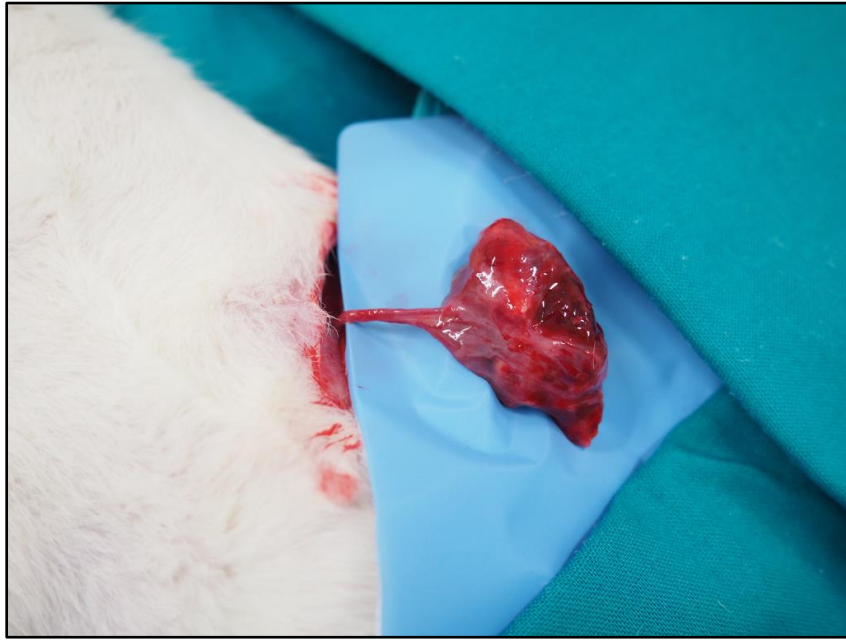
Los animales receptores del grupo II recibieron terapia movilizadora de CM de MO CD34<sup>+</sup> con plerixafor (Mozobil<sup>®</sup>, Genzyme, Cambridge, Massachusetts, E.E.U.U.) a dosis de 1 mg/kg/24 horas por vía subcutánea los días 0, 1, 2, 3 y 7 post-trasplante (287).

#### **4.6 SEGUIMIENTO CLÍNICO**

En todos los animales se monitorizó la evolución ponderal semanal y la aparición de signos de EICH entre los que se incluyeron la aparición de lesiones cutáneas, alopecia, dificultad respiratoria, diarrea o debilidad generalizada (299).

#### **4.7 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE LOS ALOINJERTOS**

Transcurridas 9 semanas post-trasplante los animales fueron anestesiados para la recuperación de los aloinjertos para su procesado y análisis (*Figura 17*). Posteriormente los animales receptores fueron sacrificados.

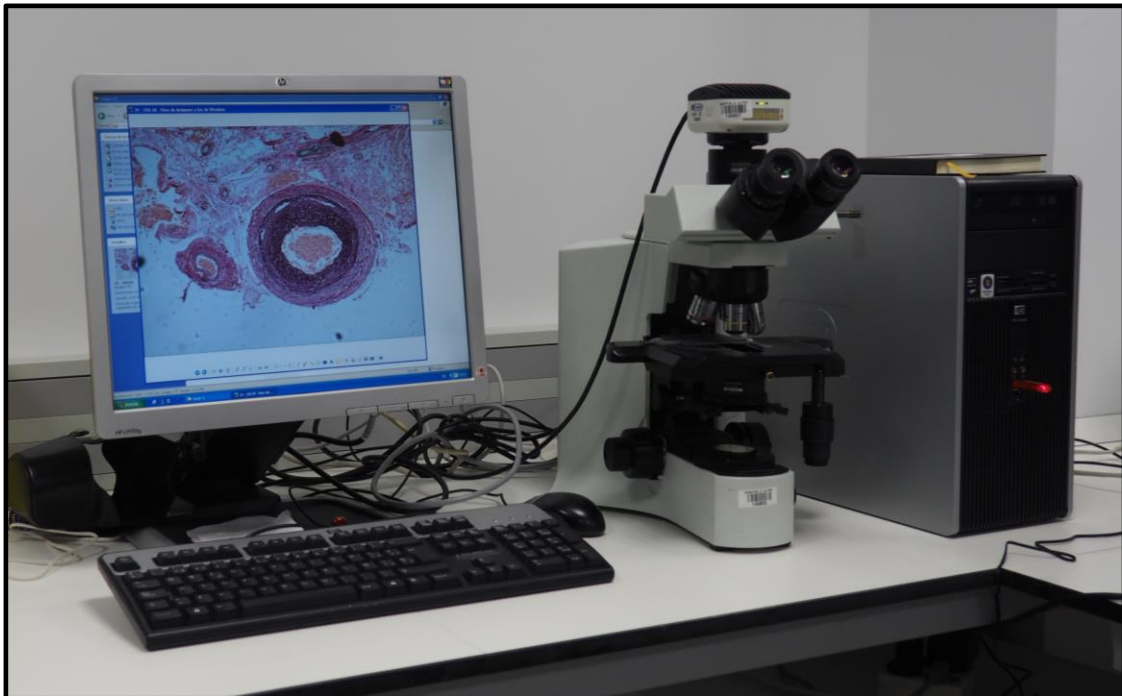


*Figura 17.* Extracción del aloinjerto a las 9 semanas post-trasplante.

#### 4.8 PROCESADO Y ESTUDIO DE LAS MUESTRAS

Los aloinjertos se dividieron en fresco en diferentes muestras que comprendían los vasos femorales, la tibia y el tejido muscular y se fijaron en tampón formalina. Las muestras musculares se dividieron en tercios con preservación exclusiva de los tercios medio y distal. Tras su inclusión en bloques de parafina, se realizaron cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  de grosor con la ayuda de microtomo (Leica® RM2255, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania) para su procesado.

Las muestras se estudiaron mediante un sistema de análisis de imagen compuesto por un microscopio Olympus® BX14 (Olympus®, Tokio, Japón) acoplado a una cámara y el software ImageJ ProPlus® (Media Cybernetis®, Washington, E.E.U.U.) (Figura 18).

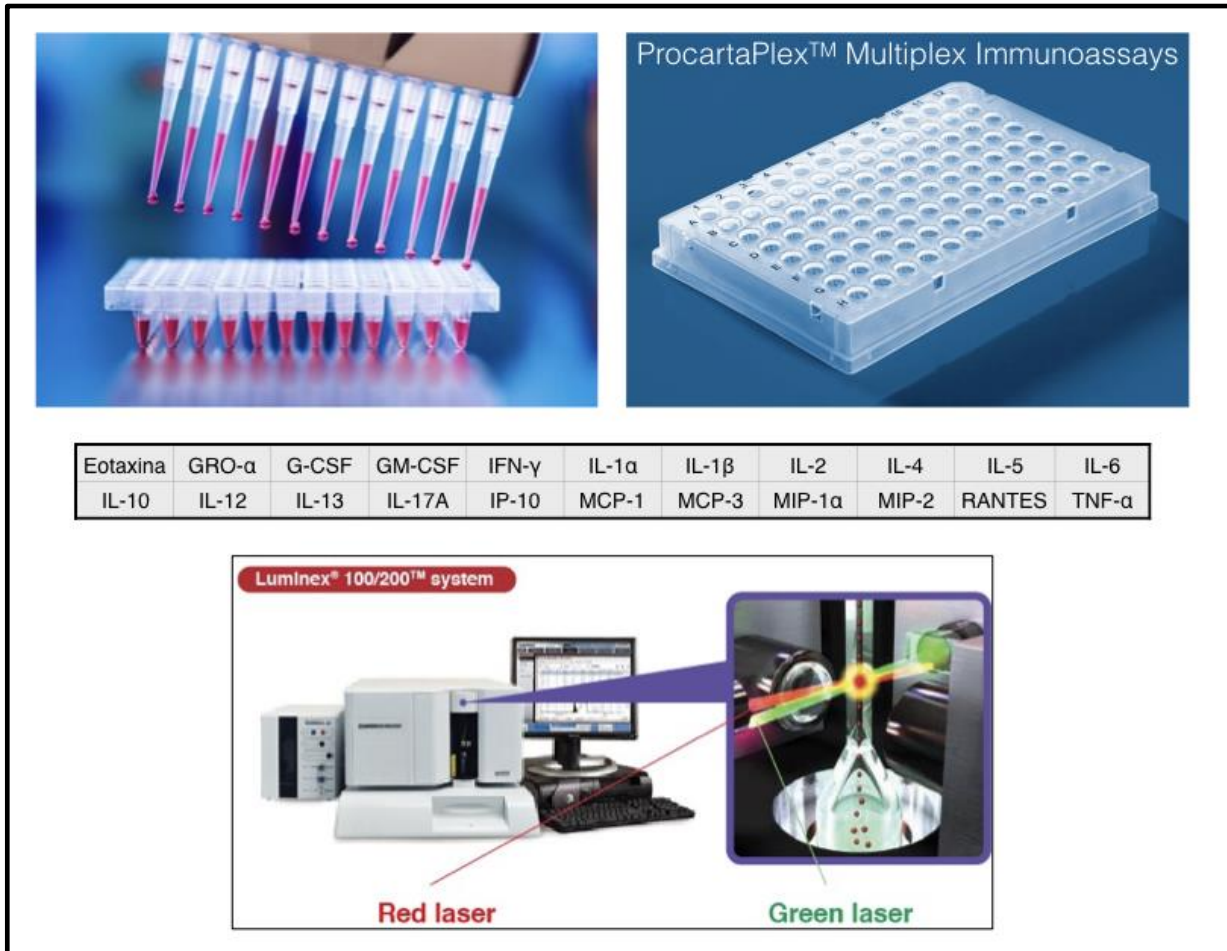


*Figura 18.* Sistema de análisis de imagen.



#### 4.9 VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

Para valorar la expresión de citoquinas se realizaron mediciones en los tercios medio y distal del tejido muscular del aloinjerto utilizando el panel de 22 citoquinas del sistema ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassays (Affymetrix, Santa Clara, California, E.E.U.U.) según instrucciones del fabricante. Las citoquinas incluidas en el panel seleccionado fueron: Eotaxina, oncogén relacionado con el crecimiento  $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, proteína 10 inducida por IFN- $\gamma$  (IP-10), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), MCP-3, proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-2, RANTES y TNF- $\alpha$ . Tras el procesado de las muestras e incubación por duplicado con cada uno de los Ac frente a las citoquinas de interés, la señal obtenida en el panel se cuantificó mediante un analizador Luminex xMAP 200 (Luminex Corporation, Austin, Texas, E.E.U.U.). Las concentraciones de citoquinas, expresadas en pg/ml, se extrapolaron a partir de las curvas estándar utilizando el software Xponent (Luminex Corporation, Austin, Texas, E.E.U.U.) (*Figura 19*).



*Figura 19.* Sistema ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassays y analizador Luminex xMAP 200.

## **4.10 VALORACIÓN DEL INFILTRADO LEUCOCITARIO**

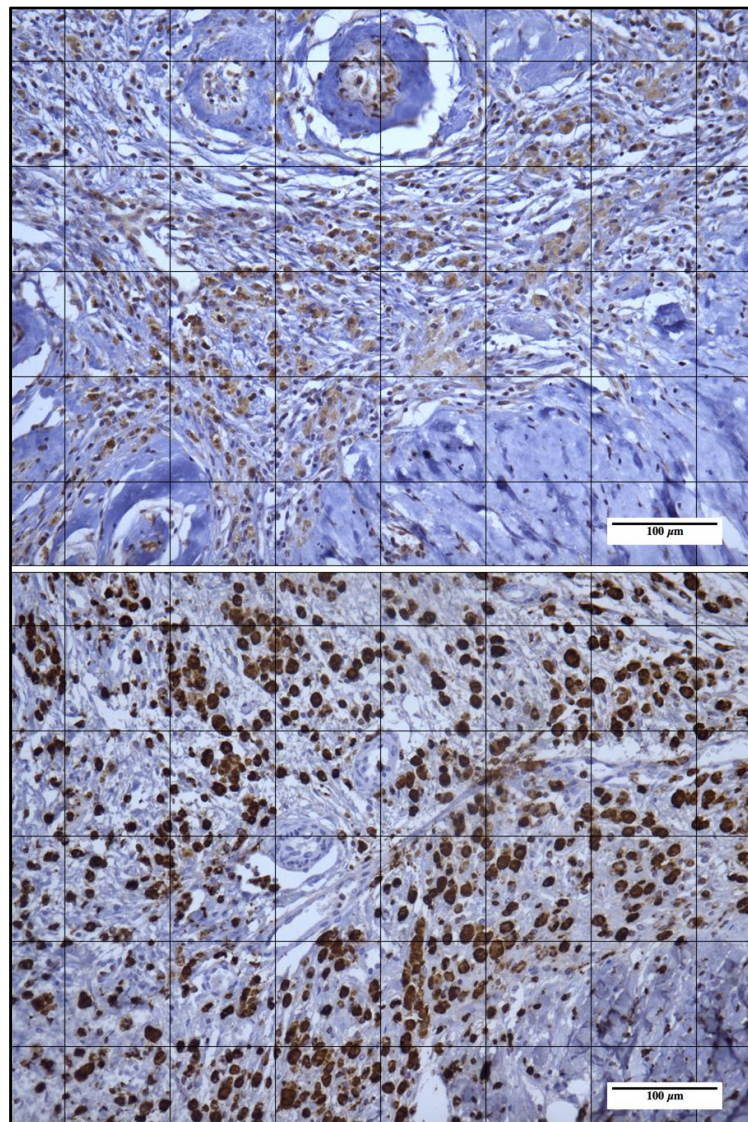
### **4.10.1 Cualitativa**

Se realizó una valoración subjetiva del infiltrado leucocitario en muestras del tercio medio del tejido muscular con tinción de hematoxilina-eosina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y una magnificación de x100. El muestreo se llevó a cabo por dos observadores independientes en cinco cortes seleccionados de manera aleatoria para cada aloinjerto. La escala utilizada fue: 0 = Ausencia; 1 = Leve; 2 = Moderado; 3 = Intenso.

### **4.10.2 Cuantitativa**

Se realizó estudio IHQ de los antígenos leucocitarios CD3, CD4, CD8, CD20 y CD68 a nivel del tercio medio del tejido muscular del aloinjerto con el objetivo de identificar los subtipos celulares. Para ello se desenmascararon los antígenos leucocitarios con un protocolo ajustado para cada Ac primario mediante el sistema PTLINK Dako® (Pre-Treatment). El equipo de tinción empleado fue el Autostainer Plus de Dako® siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras el bloqueo de la peroxidasa endógena y el de unión inespecífica, se realizó la incubación con el Ac primario y secundario, empleando entre ambos tampón de lavado (Wash Buffer Dako®). Posteriormente se incubaron las muestras con peroxidasa streptavidina (Streptavidin horseradich peroxidase conjugate, SouthernBiotech®, Birmingham, Inglaterra) y con el cromógeno según prospecto (Dako® REAL™ Detection System K5003). Tras la contratinción con hematoxilina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se procedió al montaje y deshidratación de las secciones tisulares. Los resultados mostraron los núcleos celulares en azul-violeta y las células positivas en marrón.

Se escogieron cinco cortes aleatorios por aloinjerto y se muestrearon dos áreas de  $90000 \mu\text{m}^2$  por corte, con una magnificación de x200. Se consideraron positivas para el conteo aquellas células que mostraban núcleo y citoplasma. El muestreo se llevó a cabo por dos observadores independientes (*Figura 20*).



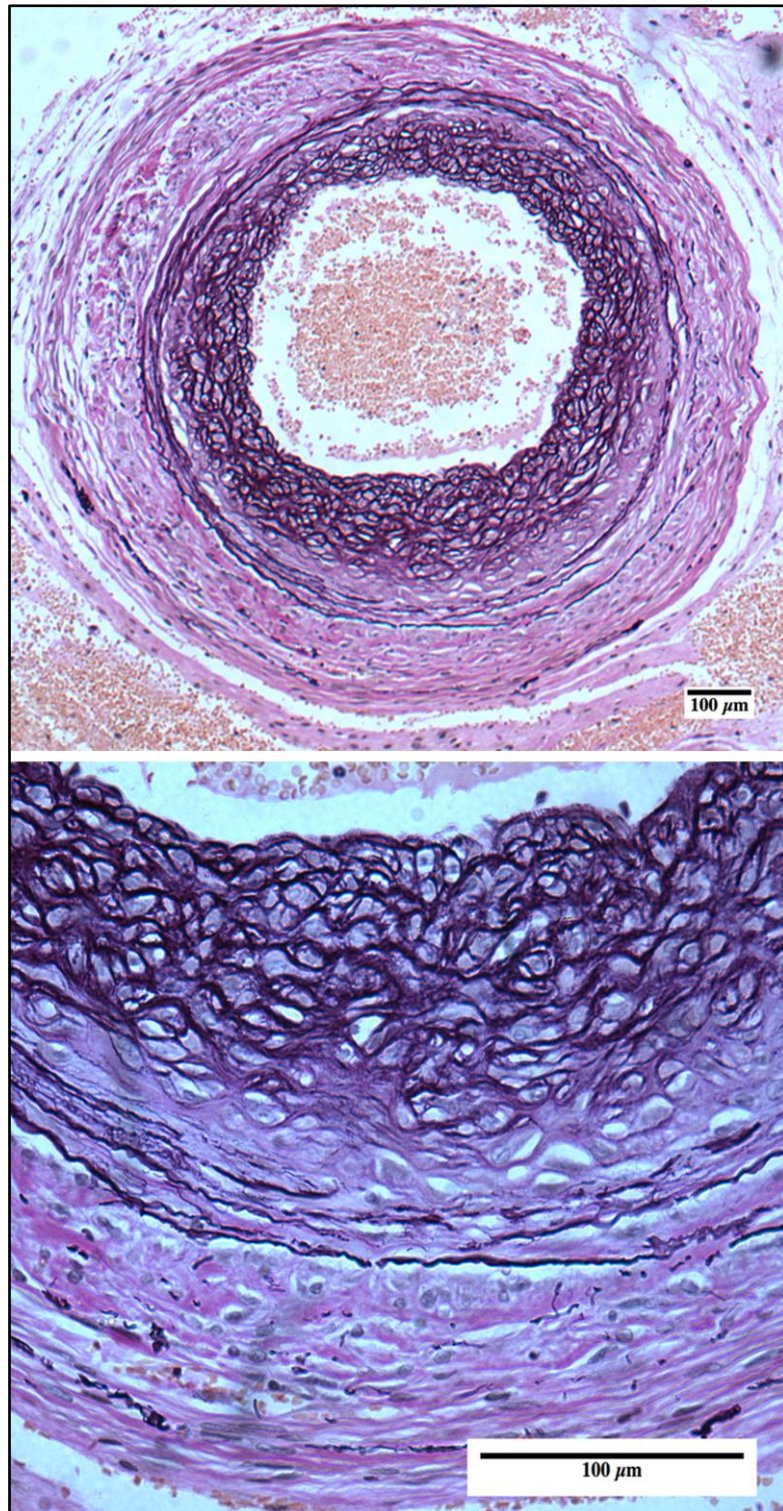
**Figura 20.** Valoración cuantitativa del infiltrado leucocitario. Superior: Tinción IHQ CD4 (x200); Inferior: Tinción IHQ CD68 (x200).

#### 4.11 VALORACIÓN DEL RECHAZO CRÓNICO

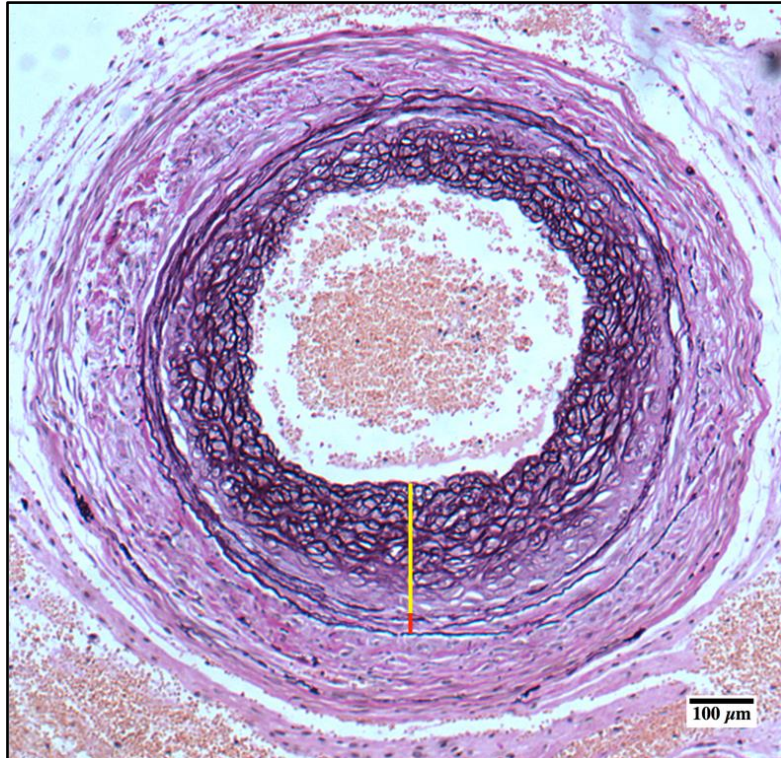
El RC (*Figura 21*) se valoró en los vasos de femorales y en los vasos del tercio medio y distal del tejido muscular del aloinjerto mediante la medición de la proliferación intimal (PI) y el porcentaje de permeabilidad arterial (PPA):

- PI (*Figura 22*): Porcentaje del grosor total de la pared arterial que ocupa la íntima. Se obtuvo según la fórmula  $(\text{Íntima} / (\text{Íntima} + \text{Media})) \times 100$  (119).
- PPA (*Figura 23*): Porcentaje de la luz arterial que es permeable al flujo y no ha sido ocupada por la neoíntima. Se obtuvo según la fórmula  $(\text{Área de la neoíntima} / \text{Área de la lámina elástica interna}) \times 100$  (300).

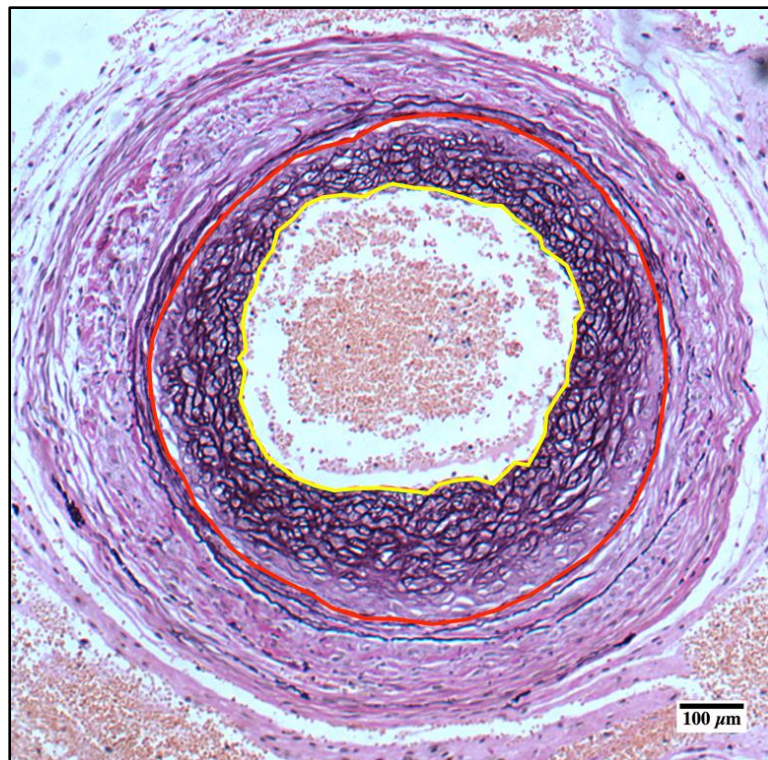
Se prepararon 5 cortes histológicos aleatorios de cada segmento vascular a estudiar, y se valoraron tras tinción con el kit de tinción de fibras elásticas según van Gieson (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Los resultados mostraron los núcleos celulares de color pardo negruzco, las fibras elásticas en negro, el colágeno en rojo y la musculatura en amarillo.



**Figura 21.** RC. **Superior:** RC en vasos femorales tras tinción de fibras elásticas según van Gieson (x100); **Inferior:** RC en vasos femorales tras tinción de fibras elásticas según van Gieson (x400).



**Figura 22.** Valoración de la PI en vasos femorales tras tinción de fibras elásticas según van Gieson (x100). Línea amarilla: Íntima. Línea roja: Media.



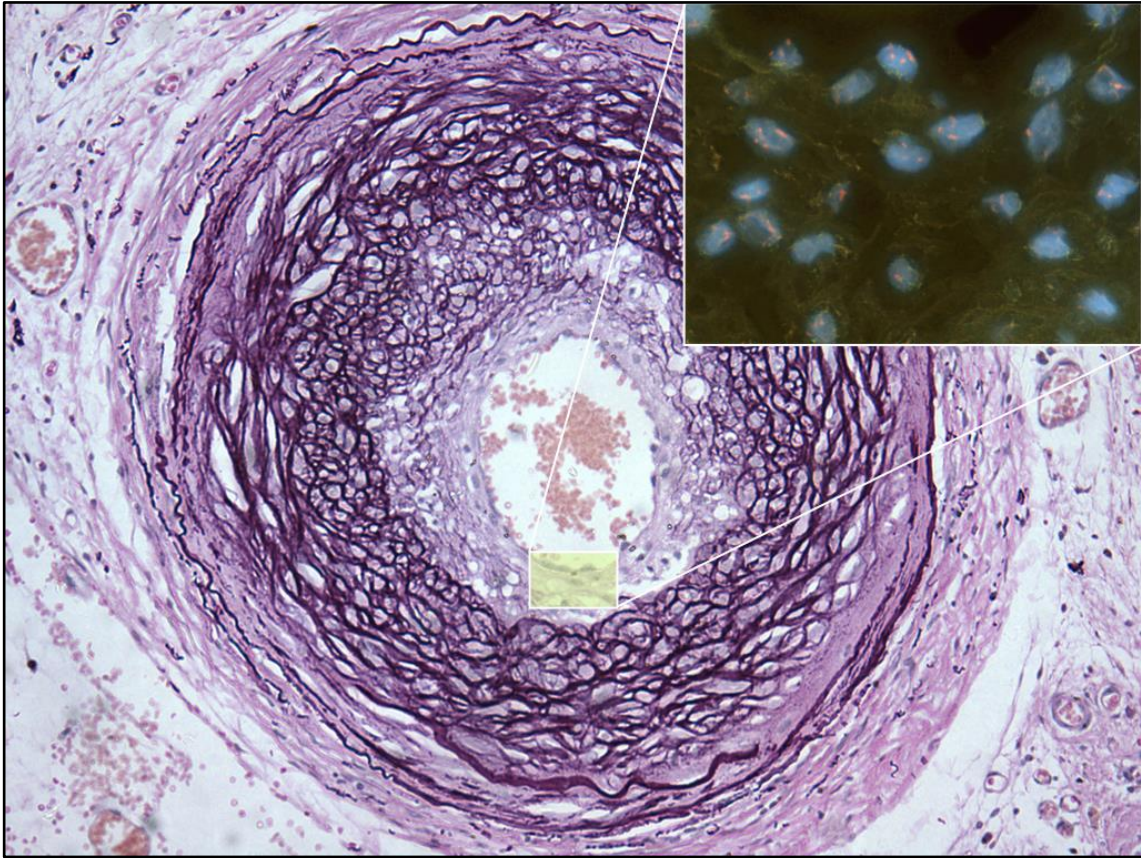
**Figura 23.** Valoración del PPA en vasos femorales tras tinción de fibras elásticas según van Gieson (x100). Línea amarilla: Área de la neoíntima. Línea roja: Área de la lámina elástica interna.

## **4.12 VALORACIÓN DEL QUIMERISMO REVERSO ENDOTELIAL**

La repoblación del endotelio de los vasos femorales del aloinjerto se evaluó mediante técnica FISH para los cromosomas X e Y. Se eligió esta técnica porque permite el análisis de varios núcleos en interfase, porque proporciona una identificación genotípica definitiva de las células y porque conserva la morfología del tejido examinado. Se realizaron pruebas de mapeo en cultivos celulares de una línea de CM mesenquimales de rata macho obteniendo una hibridación adecuada. Las sondas de los cromosomas X e Y de la rata se marcaron con fluorocromo rojo y verde, respectivamente.

Las pruebas realizadas en los tejidos parafinados de los animales de estudio presentaron hibridación en células aisladas, con una mala calidad de la hibridación y no fue suficiente para dar un resultado fiable (*Figura 24*). Para intentar optimizar los resultados se realizaron diferentes pruebas variando los buffers y los tiempos de actuación de pepsina previo a la hibridación sin obtener mejoría.





**Figura 24.** Amplificación del resultado de la técnica FISH para los cromosomas X e Y en la PI de los vasos femorales de los aloinjertos. Se observa el marcaje con fluorocromo rojo frente al cromosoma X.

En base a estos resultados nos planteamos hacer una estimación del porcentaje de células con cromosoma Y en el endotelio del aloinjerto con técnica Real-Time PCR (RT-PCR). Para ello se planteó la microdissección láser de la PI de las muestras parafinadas de arteria femoral del aloinjerto para aplicar sobre las células endoteliales aisladas la técnica de RT-PCR (*Figura 25*). La técnica de microdissección láser para aislar la capa endotelial de las muestras de arteria femoral del aloinjerto no pudo llevarse a cabo por la Unidad responsable, por lo que finalmente no fue posible la realización de la técnica RT-PCR sobre las muestras para el análisis del QR endotelial.

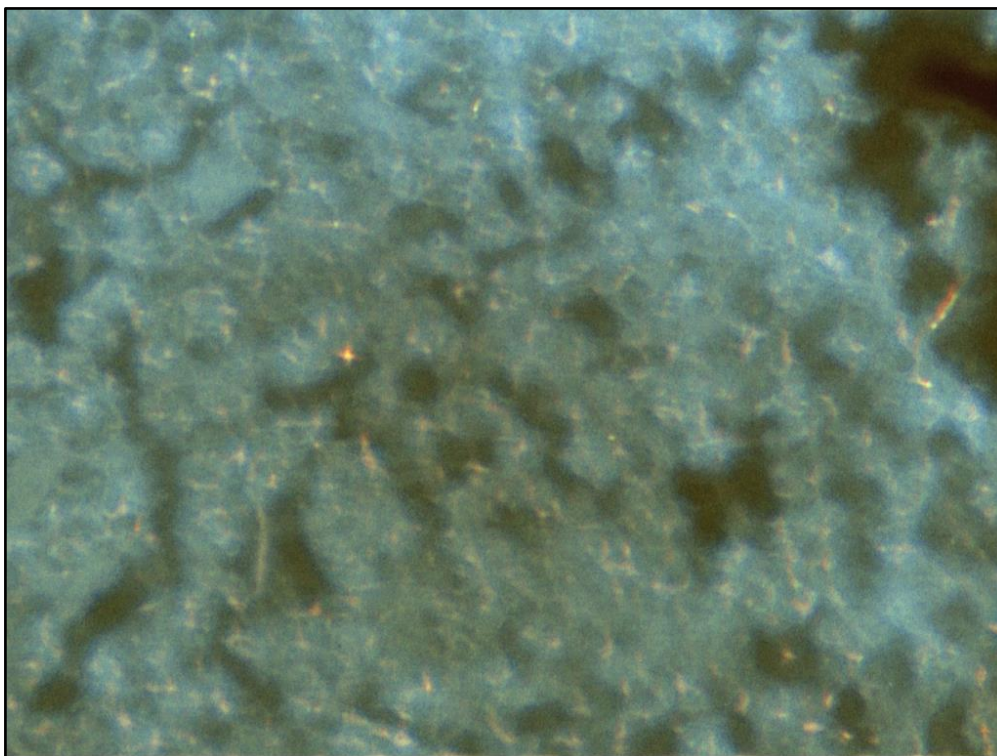


**Figura 25.** Marcaje en amarillo del área de PI sobre el que llevar a cabo la microdissección láser en vasos femorales. Tinción de fibras elásticas según van Gieson (x100).

La realización de las técnicas FISH para los cromosomas X e Y y el planteamiento de la técnica de microdissección láser se realizó en colaboración con los Servicios de Histopatología y Citogenética del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

#### 4.13 VALORACIÓN DEL QUIMERISMO REVERSO EN LA MÉDULA ÓSEA

Al igual que con la valoración del QR endotelial, la repoblación de la MO del aloinjerto se evaluó mediante técnica FISH para los cromosomas X e Y. Las pruebas realizadas en los tejidos parafinados de los animales de estudio presentaron demasiada autofluorescencia probablemente debido al método de fijación que se utiliza con el tejido óseo. La autofluorescencia era tan alta que enmascaraba las señales y no se podían ver las sondas de hibridación fluorescente (*Figura 26*). También se realizaron pruebas para intentar optimizar los resultados con variaciones en los buffers y los tiempos de actuación de pepsina, sin éxito.



**Figura 26.** Resultado de la técnica FISH para los cromosomas X e Y en el tejido óseo donde se demuestra la autofluorescencia el tejido.

Al igual que con la valoración del QR endotelial, nos planteamos evaluar la repoblación celular de la MO ósea del aloinjerto mediante el análisis del porcentaje de células con cromosoma Y en el aloinjerto con técnica RT-PCR. En este caso valoramos el completo de la muestra de MO parafinada sin aplicar la microdissección láser.

Para la realización de la técnica RT-PCR se tomaron muestras de tejido auricular de ratas macho Wistar Lewis y ratas hembra Brown-Norway para la calibración de la curva de medición estándar. Todas las muestras parafinadas incluidas en el análisis fueron tratadas con xylene para disolver y eliminar la parafina. La extracción y purificación del ADN genómico se realizó mediante el Gentra Puregene Tissue Kit (Qiagen N.V., Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

La curva de medición estándar se obtuvo mediante la dilución y mezclado de ADN de ratas macho y hembra a concentración de 4 ng/μl (*Tabla 6*).

<b>Tabla 6. Diluciones de ADN para obtención de la curva de medición estándar.</b>			
<b>% de ADN macho sobre fondo de ADN hembra</b>	<b>Volumen (μl) de 4 ng/μl de ADN macho</b>	<b>Volumen (μl) de 4 ng/μl de ADN hembra</b>	<b>Volumen total (μl)</b>
0,2	1	499	500
0,5	1	199	200
2,5	5	195	200
12,5	25	175	200
50	100	100	200
87,5	175	25	200
100	200	0	200

La RT-PCR se realizó mezclando SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.E.U.U) con los cebadores murinos Bcl-2 y Sry (*Tabla 7*) y el ADN genómico a estudiar, realizando el análisis por triplicado.

<b>Tabla 7. Secuencia genómica de los cebadores murinos Bcl-2 y Sry para RT-PCR.</b>			
<b>Gen</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>Bcl-2</b>	<b>13</b>	<b>5'-ATCTCCAGTATCCCACTCGTAG</b>	<b>5'-TGGTACCTGCAGCTTCTTTC</b>
<b>Sry</b>	<b>Y</b>	<b>5'-GATACCCACTACAGCAGAAACA</b>	<b>5'-CAGTGGACAGTAAGTAGGTTAGC</b>

La reacción RT-PCR y la obtención de los valores umbral del ciclo (Ct) se realizó utilizando la máquina QuantStudio™ 6 Flex RT-PCR System y su software asociado (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.E.U.U.) según recomendaciones del fabricante. Se calculó el valor  $\delta Ct$  ( $Ct^{Sry} - Ct^{Bcl-2}$ ) y el nivel de expresión de Sry como el valor  $2^{-\delta Ct}$ . Se establecieron las curvas de calibración estándar para cada serie de reacciones utilizando la lectura de  $2^{-\delta Ct}$  de las mezclas de ADN macho/hembra conocidos en la curva de medición estándar (Tabla 6). Las curvas de calibración fueron generadas por el trazado de la media del valor  $2^{-\delta Ct}$  por triplicado según el porcentaje de ADN macho conocido en la mezcla con un ajuste por regresión lineal.

#### **4.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, E.E.U.U.). Todas las pruebas estadísticas se han considerado bilaterales y como valores significativos aquellos que presentaron una probabilidad de error menor del 5% ( $P < 0,05$ ).

Los datos cualitativos se describen mediante frecuencias absolutas y porcentajes. Los datos cuantitativos se describen mediante media, desviación estándar, mínimo y máximo.

La comparación entre grupos de los valores de citoquinas y de QR se ha realizado usando el test de la U de Mann-Whitney (no paramétrico para datos independientes).

La comparación entre grupos de los valores de infiltrado inflamatorio y de PI y PPA en los vasos femorales y musculares del aloinjerto, teniendo en cuenta las diferentes replicaciones de dichos parámetros en los mismos sujetos, se ha analizado mediante un modelo de regresión lineal con efectos mixtos, con las replicaciones y el grupo (I vs. II) como factores.



## **5 RESULTADOS.**

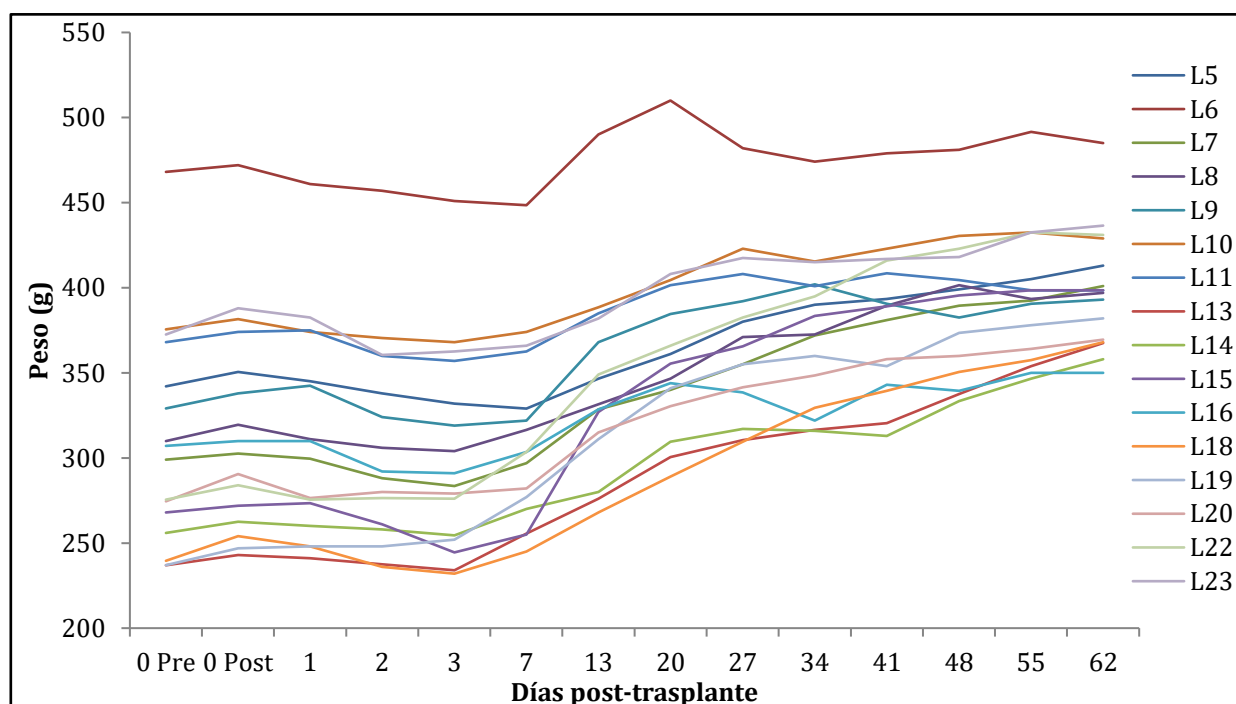




## 5.1 SUPERVIVENCIA Y SEGUIMIENTO CLÍNICO

La supervivencia global fue del 84,21%, con 16 ratas viables de 19 operadas. El tiempo medio de la intervención fue de 191,32 minutos (130 – 250 minutos), con un tiempo medio de microcirugía de 82,90 minutos (120 – 60 minutos). De los tres animales no viables, 2 murieron en el postoperatorio inmediato debido a parada cardiorrespiratoria por pérdida hemática producida durante la cirugía, y el tercero fue sacrificado el día 28 post-trasplante debido a infección tardía de la herida quirúrgica con empeoramiento del estado general.

La evolución ponderal de los 16 especímenes incluidos a lo largo de las 9 semanas de seguimiento se refleja en la *Figura 27*. No se observaron signos de EICH.



*Figura 27.* Evolución ponderal de los animales.

## 5.2 RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

Las concentraciones de citoquinas a nivel del tercio medio y distal del aloinjerto se encuentran detalladas en las *Tablas 8 y 9*. Las *Figuras 28, 29 y 30* muestran la representación en diagrama Box-Plot de la concentración de citoquinas con diferencias significativas.

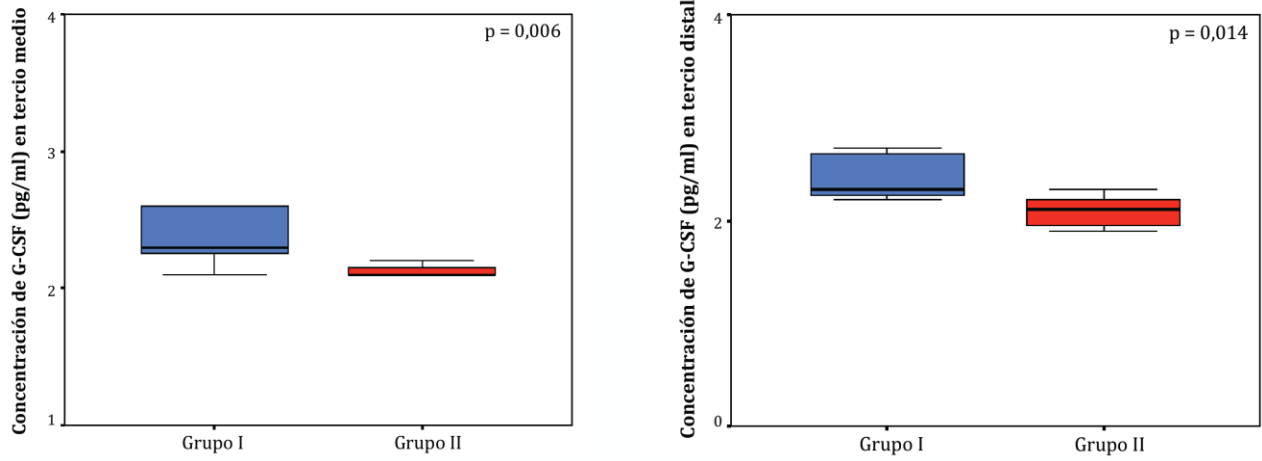
**Tabla 8.** Concentraciones de citoquinas (pg/ml) a nivel del tercio medio del aloinjerto, expresadas como media  $\pm$  desviación estándar (SD), mínimo y máximo.

Citoquina	Grupo I			Grupo II			P
	Media $\pm$ SD	Mínimo	Máximo	Media $\pm$ SD	Mínimo	Máximo	
Eotaxina	59,96 $\pm$ 33,94	26,4	115,0	38,33 $\pm$ 27,40	6,1	73,1	0,298
GRO- $\alpha$	39,65 $\pm$ 12,53	15,9	52,8	53,54 $\pm$ 40,40	21,9	143,0	1,000
G-CSF	2,94 $\pm$ 1,69	2,1	7,1	2,11 $\pm$ 0,07	2,0	2,2	0,006
GM-CSF	1,50 $\pm$ 0,27	1,1	1,8	1,34 $\pm$ 0,18	1,1	1,6	0,240
IFN- $\gamma$	18,01 $\pm$ 20,41	1,9	54,2	33,49 $\pm$ 27,15	6,5	75,0	0,132
IL-1 $\alpha$	9,50 $\pm$ 2,50	6,0	12,7	7,83 $\pm$ 0,95	6,5	8,9	0,270
IL-1 $\beta$	35,13 $\pm$ 24,76	15,3	91,4	33,03 $\pm$ 34,25	7,1	106,0	0,247
IL-2	3,55 $\pm$ 1,40	2,2	6,4	3,20 $\pm$ 1,31	1,9	5,7	0,487
IL-4	0,70 $\pm$ 0,38	0,4	1,4	0,59 $\pm$ 0,18	0,4	0,8	0,812
IL-5	0,79 $\pm$ 0,13	0,6	0,9	0,67 $\pm$ 0,08	0,6	0,8	0,063
IL-6	2,14 $\pm$ 0,21	1,8	2,5	1,81 $\pm$ 0,27	1,4	2,2	0,024
IL-10	8,81 $\pm$ 11,09	2,7	35,9	3,59 $\pm$ 0,74	2,5	4,3	0,180
IL-12	2,14 $\pm$ 0,75	1,6	3,9	1,59 $\pm$ 0,11	1,5	1,7	0,006
IL-13	0,76 $\pm$ 0,15	0,5	0,9	0,71 $\pm$ 0,16	0,5	1,0	0,444
IL-17A	2,00 $\pm$ 0,31	1,7	2,7	1,83 $\pm$ 0,15	1,7	2,1	0,170
IP-10	149,78 $\pm$ 55,64	46,2	213,0	163,57 $\pm$ 32,53	128,0	204,0	0,685
MCP-1	3178,63 $\pm$ 972,87	2294,0	5112,0	4378,00 $\pm$ 1831,17	2244,0	7229,0	0,245
MCP-3	476,13 $\pm$ 112,02	321,0	655,0	531,86 $\pm$ 83,14	390,0	641,0	0,385
MIP-1 $\alpha$	127,78 $\pm$ 27,51	94,2	176,0	186,04 $\pm$ 134,98	70,3	478,0	0,270
MIP-2	35,86 $\pm$ 59,06	0,8	164,0	98,80 $\pm$ 170,72	1,7	473,0	0,354
RANTES	3358,88 $\pm$ 657,74	2109,0	4309,0	3184,29 $\pm$ 602,90	2109,0	3784,0	0,772
TNF $\alpha$	0,63 $\pm$ 0,17	0,5	1,0	0,63 $\pm$ 0,24	0,4	1,1	0,629

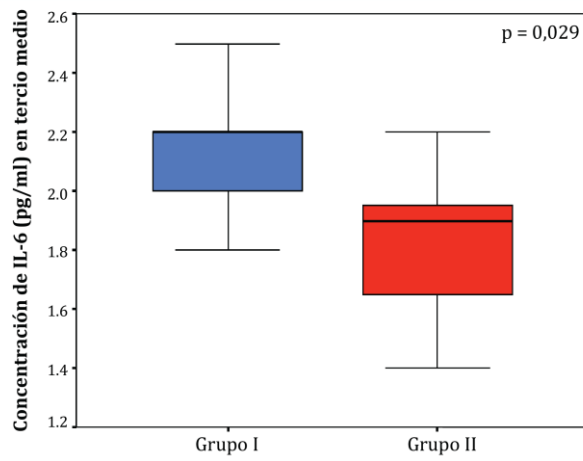
**Tabla 9.** Concentraciones de citoquinas (pg/ml) a nivel del tercio distal del aloinjerto, expresadas como media  $\pm$  desviación estándar (SD), mínimo y máximo.

Citoquina	Grupo I			Grupo II			P
	Media $\pm$ SD	Mínimo	Máximo	Media $\pm$ SD	Mínimo	Máximo	
Eotaxina	38,73 $\pm$ 15,76	21,7	60,2	29,06 $\pm$ 26,54	1,3	73,1	0,338
GRO- $\alpha$	105,79 $\pm$ 177,14	25,4	542,0	62,17 $\pm$ 41,87	29,6	149,0	0,685
G-CSF	3,09 $\pm$ 2,03	2,2	8,1	1,91 $\pm$ 0,55	0,7	2,3	0,013
GM-CSF	1,81 $\pm$ 0,85	0,8	3,2	1,47 $\pm$ 0,28	1,2	2,0	0,641
IFN- $\gamma$	25,60 $\pm$ 21,96	1,7	63,1	17,37 $\pm$ 15,21	2,2	40,0	0,487
IL-1 $\alpha$	13,00 $\pm$ 8,29	4,4	29,2	10,10 $\pm$ 3,37	6,8	16,8	0,817
IL-1 $\beta$	172,54 $\pm$ 438,63	9,8	1258,0	37,96 $\pm$ 52,28	5,7	154,0	1,000
IL-2	3,21 $\pm$ 1,32	2,1	6,0	2,66 $\pm$ 0,51	1,8	3,3	0,520
IL-4	0,90 $\pm$ 0,98	0,4	3,3	0,44 $\pm$ 0,13	0,3	0,7	0,063
IL-5	0,76 $\pm$ 0,10	0,7	1,0	1,83 $\pm$ 3,16	0,6	9,0	0,053
IL-6	2,09 $\pm$ 0,46	1,5	3,0	1,94 $\pm$ 0,37	1,6	2,7	0,447
IL-10	11,01 $\pm$ 16,26	3,4	50,8	3,51 $\pm$ 1,37	1,2	5,4	0,067
IL-12	2,33 $\pm$ 1,46	1,5	5,9	1,60 $\pm$ 0,08	1,5	1,7	0,029
IL-13	0,69 $\pm$ 0,11	0,6	0,9	0,76 $\pm$ 0,13	0,6	1,0	0,228
IL-17A	3,34 $\pm$ 3,91	1,7	13,0	2,14 $\pm$ 0,38	1,8	2,9	0,682
IP-10	147,15 $\pm$ 68,00	52,0	270,0	125,30 $\pm$ 57,60	41,4	175,0	0,643
MCP-1	3581,00 $\pm$ 2621,00	1520,0	9375,0	2178,00 $\pm$ 743,68	1075,0	3174,0	0,172
MCP-3	430,38 $\pm$ 189,53	247,0	814,0	330,11 $\pm$ 205,06	18,4	528,0	0,602
MIP-1 $\alpha$	1759,87 $\pm$ 3911,66	91,1	9743,0	210,57 $\pm$ 134,28	110,0	499,0	0,775
MIP-2	138,66 $\pm$ 231,36	0,8	656,0	84,27 $\pm$ 182,87	0,9	494,0	0,728
RANTES	2974,57 $\pm$ 757,09	1997,0	4217,0	2469,29 $\pm$ 1288,73	222,0	3703,0	0,565
TNF $\alpha$	0,70 $\pm$ 0,37	0,4	1,6	0,63 $\pm$ 0,30	0,4	1,3	0,334

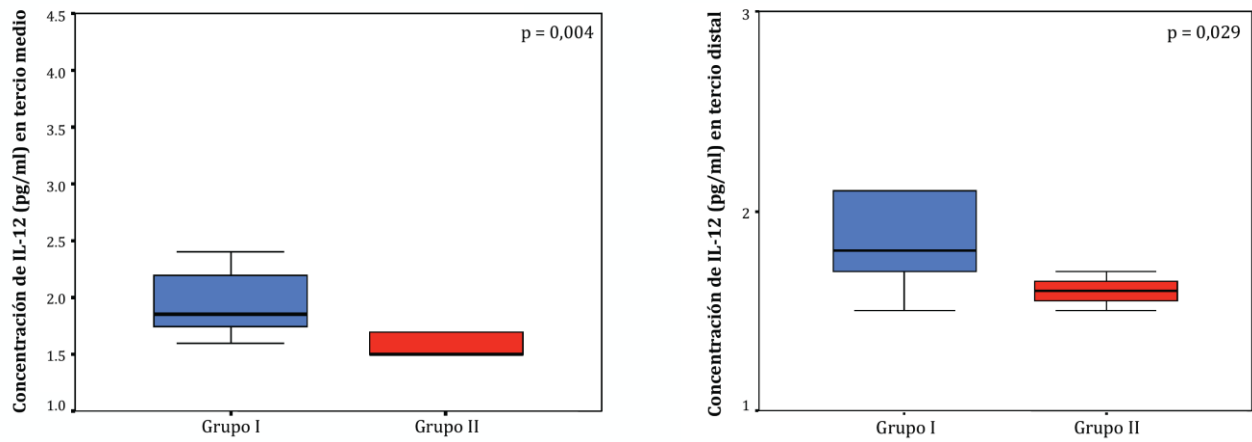
## Resultados



**Figura 28.** Representación Box-Plot de la concentración de G-CSF en tercios medio y distal.



**Figura 29.** Representación Box-Plot de la concentración de IL-6 en tercio medio.

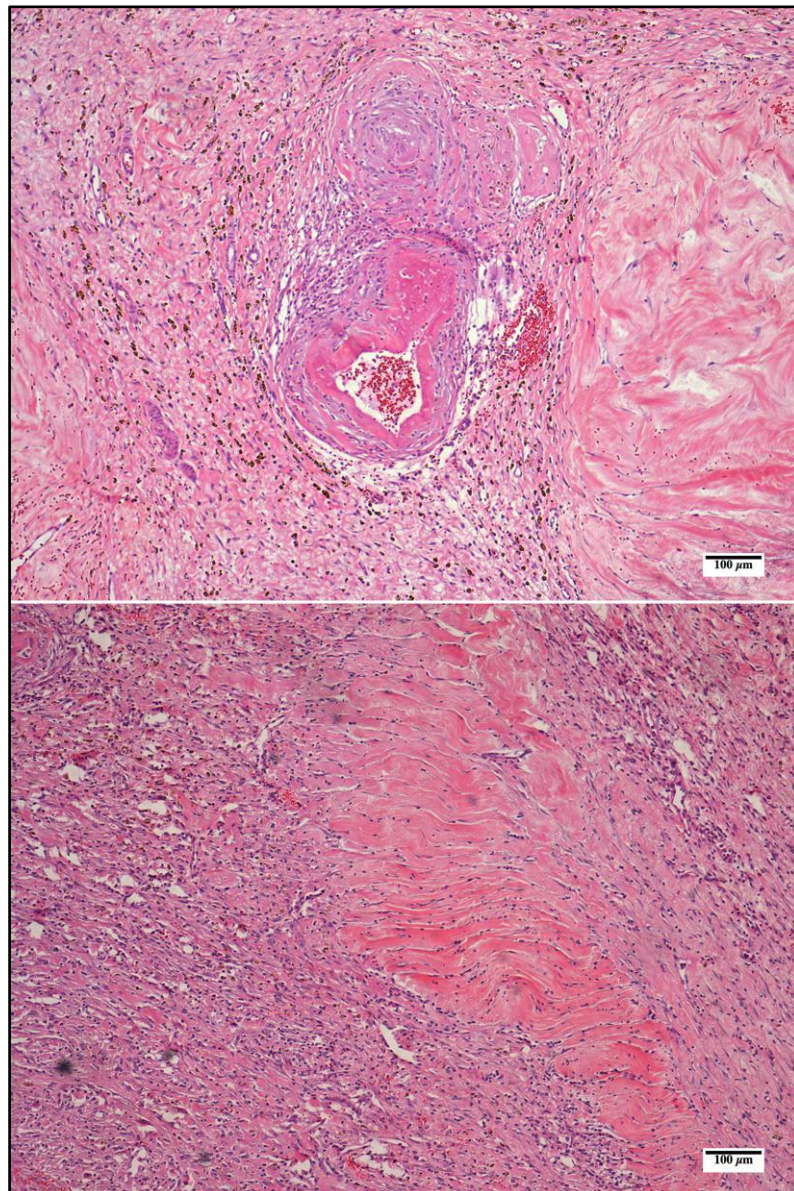


**Figura 30.** Representación Box-Plot de la concentración de IL-12 en tercios medio y distal.

### 5.3 RESULTADOS DEL INFILTRADO LEUCOCITARIO

#### 5.3.1 Cualitativa

El infiltrado leucocitario medio del grupo I fue intenso mientras que en grupo II fue moderado (*Figura 31*).



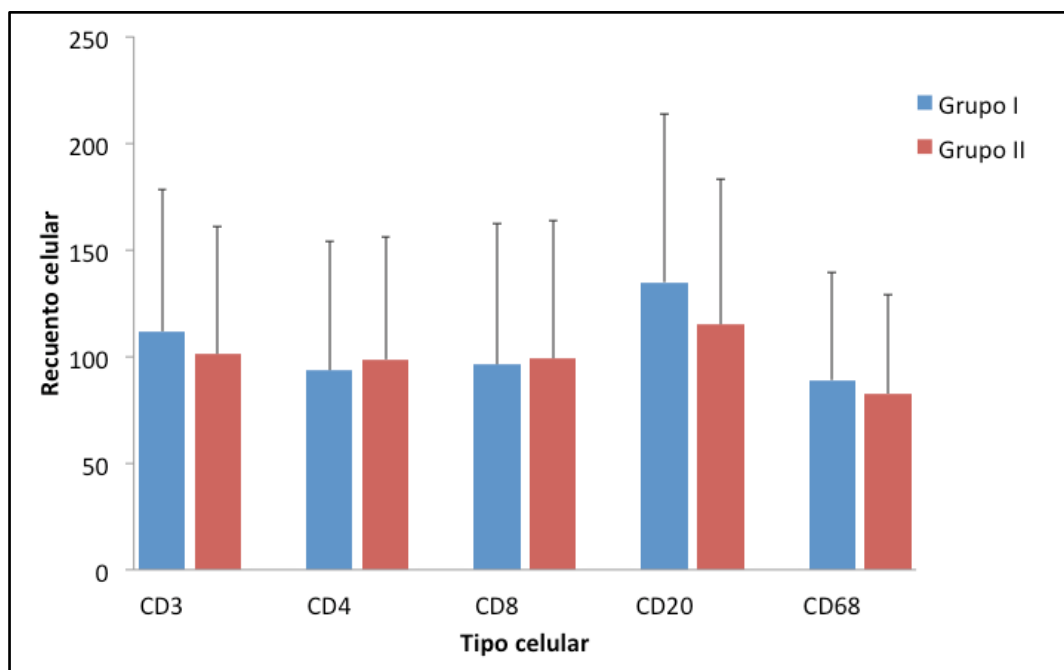
**Figura 31. Superior:** Infiltrado leucocitario de grado moderado. Tinción hematoxilina-eosina (x100).  
**Inferior:** Infiltrado leucocitario de grado intenso. Tinción hematoxilina-eosina (x100).

## Resultados

### 5.3.2 Cuantitativa

Los resultados de los contajes celulares en el tercio medio del aloinjerto por área media de  $90000 \mu\text{m}^2$  con una magnificación de  $\times 200$  para los estudios IHQ frente a los antígenos CD3, CD4, CD8, CD20 y CD68 se encuentran detallados en la *Tabla 10* y representados en la *Figura 32*. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

<b>Tabla 10. Resultados de los contajes celulares en el tercio medio del aloinjerto expresados como media <math>\pm</math> desviación estándar.</b>					
	<b>Células CD3+</b>	<b>Células CD4+</b>	<b>Células CD8+</b>	<b>Células CD20+</b>	<b>Células CD68+</b>
<b>Grupo I</b>	<b>111,79 <math>\pm</math> 66,82</b>	<b>93,25 <math>\pm</math> 61,31</b>	<b>96,09 <math>\pm</math> 66,53</b>	<b>134,85 <math>\pm</math> 79,14</b>	<b>88,97 <math>\pm</math> 50,65</b>
<b>Grupo II</b>	<b>101,05 <math>\pm</math> 60,11</b>	<b>98,63 <math>\pm</math> 57,64</b>	<b>99,18 <math>\pm</math> 64,46</b>	<b>115,09 <math>\pm</math> 68,28</b>	<b>82,58 <math>\pm</math> 46,20</b>

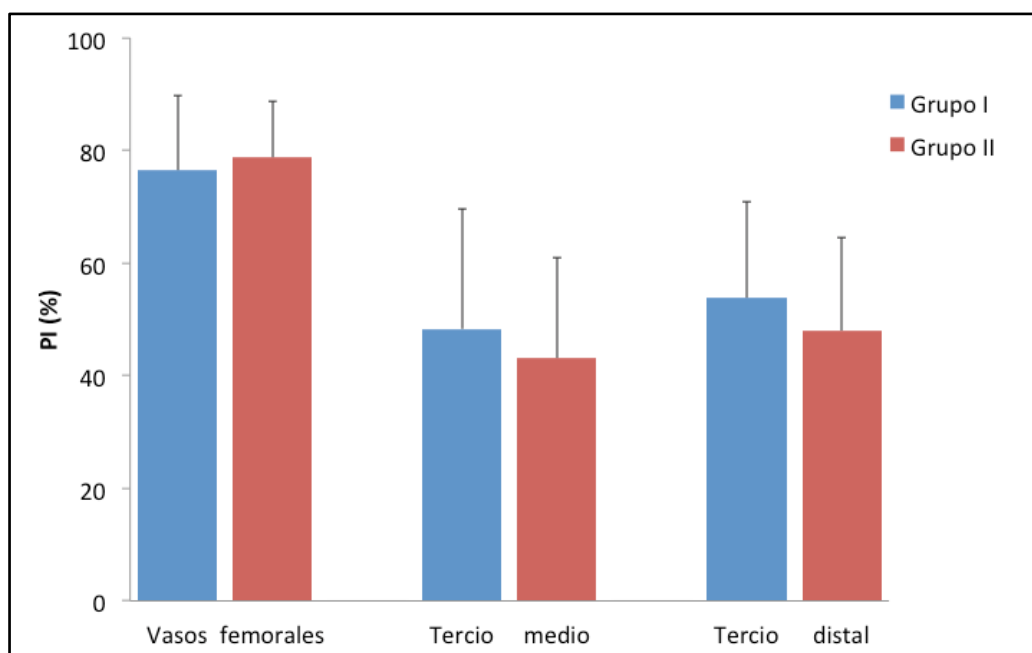


*Figura 32.* Resultados de los contajes celulares en el tercio medio del aloinjerto.

## 5.4 RESULTADOS DEL RECHAZO CRÓNICO

Todas las muestras estudiadas presentaron signos histopatológicos de RC. Los resultados de cada una de las muestras a nivel de los vasos femorales y de los vasos del tercio medio y distal del aloinjerto expresados como PI y PPA se encuentran recogidos en la *Tabla 11* y representados en las *Figuras 33* y *34*. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

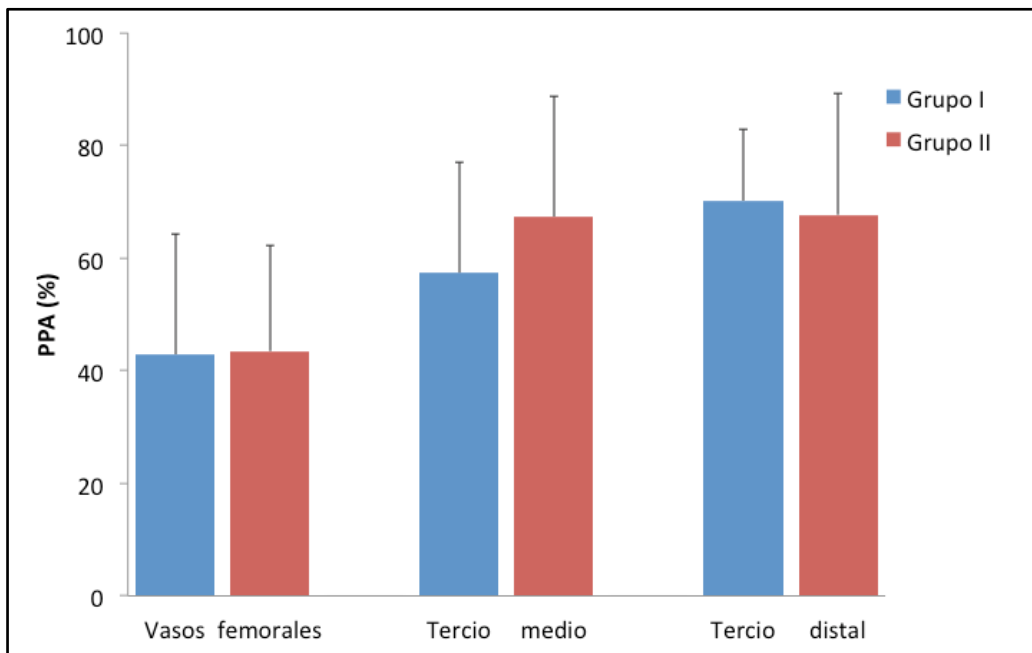
<b>Tabla 11. RC en los vasos femorales.</b>						
	Vasos femorales		Tercio medio		Tercio distal	
	PI (%)	PPA (%)	PI (%)	PPA (%)	PI (%)	PPA (%)
<b>Grupo I</b>	76,41 ± 13,36	42,92 ± 21,49	48,32 ± 21,25	57,41 ± 19,66	53,77 ± 17,07	70,19 ± 12,71
<b>Grupo II</b>	78,79 ± 9,88	43,49 ± 18,84	43,07 ± 17,98	67,37 ± 21,27	48,00 ± 16,66	67,70 ± 21,47



**Figura 33.** Resultados de la PI en los vasos femorales y en los tercio medio y distal del aloinjerto.



## Resultados



**Figura 34.** Resultados del PPA en los vasos femorales y en los tercios medio y distal del aloinjerto.

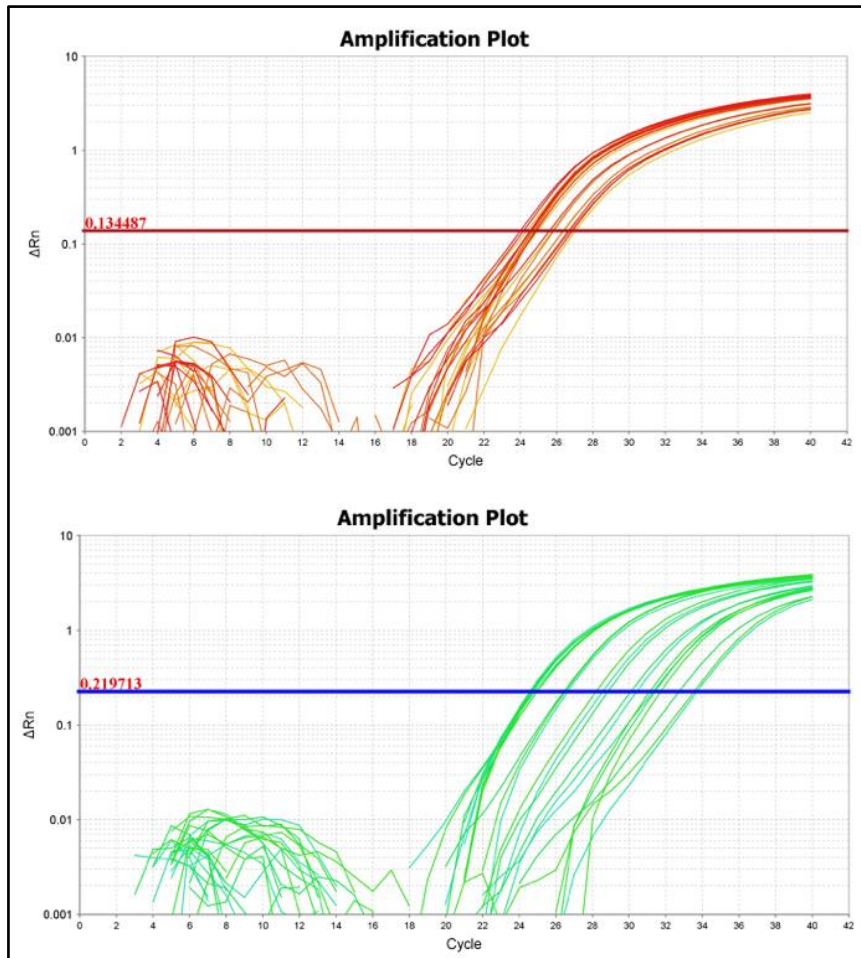
## **5.5 RESULTADOS DEL QUIMERISMO REVERSO ENDOTELIAL**

No fue posible realizar la valoración del QR endotelial.

## **5.6 RESULTADOS DEL QUIMERISMO REVERSO EN LA MÉDULA ÓSEA**

Las curvas de calibración se representan según los valores medios de  $2^{-\delta Ct}$  frente a los porcentajes de ADN de rata macho. El gen Bcl-2, localizado en el cromosoma 13, se utiliza como referencia para normalizar la cantidad total de ADN cargado en cada reacción de RT-PCR, y para cada muestra estándar es independiente de la concentración de ADN de rata macho. Sin embargo, la curva de amplificación del gen Sry, localizado en el cromosoma Y, migra a la izquierda con cada aumento de concentración de ADN de rata macho (*Figura 35*).

## Resultados



**Figura 35. Superior:** Curva de calibración del gen Bcl-2. **Inferior:** Curva de calibración del gen Sry.

La *Figura 36* muestra la curva estándar de RT-PCR para extrapolar el porcentaje de ADN macho. Los valores medios de  $\delta Ct$  ( $Ct^{Sry} - Ct^{Bcl-2}$ ) para cada muestra individual fueron calculados y se representaron los valores de  $2^{-\delta Ct}$  (eje Y) frente al porcentaje de ADN macho (eje X) (rango 0,2% - 100%) con su ajuste por regresión lineal.  $R^2$  representa el coeficiente de determinación.

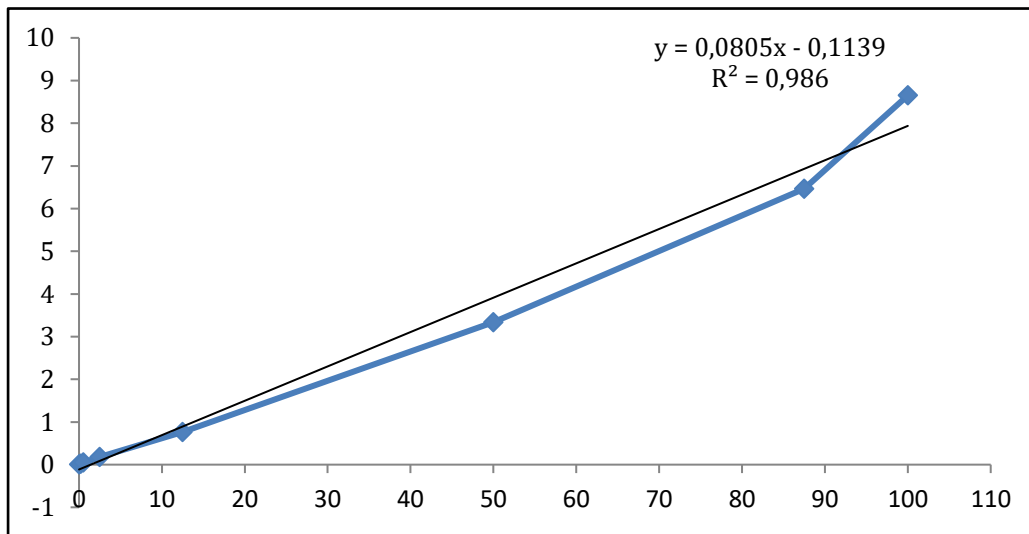


Figura 36. Curva estándar de calibración de RT-PCR para obtener el porcentaje de ADN macho.

Ambos grupos presentaron QR en MO. El porcentaje medio de QR en el grupo I y en el grupo II fue  $85,61\% \pm 16,41\%$  y  $88,40\% \pm 16,97\%$ , respectivamente (Figura 37). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

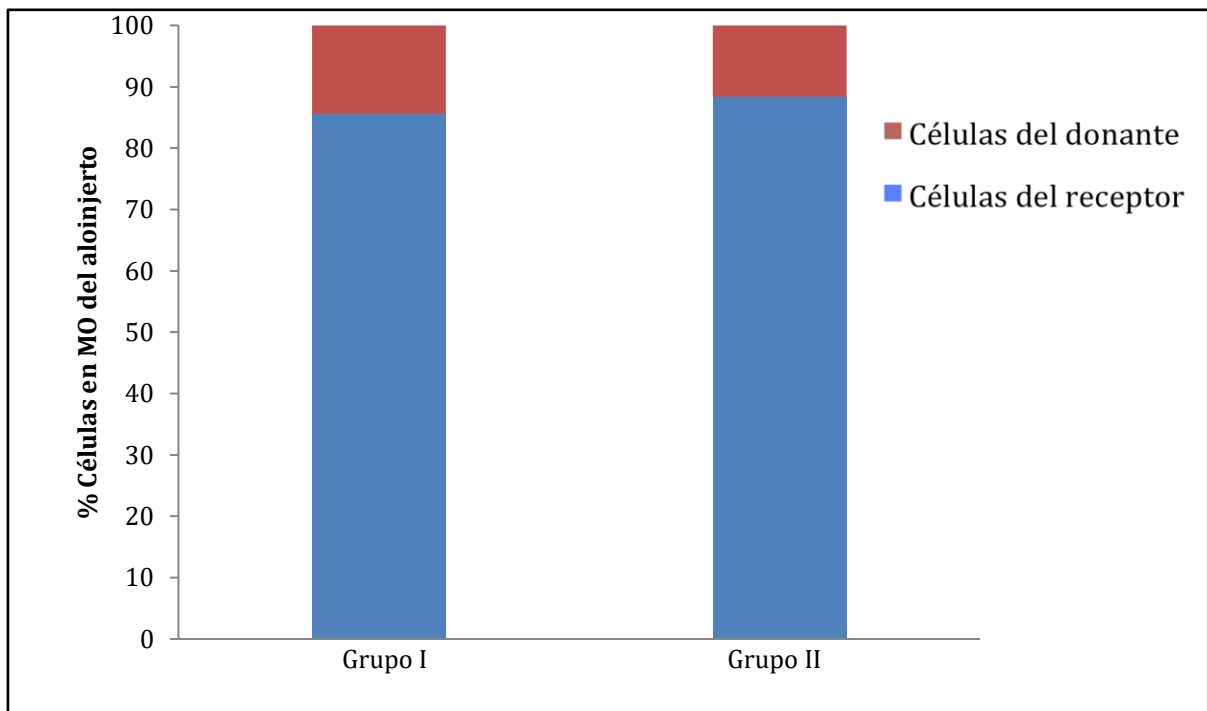


Figura 37. QR en MO del aloinjerto expresado como porcentaje de células del receptor y del donante.



## **6 DISCUSIÓN.**



Las CM de MO del donante tienen un efecto inmunoregulator que favorece la tolerancia del aloinjerto tras producir quimerismo hematopoyético en el receptor (301). Estudio in vitro muestran que las CM inducen muy poca o nula proliferación de linfocitos alogénicos, inhibiendo la proliferación de L<sub>T</sub> activadas y la formación de L<sub>T</sub> citotóxicos. Además, las CM tenderían a ocupar los tejidos dañados teniendo un potencial terapéutico en su reparación. (302) Se ha hipotetizado que el QR, que consiste en la repoblación del aloinjerto por células del receptor, también podría promover la aceptación del aloinjerto (252). La capacidad de una célula para actuar como una CM está regulada en gran medida por el entorno que forma el nicho donde reside (303). Los nichos pueden definirse como una combinación de matriz enlazada y factores solubles que pueden alterarse experimentalmente. Los factores presentes en un medio de condicionamiento para el desarrollo de un linaje celular regulan su programación y pueden cambiar la diferenciación de las células de forma reversible (304). Un ejemplo de cómo las CM adultas pueden reprogramarse se observó en CM neurales de ratones adultos. Estas células, inyectadas en un embrión se diferenciaban y contribuían en el desarrollo del riñón (305).

Las citoquinas participan en la regulación del rechazo y la tolerancia del aloinjerto (306,307). Sin embargo se desconoce el patrón de expresión de citoquinas en el papel del QR en la aceptación y rechazo de los aloinjertos de tejidos compuestos (306,308). Plerixafor es un fármaco que libera CMHe CD34<sup>+</sup> a sangre periférica. Nuestro experimento intentó dilucidar el patrón de citoquinas que se expresaba durante el RC en un modelo de QR en TTC heterotópicos de pata posterior de rata tras la movilización de CM de MO con plerixafor.

Zhu et al. describieron un modelo experimental de RC en trasplante de intestino delgado en ratas utilizando tacrólimus como tratamiento inmunosupresor.



## Discusión

Administraron pautas de tacrólimus altas (1 mg/kg/día), medias (0,5 mg/kg/día) y bajas (0,3 mg/kg/día) por vía intramuscular a los receptores los días 0-13, 20 y 27 postrasplante y observaron el desarrollo de RC en todos los grupos con una supervivencia de al menos 120 días postrasplante (309). Todos sus aloinjertos mostraron uno o más cambios histológicos característicos del RC como cambios en la arquitectura de las microvellosidades intestinales, fibrosis intersticial, infiltración leucocitaria y/o hiperplasia intimal (309). En base a los resultados publicados por Zhu, optamos por utilizar este protocolo para el desarrollo de RC con dosis bajas de tacrólimus y una supervivencia de al menos 120 días de los animales trasplantados ya que nuestro modelo de RC iba a tener un seguimiento clínico de 9 semanas. Okabayashi et al. utilizaron dosis bajas de tacrólimus (0,1 mg/kg/día) en un modelo experimental de trasplante hepático en ratas, administrado de forma subcutánea los días 0-3 y 7 postrasplante para prevenir el RA durante la primera semana para posteriormente estudiar la repoblación celular del aloinjerto por las CM de MO movilizadas farmacológicamente con plerixafor (287). Sus resultados mostraron una supervivencia de los aloinjertos de más de 180 días y una QR extenso aunque irregular en los aloinjertos hepáticos (287). Teniendo en cuenta que las dosis bajas de tacrólimus producen RC y estimulan la repoblación celular del aloinjerto, hemos optado por crear un modelo con una dosis bajas de tacrólimus asociado a tratamiento movilizador de CM de MO con plerixafor para tener RC y promover la repoblación celular (310). Nuestros resultados muestran la presencia de RC y QR en MO en todos los aloinjertos. Además, la expresión de citoquinas en el tejido muscular de los aloinjertos del grupo movilizado con plerixafor mostró una disminución significativa de G-CSF, IL-6 e IL-12. Estos cambios en el patrón de expresión de citoquinas son atribuibles a la presencia de CM de MO CD34+ que fueron movilizadas durante el experimento por plerixafor. Este es el

primer estudio experimental que utiliza el papel movilizador del plerixafor en el contexto de un TTC.

La inducción de tolerancia es uno de los objetivos que se pretende conseguir tras un trasplante para poder minimizar o eliminar el tratamiento inmunosupresor a largo plazo. Desde las primeras observaciones en roedores, se han probado diferentes protocolos clínicos con este objetivo (311-313). Los primeros ensayos encontraron una mayor supervivencia de los aloinjertos tras múltiples transfusiones de sangre no específicas y posteriormente específicas del donante (314,315). Posteriormente, como una extensión lógica de este enfoque se sugirió la presencia de un quimerismo mixto, con la infusión de MO del donante para inducir tolerancia a los aloinjertos renales y hepáticos (316,317). Además, las observaciones de Starzl et al. al documentaron el microquimerismo celular a largo plazo de líneas celulares derivadas de la MO en aloinjertos hepáticos y renales que habían suspendido la terapia inmunosupresora durante varios años (318,319). Las CM de MO del donante infundidas en el momento del trasplante podrían producir un efecto regulador de la respuesta inmunológica específica frente al aloinjerto (301). Esto también se ha demostrado en protocolos de TOS simultáneos a infusión de células de MO del donante con intención de producir quimerismo con una mayor supervivencia del aloinjerto (315,320). Bingaman et al. demostraron que los aloinjertos óseos podrían facilitar la producción de quimerismo hematopoyético en sangre periférica y tolerancia a largo plazo, encontrando una correlación directa entre la persistencia de células de MO del donante en el microambiente del aloinjerto y la supervivencia del aloinjerto (321). Realizaron trasplantes de fémur bajo la cápsula renal de los ratones receptores del aloinjerto y evaluaron el quimerismo, la viabilidad del aloinjerto óseo y la respuesta a aloantígenos in vitro y in vivo. Durlik et al. observaron que la transferencia de células de MO en los

## Discusión

TTC podría ser una fuente continua de CM de MO que mantendrían el quimerismo sistémico en el receptor y aumentarían de la supervivencia de aloinjertos de piel (322). Sus resultados mostraron que la infusión una suspensión de células de MO en cantidad equivalente a las transferidas tras realizar un TTC de pata de rata no prologó la supervivencia de los aloinjertos de piel tras cesar el tratamiento IS con ciclosporina. La transferencia de un compartimento vascularizado que contenga MO en un TTC proporciona al receptor un microambiente de MO funcional del donante en su nicho anatómico, pudiendo ser una fuente continua de células del donante. Talmor et al. han demostrado en estudios experimentales el efecto inmunomodulador de las células dendríticas derivadas de la MO así como la inducción de quimerismo en tejidos linfoides tras la transferencia ósea vascularizada en receptores no precondicionados con terapias ablativas y tratados con ciclosporina (323). Los aloinjertos óseos vascularizados y los TTC transfieren células de MO entre sus componentes. Esto favorece la producción de quimerismo sistémico linfohematopoyético en el receptor y se ha relacionado con una menor respuesta inmunitaria frente al aloinjerto y una mayor supervivencia a largo plazo del tejido trasplantado en estudios experimentales (301,323). Rao et al. identificaron que la infusión perioperatoria de células de MO del donante en pacientes con TOS aumentaba el quimerismo sistémico en sangre periférica (320). De igual manera que el quimerismo sistémico podría conseguir tolerancia, el QR podría producir tolerancia a través de las CM de MO del receptor. Estas CM de MO ocuparían nichos específicos en el aloinjerto, vacantes tras el daño tisular producido por el rechazo, para adoptar un linaje celular restrictivo de su nuevo entorno, permitiendo disminuir los requerimientos de tratamiento inmunosupresor y los efectos secundarios asociados.

Una potencial complicación tras la transferencia de MO vascularizada en

receptores inmunológicamente no competentes es la producción de EICH, caracterizada por dermatitis, alopecia, edema, cifosis, disnea y pérdida de peso precipitada (299). Durante el trasplante de MO, el receptor recibe CM del donante que reemplazan las células de MO del receptor en un proceso denominado prendimiento del injerto. Cuando las células del donante reconocen el tejido y las células del receptor, causan la EICH. Hasta el momento no hay evidencia de EICH tras TTC en modelos experimentales ni clínicos (34,285). De igual manera, en nuestro modelo de TTC de pata posterior de rata transferimos las CMHe de la MO del aloinjerto, pero en ninguno de los animales observamos ningún signo compatible con EICH. Este hecho podría deberse a que en los receptores de MO vascularizada, a pesar de estar inmunodeprimidos siguen siendo inmunológicamente competentes ya que no se ha vaciado su nicho medular. Observaciones previas y la nuestra propia confirman que un nicho de MO del donante se reemplaza en un alto porcentaje por MO del receptor (121,260,270,285,310). Esto produce un aloinjerto gradualmente menos alógeno en su compartimento medular. Todavía desconocemos las implicaciones que el reemplazo de la MO del donante pueda tener en la tolerancia del aloinjerto, pero es un mecanismo plausible que podría justificar el menor requerimiento de IS en el largo plazo de los pacientes trasplantados.

La supervivencia global de los animales incluidos en nuestro estudio fue del 84,21%, lo que supuso la pérdida de 3 ratas de las 19 intervenidas. La pérdida de dos de los animales se produjo en probable relación con el sangrado durante la cirugía. El tercero de los animales tuvo que ser sacrificado debido a una infección de la herida quirúrgica. Generalmente, durante la primera semana postoperatoria los animales perdieron peso, iniciando la ganancia ponderal a partir de los 7 días postoperatorios, en probable relación con el estrés postquirúrgico inmediato.

## Discusión

Los estudios experimentales en trasplante han demostrado que la respuesta inmunitaria frente a un órgano está regulada por la interacción de citoquinas (324,325). El daño del endotelio por la isquemia, la reperfusión y la cirugía desencadenan respuestas inflamatorias inespecíficas también mediadas por citoquinas (324-327). Las células endoteliales dañadas liberan mayores cantidades de IL-1 $\beta$  e IL-6, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , IL-8, factores estimuladores de colonias, así como múltiples factores de crecimiento como TNF- $\alpha$ , PDGF, IGF-1, TGF- $\alpha$  y FGF (328-331). Como resultado de un procedimiento quirúrgico se activa una red completa de citoquinas, incluso antes de producirse la respuesta inmunitaria de rechazo frente al aloinjerto. La producción de citoquinas en el endotelio activado produce una regulación positiva de la expresión del CMH e incrementa la adhesión de monocitos y L<sub>T</sub>, para la infiltración del tejido circundante. Por ejemplo, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inducen al endotelio vascular la transcripción de VCAM1 (332).

Como explicamos a continuación, la activación inespecífica del endotelio puede ser un factor de iniciación para el desarrollo de RA y/o RC en el aloinjerto. Los primeros estudios experimentales que analizaron las vías involucradas en el RA y la aceptación del aloinjerto mostraron que estos mecanismos están dominados por la producción de citoquinas tipo 1 o tipo 2 dentro del aloinjerto, respectivamente (80). Estudios experimentales en TOS sugirieron que el RA se asocia a la expresión en el aloinjerto de ARNm de citoquinas tipo 1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) (325,333-335). También se ha observado que la aceptación del aloinjerto se asociaba con una menor producción de citoquinas tipo 1 y una mayor producción de citoquinas tipo 2 (194-197). Sin embargo, a partir de estudios en animales genéticamente manipulados se observó que no siempre son necesarias citoquinas tipo 1 para que se produzca el rechazo, ni las citoquinas tipo 2 para que se inicie la aceptación del aloinjerto. Los ratones knockout para IL-2 e IFN- $\gamma$

rechazaron los aloinjertos en presencia de citoquinas tipo 2, y los ratones knockout para IL-4 aceptaron sus aloinjertos en presencia de citoquinas tipo 1 (336). Estos resultados sugieren que las citoquinas producidas por células distintas a los  $L_T$  también son capaces de inducir el rechazo del aloinjerto (337).

Se ha encontrado evidencia experimental del papel que tienen las citoquinas en la etiología del RC y la arteriosclerosis del aloinjerto. Estos estudios se han centrado en la producción de citoquinas por las células endoteliales y de músculo liso lesionadas y en la producción de citoquinas por los macrófagos activados. Los análisis semicuantitativos de RT-PCR en aloinjertos aórticos en ratas han mostrado el aumento de la expresión de ARNm de varias citoquinas como IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , PDGF, TNF- $\alpha$ , IGF-1 y FGF (330,338). Las citoquinas producidas por las células mononucleares que infiltran el aloinjerto también juegan un papel crítico en los procesos de rechazo crónico. En un modelo experimental de trasplante cardíaco con rechazo, la expresión de MCP-1 y factor inflamatorio del aloinjerto 1 y 2 se encontraron elevados (331,339). En este modelo, la arteriosclerosis del aloinjerto también se asoció a una mayor expresión de ARNm de IL-6 e IFN- $\gamma$ .

Se desconoce el patrón específico de expresión de citoquinas en el aloinjerto que justifique el rechazo o la tolerancia (80). Se ha sugerido que la respuesta de los  $L_{Th1}$  podría relacionarse con los episodios de rechazo, mientras que los  $L_{Th2}$  podrían estar involucradas en la generación de estados de tolerancia (197,340). Sin embargo, las interacciones moleculares que tienen lugar tras el trasplante son complejas, no siendo posible explicar el rechazo o la tolerancia de los aloinjertos sólo en base a la dicotomía entre citoquinas tipo 1 y tipo 2. Wu et al. observaron una mayor expresión de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en aloinjertos cardíacos con rechazo (333). Zhao et al. también

## Discusión

encontraron niveles aumentados de IL-6 e IFN- $\gamma$  en aloinjertos cardiacos de ratones durante los episodios de RA (341). Van Hoffer et al. demostraron niveles aumentados de IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 en aloinjertos cardiacos de pacientes con rechazo (211). Además, Liang et al. observaron una mayor supervivencia de aloinjertos cardiacos con déficit de expresión de IL-6, sugiriendo que el aloinjerto podría favorecer la activación de los linfocitos T efectores del rechazo mediante la producción de IL-6 (342). Nuestros resultados mostraron una menor expresión de IL-6 en el tercio medio de los aloinjertos del grupo tratado con plerixafor ( $P = 0,024$ ). Sin embargo, ambos grupos presentaron signos clínicos de RC sin encontrarse diferencias. Si consideramos que los niveles aumentados de IL-6 podrían relacionarse con los episodios de rechazo, nuestras observaciones podrían explicarse por la movilización de CM de MO por plerixafor.

de Mattos et al. identificaron expresión de IL-12 en aloinjertos renales durante los episodios de RA (343). Nuestros resultados mostraron una menor expresión de IL-12 en los tercios medio y distal de los aloinjertos del grupo tratado con plerixafor ( $P = 0,006$  y  $P = 0,029$ ). Al igual que con los resultados anteriores, ambos grupos presentaron signos clínicos de RC sin encontrarse diferencias entre ellos. Presuponiendo que los niveles aumentados de IL-12 podrían relacionarse con los episodios de rechazo, nuestros resultados podrían relacionarse con la movilización de CMHe por plerixafor.

No hay evidencia acerca de los niveles de expresión de G-CSF en los aloinjertos de TOS ni de TTC. Sin embargo, Vrtovec et al. concluyeron que la administración exógena de G-CSF parecía estar asociada con una menor incidencia de RA y RC en aloinjertos cardiacos, sugiriendo un potencial efecto modulador de la respuesta inmunitaria (344). Foster et al. también observaron un menor grado de rechazo en aloinjertos cardiacos tratados con G-CSF, relacionándolo con el posible efecto inhibitor del G-CSF de la liberación de TNF (345). Nuestros resultados mostraron una menor

expresión de G-CSF en los tercios medio y distal de los aloinjertos del grupo tratado con plerixafor ( $P = 0,006$  y  $P = 0,013$ ). En cambio, sería esperable que en nuestro estudio el grupo tratado con plerixafor hubiese presentado niveles superiores de G-CSF. Necesitaríamos mayor evidencia experimental del papel de G-CSF en el desarrollo del rechazo para tratar de conocer el papel de esta molécula.

Dado que la única diferencia entre ambos grupos fue la administración de plerixafor, nuestras observaciones en niveles disminuidos de IL-6, IL-12 y G-CSF podrían deberse a la presencia de CMHe movilizadas por plerixafor, lo cual sugiere que las CM de MO del receptor pueden tener un efecto modulador sobre la producción de citoquinas.

En nuestro estudio, el infiltrado leucocitario medio cualitativo en el grupo no tratado con plerixafor fue intenso mientras que en el grupo tratado con plerixafor fue moderado. Sin embargo, los contajes celulares por campo de  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD20^+$  y  $CD68^+$  no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos de experimentación. Estos resultados podrían deberse a que en ambos grupos de experimentación la presencia de RC estabiliza relativamente el infiltrado leucocitario aunque la intensidad sea menor en el grupo tratado con plerixafor, objetivándose poblaciones celulares estables en cuanto al número.

En nuestro trabajo, los contajes por campo de  $L_T CD4^+$  y  $L_T CD8^+$  pueden mantenerse estables debido a que el infiltrado inflamatorio crónicamente activado por la presencia de RC en ambos grupos de experimentación no se ve afectado por el tratamiento con plerixafor. Los macrófagos activados  $CD68^+$  son células efectoras de las reacciones  $CD4^+$  a través de la liberación de citoquinas. Cuando su activación se mantiene en el tiempo, estas citoquinas pueden actuar sobre las células mesenquimales



## Discusión

incrementando la fibrosis tisular e iniciando el desarrollo del RC (346). Al igual que con los contajes de  $L_T CD4^+$  y  $L_T CD8^+$ , los macrófagos  $CD68^+$  parece que no se ven afectados por el tratamiento con plerixafor. Una posible explicación a que los contajes celulares no muestren diferencias entre grupos podría deberse a que tampoco se han observado diferencias en el RC, ya que el RC sería la expresión histopatológica de la respuesta inflamatoria mantenida por los  $L_T CD4^+$  y  $CD8^+$  así como por los macrófagos activados  $CD68^+$ .

Los resultados histopatológicos de RC a nivel de los vasos más proximales como los vasos femorales y los vasos más distales como los del tercio medio y distal del aloinjerto no mostraron diferencias entre ambos grupos de estudio. Esto refleja que la hiperplasia intimal no se ve afectada por el tratamiento con plerixafor. Además, los datos obtenidos en la medición de la PI y del PPA son homogéneos en ambos grupos de aparición sincrónica a nivel del árbol vascular, por lo que podemos concluir que plerixafor no previno la aparición de RC.

Diferentes teorías centradas en el QR intentan explicar el proceso que hace que gradualmente se produzca mayor tolerancia frente al aloinjerto. El QR ha sido estudiado en TOS y TTC. Medawar fue el primero en hipotetizar que la aceptación del aloinjerto podría ser el resultado del reemplazo de las células del endotelio del aloinjerto por células del receptor, lo que se conoce como QR endotelial (252,298). Sin embargo, la función del aloinjerto depende de células especializadas que también pueden ser objeto de reemplazo, lo que se conoce como QR órgano específico (298). En el TOS, el QR órgano específico se demostraría por la presencia de cardiomiocitos en aloinjertos cardiacos, podocitos, células mesangiales y/o tubulares en aloinjertos renales, hepatocitos y/o colangiocitos en aloinjertos hepáticos, y células del epitelio respiratorio en aloinjertos pulmonares (258,276,347,348). Se desconoce la funcionalidad de estas

células dentro del aloinjerto. El QR de la MO se produce progresivamente, de forma similar a la sustitución celular descrita en los injertos óseos corticales o “creeping substitution” (349,350). La capacidad de producción de QR en la MO del aloinjerto sugiere la presencia de un microambiente favorable para este proceso. El QR se puede producir a partir de células indiferenciadas multipotenciales de la circulación sanguínea o del tejido sano adyacente. Se ha evidenciado histológicamente que las células de la piel, endotelio y médula ósea del donante son gradualmente reemplazadas por células del receptor, pero la mayor parte del periosteo y del tejido muscular sigue estando formado por células del donante (270).

El remodelado óseo es constante y se produce a partir de células osteoprogenitoras derivadas del periosteo o la médula ósea (271,351). Muramatsu et al. demostraron un incremento del ratio de células del receptor/donante a lo largo del tiempo tras un TTC de pata posterior en ratas (274). Esta repoblación celular se lleva a cabo por igual en todas las partes del hueso, lo que sugiere que las células del receptor llegarían al aloinjerto a través de la sangre periférica que accede al hueso por su arteria nutricia. Plerixafor, al aumentar los valores en sangre periférica de CMHe CD34<sup>+</sup>, podría acelerar la repoblación celular del aloinjerto. Las agresiones producidas en la extracción del aloinjerto como la osteotomía, o la isquemia durante la anastomosis microvascular podrían estimular la migración, proliferación y diferenciación de células indiferenciadas en osteoblastos, considerándose un mecanismo natural de remodelado óseo (260).

Las CM residentes en los diferentes tejidos juegan un papel fundamental en el mantenimiento y autorrenovación de los mismos. El crecimiento y la reparación de las fibras musculares esqueléticas en el periodo postnatal depende de una población residente de precursores miogénicos conocida como células satélite (352). En respuesta

## Discusión

a la lesión muscular, las células satélite se dividen y fusionan para reparar o reemplazar las fibras dañadas. Este proceso se limita exclusivamente al músculo dañado y al adyacente y su potencial de autorenovación es limitado. (280) Entre los mecanismos propuestos se encuentran la migración de células satélite desde las fibras adyacentes y el reclutamiento de células no miogénicas como los progenitores mesenquimales. (353) Se ha demostrado en estudios *in vitro* que las células mesenquimales derivadas del estroma de la MO pueden diferenciarse en miotubos contráctiles (281). También se ha demostrado QR en tejido muscular menor del 10% a las 48 semanas post-trasplante (307), encontrando células del receptor alrededor de vasos sanguíneos de pequeño calibre. También se ha objetivado QR en piel, pero no se ha demostrado el paso de células del donante hacia el tejido cutáneo del receptor (307). Al igual que el resto de tejidos, también se daña el endotelio vascular. La mayor parte de las células endoteliales son reemplazadas por células del receptor. Hristov y Weber observaron que la reparación celular tras isquemia puede producirse a partir de la migración y la proliferación de células endoteliales maduras adyacentes (354). Sin embargo, el endotelio maduro lo forman células diferenciadas con una baja tasa proliferativa. Estudios recientes indican que la sangre periférica contiene CM de MO con potencial de diferenciación en células endoteliales (354).

Muramatsu et al. observaron en un modelo experimental de TTC en ratas que el QR óseo era de aproximadamente un 90% a las 24 semanas post-trasplante (260,274). El QR óseo estudiado por Muramatsu eliminaba la MO del aloinjerto y se centraba en el tejido óseo, demostrando que las células óseas del donante eran gradualmente reemplazadas por células del receptor no derivadas del hueso. Ninguno de sus aloinjertos óseos presentó episodios de rechazo y la duración de la terapia con tacrólimus no presentó diferencias en la extensión del QR (274,355). Mathes et al.

encontraron que el QR en MO de TTC en cerdos era progresivo y llegaba a ser completo a las 48 semanas post-trasplante (285). Mundinger et al. observaron en TTC en primates que la MO del donante había sido reemplazada completamente por células del receptor a los 180 días del trasplante (120). Nuestros resultados muestran a las 9 semanas unos porcentajes de QR en MO que varían entre el 85% y el 88%, lo que confirma que el QR en MO del aloinjerto se produce de forma precoz.

Las técnicas comúnmente utilizadas para detectar el QR son la IHQ, el cariotipo, la hibridación fluorescente in situ (FISH), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el uso de animales transgénicos (257,259,268,270,274). Sedmak et al. estudiaron la endotelización por células del receptor de aloinjertos renales mediante IHQ frente a antígenos del grupo sanguíneo ABO. Sin embargo, esta técnica está limitada a trasplantes entre individuos ABO no idénticos, dificultando su uso en modelos animales (255). Porter utilizó el cariotipado de aloinjertos hepáticos, pero esta técnica requería la presencia de células en metafase de mitosis. En la actualidad, la técnica FISH es probablemente la más común para la detección del cromosoma Y entre trasplantes que cruzan el sexo (254). Sin embargo, la técnica FISH en tejidos calcificados es altamente exigente (356,357). La producción de muestras parafinadas a partir de tejidos calcificados requiere su descalcificación previa. La descalcificación ácida del tejido puede provocar la hidrólisis del ADN, produciendo su pérdida para la posterior aplicación de la técnica FISH (358). La incapacidad para poder llevar a cabo la técnica FISH en la MO de nuestros aloinjertos puede estar relacionado con este procesamiento de las muestras. Debido a que la descalcificación no se realizó en las muestras de tejido vascular para la detección del QR endotelial, al menos conseguimos hibridar los cromosomas X, observándose el fluorocromo rojo con el que se marcaron. Aunque la eficiencia de la hibridación del cromosoma Y en células intactas puede alcanzar el 99%,

## Discusión

no es tan alta en cortes tisulares en los que algunos núcleos han podido ser dañados durante su procesado (270). Otras técnicas moleculares que se han empleado para el estudio de la migración celular tras el trasplante es el uso de ratones transgénicos que expresan genes informadores como la proteína verde fluorescente o  $\beta$ -galactosidasa (359-362). La PCR es la herramienta más fácil y fiable para probar la existencia de diferentes materiales genéticos en el mismo tejido (363-365). Se han realizado diferentes estudios de PCR para determinar el ratio células masculinas:células femeninas en aloinjertos óseos con valores de sensibilidad muy altos para el cromosoma Y, detectando ADN masculino en una relación  $\geq 1:1000$  (270,274). La comparación de las bandas formadas permiten una evaluación semicuantitativa del ratio celular masculino:femenino adecuado para el análisis cuantitativo del QR (366,367). Al igual que Muramatsu et al y a causa de las limitaciones técnicas de la hibridación in situ, hemos utilizamos la RT-PCR para valorar el QR en MO del aloinjerto con una sensibilidad de detección de 1:1000 células XY, siendo una técnica fiable y eficaz para el estudio del QR (270,274).

## 6.1 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente estudio tiene diferentes limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados presentados.

- Se ha utilizado un modelo de RC mediante el uso de dosis sub-terapéuticas de tratamiento IS con tacrólimus. Este hecho no se corresponde con la práctica clínica habitual pero nos ha permitido desarrollar un modelo experimental de RC.
- Se ha utilizado plerixafor como movilizador de CM de MO a sangre periférica para estudiar su papel en la expresión de citoquinas y en el QR. Actualmente, el plerixafor está aprobado para su uso clínico en combinación con G-CSF y para la movilización desde MO a sangre periférica en pacientes con enfermedades oncohematológicas, no en el campo de los TTC. Sin embargo, el uso de plerixafor nos ha permitido incrementar los niveles de CM de MO circulantes para estudiar su papel en el TTC.
- El modelo de TTC mediante la transferencia osteomuscular heterotópica de pata posterior entre ratas puede modificar los resultados obtenidos así como su interpretación ya que no se ha incluido el componente cutáneo del aloinjerto ni se han realizado procedimientos de neurorrafia ni osteosíntesis para valorar su funcionalidad. Este hecho puede incrementar la fibrosis tisular debido a la ausencia de funcionalidad del tejido trasplantado.



## **7 CONCLUSIONES.**





- La expresión de G-CSF, IL-6 e IL-12 en el tejido muscular del aloinjerto se encontró disminuida significativamente en el grupo sometido a tratamiento movilizador de CM de MO CD34<sup>+</sup> con plerixafor. Esto nos permite rechazar la H<sub>0</sub> y aceptar la H<sub>1</sub> y verificar el objetivo principal del trabajo, que la movilización de CM de MO CD34<sup>+</sup> modifica la expresión de G-CSF, IL-6 e IL-12 en los aloinjertos de TTC.

- El infiltrado leucocitario cualitativo en el tercio medio del tejido muscular del aloinjerto puede comportarse como un marcador de la intensidad del RC. El infiltrado leucocitario cuantitativo no ha permitido aclarar el componente celular predominante en el RC.

- El grado de RC en los vasos femorales y del tercio medio y distal del tejido muscular del aloinjerto no se ha visto modificado tras el tratamiento con plerixafor.

- No ha sido técnicamente posible determinar el porcentaje de QR endotelial de los vasos femorales del aloinjerto.

- El tratamiento con plerixafor puede incrementar el porcentaje de QR en la MO del aloinjerto.



## **9 BIBLIOGRAFÍA.**



1. OPTN. OPTN Organ Procurement and Transplantation Network Policies.[http://optn.transplant.hrsa.gov/ContentDocuments/OPTN\\_Policies.pdf#nameddest=Policy\\_12](http://optn.transplant.hrsa.gov/ContentDocuments/OPTN_Policies.pdf#nameddest=Policy_12). Updated 2016. Accessed November 2, 2015.
2. Black KS, Hewitt CW, Fraser LA, Osborne JG, Achauer BM, Martin DC, et al. Cosmas and Damian in the laboratory. *N Engl J Med*. 1982;306:368-9.
3. Kahan BD. Cosmas and Damian revisited. *Transplant Proc*. 1983;15:2211-6.
4. Martin CE. John Hunter and tissue transplantation. *Surg Gynecol Obstet*. 1970;131:306–10.
5. Carrel A. La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. *Lyon Médical*, 98(1902), pp.858-64.
6. Carrel A, Guthrie CC. Anastomosis of blood vessels by the patching method and transplantation of the kidney. 1906 [classical article]. *Yale J Biol Med*. 2001;74:243–7.
7. Baar HS. From Ehrlich-Pirquet to Medawar and Burnet; A revolution in immunology. *J Maine Med Assoc*. 1963;54:209–14.
8. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat*. Wiley-Blackwell; 1943;77:299–310.4.
9. Harrison JH, Merrill JP, Murray JE. Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum*. 1956;6:432–6.
10. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *JAMA*. 1956;160:277–82.
11. Murray JE, Merrill JP, Dammin GJ, Dealy JB, Walter CW, Brooke MS, et al. Study on transplantation immunity after total body irradiation: clinical and experimental investigation. *Surgery*. 1960;48:272–84.

## Bibliografia

12. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Friedman EA, Dealy JB Jr., Dammin GJ. Successful Homotransplantation of the Kidney between Nonidentical Twins. *N Engl J Med.* 1960;262:1251–60.
13. Zukoski CF, Lee HM, Hume DM. The prolongation of functional survival of canine renal homografts by 6-mercaptopurine. *Surg Forum.* 1960;11:470–2.
14. Calne RY. The rejection of renal homografts. Inhibition in dogs by 6-mercaptopurine. *Lancet.* 1960;1:417–8.
15. Murray JE, Balankura O, Greenber JB, Dammin GJ. Reversibility of the kidney homograft reaction by retransplantation and drug therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1962;99:768–80.
16. Merrill JP, Murray JE, Takacs FJ, Hager EB, Wilson RE, Dammin GJ. Successful transplantation of kidney from a human cadaver. *JAMA.* 1963;185:347–53.
17. Goodwin WE, Kaufman JJ, Mims MM, Turner RD, Glasscock R, Goldman R, et al. Human renal transplantation. I. Clinical experiences with six cases of renal homotransplantation. *J Urol.* 1963;89:13–24.
18. Borel JF, Kis ZL. The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune). *Transplant Proc.* 1991;23:1867–74.
19. Peacock EE. Restoration of finger flexion with homologous composite tissue tendon grafts. *Am Surg.* 1960;26:564–71.
20. Peacock EE, Madden JW. Human composite flexor tendon allografts. *Ann Surg.* 1967;166:624–9.
21. Guimberteau JC, Panconi B, Boileau R. [Simple and composite ulnar transplants in reconstructive surgery of the hand]. *Ann Chir Plast Esthet.* 1994;39:301–17.
22. Guimberteau JC, Baudet J, Panconi B, Boileau R, Potaux L. Human allotransplant of a digital flexion system vascularized on the ulnar pedicle: a preliminary report and 1-year follow-up of two cases. *Plast Reconstr Surg.* 1992;89:1135–47.

23. Gilbert R. Transplant is successful with a cadaver forearm. *Med Trib Med News*. 1964;5:20.
24. Gilbert R. Hand transplanted from cadaver is reamputated. *Med Trib Med News*. 1964;5:23.
25. Murray JE. Organ transplantation (skin, kidney, heart) and the plastic surgeon. *Plast Reconstr Surg*. 1971;47:425–31.
26. Furnas DW, Black KS, Hewitt CW. Cyclosporine and long-term survival of composite tissue allografts (limb transplants) in rats (with historical notes on the role of plastic surgeons in allotransplantation). *Transplant Proc*. 1983;15:3063.
27. Goto T, Kino T, Hatanaka H, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M, et al. Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc*. 1987;19:4–8.
28. Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev*. 1993;136:5–28.
29. Benhaim P, Anthony JP, Ferreira L, Borsanyi JP, Mathes SJ. Use of combination of low-dose cyclosporine and RS-61443 in a rat hindlimb model of composite tissue allotransplantation. *Transplantation*. 1996;61:527–32.
30. Ustuner ET, Zdichavsky M, Ren X, Edelstein J, Maldonado C, Ray M, et al. Long-term composite tissue allograft survival in a porcine model with cyclosporine/mycophenolate mofetil therapy. *Transplantation*. 1998;66:1581–7.
31. Jones JW, Ustuner ET, Zdichavsky M, Edelstein J, Ren X, Maldonado C, et al. Long-term survival of an extremity composite tissue allograft with FK506-mycophenolate mofetil therapy. *Surgery*. 1999;126:384–8.
32. Hofmann GO, Kirschner MH, Wagner FD, Brauns L, Gonschorek O, Buhren V. Allogeneic vascularized transplantation of human femoral diaphyses and total knee joints--first clinical experiences. *Transplant Proc*. 1998;30:2754–61.



## Bibliografia

33. Hofmann GO, Kirschner MH. Clinical experience in allogeneic vascularized bone and joint allografting. *Microsurgery*. 2000;20:375–83.
34. Dubernard JM, Owen E, Herzberg G, Lanzetta M, Martin X, Kapila H, et al. Human hand allograft: report on first 6 months. *Lancet*. 1999;353:1315–20.
35. Dubernard JM, Owen E, Lefrancois N, Petruzzo P, Martin X, Dawahra M, et al. First human hand transplantation. Case report. *Transpl Int*. 2000;13 Suppl 1:S521–4.
36. Jones JW, Gruber SA, Barker JH, Breidenbach WC. Successful hand transplantation. One-year follow-up. Louisville Hand Transplant Team. *N Engl J Med*. 2000;343:468–73.
37. Petruzzo P, Dubernard JM. Hand transplantation: Lyon experience. In: Dubernard JM, editor. Composite tissue allografts. Paris; 2001. p. 63.
38. Strome M, Stein J, Esclamado R, Hicks D, Lorenz RR, Braun W, et al. Laryngeal transplantation and 40-month follow-up. *N Engl J Med*. 2001;344:1676–9.
39. Devauchelle B, Badet L, Lengelé B, Morelon E, Testelin S, Michallet M, et al. First human face allograft: early report. *Lancet*. 2006;368:203–9.
40. Khamsi R. World's second face transplant performed in China. *New Scientist* 18, 2006.
41. Lantieri L, Meningaud J-P, Grimbert P, Bellivier F, Lefaucheur J-P, Ortonne N, et al. Repair of the lower and middle parts of the face by composite tissue allotransplantation in a patient with massive plexiform neurofibroma: a 1-year follow-up study. *Lancet*. 2008;372:639–45.
42. Dubernard J-M, Devauchelle B. Face transplantation. *Lancet*. 2008;372:603–4.
43. Grayling AC. Face transplantation and living a flourishing life. *Lancet*. 2008;371:707–8.

44. Kluyskens P, Ringoir S. Follow-up of a human larynx transplantation. *The Laryngoscope*. 1970;80:1244–50.
45. Levi DM, Tzakis AG, Kato T, Madariaga J, Mittal NK, Nery J, et al. Transplantation of the abdominal wall. *Lancet*. 2003;361:2173–6.
46. Selvaggi G, Levi DM, Kato T, Madariaga J, Moon J, Nishida S, et al. Expanded use of transplantation techniques: abdominal wall transplantation and intestinal autotransplantation. *Transplant Proc*. 2004;36:1561–3.
47. Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2001;107:1419-29.
48. Birchall M. Tongue transplantation. *Lancet*. 2004;363:1663.
49. Jiang HQ, Wang Y, Hu XB, Li YS, Li JS. Composite tissue allograft transplantation of cephalocervical skin flap and two ears. *Plast Reconstr Surg*. 2005;115:31e–35e–discussion36e–37e.
50. Fageeh W, Raffa H, Jabbad H, Marzouki A. Transplantation of the human uterus. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002;76:245–51.
51. Hu W, Lu J, Zhang L, Wu W, Nie H, Zhu Y, et al. A preliminary report of penile transplantation. *Eur Urol*. 2006;50:851–3.
52. International Registry on Hand and Composite Tissue Transplantation. Accessed on September 8, 2008. <http://www.handregistry.com>.
53. Tobin GR, Breidenbach WC, Klapheke MM, Bentley FR, Pidwell DJ, Simmons PD. Ethical considerations in the early composite tissue allograft experience: a review of the Louisville Ethics Program. *Transplant Proc*. 2005;37:1392–5.
54. Klapheke MM, Marcell C, Taliaferro G, Creamer B. Psychiatric assessment of candidates for hand transplantation. *Microsurgery*. 2000;20:453–7.
55. Breidenbach WC, Tobin GR, Gorantla VS, Gonzalez RN, Granger DK. A position statement in support of hand transplantation. *J Hand Surg Am*. 2002;27:760–70.

## Bibliografia

56. Lanzetta M, Petruzzo P, Dubernard J-M, Margreiter R, Schuind F, Breidenbach W, et al. Second report (1998-2006) of the International Registry of Hand and Composite Tissue Transplantation. *Transpl Immunol*. 2007;18:1–6.
57. Kanitakis J, Jullien D, Petruzzo P, Hakim N, Claudy A, Revillard J-P, et al. Clinicopathologic features of graft rejection of the first human hand allograft. *Transplantation*. 2003;76:688–93.
58. Hettiaratchy S, Butler PE, Lee WP. Lessons from hand transplantations. *Lancet*. 2001;357:494–5.
59. Tobin GR, Granger DK, Breidenbach WC. Hand transplantation follow-up. *Lancet*. 2001;358:1018.
60. Jones NF. Concerns about human hand transplantation in the 21st century. *J Hand Surg Am*. 2002;27:771–87.
61. Tobin GR, Breidenbach WC, Ildstad ST, Marvin MM, Buell JF, Ravindra KV. The history of human composite tissue allotransplantation. *Transplant Proc*. Elsevier; 2009;41:466–71.
62. Medawar PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat*. 1944;78:176–99.
63. Medawar PB. A second study of the behaviour and fate of skin homografts in rabbits: A Report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat*. 1945;79:157–176.4.
64. Kirk AD. Surgery: Basic Science and Clinical Evidence. In: Surgery. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2001. pp. 1403–28.
65. Petersdorf EW. The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. *Blood*. 2013;122:1863–72.
66. Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today*. 1993;14:349–52.

67. Kirk AD. Immunology of Transplantation. In: Norton JA, Randal Bollinger R, Chang AE, et al., eds. *Surgery: Basic Science and Clinical Evidence*. New York:Springer; 2000;págs:1403-1429.
68. Womer KL, Sayegh MH, Auchincloss HJ. Involvement of the direct and indirect pathways of allorecognition in tolerance induction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356:639–47.
69. Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*. 1987;330:256–9.
70. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. Epstein FH, editor. *N Engl J Med*. 1998;338:1813–21.
71. Bach F, Hirschhorn K. Lymphocyte interaction: a potential histocompatibility test in vitro. *Science*. 1964;143:813–4.
72. Lee RS, Yamada K, Houser SL, Womer KL, Maloney ME, Rose HS, et al. Indirect recognition of allopeptides promotes the development of cardiac allograft vasculopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:3276–81.
73. Amin KR, Wong JKF, Fildes JE. Strategies to Reduce Ischemia Reperfusion Injury in Vascularized Composite Allotransplantation of the Limb. *J Hand Surg Am*. 2017;42:1019–24.
74. Kezić A, Stajic N, Thaiss F. Innate Immune Response in Kidney Ischemia/Reperfusion Injury: Potential Target for Therapy. *J Immunol Res*. 2017;2017:6305439–10.
75. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591–619.
76. Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, Rizeq M, Gill RG. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest*. 2000;106:1003–10.

## Bibliografia

77. Burrell BE, Csencsits K, Lu G, Grabauskiene S, Bishop DK. CD8+ Th17 mediate costimulation blockade-resistant allograft rejection in T-bet-deficient mice. *J Immunol*. 2008;181:3906–14.
78. Lakkis FG. Role of cytokines in transplantation tolerance: lessons learned from gene-knockout mice. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:2361–7.
79. Dallman MJ. Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult. *Curr Opin Immunol*. 1995;7:632–8.
80. Baan CC, Weimar W. Intra-graft cytokine gene expression: implications for clinical transplantation. *Transpl Int*. 1998;11:169–80.
81. Chung BH, Kim KW, Kim B-M, Doh KC, Cho M-L, Yang CW. Increase of Th17 Cell Phenotype in Kidney Transplant Recipients with Chronic Allograft Dysfunction. *PLoS One*. 2015;10:e0145258.
82. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2004;351:2715–29.
83. Wang D, Matsumoto R, You Y, Che T, Lin X-Y, Gaffen SL, et al. CD3/CD28 costimulation-induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and IkappaB kinase beta to the immunological synapse through CARMA1. *Mol Cell Biol*. 2004;24:164–71.
84. Parker DC, Greiner DL, Phillips NE, Appel MC, Steele AW, Durie FH, et al. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:9560–4.
85. Hancock WW, Sayegh MH, Zheng XG, Peach R, Linsley PS, Turka LA. Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:13967–72.

86. Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med.* 1996;183:2541–50.
87. Tittelbach-Helmrich D, Bausch D, Drognitz O, Goebel H, Schulz-Huotari C, Kramer-Zucker A, et al. Hyperacute rejection of a living unrelated kidney graft. *Case Rep Med.* 2014;2014:613641.
88. Baldwin WM3, Pruitt SK, Brauer RB, Daha MR, Sanfilippo F. Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury, and rejection. *Transplantation.* 1995;59:797–808.
89. Baldwin WM, Valujskikh A, Fairchild RL. Mechanisms of antibody-mediated acute and chronic rejection of kidney allografts. *Curr Opin Organ Transplant.* 2016;21:7–14.
90. Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol.* 2002;10:101–8.
91. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today.* 1995;16:39–43.
92. Amore A. Antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant.* 2015;20:536–42.
93. Morelon E, Kanitakis J, Petruzzo P. Immunological Issues in Clinical Composite Tissue Allograft Transplantation. *Transplantation.* 2012;93:855–9.
94. Lee WP, Yaremchuk MJ, Pan YC, Randolph MA, Tan CM, Weiland AJ. Relative antigenicity of components of a vascularized limb allograft. *Plast Reconstr Surg.* 1991;87:401–11.
95. Landin L, Cavadas PC, Nthumba P, Ibañez J, Vera-Sempere F. Preliminary results of bilateral arm transplantation. *Transplantation.* 2009;88:749–51.
96. Schneeberger S, Kreczy A, Brandacher G, Steurer W, Margreiter R. Steroid- and ATG-resistant rejection after double forearm transplantation responds to Campath-1H. *Am J Transplant.* 2004;4:1372–4.

## Bibliografia

97. Kanitakis J, Petruzzo P, Jullien D, Badet L, Dezza MC, Claudy A, et al. Pathological score for the evaluation of allograft rejection in human hand (composite tissue) allotransplantation. *Eur J Dermatol*. 2005;15:235–8.
98. Cendales LC, Kanitakis J, Schneeberger S, Burns C, Ruiz P, Landin L, et al. The Banff 2007 working classification of skin-containing composite tissue allograft pathology. *Am J Transplant*. 2008;8:1396–400.
99. Kanitakis J. The challenge of dermatopathological diagnosis of composite tissue allograft rejection: a review. *J Cutan Pathol*. 2008;35:738–44.
100. Eljaafari A, Badet L, Kanitakis J, Ferrand C, Farre A, Petruzzo P, et al. Isolation of regulatory T cells in the skin of a human hand-allograft, up to six years posttransplantation. *Transplantation*. 2006;82:1764–8.
101. Kanitakis J, McGregor B, Badet L, Petruzzo P, Morelon E, Devauchelle B, et al. Absence of c4d deposition in human composite tissue (hands and face) allograft biopsies: an immunoperoxidase study. *Transplantation*. 2007;84:265–7.
102. Landin L, Cavadas PC, Ibañez J, Roger I, Vera-Sempere F. CD3+-mediated rejection and C4d deposition in two composite tissue (bilateral hand) allograft recipients after induction with alemtuzumab. *Transplantation*. 2009;87:776–81.
103. Hautz T, Zelger B, Brandacher G, Mueller H, Grahammer J, Zelger B, et al. Histopathologic characterization of mild rejection (grade I) in skin biopsies of human hand allografts. *Transpl Int*. 2012;25:56–63.
104. Unadkat JV, Schneeberger S, Goldbach C, Solari MG, Washington KM, Afroz PN, et al. Investigation of Antibody-Mediated Rejection in Composite Tissue Allotransplantation in a Rat Limb Transplant Model. *Transplant Proc*. 2009;41:542–5.
105. Petruzzo P, Lanzetta M, Dubernard J-M, Landin L, Cavadas P, Margreiter R, et al. The International Registry on Hand and Composite Tissue Transplantation. *Transplantation*. 2010;90:1590–4.

106. Reinke P, Fietze E, Ode-Hakim S, Prosch S, Lippert J, Ewert R, et al. Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection. *Lancet*. 1994;344:1737–8.
107. Uemura T, Ikegami T, Sanchez EQ, Jennings LW, Narasimhan G, McKenna GJ, et al. Late acute rejection after liver transplantation impacts patient survival. *Clin Transplant*. 2008;22:316–23.
108. Dubernard J-M, Lengelé B, Morelon E, Testelin S, Badet L, Moure C, et al. Outcomes 18 months after the first human partial face transplantation. *N Engl J Med*. 2007;357:2451–60.
109. Yates PJ, Nicholson ML. The aetiology and pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *Transpl Immunol*. 2006;16:148–57.
110. Heemann U, Lutz J. Pathophysiology and treatment options of chronic renal allograft damage. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28:2438–46.
111. Thaunat O, Badet L, Dubois V, Kanitakis J, Petruzzo P, Morelon E. Immunopathology of rejection: do the rules of solid organ apply to vascularized composite allotransplantation? *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20:596–601.
112. Abrahimi P, Liu R, Pober JS. Blood Vessels in Allotransplantation. *Am J Transplant*. 2015;15:1748–54.
113. Thaunat O. Humoral immunity in chronic allograft rejection: puzzle pieces come together. *Transpl Immunol*. 2012;26:101–6.
114. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*. 2014;14:272–83.
115. Hand Registry. International Registry on Hand and Composite Tissue Transplantation. [www.handregistry.com](http://www.handregistry.com). Updated 2016. Accessed November 2, 2015.
116. Chandraker A, Arscott R, Murphy GF, Lian CG, Bueno EM, Marty FM, et al. The management of antibody-mediated rejection in the first presensitized recipient of a full-face allotransplant. *Am J Transplant*. 2014;14:1446–52.



## Bibliografia

117. Thauinat O, Field A-C, Dai J, Louedec L, Patey N, Bloch M-F, et al. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:14723–8.

118. Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, et al. Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:603–12.

119. Unadkat JV, Schneeberger S, Horibe EH, Goldbach C, Solari MG, Washington KM, et al. Composite tissue vasculopathy and degeneration following multiple episodes of acute rejection in reconstructive transplantation. *Am J Transplant*. 2010;10:251–61.

120. Munding GS, Munivenkatappa R, Drachenberg CB, Ha JS, Vaca EE, Shipley ST, et al. Histopathology of Chronic Rejection in a Nonhuman Primate Model of Vascularized Composite Allotransplantation. *Transplantation*. 2013;95:1204–10.

121. Munding GS, Nam AJ, Hui-Chou HG, Stanwix MG, Jones LS, Drachenberg CB, et al. Nonhuman Primate Model of Fibula Vascularized Composite Tissue Allotransplantation Demonstrates Donor-Recipient Bony Union. *Plast Reconstr Surg*. 2011;128:1193–204.

122. Bonastre J, Landin L, Bolado P, Casado-Sanchez C, López-Collazo E, Diez J. Effect of Cold Preservation on Chronic Rejection in a Rat Hindlimb Transplantation Model. *Plast Reconstr Surg*. 2016;138:628–37.

123. Hautz T, Zelger B, Grahammer J, Krapf C, Amberger A, Brandacher G, et al. Molecular markers and targeted therapy of skin rejection in composite tissue allotransplantation. *Am J Transplant*. 2010;10:1200–9.

124. Kaufman CL, Ouseph R, Blair B, Kutz JE, Tsai TM, Scheker LR, et al. Graft Vasculopathy in Clinical Hand Transplantation. *Am J Transplant*. 2012;12:1004–16.

125. Kanitakis J, Karayannopoulou G, Lanzetta M, Petruzzo P. Graft vasculopathy in the skin of a human hand allograft: implications for diagnosis of rejection of vascularized composite allografts. *Transpl Int*. 2014;27:e118–23.
126. Diefenbeck M, Nerlich A, Schneeberger S, Wagner F, Hofmann GO. Allograft vasculopathy after allogeneic vascularized knee transplantation. *Transpl Int*. 2011;24:e1–e5.
127. Petruzzo P, Kanitakis J, Testelin S, Pialat J-B, Buron F, Badet L, et al. Clinicopathological Findings of Chronic Rejection in a Face Grafted Patient. *Transplantation*. 2015;99:2644–50.
128. Huang W-C, Lin J-Y, Wallace CG, Chuang W-Y, Wei F-C, Liao S-K. Vascularized bone grafts within composite tissue allotransplants can autcreate tolerance through mixed chimerism with partial myeloablative conditioning: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125:1095–103.
129. Granger DK, Briedenbach WC, Pidwell DJ, Jones JW, Baxter-Lowe LA, Kaufman CL. Lack of donor hyporesponsiveness and donor chimerism after clinical transplantation of the hand. *Transplantation*. 2002;74:1624–30.
130. Kanitakis J, Jullien D, Petruzzo P, Hakim N, Claudy A, Revillard J-P, et al. Clinicopathologic features of graft rejection of the first human hand allograft. *Transplantation*. 2003;76:688–93.
131. Pei G, Xiang D, Gu L, Wang G, Zhu L, Yu L, et al. A report of 15 hand allotransplantations in 12 patients and their outcomes in China. *Transplantation*. 2012;94:1052–9.
132. Petruzzo P, Gazarian A, Kanitakis J, Parmentier H, Guigal V, Guillot M, et al. Outcomes after bilateral hand allotransplantation: a risk/benefit ratio analysis. *Ann Surg*. 2015;261:213–20.
133. Mundinger GS, Drachenberg CB. Chronic rejection in vascularized composite allografts. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014;19:309–14.

## Bibliografia

134. Kaniakakis J, Petruzzo P, Badet L, Gazarian A, Thaunat O, Testelin S, et al. Chronic Rejection in Human Vascularized Composite Allotransplantation (Hand and Face Recipients): An Update. *Transplantation*. 2016;100:2053–61.

135. Kaufman CL, Ouseph R, Kutz J, et al. Chronic rejection in reconstructive transplantation. In: Brandacher G editor. *The Science of Reconstructive Transplantation. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Humana Press; 2015:163–179.

136. Christensen J, Ibrahim Z, Wu L, et al. Mechanical trauma can reactivate an alloimmune response against the skin-component in a large animal vascularized composite allotransplantation (VCA) model of operational tolerance [abstract]. *Am J Transplant*. 2013;13(suppl 5).

137. Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol*. 1978;120:2027–32.

138. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136:2348–57.

139. Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today*. 1991;12:256–7.

140. Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW, Strom TB. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol*. 1994;6:757–64.

141. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996;17:138–46.

142. Carter LL, Dutton RW. Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 1996;8:336–42.

143. Cohen MC, Cohen S. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol*. 1996;10:589–98.

144. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem.* 1990;59:783–836.
145. Crosier PS, Clark SC. Basic biology of the hematopoietic growth factors. *Semin Oncol.* 1992;19:349–61.
146. Beckmann MP, Cosman D, Fanslow W, Maliszewski CR, Lyman SD. The interleukin-4 receptor: structure, function, and signal transduction. *Chem Immunol.* 1992;51:107–34.
147. Yokota T, Arai N, de Vries J, Spits H, Banchereau J, Zlotnik A, et al. Molecular biology of interleukin 4 and interleukin 5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells and hemopoietic cells. *Immunol Rev.* 1988;102:137–87.
148. Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science.* 1991;254:707–10.
149. Fertin C, Nicolas JF, Gillery P, Kalis B, Banchereau J, Maquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell Mol Biol.* 1991;37:823–9.
150. Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. Human recombinant interleukin-4 induces proliferation and interleukin-6 production by cultured human skin fibroblasts. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992;63:182–7.
151. Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A, Hjerrild KJ, Jerzy R, Clevenger W, et al. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:302–6.
152. Yang YC, Ricciardi S, Ciarletta A, Calvetti J, Kelleher K, Clark SC. Expression cloning of cDNA encoding a novel human hematopoietic growth factor: human homologue of murine T-cell growth factor P40. *Blood.* 1989;74:1880–4.
153. Kelleher K, Bean K, Clark SC, Leung WY, Yang-Feng TL, Chen JW, et al. Human interleukin-9: genomic sequence, chromosomal location, and sequences

## Bibliografia

essential for its expression in human T-cell leukemia virus (HTLV)-I-transformed human T cells. *Blood*. 1991;77:1436–41.

154. Houssiau FA, Renauld JC, Fibbe WE, Van Snick J. IL-2 dependence of IL-9 expression in human T lymphocytes. *J Immunol*. 1992;148:3147–51.

155. Chen WF, Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol*. 1991;147:528–34.

156. de Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE. Interleukin-10. *Curr Opin Immunol*. 1992;4:314–20.

157. Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today*. 1991;12:A49–53.

158. Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol*. 1992;143:127–42.

159. Kaniwa M, Gately M, Gubler U, Chizzonite R, Fargeas C, Delespesse G. Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest*. 1992;90:262–6.

160. Scott P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science*. 1993;260:496–7.

161. Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*. 1993;362:248–50.

162. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:3730–4.

163. Ford R, Tamayo A, Martin B, Niu K, Claypool K, Cabanillas F, et al. Identification of B-cell growth factors (interleukin-14; high molecular weight-B-cell growth factors) in effusion fluids from patients with aggressive B-cell lymphomas. *Blood*. 1995;86:283–93.

164. Giri JG, Anderson DM, Kumaki S, Park LS, Grabstein KH, Cosman D. IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *J Leukoc Biol.* 1995;57:763–6.
165. Doherty TM, Seder RA, Sher A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol.* 1996;156:735–41.
166. McInnes IB, al-Mughales J, Field M, Leung BP, Huang FP, Dixon R, et al. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 1996;2:175–82.
167. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science.* 1986;233:532–4.
168. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest.* 1992;90:1–7.
169. Wheelock EF. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science.* 1965;149:310–1.
170. Heremans H, Billiau A. The potential role of interferons and interferon antagonists in inflammatory disease. *Drugs.* 1989;38:957–72.
171. Jacob CO, van der Meide PH, McDevitt HO. In vivo treatment of (NZB X NZW)F1 lupus-like nephritis with monoclonal antibody to gamma interferon. *J Exp Med.* 1987;166:798–803.
172. Campbell IL, Oxbrow L, Koulmanda M, Harrison LC. IFN-gamma induces islet cell MHC antigens and enhances autoimmune, streptozotocin-induced diabetes in the mouse. *J Immunol.* 1988;140:1111–6.
173. Sarvetnick N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Stewart TA. Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma. *Cell.* 1988;52:773–82.
174. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* 1995;378:88–91.

## Bibliografia

175. Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol*. 1996;156:4274–9.

176. Adams DH, Hubscher S, Fear J, Johnston J, Shaw S, Afford S. Hepatic expression of macrophage inflammatory protein-1 alpha and macrophage inflammatory protein-1 beta after liver transplantation. *Transplantation*. 1996;61:817–25.

177. Pattison JM, Nelson PJ, Huie P, Sibley RK, Krensky AM. RANTES chemokine expression in transplant-associated accelerated atherosclerosis. *J Heart Lung Transplant*. 1996;15:1194–9.

178. Devergne O, Marfaing-Koka A, Schall TJ, Leger-Ravet MB, Sadick M, Peuchmaur M, et al. Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells. *J Exp Med*. 1994;179:1689–94.

179. Baan CC, Holweg CT, Niesters HG, van Gelder T, Mol WM, Zondervan PE, et al. The nature of acute rejection is associated with development of graft vascular disease after clinical heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1998;17:363–73.

180. van Besouw NM, Daane CR, Vaessen LM, Mochtar B, Balk AH, Weimar W. Donor-specific cytokine production by graft-infiltrating lymphocytes induces and maintains graft vascular disease in human cardiac allografts. *Transplantation*. 1997;63:1313–8.

181. Hayashi M, Martinez OM, Garcia-Kennedy R, So S, Esquivel CO, Krams SM. Expression of cytokines and immune mediators during chronic liver allograft rejection. *Transplantation*. 1995;60:1533–8.

182. Loong CC, Chen A, Lui WY, King KL, Lin CY. Expression of cytokines, growth factors, and adhesion molecules in rejecting human renal allograft. *Transplant Proc*. 1996;28:1445–6.

183. Merville P, Lambert C, Durand I, Pouteil-Noble C, Touraine JL, Berthoux F, et al. High frequency of IL-10-secreting CD4+ graft-infiltrating T lymphocytes in promptly rejected kidney allografts. *Transplantation*. 1995;59:1113–9.

184. Noronha IL, Eberlein-Gonska M, Hartley B, Stephens S, Cameron JS, Waldherr R. In situ expression of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-2 receptors in renal allograft biopsies. *Transplantation*. 1992;54:1017–24.
185. Zhao XM, Yeoh TK, Hiebert M, Frist WH, Miller GG. The expression of acidic fibroblast growth factor (heparin-binding growth factor-1) and cytokine genes in human cardiac allografts and T cells. *Transplantation*. 1993;56:1177–82.
186. Ationu A, Carter N. Ventricular expression of basic fibroblast growth factor gene after orthotopic cardiac transplantation. *Transplantation*. 1994;57:1364–6.
187. Aikawa A, McLaughlin PJ, McDicken IW, Davies HM, Southern SA, Johnson PM, et al. TNF staining of graft biopsies in renal transplantation. *Transplantation*. 1993;56:231–3.
188. Demirci G, Nashan B, Pichlmayr R. Fibrosis in chronic rejection of human liver allografts: expression patterns of transforming growth factor-TGFbeta1 and TGF-beta3. *Transplantation*. 1996;62:1776–83.
189. Shaddy RE, Hammond EH, Yowell RL. Immunohistochemical analysis of platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor in cardiac biopsy and autopsy specimens of heart transplant patients. *Am J Cardiol*. 1996;77:1210–5.
190. Sharma VK, Bologna RM, Xu GP, Li B, Mouradian J, Wang J, et al. Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int*. 1996;49:1297–303.
191. Zhao XM, Yeoh TK, Frist WH, Porterfield DL, Miller GG. Induction of acidic fibroblast growth factor and full-length platelet-derived growth factor expression in human cardiac allografts. Analysis by PCR, in situ hybridization, and immunohistochemistry. *Circulation*. 1994;90:677–85.
192. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:695–700.



## Bibliografia

193. Bishop GA, Rokahr KL, Napoli J, McCaughan GW. Intragraft cytokine mRNA levels in human liver allograft rejection analysed by reverse transcription and semiquantitative polymerase chain reaction amplification. *Transpl Immunol.* 1993;1:253–61.

194. Bugeon L, Cuturi MC, Hallet MM, Paineau J, Chabannes D, Souillou JP. Peripheral tolerance of an allograft in adult rats--characterization by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. *Transplantation.* 1992;54:219–25.

195. Chen N, Field EH. Enhanced type 2 and diminished type 1 cytokines in neonatal tolerance. *Transplantation.* 1995;59:933–41.

196. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, et al. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med.* 1995;181:1869–74.

197. Takeuchi T, Lowry RP, Konieczny B. Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation.* 1992;53:1281–94.

198. Piccotti JR, Chan SY, VanBuskirk AM, Eichwald EJ, Bishop DK. Are Th2 helper T lymphocytes beneficial, deleterious, or irrelevant in promoting allograft survival? *Transplantation.* 1997;63:619–24.

199. Strom TB, Roy-Chaudhury P, Manfro R, Zheng XX, Nickerson PW, Wood K, et al. The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. *Curr Opin Immunol.* 1996;8:688–93.

200. Baan CC, Metselaar HJ, Mol WM, Tilanus HW, IJermans JM, Zondervan PE, et al. Intragraft IL-4 mRNA expression is associated with down-regulation of liver graft rejection. *Clin Transplant.* 1996;10:542–9.

201. Baan CC, van Emmerik NE, Balk AH, Quint WG, Mochtar B, Jutte NH, et al. Cytokine mRNA expression in endomyocardial biopsies during acute rejection from human heart transplants. *Clin Exp Immunol.* 1994;97:293–8.

202. Cosenza CA, Shirwan H, Cramer DV, Sher L, Podesta L, Makowka L. Intragraft cytokine gene expression in human liver allografts. *Liver Transpl Surg.* 1995;1:16–22.
203. Gaweco AS, Otto G, Otto HF, Geisse T, Hofmann WJ. Distinct intragraft cytokine gene expression patterns during acute hepatic rejection under cyclosporine versus FK 506 primary immunosuppression. *Transplant Proc.* 1994;26:3111–3.
204. Gorczynski RM, Adams RB, Levy GA, Chung SW. Correlation of peripheral blood lymphocyte and intragraft cytokine mRNA expression with rejection in orthotopic liver transplantation. *Surgery.* 1996;120:496–502.
205. Krams SM, Falco DA, Villanueva JC, Rabkin J, Tomlanovich SJ, Vincenti F, et al. Cytokine and T cell receptor gene expression at the site of allograft rejection. *Transplantation.* 1992;53:151–6.
206. Martinez OM, Krams SM, Sterneck M, Villanueva JC, Falco DA, Ferrell LD, et al. Intragraft cytokine profile during human liver allograft rejection. *Transplantation.* 1992;53:449–56.
207. Baan CC, van Besouw NM, Daane CR, Balk AH, Mochtar B, Niesters HG, et al. Kinetics of IL-2 and IL-4 mRNA and protein production by graft-infiltrating lymphocytes responsible for rejection after clinical heart transplantation. *Transpl Immunol.* 1997;5:97–103.
208. Kusaka S, Grailer AP, Fechner JHJ, Burlingham WJ. Evidence for a possible Th2 bias in human renal transplant tolerance. *Transplant Proc.* 1995;27:225–6.
209. Grant SC, Guy SP, Lamb WR, Brooks NH, Brenchley PE, Hutchinson IV. Expression of cytokine messenger RNA after heart transplantation: relationship with rejection and serum cytokines. *Transplantation.* 1996;62:910–6.
210. Azzawi M, Hasleton PS, Grant SC, Stewart JP, Hutchinson IV. Interleukin-10 in human heart transplantation: an in situ hybridization study. The Manchester Transplant Cytokine Group. *J Heart Lung Transplant.* 1995;14:519–28.

## Bibliografia

211. Van HE. In situ expression of cytokines in human heart allografts. *Am J Pathol.* 1996;149:1991–2003.
212. Xu GP, Sharma VK, Li B, Bologna R, Li Y, Mouradian J, et al. Intragraft expression of IL-10 messenger RNA: a novel correlate of renal allograft rejection. *Kidney Int.* 1995;48:1504–7.
213. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit.* 1995;17:584–91.
214. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot.* 1987;40:1249–55.
215. Goto T, Kino T, Hatanaka H, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M, et al. Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from Streptomyces tsukubaensis. *Transplant Proc.* 1987;19:4–8.
216. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996;80:S40–5.
217. Cardenas ME, Zhu D, Heitman J. Molecular mechanisms of immunosuppression by cyclosporine, FK506, and rapamycin. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1995;4:472–7.
218. Su Q, Weber L, Le Hir M, Zenke G, Ryffel B. Nephrotoxicity of cyclosporin A and FK506: inhibition of calcineurin phosphatase. *Ren Physiol Biochem.* 1995;18:128–39.
219. Williams GM, Alvarez CA. Host repopulation of the endothelium in allografts of kidneys and aorta. *Surg Forum.* 1969;20:293–4.
220. Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarajah S, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol.* 2001;195:229–35.

221. Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*. 2001;104:233–45.
222. Jensen UB, Lowell S, Watt FM. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development*. 1999;126:2409–18.
223. Alison MR, Poulsom R, Forbes SJ. Update on hepatic stem cells. *Liver*. 2001;21:367–73.
224. Wright NA. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int J Exp Pathol*. 2000;81:117–43.
225. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell*. 2000;100:143–55.
226. Hall FL, Han B, Kundu RK, Yee A, Nimni ME, Gordon EM. Phenotypic differentiation of TGF-beta1-responsive pluripotent premesenchymal prehematopoietic progenitor (P4 stem) cells from murine bone marrow. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001;10:261–71.
227. Poulsom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol*. 2002;197:441–56.
228. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005;106:1901–10.
229. Beyer J, Schwella N, Zingsem J, Strohscheer I, Schwaner I, Oettle H, et al. Hematopoietic rescue after high-dose chemotherapy using autologous peripheral-blood progenitor cells or bone marrow: a randomized comparison. *J Clin Oncol*. 1995;13:1328–35.
230. Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*. 2004;103:1580–5.
231. Fruehauf S, Ehninger G, Hubel K, Topaly J, Goldschmidt H, Ho AD, et al. Mobilization of peripheral blood stem cells for autologous transplant in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma patients by plerixafor and G-CSF and detection of

## Bibliografia

tumor cell mobilization by PCR in multiple myeloma patients. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:269–75.

232. Duarte RF, Shaw BE, Marin P, Kottaridis P, Ortiz M, Morante C, et al. Plerixafor plus granulocyte CSF can mobilize hematopoietic stem cells from multiple myeloma and lymphoma patients failing previous mobilization attempts: EU compassionate use data. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46:52–8.

233. Russell N, Douglas K, Ho AD, Mohty M, Carlson K, Ossenkoppele GJ, et al. Plerixafor and granulocyte colony-stimulating factor for first-line steady-state autologous peripheral blood stem cell mobilization in lymphoma and multiple myeloma: results of the prospective PREDICT trial. *Haematologica.* 2013;98:172–8.

234. De Clercq E. The AMD3100 story: The path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem Pharmacol.* 2009;77:1655–64.

235. Hubel K, Fresen MM, Apperley JF, Basak GW, Douglas KW, Gabriel IH, et al. European data on stem cell mobilization with plerixafor in non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma patients. A subgroup analysis of the European Consortium of stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47:1046–50.

236. Hendrix CW, Flexner C, MacFarland RT, Giandomenico C, Fuchs EJ, Redpath E, et al. Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:1667–73.

237. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hübel K, Cooper S, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood.* 2003;102:2728–30.

238. Choi H-Y, Yong C-S, Yoo BK. Plerixafor for stem cell mobilization in patients with non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Ann Pharmacother.* 2010;44:117–26.

239. Dipersio JF, Micallef IN, Stiff PJ, Bolwell BJ, Maziarz RT, Jacobsen E, et al. Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor

plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27:4767–73.

240. Worel N, Roskopf K, Neumeister P, Kasparu H, Nachbaur D, Russ G, et al. Plerixafor and granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) in patients with lymphoma and multiple myeloma previously failing mobilization with G-CSF with or without chemotherapy for autologous hematopoietic stem cell mobilization: the Austrian experience on a named patient program. *Transfusion*. 2011;51:968–75.

241. Sancho J-M, Duarte R, Medina L, Querol S, Marin P, Sureda A. [Mobilization of peripheral blood stem cells with plerixafor in poor mobilizer patients]. *Med Clin (Barc)*. 2016;147:223.e1–223.e7.

242. Kumar SK, Mikhael J, Laplant B, Lacy MQ, Buadi FK, Dingli D, et al. Phase 2 trial of intravenously administered plerixafor for stem cell mobilization in patients with multiple myeloma following lenalidomide-based initial therapy. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49:201–5.

243. Salama AD, Remuzzi G, Harmon WE, Sayegh MH. Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. *J Clin Invest*. 2001;108:943–8.

244. Salama AD, Womer KL, Sayegh MH. Clinical transplantation tolerance: many rivers to cross. *J Immunol*. 2007;178:5419–23.

245. Fudaba Y, Spitzer TR, Shaffer J, Kawai T, Fehr T, Delmonico F, et al. Myeloma responses and tolerance following combined kidney and nonmyeloablative marrow transplantation: in vivo and in vitro analyses. *Am J Transplant*. 2nd ed. 2006;6:2121–33.

246. Sun Z, Williams GM. Host stem cells repopulate liver allografts: reverse chimerism. *Chimerism*. 2011;2:120–2.

247. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Ramos H, Zeevi A, Rudert WA, et al. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet*. 1992;340:876–7.

## Bibliografia

248. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Ricordi C, Ildstad S, Terasaki PI, et al. Chimerism after liver transplantation for type IV glycogen storage disease and type 1 Gaucher's disease. *N Engl J Med.* 1993;328:745–9.

249. Alexander SI, Smith N, Hu M, Verran D, Shun A, Dorney S, et al. Chimerism and Tolerance in a Recipient of a Deceased-Donor Liver Transplant. *N Engl J Med.* 2008;358:369–74.

250. Cosimi AB, Sachs DH. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Transplantation.* 2004;77:943–6.

251. Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, Benike C, Millan MT, Shizuru JA, et al. Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2008;358:362–8.

252. Medawar P. Transplantation of tissues and organs: Introduction. *Br Med Bull.* 1965;21:97–9.

253. Williams GM, Krajewski CA, Dagher FJ, Haar ter AM, Roth JA, Santos GW. Host repopulation of endothelium. *Transplant Proc.* 1971;3:869–72.

254. Hruban RH, Long PP, Perlman EJ, Hutchins GM, Baumgartner WA, Baughman KL, et al. Fluorescence in situ hybridization for the Y-chromosome can be used to detect cells of recipient origin in allografted hearts following cardiac transplantation. *Am J Pathol.* 1993;142:975–80.

255. Sedmak DD, Sharma HM, Czajak CM, Ferguson RM. Recipient endothelialization of renal allografts. An immunohistochemical study utilizing blood group antigens. *Transplantation.* 1988;46:907–10.

256. Lagaaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, van Kemenade FJ, van Es LA, Bruijn JA, van Krieken JH. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet.* 2001;357:33–7.

257. Tanaka Y, Haga H, Egawa H, Okuno T, Miyagawa-Hayashino A, Tsuruyama T, et al. Intragraft expression of recipient-type ABO blood group antigens:

Long-term follow-up and histological features after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2005;11:547–54.

258. Murata H, Ratajczak P, Meignin V, Groussard O, Fournier M, Socié G, et al. Endothelial Cell Chimerism Associated With Graft Rejection After Human Lung Transplantation. 2008;85:150–4.

259. Xu W, Baelde HJ, Lagaaij EL, De Heer E, Paul LC, Bruijn JA. Endothelial cell chimerism after renal transplantation in a rat model. *Transplantation.* 2002;74:1316–20.

260. Muramatsu K, Bishop AT. Cell repopulation in vascularized bone grafts. *J Orthop Res.* 2002;20:772–8.

261. Muramatsu K, Kuriyama R, Taguchi T. Repopulation of donor cells from the recipient following extremity graft: studies using the LACZ transgenic rat. *Microsurgery.* 2007;28:279–84.

262. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet.* 1992;339:1579–82.

263. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Trucco M, Thomson AW, Rao AS. The changing immunology of organ transplantation. *Hosp Pract (1995).* 1995;30:31–4–37–42.

264. Monaco AP. Chimerism in organ transplantation: conflicting experiments and clinical observations. *Transplantation.* 2003;75:13S–16S.

265. Colson YL, Zadach K, Nalesnik M, Ildstad ST. Mixed allogeneic chimerism in the rat. Donor-specific transplantation tolerance without chronic rejection for primarily vascularized cardiac allografts. *Transplantation.* 1995;60:971–80.

266. Foster RD, Pham S, Li S, Aitouche A. Long-term acceptance of composite tissue allografts through mixed chimerism and CD28 blockade. *Transplantation.* 2003;76:988–94.

267. Prabhune KA, Gorantla VS, Perez-Abadia G, Francois CG, Vossen M, Laurentin-Perez LA, et al. Composite tissue allotransplantation in chimeric hosts part II.



## Bibliografia

A clinically relevant protocol to induce tolerance in a rat model. *Transplantation*. 2003;76:1548–55.

268. Kashiwagi N, Porter KA, Penn I, Brettschneider L, Starzl TE. Studies of homograft sex and of gamma globulin phenotypes after orthotopic homotransplantation of the human liver. *Surg Forum*. 1969;20:374–6.

269. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*. 2000;31:235–40.

270. Muramatsu K, Suzuki H, You-Xin S, Hashimoto T, Matsunaga T, Taguchi T. Donor cell repopulation of whole-limb allografts in the rat: detection with green fluorescent protein. *Plast Reconstr Surg*. 2007;120:100–7.

271. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem*. 1994;55:273–86.

272. Buckwalter JA, Cooper RR. Bone structure and function. *Instr Course Lect*. 1987;36:27–48.

273. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect*. 1996;45:371–86.

274. Muramatsu K, Kurokawa Y, Kuriyama R, Taguchi T, Bishop AT. Gradual graft-cell repopulation with recipient cells following vascularized bone and limb allotransplantation. *Microsurgery*. 2005;25:599–605.

275. Clouston AD, Jonsson JR, Balderson GA, Fawcett J, Lynch SV, Kelso A, et al. Lymphocyte apoptosis and cell replacement in human liver allografts. *Transplantation*. 2002;73:1828–34.

276. Koestner SC, Kappeler A, Schaffner T, Carrel TP, Mohacsi PJ. ABO histo-blood group antigen expression on the graft endothelium long term after ABO-compatible, non-identical heart transplantation. *Xenotransplantation*. 2006;13:166–70.

277. O'Connell JB, Renlund DG, Bristow MR, Hammond EH. Detection of allograft endothelial cells of recipient origin following ABO-compatible, nonidentical cardiac transplantation. *Transplantation*. 1991;51:438–42.
278. Hristov M, Zerneck A, Liehn EA, Weber C. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemost*. 2007;98:274–7.
279. Peled ZM, Chin GS, Liu W, Galliano R, Longaker MT. Response to tissue injury. *Clin Plast Surg*. 2000;27:489–500.
280. Williams DT, Harding K. Healing responses of skin and muscle in critical illness. *Crit Care Med*. 2003;31:S547–57.
281. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279:1528–30.
282. Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol*. 2002;3:1135–41.
283. Kanitakis J, Petruzzo P, Dubernard J-M. Turnover of epidermal Langerhans' cells. *N Engl J Med*. 2004;351:2661–2.
284. Muramatsu K, Kuriyama R, Taguchi T. Intra-graft chimerism following composite tissue allograft. *J Surg Res*. 2009;157:129–35.
285. Mathes DW, Randolph MA, Bourget JL, Nielsen GP, Ferrera VR, Arn JS, et al. Recipient bone marrow engraftment in donor tissue after long-term tolerance to a composite tissue allograft. *Transplantation*. 2002;73:1880–5.
286. Sun Z, Zhang X, Locke JE, Zheng Q, Tachibana S, Diehl AM, et al. Recruitment of host progenitor cells in rat liver transplants. *Hepatology*. 2008;49:587–97.
287. Okabayashi T, Cameron AM, Hisada M, Montgomery RA, Williams GM, Sun Z. Mobilization of Host Stem Cells Enables Long-Term Liver Transplant

## Bibliografia

Acceptance in a Strongly Rejecting Rat Strain Combination. *Am J Transplant*. Blackwell Publishing Inc; 2011;11:2046–56.

288. Siegel G, Schafer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2009;87:S45–9.

289. Noel D, Djouad F, Bouffi C, Mrugala D, Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:1283–9.

290. Sotiropoulou PA, Papamichail M. Immune properties of mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2007;407:225–43.

291. Patel SA, Sherman L, Munoz J, Rameshwar P. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008;56:1–8.

292. Popp FC, Eggenhofer E, Renner P, Geissler EK, Piso P, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells can affect solid organ allograft survival. *Transplantation*. 2009;87:S57–62.

293. Cameron AM, Wesson RN, Ahmadi AR, Singer AL, Hu X, Okabayashi T, et al. Chimeric Allografts Induced by Short-Term Treatment With Stem Cell Mobilizing Agents Result in Long-Term Kidney Transplant Survival Without Immunosuppression: II, Study in Miniature Swine. *Am J Transplant*. 2016;16:2066–76.

294. Hu X, Okabayashi T, Cameron AM, Wang Y, Hisada M, Li J, et al. Chimeric Allografts Induced by Short-Term Treatment With Stem Cell-Mobilizing Agents Result in Long-Term Kidney Transplant Survival Without Immunosuppression: A Study in Rats. *Am J Transplant*. 2016;16:2055–65.

295. Ikarashi K, Li B, Suwa M, Kawamura K, Morioka T, Yao J, et al. Bone marrow cells contribute to regeneration of damaged glomerular endothelial cells. *Kidney Int*. 2005;67:1925–33.

296. Lin F, Moran A, Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest*. 2005;115:1756–64.

297. Duffield JS, Park KM, Hsiao L-L, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest*. 2005;115:1743–55.
298. Bolado P, Landin L. Effect of reverse chimerism on rejection in clinical transplantation. *Ann Plast Surg*. 2013;71:615–20.
299. Ramsamooj R, Llull R, Black KS, Hewitt CW. Composite tissue allografts in rats: IV. Graft-versus-host disease in recipients of vascularized bone marrow transplants. *Plast Reconstr Surg*. 1999;104:1365–71.
300. Syrjälä SO, Keränen MAI, Tuuminen R, Nykänen AI, Tammi M, Krebs R, et al. Increased Th17 rather than Th1 alloimmune response is associated with cardiac allograft vasculopathy after hypothermic preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:1047–57.
301. Miller J, Mathew J, Garcia-Morales R, Zucker KE, Carreno M, Jin Y, et al. The human bone marrow as an immunoregulatory organ. *Transplantation*. 1999;68:1079–90.
302. Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy*. 2006;8:559–61.
303. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001;414:98–104.
304. Lake J, Rathjen J, Remiszewski J, Rathjen PD. Reversible programming of pluripotent cell differentiation. *J Cell Sci*. 2000;113:555–66.
305. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*. 2000;288:1660–3.
306. Olthoff KM. Hepatic regeneration in living donor liver transplantation. *Liver Transpl*. 2003;9:S35–41.
307. Muramatsu K, Kurokawa Y, You-Xin S, Bishop AT, Doi K. Cell traffic between donor and recipient following rat limb allograft. *J Orthop Res*. 2005;23:181–7.

## Bibliografía

308. Olthoff KM. Molecular pathways of regeneration and repair after liver transplantation. *World J Surg.* 2002;26:831–7.

309. Zhu Y, Wei W, Li Y. FK506 treatment in a Long-term chronic rejection rat model of small bowel transplantation. *Clin Invest Med.* 2010;33:E168–73.

310. Bolado-Gutiérrez, Pedro, Landín-Jarillo, Luis, Casado-Pérez, César. Estudio sobre quimerismo reverso y el efecto de la movilización de células madre de médula ósea sobre la expresión de citoquinas en un modelo experimental de trasplante de tejidos compuestos. *Cir Plást Iberolatinoam.* 2018;44,131-139.

311. Monaco AP, Wood ML. Studies on heterologous antilymphocyte serum in mice. VII. Optimal cellular antigen for induction of immunologic tolerance with antilymphocyte serum. *Transplant Proc.* 1970;2:489–96.

312. Caridis DT, Liegeois A, Barrett I, Monaco AP. Enhanced survival of canine renal allografts of ALS- treated dogs given bone marrow. *Transplant Proc.* 1973;5:671–4.

313. Hartner WC, De Fazio SR, Maki T, Markees TG, Monaco AP, Gozzo JJ. Prolongation of renal allograft survival in antilymphocyte-serum-treated dogs by postoperative injection of density-gradient-fractionated donor bone marrow. *Transplantation.* 1986;42:593–7.

314. Opelz G, Terasaki PI. Improvement of kidney-graft survival with increased numbers of blood transfusions. *N Engl J Med.* 1978;299:799–803.

315. Salvatierra O, Vincenti F, Amend W, Potter D, Iwaki Y, Opelz G, et al. Deliberate donor-specific blood transfusions prior to living related renal transplantation. A new approach. *Ann Surg.* 1980;192:543–52.

316. Barber WH, Mankin JA, Laskow DA, Deierhoi MH, Julian BA, Curtis JJ, et al. Long-term results of a controlled prospective study with transfusion of donor-specific bone marrow in 57 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation.* 1991;51:70–5.

317. Fontes P, Rao AS, Demetris AJ, Zeevi A, Trucco M, Carroll P, et al. Bone marrow augmentation of donor-cell chimerism in kidney, liver, heart, and pancreas islet transplantation. *Lancet*. 1994;344:151–5.

318. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Murase N, Ricordi C, Ildstad S, et al. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology*. 1993;17:1127–52.

319. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Zeevi A, Ramos H, Terasaki P, et al. Chimerism and donor-specific nonreactivity 27 to 29 years after kidney allotransplantation. *Transplantation*. 1993;55:1272–7.

320. Rao AS, Shapiro R, Corry R, Dodson F, Abu-Elmagd K, Jordan M, et al. Adjuvant bone marrow infusion in clinical organ transplant recipients. *Transplant Proc*. 1998;30:1367–8.

321. Bingaman AW, Waitze SY, Alexander DZ, Cho HR, Lin A, Tucker-Burden C, et al. Transplantation of the bone marrow microenvironment leads to hematopoietic chimerism without cytoreductive conditioning. *Transplantation*. 2000;69:2491–6.

322. Durlík M, Lukomska B, Ziolkowska H, Namyslowski A, Janczewska S, Cybulska E, et al. Microchimerism following allogeneic vascularized bone marrow transplantation—its possible role in induction of posttransplantation tolerance. *Ann Transplant*. 1998;3:24–6.

323. Talmor M, Steinman RM, Codner MA, Chen M, Harper AD, Witmer-Pack MD, et al. Bone marrow-derived chimerism in non-irradiated, cyclosporin-treated rats receiving microvascularized limb transplants: evidence for donor-derived dendritic cells in recipient lymphoid tissues. *Immunology*. 1995;86:448–55.

324. Halloran PF, Broski AP, Batiuk TD, Madrenas J. The molecular immunology of acute rejection: an overview. *Transpl Immunol*. 1993;1:3–27.

325. Dallman MJ, Larsen CP, Morris PJ. Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts: analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med*. 1991;174:493–6.

## Bibliografia

326. Goes N, Urmson J, Ramassar V, Halloran PF. Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. Evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-10. *Transplantation*. 1995;59:565–72.
327. Libby P, Salomon RN, Payne DD, Schoen FJ, Pober JS. Functions of vascular wall cells related to development of transplantation-associated coronary arteriosclerosis. *Transplant Proc*. 1989;21:3677–84.
328. Azuma H, Tilney NL. Chronic graft rejection. *Curr Opin Immunol*. 1994;6:770–6.
329. Day JD, Rayburn BK, Gaudin PB, Baldwin WM3, Lowenstein CJ, Kasper EK, et al. Cardiac allograft vasculopathy: the central pathogenetic role of ischemia-induced endothelial cell injury. *J Heart Lung Transplant*. 1995;14:S142–9.
330. Raisanen-Sokolowski A, Hayry P. Chronic allograft arteriosclerosis: contributing factors and molecular mechanisms in the light of experimental studies. *Transpl Immunol*. 1996;4:91–8.
331. Russell ME, Wallace AF, Hancock WW, Sayegh MH, Adams DH, Sibinga NE, et al. Upregulation of cytokines associated with macrophage activation in the Lewis-to-F344 rat transplantation model of chronic cardiac rejection. *Transplantation*. 1995;59:572–8.
332. Libby P. Atheroma: more than mush. *Lancet*. 1996;348:s4–7.
333. Wu CJ, Lovett M, Wong-Lee J, Moeller F, Kitamura M, Goralski TJ, et al. Cytokine gene expression in rejecting cardiac allografts. *Transplantation*. 1992;54:326–32.
334. Thai NL, Fu F, Qian S, Sun H, Gao L, Wang SC, et al. Cytokine mRNA profiles in mouse orthotopic liver transplantation. Graft rejection is associated with augmented TH1 function. *Transplantation*. 1995;59:274–81.

335. Morgan CJ, Pelletier RP, Hernandez CJ, Teske DL, Huang E, Ohye R, et al. Alloantigen-dependent endothelial phenotype and lymphokine mRNA expression in rejecting murine cardiac allografts. *Transplantation*. 1993;55:919–24.
336. Steiger J, Nickerson PW, Steurer W, Moscovitch-Lopatin M, Strom TB. IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J Immunol*. 1995;155:489–98.
337. Roy-Chaudhury P, Manfro RC, Steiger J, Nickerson PW, Tian Y, Zheng XX, et al. IL-2 and IL-4 double knock-out mice reject islet allografts: a role for novel T-cell growth factors? *Transplant Proc*. 1997;29:1083–4.
338. Hayry P, Isoniemi H, Yilmaz S, Mennander A, Lemstrom K, Raisanen-Sokolowski A, et al. Chronic allograft rejection. *Immunol Rev*. 1993;134:33–81.
339. Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest*. 1995;95:2954–62.
340. van Besouw NM, Daane CR, Vaessen LM, Balk AH, Claas FH, Zondervan PE, et al. Different patterns in donor-specific production of T-helper 1 and 2 cytokines by cells infiltrating the rejecting cardiac allograft. *J Heart Lung Transplant*. 1995;14:816–23.
341. Zhao X, Boenisch O, Yeung M, Mfarrej B, Yang S, Turka LA, et al. Critical role of proinflammatory cytokine IL-6 in allograft rejection and tolerance. *Am J Transplant*. 2012;12:90–101.
342. Liang Y, Christopher K, Finn PW, Colson YL, Perkins DL. Graft produced interleukin-6 functions as a danger signal and promotes rejection after transplantation. *Transplantation*. 2007;84:771–7.
343. de Mattos AM, Meyer MM, Norman DJ, Bennett WM, Sprague J, Bakke AC. Interleukin-12 p40 m-RNA expression in human kidney allograft biopsies. *Transpl Immunol*. 1997;5:199–203.



## Bibliografia

344. Vrtovec B, Haddad F, Pham M, Deuse T, Fearon WF, Schrepfer S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor therapy is associated with a reduced incidence of acute rejection episodes or allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *Transplant Proc.* 2013;45:2406–9.
345. Foster PF, Kociss K, Shen J, Sankary HN, Mital D, Chong AS, et al. Granulocyte colony-stimulating factor immunomodulation in the rat cardiac transplantation model. *Transplantation.* 1996;61:1122–5.
346. Salomon RN, Hughes CC, Schoen FJ, Payne DD, Pober JS, Libby P. Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis. Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells. *Am J Pathol.* 1991;138:791–8.
347. Idilman R, Erden E, Kuzu I, Ersoz S, Karasu Z, Karayalcin K, et al. Recipient-derived hepatocytes in sex-mismatched liver allografts after liver transplantation: early versus late transplant biopsies. *Transplantation.* 2004;78:1647–52.
348. Tanabe T, Ishida H, Horita S, Honda K, Yamaguchi Y, Nonomura K, et al. Endothelial Chimerism After ABO-Incompatible Kidney Transplantation. *Transplantation.* 2012;93:709–16.
349. Aro HT, Aho AJ. Clinical use of bone allografts. *Ann Med.* 1993;25:403–12.
350. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res.* 1987;225:7–16.
351. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect.* 1996;45:387–99.
352. Campion DR. The muscle satellite cell: a review. *Int Rev Cytol.* 1984;87:225–51.

353. Cossu G. Unorthodox myogenesis: possible developmental significance and implications for tissue histogenesis and regeneration. *Histol Histopathol.* 1997;12:755–60.

354. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med.* 2004;8:498–508.

355. Bishop AT, Pelzer M. Vascularized bone allotransplantation: current state and implications for future reconstructive surgery. *Orthop Clin North Am.* 2007;38:109–22–vii.

356. Hoebee B, de Stoppelaar JM, Suijkerbuijk RF, Monard S. Isolation of rat chromosome-specific paint probes by bivariate flow sorting followed by degenerate oligonucleotide primed-PCR. *Cytogenet Cell Genet.* 1994;66:277–82.

357. Essers J, de Stoppelaar JM, Hoebee B. A new rat repetitive DNA family shows preferential localization on chromosome 3, 12 and Y after fluorescence in situ hybridization and contains a subfamily which is Y chromosome specific. *Cytogenet Cell Genet.* 1995;69:246–52.

358. Brown RSD, Edwards J, Bartlett JW, Jones C, Dogan A. Routine acid decalcification of bone marrow samples can preserve DNA for FISH and CGH studies in metastatic prostate cancer. *J Histochem Cytochem.* 2002;50:113–5.

359. Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A, et al. Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286:779–85.

360. Takeuchi K, Sereemasapun A, Inagaki T, Hakamata Y, Kaneko T, Murakami T, et al. Morphologic characterization of green fluorescent protein in embryonic, neonatal, and adult transgenic rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003;274:883–6.

361. Takahashi M, Hakamata Y, Murakami T, Takeda S-I, Kaneko T, Takeuchi K, et al. Establishment of lacZ-transgenic rats: a tool for regenerative research in myocardium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305:904–8.

## Bibliografia

362. Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, Kimura A, Hakamata Y, Sato Y, et al. Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329:288–95.

363. Hirasawa A, Tsujimoto G, Okuyama S, Li XK, Iwaya M, Masaki Y, et al. Polymerase chain reaction of the rat sex-determining region of the Y-chromosome and its application to estimating a state of sensitization to minor histocompatibility antigen H-Y. *Transplant Proc.* 1995;27:1598–600.

364. Tashiro H, Fukuda Y, Kimura A, Hoshino S, Ito H, Dohi K. Assessment of microchimerism in rat liver transplantation by polymerase chain reaction. *Hepatology.* 1996;23:828–34.

365. Tashiro H, Fukuda Y, Hoshino S, Furukawa M, Shintaku S, Dohi K. Monitoring for engraftment following rat orthotopic liver transplantation by in vitro amplification of Y-chromosome gene using polymerase chain reaction. *Cell Transplant.* 1995;4:S61–3.

366. Zhao J, Araki N, Nishimoto SK. Quantitation of matrix Gla protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control. *Gene.* 1995;155:159–65.

367. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:2725–9.





## **10.1 PREMIOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS**

- Primer Premio de Investigación en el Concurso Internacional de Residentes del XXII Congreso de la Federación Ibero-latinoamericana de Cirugía Plástica, celebrado en Lima (Perú) en mayo de 2018, con el trabajo: “Estudio sobre quimerismo reverso y el efecto de la movilización de células madre de médula ósea sobre la expresión de citoquinas en un modelo experimental de trasplante de tejidos compuestos”.

- Premio Nacional de Residentes en el LI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética, celebrado en Estoril (Portugal) en junio de 2016, con el trabajo: “Estudio sobre quimerismo reverso y el efecto de la movilización de células madre de médula ósea sobre la expresión de citoquinas en un modelo experimental de trasplante de tejidos compuestos”.



**XXII Congreso Ibero Latinoamericano de Cirugía Plástica y Reconstructiva**  
Lima-Perú, 23 al 26 de mayo de 2018

## **CONCURSO DE RESIDENTES**

### **PRIMER LUGAR**

**Área de Estudio: Investigación**

**Estudio sobre quimerismo reverso y el efecto  
de la movilización de células madre de médula ósea sobre  
la expresión de citoquinas en un modelo experimental  
de trasplante de tejidos compuestos**

**Autor:**

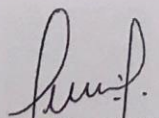
Pedro Bolado

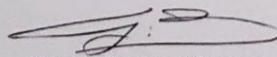
Especialista en Cirugía Plástica, Estética y Reparadora  
*Hospital Universitario La Paz*  
*Madrid, España*

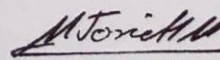
durante el XXII Congreso Ibero Latinoamericano de  
Cirugía Plástica y Reconstructiva

**FILACP 2018**

Lima-Perú, 23 al 26 de mayo de 2018

  
**Dr. Gustavo Núñez**  
Presidente  
Comité Organizador

  
**Dr. Guillermo Vázquez**  
Presidente  
FILACP

  
**Dra. Militza Jovick**  
Presidente  
Comité Científico



**PREMIO DE RESIDENTES PATROCINADO POR MENTOR**



Reunido el Jurado del **PREMIO DE RESIDENTES PATROCINADO POR MENTOR** del 51º Congreso de la SECPRE celebrado en Estoril a las 17.00h compuesto por:

- Dr. Miguel Chamosa Martín: Ex Presidente y Presidente Fundación Docente SECPRE
- Dr. Cristino Suárez López de Vergara: Presidente SECPRE
- Dr. Carlos Tejerina Botella: Vocal Comisión Nacional
- Dr. Miguel Gómez Bravo: Vocal Residentes SECPRE
- Dr. Manuel Sánchez Nebreda: Ex – Presidente SECPRE

Tras la evaluación de los trabajos presentados según la normativa vigente del concurso Premio de Residentes patrocinado por Mentor:

Se resuelve dar **el PREMIO DE RESIDENTES:**

**Dr. PEDRO BOLADO GUTIÉRREZ** por su trabajo: *“Estudio sobre quimerismo reverso y el efecto de la movilización de células madre de médula ósea sobre la expresión de citoquinas en un modelo experimental de trasplante de tejidos compuestos”.*

Estoril, 3 de Junio de 2016

Dr. Miguel Chamosa Martín  
Presidente Fundación Docente SECPRE

Dr. Cristino Suarez López de Vergara  
Presidente SECPRE

Diego de León, 47 - 28006 Madrid - Tlf. 915 765 995 / Fax. 914 315 153  
e-mail: [info@secpre.org](mailto:info@secpre.org)

web: [www.secpre.org](http://www.secpre.org)



## **10.2 BECAS CONCEDIDAS A LA PRESENTE TESIS**

Investigador en el Proyecto de Investigación en Salud: “Protocolo de inmunosupresión reducida tras condicionamiento con precursores hematopoiéticos en trasplantes de tejidos compuestos: Investigación básica y clínica”. Número de Expediente: PI12/00867. Tipo de intervención: Colaborador. Duración: 3 años. Investigador Principal: Dr. Luis Landín Jarillo. Presupuesto concedido: 32.065,00 €.



**Belén Bornstein Sánchez**  
**Subdirectora General de Evaluación y Fomento de la Investigación**

**CERTIFICA**

Que según los antecedentes que obran en poder de esta Subdirección General, **D. PEDRO BOLADO GUTIERREZ**, ha participado como investigador en los Proyectos de Investigación en Salud, que se relacionan:

Título del Proyecto: **“PROTOCOLO DE INMUNOSUPRESION REDUCIDA TRAS CONDICIONAMIENTO CON PRECURSORES HEMATOPOIETICOS EN TRASPLANTES DE TEJIDOS COMPUESTOS: INVESTIGACION BASICA Y CLINICA.”**

- Número de Expediente: PI12/00867
- Tipo de intervención: Colaborador
- Duración: 3 años.
- Investigador Principal: LANDIN JARILLO, LUIS.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Madrid, a 17 de abril de 2017.

  
Belén Bornstein Sánchez  
Subdirectora General

Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación

Avenida Monforte de Lemos 5,  
pabellón 6-acortes@isciii.es  
28029 Madrid

### **10.3 ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS**

- Bolado-Gutiérrez P, Landín-Jarillo L, Casado-Pérez C. Estudio sobre quimerismo reverso y el efecto de la movilización de células madre de médula ósea sobre la expresión de citoquinas en un modelo experimental de trasplante de tejidos compuestos. *Cir plás iberolatinoam*. Vol. 44-Nº2-2018/Pag. 131-139.

- Bolado P, Landin L. Effect of reverse chimerism on rejection in clinical transplantation. *Ann Plast Surg*. 2013 Nov;71(5):615-20. DOI: 10.1097/01.sap.0000437314.05306.36.

## Effect of Reverse Chimerism on Rejection in Clinical Transplantation

Pedro Bolado, MD, and Luis Landin, MD, PhD

**Abstract:** Chimerism may enable allografts to survive when immunosuppressive therapy is administered at low levels or is even absent. Reverse chimerism (RC) is focused on intragraft chimerism that repopulates the allograft with cells of recipient origin. We aimed to identify and analyze current clinical evidence on RC and the presence of endothelial RC and tissue-specific RC. A total of 33 clinical reports on cardiac, kidney, liver, and lung transplants published between 1972 and 2012 that focused on RC were included in a systematic review. Liver allografts presented with the highest percentage of endothelial RC and lung allografts by far the lowest. Tissue-specific RC was present in most of the recipients, but at very low levels. There were also cardiac and kidney allografts with chimerism, but the functionality of the cells of recipient origin was questionable. We were unable to determine whether RC was a trigger for or a result of acute rejection. Further clinical research should focus on outcomes to evaluate the clinical relevance of this form of chimerism in transplantation.

**Key Words:** vascularized composite allograft, transplantation, chimerism, reverse chimerism, immunosuppression

(*Ann Plast Surg* 2013;71: 615–620)

Immunosuppressive drugs facilitate the transplantation by allograft of solid organs (SOT) and nonvital vascularized composite tissue allografts (VCA) at the expense of a number of adverse effects. To avoid or minimize the use of immunosuppressive drugs, a small number of protocols have been formulated that aim to establish clinical tolerance to allografts by modifying the recipient by transfusing blood cells from the donor.<sup>1–10</sup> However, experimental evidence suggests that chimerism could also be achieved by repopulating allografts with host cells; a phenomenon known as intragraft or reverse chimerism (RC).<sup>11–21</sup> Reverse chimerism was initially reported in the late 1960s in a model of aortic allograft,<sup>22,23</sup> and recently has been observed in different clinical settings, including cardiac, kidney, liver, and lung allograft transplantation, by detection of the Y-chromosome in allografts of sex-mismatched male recipients.<sup>24–34</sup>

Medawar<sup>35,36</sup> hypothesized that graft acceptance could be a result of endothelial replacement of the allograft endothelium by host cells, known as endothelial RC (ERC). Endothelial RC eliminated donor-directed antibody rejection in experimental skin allografts.<sup>37,38</sup> However, allograft function depends on specialized cells, which may also be subject to replacement by, for example, tissue-specific RC (TSRC). Tissue-specific RC is demonstrated by the presence of cardiomyocytes in cardiac allografts, podocytes, mesangial, and tubular cells in kidney allografts, hepatocytes, and cholangiocytes

in liver allografts, and respiratory epithelial cells in lung allografts.<sup>30,39–41</sup> Whether these cells of host origin that repopulate the allograft are functional remains unknown.

We investigated the hypothesis that RC may allow the repopulation of the allograft with recipient cells to create an organ of mixed genetic composition, thereby reducing or even eliminating the need for long-term immunosuppressive therapy. Our aim was to identify and analyze current clinical evidence on RC, focusing on allograft rejection and the presence of ERC and TSRC.

### MATERIALS AND METHODS

We performed a systematic review on papers taken from the MEDLINE database. We searched the database on May 20, 2013, using the keywords “chimerism” and “Y-chromosome.” The search yielded 283 eligible papers. Of these papers, only those published in the English language, reporting clinical data on cardiac, kidney, liver, and lung transplantation were selected. Duplicate articles and articles with incomplete data were excluded. Additional articles were identified by cross-checking the references of the selected articles. In all, 33 papers met the inclusion criteria. Figure 1 presents a flow diagram of the algorithm for data collection. The variables that were recorded are shown in Tables 1–3. Data are expressed as means, incidences, or proportions.

Data for evidence of RC and rejection in cardiac, kidney, and liver recipients, as well as the total number of solid organ recipients were analyzed using the  $\chi^2$  test (2-tailed), whereas data in lung recipients were analyzed using Fisher exact test (2-tailed). All analyses were performed using IBM SPSS Statistics, version 20.0 (Chicago, Ill).  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant.

### RESULTS

A total of 33 articles were included in the analysis.<sup>24–27,30–34,39–62</sup> Table 1 shows the demographic data, follow-up, and survival of the recipients. Table 2 shows the data on rejection, taken from biopsy samples. Table 3 shows the data on RC in the biopsy samples. To assess the association between RC and rejection, the incidence of RC and rejection were analyzed; the data are shown in Figure 4.

The 33 papers covered a total of 409 patients. However, not all the variables were available for every recipient. Immunosuppression was maintained in 98.14% of the recipients after a mean follow-up of 35 months. Patient survival was near to 70% and allograft survival was 60% (Table 1). In total, 550 tissue samples from 337 patients were available for inclusion in the study. Almost 40% of the recipients suffered rejection, accounting for a mean 2.5 episodes of rejection per recipient (Table 2). Endothelial RC was observed in 57.07% of the recipients, whereas TSRC was seen in 73.12% (Table 3).

Endothelial RC was present in 50% of cardiac allografts, 58.95% of kidney allografts, 79.17% of liver allografts, and 33.34% of lung allografts (Fig. 2). The percentage of endothelial cells of recipient origin that were identified in the allograft was 14.04% for cardiac allografts, 9.96% for kidney allografts, 46.33% for liver allografts, and 0.56% for lung allografts (Fig. 3). Reverse chimerism and allograft rejection occurred in 19.23% of cardiac recipients,

Received July 17, 2013, and accepted for publication, after revision, August 29, 2013. From the Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Hospital Universitario “La Paz,” Madrid, Spain.

Conflicts of interest and sources of funding: none declared.

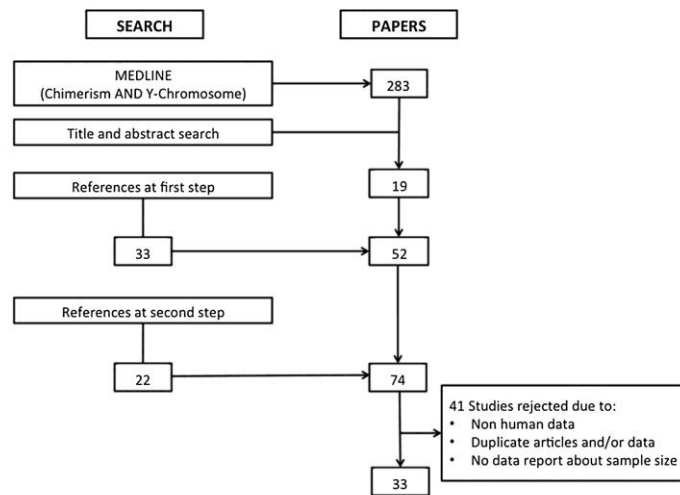
Both authors made their own contribution to the writing of the final manuscript; they also contributed to data recovery and analysis, writing, and reviewing the paper.

Reprints: Luis Landin, MD, PhD, Plastic and Reconstructive Surgery Division, University Hospital “La Paz,” Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. E-mail: landinsurgery@gmail.com.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0148-7043/13/7105-0615

DOI: 10.1097/01.sap.0000437314.05306.36



**FIGURE 1.** Flow diagram of the search strategy for our systematic review. “MEDLINE (Chimerism AND Y-Chromosome)” refers to the initial search in MEDLINE. “Title and abstract search” refers to screening by title and abstract. “References at first step” refers to those extracted from previously identified articles. “References at second step” refers to those obtained from the articles added at the first step.

35.43% of kidney recipients, 21.28% of liver recipients, and 57.14% of lung recipients (Fig. 4).

**DISCUSSION**

The attempt to produce tolerance to allografted tissue by clinical intervention is motivated by the belief that less reliance on immunosuppressive drugs may lead to fewer adverse effects.<sup>63</sup> Chimerism of the recipient is induced by donor cell transfusion after SOT or VCA, but its effects remain unclear, ranging from graft acceptance to no effect on rejection.<sup>63-68</sup> By contrast, RC shapes a chimeric allograft by active repopulation with host-derived cells.<sup>12</sup> However, it is yet to be determined whether RC reduces the risk of rejection and the need for

chronic immunosuppression. We found that rejection and RC coexisted in 31.86% of patients, but did not identify any significant association between the 2 variables. Therefore, we could not determine whether, and if so to what extent, intragraft chimerism prevented rejection. However, lower rates of survival were seen in kidneys that showed RC than in those that did not.<sup>40</sup> Whether RC is merely physiological repair of tissue, an adaptive mechanism of the recipient to substitute alloantigens, or the onset of a destructive process that terminates allograft function remains unknown.

The invasion of extracardiac progenitor cells has been proposed as a source of RC in the physiological mechanism of postischemic regeneration of the heart.<sup>48</sup> This is partially explained by circulating

**TABLE 1.** Demographics, Follow-up, and Survival

Allograft	Sample Size	Matching	Maintenance IS	Birth, Abortion, Transfusion	Follow-up	Patient Survival	Allograft Survival
Cardiac	78	Sex, 68 Blood group, 10	100% (29)	—	0–121 mo (76) 37.85 mo (75)	44.44% (72)	40% (74)
Kidney	216	Sex, 92 Blood group, 62 HLA, 26 Random, 36	100% (113)	—	30.04 mo (144) 0–233 mo (177)	92.49% (169)	85.11 (169)
Liver	80	Sex, 60 HLA, 11 Random, 9	40% (5)	0% (16)	25.49 mo (74) 0–144 mo (74)	100% (49)	100% (49)
Lung	35	Sex, 28 Random, 7	100% (14)	—	24.58 mo (35) 0–84 mo (35)	41.67% (18)	20.84% (33)
Total	409	Sex, 248 Blood group, 72 HLA, 37 Random, 52	98.14% (161)	0% (16)	32.55 mo (328) 0–233 mo (362)	69.92% (308)	59.76% (325)

Data given in brackets show the number of patients whose data were available.

TABLE 2. Biopsies and Rejection

Allograft	Time Lapse, mo	Number	Biopsies Without AR	Patients With Rejection	Mean Episodes of AR	CR
Cardiac	37.85	172 (62)	39.97% (35)	31.92% (52)	4.69 (8)	Yes (20)
Kidney	21.75	214 (190)	44.38% (116)	32.27% (132)	—	Yes (166)
Liver	18.3	59 (59)	74.79% (44)	71.83% (49)	0.33 (18)	Yes (22) No (4)
Lung	20.7	33 (26)	38.46% (13)	20.83% (28)	—	Yes (27)
Total	26.64	550 (337)	50.63% (208)	39.34% (261)	2.51 (26)	Yes (235) No (4)

Data given in brackets show the number of patients whose data were available. AR, acute rejection; CR, chronic rejection.

mesenchymal precursor cells that have the potential to migrate to areas of inflammation.<sup>51</sup> Similar to cardiac allografts, bone-marrow-derived cells can be observed in human transplanted kidneys that are rejected, which may indicate that these cells contribute to the turnover of renal epithelium.<sup>52</sup> Sinclair<sup>50</sup> was the first to propose the occurrence of ERC of recipient origin in renal allografts, and he found that the phenomenon was linked directly to tissue damage and loss of function. Recently, Lagaij et al<sup>51</sup> confirmed that the more severe the rejection, the greater the ERC. In contrast to ERC, TSRC may not occur at the time of rejection,<sup>54,55</sup> and our data suggest similar findings for kidney allografts. Endothelial RC is not associated with rejection outcome, but is seen concomitantly with tubular atrophy.<sup>53</sup> Tissue-specific RC is an early and persistent phenomenon after kidney transplantation,<sup>52</sup> but it is not correlated with transplant outcome. However, more recent evidence suggests that RC is present in allografts that suffer rejection, and patients with such also have lower survival rates than those in the non-

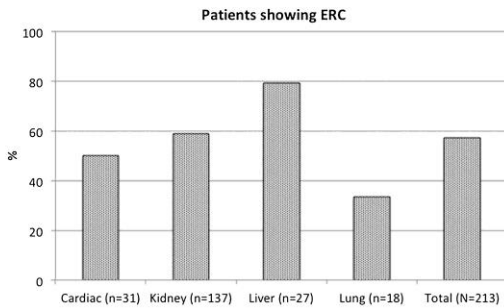
RC group.<sup>40</sup> We found that cardiac muscle had less TSRC than kidney, liver, and lung allografts. However, we could not confirm that rejection induced RC in cardiac allografts. In addition, we found contradictory data on the functional importance of TSRC. Differentiation of noncardiac cells into cardiomyocytes and physiological linkage to neighboring myocytes were seen in some cardiac allografts,<sup>43</sup> but examples of nonfunctional TSRC were identified; some cells were part of vascular smooth muscle and the same was true for marrow-derived stem cells.<sup>44,46</sup> In addition, an excess of cells migrating to the grafted heart could be a factor for poor prognosis.<sup>33</sup> For example, the only patient whose immediate cause of death was allograft rejection showed up to 29% TSRC.<sup>45</sup> This was also confirmed, in that allografts that contained greater than 10% of chimeric recipient cells showed no improvement in echocardiographic performance.<sup>34</sup>

We found that recipients of liver allografts had a higher proportion of ERC than recipients of other types of allograft, but we could

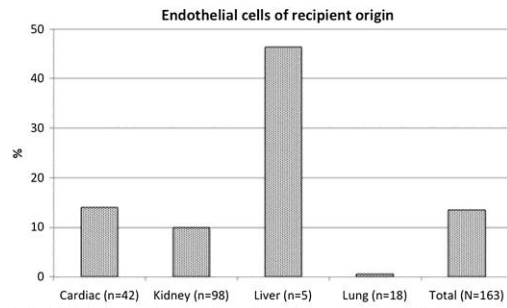
TABLE 3. Data on RC in Biopsy Samples

Allograft	Method/No. Samples	Patients Showing ERC	Patients Showing TSRC	% of Cells ERC	% of Cells TSRC
Cardiac	Y/40 XY/28 ABO/10	50% (31)	75.9% (75)	14.04% (42)	Cardiomyocytes, 2.42% (57)
Kidney	Y/44 XY/56  ABO/62 HLA-I/26 STR-PCR/36	58.95% (137)	68.11% (190)	9.96% (98)	Tubular, 11.27% (106) Mesangial, 2.26% (62) Podocyte, 0.18% (22)
Liver	Y/6 XY/54  HLA-I/29 STR-PCR/13	79.17% (27)	78.57% (74)	46.33% (5)	Hepatocytes, 16.38% (35) Cholangiocytes, 55.38% (13)
Lung	Y/2 XY/26 ABO/6 STR-PCR/7	33.34% (18)	66.67% (27)	0.56% (18)	Epithelial, 5.36% (21)
Total	Y/92 XY/164 ABO/78 HLA-I/55 STR-PCR/56	57.07% (213)	73.12% (366)	13.46% (163)	—

Data given in brackets show the number of patients whose data were available. ABO, detection of blood group antigens; HLA-I, study of major histocompatibility complex type I antigens; STR-PCR, study of short tandem repeats polymorphisms; XY, detection of X and Y chromosomes; Y, detection of Y chromosome.



**FIGURE 2.** Bar diagram showing the percentage of patients presenting with ERC in each type of allograft (n, number of patients for whom data were available; N, total sample size).



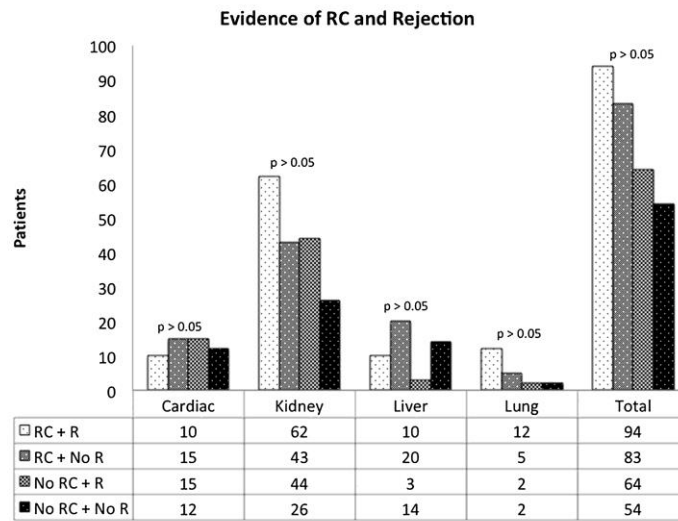
**FIGURE 3.** Bar diagram showing the percentage of endothelial cells of recipient origin present in each type of allograft (n, number of patients for whom data were available; N, total sample size).

not determine whether ERC could explain the low immunosuppressive requirement in liver allografts. Reverse chimerism occurs within the first trimester posttransplantation,<sup>57,69</sup> and like other organs, liver transplants showed TSRC derived from extrahepatic circulating stem cells, probably of bone marrow origin.<sup>56</sup> The liver has a unique venous endothelium characterized by high turnover, where cells of marrow origin have the potential to transform into endothelial cells.<sup>24</sup> In liver allograft parenchyma, cells of recipient origin cannot always be considered functional, in that they may show inflammatory cell profile.<sup>26</sup> This finding has been confirmed by Bilezikçi et al.,<sup>58</sup> who found no significant association between RC and clinicopathological outcomes.

We found that lung allografts always presented with RC at the time of rejection. However, lung recipients were less likely to present with RC than recipients of other types of allograft.<sup>62</sup> Murata et al.<sup>41</sup> showed that ERC in lung allografts was related to pathological signs of acute rejection. As for other organs, TSRC occurred from extrapulmonary precursor cells as early as 3 weeks posttransplantation.<sup>60,61</sup> We found that RC always accompanied

rejection, but we could not determine whether it was associated with graft loss.

A number of limiting factors precluded further analysis in this literature review. One of these was a lack of background information about births, abortions, and blood transfusions in women. Each of these has been described as a source of RC in women before transplantation, because embryonic, fetal, or nucleated cells are present in blood concentrates.<sup>70-73</sup> Another limiting factor was the heterogeneity of techniques used to assess chimerism. One example occurred with fluorescent in situ hybridization, which needs strong tissue treatment that may damage some antigens, leading to low sensitivity.<sup>74</sup> Tissue samples of different thickness may not show cell nuclei and sex chromosomes properly.<sup>31,42,48</sup> Another example is that different measures may have different power to determine chimerism (eg, polymerase chain reaction vs human leukocyte antigen).<sup>31</sup> A further important limitation was that histological information was not always accompanied by clinical outcome.<sup>24-27,30-34,39-62</sup>



**FIGURE 4.** Bar diagram showing the proportion of biopsy samples in which rejection and RC were assessed (R, rejection).

The performance of VCA is aimed at improving the quality of life of patients with non life-threatening conditions, but such allografts require high levels of immunosuppression therapy for maintenance.<sup>75</sup> Importantly, in nonhuman primate VCA, full RC has been found in bone marrow after fibular allotransplantation.<sup>16</sup> Other experimental data in mice suggest that donor Schwann cells are replaced in all nerve allografts in the absence of immunosuppressive treatment.<sup>76</sup> This was shown by the fact that donor alloantigens in nerve grafts were lost or replaced by the recipient after withdrawal of immunosuppression, but this process was retarded and incomplete under continuous immunosuppressive treatment.<sup>77</sup> Whether these findings for mice may lessen the need for immunosuppression therapy requires further investigation, because the results may affect the clinical application of VCA.

### CONCLUSIONS

We found no significant association between RC and allograft rejection in cardiac, kidney, liver, or lung transplantation. We could not elucidate the function of TSRC, but the findings reported in a few papers suggest that it may not be clinically relevant. We recommend that future research report both clinical and histological data, because intragraft chimerism might play a role in chimerism of SOT and other kinds of transplantation.

### REFERENCES

- Kotter JR, Drakos SG, Horne BD, et al. Effect of blood product transfusion-induced tolerance on incidence of cardiac allograft rejection. *Transplant Proc.* 2010;42:2687-2692.
- Niaudet P. Immunological factors in organ transplantation. *Intensive Care Med.* 1989;15(suppl 1):S61-S63.
- Mason DP, Little SG, Nowicki ER, et al. Temporal pattern of transfusion and its relation to rejection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2009;28:558-563.
- Ross WB, Yap PL. Blood transfusion and organ transplantation. *Blood Rev.* 1990;4:252-258.
- Fernandez FG, Jaramillo A, Ewald G, et al. Blood transfusions decrease the incidence of acute rejection in cardiac allograft recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24:S255-S261.
- Opelz G, Sengar DP, Mickey MR, et al. Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. *Transplant Proc.* 1973;5:253-259.
- Salvatierra O Jr, Vincenti F, Amend W, et al. Deliberate donor-specific blood transfusions prior to living related renal transplantation. A new approach. *Ann Surg.* 1980;192:543-552.
- Katz MR, Barnhart GR, Goldman MH, et al. Pretransplant transfusions in cardiac allograft recipients. *Transplantation.* 1987;43:499-501.
- Pirenne J, Kawai M. Tolerogenic protocol for intestinal transplantation. *Transplant Proc.* 2006;38:1664-1667.
- Jiang H, Tu H, Chen Z, et al. Effects of chimerism on the mice heart transplanted survival with the bone marrow infusion. *Transpl Immunol.* 2011;25:202-206.
- Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, et al. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107:1411-1422.
- Okabayashi T, Cameron AM, Hisada M, et al. Mobilization of host stem cells enables long-term liver transplant acceptance in a strongly rejecting rat strain combination. *Am J Transplant.* 2011;11:2046-2056.
- Muramatsu K, Kurokawa Y, Kuriyama R, et al. Gradual graft-cell repopulation with recipient cells following vascularized bone and limb allotransplantation. *Microsurgery.* 2005;25:599-605.
- Sun Z, Williams GM. Host stem cells repopulate liver allografts: reverse chimerism. *Chimerism.* 2011;2:120-122.
- Shimizu K, Sugiama S, Aikawa M, et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med.* 2001;7:738-741.
- Munding GS, Nam AI, Hui-Chou HG, et al. Nonhuman primate model of fibula vascularized composite tissue allotransplantation demonstrates donor-recipient bony union. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128:1193-1204.
- Rienstra H, Boersema M, Onuta G, et al. Donor and recipient origin of mesenchymal and endothelial cells in chronic renal allograft remodeling. *Am J Transplant.* 2009;9:463-472.
- Paivaniemi OE, Musilova P, Raivio PM, et al. Ingraft chimerism in lung transplantation—a study in a porcine model of obliterative bronchiolitis. *Respir Res.* 2011;12:56.
- Ikonen TS, Brazelton TR, Berry GJ, et al. Epithelial re-growth is associated with inhibition of obliterative airway disease in orthotopic tracheal allografts in non-immunosuppressed rats. *Transplantation.* 2000;70:857-863.
- Hillebrands J, van den Hurk BM, Klatter FA, et al. Recipient origin of neointimal vascular smooth muscle cells in cardiac allografts with transplant arteriosclerosis. *J Heart Lung Transplant.* 2000;19:1183-1192.
- Xu W, Baelde HJ, Lagaaij EL, et al. Endothelial cell chimerism after renal transplantation in a rat model. *Transplantation.* 2002;74:1316-1320.
- Williams GM, Alvarez CA. Host repopulation of the endothelium in allografts of kidneys and aorta. *Surg Forum.* 1969;20:293-294.
- Williams GM, Krajewski CA, Dagher FJ, et al. Host repopulation of endothelium. *Transplant Proc.* 1971;3:869-872.
- Gao Z, McAlister VC, Williams GM. Repopulation of liver endothelium by bone-marrow-derived cells. *Lancet.* 2001;357:932-933.
- Kleeberger W, Rothamel T, Glockner S, et al. High frequency of epithelial chimerism in liver transplants demonstrated by microdissection and STR-analysis. *Hepatology.* 2002;35:110-116.
- Fogt F, Beyser KH, Poremba C, et al. Recipient-derived hepatocytes in liver transplants: a rare event in sex-mismatched transplants. *Hepatology.* 2002;36:173-176.
- Hove WR, van Hoek B, Bajema IM, et al. Extensive chimerism in liver transplants: vascular endothelium, bile duct epithelium, and hepatocytes. *Liver Transpl.* 2003;9:552-556.
- Ng IO, Chan KL, Shek WH, et al. High frequency of chimerism in transplanted livers. *Hepatology.* 2003;38:989-998.
- Idilman R, Erden E, Kuzu I, et al. Recipient-derived hepatocytes in sex-mismatched liver allografts after liver transplantation: early versus late transplant biopsies. *Transplantation.* 2004;78:1647-1652.
- Idilman R, Erden E, Kuzu I, et al. The fate of recipient-derived hepatocytes in sex-mismatched liver allograft following liver transplantation. *Clin Transplant.* 2007;21:202-206.
- Lagaaij EL, Cramer-Knijenburg GF, van Kemenade FJ, et al. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet.* 2001;357:33-37.
- Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol.* 2001;195:229-235.
- Quaini F, Urbaneck K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* 2002;346:5-15.
- Bayes-Genis A, Salido M, Sole Ristol F, et al. Host cell-derived cardiomyocytes in sex-mismatch cardiac allografts. *Cardiovasc Res.* 2002;56:404-410.
- Medawar P. Transplantation of tissues and organs: introduction. *Br Med Bull.* 1965;21:97-99.
- Medawar P. A biological retrospect. *Nature.* 1965;207:1327-1330.
- Jooste SV, Colvin RB, Soper WD, et al. The vascular bed as the primary target in the destruction of skin grafts by antiserum. I. Resistance of freshly placed xenografts of skin to antiserum. *J Exp Med.* 1981;154:1319-1331.
- Jooste SV, Colvin RB, Winn HJ. The vascular bed as the primary target in the destruction of skin grafts by antiserum. II. Loss of sensitivity to antiserum in long-term xenografts of skin. *J Exp Med.* 1981;154:1332-1341.
- Koestner SC, Kappeler A, Schaffner T, et al. ABO histo-blood group antigen expression on the graft endothelium long term after ABO-compatible, non-identical heart transplantation. *Xenotransplantation.* 2006;13:166-170.
- Tanabe T, Ishida H, Horita S, et al. Endothelial chimerism after ABO-incompatible kidney transplantation. *Transplantation.* 2012;93:709-716.
- Murata H, Ratajczak P, Meignin V, et al. Endothelial cell chimerism associated with graft rejection after human lung transplantation. *Transplantation.* 2008;85:150-154.
- Hruban RH, Long PP, Perlman EJ, et al. Fluorescence in situ hybridization for the Y-chromosome can be used to detect cells of recipient origin in allografted hearts following cardiac transplantation. *Am J Pathol.* 1993;142:975-980.
- Muller P, Pfeiffer P, Koglin J, et al. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation.* 2002;106:31-35.
- Glaser R, Lu MM, Narula N, et al. Smooth muscle cells, but not myocytes, of host origin in transplanted human hearts. *Circulation.* 2002;106:17-19.
- Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, et al. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res.* 2002;90:634-640.



46. Fogt F, Beyser KH, Poremba C, et al. Evaluation of host stem cell-derived cardiac myocytes in consecutive biopsies in long-term cardiac transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2003;22:1314-1317.
47. Thiele J, Varus E, Wickenhauser C, et al. Mixed chimerism of cardiomyocytes and vessels after allogeneic bone marrow and stem-cell transplantation in comparison with cardiac allografts. *Transplantation*. 2004;77:1902-1905.
48. Hocht-Zeissberg E, Kahnert H, Guan K, et al. Cellular repopulation of myocardial infarction in patients with sex-mismatched heart transplantation. *Eur Heart J*. 2004;25:749-758.
49. Minami E, Laflamme MA, Saffitz JE, et al. Extracardiac progenitor cells repopulate most major cell types in the transplanted human heart. *Circulation*. 2005;112:2951-2958.
50. Sinclair RA. Origin of endothelium in human renal allografts. *Br Med J*. 1972;4:15-16.
51. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2001;345:93-97.
52. Mengel M, Jonigk D, Marwedel M, et al. Tubular chimerism occurs regularly in renal allografts and is not correlated to outcome. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:978-986.
53. van Poelgeest EP, Baelde HJ, Lagaaij EL, et al. Endothelial cell chimerism occurs more often and earlier in female than in male recipients of kidney transplants. *Kidney Int*. 2005;68:847-853.
54. Ferlicot S, Vernochet A, Romana S, et al. Microchimerism in renal allografts: clinicopathological associations according to the type of chimeric cells. *Histopathology*. 2010;56:188-197.
55. Varga Z, Gaspert A, Behnke S, et al. Tubular and endothelial chimerism in renal allografts using fluorescence and chromogenic in situ hybridization (FISH, CISH) technology. *Pathol Int*. 2012;62:254-263.
56. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000;32:11-16.
57. Pons JA, Yelamos J, Ramirez P, et al. Endothelial cell chimerism does not influence allograft tolerance in liver transplant patients after withdrawal of immunosuppression. *Transplantation*. 2003;75:1045-1047.
58. Bilezikci B, Sahin F, Uyar P, et al. Frequency of recipient-derived chimerism and relationship with acute rejection and HLA tissue typing in transplanted livers. *Transplant Proc*. 2006;38:598-601.
59. Bittmann I, Dose T, Baretton GB, et al. Cellular chimerism of the lung after transplantation. An interphase cytogenetic study. *Am J Clin Pathol*. 2001;115:525-533.
60. Kleeburger W, Versmold A, Rothamel T, et al. Increased chimerism of bronchial and alveolar epithelium in human lung allografts undergoing chronic injury. *Am J Pathol*. 2003;162:1487-1494.
61. Alberca C, Polak JM, Janes S, et al. Repopulation of human pulmonary epithelium by bone marrow cells: a potential means to promote repair. *Tissue Eng*. 2005;11:1115-1121.
62. Spencer H, Rampling D, Aurora P, et al. Transbronchial biopsies provide longitudinal evidence for epithelial chimerism in children following sex mismatched lung transplantation. *Thorax*. 2005;60:60-62.
63. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, et al. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet*. 1992;339:1579-1582.
64. Schlitt HJ, Hundrieser J, Ringe B, et al. Donor-type microchimerism associated with graft rejection eight years after liver transplantation. *N Engl J Med*. 1994;330:646-647.
65. Alexander SI, Smith N, Hu M, et al. Chimerism and tolerance in a recipient of a deceased-donor liver transplant. *N Engl J Med*. 2008;358:369-374.
66. Domati-Saad R, Klintmalm GB, Netto G, et al. Acute graft versus host disease after liver transplantation: patterns of lymphocyte chimerism. *Am J Transplant*. 2005;5:2968-2973.
67. Schlitt HJ. Is microchimerism needed for allograft tolerance? *Transplant Proc*. 1997;29:82-84.
68. Sivasai KS, Alevy YG, Duffy BF, et al. Peripheral blood microchimerism in human liver and renal transplant recipients: rejection despite donor-specific chimerism. *Transplantation*. 1997;64:427-432.
69. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009;9(suppl 3):S1-S155.
70. Koopmans M, Kremer Hovinga IC, Baelde HJ, et al. Chimerism in kidneys, livers and hearts of normal women: implications for transplantation studies. *Am J Transplant*. 2005;5:1495-1502.
71. Koopmans M, Kremer Hovinga IC, Baelde HJ, et al. Endothelial chimerism in transplantation: looking for needles in a haystack. *Transplantation*. 2006;82:S25-S29.
72. Stevens AM, McDonnell WM, Mullarkey ME, et al. Liver biopsies from human females contain male hepatocytes in the absence of transplantation. *Lab Invest*. 2004;84:1603-1609.
73. Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL, et al. Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study. *Lancet*. 2001;358:2034-2038.
74. Grassi A, Susca M, Ravaoli M, et al. Detection of recipient's cells in liver graft using antibodies to mismatched HLA class I antigens. *Liver Transpl*. 2004;10:1406-1414.
75. Landin L, Bonastre J, Casado-Sanchez C, et al. Outcomes with respect to disabilities of the upper limb after hand allograft transplantation: a systematic review. *Transpl Int*. 2012;25:424-432.
76. Midha R, Mackinnon SE, Becker LE. The fate of Schwann cells in peripheral nerve allografts. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994;53:316-322.
77. Atchabadian A, Doolabh VB, Mackinnon SE, et al. Indefinite survival of peripheral nerve allografts after temporary Cyclosporine A immunosuppression. *Restor Neurol Neurosci*. 1998;13:129-139.

## Estudio sobre quimerismo reverso y el efecto de la movilización de células madre de médula ósea sobre la expresión de citoquinas en un modelo experimental de trasplante de tejidos compuestos

### Study on reverse chimerism and the effect of mobilization of bone marrow stem cells on the expression of cytokines in an experimental model of composite tissue transplantation



Bolado Gutiérrez, P.

Pedro BOLADO-GUTIÉRREZ\*, Luis LANDÍN-JARILLO\*, César CASADO-PÉREZ\*\*

#### Resumen

#### Abstract

**Introducción y Objetivo.** Los trasplantes de tejidos compuestos sufren rechazo crónico modulado entre otros factores por citoquinas. El quimerismo reverso o quimerismo del aloinjerto se define como la repoblación del tejido trasplantado por células circulantes del receptor. Plerixafor produce la movilización de células madre de médula ósea CD34+ hacia la sangre periférica.

El objetivo del estudio fue conocer los mecanismos moleculares que intervienen en el rechazo crónico y el quimerismo reverso tras la administración de plerixafor.

**Material y Método.** Realizamos 16 trasplantes osteomusculares heterotópicos de pata posterior entre ratas Brown-Norway hembra y Wistar Lewis macho bajo inmunosupresión subterapéutica con tacrolimus. Establecimos 2 grupos de estudio según la administración postoperatoria de plerixafor. Transcurridas 9 semanas estudiamos la expresión de citoquinas y el infiltrado leucocitario en distintas localizaciones musculares, así como el grado de rechazo crónico y porcentaje de quimerismo reverso en diferentes tejidos del aloinjerto.

**Resultados.** Encontramos diferencias estadísticas en la expresión de factor estimulante de colonias granulocíticas e interleucina 12 a nivel de los tercios medio y distal del aloinjerto, y de interleucina 6 a nivel del tercio medio del aloinjerto. La intensidad del infiltrado leucocitario fue mayor en el grupo que no recibió plerixafor. Ambos grupos desarrollaron rechazo crónico y pudimos observar la aparición de quimerismo reverso. Sin embargo no observamos diferencias significativas en el infiltrado leucocitario, el rechazo crónico ni el quimerismo reverso.

**Conclusiones.** La movilización de células madre de médula ósea CD34+ se asoció con una menor expresión de factor estimulante de colonias granulocíticas, interleucina 6 e interleucina 12. Estos hallazgos contribuyen a elucidar los mecanismos moleculares que podrían conducir a la creación de quimeras en el aloinjerto.

**Background and Objective.** Vascularized composite allotransplantation suffer chronic rejection modulated by cytokines. Reverse chimerism or allograft chimerism is defined as the repopulation of the transplanted tissue by circulating cells of the recipient. Plerixafor mobilizes CD34+ bone marrow stem cells to the peripheral blood.

The aim of the study was to know the molecular mechanisms involved in chronic rejection and reverse chimerism after plerixafor administration.

**Methods.** Sixteen heterotopic osteomuscular hindlimb transplants were performed between female Brown-Norway rats as donors and male Wistar Lewis rats as recipients under subtherapeutic immunosuppression with tacrolimus. Two groups were established according to the postoperative administration of plerixafor. After 9 weeks, expression of cytokines and leukocyte infiltration were studied in different muscle locations, as well as the degree of chronic rejection and percentage of reverse chimerism in different tissues of the allograft.

**Results.** Statistical differences were found in granulocyte colony stimulating factor and interleukin 12 expression at middle and distal allograft thirds, and interleukin 6 expression at middle allograft third. The intensity of leukocyte infiltration was greater in the group that did not receive plerixafor. Both groups developed chronic rejection and the appearance of reverse chimerism could be observed. However, no significant differences were observed in leukocyte infiltration, chronic rejection or reverse chimerism.

**Conclusions.** The mobilization of CD34+ bone marrow stem cells was associated with a lower expression of granulocyte colony stimulating factor, interleukin 6 and interleukin 12.

These findings contribute to elucidate the molecular mechanisms that could lead to the creation of chimeras in the allograft.

<b>Palabras clave</b>	Trasplante tejidos compuestos, Rechazo crónico, Quimerismo reverso, Células madre médula ósea CD34+, Plerixafor.
<b>Nivel de evidencia científica</b>	4 Investigación Básica
<b>Recibido (esta versión)</b>	27 noviembre/2017
<b>Aceptado</b>	23 mayo/2018

<b>Keywords</b>	Vascularized composite allotransplantation, Chronic rejection, Reverse chimerism, CD34+ bone marrow stem cell, Plerixafor
<b>Level of evidence</b>	4 Bench Research
<b>Received (this version)</b>	27 november/2017
<b>Accepted</b>	23 may/2018

**Ayudas recibidas:** Trabajo incluido en el Proyecto de Investigación en Salud "Protocolo de inmunosupresión reducida tras condicionamiento con precursores hematopoiéticos en trasplantes de tejidos compuestos: Investigación básica y clínica", con número de expediente PI12/00867, y cofinanciado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

\* Facultativo Especialista de Área.

\*\* Jefe del Servicio.

Servicio de Cirugía Plástica, Reparadora y Quemados, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.

**Trabajo galardonado con el Premio Nacional de Residentes de la Sociedad Española de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética (SECPRE) en su LI Congreso Nacional celebrado en Estoril, Portugal, junio de 2016; y con el Primer Premio de Investigación Experimental en el Concurso Internacional de Residentes de la Federación Ibero-Latinoamericana de Cirugía Plástica (FILACP) en su XXII Congreso celebrado en Lima, Perú, mayo de 2018.**



## Introducción

En los trasplantes de tejidos compuestos (TTCs) se transfieren tejidos vascularizados antigénicamente heterogéneos. Los TTCs de miembros están formados por la piel, el tejido subcutáneo, nervioso, muscular, tendinoso, fascial, cartilaginoso, óseo y la médula ósea vascularizada (MOV).

Los protocolos convencionales de inmunosupresión (IS) mantienen al receptor en un “estado de ignorancia” frente al aloinjerto y contribuyen al éxito clínico del trasplante. La IS puede prevenir o revertir los episodios de rechazo agudo (RA). Sin embargo, el aloinjerto sigue expuesto a la aparición de rechazo crónico (RC) o vasculopatía crónica del aloinjerto. El RC se caracteriza por vasculopatía fibroproliferativa y fibrosis tisular del órgano trasplantado. La estenosis de la luz vascular puede producirse por un engrosamiento difuso y concéntrico de la íntima conocido como hiperplasia intimal, o por una fibrosis de la adventicia.<sup>(1)</sup> Las lesiones histopatológicas del RC son en gran medida irreversibles y producen progresivamente la disfunción del aloinjerto.<sup>(1)</sup> Si bien se desconoce la relación exacta entre el RA y el RC y los mecanismos moleculares que los regulan, los episodios de RA aceleran el desarrollo de RC tanto en trasplante de órgano sólido (TOS) como en modelos de TTC.<sup>(1,2)</sup> Los fenómenos de RC pueden observarse en modelos experimentales de trasplante cuando se utiliza IS a dosis sub-terapéuticas.<sup>(3)</sup>

La MOV que aportan los huesos de los aloinjertos en los TTCs se integra en el espacio vascular del receptor tras la revascularización del aloinjerto.<sup>(4)</sup> Las células madre de médula ósea (CMMO) del donante generan un estado de quimerismo sistémico en la sangre periférica, la médula ósea y los tejidos linfoides del receptor que puede contribuir a la inducción de tolerancia específica frente al donante.<sup>(5)</sup> La tolerancia del trasplante podría definirse como la falta de respuesta inmunitaria del receptor frente a antígenos específicos del donante sin la necesidad de IS crónica para su mantenimiento, preservando intacta la respuesta inmunitaria frente al resto de los antígenos.<sup>(5)</sup> Los linfocitos derivados de las CMMO del donante pueden contribuir a prolongar la supervivencia a largo plazo del aloinjerto mediante la regulación negativa de la respuesta inmunitaria del receptor específica frente al donante.<sup>(6)</sup>

El tráfico celular desde el receptor hacia el aloinjerto puede producirse mediante un fenómeno conocido como quimerismo reverso (QR) o quimerismo del aloinjerto. El QR consiste en la repoblación del aloinjerto por células del receptor. Hasta el momento se desconoce qué tipos de células son las responsables de la producción de QR, así como los mecanismos moleculares que lo regulan en los TTCs.<sup>(7)</sup> Sin embargo, se especula que las CMMO del receptor en sangre periférica y que circulan a través del aloinjerto podrían diferenciarse en los diferentes fenotipos celulares que lo componen.<sup>(8)</sup>

El factor derivado del estroma 1 (SDF-1; CXCL12) es una citoquina multifuncional que pertenece a la familia de quimiocinas CXC y se expresa de forma constitutiva en células del estroma de la médula ósea (MO). El receptor de SDF-1, CXCR4, se expresa en diferentes tipos celulares entre los que se encuentran las CMMO CD34<sup>+</sup> que juegan un papel crítico en la supervivencia, proliferación, migración y mantenimiento celular.<sup>(9)</sup> Plerixafor es un fármaco antagonista del receptor alfa de la citoquina CXCR4 e impide la unión de SDF-1. Su administración produce la movilización de CMMO a sangre periférica. Por este motivo se ha utilizado en casos de linfoma y mieloma múltiple de tal manera que las CMMO CD34<sup>+</sup> puedan extraerse, conservarse e infundirse de nuevo tras la finalización de tratamientos mioablativos.

El objetivo del estudio fue evaluar la expresión de citoquinas en un modelo experimental de RC en aloinjertos osteomusculares heterotópicos de pata posterior de rata, sometidos a IS subterapéutica con tacrólimus, tras la movilización de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor. Además se establecieron los siguientes objetivos secundarios: analizar el infiltrado leucocitario cualitativamente y cuantitativamente en el tercio medio del tejido muscular del aloinjerto, el grado de RC en los vasos femorales y del tercio medio y distal del tejido muscular del aloinjerto, y el porcentaje de QR en la MO del aloinjerto.

## Material y método

### Protocolo quirúrgico experimental

Todos los animales recibieron un trato adecuado de acuerdo a la Directiva del Consejo de Europa del 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE). El proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Bienestar Animal del Hospital Universitario La Paz (Madrid, España) con fecha 27 de febrero de 2012.

Realizamos 16 transferencias de pata posterior entre ratas (*Rattus Norvegicus*) de 2 familias no consanguíneas: ratas macho Wistar-Lewis (LEW) haplotipo RT1<sup>l</sup> como receptoras y ratas hembra Lewis Brown-Norway (LBN) RT1<sup>n</sup> como donantes (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Francia), divididas en 2 grupos de experimentación con 8 animales en cada grupo. Todos los animales fueron sometidos a trasplante inmediato y posterior IS subterapéutica con tacrólimus (Prograf<sup>®</sup>, Astellas Pharma, Chūō, Tokyo, Tokio, Japón). El grupo II además fue sometido a terapia movilizadora de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor (Mozobil<sup>®</sup>, Genzyme, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.) (Tabla I).

### Extracción del aloinjerto

El aloinjerto se extrajo a nivel de la raíz de la pata posterior de la rata, tomando los vasos femorales como pedículo (Fig. 1).

### Técnica quirúrgica en el animal receptor

En la rata receptora disecamos los vasos femorales

Estudio sobre quimerismo reverso y el efecto de la movilización de células madre de médula ósea sobre la expresión de citoquinas en un modelo experimental de trasplante de tejidos compuestos

Tabla I. Grupos de experimentación

Grupo	n	Donante ⇒ Receptor	Terapia IS (días)	Terapia movilizadora de CMMO CD34 <sup>+</sup> (días)	Supervivencia (días)
I	8	Hembra ⇒ Macho	Tacrolimus 0.1 mg/kg (0,1,2,3,7 post-trasplante)	No	63
II	8	Hembra ⇒ Macho	Tacrolimus 0.1 mg/kg (0,1,2,3,7 post-trasplante)	Plerixafor 1 mg/kg (0,1,2,3,7 post-trasplante)	63

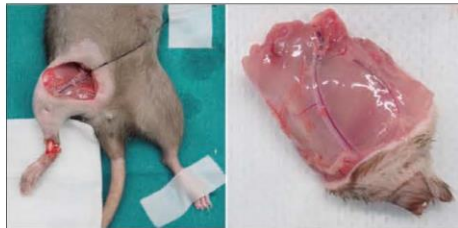


Fig. 1. Extracción del aloinjerto. Izquierda: disección de los vasos femorales a nivel de la ingle y de los vasos tibiales anteriores y posteriores a nivel del tobillo. Derecha: extracción del aloinjerto.

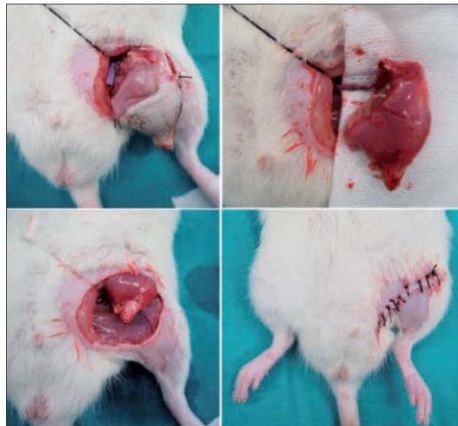


Fig. 2. Técnica quirúrgica en el animal receptor. Superior izquierda: fijación del aloinjerto. Superior derecha: desepidermización del aloinjerto tras patencia vascular positiva. Inferior izquierda: acomodación heterotópica subcutánea abdominal del aloinjerto. Inferior derecha: cierre de la zona receptora.

como vasos receptores. Las anastomosis arterial y venosa las realizamos mediante técnica término-terminal. Tras comprobar la patencia vascular del aloinjerto procedimos a la eliminación de la totalidad del componente cutáneo y posterior acomodación heterotópica subcutánea a nivel abdominal (Fig. 2).

**Protocolo de inmunosupresión**

Todos los animales receptores recibieron terapia IS subterapéutica con tacrolimus (Prograf®, Astellas Pharma, Chūō, Tokyo, Tokio, Japón) a dosis de 0,1 mg/kg/24 horas por vía subcutánea los días 0, 1, 2, 3 y 7 post-trasplante.<sup>(10)</sup>



www.ciplaslatin.com



Fig. 3. Extracción del aloinjerto a las 9 semanas post-trasplante.

**Protocolo de movilización de CMMO CD34<sup>+</sup>**

Los animales receptores del grupo II recibieron terapia movilizadora de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor (Mozobil®, Genzyme, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.) a dosis de 1 mg/kg/24 horas por vía subcutánea los días 0, 1, 2, 3 y 7 post-trasplante.<sup>(10)</sup>

**Seguimiento clínico**

En todos los animales monitorizamos la evolución ponderal semanal y la aparición de signos de enfermedad injerto contra huésped (EICH) entre los que incluimos la aparición de lesiones cutáneas, alopecia, atrofia muscular, dificultad respiratoria, diarrea o debilidad generalizada. Toda lesión cutánea sospechosa fue evaluada anatomopatológicamente.

**Protocolo de extracción de los aloinjertos**

Transcurridas 9 semanas post-trasplante recuperamos los aloinjertos para su procesado y análisis (Fig. 3). Posteriormente sacrificamos los animales receptores.

**Procesado y estudio de las muestras**

Dividimos los aloinjertos en fresco en diferentes muestras que comprendían los vasos femorales, la tibia y el tejido muscular y los fijamos en tampón formalina. Las muestras musculares las dividimos en tercios con preservación exclusiva de los tercios medio y distal.

**Valoración de la expresión de citoquinas**

Realizamos mediciones en los tercios medio y distal del tejido muscular del aloinjerto utilizando el panel de

133

22 citoquinas del sistema ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassays (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.) según instrucciones del fabricante. Las citoquinas incluidas en el panel seleccionado fueron: Eotaxina, oncogén relacionado con el crecimiento  $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IFN- $\gamma$ -proteína inducible 10 (IP-10), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), MCP-3, proteína inflamatoria de macrófagos 1  $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-2, quimiocina expresada y secretada por células T normales reguladas tras la activación (RANTES) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Tras el procesamiento de las muestras e incubación por duplicado con cada uno de los anticuerpos frente a las citoquinas de interés, cuantificamos la señal obtenida en el panel mediante un analizador Luminex xMAP 200 (Luminex Corporation, Austin, Texas, EE.UU.).

**Valoración del infiltrado leucocitario**

- **Cualitativa.** Realizamos una valoración subjetiva del infiltrado leucocitario en muestras del tercio medio del tejido muscular con tinción de hematoxilina-eosina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y una magnificación de x100. El muestreo lo llevaron a cabo 2 observadores independientes en 5 cortes seleccionados de manera aleatoria para cada aloinjerto. La escala utilizada fue: 0 = Ausencia; 1 = Leve; 2 = Moderado; 3 = Intenso.
- **Cuantitativa.** Realizamos un estudio inmunohistoquímico (IHQ) de los antígenos leucocitarios CD3, CD4, CD8, CD20 y CD68 a nivel del tercio medio del tejido muscular del aloinjerto con el objetivo de identificar los subtipos celulares. Para ello desenmascaramos los antígenos leucocitarios con un protocolo ajustado para cada anticuerpo primario mediante el sistema PTLINK Dako® (Pre-Treatment). El equipo de tinción empleado fue el Autostainer Plus de Dako® siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los resultados mostraron los núcleos celulares en azul-violeta y las células positivas en marrón.

Escogimos 5 cortes aleatorios por aloinjerto y muestreamos 2 áreas de 90000  $\mu\text{m}^2$  por corte, con una magnificación de x200. Consideramos positivas para el conteo aquellas células que mostraban núcleo y citoplasma. El muestreo se llevó a cabo por 2 observadores independientes (Fig. 4).

**Valoración del rechazo crónico**

Valoramos el RC en los vasos de femorales y en los vasos del tercio medio y distal del tejido muscular del aloinjerto mediante la medición de la proliferación intimal (PI) y el porcentaje de permeabilidad arterial (PPA):

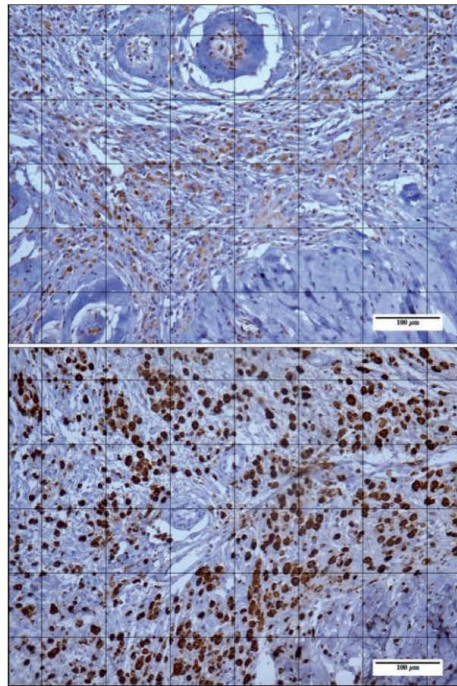


Fig. 4. Valoración cuantitativa del infiltrado leucocitario. Superior: tinción IHQ CD4 (x200). Inferior: tinción IHQ CD68 (x200).

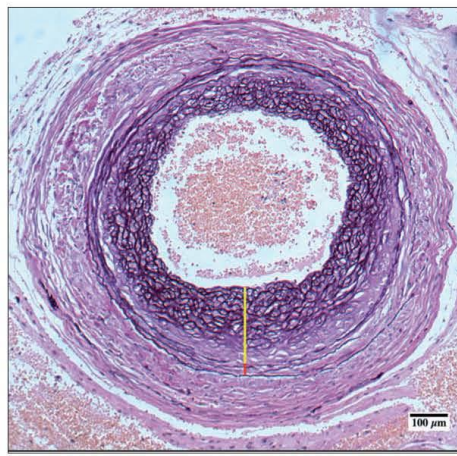


Fig. 5. Valoración de la PI en vasos femorales tras tinción de fibras elásticas según van Gieson (x100). Línea amarilla: íntima. Línea roja: media.

- PI (Fig. 5): porcentaje del grosor total de la pared arterial que ocupa la íntima. Obtenido según la fórmula (Íntima / (Íntima + Media)) x 100.

- PPA (Fig. 6): porcentaje de la luz arterial que es permeable al flujo y no ha sido ocupada por la neointima. Obtenido según la fórmula (Área de la neointima / Área de la lámina elástica interna) x 100.

Para ello preparamos 5 cortes histológicos aleatorios de cada segmento vascular a estudiar, y valoramos tras tinción con el kit de tinción de fibras elásticas según van Gieson (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Los resultados mostraron los núcleos celulares de color pardo negro, las fibras elásticas en negro, el colágeno en rojo y la musculatura en amarillo.

**Valoración del quimerismo reverso**

Evaluamos la repoblación celular de la MO del aloinjerto mediante el análisis del porcentaje de células con cromosoma Y en el aloinjerto con técnica Real-Time PCR (RT-PCR), mezclando SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts,

EE.UU) con los cebadores murinos Bcl-2 del cromosoma 13 y Sry del cromosoma Y, y el ADN genómico a estudiar, realizando el análisis por triplicado.

**Análisis estadístico**

Realizamos el análisis estadístico utilizando el programa SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, EE.UU.). Todas las pruebas estadísticas se han considerado bilaterales y como valores significativos aquellos que presentaron una probabilidad de error menor del 5% (p < 0.05).

Realizamos la comparación entre grupos de los valores de citoquinas y de QR usando el test de la U de Mann-Whitney (no paramétrico para datos independientes).

La comparación entre grupos de los valores de infiltrado inflamatorio y de PI y PPA en los vasos femorales y musculares del aloinjerto, teniendo en cuenta las diferentes repeticiones de dichos parámetros en los mismos sujetos, la analizamos mediante un modelo de regresión lineal con efectos mixtos, con las repeticiones y el grupo (I frente a II) como factores.

**RESULTADOS**

**Supervivencia y seguimiento clínico**

La supervivencia global fue del 84.21%, con 16 ratas viables de 19 operadas. El tiempo medio de la intervención fue de 191.32 minutos (130 - 250 minutos), con un tiempo medio de microcirugía de 82.90 minutos (120 - 60 minutos). De los 3 animales no viables, 2 murieron en el postoperatorio inmediato debido a parada cardiorrespiratoria en probable relación con la pérdida hemática producida durante la cirugía, y el tercero fue sacrificado el día 28 post-trasplante debido a infección tardía de la herida quirúrgica con empeoramiento del estado general. No observamos signos de EICH.

**Resultados de la expresión de citoquinas**

Las concentraciones de citoquinas con diferencias significativas a nivel del tercio medio y distal del aloinjerto están representadas en diagrama Box-Plot en las Fig. 7-9.

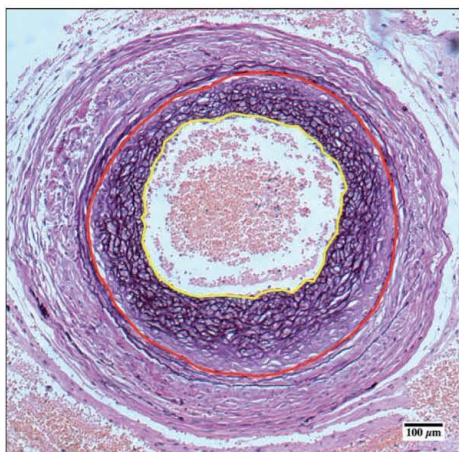


Fig. 6. Valoración del PPA en vasos femorales tras tinción de fibras elásticas según van Gieson (x100). Línea amarilla: área de la neointima. Línea roja: área de la lámina elástica interna.

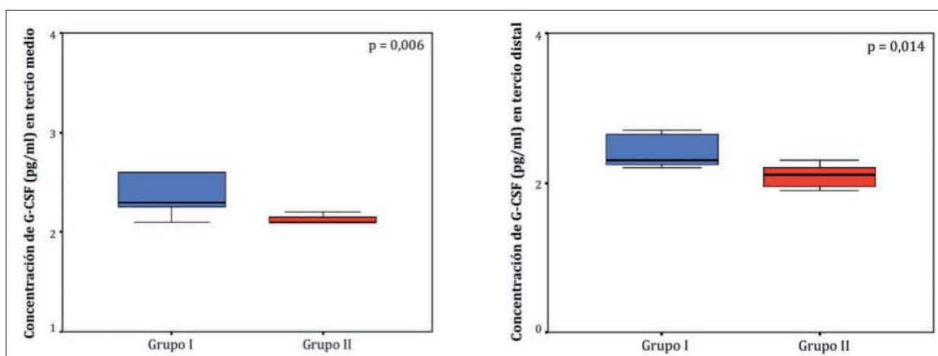


Fig. 7. Representación Box-Plot de la concentración de G-CSF en tercios medio y distal.



**Resultados del infiltrado leucocitario**

- *Cualitativa.* El infiltrado leucocitario medio del grupo I fue intenso mientras que en grupo II fue moderado (Fig. 10).
- *Cuantitativa.* Los resultados de los contajes celulares en el tercio medio del aloinjerto por área media de 90000 μm<sup>2</sup> con una magnificación de ×200 para los estudios IHQ frente a los antígenos CD3, CD4, CD8, CD20 y CD68 están representados en la Fig. 11. No encontramos diferencias significativas entre ambos grupos.

**Resultados del rechazo crónico**

Todas las muestras estudiadas presentaron signos histopatológicos de RC. Los resultados de cada una de las muestras a nivel de los vasos femorales y de los vasos del tercio medio y distal del aloinjerto expresados como PI y PPA están representados en las Fig. 12 y 13. No encontramos diferencias significativas entre ambos grupos.

**Resultados del quimerismo reverso**

El porcentaje medio de QR en el grupo I y en el grupo

II fue 85.61% ± 16.41% y 88.40% ± 16.97%, respectivamente (Fig. 14). No encontramos diferencias significativas entre ambos grupos.

**Discusión**

Las CMMO del donante tienen un efecto inmunorregulador favoreciendo la tolerancia del aloinjerto tras la producción de quimerismo sistémico hematopoyético en el receptor.<sup>(11)</sup> Se ha hipotetizado que el QR también podría promover la aceptación del aloinjerto por el receptor.<sup>(12)</sup> Entre los mecanismos moleculares que regulan el rechazo y la tolerancia del aloinjerto se encuentran las citoquinas.<sup>(13)</sup> Sin embargo, se desconoce el patrón específico de expresión de citoquinas tras un TTC así como su relación con el RC y el QR.<sup>(13)</sup> Nuestros resultados muestran la presencia de RC y QR en MO en todos los aloinjertos. Además, la expresión de citoquinas en el tejido muscular del aloinjerto muestra una disminución significativa de G-CSF, IL-6 e IL-12. Estos cambios en el patrón de expresión de citoquinas podrían deberse al efecto regulador de la respuesta inmunitaria de las CMMO CD34<sup>+</sup> movilizadas por plerixafor.

La transferencia de células de MO a través de los aloinjertos óseos vascularizados y los TTCs de miembros favorece la producción de quimerismo sistémico linfohematopoyético en el receptor, lo que se ha relacionado con una regulación negativa de la respuesta inmunitaria frente al aloinjerto y la supervivencia a largo plazo del tejido trasplantado.<sup>(11)</sup>

La falta de homogeneidad en el diseño de los estudios experimentales y clínicos de TOS y TTCs es uno de los problemas que impide establecer un patrón específico de expresión de citoquinas en el aloinjerto ni relacionarlo directamente con el rechazo y la tolerancia.<sup>(14)</sup> Se ha sugerido que la respuesta de los linfocitos T helper 1 (Th1) podría relacionarse con los episodios de rechazo, mientras que los linfocitos Th2 podrían estar involucradas en la generación de estados de tolerancia.<sup>(15)</sup> Wu y col. ob-

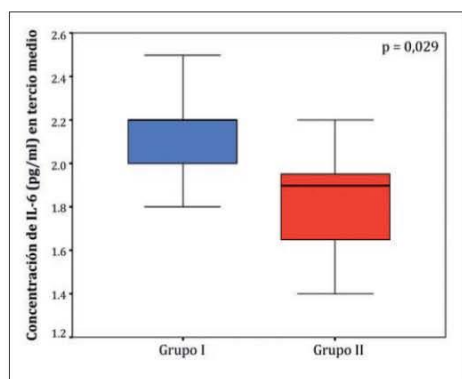


Fig. 8. Representación Box-Plot de la concentración de IL-6 en tercio medio.

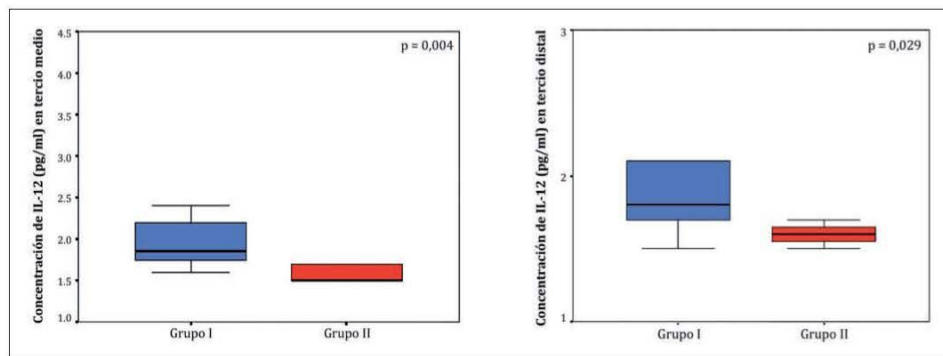


Fig. 9. Representación Box-Plot de la concentración de IL-12 en tercios medio y distal.

Estudio sobre quimerismo reverso y el efecto de la movilización de células madre de médula ósea sobre la expresión de citoquinas en un modelo experimental de trasplante de tejidos compuestos

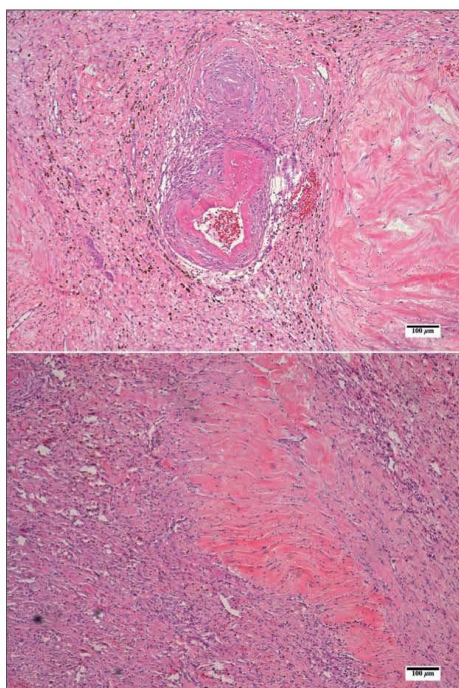


Fig. 10. Superior: infiltrado leucocitario de grado moderado. Tinción hematoxilina-eosina (x100). Inferior: infiltrado leucocitario de grado intenso. Tinción hematoxilina-eosina (x100).

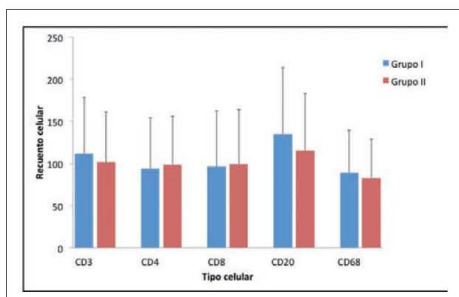


Fig. 11. Resultados de los conteos celulares en el tercio medio del aloinjerto.

servaron una mayor expresión de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en aloinjertos cardiacos con rechazo.<sup>(16)</sup> Van Hoffer y col. demostraron niveles aumentados de IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 en aloinjertos cardiacos de pacientes con rechazo.<sup>(17)</sup> De Mattos y col. identificaron expresión de IL-12 en aloinjertos renales durante los episodios de RA.<sup>(18)</sup> No hay evidencia acerca de los niveles de expresión de G-CSF en los aloinjertos de TOS ni de TTCs. Sin embargo, Vrtovec y col. concluyeron que la administración exógena de G-CSF parecía estar asociada

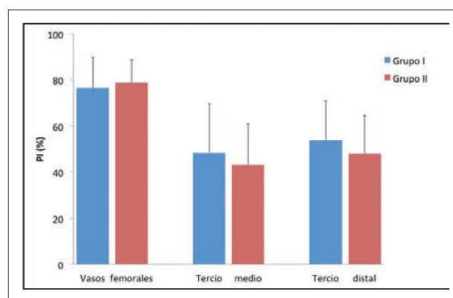


Fig. 12. Resultados de la PI en los vasos femorales y en los tercio medio y distal del aloinjerto.

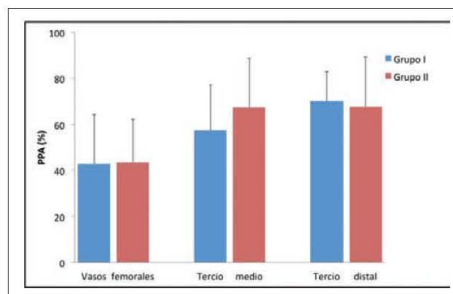


Fig. 13. Resultados del PPA en los vasos femorales y en los tercio medio y distal del aloinjerto.

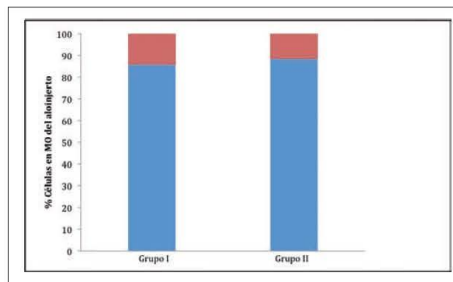


Fig. 14. QR en MO del aloinjerto expresado como porcentaje de células del receptor y del donante.

con una menor incidencia de RA y RC en aloinjertos cardiacos, sugiriendo un potencial efecto modulador de la respuesta inmunitaria.<sup>(19)</sup>

La regeneración celular del aloinjerto puede activarse para reparar los tejidos lesionados por la respuesta inmunitaria del receptor y la lesión por isquemia y reperusión.<sup>(13)</sup> Además, en los TTCs de miembros esta agresión se ve agravada por la osteotomía y la denervación del aloinjerto.<sup>(20)</sup> Diferentes autores como Olthoff o Miyake han sugerido que las citoquinas, la activación de factores de transcripción y la expresión de genes moduladores del ciclo celular están implicados en los meca-





nismos de regeneración celular.<sup>(21,22)</sup> Olthoff estudió los mecanismos de regeneración celular en aloinjertos hepáticos observando que las células de Kupffer son una fuente primaria de IL-6 y factores de crecimiento tras el trasplante, implicados en el inicio de la regeneración hepática.<sup>(13)</sup>

La disminución significativa de IL-6 e IL-12 en los aloinjertos del grupo sometido a tratamiento movilizador de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor observada en nuestros resultados podría estar relacionada con la presencia de un menor número de episodios de RA asociado al efecto modulador de la respuesta inmunitaria producido por las CMMO circulantes. Además, si suponemos que el daño tisular generado por los episodios de rechazo ha sido superior en el grupo no sometido a tratamiento movilizador de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor, los valores de IL-6 también podrían verse incrementados como señal de una mayor regeneración tisular.

Diferentes teorías centradas en el QR intentan explicar el proceso que hace que el aloinjerto sea gradualmente menos inmunogénico. Medawar fue el primero en hipotetizar que la aceptación del aloinjerto podría ser el resultado del reemplazo endotelial de las células del aloinjerto por las del receptor, lo que se conoce como QR endotelial.<sup>(12,23)</sup> Sin embargo, la función del aloinjerto depende de células especializadas que también pueden ser objeto de reemplazo, lo que se conoce como QR órgano específico.<sup>(23)</sup> Muramatsu y col. evidenciaron histológicamente en TTCs en ratas valorados a los 18 meses post-trasplante que el QR se producía gradualmente en la piel, el endotelio y la MO, pero la mayor del parte del perisostio y del tejido muscular seguía estando formado por células del donante.<sup>(24)</sup> Mathes y col. encontraron que el QR en MO de TTCs en cerdos era progresivo y llegaba a ser completo a las 48 semanas post-trasplante.<sup>(25)</sup> Nuestros resultados muestran unos porcentajes de QR en MO evaluado a las 9 semanas post-trasplante que varían entre el 85% y el 88%, lo que confirma que el QR en MO del aloinjerto se produce de forma precoz y es independiente del tratamiento movilizador de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor.

Entre otras limitaciones de nuestro estudio encontramos el tamaño muestral, ya que impidió detectar con suficiente potencia diferencias cuya significancia podría haberse alcanzado con un mayor tamaño. Además, el modelo de IS subterapéutica no se corresponde con la práctica clínica de la trasplantología pero permitió la generación de RC e incrementar los mecanismos de daño y regeneración celular.

## Conclusiones

Encontramos disminuida significativamente la expresión de G-CSF, IL-6 e IL-12 en el tejido muscular del aloinjerto en el grupo sometido a tratamiento movilizador de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor.

Las conclusiones obtenidas de los objetivos secundarios son:

- El infiltrado leucocitario cualitativo en el tercio medio del tejido muscular del aloinjerto fue más intenso en el grupo no sometido a tratamiento movilizador de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor. El infiltrado leucocitario cuantitativo de células CD3, CD20 y CD68 en el tercio medio del tejido muscular del aloinjerto fue superior en el grupo no sometido a tratamiento movilizador de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor, mientras que el de células CD4 y CD8 fue superior en el grupo sometido a tratamiento movilizador de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor.
- El grado de RC medido como PI fue mayor en los vasos del tercio medio y distal del tejido muscular del aloinjerto en el grupo no sometido a tratamiento movilizador de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor, mientras que en los vasos femorales fue mayor en el grupo sometido a tratamiento movilizador de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor. El grado de RC medido como PPA fue mayor en los vasos del tercio distal del tejido muscular del aloinjerto en el grupo no sometido a tratamiento movilizador de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor, mientras que en los vasos femorales y del tercio medio del tejido muscular del aloinjerto fue mayor en el grupo sometido a tratamiento movilizador de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor.
- El porcentaje de QR en la MO del aloinjerto fue mayor en el grupo sometido a tratamiento movilizador de CMMO CD34<sup>+</sup> con plerixafor.

## Agradecimientos

A la Dra. Carlota Largo Aramburu y al personal del Servicio de Cirugía Experimental por el mantenimiento del bienestar animal. A la Dra. María Teresa Vallejo Cremades por el procesamiento de las muestras histológicas. A la Dra. Rosario Madero Jarabo por el análisis estadístico.

## Dirección del autor

Dr. Pedro Bolado Gutiérrez  
Servicio de Cirugía Plástica, Reparadora y Quemados  
Hospital Universitario La Paz  
Paseo de la Castellana 261  
28046 Madrid, España.  
Correo electrónico: pboladog@gmail.com

## Bibliografía

1. Libby P, Pober JS. Chronic rejection. *Immunity* 2001; 14(4): 387-397.
2. Unadkat JV, Schneeberger S, Horibe EH, Goldbach C, Solari MG, Washington KM, et al. Composite tissue vasculopathy and degeneration following multiple episodes of acute rejection in reconstructive transplantation. *Am J Transplant*. 2010;10(2):251-261.

Estudio sobre quimerismo reverso y el efecto de la movilización de células madre de médula ósea sobre la expresión de citoquinas en un modelo experimental de trasplante de tejidos compuestos

3. Li Y, Zhu Y, Wang J, Wei W, Wu B, Li J. 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):1811-1815.
4. Suzuki H, Patel N, Matthews M, DelRossi AJ, Doolin EJ, Hewitt CW. Vascularized bone marrow transplantation: A new surgical approach using isolated femoral bone/bone marrow. *J Surg Res.* 2000; 89(2):176-183.
5. Muramatsu K, Kuriyama R, You-Xin S, Hashimoto T, Matsunaga T, Taguchi T. Chimerism studies as an approach for the induction of tolerance to extremity allografts. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008; 61(9):1009-1015.
6. Hartner WC, De Fazio SR, Markes TG, Maki T, Monaco AP, Gozzo JJ. Specific tolerance to canine renal allografts following treatment with fractionated bone marrow and antilymphocyte serum. *Transplant Proc.* 1987;19(1 Pt 1):476-477.
7. Muramatsu K, Bishop AT. Cell repopulation in vascularized bone grafts. *J Orthop Res.* 2002; 20(4):772-778.
8. Muramatsu K, Kuriyama R, Taguchi T. Repopulation of donor cells from the recipient following extremity graft: studies using the LACZ transgenic rat. *Microsurgery.* 2007; 31; 28(4): 279-284.
9. Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P, et al. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood.* 2000; 1;95(3):756-768.
10. Okabayashi T, Cameron AM, Hisada M, Montgomery RA, Williams GM, Sun Z. Mobilization of Host Stem Cells Enables Long-Term Liver Transplant Acceptance in a Strongly Rejecting Rat Strain Combination. *Am J Transplant.* 2011; 1;11(10):2046-2056.
11. Miller J, Mathew J, Garcia-Morales R, Zucker KE, Carreno M, Jin Y, et al. The human bone marrow as an immunoregulatory organ. *Transplantation.* 1999; 27;68(8):1079-1090.
12. Medawar P. Transplantation of tissues and organs: Introduction. *British Medical Bulletin.* 1965;1;21(2):97-99.
13. Olthoff KM. Hepatic regeneration in living donor liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003; 9(10 Suppl 2):S35-S41.
14. Baan CC, Weimar W. Intra-graft cytokine gene expression: implications for clinical transplantation. *Transpl Int.* 1998; 11(3):169-180.
15. van Besouw NM, Daane CR, Vaessen LM, Balk AH, Claas FH, Zondervan PE, et al. Different patterns in donor-specific production of T-helper 1 and 2 cytokines by cells infiltrating the rejecting cardiac allograft. *J Heart Lung Transplant.* 1995; 14(5):816-823.
16. Wu CJ, Lovett M, Wong-Lee J, Moeller F, Kitamura M, Goraliski TJ, et al. Cytokine gene expression in rejecting cardiac allografts. *Transplantation.* 1992; 54(2):326-322.
17. Van HE. In situ expression of cytokines in human heart allografts. *American Journal of Pathology.* 1996; 21;149(6):1991-2003.
18. de Mattos AM, Meyer MM, Norman DJ, Bennett WM, Sprague J, Bakke AC. Interleukin-12 p40 m-RNA expression in human kidney allograft biopsies. *Transpl Immunol.* 1997; 5(3):199-203.
19. Vrtovec B, Haddad F, Pham M, Deuse T, Fearon WF, Schrepfer S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor therapy is associated with a reduced incidence of acute rejection episodes or allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *Transplant Proc.* 2013; 45(6):2406-2409.
20. Muramatsu K, Kurokawa Y, You-Xin S, Bishop AT, Doi K. Cell traffic between donor and recipient following rat limb allograft. *J Orthop Res.* 200; 23(1):181-187.
21. Olthoff KM. Molecular pathways of regeneration and repair after liver transplantation. *World J Surg.* 2002; 26(7):831-837.
22. Miyake K, McNeil PL. Mechanical injury and repair of cells. *Crit Care Med.* 2003; 31(8 Suppl):S496-501.
23. Bolado P, Landin L. Effect of reverse chimerism on rejection in clinical transplantation. *Ann Plast Surg.* 2013; 71(5):615-620.
24. Muramatsu K, Suzuki H, You-Xin S, Hashimoto T, Matsunaga T, Taguchi T. Donor cell repopulation of whole-limb allografts in the rat: detection with green fluorescent protein. *Plast Reconstr Surg.* 2007;120(1):100-107.
25. Mathes DW, Randolph MA, Bourget JL, Nielsen GP, Ferrera VR, Arn JS, et al. Recipient bone marrow engraftment in donor tissue after long-term tolerance to a composite tissue allograft. *Transplantation.* 2002; 27;73(12):1880-1885.



#### **10.4 COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS**

- Comunicación oral al XXII Congreso de la Federación Ibero Latinoamericana de Cirugía Plástica, dentro del concurso internacional de residentes, celebrado en Lima (Perú) en mayo de 2018: “Estudio sobre quimerismo reverso y el efecto de la movilización de células madre de médula ósea sobre la expresión de citoquinas en un modelo experimental de trasplante de tejidos compuestos”.

- Comunicación oral al LI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética, dentro del concurso nacional de residentes, celebrado en Estoril (Portugal) en junio de 2016: “Estudio sobre quimerismo reverso y el efecto de la movilización de células madre de médula ósea sobre la expresión de citoquinas en un modelo experimental de trasplante de tejidos compuestos”.

- Póster al LI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética, celebrado en Estoril (Portugal) en junio de 2016: “Efecto clínico del quimerismo reverso en el rechazo y la funcionalidad clínica del trasplante”.

- Comunicación oral al XIX Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas, celebrado en Madrid en noviembre de 2013: “New form of chimerism and its implication in clinical transplantation”.

## 10.5 NOTAS, PERMISOS Y DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo ha sido ejecutado en el Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ) de Madrid. Ha contado con la aprobación del Comité Ético de Bienestar Animal (C.E.B.A.) de dicho hospital con fecha de 30 de noviembre de 2012 (número de proyecto C.E.B.A. 10-2012), certificando el cumplimiento de la normativa vigente en experimentación animal de acuerdo a la Directiva del Consejo de Europa del 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE).

No existe relación comercial ni financiera entre el presente trabajo, su autor y colaboradores y los productos que en él se han utilizado.

Las imágenes no originales contenidas en la presente tesis se publican con permiso de las editoriales propietarias de sus derechos de autor (Elsevier, Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Massachusetts Medical Society y John Wiley and Sons). Los derechos para su uso en esta tesis han sido cedidos por Rightslink con números de licencia 4466040180557, 4466040969776, 4466070014612, 4466710578287, 4487190362060 y 4490670691514.