



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

**EFFECTO INMUNOMODULADOR DEL LIPOPOLISACÁRIDO Y
EL GALACTOMANANO EN UN MODELO DE ALOTRASPLANTE
VASCULARIZADO COMPUESTO DE EXTREMIDAD
POSTERIOR EN RATAS**

Memoria presentada por Mónica Rubio Yanchuck

Para optar al grado de Doctora en Medicina

2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

**EFFECTO INMUNOMODULADOR DEL LIPOPOLISACARIDO Y
EL GALACTOMANANO EN UN MODELO DE ALOTRASPLANTE
VASCULARIZADO COMPUESTO DE EXTREMIDAD
POSTERIOR EN RATAS**

Memoria presentada por Mónica Rubio Yanchuck

Directores

Jorge Bonastre Juliá

Juan Carlos Rubio Suárez

2021



FACULTAD DE MEDICINA. DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

El DR. JORGE BONASTRE JULIÁ, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Cirugía Plástica y Quemados del Hospital Universitario La Paz, como codirector;

El DR. JUAN CARLOS RUBIO SUÁREZ, Jefe de Sección de Fracturas del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario La Paz, como codirector;

El DR. CÉSAR CASADO SÁNCHEZ, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y facultativo especialista de Área del Servicio de Cirugía Plástica y Quemados del Hospital Universitario La Paz, como tutor;

HACEN CONSTAR que Dña. MÓNICA RUBIO YANCHUCK, ha elaborado bajo su dirección la Tesis Doctoral titulada “Efecto inmunomodulador del lipopolisacárido y el galactomanano en un modelo de alotrasplante vascularizado compuesto de extremidad posterior en ratas”, con la finalidad de proceder a su lectura y defensa, una vez concluida al cumplir las exigencias académicas pertinentes.

Fdo.: Dr. Juan Carlos Rubio Suárez

Fdo.: Dr. Jorge Bonastre Juliá

Fdo.: Dr. César Casado Sánchez

A Javier, mi marido.

A nuestra hija Sofia.

*“El trabajo se expande hasta llenar el
tiempo disponible para que se termine”*

Cyril Northcote Parkinson

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido mucho esfuerzo y dedicación por parte de la autora, no hubiese sido posible sin la ayuda desinteresada de todas y cada una de las personas que me han acompañado en este reto, que han hecho posible la culminación de este trabajo de investigación.

Al Dr. Jorge Bonastre, por su apoyo, por las largas conversaciones, por las lecciones aprendidas y por su apoyo incondicional desde el inicio del proyecto. Ha sido un ejemplo a seguir y volvería a embarcarme en este proyecto con él.

A mi padre, el Dr. Juan Carlos Rubio, por su apoyo, paciencia, orientación, dirección y ánimo en todo el desarrollo del trabajo. Quiero reflejar el orgullo que representa tener un referente tan importante no solo en la esfera personal, sino en la profesional, así como en lo que se refiere al ámbito académico.

Al Dr. César Casado Sánchez, por sus consejos, sus dosis de realidad que a día de hoy tengo presentes y por estar ahí siempre que lo he necesitado.

Al Dr. César Casado Pérez, por sus lecciones que me han formado como profesional, siendo un ejemplo diario, así como por haberme animado a seguir avanzando en este trabajo de investigación.

A la Dra. Carlota Largo Aramburu, por sus lecciones sobre anestesia y cuidado en el manejo de las ratas y, por ayudarme a conseguir un modelo que pudiera soportar el posoperatorio manteniendo la isla cutánea sin peligro de dañarse el trasplante.

Al Dr. Eduardo López Collazo y a su equipo, por ayudarme a sacar adelante el proyecto y prestarme toda su infraestructura, así como aclarar las dudas sobre

inmunología y ciencias básicas que han ido surgiendo a lo largo del presente estudio. Especialmente quiero agradecer a Víctor Toledano todo el esfuerzo realizado ya que sin él no hubiera sido posible el desarrollo del proyecto.

Al equipo de la Dra. Mayte Vallejo, por ayudarme con el procesado histológico de las muestras y por toda la información y conocimientos que me han aportado.

A todos mis compañeros residentes en su momento, que me han ayudado en la monitorización de los animales durante el posoperatorio.

Por último, y no menos importante, a Javier, mi marido, por apoyarme en cada una de las etapas de la realización de esta tesis, por animarme a seguir cuando no veía salida, y por darme fuerzas para sacar el trabajo adelante. Así mismo, quiero reflejar el apoyo incondicional que he recibido de mi madre, Marta, y mi hermano, Juan; me han acompañado en este largo camino y han estado presentes ante la mínima necesidad que requiriese el desarrollo de la tesis.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	1
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Nomenclatura.....	11
1.2. Marco histórico	12
1.3. Epidemiología.....	18
1.3.1 Estadística internacional.....	18
1.3.2 Estadística nacional	22
1.4. Inmunología de los trasplantes.....	25
1.4.1 Antígenos implicados en el rechazo del trasplante.....	25
1.4.2 Respuesta inmune y rechazo	29
1.4.3 Regulación del rechazo por citoquinas.....	36
1.4.4 Rechazo agudo.....	42
1.4.5 Inmunosupresión	51
1.5. Tolerancia inmunitaria.....	56
1.5.1 Concepto.....	56
1.5.2 Modelos de tolerancia clínica y experimental	59
1.6. Inmunomodulación: Tolerancia a endotoxina	70

1.6.1	Fisiopatología	72
1.6.2	Mecanismos moleculares.....	75
1.6.3	Lipopolisacárido	79
1.6.4	Galactomanano	82
2.	HIPÓTESIS	87
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	89
3.1.	Protocolo quirúrgico experimental	89
3.1.1.	Extracción del aloinjerto.....	92
3.1.2.	Técnica quirúrgica en el animal receptor	93
3.1.3.	Protocolo de curas	96
3.1.4.	Protocolo de inmunosupresión	97
3.1.5.	Valoración clínica del rechazo agudo del aloinjerto	97
3.1.6.	Valoración de la Enfermedad Injerto contra Huésped.....	98
3.1.7.	Toma de muestras y protocolo de extracción	99
3.2.	Análisis del bienestar animal	99
3.3.	Estudio histológico	100
3.3.1.	Procesamiento de las muestras	100
3.3.2.	Gradación del episodio de rechazo agudo	100
3.3.3.	Valoración cuantitativa del infiltrado leucocitario muscular	101
3.4.	Citometría de flujo en sangre periférica	101
3.5.	Medición de niveles de citoquinas.....	101

3.6.	Análisis estadístico	102
4.	RESULTADOS.....	105
4.1.	Resultados del protocolo quirúrgico experimental	105
4.2.	Supervivencia del aloinjerto	109
4.3.	Análisis del bienestar animal	110
4.4.	Resultados histológicos.....	112
4.4.1.	Gradación del episodio de rechazo agudo	112
4.4.2.	Valoración cuantitativa del infiltrado leucocitario muscular	116
4.5.	Citometría de flujo en sangre periférica	119
4.6.	Niveles de expresión de citoquinas.....	123
5.	DISCUSIÓN.....	127
5.1.	Limitaciones del estudio	148
6.	CONCLUSIONES.....	151
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	153
8.	ANEXOS	203
8.1.	Premio derivado de la presente tesis	203
8.2.	Beca concedida de la presente tesis	203
8.3.	Publicaciones derivadas de la presente tesis.....	203
8.4.	Comunicaciones a congresos derivadas de la presente tesis.....	204
8.5.	Notas, permisos y derechos de autor	204

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1: Tipos de AVC llevados a cabo desde 1964 hasta la 2020.	19
Figura 2: Registro Internacional de trasplante de miembro superior.	20
Figura 3: Registro Internacional de trasplante facial.....	20
Figura 4: Reconocimiento antigénico. Vías directa e indirecta.	33
Figura 5: Imagen representativa de microscopia óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de biopsias de piel de un animal de grupo control que ha sufrido RA.	36
Figura 6: Protocolos de tolerancia no mieloablativos	63
Figura 7: Mecanismos moleculares de la TE.....	78
Figura 8: Reconocimiento y vías de transducción de LPS..	80
Figura 9: Estructura y localización del GAL. A. Estructura de la unidad de repetición del GAL.....	83
Figura 10: Escala de muecas para roedores (Grimace scale).	91
Figura 11: Extracción del aloinjerto	93
Figura 12: Animal receptor.....	94
Figura 13: Animal receptor.....	96
Figura 14: Animal receptor.....	98
Figura 15: Úlcera por decúbito en el trasplante.....	106
Figura 16: Complicaciones.....	107

Figura 17: Complicaciones intra y posoperatorias.	107
Figura 18: Tiempo de supervivencia de los trasplantes de extremidad posterior en los grupos I a IV	109
Figura 19: Variación del peso entre grupos. Evolución temporal del peso de los animales de cada grupo durante las semanas posteriores al trasplante.....	111
Figura 20: Variación del peso entre los grupos.	112
Figura 21: Imagen representativa de microscopia óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de biopsias de piel de un animal de grupo control que ha sufrido RA grado III según la clasificación de Banff.....	113
Figura 22: Imagen representativa de microscopia óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de biopsias de piel de un animal del grupo III que ha sufrido RA grado I según la clasificación de Banff.	114
Figura 23: Imagen representativa de microscopia óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de biopsias de piel de un animal del grupo II que han sufrido RA grado I según la clasificación de Banff.....	114
Figura 24: Imagen representativa de microscopia óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de biopsias de piel de un animal del grupo IV que ha sufrido RA grado I según la clasificación de Banff.	115
Figura 25: Representación en boxplot de las comparaciones entre los diferentes grupos en cuanto a la mediana en la clasificación de Banff 2007 (* $p < 0,05$).....	115
Figura 26: Imagen representativa de microscopía óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de una biopsia muscular de una rata del grupo II que ha sufrido rechazo agudo.	117

Figura 27: Imagen representativa de microscopía óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de una biopsia muscular de una rata grupo control que ha sufrido rechazo agudo..	117
Figura 28: Imagen representativa de microscopía óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de una biopsia muscular de una rata del grupo IV que ha sufrido rechazo agudo.	118
Figura 29: Imagen representativa de microscopía óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de una biopsia muscular de una rata del grupo III que ha sufrido rechazo agudo.	118
Figura 30: Representación en boxplot de las comparaciones entre los diferentes grupos en cuanto a la mediana en la gradación semicuantitativa del infiltrado leucocitario muscular (* p<0,05).	119
Figura 31: Representación mediante diagramas de dispersión del análisis de linfocitos T CD3+ en los diferentes grupos, medidos en sangre periférica en el día 7 postoperatorio, empleando citometría de flujo.	120
Figura 32: Representación mediante diagrama de barras de la evolución temporal de los porcentajes de linfocitos T (CD3+) durante las semanas posteriores al trasplante	120
Figura 33: Representación mediante diagrama de barras del porcentaje total de células con CMH-I de la rata Brown Norway (quimerismo) en la sangre periférica del animal receptor en las semanas posteriores al trasplante.	122
Figura 34: Representación mediante diagrama de barras del porcentaje total de células T con CMH-I CD4+ de rata Brown Norway en sangre periférica del animal receptor (**p<0,001).	122

Figura 35: Representación mediante diagrama de barras del porcentaje total de células T con CMH-I CD8 ⁺ de rata Brown Norway en sangre periférica del animal receptor (**p<0,001).	123
Figura 36: Progresión de los niveles TNF-α en plasma durante el estudio (*p<0,005).	124
Figura 37: Progresión de los IFN-γ en plasma durante el estudio (*p<0,005, **p<0,001).	125

TABLAS

Tabla 1: Criterios que definen el Alotrasplante Vascularizado Compuesto. OPTN (42 CFR 121.1)	12
Tabla 2: Clasificación de Banff 2007 para los AVC. RA: rechazo agudo	49
Tabla 3: Esquema de los grupos de experimentación. CsA: ciclosporina A. RA: rechazo agudo.	89
Tabla 4: Comparación entre las complicaciones quirúrgicas y los tiempos quirúrgicos y los tiempos de la microcirugía.....	108
Tabla 5: Tiempo de supervivencia de los trasplantes de extremidad posterior en los grupos I a IV.....	110

ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- AED: anticuerpos con especificidad para el donante.
- ALS: del inglés, *antilymphocyte serum*; suero antilinfocítico.
- ARN: ácido ribonucleico.
- ARN_{lnc}: ácido ribonucleico no codificante grande.
- ARN_m: ácido ribonucleico mensajero.
- ARN_{nc}: ácido ribonucleico no codificante.
- ATP: adenosín trifosfato.
- AVC: alotrasplante vascularizado compuesto.
- AZA: azatioprina.
- CARS: del inglés, *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome*; Síndrome de Respuesta Antiinflamatoria de Compensación.
- Células NK: del inglés, *natural killer*; asesino natural.
- Células T_h: células T helper.
- Células T_{reg}: células T reguladoras.
- CIITA: del inglés, *Class II transactivator*; transactivador clase II.
- CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.
- CPA: célula presentadora de antígenos.
- CsA: ciclosporina A.
- CTLA4-Ig: del inglés, *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*; antígeno 4 de linfocito T citotóxico.
- DAMPs: del inglés, *danger associated molecular patterns*; patrones moleculares asociados a peligro.

- DASH: del inglés, *disabilities of the arm, shoulder and hand*; discapacidades del hombro, codo y mano.
- EEUU: Estados Unidos de América.
- EICH: Enfermedad Injerto Contra Huésped.
- Fc: fracción constante de los anticuerpos.
- H-E: hematoxilina – eosina.
- HLA: del inglés, *human leukocyte antigen*; antígeno leucocitario humano.
- HMGB1: del inglés, *chromatin-associated protein high-mobility group box 1*; proteína de alta movilidad del grupo 1 asociada a la cromatina.
- Ig: inmunoglobulina.
- IL: interleuquina.
- INF: interferón.
- INF- γ : interferón gamma.
- IRAK-M: del inglés, *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase M*; Kinasa asociada al receptor de IL-1.
- IRF3: del inglés, *Interferon Regulatory Factor 3*; Factor 3 de regulación del interferón.
- KDa: kilodaltons.
- LBN RT1ⁿ: rata Lewis Brown-Norway.
- LEW RT1^l: rata Wistar-Lewis.
- LPS: Lipopolisacárido.
- MAPK: del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinase*; proteína quinasa activada por mitógenos.
- MARCO: de inglés, *Macrophage receptor with collagenous structure*; receptor de macrófago con estructura de colágeno.

- MMF: micofenolato mofetilo.
- mTOR: del inglés, *mammalian target of rapamycin*; diana de la rapamicina de los mamíferos.
- MyD88: del inglés, *Myeloid differentiation 88*; factor de diferenciación mieloide 88.
- NF-AT: del inglés, *nuclear factor AT*; factor nuclear-AT.
- NF-kB: del inglés, *nuclear factor-kappa B*; factor nuclear kappa B.
- OPTN: del inglés, *Organ Procurement and Transplantation Network*; Red de Adquisición y Trasplante de Órganos.
- PAMPs: del inglés, *Pathogen-Associated Molecular Patters*; patrones moleculares asociados a patógenos.
- RA: rechazo agudo.
- RCT: receptor de células T.
- RRP: receptores de reconocimiento de patrones.
- S.C: vía subcutánea.
- SIRS: del inglés, *Systemic Inflammatory Response Syndrome*; Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.
- SSF: suero salino fisiológico.
- Tac o FK-506: tacrolimus.
- TE: tolerancia a endotoxina
- TGF- β : del inglés, *transforming growth factor beta*; factor de crecimiento tumoral β .
- TIR: del inglés, *Toll/Il-1 Receptor*; receptor Toll/IL-1.
- TLR: del inglés, *Toll Like Receptor*; receptor tipo Toll.
- TMO: trasplante de medula ósea.

- TNF: en inglés, *tumor necrosis factor*; factor de necrosis tumoral.
- TOS: trasplante de órgano sólido.
- TREM-1: del inglés, *Triggering receptors expressed on myeloid cell 1*; receptors de activación expresados en células mieloides 1.
- TRIF: del inglés, *TIR domain-containing adapter protein inducing IFN-beta*; proteína adaptadora que contiene el dominio TIR que induce INF- β .
- TTC: trasplante de tejido compuesto.
- VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

RESUMEN

El principal obstáculo para el desarrollo del alotrasplante vascularizado compuesto es la necesidad de inmunosupresión a largo plazo, con sus efectos adversos asociados, en pacientes que no se encuentran en una situación de riesgo vital. La tolerancia a endotoxina es un mecanismo de autorregulación de las células del sistema inmunitario innato, cuando se exponen a lipopolisacárido (LPS). Sin embargo, la morbilidad asociada con la reacción inflamatoria inicial del LPS no es asumible en la práctica clínica. Los análogos de LPS como el galactomanano (GAL) producen tolerancia a endotoxina in vitro, pero con una respuesta inflamatoria menor. Nuestra hipótesis es que la administración de LPS o GAL retrasaría el rechazo agudo del trasplante a través del mecanismo de tolerancia a la endotoxina.

Material y métodos: se realizaron veinticuatro trasplantes de miembros posteriores de rata cruzando el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (de rata Brown-Norway como donante a rata Wistar-Lewis como receptora). Previamente los animales se dividieron en 4 grupos (n=6/grupo) según el precondicionamiento que recibieron: control (suero salino fisiológico), LPS (0,16 ml/Kg), GAL 72 horas antes (8 ml/Kg), y con GAL 24 horas antes (8 ml/Kg). Se controló la mediana del tiempo hasta la aparición de un episodio de rechazo agudo. La pérdida de peso y los episodios de diarrea se definieron como complicaciones. Se recogieron muestras de sangre periférica el día de la cirugía y a los 7, 21, 30, 45 y 60 días postrasplante para analizar los niveles de citoquinas en plasma, el quimerismo periférico del receptor, el porcentaje de linfocitos y sus subconjuntos.

Resultados: El grupo control tuvo una mediana de supervivencia del aloinjerto de 40 (44-40) días, mientras que en el grupo LPS fue de 68 (71-61) días y en ambos grupos GAL de 70 (73-69) días ($p=0,001$). El grupo precondicionado con LPS presentó una tasa de episodios diarreicos del 83,3 %, significativamente superior a los demás grupos (control 0 %, $p=0,015$; GAL-72 0 %, $p=0,015$; y GAL-24 16,7 %, $p=0,02$). Hubo una pérdida de peso significativa en el grupo LPS ($p<0,001$). Los grupos precondicionados presentaron mayor quimerismo de sangre periférica (LPS $2,30\% \pm 0,13\%$, GAL-72 $2,63\% \pm 1,46$ y GAL-24 $2,47\% \pm 0,19\%$) en comparación con el grupo control ($2,06\% \pm 0,36\%$) ($p=0,04$, LPS, $p=0,002$, GAL-72 y $p=0,002$, GAL-24).

Conclusiones: La inducción de tolerancia a endotoxina retrasa el rechazo agudo del aloinjerto en el modelo de trasplante de miembro posterior en rata. El precondicionamiento con GAL no tiene los efectos secundarios del LPS y no se encontraron diferencias en el tiempo transcurrido hasta el rechazo entre ambos grupos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.Nomenclatura

El trasplante de estructuras corporales, compuestas por múltiples tejidos derivados de ectodermo y mesodermo, es conocido como trasplante de tejido compuesto (TTC). Este término fue acuñado por los doctores Harold E. Kleinert y Erle E. Peacock a partir de su estudio de reconstrucción del sistema flexor mediante el empleo de aloinjertos de tendón, que fueron llevados a cabo sin necesidad de inmunosupresión y vascularizados directamente desde su lecho (1).

La evolución y el progreso en el campo de la microcirugía e inmunología ha permitido ampliar las indicaciones del trasplante a estructuras cada vez más complejas tales como la mano, la cara, la laringe, las articulaciones, la pared abdominal, el útero, el pene y las extremidades inferiores. Sin embargo, su supervivencia, al contrario que en el modelo del sistema flexor, sí depende de la anastomosis vascular y de la inmunosupresión administrada. Por todo esto, durante la segunda reunión del comité de Alotrasplantes de Tejidos Compuestos celebrada en enero de 2013 (“*The Evolution of Reconstruction*”, de la Sociedad Europea de Trasplantes de Órganos), se propuso adaptar la definición y establecer una regulación de este término pasando de TTC a Alotrasplante Vascularizado Compuesto (AVC) (2). El 3 de julio de 2014, la Red de Adquisición y Trasplante de Órganos (OPTN, del inglés *Organ Procurement and Transplantation Network*), asumió la responsabilidad de desarrollar una regulación a nivel político para los AVCs. Tal como establece la última cláusula de la OPTN (42 CFR 121. 2), existen 9 criterios que definen el AVC (ver *Tabla 1*). Debe estar constituido por diferentes tipos de tejidos y estar vascularizado a través de una anastomosis microquirúrgica. Además, debe ser susceptible

a la isquemia, conservándose sólo de forma temporal y debe ser susceptible al rechazo requiriendo inmunosupresión para sobrevivir (3).

1. Vascularizado a través de anastomosis quirúrgica.
2. Constituido por diferentes tejidos.
3. Procedente de donante humano, como una unidad anatómica/estructural.
4. Trasplantado a un receptor humano como una unidad anatómica/estructural.
5. Mínimamente manipulado (el procedimiento no debe alterar las características del órgano trasplantado).
6. Uso homólogo (debe cumplir las mismas funciones básicas en el receptor que en el donante).
7. No puede combinarse con otros artículos, como dispositivos mecánicos (prótesis, etc).
8. Susceptible a isquemia y por tanto solamente puede ser almacenado de forma temporal y no criopreservado.
9. Susceptible a rechazo, requiriendo inmunosupresión.

Tabla 1: Criterios que definen el Alotrasplante Vascularizado Compuesto. OPTN (42 CFR 121.1)

1.2.Marco histórico

La leyenda del siglo XV de los santos Cosmos y Damián, quienes reemplazaron la pierna de un hombre que sufría gangrena por la de otro hombre fallecido, se considera popularmente como el primer caso de un AVC (4). De hecho, podríamos decir que el AVC fue el objetivo inicial del trasplante. Durante la segunda guerra mundial, cientos de soldados ingleses sufrieron quemaduras graves. La reconstrucción de estos defectos fue el estímulo que condujo al biólogo Sir Peter Medawar, junto al cirujano plástico Thomas

Gibson, a comenzar su investigación para el tratamiento de estos pacientes con aloinjertos cutáneos. El inevitable rechazo de éstos, promovió el desarrollo de los primeros estudios de inmunología en el trasplante (5). Así, Joseph Murray (cirujano plástico) y su equipo, lograron realizar el primer trasplante renal entre gemelos dicigóticos en 1959 (6). Los avances en el campo de los fármacos inmunosupresores a principios de los años 60 permitieron después el éxito del primer trasplante renal procedente de un donante fallecido (7).

Posteriormente, en Ecuador en el año 1964, el equipo liderado por el cirujano Robert Gilbert realizó el primer intento de AVC (8). Se llevó a cabo un trasplante de mano unilateral de donante cadáver a un paciente con una amputación bilateral secundaria a una explosión, utilizando la misma inmunosupresión empleada hasta la fecha para el trasplante de órgano sólido (TOS) (azatioprina (AZA) y prednisona). Lamentablemente el paciente sufrió un episodio de rechazo agudo (RA) a las 3 semanas requiriendo la amputación del aloinjerto (9).

Los avances en la medicación inmunosupresora a partir de los años 60, han permitido un rápido desarrollo en el campo de los TOS. Sin embargo, este progreso no ha sido extrapolable a los AVCs, debido fundamentalmente a la presencia de uno de los tejidos más inmunogénicos que existen entre sus componentes: la piel (10). El desarrollo de nuevos inmunosupresores como los inhibidores de la calcineurina o los agentes antiproliferativos como el micofenolato de mofetilo (MMF), han permitido el éxito del AVC en modelos animales, como paso previo a la aplicación en la práctica clínica (11).

En 1988, el doctor Marshal Strome y su equipo realizaron el primer trasplante laringotraqueal a nivel mundial en Cleveland (Ohio, Estados Unidos (EEUU)). El receptor había sufrido una pérdida de la laringe de origen traumático hacía 20 años. La cirugía consistió en el trasplante de las estructuras traqueo-faríngeas, incluyendo las

glándulas tiroideas y paratiroides. Los resultados funcionales así como la satisfacción del paciente fueron excelentes, con recuperación completa de la deglución y timbre de la voz (12).

Entre los primeros casos de AVC también se encuentran los trasplantes vascularizados de rodilla, fémur y musculatura asociada llevados a cabo por el equipo de los doctores Gunther Olaf Hofmann y Martin Hartwig Kirchner en 1996 en Munich (Alemania). Tres fueron trasplantes para defectos segmentarios de fémur y 6 fueron aloinjertos de rodilla completa vascularizados (13). Inicialmente todos los casos tuvieron éxito pero ninguno sobrevivió a largo plazo (14).

Tras el fracaso del primer trasplante de mano, el siguiente trasplante publicado se realizó en Lyon (Francia) en 1998 por el equipo liderado por el Doctor Earl Owen en colaboración con el Doctor Jean-Michel Dubernard (15). El receptor fue un paciente neozelandés que sufrió una amputación unilateral de la mano en un accidente de prisión. Sin embargo, tras el éxito inicial, el paciente abandonó la rehabilitación y no fue constante con el cumplimiento terapéutico del régimen inmunosupresor, lo que culminó en un episodio de rechazo. En 2001, el paciente solicitó la amputación de la mano trasplantada (16). Unos meses después de realizar este trasplante en Francia, se publicó el primer trasplante de mano en Louisville (Kentucky, EEUU) en enero de 1999, realizado por el equipo liderado por el Doctor Warren C. Breidenbach (17). Al contrario del anterior, en este caso el paciente fue cuidadosamente seleccionado mediante evaluación psicológica así como una adecuada preparación sociofamiliar. Esto permitió una adecuada rehabilitación, un cumplimiento riguroso del régimen inmunosupresor y un correcto seguimiento, convirtiéndose en el primer trasplante de mano más longevo en la actualidad (3). El primer trasplante bilateral de miembros superiores se realizó en el año 2000 por el equipo del Doctor Jean-Michel Dubernard en Lyon (Francia) (18). Hasta la fecha, se han

llevado a cabo más de 100 trasplantes de miembro superior a nivel mundial, con una significativa mejoría en la calidad de vida por parte de sus pacientes (19,20). En concreto, los datos aportados tras la revisión sistemática llevada a cabo por Landín et al, confirman una mejoría del resultado funcional respecto a la puntuación preoperatoria del test de discapacidad para brazo, hombro y mano (DASH, del inglés *Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand*) de 27,6 ($\pm 19,04$) puntos tras el trasplante ($p= 0,005$)(20). En otra revisión reciente, se observó además que la mayoría de los pacientes adquirían sensibilidad protopática y algunos, principalmente aquéllos con trasplantes más distales, adquirieron una discriminación entre dos puntos, medida mediante la prueba de Semmes-Weinstein (21). Aunque los resultados en cuanto a fuerza y movilidad son inconsistentes debido a la variedad de técnicas y escalas empleadas en cada caso, se observó que la mayoría de los pacientes consiguieron realizar actividades básicas de la vida diaria como vestirse, conducir, montar en bicicleta, coger objetos pequeños, abrocharse la ropa y volver a tener un empleo (21).

En el año 2000 el equipo del doctor Wafa Faggeeh realizó el primer trasplante de útero en el hospital Rey Fahad en Jedahh (Arabia Saudí), a una mujer de 26 años que lo había perdido por una hemorragia durante una cesárea. El trasplante inicialmente fue bien, llegando a tener 2 menstruaciones, pero a los 99 días posoperatorios desarrolló una trombosis vascular del pedículo secundario a un aparentemente inadecuado soporte estructural que causó su acodamiento, por lo que tuvo que ser retirado (22). En 2011 se publicó el segundo trasplante de útero realizado por el equipo del doctor Omer Ozkan en el hospital de la Universidad del Mediterraneo en Antalya (Turquía) procedente de una donante fallecida. Nueve años después y tras varios abortos la paciente dio a luz a su primer hijo (23,24). El éxito de este tipo de alotrasplante viene dado por la ausencia de rechazo durante más de 3 meses y por la recuperación de su función, determinada por la

presencia de ciclos menstruales durante un año y conseguir posteriormente un embarazo a término viable (25). En 2014 tuvo lugar el primer nacimiento tras trasplante de útero de una donante viva en el Hospital Universitario de Sahlgrenska de Suecia dirigido por el doctor Mats Brännström (26). Por lo tanto, éste es considerado el primer trasplante de útero con éxito (25,27).

El alotrasplante de pared abdominal consiste en la transferencia de la unidad de músculo recto abdominal con la arteria epigástrica inferior profunda como pedículo vascular. El primer caso se realizó en 2001 por el equipo de los doctores David M. Levi y Andreas G. Tzakis en Miami (Florida, EEUU), con excelentes resultados en cuanto a cobertura visceral (28).

En 2003, el equipo del doctor Rolf Ewers en Viena (Austria), realizó el primer trasplante de lengua tras la resección de la misma por un carcinoma epidermoide. Sin embargo, el éxito inicial se truncó por la recurrencia tumoral y el posterior fallecimiento del receptor (29).

Más tarde, en 2005, el equipo de los doctores Jean Michel Devauchelle y Bernard Dubernard, realizó el primer trasplante facial parcial del mundo en Amiens (Francia) (30). El primer trasplante facial total se llevó a cabo en Barcelona (España) por el equipo del doctor Joan Pere Barret en 2010 (31). En general, los resultados publicados muestran una recuperación progresiva de la sensibilidad y de la función motora permitiendo gran mejoría en la competencia oral, el habla, la expresión facial y la reintegración social (32). A pesar de que se ha sido objeto de debate permanente, se han realizado numerosos trasplantes faciales en pacientes con antecedentes de intentos de suicidio (a menudo como mecanismo de lesión facial) (33). Por ello, y aunque se han publicado buenos resultados funcionales, es fundamental el seguimiento a largo plazo con un constante apoyo psicosocial, hecho que se refuerza por el suicidio de uno de los receptores a los 36 meses

del postoperatorio (34). En última instancia, el objetivo es poder predecir el incumplimiento terapéutico, confirmar que el paciente no está psicótico o deprimido en el momento de la selección y asegurarse de que exista un sólido sistema de apoyo psicosocial.

Un año después, en 2006, un equipo del Hospital General de Guangzhou (China) encabezado por el doctor Weilie Hu, realizó el primer trasplante de aparato genitourinario masculino en China. Sin embargo, no se consideró como un éxito de AVC ya que tuvo que ser explantado a los 14 días posoperatorios, debido al rechazo psicológico por parte del paciente y su mujer (35). Hubo que esperar hasta 2014 para obtener un trasplante de pene con éxito por parte del equipo del doctor Andre Van der Merwe en Ciudad del Cabo (Sudáfrica), que actualmente presenta una función urinaria y sexual completas (36).

El equipo del doctor Ronald Zuker en Ontario (Canadá) realizó en 2006 el primer trasplante de extremidad inferior. Se trasplantó la extremidad inferior derecha completa entre gemelos isquiópagos de 3 meses de edad. Había 3 extremidades inferiores compartidas entre éstos. El gemelo donante falleció a causa de una insuficiencia cardíaca inoperable, proporcionando al gemelo receptor 2 piernas normales. Actualmente, el paciente camina con muletas debido a una disimetría de aproximadamente 6 cm. Presenta sensibilidad epicrítica y protopática en toda la extremidad, aunque disminuida de forma generalizada respecto a la extremidad contralateral. El rango de movilidad pasivo es prácticamente completo y presenta un rango de movilidad activo grado 3-4 en la flexión de cadera, extensión y flexión de rodilla así como extensión de primer dedo de pie; sin embargo, carece de fuerza para la flexión plantar y dorsal del tobillo (37). En 2011 el equipo del doctor Pedro Cavadas en Valencia (España), llevó a cabo el primer trasplante bilateral de extremidades inferiores. El paciente había sufrido una amputación traumática de ambos miembros inferiores por encima de la rodilla 2 años antes. Tras un año

postoperatorio el paciente estaba deambulando con carga parcial, presentaba un rango de movilidad pasiva de ambas rodillas completo y 35 y 40 grados de extensión activa de la rodilla derecha e izquierda respectivamente. El signo de Tinel avanzó hasta el nivel plantar en ambos miembros. Desafortunadamente, a los 2 años posoperatorios el paciente desarrolló un linfoma cerebral tras recibir dosis altas continuadas de inmunosupresión, que obligó a suspender la medicación inmunosupresora, resultando en rechazo y con ello, la retirada de los trasplantes (38).

1.3.Epidemiología

1.3.1 Estadística internacional

Desde el primer intento de trasplante de miembro superior en 1964, se han registrado 293 AVC. Además de los trasplantes de miembro superior y facial, que son los que con mayor frecuencia se han realizado, el campo del AVC ahora también abarca el trasplante de pared abdominal, laringe, miembro inferior, lengua, y más recientemente los trasplantes de útero y pene (19,27,33,39–43) (ver *Figura 1*).

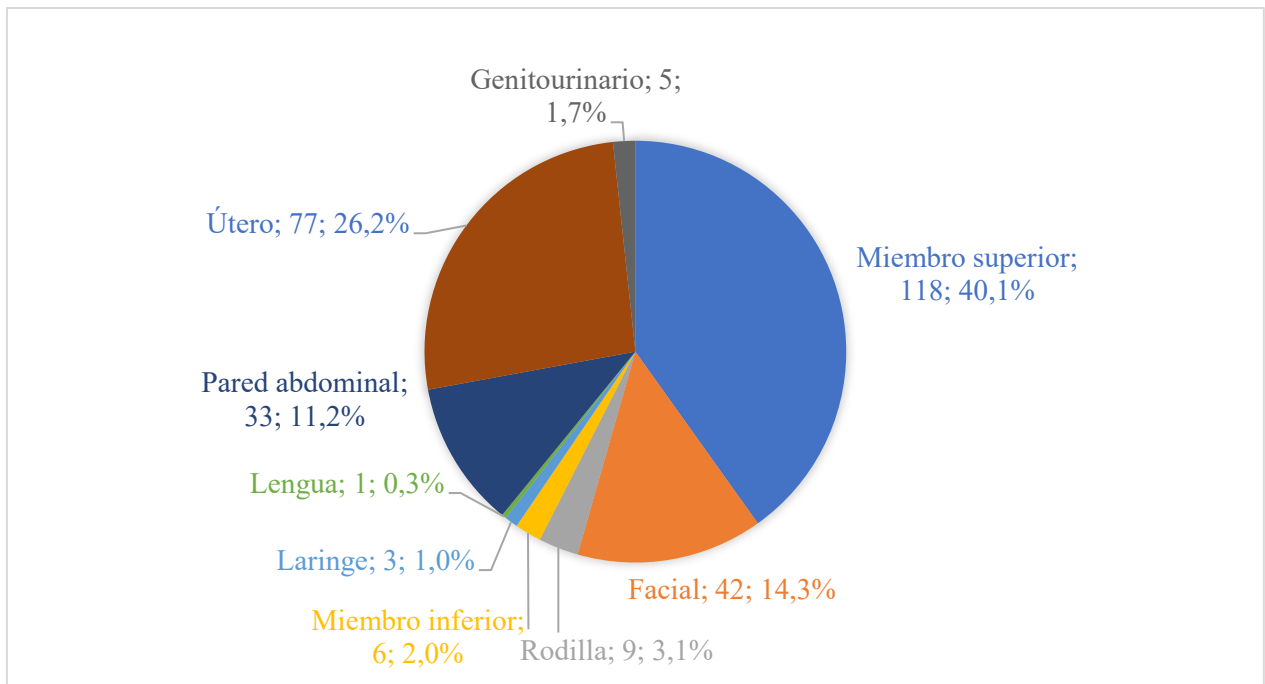


Figura 1: Tipos de AVC llevados a cabo desde 1964 hasta la 2020 (expresado en número absoluto y porcentaje).

Según el Registro Internacional de AVC, hasta la fecha se ha intervenido a 74 pacientes de trasplante de miembro superior, siendo 31 casos unilateral (20 derecho y 11 izquierdo) y 43 bilaterales. Es el tipo de AVC que más se ha llevado a cabo hasta la actualidad (47,4 % de total de AVC), probablemente debido a la mayor frecuencia de amputaciones traumáticas de miembros superiores respecto a otras áreas anatómicas y la repercusión funcional que conllevan en individuos generalmente jóvenes. Respecto al trasplante facial, se han registrado 42 casos desde 2005 hasta 2019, de los cuales 18 fueron totales, entendiéndose como tal, el trasplante no solo de tejidos blandos, sino también de estructuras orales y componentes óseos.

A pesar de todos los procedimientos realizados hasta la fecha, y de la importante financiación para la investigación sobre la mejora en seguridad, eficacia y aplicabilidad de los AVC, se ha observado una tendencia decreciente en los últimos años del número total de casos de trasplante de miembro superior y facial (ver Figuras 2 y 3) (33,39). La falta de comprensión en áreas de riesgo inmunosupresor, la dificultad en la adherencia rigurosa a los medicamentos y a la rehabilitación, y los problemas psicosociales que conllevan este tipo de trasplantes, pueden ser explicaciones plausibles de esta tendencia.

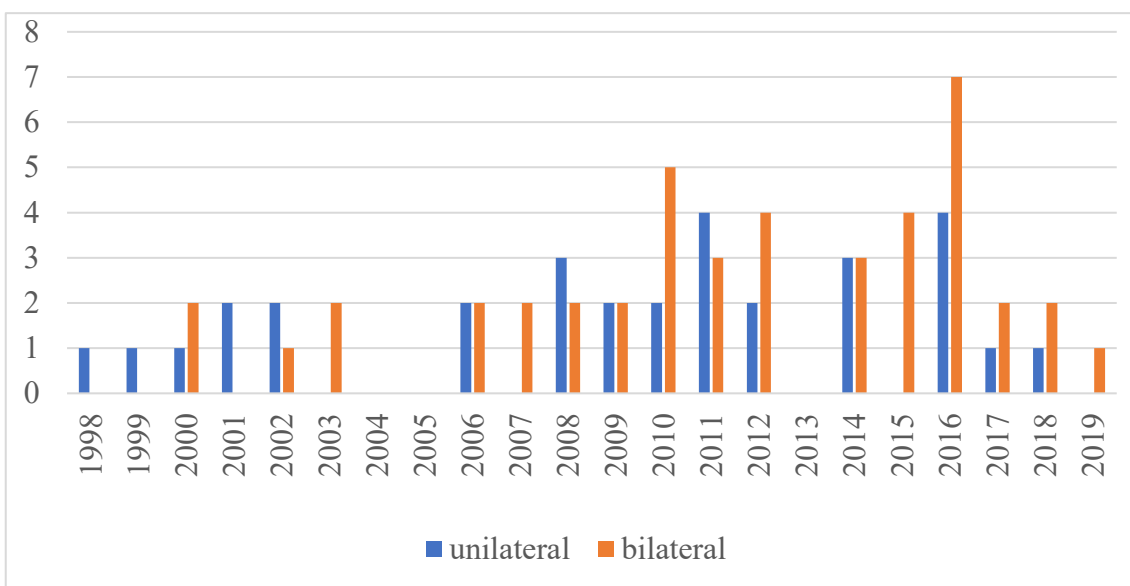


Figura 2: Registro Internacional de trasplante de miembro superior.

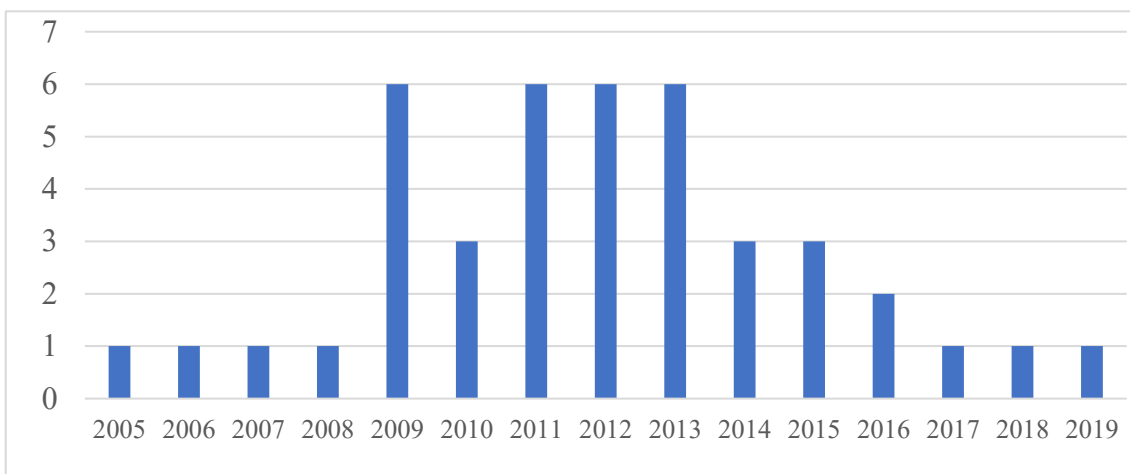


Figura 3: Registro Internacional de trasplante facial.

Hasta la fecha se han registrado 4 pacientes intervenidos de trasplante de miembros inferiores (2 unilaterales y 2 bilaterales) de los cuales sólo ha tenido éxito el trasplante unilateral llevado a cabo entre siameses isquiópagos en Canadá en 2006. El segundo trasplante de este tipo fue bilateral y se realizó en España en 2011, ya comentado previamente (ver página 20). El tercero de este grupo, fue el primer triple trasplante del mundo (miembro superior derecho y los 2 miembros inferiores) y se realizó en Turquía en 2012. Sin embargo, el paciente falleció a los 5 meses por complicaciones infecciosas. El cuarto y último caso, fue el primer trasplante cuádruple de extremidades y también se llevó a cabo en Turquía en 2012. El paciente falleció el 4º día posoperatorio tras hemodiálisis continua y transfusión masiva (200 unidades de concentrados de hematíes). Desde entonces no se ha vuelto a registrar ningún trasplante de extremidad inferior hasta la fecha (40).

Desde 1998, se han publicado 3 casos de trasplante laringotraqueal completos. El primero tuvo éxito inicialmente, pero las funciones se perdieron al sufrir el aloinjerto un episodio de rechazo crónico. En los otros 2 casos se consiguió una mejoría en la calidad de vida en cuanto a fonación, respiración y deglución por parte de ambos pacientes (41,44).

Cuatro de los 5 trasplantes genitourinarios registrados a nivel mundial han tenido éxito. En 2006, se realizó el primer trasplante de pene en China, pero fue explantado el día 14 posoperatorio por motivos psicológicos alegados por el propio paciente y su mujer (35). De los restantes casos, 2 tuvieron lugar en Sudáfrica en 2014 y 2017 y los otros 2 en EEUU en 2016 y 2018 (36,45). Todos fueron trasplantes de pene salvo el último que también incluyó el escroto, y la etiología del defecto en todos ellos fue traumática salvo un caso de carcinoma epidermoide. De ellos, 2 han recuperado la función urinaria y sexual de forma completa, y en los otros 2 la evolución es desconocida (42).

Hasta el momento actual se han descrito en la literatura 33 pacientes intervenidos de trasplante de pared abdominal en 7 centros distintos (28,46–50). El objetivo de este tipo de alotrasplante es garantizar la seguridad del cierre de la pared abdominal después de un alotrasplante de órgano visceral. Como se trata de un procedimiento complementario y necesario para la supervivencia del paciente, no hubo tantos inconvenientes de carácter ético, como puede ocurrir con otros AVC como el de mano o el facial. El trasplante de pared abdominal y de órganos sólidos de forma simultánea, ante los resultados hasta la fecha, no parece poner en peligro el resultado del trasplante visceral, pudiendo además el aloinjerto de pared, funcionar como un testigo cutáneo de detección temprana de los episodios de RA (51). Hasta la fecha, el alotrasplante de pared abdominal solo está indicado en pacientes que requieran un trasplante visceral con un compartimento abdominal insuficiente. Sin embargo, las indicaciones podrían extenderse en un futuro a los pacientes con hernias abdominales extensas, lesiones abdominales o malformaciones congénitas (43).

Tras varias publicaciones que describían trasplantes de útero exitosos, pero sin embarazo viable, en 2014 tuvo lugar el primer nacimiento tras trasplante de útero de una donante viva en el Hospital Universitario de Sahlgrenska de Suecia dirigido por el doctor Mats Brännström (22,23,52). Después de esta publicación, varios grupos de todo el mundo iniciaron programas de trasplante de útero incluyendo tanto donantes vivas como fallecidas (25). Hasta la fecha, se han realizado al menos 77 trasplantes con 20 recién nacidos sanos han nacido después de dicho procedimiento (53,54).

1.3.2 Estadística nacional

En España, atendiendo a los datos publicados, se han intervenido 4 pacientes de trasplante de miembro superior, todos ellos bilaterales (21). Los 3 primeros se llevaron a

cabo en el Hospital La Fe de Valencia por el equipo del doctor Pedro Cavadas, y el cuarto en el Hospital La Paz de Madrid por el equipo liderado por el doctor César Casado y coordinado por el doctor Luis Landín. El nivel del trasplante difirió en cada uno de los casos: el primer paciente se trasplantó en el año 2006 a nivel del tercio distal del antebrazo; el segundo en 2007, a nivel del tercio proximal del antebrazo y los 2 últimos en 2008 y 2014, a nivel transhumeral. Todos los pacientes fueron sometidos a intervenciones secundarias para alcanzar una mejoría funcional y estética. Tras un seguimiento mínimo de 2 años, los 3 primeros pacientes alcanzaron una mejoría funcional significativa, con una disminución media en la puntuación del cuestionario DASH de $29,9 \pm 16,86$ puntos respecto a la situación preoperatoria, alcanzaron un grado II en la puntuación de Chen y una puntuación media de $75,83 \pm 3,21$ en el HTSS (del inglés, *Hand Transplant Score System*) (21,55,56). No se han encontrado datos respecto a los resultados funcionales del último trasplante bilateral.

Se han realizado 4 trasplantes faciales en nuestro país. El primero se realizó en 2009 en el Hospital La Fe de Valencia por el equipo del doctor Pedro Cavadas. Se trató de un trasplante parcial de cara para reconstruir un defecto del tercio inferior secundario a las complicaciones de la radioterapia por un carcinoma epidermoide del suelo de la boca en un paciente VIH (*Virus de la Inmunodeficiencia Humana*) positivo. Incluyó el labio inferior, la lengua, el suelo de la boca y la mandíbula. A los 16 meses de la intervención, el paciente ya había recuperado algunas funciones como la deglución y había empezado la rehabilitación para la fonación (57). Sin embargo, falleció a los 3 años de la intervención por una recidiva neoplásica probablemente secundaria a su enfermedad de base y al tratamiento inmunosupresor (33). En 2010 se realizó el segundo trasplante facial en el Hospital Virgen del Rocío en Sevilla por el equipo del doctor Pedro Tomás Gómez-Cía en un paciente con neurofibromatosis. Fue un trasplante parcial que incluyó mejilla,

labios, mentón y mandíbula. A los 6 meses ya presentaba sensibilidad tanto al dolor como a la temperatura y recuperación motora de los músculos buccinador y elevador del labio. Al año había mejorado significativamente la fonación, siendo capaz de lograr una alimentación oral autónoma y logrando la reintegración a su vida social anterior (58,59). En marzo del mismo año, el equipo del doctor Joan Pere Barret realizó en el Hospital Vall d'Hebron (Barcelona) el primer trasplante facial total publicado del mundo a un paciente que había sufrido un accidente balístico. El trasplante estaba constituido por todas las partes blandas de la cara incluidos los párpados junto al aparato lagrimal, la nariz y los labios, las estructuras intraorales y gran parte del esqueleto facial (el cigoma, el maxilar y la mandíbula), constituyendo un trasplante tipo VB de la clasificación de Lengele (31,60). El paciente fue despertado completamente a las 24 horas de la cirugía presentando ventilación espontánea. El día 56 postoperatorio comenzó con dieta líquida progresando a dieta blanda 2 semanas después (10 semanas después de la cirugía). A los 12 meses el paciente había recuperado la sensibilidad completa en todos los territorios faciales, así como la movilidad activa de los músculos, siendo parcial en el lado izquierdo (61). En 2015 se realizó el cuarto y último trasplante facial realizado hasta la fecha en nuestro país, también por el equipo del doctor Barret, pero en este caso el paciente presentaba una malformación arterio-venosa y el trasplante se realizó del tercio inferior de la cara, incluyendo los labios, la lengua, el cuello y la faringe (33).

En 2011 se realizó el primer trasplante de miembros inferiores bilateral en el Hospital La Fe de Valencia por el equipo del doctor Pedro Cavadas. El resultado inicial fue prometedor con mejoría funcional llegando a la deambulación con carga parcial (38). Sin embargo, debido al desarrollo de un linfoma cerebral hubo que suspender la medicación inmunosupresora y con ello, retirar los aloinjertos a los 2 años de la intervención (40).

Por último, el 5 de octubre de 2020 se realizó el primer trasplante de útero en el Hospital Clinic de Barcelona por el equipo liderado por los doctores Francisco Carmona y Antonio Alcaraz. La paciente sufría el síndrome de Rokitansky y el procedimiento fue posible gracias a la donación en vivo del útero de su hermana. A los 2 meses del posoperatorio el trasplante demostró su funcionalidad al haber tenido la receptora su primer ciclo menstrual. El siguiente paso será la implantación de un embrión para demostrar su funcionalidad completa (54).

1.4. Inmunología de los trasplantes

1.4.1 Antígenos implicados en el rechazo del trasplante

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Los principales antígenos implicados en el rechazo del alotrasplante son los del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). En general, se denomina complejo de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA, del inglés *Human Leukocyte Antigen*) ya que inicialmente se pensaba que sólo era expresado por los leucocitos, y su nomenclatura difiere entre diferentes especies: antígeno leucocitario del cerdo (SLA, del inglés *Swine Leukocyte Antigen*), H-2 en ratón y RT1 en rata. Son un conjunto de proteínas codificadas en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3). Los genes del CMH se expresan de forma codominante, con un haplotipo, o conjunto de alelos, heredados de cada progenitor.

Los genes que conforman el CMH se pueden dividir en tres regiones. La región de clase I, que codifica las moléculas de histocompatibilidad de clase I, la región de clase II, que codifica las moléculas de histocompatibilidad de clase II y la región de clase III que codifica una serie de proteínas de características estructurales y funcionales diferentes,

como componentes del complemento (C2, C4 y factor B), citoquinas inflamatorias o proteínas de choque térmico.

La región de la clase I del CMH es la más telomérica y aquí se encuentran los genes en 3 loci distintos (A, B, y C) que codifican las moléculas clásicas HLA-A, HLA-B y HLA-C, así como los genes que codifican las moléculas no clásicas HLA E, F, G, H, Y y J (62,63). Las moléculas de clase I están formadas por dos cadenas polipeptídicas, una pesada (α) con un peso molecular de 44 kilodalton (kDa), donde radica el mayor polimorfismo de la molécula, y una ligera, denominada β_2 -microglobulina (12 kDa), que es invariable e igual en todos los individuos. La cadena pesada está dividida en tres dominios extracelulares (α_1 , α_2 y α_3), una región transmembrana y otra ubicada en el citoplasma. Los dominios extracelulares α_1 y α_2 son los más polimórficos y constituyen el lugar destinado a albergar el antígeno procesado. El dominio α_3 es constante y está asociado mediante enlaces no covalentes a la cadena β_2 -microglobulina, garantizando la configuración cuaternaria de la molécula HLA de clase I. Las moléculas de clase I se expresan, prácticamente, en todas las células nucleadas del organismo.

Los genes del CMH de clase II se localizan más cerca del centrómero y se organizan en 3 loci (DP, DQ y DR), que codifican las moléculas HLA-DP, HLA-DR y HLA-DQ. Cada una de estas moléculas está formada por dos cadenas de glicoproteínas, una cadena pesada (α) y una ligera (β) con dos dominios extracelulares cada una. Son polimórficas y están unidas mediante enlaces no covalentes (64). La localización de las moléculas de clase II es más restringida, de forma que solo se expresan en las células presentadoras de antígenos (CPAs) (macrófagos, células dendríticas y células B), los linfocitos T activados y las células del endotelio vascular (65). No obstante, la distribución en los distintos tejidos no es universal ni uniforme entre especies, de forma que en humanos, perros,

cerdos y monos se expresan moléculas de clase II en células endoteliales, mientras que en roedores y otras especies no.

La discriminación del sistema inmune entre lo propio y lo ajeno se realiza a través de las moléculas HLA de clase I y II mediante el proceso conocido como “restricción del CMH”. Los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ sólo pueden reconocer un antígeno si está unido a una molécula HLA propia, por ello el patrón de expresión de los antígenos HLA en los diferentes tipos de células guarda relación con cada una de estas subpoblaciones linfocitarias (63). Los linfocitos T CD8⁺ reconocen los antígenos unidos a moléculas HLA clase I, mientras que los linfocitos T CD4⁺ están restringidos por el HLA de clase II. Ambas moléculas de clase I y II tienen un sitio específico de unión al antígeno, el cual puede ser presentado de forma directa a través de CPAs, o bien de forma indirecta, una vez procesado en las mismas (66).

Los antígenos del CMH son los encargados de identificar las células del organismo y diferenciarlas de las extrañas. Por ello, presentan un papel determinante en el trasplante de órganos y tejidos. De hecho, la concordancia con HLA-A, HLA-B y HLA-DR ha mostrado ser un factor definitivo en la supervivencia a largo plazo de los alotrasplantes (67). Williams et al. informaron de la existencia de una relación lineal entre la supervivencia del trasplante renal y la incompatibilidad del HLA, de forma que la discordancia en un alelo confería un 13% más de riesgo de RA, y si la discordancia era en todos, el riesgo aumentaba un 64% (68). En el caso de los AVC, asegurar la compatibilidad de HLA no es fácil, ya que los donantes son escasos y, de manera similar al trasplante cardiaco, la urgencia del procedimiento limita el tiempo para determinar la compatibilidad del HLA. En el estudio de Bonastre et al., observaron que, en trasplantes de miembro superior, la discordancia en más de 3 alelos no aumentaba de forma significativa el número de episodios de RA en comparación con aquellos que tenían

menos de 3 alelos discordantes, aunque si se observó una incidencia mayor ($3,07 \pm 1,6$ vs $1,8 \pm 1,3$ respectivamente, $p=0,079$) (69).

El fenómeno que inicia la respuesta de rechazo al alotrasplante es el reconocimiento de las moléculas del CMH por los linfocitos T a través de su receptor específico (RCT, *Receptor de Células T*) (70). A diferencia de los anticuerpos que pueden unirse a cualquier molécula ajena al individuo, el RCT reconoce específicamente los péptidos que conforman el CMH. La activación de los linfocitos T depende de que el RCT identifique el CMH, y además requiere dos señales diferentes: una a través de los receptores CD4 y CD8 y otra proveniente de la coestimulación de la familia B7-CD28 (71). Esto va a desencadenar una respuesta intracelular que culmina con la diferenciación del linfocito T y su expansión clonal (63).

Otros antígenos implicados en el rechazo del alotrasplante

Además de los antígenos del CMH, hay otros 3 tipos de proteínas de superficie importantes en el proceso inmunológico del trasplante: las proteínas del grupo sanguíneo AB0, los antígenos menores de histocompatibilidad y los antígenos específicos de la piel.

Los antígenos del grupo sanguíneo son importantes en el trasplante al expresarse en las células endoteliales. Pacientes de los grupos A y B desarrollan anticuerpos contra el grupo contrario, y los del grupo 0 desarrollan anticuerpos contra los grupos A y B. Aunque no estimulan el rechazo mediado por células, sí pueden provocar un ataque directo mediado por anticuerpos produciendo rápidamente el fallo del trasplante (rechazo hiperagudo) (*ver sección 1.6.2*) (72).

Los antígenos menores de histocompatibilidad son péptidos de origen intracitoplásmico, pudiendo ser intracelulares o de superficie, y se presentan en la membrana a través del CMH a los linfocitos T alorreactivos. Los hermanos no gemelos,

con una concordancia perfecta entre los CMH, pueden diferir en estos antígenos menores de histocompatibilidad debido a una variación alélica de los genes que los codifican. No obstante, aunque esta discordancia pudiera estimular una respuesta inmune mediada por células, ésta habitualmente no será tan intensa y en su caso, ocasionaría un rechazo leve (73).

Por último, los antígenos específicos de la piel son proteínas de tejido cuya discrepancia puede ocasionar el rechazo del trasplante a través de una respuesta inmune mediada por células. Por ello, la piel se considera uno de los órganos más inmunogénicos, cuya presencia genera más episodios de rechazo, y complica la inducción de tolerancia al alotrasplante (74).

1.4.2 Respuesta inmune y rechazo

La respuesta inmune es el conjunto de mecanismos destinados a la eliminación de agentes extraños. Se basa en el reconocimiento específico del antígeno por parte de macrófagos, linfocitos y otros tipos celulares, la interacción de los diferentes componentes del sistema inmune para su activación y regulación, y la respuesta de intensidad adecuada para la eliminación del antígeno. Se puede clasificar en 2 tipos: innata (natural o inespecífica) y adaptativa (adquirida o específica).

Respuesta inmune innata

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa frente a la invasión de patógenos microbianos, así como de otras amenazas potenciales para el huésped, ya sean endógenas o exógenas. Se desencadena de forma rápida y predomina en las primeras fases desde la detección de un agente extraño en el organismo. Está constituida por las barreras físicas y los agentes químicos no específicos, las proteínas del complemento y las células que los reconocen de manera inespecífica (monocitos/macrófagos, células NK

[del inglés, *Natural Killer*], granulocitos, etc.) (75). Este sistema identifica moléculas que se interpretan como señales de peligro denominadas patrones moleculares asociadas a peligro (DAMPs, del inglés *Danger-Associated Molecular Patterns*) integrado por los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) y la alarminas, que son proteínas intracelulares liberadas por las células necróticas. Los receptores capaces de reconocer estas moléculas se denominan receptores de reconocimiento de patrones (RRP). Existen numerosas clases funcionales de RRP siendo los mejor caracterizados los llamados receptores tipo Toll (TLR, del inglés, *Toll Like Receptor*). EL primer TLR de la *Drosophila melanogaster* fue identificado en 1997, y desde entonces se han descrito 13 miembros de esta familia. Presentan 3 regiones estructurales: el extremo amino que contiene el dominio de unión al ligando que se caracteriza por presentar secuencias repetidas ricas en leucina, una región transmembrana y un extremo carboxilo intracelular que contiene el dominio TIR (del inglés, *Toll/IL-1 Receptor*) que originalmente se identificó en el receptor de la interleuquina-1 (IL-1). Reconocen una gran variedad de PAMPs, desde bacterias, hongos, parásitos, virus e incluso componentes lipídicos de la pared celular como los lipopolisacáridos y los lipopéptidos, componentes de proteínas microbianos como la flagelina y los ácidos nucleicos como ácido ribonucleico monocatenario (ARNmc) o ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena. La asociación de los TLRs con sus ligandos inicia vías de señalización gracias al reclutamiento de distintas moléculas que contienen el dominio TIR (MyD88 [del inglés, *Myeloid differentiation 88*; factor de diferenciación mielóide 88], TIRAP [del inglés, *TIR Domain Containing Adaptor Protein*, proteína adaptadora que contiene el dominio TIR], TRIF [del inglés, *TIR domain-containing adapter protein inducing IFN-beta*; proteína adaptadora que contiene el dominio TIR que induce INF- β] y TRAM [del inglés, *TRIF-related adaptor molecule*,

molécula adaptadora relacionada con TRIF]), las cuales concluyen con la activación de los factores de transcripción NF- κ B (del inglés, *Nuclear Factor-kappa B*; factor nuclear kappa B) y AP-1 (del inglés, *Activator Protein 1*, proteína activadora 1) y, por consiguiente, la producción de citoquinas inflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , del inglés, *Tumor Necrosis Factor α*), IL-1B y la IL-6. La activación de los TLR en las CPAs inicia una cascada de señalización que culmina con la traslocación de NF- κ B produciendo la maduración de estas células asociada a un incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras y a la secreción de citoquinas proinflamatorias. Posteriormente las CPAs migran al ganglio linfático e interactúan con los linfocitos T vírgenes poniendo en marcha la respuesta inmune adaptativa (76). En el estudio de Goldstein et al, describieron la ausencia de rechazo en un modelo de trasplante de piel en ratones *knock-out* para MyD88 (77). Estudios posteriores confirmaron que esta tolerancia se debía a una ausencia de células dendríticas maduras, dando lugar a una atenuación en la generación de las células T anti-donante específicas y a una respuesta Th1 deteriorada (78). Por otra parte, los DAMPs liberados durante el proceso de isquemia/reperfusión que tiene lugar durante la cirugía del trasplante, pueden activar los TLR, produciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias, que a su vez reclutan macrófagos, neutrófilos y células T produciendo una actividad inflamatoria a gran escala, con el consiguiente daño del órgano. En un estudio experimental con un modelo de isquemia/reperfusión miocárdica en ratón, se observó que los animales carentes de TLR4 habían padecido menos infartos y menos inflamación cardíaca (79).

Respuesta inmune adaptativa

El sistema inmune adaptativo depende de los linfocitos T y B, caracterizándose por la especificidad para reconocer antígenos y la generación de memoria para activarse

rápidamente en caso de un ulterior contacto con el mismo agente. Dentro de esta respuesta específica puede distinguirse un componente humoral, basado en la producción de anticuerpos, y un componente celular, basado en mecanismos de citotoxicidad. Durante el desarrollo de la respuesta adaptativa se suelen desencadenar ambos tipos de respuesta, si bien, generalmente, una de ellas predomina sobre la otra dependiendo del tipo de agresión.

Los antígenos responsables del rechazo de tejidos genéticamente diferentes se denominan aloantígenos, siendo el CMH el principal responsable. Su reconocimiento por el sistema inmune adaptativo del receptor se denomina alosensibilización y tiene lugar cuando los aloantígenos llegan a los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos y bazo) (80). Los linfocitos B reconocen los aloantígenos en su forma nativa, mientras que los linfocitos T requieren la degradación parcial de éstos y su presentación a través de las CPAs. La sensibilización de las células T es un proceso más complejo e implica dos vías moleculares distintas. La vía directa se basa en que los tejidos trasplantados llevan un número variable de CPAs propias. Tras el trasplante, éstas migran a los órganos linfoides secundarios del receptor, donde las células T reconocen directamente a los aloantígenos unidos a una molécula del CMH en la superficie de las CPAs del donante. Esta es la vía dominante involucrada en la respuesta temprana, sin embargo, solo puede desencadenar respuestas de tipo celular y se desvanece con el tiempo ya que el número de CPAs del donante dentro del aloinjerto es finito. Por otra parte, la presencia del trasplante atrae a las CPAs del receptor, que capturarán aloantígenos del donante y los llevarán a los órganos linfoides secundarios para presentarlos a las células T propias (81). Éstas a su vez activarán a linfocitos B que se diferenciarán en células plasmáticas. A diferencia de la vía directa, la vía indirecta permanecerá activa mientras el alotrasplante esté presente (82) (ver *Figura 4*).

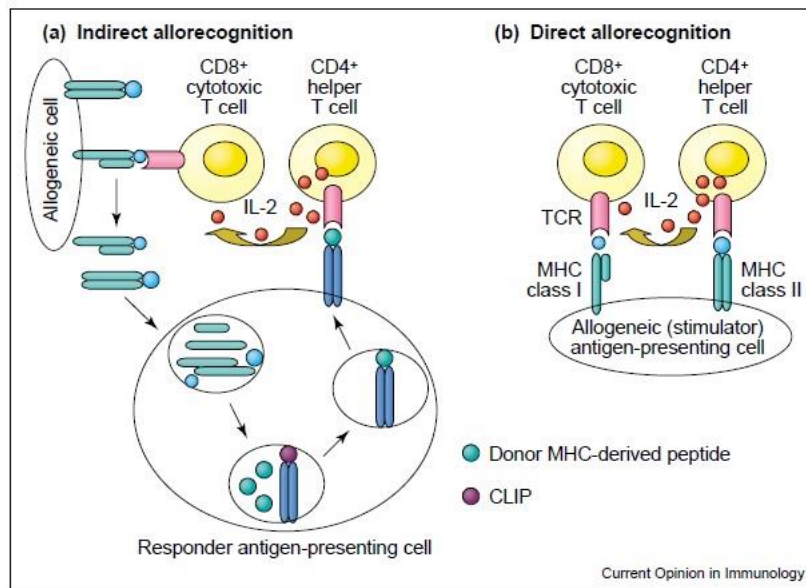


Figura 4: Reconocimiento antigénico. Vías directa e indirecta. (Reproducido con permiso: Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: Implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Current Opinion in Immunology*. 2004. Copyright Elsevier).

Según las características histológicas y con un correlato patogénico, podemos distinguir el rechazo mediado por células T o rechazo celular, y el rechazo mediado por anticuerpos o rechazo humoral. En una visión unicista, ambas formas son un extremo en la escala de un mismo proceso, pero posiblemente sean posibles múltiples situaciones intermedias (83).

a) Rechazo celular:

Está mediado por células T y tiene como objetivo fundamental reconocer las moléculas del CMH no propias y destruir las células del órgano trasplantado que las presenten (84). Tras su activación y proliferación, las células T alorreactivas saldrán a los órganos linfoides secundarios y a la circulación. Aunque el endotelio expresa moléculas de CMH, las células T llegan al trasplante por un mecanismo independiente del reconocimiento de antígenos. El daño por isquemia-reperfusión induce la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales del trasplante, que promueven la entrada de las células T a través del ligando selectina-integrina, así como a través de moléculas

de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas. A continuación, éstas son guiadas al espacio extravascular mediante glucosaminoglicanos (85). Como se ha mencionado previamente, los antígenos del donante son reconocidos por los linfocitos T alorreactivos mediante dos vías distintas, la directa y la indirecta. Clásicamente, se han separado ambas vías de reconocimiento, pero hoy en día se sabe que ambas no son excluyentes, participando en el desarrollo del rechazo ya sea de forma simultánea o en diferentes fases de éste (86).

Las células T CD8⁺ con especificidad directa, son las únicas células efectoras capaces de responder directamente a las células epiteliales del trasplante. Inducen la apoptosis celular a través de la liberación de perforinas y granzimas así como la expresión de la proteína de superficie Fas ligando, la cual puede unirse a las moléculas Fas expresadas en la superficie celular de las células del trasplante (85).

Las células T CD4⁺ solo pueden reconocer los aloantígenos del donante cuando son presentados a través de una CPA en forma CMH tipo II, y pueden desencadenar el rechazo celular a través de tres mecanismos distintos. El primero consiste en promover la expansión clonal de los linfocitos T CD8⁺ mediante la producción de IL-2. La presentación directa de los aloantígenos a través de CMH clase I a los linfocitos T citotóxicos, provocará la lisis de las diferentes estirpes celulares del aloinjerto (87). El segundo mecanismo efector consiste en la activación de los leucocitos antígeno-independientes, como los macrófagos activados CD68⁺, que producirán daño tisular al aloinjerto mediante la liberación de enzimas histolíticas y radicales libres de oxígeno (88). El último mecanismo consiste en la producción de señales que estimularán la diferenciación y activación de los linfocitos B CD20⁺ productores de anticuerpos con especificidad para el donante (AED), relacionándose así directamente con el rechazo humoral. Estos a su vez pueden infiltrar los tejidos del trasplante y participar en la

presentación de antígenos a los linfocitos T CD4⁺ (89,90). A pesar de que los linfocitos T ocupan un papel primordial en el rechazo del trasplante, la presencia de episodios de RA resistentes a los inmunosupresores actuales cuya diana es la célula T, la detección de AED circulantes y el depósito del fragmento C4d perteneciente a la vía clásica del complemento, ponen de manifiesto la importancia del rechazo humoral (91).

b) Rechazo mediado por anticuerpos o humoral:

Es una respuesta de células B timo dependiente, en la cual se generan anticuerpos de alta afinidad (Ig G) dirigidas contra antígenos proteicos del donante (principalmente moléculas CMH) (92). La actividad de las células B se inicia en los órganos linfoides secundarios cuando los aloantígenos se unen a su receptor de superficie. A continuación, el antígeno se internaliza, se procesa y se expone en la superficie celular. Estas células B migran para emparejarse con las células T CD4⁺, las cuales producirán la segunda coestimulación de las células B a través de la interacción del ligando CD40L y la IL-21. Las células B activadas entrarán después en el centro germinal del folículo linfoide, donde pasarán por múltiples ciclos de selección antes de diferenciarse a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Estos anticuerpos se liberarán al torrente sanguíneo y al entrar en el trasplante se unirán a las células endoteliales donde pueden activar la vía clásica del complemento, así como unirse al CMH de las células endoteliales y reclutar efectores de la respuesta inmune innata a través de receptores Fc (fracción constante de los anticuerpos) (93,94).

Para hablar clínicamente de rechazo humoral deberán existir estos cuatro criterios: disfunción clínica del aloinjerto, evidencia histológica de daño tisular (vasculitis neutrofílica y/o necrosis fibrinoide), evidencia anatomopatológica del daño por anticuerpos mediante la identificación del fragmento C4d del complemento a nivel

capilar, y la evidencia serológica de AED en el momento de la biopsia (95–98). El rechazo humoral puede manifestarse mediante un rechazo hiperagudo, como rechazo vascular o como rechazo crónico. El primero es secundario a la presencia de AED preformados y se caracteriza por una oclusión trombótica de los vasos del aloinjerto que comienza al cabo de minutos a horas después de la anastomosis, dando lugar al fallo del órgano trasplantado. El rechazo vascular o rechazo agudo es un proceso de lesión vascular y parenquimatosa que suele iniciarse después de la primera semana del trasplante. Los anticuerpos producidos contra los aloantígenos se unen a las paredes vasculares y activan la vía clásica del complemento. Histológicamente, se observará una necrosis transmural de las paredes vasculares con inflamación aguda asociada, distinta de la oclusión trombótica sin necrosis que tiene lugar en el rechazo hiperagudo (ver *Figura 5*) (99,100).

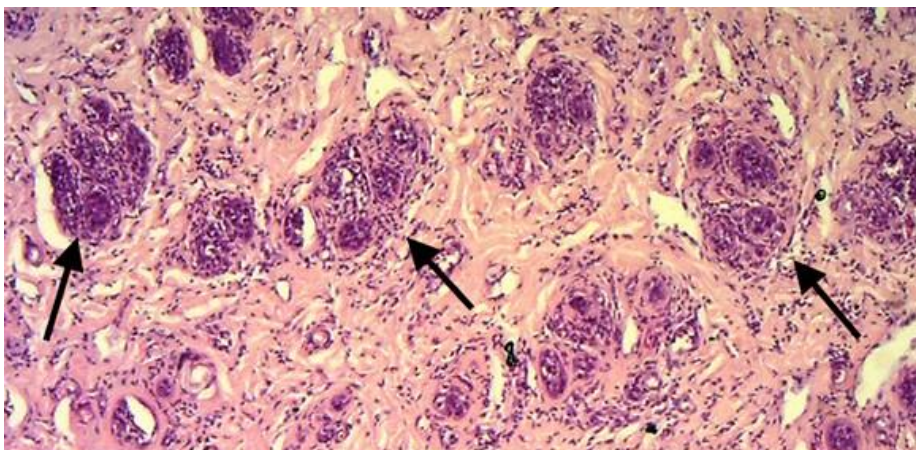


Figura 5: Imagen representativa de microscopía óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de biopsias de piel de un animal de grupo control que ha sufrido RA. Las flechas señalan una intensa infiltración inflamatoria esencialmente en la capa íntima con obstrucción de la luz vascular.

1.4.3 Regulación del rechazo por citoquinas

Además de la interacción celular que se observa durante la respuesta inmune, hay múltiples mediadores solubles involucrados. Entre ellos destacan las moléculas de adhesión celular y las citoquinas. Las citoquinas son proteínas reguladoras que pueden

ser producidas por una amplia variedad de células ante su estimulación. Pueden actuar localmente, ya sea de forma autocrina o paracrina, o sobre células distantes a través de la sangre (actividad endocrina) (101). Las citoquinas se pueden dividir en proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , TNF- β), citoquinas con función inmunorreguladora pertenecientes a la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β , de inglés *transforming growth factor β*), y citoquinas involucradas en la diferenciación de las células T (IL-2,IL-4,IL-5,IL-10,IL-12, IL-13, IFN- γ) (101).

Una de sus características principales es que interaccionan en una gran red: son producidas por una amplia variedad de células, incluyendo los linfocitos, monocitos, células endoteliales y fibroblastos. Presentan un efecto pleiotrópico y redundante, ya que los efectos individuales pueden ser producidos por más de una citoquina diferente. Actúan en cascada, de forma que una citoquina puede inducir la síntesis de otras, pueden tener efectos sinérgicos o antagónicos y pueden regularse unas a otras mediante la transmodulación de la expresión de receptores de superficie.

De manera esquemática, las citoquinas van a participar en el trasplante de órganos a 4 niveles diferentes.

- Órgano donante: la cirugía de extracción activa la producción de citoquinas que regulan la respuesta de fase aguda, pudiendo afectar a la función del mismo así como influir en la respuesta inmune posterior (102).
- Intervención quirúrgica: el daño tisular inherente a la cirugía y la activación de los monocitos-macrófagos tras la isquemia-reperfusión producen la síntesis masiva de citoquinas, especialmente IL-6 y TNF- α . Sin embargo, cabe destacar que las linfoquinas IL-2 e IFN- γ no se detectaron ni en el suero ni en parénquima en un modelo de trasplante hepático (103). Esto demuestra que inicialmente hay

- una mayor estimulación de la síntesis de monoquinas por monocitos y macrófagos en ausencia de la activación linfocitaria en estadios iniciales del trasplante (104).
- Respuesta aloinmune al trasplante: el trasplante de un órgano entre gemelos no idénticos genera una respuesta específica de células T contra los antígenos CMH del donante, y las citoquinas, presentan un papel importante en esta respuesta (105). Estudios de RA en trasplante renal, identificaron niveles elevados de TNF- α , IFN- γ y IL-2. Además, la neutralización de estas citoquinas prolonga la supervivencia del trasplante (106). El IFN- γ activa los macrófagos aumentando así la síntesis de IL-1, TNF- α e IL-6. El TNF- α ejerce un efecto citotóxico directo sobre las células del parénquima del órgano trasplantado y actúa sobre las células endoteliales induciendo actividad procoagulante, la síntesis de IL-6 y la de IL-8 (que atrae a los neutrófilos) y la expresión de moléculas de adhesión. TNF- α e IFN- γ presentan un efecto sinérgico induciendo la expresión de CMH, lo cual va a aumentar la inmunogenicidad del injerto y es un hecho invariable asociado al desarrollo de RA (105). Por otra parte, las células Th (células T *helper*), que juegan un papel central en la respuesta aloinmune, se subdividen en 2 clases (Th1 y Th2) que liberan un patrón de citoquinas diferente. El subconjunto Th 1 produce IL-2, IL-3, IFN- γ , TNF- β y GM-CSF, mientras que el subconjunto Th2 produce IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Las citoquinas derivadas de Th1 inhiben al subconjunto Th 2 y viceversa. Este efecto inhibitorio dual, conduce al desarrollo preferente de un subconjunto respecto al otro. Durante el RA prevalece la respuesta del subconjunto Th1 (107).
 - Rechazo crónico: PDGF, IL-1 y TNF- α estimulan la proliferación de musculo liso, una lesión vascular obstructiva típica de esta entidad. Tanto IL-1 como TNF ejercen efectos deletéreos sobre las células endoteliales, incluyendo efectos

procoagulantes, síntesis de IL-6 e IL-8 y la expresión de moléculas de adhesión (108).

TNF- α o cachectina:

a) **Genética y estructura molecular:** el gen TNF- α se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, en la banda citogenética 6p21. Estructuralmente, es un trímero constituido por subunidades idénticas unidas de manera no covalente, cada una de las cuales es un péptido no glicosilado de 17 kDa. Se puede encontrar de 2 formas: una precursora unida a la membrana y otra soluble. La forma unida a la membrana está formada por 233 aminoácidos, tiene un peso molecular de 26 kDa y es escindida por la enzima convertidora de TNF- α , dando origen a la forma soluble. Ésta última está formada por 157 aminoácidos y presenta un peso molecular de 17 kDa. El homotrímero tiende a disociarse a bajas concentraciones, perdiendo así su actividad biológica (109).

b) **Producción:** es producido principalmente por macrófagos/monocitos activados, pero también por células T (esencialmente CD4⁺), neutrófilos, células NK, astrocitos, células de la microglía, células musculares lisas, células endoteliales y fibroblastos (110).

c) **Funciones y dianas:** el TNF- α es una potente citoquina pleiotrópica con múltiples funciones celulares. Las 2 formas del TNF- α ejercen un papel biológico inflamatorio; la unida a la membrana lo hace de manera local y depende de la interacción con otras células, mientras que la forma soluble ejerce su función a distancia (111). El TNF- α señala a través de dos receptores triméricos de membrana: los receptores 1 y 2 (TNFR1 y TNFR2, conocidos también como p55 ó p60 y p75 ó p80, respectivamente). Ambos receptores se expresan prácticamente en todas las células del ser humano; el TNFR1 se

expresa en las células nucleadas, mientras que el TNFR2 solo se expresa en células del sistema inmune, endoteliales y nerviosas. Presentan una estructura proteica similar, sin embargo, TNFR1 contiene un dominio de muerte celular que promueve la apoptosis mediada por caspasas, mientras que TNFR2 carece del mismo y por tanto no puede mediar este fenómeno (112). Así mismo, la unión entre TNF- α y TNFR1 desencadena una señalización intracelular que culmina con la activación del factor de transcripción nuclear “potenciador de la cadena ligera kappa” de las células B activadas (NF- κ B, del inglés *nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B cells*) el cual se transloca al núcleo y expresa genes involucrados con la síntesis de proteínas relacionadas con la maduración de la respuesta inmune innata, adaptativa, la inflamación y la autoinmunidad (113). Así, entre las funciones del TNF- α destacan la estimulación de la producción de más TNF- α y otras citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8, la expresión de CMH clase I, la activación de monocitos y coestimulación de linfocitos T y B, incremento de la fagocitosis y la citotoxicidad de neutrófilos y macrófagos, y estimulación de la liberación de IFN- γ . Además, junto a la IL-1, es responsable del incremento de la expresión de moléculas de adhesión al endotelio, inhibiendo los mecanismos anticoagulantes y promoviendo los procesos trombocíticos (114). En caso de una producción prolongada en el tiempo, el TNF- α es responsable de las alteraciones metabólicas que producen la caquexia característica de los procesos inflamatorios de carácter crónico (115).

IFN- γ :

a) **Genética y estructura molecular:** el gen que codifica el IFN- γ o interferón de tipo II se encuentra en el cromosoma 12 (12q15). Es un

homodímero estabilizado por uniones no covalentes, con subunidades de 143 aminoácidos. Se sintetiza como una proteína precursora de 166 aminoácidos, que incluye una secuencia señal de 23 aminoácidos (116).

b) **Producción:** el IFN- γ es producido por los linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ células T γ/δ , así como por células NK en respuesta a algún estímulo inmune o inflamatorio. Las células mieloides (células dendríticas, macrófagos y neutrófilos) también son capaces de producir IFN- γ a través de la estimulación con IL-12 e IL-18 (117). La producción de IFN- γ es inducida por patógenos, por el entrecruzamiento de moléculas de superficie, por antígenos específicos, por la activación del receptor de células T o por estimuladores de células T no específicos como la fitohemaglutinina, la concanavalina-A, ésteres de forbol e ionóforos. También se estimula por citoquinas (IL-1, IL-2, IL-12, IL-18), factores de crecimiento y estrógenos. La expresión del gen de IFN- γ se inhibe por los glucocorticoides, el TGF- β y la IL-10, así como por el inmunosupresor CsA a través del factor de transcripción NF-ATp (del inglés, *Nuclear Factor AT*, Factor nuclear AT) (118).

c) **Funciones y dianas:** la actividad biológica del IFN- γ es mediada por un receptor específico, que se expresa en todas las células con excepción de los eritrocitos maduros. Está constituido por 2 proteínas IFN γ R1 de 90 kDa (denominadas cadenas alfa, cadenas de unión al ligando o CD119W) y 2 proteínas IFN γ R2 de 60 kDa (denominadas cadena beta de transducción de señales o factor accesorio 1). El IFN- γ se une a las dos cadenas de IFN γ R1, facilitando la unión de las dos proteínas del IFN γ R2 al complejo IFN γ R1/IFN γ . Esto permite que los dominios intracelulares de los receptores se aproximen induciendo la asociación de las JAK quinasas (tirosinas quinasas de la familia

de las quinasas Janus), lo que resulta en una transfosforilación de estas últimas y la subsecuente fosforilación de la tirosina 440 de IFN γ R1. A través de su dominio SH2, una STAT1 (transductores de señales y activadores de la transcripción) reconoce y une cada sitio de tirosina fosforilada del IFN γ R1. A continuación, el complejo IFN γ R1 asociado a STAT1 se fosforila en tirosina y se activa formándose homodímeros de STAT1 que se traslocan al núcleo donde se unen a secuencias de activación de los genes inducibles por INF- γ (119). De esta forma, el INF- γ potencia la transcripción de varios genes involucrados en actividades inmunomoduladoras, antivirales y antiproliferativas. Como molécula inmunomoduladora, tiene la capacidad de aumentar la actividad citotóxica y fagocítica de los macrófagos e induce la expresión de moléculas de CMH clase I y II en las CPAs. Así mismo, incrementa el desarrollo y diferenciación de las células Th1, regula la respuesta humoral induciendo la producción de IgG2a e IgG3 por las células B y promueve la actividad citotóxica de los linfocitos T y células NK. Por último, regula la producción de citoquinas proinflamatorias, aumentando la expresión de TNF- α , IL-12 e IL-15 a través de la activación de factores de transcripción como el NF κ B. Estas propiedades proinflamatorias contrastan con otras antiinflamatorias al inhibir la producción de IL-1 α e IL-18, como se ha descrito en la artritis reumatoide y la artritis estreptocócica (120–122).

1.4.4 Rechazo agudo

Concepto

Se denomina RA a la respuesta inmune de tipo celular y humoral que trata de destruir el injerto. Consiste en un proceso de lesión vascular y parenquimatosa en el que

intervienen los linfocitos T y los anticuerpos, y que suele iniciarse después de la primera semana del trasplante. Según los datos del registro internacional de AVC, alrededor del 85% de todos los pacientes receptores de un AVC experimentan al menos un episodio de RA en el primer año posoperatorio, y cerca del 50% sufren múltiples episodios (123,124). Si nos centramos en los trasplantes de miembros superiores, Bonastre et al observaron que la tasa de episodios de RA es del 89%, teniendo cada receptor una media de 2,42 episodios durante su seguimiento, y ocurriendo el 60% de los mismos durante el primer semestre posoperatorio (69). Atendiendo a la revisión de trasplante facial realizada por Rifkin et al, de los 40 casos realizados entre 2005 y 2018, 30 pacientes sufrieron uno o más episodios de RA (33) . No obstante, a pesar de la alta tasa de episodios de RA, atribuible a la inmunogenicidad de la piel, la pérdida del AVC por un episodio de RA es un fenómeno poco frecuente (125). De hecho, en la revisión publicada por Bonastre et al, se observó que todos los episodios de rechazo fueron tratados con éxito independientemente del protocolo inmunosupresor empleado (69).

Etiopatogenia

Los linfocitos T efectores y los anticuerpos se desarrollan a lo largo de algunos días o incluso semanas después del trasplante, lo que justifica el intervalo libre hasta la aparición del RA (85). Los linfocitos T desempeñan una función esencial en este tipo de rechazo debido a su capacidad de respuesta a los aloantígenos, entre los que figuran las moléculas del CMH existentes en las células endoteliales y parenquimatosas del aloinjerto. Los linfocitos T activados producen la lisis directa de las células del injerto. Así mismo, secretan citoquinas que atraen y activan las células inflamatorias, que a su vez lesionan el trasplante. En los trasplantes vascularizados las células endoteliales son las primeras dianas del RA. En las etapas iniciales de este proceso, se produce una arteritis

de la capa íntima vascular, que es un signo de rechazo incipiente y que, si no se trata, suele provocar la insuficiencia aguda del trasplante (126).

El procesamiento de los antígenos del donante por parte de las CPAs y el posterior reconocimiento de los linfocitos T CD4⁺, van a desencadenar varios mecanismos efectores, ya comentados previamente (*ver sección 1.6.2*).

Bases moleculares

Entre los marcadores moleculares del RA destacan distintas citoquinas. En función de si estimulan la respuesta inmune de rechazo o bien favorecen tolerancia, se pueden clasificar en 2 grupos. Entre las citoquinas más destacadas como mediadoras del rechazo y activadores de macrófagos destacan la IL-2, el IFN- γ y el TNF- α ; mientras que la IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 pertenecen al segundo grupo que favorece la tolerancia.

El patrón de expresión de estas moléculas en biopsias tisulares y en sangre periférica nos va a dar información acerca del estado de la activación del endotelio en el postoperatorio inmediato (síndrome isquemia/reperfusión), del desarrollo de un episodio de RA o de la eficacia del tratamiento inmunosupresor (127). Así, previo a la respuesta alodérmica de rechazo, durante el trasplante se produce un aumento de la expresión de citoquinas en las células endoteliales (IFN- γ y TNF- α), lo que a su vez conlleva un aumento en la expresión de CMH tipo I acompañado de la liberación de factores quimiotácticos para los macrófagos que infiltrarán los tejidos.

La tolerancia se asocia a una menor actividad de las citoquinas del primer grupo (IL-2, el IFN- γ y el TNF- α) y a una mayor expresión del segundo (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10). Así, niveles elevados de IL-2, el IFN- γ y el TNF- α preceden al desarrollo de un episodio de RA en modelos experimentales. En la práctica clínica, los resultados son más controvertidos ya que dependen en gran medida de la variabilidad de los pacientes, el momento de la biopsia, de la redundancia de las acciones de las citoquinas o del

tratamiento inmunosupresor (128). Por otra parte, la selección tratamiento inmunosupresor o la eficacia del mismo, también es susceptible de ser estudiada por los niveles de citoquinas. Así, los inhibidores de la calcineurina (Csa y FK506) producen una inhibición en la expresión de citoquinas del primer grupo, mientras que la rapamicina y el micofenolato inhiben la proliferación por medio de la inhibición del ciclo celular o la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), no afectando a los niveles de expresión (127).

Histopatología

En 1980, Dvorak et al llevaron a cabo un estudio experimental sobre rechazo en aloinjertos de piel demostrando que el endotelio microvascular es el principal objetivo de la respuesta inmune, dando lugar a un daño vascular generalizado que acabará produciendo infartos isquémicos (129). Acompañando a este daño vascular, se organizaban acúmulos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ perivasculares y, eventualmente, penetraban la epidermis conduciendo a una alteración de los queratinocitos (129,130). Este modelo es bastante similar a los cambios histológicos que acontecen en el rechazo inicial del AVC. Sin embargo, hay que destacar algunas diferencias, como son la aplicación de protocolos de inmunosupresión empleados de manera habitual, y que la piel va acompañada de otros componentes que pueden volver al AVC menos antigénico alterando el tiempo y la intensidad de los episodios de RA (131).

El patrón histológico típico del RA es una infiltración celular mononuclear extensa y el edema. La tinción inmunohistoquímica con peroxidasa revela linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ expresando marcadores de células T activadas (como la cadena alfa del receptor de IL-2) (132). Además de producir daño en los distintos tejidos, las células T CD8⁺ lesionan las células endoteliales vasculares, produciendo la denominada “endotelitis”. Esta forma de daño vascular mediado por células está limitada al endotelio, y es distinta de la

vasculitis mediada por anticuerpos. Los vasos afectados tienen células endoteliales edematosas y, en algunos lugares, se pueden ver linfocitos entre el endotelio y la pared del vaso. El reconocimiento del rechazo celular es importante ya que, en ausencia de arteritis acompañante, los pacientes responden rápidamente al tratamiento inmunosupresor (133).

En el trasplante de manos, el RA se manifiesta por cambios en el dorso cutáneo y con menos frecuencia en la región palmar y en las uñas. De forma atípica, aparece en estas últimas localizaciones, siendo más probable su aparición en pacientes con exposición repetida y persistente a estrés mecánico en la palma (134). En base a los datos publicados por Schneeberger et al, el rechazo a este nivel suele ser más resistente a tratamiento convencional (134). A nivel macroscópico, los hallazgos típicos incluyen el rash eritematoso maculopapular, que puede ser difuso, parcheado o focal, asociado o no a dolor (135). La afectación ungueal se caracteriza por distrofia, degeneración, deformidad o incluso pérdida de la misma. A nivel microscópico se puede observar un infiltrado linfocitario perivascular en la dermis, que se extiende hacia el intersticio y la epidermis según sea mayor el grado de rechazo, observándose en el estadio más avanzado, la necrosis y pérdida de la epidermis (136). En el caso de afectación palmar, también se observa hiperqueratosis, espongiosis y cuerpos citoides en los queratinocitos (134). El análisis inmunohistoquímico revela que el infiltrado celular es predominantemente de células T CD3⁺, con una tendencia hacia el predominio de células T CD8⁺ en casos más leves y células T CD4⁺ en casos más avanzados. Así mismo, dependiendo del grado de rechazo podemos encontrar macrófagos CD68⁺ (10-50%), células B CD20⁺ (0,5-5%) y linfocitos T CD4⁺ reguladores Foxp3 (5-10%) (132).

En el trasplante facial, además de la piel, las mucosas oral y nasal suponen un desafío inmunológico añadido. A nivel macroscópico, el RA se caracteriza por eritema

e inflamación cutánea, aparición de nódulos y pápulas, y las mucosas se observan eritematosas (137). A nivel microscópico, los hallazgos son similares a los encontrados en el trasplante de miembro superior: en la dermis aparece edema e infiltrado inflamatorio de predominio linfocitario, y a nivel epidérmico edema intercelular, vacuolización de las células basales, linfocitos y apoptosis de queratinocitos (132). Las biopsias de la mucosa muestran mayores cambios respecto a las muestras cutáneas, siendo la causa desconocida aunque podría ser debido a la mayor densidad de CPA presentes en la misma (138). Los hallazgos inmunohistoquímicos son muy similares a los encontrados en el RA de miembro superior mencionado anteriormente.

El rechazo humoral agudo está mediado por AED, y se manifiesta principalmente por daño a nivel vascular. En los TOS, se ha visto que puede manifestarse en forma de vasculitis necrosante, con necrosis de las células endoteliales, infiltración neutrofílica, depósito de inmunoglobulinas, complemento, fibrina y trombosis de la luz (139). No obstante, también se puede manifestar con un engrosamiento de la íntima por fibroblastos, miocitos y macrófagos, dando a un desarrollo progresivo de arterioesclerosis con disfunción crónica de trasplante (140). A nivel del AVC, el impacto que tienen los AED es difícil de saber debido a que el rechazo mediado por anticuerpos no se puede separar del rechazo mediado por células T (141). En línea con esta hipótesis, en el estudio de Schneeberger et al, la detección de AED en los receptores se asoció a rechazo mediado por células T en la mayoría de los casos (142). A nivel de inmunohistoquímica, en el estudio de Chandraker et al, se observó un depósito de la fracción C4d del complemento en los capilares dérmicos, en ausencia de evidencia de rechazo mediado por células T (143). Sin embargo, estos depósitos también se encontraron en el trasplante de mano bilateral publicado por Landin et al, en ausencia de rechazo y de AED (97). Además, en el estudio de Petruzzo et al, no se observó depósito C4d en el AVC a pesar de la presencia

de AED circulantes (144). Por tanto, la tinción positiva para C4d no es necesaria para el diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos en TOS y su papel en los AVC permanece incierta (141,145). Por otra parte, la ausencia de AED en receptores con AVC con características histológicas compatibles con rechazo mediado por anticuerpos, podría deberse a que los AED son indetectables en la circulación, a que las lesiones vasculares se deban a anticuerpos no HLA que no son detectados por los dispositivos actuales, o a que las lesiones vasculares sean debidas a células T o efectoras de la inmunidad innata como a las células NK (146–148).

Diagnóstico y opciones terapéuticas

La monitorización del alotrasplante para la detección temprana del RA se lleva a cabo a través de la inspección clínica y, en última estancia, se confirma mediante la biopsia cutánea (132). A continuación, se establece la gravedad de acuerdo a la clasificación de Banff para los AVC, a partir de los hallazgos descriptivos encontrados en la sección de las biopsias preparadas mediante tinción con hematoxilina-eosina. Esta clasificación establece 5 grados que van desde los agregados linfocitarios perivasculares aislados en la epidermis en grados leves, a necrosis de los queratinocitos basales con despegamiento dermo-epidérmico y, finalmente, necrosis con pérdida de la epidermis en estadios avanzados (136) (ver *Tabla 2*).

<p>Grado 0. Ninguno o pocos infiltrados inflamatorios</p> <p>Grado I. Leve. Infiltración perivascular leve. No hay afectación de la epidermis.</p> <p>Grado II. Moderado. Inflamación perivascular de moderada a grave con o sin afectación epidérmica y/o anexial leve (limitada a espongirosis y exocitosis). No hay disqueratosis epidérmica ni apoptosis.</p> <p>Grado III. Grave. Inflamación densa y afectación epidérmica con apoptosis epitelial, disqueratosis y/o queratinolisis.</p> <p>Grado IV. RA necrosante. Necrosis franca de la epidermis u otras estructuras de la piel.</p>
--

Tabla 2: Clasificación de Banff 2007 para los AVC. RA: rechazo agudo

Con la inmunosupresión moderna, la pérdida del órgano trasplantado por un episodio de RA es un fenómeno muy poco frecuente. En una revisión sistemática publicada por Bonastre et al se observó que, aunque la tasa de episodios de RA era alta (89%), todos los episodios fueron correctamente revertidos independientemente del protocolo “antirrechazo” empleado (69). La mayoría de los casos ocurren por falta de cumplimiento terapéutico, o por descenso en los niveles de fármacos inmunosupresores de mantenimiento secundario a sus efectos adversos (149). Los episodios de RA deben ser tratados de forma inmediata, ya que la activación prolongada de los mecanismos inmunitarios efectores hace difícil el tratamiento a posteriori. Se ha comprobado que en el 90% de los casos de trasplantes de miembro superior y en el 81% de los trasplantes faciales que sufrieron RA, el tratamiento con bolos de corticoesteroides fue suficiente para frenar el rechazo (149,150). En los TOS, por el contrario, la terapia con corticoides junto al aumento de la dosis de inmunosupresores solo consiguió revertir el 60-75% de los casos; por ello, a la vista de estos resultados, parece que el AVC responde mejor al

tratamiento de RA mediante bolos de corticoides que el TOS (151). En algunos centros, se ha intentado asociar con tratamiento inmunosupresor tópico. Éste ha demostrado ser eficaz en la prevención de la EICH y en enfermedades alérgicas y autoinmunes de la piel, pero aún no se ha probado su eficacia en el RA del AVC (152,153).

A pesar del éxito del tratamiento con corticoides, se ha visto que 7,5% y 19% de los trasplantes de mano y cara respectivamente, son resistentes a corticoides (149,150). Estos casos pueden deberse a rechazo mediado por anticuerpos (154). Si se confirma, el tratamiento debe dirigirse a eliminar los anticuerpos de la circulación mediante plasmaféresis o inmunoadsorción con Ig intravenosa; disminuir el título de anticuerpos con bortezomib o rituximab, o emplear inhibidores del complemento (eculizumab) para limitar el daño mediado por anticuerpos (143).

La prevención del RA se lleva a cabo mediante la terapia de inducción, que consiste en la administración de globulina antitimocito (ATG, del inglés *Antithymocyte globulin*), basiliximab o alemtuzumab. En un estudio comparativo, entre alemtuzumab y ATG, realizado por Landin et al, no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos en la prevención del RA en el AVC (97). La mayoría de terapias de inducción van dirigidas a la prevención del RA celular, pero debemos tener en cuenta la posibilidad del RA humoral. La prevención del rechazo humoral se basa en la detección de autoanticuerpos y la realización de pruebas cruzadas para linfocitos T y B pre-trasplante (133). La presencia de autoanticuerpos se puede sospechar ante la historia de posibles episodios de sensibilización previos: historia de transfusiones, embarazo u otro trasplante previo (124). Aunque parece improbable, estas características podrían presentarse frecuentemente en pacientes que esperan un AVC, ya que han sufrido accidentes graves con amputaciones o defectos faciales, que pueden haber requerido transfusiones de sangre o el uso aloinjertos de piel como cobertura temporal. Para estos

pacientes se puede inducir una desensibilización eliminando los anticuerpos circulantes. Esto se consigue mediante un protocolo de recambio plasmático total y la administración de Ig intravenosa (124). No obstante, hay que tener en cuenta que este protocolo aumenta el riesgo de otras complicaciones como infecciones, neoplasias o sangrado (155).

1.4.5 Inmunosupresión

Actualmente, no hay un régimen de inmunosupresión estándar para el AVC, de forma que los empleados en este tipo de trasplante se basan en la experiencia en el TOS (156). Generalmente, se utilizan terapias combinadas mediante triple inmunosupresión, lo cual permite actuar a diferentes niveles produciendo un efecto sinérgico y reducir la dosis de cada uno de ellos por separado. En la práctica clínica nos encontramos dos grandes grupos de combinación o regímenes de tratamiento inmunosupresor atendiendo al momento de administración: regímenes de inducción y regímenes de mantenimiento.

a. Terapia de inducción:

El régimen de inducción consiste en la administración de fármacos para conseguir una inmunosupresión intensa a corto plazo durante el periodo perioperatorio y posoperatorio inmediato. Los objetivos fundamentales de este régimen son la reducción de la incidencia de RA y la disminución de la dosis de la terapia de mantenimiento para evitar efectos secundarios adversos. Para ello, habitualmente se utiliza una preparación de anticuerpos inmunomoduladores junto a altas dosis de corticoides, con la intención de atenuar la respuesta aloinmune inmediata (sobre todo de los linfocitos T), que se produce en el momento del trasplante. Dentro de los tipos de agentes empleados destacan los antagonistas del receptor de IL-2 (Basiliximab), las globulinas antitimocito (ATG) y los anticuerpos anti-CD52 (Alemtuzumab). Independientemente del tipo de AVC, la mayoría

de los trasplantes realizados hasta la fecha han recibido alguno de estos agentes como terapia de inducción. El grupo de Schneeberger et al describió, en su estudio de 5 pacientes, un protocolo antirrechazo para minimizar la inmunosupresión utilizando Alemtuzumab como terapia de inducción (142). De los pacientes receptores de trasplante de miembro superior del programa de Louisville, el 80% (8 pacientes) demostraron excelentes resultados con la terapia de inducción, en términos de ausencia de RA. De los 10 pacientes del programa, 2 recibieron Baxiliximab, 4 recibieron Alemtuzumab y 4 recibieron ATG recombinante de conejo. De los alotrasplantes que fracasaron, uno tuvo lugar en el día 5 postoperatorio por razones técnicas y otro a los 9 meses por vasculopatía grave (3). El grupo de Lyon empleó únicamente como tratamiento de inducción la monoterapia con ATG junto a los corticoides, y describieron 2 episodios de RA caracterizados por lesiones focales maculopapulares asintomáticas en los días 53 y 82 postrasplante (157). Por su parte el grupo de Sosin et al, empleó con éxito como terapia de inducción ATG en combinación a un agente con acción reductora de células B (Rituximab) con el objetivo de minimizar el rechazo humoral que pudiera ocurrir. No se describieron episodios de RA en la evolución del paciente (158).

b. Terapia de mantenimiento

Aunque no hay un protocolo de terapia de mantenimiento estándar tras la realización de un AVC, parece que la mayoría de los equipos utilizan regímenes basados en los empleados para los TOS. Esto es, inmunosupresión basada en la combinación de FK-506, MMF y prednisona (159–162).

El MMF inhibe la proliferación de linfocitos al interferir con la síntesis de nucleótidos de guanina. La dosis habitualmente empleada son 2 gramos diarios divididos en 2 dosis (163). En caso de intolerancia gastrointestinal, se puede sustituir por

micofenolato sódico, fármaco recubierto con una película gastrorresistente, diseñada para proteger el tracto gastrointestinal superior de los efectos secundarios relacionados con el ácido micofenólico (164). Se ha visto una buena tolerancia a la reducción de la dosis en AVC, y en algunos casos se ha logrado su interrupción completa (163,165). Por ejemplo, en el estudio de Johannesson et al, en 3 de 7 trasplantes de útero se logró la interrupción completa del MMF a los 6 meses. En las otras 4 pacientes, la inflamación del trasplante requirió tratamiento de rescate con azatioprina y prednisona (26). Atendiendo al protocolo para AVC de Louisville, todos los pacientes recibieron junto con el tratamiento de inducción ya comentado, la triple terapia basada en FK506, MMF y prednisona como terapia de mantenimiento durante un año. A los 2-3 meses del trasplante, una vez comprobada la presencia de consolidación ósea, se cambió el MMF por sirolimus como terapia de mantenimiento debido a las ventajas antiproliferativas de este último, minimizando el riesgo de vasculopatía y neoplasias (166–168).

Los corticoides son utilizados en altas dosis (500-1000 mg de metilprednisolona) como régimen de inducción. A continuación, se suele reducir la dosis y su administración pasar a vía oral diaria como terapia de mantenimiento (10-20 mg al día) (163). Con el tiempo se puede ir reduciendo la dosis a 2,5-5 mg e incluso cesar por completo y con éxito su administración como se describen en los programas de trasplante de miembro superior de Innsbruck, Louisville y Polonia (160–162). En el grupo de Boston, también se logró la supresión completa de los corticoides en los 6 trasplantes faciales (169). Por otra parte, en algunas series se ha podido obviar el uso de corticoides, como se llevó a cabo en el protocolo de Pittsburgh donde la inducción con Alemtuzumab junto con la transfusión de médula ósea de donante en el día 14 postrasplante, permitió la omisión de corticoides en la posterior terapia de mantenimiento (170).

La CsA es un endecapéptido cíclico, aislado del hongo *Tolypocladium inflatum gams* en 1972 (171). Este fármaco actúa como inmunosupresor específico de células T, y su mecanismo de acción es a través de su unión a la ciclofilina (172). Esta unión forma un complejo de gran afinidad con el complejo calcineurina-calmodulina y bloquea la fosforilación dependiente de calcio y la activación de NF-AT. Este proceso también interrumpe otros genes que son críticos para la activación de la célula T. Además, la CsA aumenta la transcripción de TGF- β , el cual regula a la baja la activación de la célula T (171). El efecto de la CsA es reversible ya que bloquea la señal de transducción del RCT pero no inhibe las señales coestimuladoras (173). Los efectos de la CsA pueden ser contrarrestados con la administración exógena de IL-2, debido a que la ciclosporina no es efectiva si el rechazo se está produciendo. En otras palabras, es útil como agente de mantenimiento, pero es ineficaz como rescate de un RA. Cabe destacar que la CsA tiene una importante toxicidad. Presenta un gran poder vasoconstrictor en las arteriolas proximales del riñón, haciendo que disminuya el flujo renal alrededor de un 30% (174). Esto efectos pueden conllevar a la fibrosis e hiperkaliemia, y terminar en una necrosis tubular aguda (175). Así mismo, tiene efectos adversos neurológicos, como temblor, parestesias, cefalea, depresión, confusión y convulsiones (176). Por todo ello el uso de ciclosporina a nivel clínico ha sido reemplazado por FK-506.

El FK506 es un inhibidor de la calcineurina, con el mismo mecanismo de acción de la CsA (177). Es empleado en casi todos los regímenes de mantenimiento de los AVCs. Los niveles iniciales varían de un programa a otro, desde objetivos de niveles plasmáticos de 20-25 ng/ml a 8-15 ng/ml (estos últimos más parecidos a los requeridos en el TOS) (3). Lo que sí es común, es el objetivo de reducción progresiva del FK506 con el paso del tiempo para minimizar y/o prevenir los efectos secundarios. Aunque se ha demostrado que la nefrotoxicidad del FK506 es menor que el de la CsA, no está exento de efectos

secundarios no tolerables, como el mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus insulino-dependiente (178). Este hecho junto con el fracaso en la prevención del rechazo mediado por AED o en el rechazo crónico, ha llevado a la búsqueda de nuevos inmunosupresores que puedan actuar en su lugar como terapia de mantenimiento.

El belatacept (CTLA4-Ig) actúa inhibiendo la activación de los linfocitos T por bloqueo de la unión del coestimulador B7 al CD28 de los linfocitos T. Los resultados del ensayo clínico BENEFIT demostraron una mejoría en la supervivencia y la función a largo plazo del trasplante renal en comparación con la CsA (179). Este ensayo condujo a su investigación en el campo de los AVC. La primera aplicación se llevó a cabo por el grupo de Cendales et al, que ante un caso de alotrasplante de mano que presentó episodios recurrentes de RA y desarrollo nefrotoxicidad por FK506, se decidió emplear con éxito una nueva terapia de mantenimiento con sirolimus y belatacept (180). Poco después, el grupo de Austria empleó el belatacept como régimen de mantenimiento en 4 pacientes intervenidos de AVC de miembro superior. Tres de estos pacientes lo toleraron bien permitiendo una reducción de la dosis de los inhibidores de la calcineurina. Sin embargo el cuarto paciente presentó episodios de RA mediado por anticuerpos, dando lugar a la pérdida del trasplante 11 meses después (181). En esta misma línea se está investigando el desarrollo de agentes que intervengan en la regulación y coestimulación de la célula T, como es el caso del FR104. Se trata de un anticuerpo monoclonal pegilado que inhibe la interacción CD28-CD80/86 sin interaccionar con la unión de CTLA4-B7, y presenta resultados preclínicos prometedores (182,183).

El desafío de la inmunosupresión en el trasplante es mantener el equilibrio entre las complicaciones por toxicidad y el RA. Los problemas relacionados con el tratamiento inmunosupresor se pueden clasificar en 2 grupos: aquellos que aparecen por toxicidad directa del fármaco, y aquellos asociados a la depresión del sistema inmune. En relación

con los primeros, son bien conocidos los efectos nefrotóxicos de los inhibidores de la calcineurina y la prednisona, así como la diabetes asociada a FK506 y prednisona, solos o en combinación (175,184).

La inmunodeficiencia secundaria a los inmunosupresores produce infecciones y enfermedades tumorales, que se asocian más a la intensidad de la inmunodepresión que al fármaco empleado (185) En una revisión sistemática publicada por Conrad et al desde 1998 hasta 2016, se observó una incidencia de 50,8% de infecciones, siendo la infección temprana (primeros 6 meses) en los AVC de miembro superior significativamente mayor que los pacientes con trasplante renal (186). Además, dentro de las infecciones, las mucocutáneas fueron las predominantes de manera significativa en los AVC (186). Dentro de los microorganismos causales más frecuentes encontramos las infecciones por *Candida spp*, *Malassezia furfur*, virus herpes simplex, varicela zoster y virus del papiloma humano (186). La supresión del sistema inmune también implica una pérdida de vigilancia antitumoral con el riesgo de transformación neoplásica que ello implica. Así, se han descrito trastornos linfoproliferativos postrasplante, linfomas de zona marginal, tumores de músculo liso asociados a virus de Epstein-Barr o displasia de cérvix severa, entre otros (185,187).

1.5.Tolerancia inmunitaria

1.5.1 Concepto

Los efectos secundarios asociados a la medicación inmunosupresora pueden no ser asumibles en pacientes candidatos a un AVC, que a diferencia de los pacientes sometidos a un TOS, no se encuentran generalmente en situación de riesgo vital (188). Entre las posibles alternativas a la inmunosupresión, se encuentran la modulación de los aloinjertos para reducir su inmunogenicidad, la depleción de linfocitos pasajeros, el trasplante a sitios

inmunoprivilegiados (como el timo o los testículos), o la inducción de un estado de tolerancia inmunitaria (189). Clínicamente, la tolerancia se define como la supervivencia de un tejido extraño en un receptor sin la necesidad de inmunosupresión a largo plazo. Desde el punto de vista inmunológico, se caracteriza por no presentar una respuesta inmunitaria detectable en ausencia de medicación inmunosupresora (190). Así mismo, en un estado de tolerancia, el receptor debe ser capaz de responder a otros estímulos inmunes. Actualmente, el alcanzar un estado de tolerancia es la alternativa a la inmunosupresión que más desarrollo y aplicabilidad tiene, pudiendo llegar a obviar la necesidad de medicación inmunosupresora y a disminuir o incluso eliminar los episodios de RA (190,191).

Como se ha mencionado previamente, el desarrollo de rechazo a alotransplantes esta mediado, en su mayoría, por la vertiente adaptativa del sistema inmune, constituida por los linfocitos T y B (192,193). Por tanto, la generación de tolerancia debe ir dirigida a estos subtipos celulares. Existen fundamentalmente dos mecanismos de tolerancia: central y periférica.

Tolerancia central

Los linfocitos producidos en la médula ósea, migran al timo donde pasan un proceso de selección denominado deleción clonal. Existen 2 tipos de deleción clonal: la selección positiva y la selección negativa. En la selección positiva, los timocitos son expuestos a antígenos propios por las CPA, y son seleccionados aquellos cuyo receptor (RCT) reconoce las moléculas del CMH tipo I y II asociado a los antígenos. En la selección negativa, los timocitos que expresan un RCT con gran avidez por los antígenos propios presentados por el CMH tipo I en las CPA del timo, son eliminados para prevenir fenómenos autoinmunes (45,194,195). Aunque en el timo las células T son expuestas a

numerosos antígenos gracias a la proteína reguladora autoinmune, es imposible expresar todos los antígenos propios en las células epiteliales del timo, por lo que, de manera inevitable, algunos clones autorreactivos escapan a la selección negativa. Por ello, se requieren mecanismos de tolerancia a nivel periférico (194).

Tolerancia periférica

Su objetivo principal es garantizar la tolerancia de los linfocitos T a autoantígenos específicos de tejidos que no son abundantes en el timo, y por tanto escapan a la tolerancia central. Existen varios mecanismos de tolerancia periférica. El primer mecanismo para evitar la autorreactividad es mantener apartados los antígenos específicos de los tejidos de los linfocitos T vírgenes, lo cual se logra mediante una regulación de los receptores CCR7 y CD62L que dirigen al linfocito desde la sangre a los ganglios linfáticos y de vuelta a la sangre, impidiendo su entrada a tejidos periféricos donde se encontrarán con antígenos propios (196). El segundo mecanismo es la anergia, que consiste en un estado de inactividad funcional de los linfocitos que se produce cuando estos reconocen antígenos peptídicos presentados por la CPA, pero sin las señales coestimuladoras necesarias para reaccionar (como la interacción de CD40 y CD40 L ó CD28 y B27). Al no recibir todos los estímulos necesarios para la activación, los linfocitos se quedan en un estado de inactividad permanente y terminan sufriendo una apoptosis celular (231). El tercer mecanismo de control es la delección periférica de los linfocitos mediante muerte celular inducida por activación. La estimulación repetida de los linfocitos por antígenos persistentes provoca la apoptosis de los mismos mediante la co-expresión de las moléculas de superficie Fas (CD95) y Fas ligando (196,198). Por último, el cuarto mecanismo de tolerancia periférica es la supresión. Ésta es llevada a cabo por los linfocitos T reguladores, una población heterogénea que comprende varias

subpoblaciones entre las que se incluyen los linfocitos T CD4⁺ que expresan CD25 y FoxP₃ (Treg) y linfocitos Th₃ y Tr1, encargados de suprimir la respuesta inmune tras procesos inflamatorios para evitar respuestas exageradas o descontroladas. Son células antígeno específicas, que actúan mediante citoquinas antiinflamatorias (IL-1, IL-10, TGF-β), y por contacto célula-célula (199,200).

1.5.2 Modelos de tolerancia clínica y experimental

Los modelos para lograr un estado de tolerancia se basan en la manipulación del sistema inmunitario del receptor para que reconozca al tejido del donante como propio. Se pueden agrupar en 2 categorías: la que alcanza un quimerismo completo y la que logra un quimerismo mixto. La primera supone reemplazar completamente el sistema inmunitario del receptor por células del donante, de forma que el sistema inmunitario pasa a ser donante y reconoce al aloinjerto como propio, consiguiendo así alcanzar un estado de quimerismo completo. Los esfuerzos iniciales para generar tolerancia utilizaban esta estrategia, donde se eliminaba el sistema inmunitario del receptor, seguido de la infusión de precursores hematopoyéticos del donante para reconstituir el sistema inmune. Esto se consigue mediante regímenes de condicionamiento mieloablativos, y tiene 2 objetivos. El primero es conseguir una inmunosupresión suficiente en el receptor que evite el rechazo del trasplante; el segundo es permitir la viabilidad del injerto de las células hematoyéticas/inmunes del donante. Los primeros regímenes de condicionamiento consistieron en la aplicación de radiación corporal total, sola o en combinación con ciclofosfamida, seguido de un trasplante de medula ósea del donante (201). Solo una dosis de RCT de 950 centigrays (cGy) es suficiente para que el injerto de medula ósea alogénica prenda, sin necesidad de ningún tipo de inmunosupresión adicional (202). Otros regímenes mieloablativos desarrollados posteriormente, emplean ciclofosfamida u otro agente quimioterápico como etopósido, citarabina o melfalán en combinación con RCT,

o bien el uso de agentes quimioterápicos en combinación, con ciclofosfamida y busulfán, sin RCT asociada (203). La posterior reconstitución del sistema inmune se lleva a cabo mediante el trasplante de médula ósea (TMO) vascularizada, ya que ha demostrado ser la mejor fuente para la reconstitución de la médula ósea, respecto a la infusión de progenitores hematopoyéticos de manera aislada (204).

Dentro de este grupo de condicionamiento pretrasplante podemos encontrar diferentes trabajos (202,204–209). El estudio publicado por Foster et al, representa el primer modelo de trasplante de pata trasera de rata publicado que demuestra la supervivencia del AVC libre de rechazo sin requerir inmunosupresión a largo plazo (208). En el caso del estudio de Gorantla et al, llevado a cabo poco después con un diseño similar, se obtuvieron resultados parecidos. Sin embargo, el éxito de estos trabajos se basa en el empleo de dosis de radiación mieloablativas, cuya morbilidad no es asumible en la actual trasplantología reconstructiva (210). Entre los efectos secundarios agudos ocasionados cabe destacar la pancitopenia, con los riesgos de anemia e infecciones que implica. Además, va a producir náuseas, vómitos, diarrea, pérdida del apetito, parotiditis y rash cutáneo (211). Entre los efectos tardíos podemos mencionar la neumonitis intersticial, la enfermedad veno-oclusiva hepática, las cataratas, la infertilidad, las alteraciones hormonales, la toxicidad ósea (y posterior osteoporosis) y las neoplasias secundarias (211). Además de la toxicidad, el hecho de destruir toda la población celular de la médula ósea receptora, hace que la nueva población celular donante con antígenos HLA diferentes, reaccione contra las células del huésped, ocasionando la temida EICH, que puede llegar a ser mortal (201). En el estudio de Foster et al, se observó que de los 31 animales del estudio sólo sobrevivieron 17. De las causas de deceso registradas, 2 fueron infecciones sistémicas y otras 2 fueron por EICH. En estos últimos, coincidió que la pata trasplantada no había recibido radiación previa (208). Siguiendo esta línea, el

grupo de Gorantla et al, observó que todos los AVC en los que no se había realizado radiación previa de la pata donante, sufrieron EICH (202). Por tanto, en ambos estudios se concluyó que la radiación de la pata donante previo al trasplante era un factor fundamental para la prevención de la EICH (202,208). En relación a esta afirmación, se ha visto que el daño que la radiación induce en el miembro trasplantado no es desestimable y puede aumentar el riesgo de rechazo si no se combina con tratamiento adyuvante (203). Hou et al, vieron en su estudio que la RCT aceleraba el rechazo del alotrasplante de pata trasera de rata en comparación con otros tratamientos inmunosupresores. Esto podría ser debido a la liberación de citoquinas proinflamatorias y la lesión endotelial tras la radiación, activando así la respuesta inmune (212).

Además de la toxicidad demostrada de la irradiación tanto del huésped como del miembro trasplantado donante, existe otro factor a tener en cuenta que hace poco factible la realización de una RCT en la práctica clínica. Esto es la falta de simultaneidad entre la RCT y el TMO con respecto a la realización del AVC, que en algunos estudios podría ser de un año (208). En el caso de los TOS podría ser posible ya que el donante suele ser un paciente vivo, pero en el caso del AVC no lo es, ya que el donante siempre es un donante cadáver. Para vencer este obstáculo, Prabhune et al llevaron a cabo un trasplante de medula ósea y de pata trasera en 37 ratas, de forma secuencial (a los 50-70 días del TMO) o simultánea, dependiendo del grupo de experimentación (202). De todos los animales del estudio, solo sobrevivieron 15 (40,5%) (202). De los supervivientes ninguno presentó episodios de RA ni de EICH y se lograron niveles de quimerismo altos (>80%) que persistieron a lo largo del estudio que tuvo 150 días de duración (202). Sin embargo, este posible éxito en la simultaneidad entre la RCT y el TMO se truncó por la aparición de los efectos adversos graves observados en los animales perdidos, destacando la pancitopenia intensa, un linfoma de bazo y otro en ganglios linfáticos (202).

La segunda opción para lograr tolerancia, consiste en reprogramar o redirigir el sistema inmunitario receptor para que coexistan ambas estirpes celulares, lográndose así un estado de quimerismo mixto (213). La ventaja de este enfoque, es que el acondicionamiento previo presenta menor toxicidad y menor posibilidad de desarrollar una EICH en el receptor. Entre las estrategias para conseguirlo, podemos encontrar el empleo de anticuerpos monoclonales que depleccionan la población de linfocitos T. Estos anticuerpos pueden ser monoclonales como aquellos dirigidos contra el receptor $\alpha\beta$ -RCT, el CD3 o el CD52, o bien policlonales como los anticuerpos antitimocito o el suero antilinfocítico. Otra estrategia sería bloquear la señal coestimuladora que desencadena la activación de los linfocitos T mediante anticuerpos (CTLA-4, LEA 29g) o inhibiendo la producción de IL-2b (antiCD25). Por último, otra opción sería el empleo de fármacos citotóxicos, pero a dosis no mieloablativas. Todas estas estrategias irían acompañadas de un trasplante de células hematopoyéticas que puede ser intravenoso, intraóseo o directamente mediante un trasplante vascularizado compuesto que contenga tejido óseo. El trasplante vascularizado de médula ósea proporciona al receptor tanto células hematopoyéticas como células estromales en su microambiente natural, lo cual ha

demostrado una mayor y más rápida repoblación celular respecto a la administración intravenosa o intraósea (214,215).

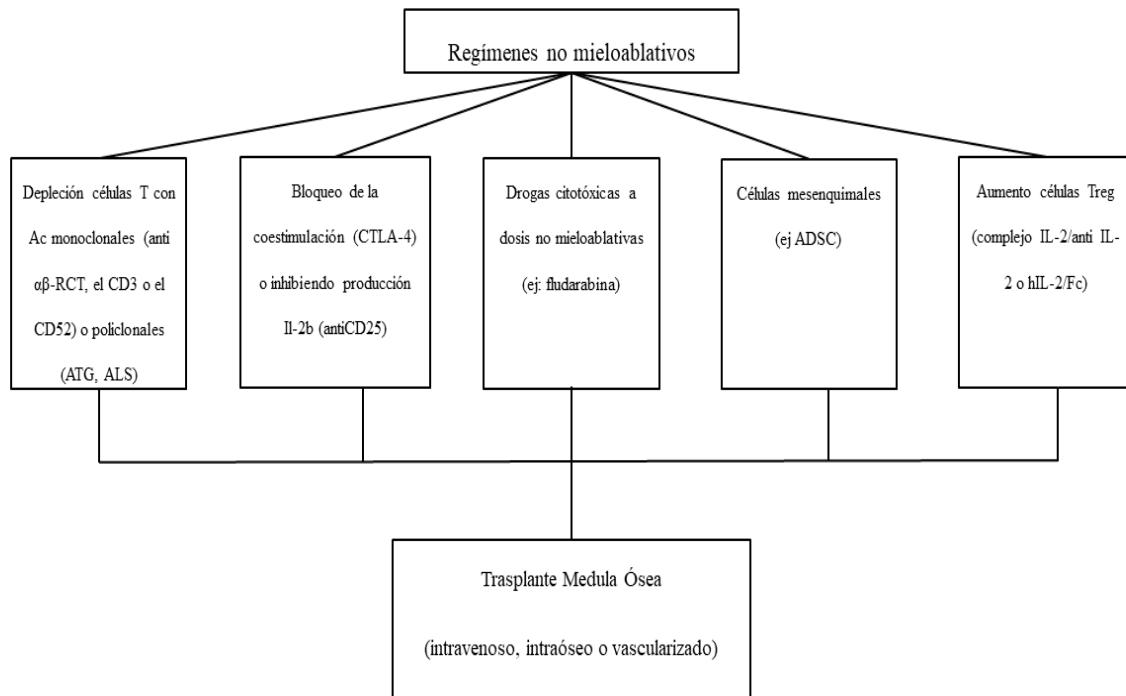


Figura 6: Protocolos de tolerancia no mieloablativos. Elaboración propia, basada en la fuente: Siemionow M, Nasir S. *Impact of donor bone marrow on survival of composite tissue allografts*. Annals of Plastic Surgery. 2008. Ac: anticuerpos. RCT: receptor célula T. ATG: del inglés antithymocyte globulin; globulina antitimocito. ALS: del inglés, antilymphocyte serum; suero antilinfocito. ADSC: del inglés adiposed-derived stem cells; células madre derivadas de tejido adiposo.

Como se ha mencionado previamente, las células T juegan un papel fundamental en la respuesta inmune del rechazo. La reducción o eliminación de estas células conllevaría la falta de reconocimiento de los antígenos HLA del donante y con ello evitaríamos teóricamente la puesta en marcha de la respuesta inmune del rechazo. Estas conclusiones se basan en estudios con ratones *nude* que carecían de células T, donde se vio que no rechazaban los aloinjertos (216). A partir de este estudio, se observó que el empleo de anticuerpos monoclonales contra el complejo RCT-CD3 prolongaban la

supervivencia del aloinjerto en un modelo de RA de trasplante cardiaco de ratón a rata (217).

En el campo del trasplante de tejido compuesto experimental se han llevado a cabo varios estudios en los que se provoca un agotamiento selectivo de células T mediante la administración de anticuerpos contra el receptor $\alpha\beta$ -RCT en combinación con CsA durante 3 semanas, logrando la tolerancia del trasplante (por encima de 300 días) y quimerismo estable y permanente. En estos estudios, la repoblación linfocitaria comenzaba a ser evidente a partir del segundo mes postrasplante (218–220). Otro método para reducir la población de linfocitos T es mediante el empleo de protocolos no selectivos con suero antilinfocito (ALS, del inglés antilymphocyte serum) y CsA. El ALS crea el nicho necesario en la médula ósea para la repoblación con médula ósea de donante, mientras que la CsA previene el rechazo inmediato del injerto. Esto permitió lograr la tolerancia del trasplante (más de 420 días) y alcanzar un quimerismo estable en modelos experimentales en ratas que habían recibido un protocolo de 21 días de ambos tratamientos (221). Otros protocolos no mieloablativos se basan en el bloqueo de moléculas coestimuladoras como CD28, CD154 o CTLA-4. CD28 y CD154 se expresan en las células T y tiene una función importante en la respuesta mediada por las mismas. La unión del antígeno CMH con el RCT y la molécula CD28 con CD80/86 (B7) presente en la CPA, desencadena un aumento de la producción de citoquinas así como la proliferación y diferenciación de células T vírgenes en células efectoras (222). El antígeno 4 del linfocito T citotóxico conocido como CTLA-4 (del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), es un receptor estructuralmente homólogo a CD28, que se expresa en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ recién activados; su función consiste en inhibir la activación de los linfocitos T al contrarrestar las señales liberadas por CD28. Por tanto, los anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 van a bloquear la señal coestimuladora comenzada

por CD28. En un estudio de Foster et al, emplearon anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 junto a FK-506, ALS, bajas dosis de radiación y TMO, consiguiendo supervivencia y quimerismo permanentes. Sin embargo, requirieron radiación previa y el TMO, y el alotrasplante se realizó con una diferencia de 4 semanas, por lo cual no es extrapolable a la práctica clínica de un AVC (223). Así mismo, el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T estimula la expresión del ligando de CD40 (CD40L o CD154) que se une al CD40 de la CPA. Esto estimula la expresión de la molécula B7 en las CPA y la secreción de citoquinas. Por tanto, la vía CD40 amplifica indirectamente la respuesta de los linfocitos T (224). Además, CD40 es una molécula de crucial importancia en la activación del linfocito B, ya que interacciona con CD40L del linfocito T helper, activando una señal imprescindible para la activación, proliferación y diferenciación del linfocito B (224). En el estudio de Tung et al combinaron anticuerpos contra CD40 y TMO, logrando un aumento de la supervivencia de la pata trasplantada ($67 \pm 16,4$ días), pero no alcanzando tolerancia y los niveles de quimerismo al mes de la cirugía fueron indetectables (225,226). En otro estudio de trasplante traqueal en ratones, donde se analizaba la presencia de enfermedad obliterante como signo de rechazo, el empleo del anticuerpo monoclonal contra el ligando CD40 demostró la ausencia de rechazo, sin evidenciar quimerismo persistente ni toxicidad (227).

El inconveniente de los protocolos no mieloablativos descritos hasta la fecha es que implican cierto grado de citoreducción, ya sea cuantitativa o funcional. Esto inevitablemente conlleva un periodo de inmunosupresión con los consiguientes riesgos que implica. El modelo de tolerancia ideal debería obviar protocolos de citorreducción. En base a esta premisa, se observó que había un grupo de células T denominadas células T reguladoras (Treg) ($CD4^+$, $CD25^+$, $FoxP3^+$) cuya misión es la de modular la respuesta inmune de los linfocitos. Esto lo llevan a cabo mediante la supresión de las células

dendríticas y la liberación de citoquinas como TGF- β , IL-10, IL-35. También producen granzimas A/B y perforinas que conducen a la lisis de las células T efectoras, así como ocasionan la deprivación de la IL-2 a través de la propia expresión de receptores de IL-2 de alta afinidad. Por último, dan lugar a la producción de metabolitos de Adenosin Monofosfato cíclico (AMPC) que conllevan alteraciones en el metaboloma de las células T efectoras (228). Por ello, el aumento de células Treg podría ser una alternativa a los modelos comentados previamente de tolerancia. En varios estudios con animales se llevó a cabo la administración de complejos IL-2/antiIL-2, aumentando el número de células Treg. Esto condujo a un aumento de la supervivencia del aloinjerto de extremidad posterior en rata, especialmente cuando se combinaba con la administración de rapamicina (229,230). Por otra parte, se observó que la administración de la proteína de fusión de IL-2 (hIL-2/Fc), aumentó también el número de células Tregs y además mejoró su capacidad supresora. En concreto, la capacidad de respuesta hacia otros antígenos permaneció intacta, lo que indicó una respuesta inmune específica indemne. Además, la medición de FoxP3⁺, INF- γ y Prfl, permitió predecir los episodios de rechazo bajo el tratamiento con hIL-2/Fc, ALS y CsA, lo cual permitiría la reducción supervisada de la inmunosupresión (231).

Otro mecanismo de inmunorregulación estudiado en el ámbito de la tolerancia es el empleo de células madre mesenquimales. Estas son células progenitoras multipotentes, no hematopoyéticas, que son capaces de diferenciarse a varios tipos de célula mesenquimal (232). Estudios previos han demostrado que no expresan las moléculas de coestimulación como B7-1, B7-2 y CD40. Por tanto, probablemente son incapaces de estimular a los linfocitos T alorreactivos (233,234). Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, sus acciones inmunomoduladoras, entre las que se incluyen la regulación de la actividad de las células T(235,236). En un modelo de trasplante de pata en cerdo se

demonstró que la administración de células mesenquimales sin TMO aumentaba la supervivencia del trasplante, lo cual se relacionó con un aumento del recuento de células T reguladoras (237). Sin embargo, la preparación de células mesenquimales a partir de médula ósea es tediosa y consume bastante tiempo. Para superar esta limitación se llevó a cabo un estudio en modelo de trasplante de pata de rata mediante la administración de células madre derivadas de tejido adiposo, cuya extracción es más fácil. En él, se observó un aumento de la supervivencia del alotrasplante (más de 150 días) en el grupo tratado con células madre de tejido adiposo junto con un ciclo corto de inmunosupresión con ALS (administrado 4 días antes y un día después del trasplante) y CsA (administrada durante 20 días tras la cirugía). Además, se demostró la modulación del sistema inmune a través de los cambios en la expresión de las citoquinas, con un aumento significativo de TGF- β e IL-10 y así como de las células Tregs (238).

A nivel clínico, los estudios de tolerancia son más limitados. En la actualidad existen varios ensayos clínicos, la mayoría en pacientes con trasplante renal, pero los hay también con trasplante hepático y de AVC(191,239–244). Aunque cada vez son más los estudios enfocados en los mecanismos de tolerancia periférica, la mayoría de los estudios clínicos publicados se centran en la tolerancia central mediante el trasplante de células hematopoyéticas.

La primera experiencia clínica de tolerancia en humanos se llevó a cabo en un paciente con fallo renal secundario a un mieloma múltiple. Se trasplantó de forma conjunta MO y un riñón, logrando establecer quimerismo hematológico y tolerancia al órgano trasplantado (245). A continuación, el grupo de Fudaba et al, llevaron a cabo un ensayo clínico con 6 pacientes con características similares al paciente previo (pacientes con insuficiencia renal terminal secundaria a mieloma múltiple) que recibieron un trasplante combinado de riñón y MO de hermanos con HLA idéntico. Como terapia de

inducción se empleó ciclofosfamida, irradiación tímica y ATG; se utilizó CsA como terapia de mantenimiento, que se disminuyó hasta suspenderse a los 60 días del trasplante, seguido de una infusión de leucocitos de donante (10^3 células T CD3⁺/kg). De los 6 pacientes, 2 presentaron quimerismo completo, pero ambos sufrieron EICH, por lo que continuaron con su inmunosupresión. Los otros 4 pacientes tuvieron quimerismo mixto transitorio detectable y solo uno presentó rechazo tras la suspensión de la CsA en el día 104 postrasplante, por lo que tuvo que volver a recibir inmunosupresión, aunque se pudo suspender al cabo del tiempo (a los 1,8 años). De esta forma, de los 6 pacientes, 4 pudieron suspender la medicación inmunosupresora habiendo generado tolerancia al trasplante renal y en todos los pacientes del ensayo la creatinina y función renal fueron normales (239). Tras el éxito de este último estudio, se realizaron otros similares, pero con pacientes sin enfermedades hematológicas (240,241,246–248). El grupo de Stanford (EEUU) es el que tiene más pacientes incluidos en ensayos clínicos. Se incluyeron 38 pacientes divididos en 3 cohortes en los que se realizó un trasplante de MO tras realizar el trasplante renal. En todas las cohortes se utilizaron regímenes inmunosupresores junto a irradiación linfóide total como terapia de inducción, que consistía en irradiar los ganglios del cuello, axila, mediastino, aórticos, ilíacos y pélvicos. Del total de pacientes se logró alcanzar la tolerancia y por tanto suspender la medicación inmunosupresora en 16 pacientes (240). El grupo de Massachusetts (EEUU), publicó los resultados obtenidos en 10 pacientes con trasplante de riñón y TMO. Para la inducción emplearon ciclofosfamida, antiCD2, CsA e irradiación tímica prequirúrgica. Tras la cirugía se continuó con FK-506 como terapia de mantenimiento, que se disminuyó hasta la suspensión entre 9-14 meses después del trasplante. Se logró el abandono de la inmunosupresión y, por tanto, la tolerancia al trasplante en 4 pacientes (240,247). El grupo de Northwestern (EEUU) llevó a cabo 19 trasplantes de riñón con un protocolo de inducción que consistió en fludarabina,

ciclofosfamida e irradiación corporal total el día antes del trasplante. A continuación, se realizó el trasplante renal seguido del trasplante de células madre hematopoyéticas y se continuó con la terapia de mantenimiento con MMF y FK-506. Se pudo suspender la medicación inmunosupresora en 12 pacientes, los cuales habían presentado quimerismo persistente, con biopsias renales sin signos de RA y función renal normal. No obstante, no se intentó suspender el tratamiento en los pacientes con quimerismo transitorio, al contrario que los otros grupos, en los que se lograron resultados aceptables en pacientes que perdieron el quimerismo en el primer mes postrasplante (241).

Con los resultados obtenidos en TOS, el intento de generar tolerancia se llevó al VCA, concretamente al trasplante de mano. Así en 2013, el grupo de Pittsburg (EEUU) llevó a cabo un ensayo clínico con 5 pacientes (2 de ellos recibieron trasplante bilateral de manos, otros 2 manos unilaterales y un paciente recibió un trasplante bilateral de mano/antebrazos) (142). Se administró alemtuzumab y metilprednisolona como terapia de inducción; y a continuación, el trasplante de miembro superior seguido del TMO en el día 14 postquirúrgico. La terapia de mantenimiento se realizó con FK-506 en monoterapia. No se detectó quimerismo persistente y no hubo casos de EICH. Todos los pacientes presentaron en algún momento episodios de RA, que fueron tratados con éxito mediante con corticoides intravenosos y la administración tópica de FK-506 /clobetasol. A destacar que todos los pacientes continúan con el trasplante empleando como terapia de mantenimiento el FK-506 a dosis bajas (4-12 ng/ml), mientras que la mayoría de pacientes con trasplante de miembro superior son manejados con triple terapia de mantenimiento (FK-506, MMF y corticoides) (249,250).

1.6. Inmunomodulación: Tolerancia a endotoxina

La inmunomodulación es la modificación del sistema inmunitario mediante el empleo de sustancias de origen bien biológico o químico. En algunos casos el objetivo será aumentar la intensidad de la respuesta inmune como en casos de inmunosupresión patológica o infecciones, y en otros será reducirla, como en el caso de los trasplantes para generar tolerancia o en enfermedades autoinmunes, estados alérgicos, etc.

Las células del sistema inmune innato detectan y responden a “señales de peligro” (como patógenos o daño tisular) a través de los RRP expresados en la superficie de las células (251). El receptor tipo Toll 4 (TLR-4, del inglés *Toll Like Receptor 4*) es el RRP predominante en la detección de bacterias gram negativas y sus endotoxinas asociadas (como el lipopolisacárido [LPS] o lípido A) (252). El inicio y la finalización de una respuesta inmunitaria deben estar correctamente reguladas ya que, de lo contrario, una respuesta inflamatoria sin control puede conducir a su generalización, y derivar en un cuadro patológico como la sepsis, las enfermedades autoinmunes o el cáncer (253). En este sentido, la regulación de este estado inflamatorio es un mecanismo de protección frente al shock endotóxico. Uno de estos mecanismos clásicos de protección es la tolerancia a endotoxina (TE), definida como un fenómeno biológico que consiste en una reprogramación de las células del sistema inmune para responder de forma alternativa a las endotoxinas bacterianas después de una exposición inicial a este estímulo (254). No constituye una supresión completa del sistema inmune, sino más bien una reprogramación de las células del sistema inmune innato que da lugar a una activación alternativa de las mismas, desencadenando unos mecanismos diferentes a los usuales. Tiene lugar como resultado de la estimulación persistente del TLR, no sólo por LPS sino también por otros agonistas de TLR e incluso por mediadores inflamatorios independientes de TLR (254). El mecanismo por el cual la exposición a un ligando particular de TLR u otros mediadores

inflamatorios como las citoquinas reducen la respuesta inflamatoria a diferentes ligandos de TLR, se conoce como tolerancia cruzada y tolerancia inducida por citoquinas respectivamente (255).

El primer artículo publicado sobre TE fue escrito por Paul Beeson en 1964. En su estudio en conejos, se realizó una inoculación repetida de vacunas contra la fiebre tifoidea, lo cual dio lugar a una reducción significativa de la fiebre inducida por dicha vacuna (256). Posteriormente, estudios experimentales con ratones mostraron que dosis de LPS subletales administradas de forma repetida, protegían frente a una dosis letal de endotoxina administrada más tarde (257). A partir de estos hallazgos, se llevaron a cabo estudios in vitro donde se observó que la exposición a LPS durante una hora era tiempo suficiente para desencadenar la TE. Sin embargo, el estado refractario de la célula no era permanente, si no que volvía a su fenotipo de respuesta proinflamatorio a un nuevo estímulo con LPS al cabo de 5 días aproximadamente (258). Esto implica que las células del sistema inmune innato podrían presentar una memoria inmunitaria y, por tanto, su respuesta no ser inespecífica, pudiendo estar regulado por factores epigenéticos (259). Así mismo, se observó una regulación a la baja de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1b, CCL3, CCL4 y CXCL10, y una sobreexpresión de citoquinas antiinflamatorias (como IL-10, TGF- β , e IL-1RA), receptores de lectina tipo C como MARCO, CLEC4a y CD64, reguladores negativos como IRAK-M (del inglés, *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase M*; Kinasa asociada al receptor de IL-1) y una variedad de genes antimicrobianos (FPR1, AOA1, RNASET2) (258,260). Además, se observó que los macrófagos en estado de TE presentan una actividad fagocítica mayor, asociada a la sobreexpresión de su receptor de superficie CD64, aunque con una capacidad de presentación de antígenos deteriorada debido a la menor expresión de CMH-II, siendo incapaces de pasar a la respuesta adaptativa o específica (254,258). A partir de

los estudios *in vitro* se empezaron a realizar estudios *in vivo* en modelos murinos, que confirmaron la relevancia fisiológica del proceso de tolerancia y han apoyado los datos obtenidos *in vitro*, así como han ayudado a discernir la contribución de los distintos tipos de células al resultado final de la TE (261–263). Posteriormente se llevaron a cabo estudios de TE *in vivo* en humanos, a los que se administró LPS (aproximadamente 1 ng/kg peso corporal) y se controló su respuesta. Se observaron reducciones de las citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6) pero también de las citoquinas antiinflamatorias (IL-10 e IL-1RA), lo cual sugiere que, en condiciones de TE *in vivo*, la respuesta en general es mucho más compleja de lo que indican los estudios *in vitro*. Esto podría ser debido a la participación de otros grupos celulares, como los neutrófilos, que habitualmente no son tenidos en cuenta en estudios *in vitro* (261–263).

1.6.1 Fisiopatología

A nivel clínico la primera referencia de la TE se observó en pacientes con sepsis, donde se vio que había una desregulación de la respuesta inflamatoria inmediata tras la infección sistémica por bacterias gram negativas (264). Se distinguen 2 fases, la primera donde los pacientes sufren una respuesta inflamatoria masiva conocida como Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS, del inglés *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), seguida de una segunda etapa antiinflamatoria de compensación (257). Esta segunda etapa es la manifestación clínica de la TE, conocida como Síndrome de Respuesta Compensatoria Antiinflamatoria (CARS, del inglés *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*). Clínicamente, este estado se ha relacionado con un alto riesgo de infección secundaria y muerte (265). La TE supone un cambio en el fenotipo celular de pro-inflamatorio a anti-inflamatorio (266). Las células del sistema inmune innato son reprogramadas, de forma que producen una menor cantidad de mediadores inflamatorios (como TNF- α , IL-12, IL-23, IL-6), expresando mayor

concentración de citoquinas antiinflamatorias al ser expuestas a estímulos secundarios del TLR (254). Así mismo, presentan una menor capacidad de presentación de antígenos por una menor expresión de CMH de clase II (CD86) y CIITA (254,258). Por otra parte, la sobreexpresión de factores antiinflamatorios como la IL-10 es un aspecto controvertido, ya que muchos autores han afirmado que su papel es crucial en la TE mientras que otros no opinan lo mismo (259,267). En esta línea se ha visto que ratones sin capacidad de expresión de IL-10 pueden reproducir el estado de TE, por lo que otros factores antiinflamatorios deben contribuir a su desarrollo (como TGF- β , IL-1RA, SLPI, glucocorticoides, etc) (259).

La TE se ha observado también en otras patologías como la fibrosis quística, el síndrome coronario agudo, los ictus o en los procesos cancerígenos. En la fibrosis quística, la mutación de la proteína CFTR (Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística, del inglés, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), afecta de forma predominante al epitelio exocrino, siendo los órganos más frecuentemente afectados el pulmón, el páncreas, el hígado, el intestino y el páncreas exocrino (268). La morbilidad y mortalidad de estos pacientes es con frecuencia resultado de infecciones crónicas de la vía aérea baja. Las infecciones polimicrobianas recurrentes causan un deterioro progresivo del tejido pulmonar, acabando en fracaso respiratorio y muerte en el 90% de los pacientes (268). Se han visto concentraciones altas de LPS en el plasma y el aislamiento de monocitos circulantes ha demostrado una capacidad de expresión citoquinas inflamatorias disminuida, un aumento de la fagocitosis, una disminución de la expresión de HLA-II, una disminución de la capacidad de presentación de antígenos y una expresión baja de los niveles de TREM-1 (del inglés, *Triggering receptors expressed on myeloid cell 1*; receptores de activación expresados en células mieloides 1) (258,269). Todos estos datos indican que los pacientes con fibrosis

quística se encuentran bloqueados en un estado de TE, que evitaría una tormenta de citoquinas permanente la cual comprometería su supervivencia (259).

En el síndrome coronario agudo el sistema inmune innato juega un papel fundamental en la progresión de las placas ateroscleróticas y en la remodelación del miocardio infartado (270,271). Los macrófagos circulantes durante las 3 primeras horas tras el infarto muestran un fenotipo proinflamatorio con regulación al alza de TNF- α , exponiendo niveles elevados de IRAK-M (272). Esto último da lugar, a nivel molecular, a una regulación negativa de la respuesta proinflamatoria. Por ello, horas después del infarto se ha comprobado que se produce un cambio en la respuesta a un fenotipo antiinflamatorio (272). Así mismo, se ha visto que los pacientes estudiados en los que los macrófagos presentaban un fenotipo de TE (por ejemplo, expresión disminuida del CMH-II o una capacidad de presentación de antígenos disminuida), tenían más probabilidad de reingresar por infección en los 3 meses siguientes (259). Esto es un ejemplo claro de heterotolerancia, donde el sistema inmune innato del paciente falla a la hora de reaccionar contra un patógeno externo al que no se había expuesto previamente. Algo similar ocurre en pacientes con ictus, donde un tercio fallecen a consecuencia de factores no relacionados directamente con la patología de base, como puede ser una infección secundaria (259,273).

Por otra parte, se ha visto que las células del sistema inmune innato en pacientes con leucemia linfática crónica muestran características de TE (274). Los macrófagos se vuelven tolerantes al tumor, disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias mediado por la regulación de IRAK-M (275). Así mismo, disminuye la expresión de HLA II, CIITA, disminuye la capacidad de presentación de antígenos y aumenta la capacidad fagocítica de los mismos (276). Todo ello podría explicar el alto riesgo de infecciones

secundarias que presentan estos pacientes, asumiendo una tolerancia cruzada como hemos visto previamente (259,277).

Mientras que en la sepsis los pacientes están expuestos a endotoxinas bacterianas, en el resto de patologías mencionadas se encuentran libres de éstas. En estas patologías DAMPs como HMGB1 (del inglés, *chromatin-associated protein high-mobility group box 1*; proteína de alta movilidad del grupo 1 asociada a la cromatina) y las células tumorales, respectivamente, podrían ser las responsables de la reprogramación del sistema inmune innato impulsándolo a un estado de TE (254).

1.6.2 Mecanismos moleculares

El mecanismo de la TE está regulado por complejas vías moleculares en macrófagos y otras células del sistema inmune innato. Estas vías moleculares están controladas por la modulación intracelular de proteínas de señalización, así como por ARN no codificados (ARNnc), como microARNs y ARNlnc (ARN no codificado grande).

La señalización a través de la vía TLR4 es una de los principales mecanismos moleculares de detección de bacterias gram negativas y sus toxinas, empleando 2 vías intracelulares diferentes: MyD88 y TRIF (252). A través de la vía MyD88 se produce la transcripción del factor NF- κ B, así como de genes implicados en la producción de citoquinas proinflamatorias (TNFA, IL1B, IL6, IL12B). La vía TRIF activa la transcripción de los factores IRF3 (del inglés, *Interferon Regulatory Factor 3*; Factor 3 de regulación del interferón) y STAT1, los cuales van a inducir la expresión de INF- β , CCL5 y CXCL10 (252,278). Se ha comprobado en estudios *in vitro* que la TE asocia a una disminución de la actividad de la vía My-D88, con el consiguiente empeoramiento en la actividad de IRAK-1, defecto en la activación de MAPKs y de NF- κ B. Mientras, la vía TRIF permanecería como vía predominante, aumentando la expresión de genes como INF- β y CCL5, así como un aumento de la expresión de IL-10 (a través de TRAF3 e IFN-

I) (278). Por otra parte, diferentes estudios han profundizado en la regulación interna de las vías mencionadas, descubriendo nuevos roles en diferentes moléculas como SHIP-1, A20 e IRAK-M (279). De todas ellas, la pseudoquinasa IRAK-M se ha considerado como regulador principal dentro de la TE. Su expresión se induce de manera consistente en la TE así como en otras patologías como la sepsis, el cáncer, el asma y el síndrome coronario agudo (257). Estudios *in vivo* en ratones han demostrado que la deficiencia en IRAK-M provoca la incapacidad para desarrollar TE (280). En condiciones basales no se expresa, pero es rápidamente inducida ante la primera exposición a LPS y su sobreexpresión en humanos se ha relacionado con la alta mortalidad que presentan los pacientes con sepsis inducida por gram negativos (257,281). Diferentes estudios sugieren que el mecanismo por el que IRAK-M regula la respuesta al LPS se relaciona con la inhibición de la vía de señalización TLR4-MyD88 (254,257). El TREM-1 (Receptor de Activación Expresado en Células Mieloides 1; del inglés, *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1*) se expresa en la superficie de los monocitos y presenta un papel importante en el desarrollo de la TE. Su acción principal es aumentar la expresión de citoquinas inflamatorias tras la activación de TLR en células mieloides y su expresión se encuentra disminuida en monocitos aislados de pacientes con TE (269,282) (*Figura 7*).

Centrándonos en el núcleo celular, estudios del transcriptoma de monocitos/macrófagos han mostrado una reprogramación génica de éstos durante la TE. Así, encontramos un grupo de genes inflamatorios cuya expresión está disminuida y otro grupo de genes antiinflamatorios cuya expresión esta aumentada, todo ello como un mecanismo de protección frente al shock séptico. Este patrón distintivo de la expresión génica se debe a modificaciones en la cromatina inducidas tras la activación de TLR (260). Las modificaciones epigenéticas de la cromatina y del ADN, constituyen un importante nivel de regulación. La modificación de las histonas dentro de los

nucleosomas va a condicionar el grado de enrollamiento del ADN y, a su vez, el grado de accesibilidad para la transcripción génica (254,283). La acetilación y desmetilación de las histonas activa la transcripción activa mientras que la desacetilación o la metilación causa el silencio génico (283). Se ha visto que el LPS induce la metilación de histonas en genes pro- y anti-inflamatorios, pero ante un nuevo estímulo con LPS sólo se produce una reacetilación de las histonas de los genes antiinflamatorios, produciendo el reclutamiento de la ARNpolimerasa y la transcripción de los mismos mientras que los promotores de los genes inflamatorios permanecen inactivos (260).

Los ARNnc han emergido como un importante mecanismo de regulación postranscripcional de la expresión génica. Varios microARN (miR-146, miR-125b, miR-98, miR-579, miR-132, let-7e) son inducidos por la activación de TLR y promueven de forma recíproca la TE y/o tolerancia cruzada. Por ejemplo, la administración de LPS aumenta la expresión de 2 microRNA (miR146 y miR155) en monocitos humanos (284). Ambos regulan a la baja la inflamación al atenuar la señalización de la vía TLR4 a través de la regulación postranscripcional de proteínas como IRAK-1 Y TRAF6 (284). Los ARN largos no codificantes (Mirt2, THRIL, MALAT1, lincRNA-21, entre otros), también se alteran con la activación de TLR y regulan negativamente la señalización a través del mismo (285). Pero la TE no solo está regulada por mediadores intracelulares, sino también por mediadores solubles independientes de TLR como citoquinas o ARNnc solubles, que podrían lograr su efecto a través de la modulación de ARNnc intracelulares (285). La regulación de varias citoquinas y quimiocinas en células tratadas con LPS o tolerantes a LPS se ha atribuido a la estabilidad diferencial de ARNm y la proteína, lo cual sugiere un papel importante para los ARNnc en la regulación de la citoquinas y quimiocinas inflamatorias (286). No obstante, hay un gran número de ARNnc implicados

en la TE cuya contribución permanece desconocida por lo que aún queda mucho por descubrir en este campo.

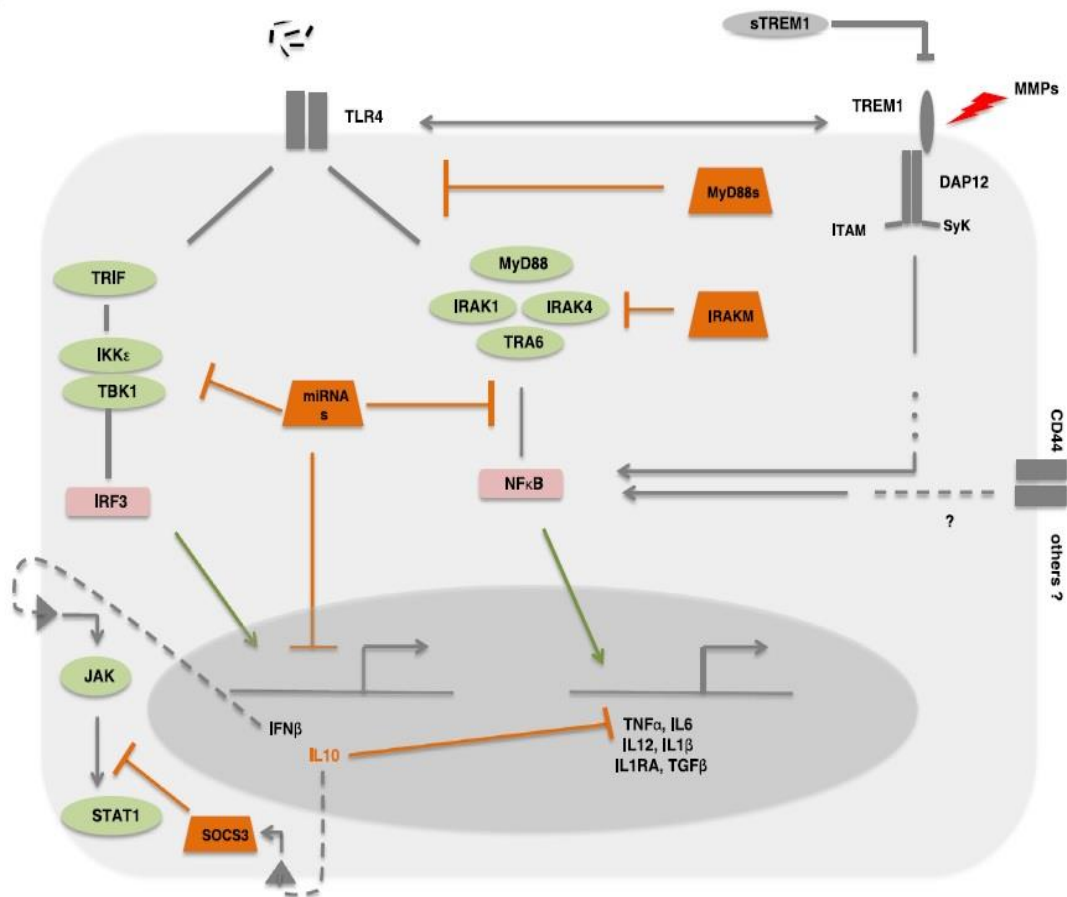


Figura 7: Mecanismos moleculares de la TE. DAP12, DNAX del inglés, activation protein of 12 kDa; proteína de activación de 12 kDa. IFN β , interferon-beta. IL,interleuquina. IKK, I κ B kinasa. IRAK, del inglés interleukin-1 receptor-associated kinase; Kinasa 4 asociada al receptor de IL-1. IRF3, del inglés interferon regulatory transcription factor 3; regulador del factor de transcripción de interferon 3. ITAM, del inglés, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; motive de activación del inmunorreceptor basado en tirosina. JAK, Janus kinasa; miRNA, microARN. MMP, del inglés matrix metalloproteinase; metaloproteinas de matriz. MyD88, del inglés myeloid differentiation primary response gene 88; factor de diferenciación mielóide 88. NF- κ B, del inglés nuclear factor-kappa-B; factor nuclear kappa-B. SOCS3, del inglés suppressor of cytokine signaling proteins 3; supresor de proteínas de señalización de citocinas 3. STAT1, del inglés signal transducer and activator of transcription 1; transductor de señal y activador de transcripción 1. sTREM1, del inglés soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1; receptor desencadenante soluble expresado en células mieloides 1. SyK, del inglés Spleen tyrosine kinase; Tirocina quinasa del bazo. TBK1, TANK-binding kinase 1; kinasa 1 de unión a TANK. TGF- β , del inglés transforming growth factor-beta; Factor de crecimiento transformante beta. TLR4, del inglés Toll-like receptor 4; receptor tipo Toll 4. TNF- α , del inglés tumor necrosis factor-alpha; Factor de necrosis tumoral alfa. TRAF6, del inglés TNF receptor associated factor (TRAF) protein family 6; Familia de proteínas del factor asociado al receptor de TNF 6. TREM1, del inglés triggering receptor expressed on myeloid cells 1; receptor activador expresado en células mieloides 1. TRIF, del inglés TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ; proteína adaptora que contiene el dominio TIR que induce IFN- β . (Reproducido con permiso: López-Collazo E, del Fresno C. Pathophysiology of endotoxin tolerance: Mechanisms and clinical consequences. Critical Care. 2013, Copyright Biomed Central).

1.6.3 Lipopolisacárido

El LPS es una molécula glicolípida anclada a la membrana externa de las bacterias gram negativas y es considerado el antígeno de superficie más importante de éstas. Se compone fundamentalmente de 2 regiones: un glucolípido llamado Lípido A y un heteropolisacárido conocido como núcleo o core, unidos entre sí por el azúcar ácido 2-keto-3-deoxioctanato (KDO). El lípido A es la fracción biológicamente activa de la molécula; se trata de un disacárido (glucosamina) unido a ácidos grasos (generalmente ácido caproico, mirístico, palmítico o esteárico). El núcleo se subdivide en un core externo (formado por hexosas) y un core interno (formado por heptosas). En algunos microorganismos el LPS presenta una región sacárida adicional conocida como antígeno O, el cual es un polímero altamente variable entre especies, que consta de 1 a 8 residuos glicosídicos (287,288).

Entre las funciones del LPS encontramos el mantenimiento y organización de la membrana externa bacteriana, el mimetismo molecular, la inhibición de anticuerpos, las variaciones antigénicas, la activación del sistema inmune y la mediación en la adherencia a las células y el tejido del huésped (289). Sin embargo, probablemente la función más importante es su potente acción endotóxica, siendo el principal responsable del shock producido en la sepsis por bacterias gram negativas (287).

Cuando la bacteria gram negativa muere o se multiplica, el LPS es liberado de la membrana y es capturado por la proteína de unión al LPS (LBP, del inglés, *LPS Binding Protein*). El complejo LPS-LBP facilita la unión al receptor CD14 situado en la superficie de los monocitos, los macrófagos, los polimorfonucleares y las células endoteliales. La función principal de este receptor es transferir el LPS al complejo encargado de su reconocimiento: MD-2/TLR4. Una vez formado el complejo LPS- MD-2/TLR4, el TLR4 inicia una reacción que comienza con la interacción con proteínas celulares que poseen

dominios TIR (del inglés *Toll Interleukine Receptor*; receptores Toll de Interleuquina 1) (290,291). La señal de transducción del LPS a través de TLR4 se puede dividir en 2: la vía dependiente de la proteína MyD88 y la vía dependiente de la proteína TRIF. Cada una de las vías termina en un mismo punto donde activan el factor de transcripción nuclear NF- κ B, el cual se transloca al núcleo y se une a la región promotora de los genes de respuesta inflamatoria. Si se activa por la vía TRIF la respuesta final será la transcripción de interferones tipo I, mientras que si lo hace por MyD88 el resultado será la transcripción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α) (292) (Figura 8).

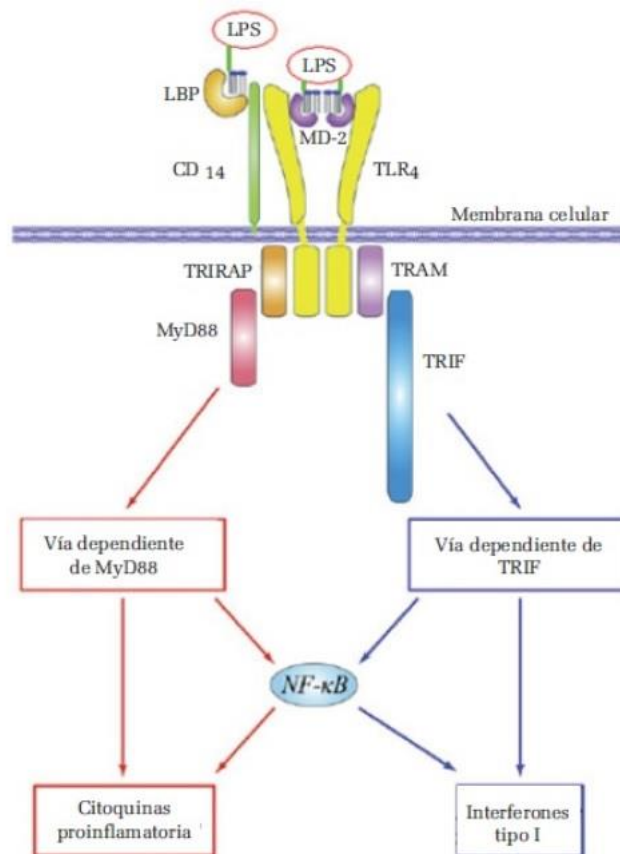


Figura 8: Reconocimiento y vías de transducción de LPS. LPS, lipopolisacárido. LBP, del inglés, LPS Binding Protein; proteína de unión al LPS. TLR4, del inglés Toll-like receptor 4; receptor tipo Toll 4. TRIRAP, proteína adaptadora del dominio TIR. TRAM, molécula adaptadora relacionada con el TRIF. MyD88, del inglés myeloid differentiation primary response gene 88; factor de diferenciación mieloide 88. TRIF, del inglés TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ; proteína adaptora que contiene el dominio TIR que induce INF- β . NF- κ B, del inglés nuclear factor-kappa-B; factor nuclear kappa-B (Reproducido con permiso: Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 2008, Copyright Elsevier).

Como hemos visto anteriormente la estimulación del receptor TLR4, a través de la producción de citoquinas proinflamatorias, va a desencadenar una serie de respuestas en el organismo como el aumento de permeabilidad vascular, un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión en los leucocitos y en las células endoteliales, la producción de nuevas citoquinas y quimiocinas, la activación de factor XII de la coagulación, la fibrinólisis, la activación de la vía clásica del complemento, entre otras (293). Todo ello puede culminar en un shock endotóxico con fallo multiorgánico y muerte del individuo (287). Debido a esto, existen unas vías de inhibición de la señal de transducción del LPS como mecanismo de protección. A nivel del citoplasma, se encuentran las proteínas TIRAF1 - TIRAF4 (factor 1/4 asociado al receptor de TNF) e IRAK-M, que inhiben al NF- κ B y a la proteína MyD88 respectivamente; las proteínas RP105 (radioprotector 105), ST2L (análogo del receptor de IL-1) y la SIGIRR (molécula relacionada con la inmunoglobulina 1) se expresan en la superficie de las células e inhiben directamente al receptor TLR4, a la proteína MyD88 y al TIRAP, respectivamente (294). Concretamente, la activación de la pseudoquinasa IRAK-M se ha descrito como una vía esencial de control de la respuesta inflamatoria intracelular. En el estudio *in vitro* de Kobayashi et al se vio una sobreexpresión de IRAK-M tras la estimulación de monocitos con LPS, con una disminución consecuente de la expresión de citoquinas proinflamatorias, actuando así como un regulador negativo de la señalización intracelular de TLR (280).

Cuando las células del sistema inmune innato se exponen a bajas dosis de LPS, entran en un estado transitorio de “falta de respuesta” y son incapaces de responder a posteriores estímulos con LPS, entrando en un estado de TE. Este fenómeno se ha podido demostrar tanto *in vitro* como *in vivo* en estudios animales al igual que en el humano (258,262,295–298). Estudios recientes han señalado una “ventana de tolerancia”, donde los monocitos de voluntarios sanos entraban en un estado de tolerancia una hora después

de entrar en contacto con el LPS, y permanecían así hasta 5 días. Tras este tiempo, las células se revertían a su fenotipo proinflamatorio habitual ante un estímulo con LPS (258). Esta ventana de tolerancia se ha intentado aprovechar en un estudio reciente de alotrasplante cardiaco en ratones mediante el preconditionamiento con LPS, obteniendo un mayor tiempo de supervivencia respecto a los grupos no preconditionados (299). Sin embargo, el grupo al que se administró el LPS presentó mayores complicaciones al inicio del tratamiento, secundarias a la respuesta inflamatoria inicial, lo cual no sería asumible si lo extrapolásemos a la práctica clínica. Por tanto, dado que se ha establecido la factibilidad de la aplicación de la TE en el campo de la trasplantología, se impone la necesidad de buscar análogos de LPS que no supongan una toxicidad inicial y que permitan desarrollar tolerancia.

1.6.4 Galactomanano

EL GAL es un biopolímero tipo polisacárido presente en la pared celular de los hongos *Aspergillus* spp., aunque también se ha identificado en la pared de otros tipos de hongos como *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Alternaria* spp., *Histoplasma* spp. y *Penicillium* spp. Está formado por un esqueleto de manosa con ramificaciones constituidas por unidades de galactofuranosa (300). La cadena principal está compuesta por un tetra α -1,2-manósido conectado a través de un enlace α -1,6, y los residuos de galactofuranosa se unen a la manosa a través de un enlace β -1,3 o β -1,6 (ver *Figura 9A*). Presenta tres formas diferentes: unido a la membrana a través de una molécula de inositolfosfoceramida, en la pared celular, donde está unido de forma covalente a 1,3-glucanos; y secretado en forma de polímero libre (ver *Figura 9B*). El *Aspergillus* spp.

libera el GAL como parte del proceso de reciclaje de la pared celular durante el crecimiento de las hifas (301).

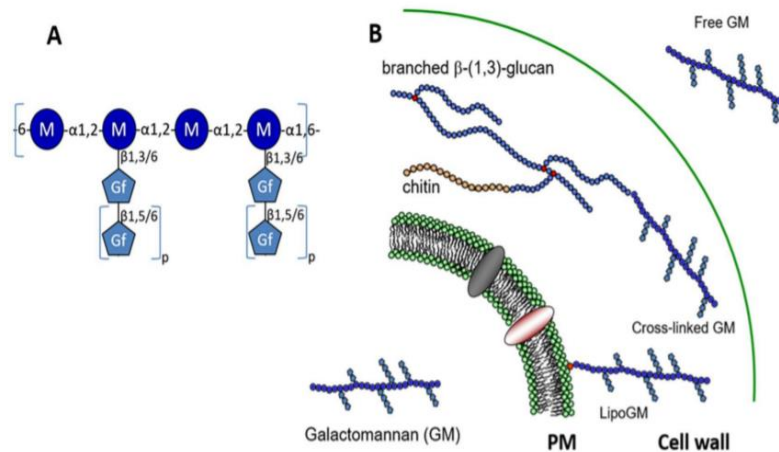


Figura 9: Estructura y localización del GAL. A. Estructura de la unidad de repetición del GAL. La cadena principal de manano está compuesta por un tetra- α 1,2-manósido conectado a través de un enlace α -1,6. Las cadenas laterales están constituidas por residuos de galactofuranosa unidos a manosa a través de un enlace β 1,3 o β 1,6. B. El GAL se puede encontrar en tres formas diferentes: en la membrana plasmática a través de una molécula de inositolfosfoceramida, en la pared celular donde el GAL se reticula con β -1,3-glucano, o libre en forma de polímero. (Reproducido con permiso: Fontaine T, Latgé JP. Galactomannan produced by *Aspergillus fumigatus*: An update on the structure, biosynthesis and biological functions of an emblematic fungal biomarker. *Journal of Fungi*. 2020, Copyright [Creative Commons Attribution License](#)).

El GAL tiene diversas funciones. La primera es la organización de la pared celular fúngica, controlando la permeabilidad de la misma y aportando resistencia a las agresiones externas. Participa en el crecimiento apical del hongo, la polarización del tubo germinal y en el proceso de conidiación, constituyendo una herramienta diagnóstica precoz de las infecciones fúngicas invasivas a través de la detección de residuos de galactofuranosa de la cadena lateral mediante la prueba de ELISA (301). Así mismo, el GAL es una molécula clave en el proceso de reconocimiento por parte del sistema inmune del huésped, y lo hace a través de los receptores TLR-2 y 4 y Dectina-1 y 2. La Dectina-1 es un receptor de lectinas tipo C que reconoce residuos de β -glucano de los conidios en germinación, activando vías como Syk quinasa, el inflammasoma CARD9 (del inglés,

Caspase-Associated Domain-Containing Protein 9) y el NF- κ B, que inducen la expresión de citoquinas y quimioquinas como TNF- α , IL-6, IL-1 α , IL-1 β , G-CSF (factor estimulante de colonia de granulocitos), GM-CSF (factor estimulante de colonia de granulocito/macrófago), MIP-1 α y MIP-1 β (proteínas inflamatorias del macrófago α y β) e IL-10 (302). La Dectina-2 reconoce α -mananos, lo que induce la producción de IL-1 β , TNF- α , IL-23 e IL-10 mediada por Syk quinasa y NF κ B (303). A través de estos receptores va a desencadenar un efecto inmunoestimulador e inmunomodulador. En un estudio reciente *in vitro* con macrófagos murinos, se observó que la exposición al GAL presentaba un efecto inmunoestimulador al inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-12 en macrófagos y células dendríticas, principalmente a través del receptor TLR4. La activación de este último desencadena la activación de la cascada de MAPKs, incluidas ERK1 y 2, JNK 1 y 2 y p38 que conducirán a la producción de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, esta actividad inmunoestimuladora fue mucho menor que la producida por LPS ($p < 0,001$). En este mismo estudio, se observó que la estimulación posterior con LPS de las células que habían sido expuestas a GAL previamente, presentaban una respuesta atenuada, marcada por una disminución en la expresión de citoquinas TNF- α e IL-6. Este fenómeno de TE inducida por GAL se relacionó con una activación reducida de NF- κ B (304). En consonancia con esta investigación, el estudio *in vitro* desarrollado por Toledano et al, demostró que el GAL era capaz de inducir un estado de tolerancia en monocitos humanos de forma parecida al LPS, pero sin producir la respuesta inflamatoria sistémica de éste. Esto es, una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias y una disminución de la expresión de HLA-II así como del gen principal que lo regula (CIITA). Observaron que no había un aumento en la expresión de la pseudoquinasa IRAK-M, al contrario de lo que sucedía en la TE inducida por LPS. Así mismo, se detectó un aumento en la expresión de

NF κ B2/p100 (305). Esta proteína de la vía no canónica de la activación NF- κ B, exhibe propiedades inhibitorias sobre la vía clásica o canónica. En células no estimuladas, el NF- κ B se encuentra secuestrado en el citoplasma mediante la interacción con las proteínas inhibitoras de κ B (IkBs), entre las cuales encontramos IkBa, IkBb e I κ ϵ . En respuesta a estímulos con agonistas, los IkBs son degradados por el proteosoma 26S tras la activación de las quinasas de los inhibidores de NF- κ B (IKKs), liberando los dímeros de NF- κ B, que se traslocan al núcleo y modulan la transcripción génica. En este sentido, NF κ B2/p100 podría considerarse una cuarta proteína IkB, que secuestra los dímeros de NF- κ B en el citoplasma impidiendo la expresión de citoquinas proinflamatorias (306). Por otra parte, se observó en el estudio que con la administración de un inhibidor del receptor de dectina-1, no se producía la mencionada sobreexpresión de NF κ B2/p100 y, además, se revertía el estado tolerante. Todo ello indica que el GAL actúa a través del receptor de la Dectina-1 que a su vez modula la vía TLR mediante la sobreexpresión de NF κ B2/p100 (305).

La menor respuesta inflamatoria inicial y el desarrollo de TE en monocitos *in vitro*, abre una vía para la aplicación del GAL como análogo de LPS en el estudio de la inmunomodulación que se requiere en el trasplante para lograr tolerancia y disminuir o suprimir el empleo de fármacos inmunosupresores.

2. HIPÓTESIS

Hasta donde conocemos, el efecto que la infusión de LPS y GAL pueden tener sobre el desarrollo de tolerancia previa a una AVC no ha sido evaluado. El presente trabajo tiene como objetivo principal valorar el efecto inmunomodulador del preconditionamiento con LPS o GAL en el contexto de un AVC experimental de extremidad posterior en ratas, comparando las diferencias en el tiempo hasta la aparición de un episodio de RA.

Se establece como *hipótesis nula* (H_0) que no existen diferencias en el tiempo entre los alotrasplantes preconditionados con GAL o LPS y aquéllos no preconditionados. Como *hipótesis alternativa* (H_1), se establece que existen diferencias en el tiempo entre alotrasplantes preconditionados con LPS o GAL y aquéllos no preconditionados.

Además, se establecen como objetivos secundarios:

- Valorar la morbilidad asociada a los distintos preconditionamientos.
- Valorar la intensidad del rechazo en las biopsias tisulares.
- Analizar la duración del quimerismo en sangre periférica.
- Estudiar el cambio a la respuesta inmune adaptativa.
- Analizar los niveles de expresión de las citoquinas tras el preconditionamiento.
- Adquirir destreza en técnicas microquirúrgicas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Protocolo quirúrgico experimental

Se realizaron trasplantes de patas traseras entre ratas (*Rattus Norvergicus*) cruzando el CMH (307). Los animales previamente se dividieron en 4 grupos de experimentación según el acondicionamiento que recibieron. El grupo I recibió 1 ml de suero salino fisiológico (SSF) intravenoso (i.v.) 72 horas antes de realizarse el trasplante. El grupo II se acondicionó 72 horas pretrasplante con una dosis i.v. no letal de 0,8 mg/Kg (0,16 ml/Kg) de LPS (Serotype 055:B5, Sigma) (308). El grupo III recibió una dosis de 80 mg/Kg (8.00 ml/Kg) vía oral de GAL (D-Galacto-D-mannan, 48230-100 mg, Sigma) 72 horas pretrasplante, y el grupo IV recibió la misma dosis de GAL, pero 24 horas antes de la intervención (*ver Tabla 4*). Posteriormente todos los grupos de experimentación recibieron inmunosupresión diaria con CsA a dosis terapéuticas en pauta decreciente durante 4 semanas. Los animales trasplantados se mantuvieron con vida hasta que presentaron un episodio de RA con alopecia y desepitelización macroscópica (309,310).

	Precondicionamiento	Inmunosupresión	N	Recuperación	Análisis
Grupo I	SSF i.v. 72 horas pretrasplante	CsA a dosis terapéuticas en pauta decreciente	6	Hasta episodio de RA	Quimerismo en sangre periférica
Grupo II	LPS i.v. 72 horas pretrasplante		6		Grado de rechazo
Grupo III	GAL i.v. 72 horas pretrasplante		6		Infiltrado leucocitario tisular
Grupo IV	GAL i.v. 24 horas pretrasplante		6		Expresión génica de las citoquinas

Tabla 3: Esquema de los grupos de experimentación. CsA: ciclosporina A. RA: rechazo agudo.

Se utilizaron ratas Brown-Norway (LBN RT1ⁿ) de 5-11 semanas de vida como donantes, y ratas Wistar-Lewis (LEW RT1^l) de 10-11 semanas de vida como receptoras (219). Todos los animales del estudio recibieron un trato digno, de acuerdo con la Directiva del Consejo de Europa publicada el 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE). El estudio contó con la aprobación del Comité Ético y de Bienestar Animal (CEBA) del Hospital Universitario La Paz con número 01/2016.

Los procedimientos se realizaron bajo condiciones de asepsia, y durante la intervención los animales se mantuvieron calientes con la temperatura estable gracias a una manta eléctrica. La cirugía se realizó con anestesia inhalatoria, realizando primero la inducción con isoflurano al 5% (Forane[®], Abbott), y manteniéndose posteriormente al animal con una mascarilla con flujo de isoflurano al 2%. Como suplemento de fluidos se inyectaron 7 ml de SSF subcutáneos, distribuidos de la siguiente forma: 2 ml antes de iniciar la intervención, 3 ml antes de la perfusión del aloinjerto y 2 ml al finalizar la cirugía (311). Tras la intervención los animales se estabularon en celdas individuales en condiciones de aislamiento en un rack ventilado, con pienso y agua a demanda. La analgesia posoperatoria se realizó administrando tramadol 20 mg/kg/12h s.c. durante los primeros 2 días postoperatorios y teniendo en cuenta la presencia de signos de dolor por la escala de muecas para roedores (Grimace Scale) (ver *Figura 10*) (312,313). Junto con la analgesia se administró profilaxis antibiótica con enrofloxacino (Ganadexil[®], Livisto) 5-10 mg/kg/24h s.c.



Figura 10: Escala de muecas para roedores (Grimace scale). (Reproducido con permiso: Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. Mol Pain. 2011, 29;7:55, Copyright SAGE).

Para evaluar el protocolo quirúrgico experimental, se recogieron las siguientes variables:

1. Tiempo de intervención (medido en minutos), desde el inicio de la disección inguinal del animal donante, hasta el cierre cutáneo del animal receptor.

2. Tiempo de microcirugía (medido en minutos), desde el inicio de la anastomosis arterial hasta el final de la anastomosis venosa, tras verificar que ambas fueran permeables y no presentaran fugas de sangre entre los puntos.
3. Supervivencia del animal al final del procedimiento.
4. Existencia de complicaciones intraoperatorias, entendiéndose como tal la ausencia de permeabilidad de la anastomosis requiriendo su repetición o la muerte del animal por incidencias a nivel respiratorio o hemodinámico.

3.1.1. Extracción del aloinjerto

Tras comprobar el correcto nivel anestésico mediante la estimulación de una pata del animal, se comenzó el procedimiento colocando al animal en decúbito supino sobre la manta eléctrica y un paño estéril. Se empleó pomada epitelizante (Oculos[®], Novartis) para proteger los ojos del animal. Se preparó el campo quirúrgico rasurando el pelo de la pata posterior y de la ingle, y se acondicionó la piel con solución antiséptica de povidona yodada al 10% (Betadine[®], Meda). Se empezó la cirugía mediante una incisión horizontal a nivel inguinal, visualizándose el ligamento inguinal que se ancló mediante seda 2/0 para rechazar el colgajo superior hacia el abdomen. A continuación, se ligaron los vasos epigástricos superficiales con una seda de 6/0. Se disecó el paquete vasculonervioso femoral desde el ligamento inguinal hasta el tercio distal del muslo del animal, ligando los vasos circunflejos femorales en su cara posterior con seda de 6/0. Los vasos femorales fueron ligados lo más proximalmente posible también con seda de 6/0 y con un clamp vascular en su cabo distal. Una vez terminada la disección vascular, se llevó a cabo la disección muscular con ayuda de un electrocauterio bipolar, seccionando la musculatura de medial a lateral a nivel del tercio medio del muslo del animal. Se realizó la sección del nervio ciático con bisturí frío y se seccionó el fémur con una gubia a nivel del tercio

medio del mismo. Los vasos femorales fueron lavados con solución salina heparinizada (10 UI/ml) (314).

Una vez obtenida la pata se procedió al sacrificio del animal mediante inyección de 1 ml de cloruro potásico intracardiaco, y se comprobó tanto la ausencia de pulso como de respiración. La pieza del trasplante se conservó en suero estéril frío a 4°C, protegida con gasas húmedas (ver *Figura 11*).

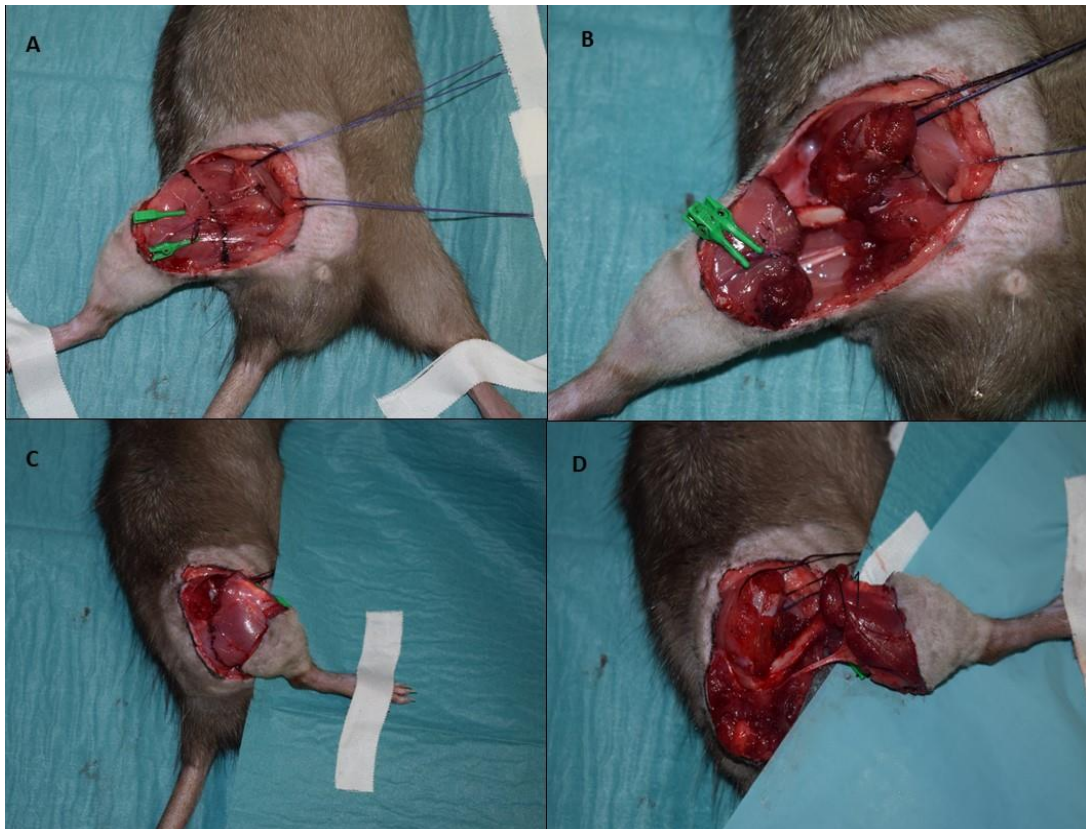


Figura 11: Extracción del aloinjerto. A. Se observa el abordaje inguinal, con los vasos femorales ya ligados. Se marca el nivel de la sección muscular. B. Musculatura del cuádriceps femoral seccionada visualizándose fémur. C. Imagen posterior con línea de marcado de sección muscular. D. Sección muscular completada visualizándose el fémur por su parte posterior y el nervio ciático.

3.1.2. Técnica quirúrgica en el animal receptor

Una vez anestesiado el animal receptor de forma correcta, se procedió a su preparación mediante rasurado de la zona inguinal y aplicación de solución antiséptica de

povidona yodada al 10% (Betadine®, Meda). Se realizó una incisión oblicua a lo largo del pliegue inguinal, se ligaron los vasos epigástricos superficiales con seda 6/0 y se rebatió el colgajo abdominal hacia proximal. Una vez expuestos los vasos femorales, se procedió a su disección y se ligaron distalmente a la salida de los vasos epigástricos, preparando el segmento proximal a la ligadura para la anastomosis termino-terminal con el pedículo del aloinjerto (ver *Figura 12*).

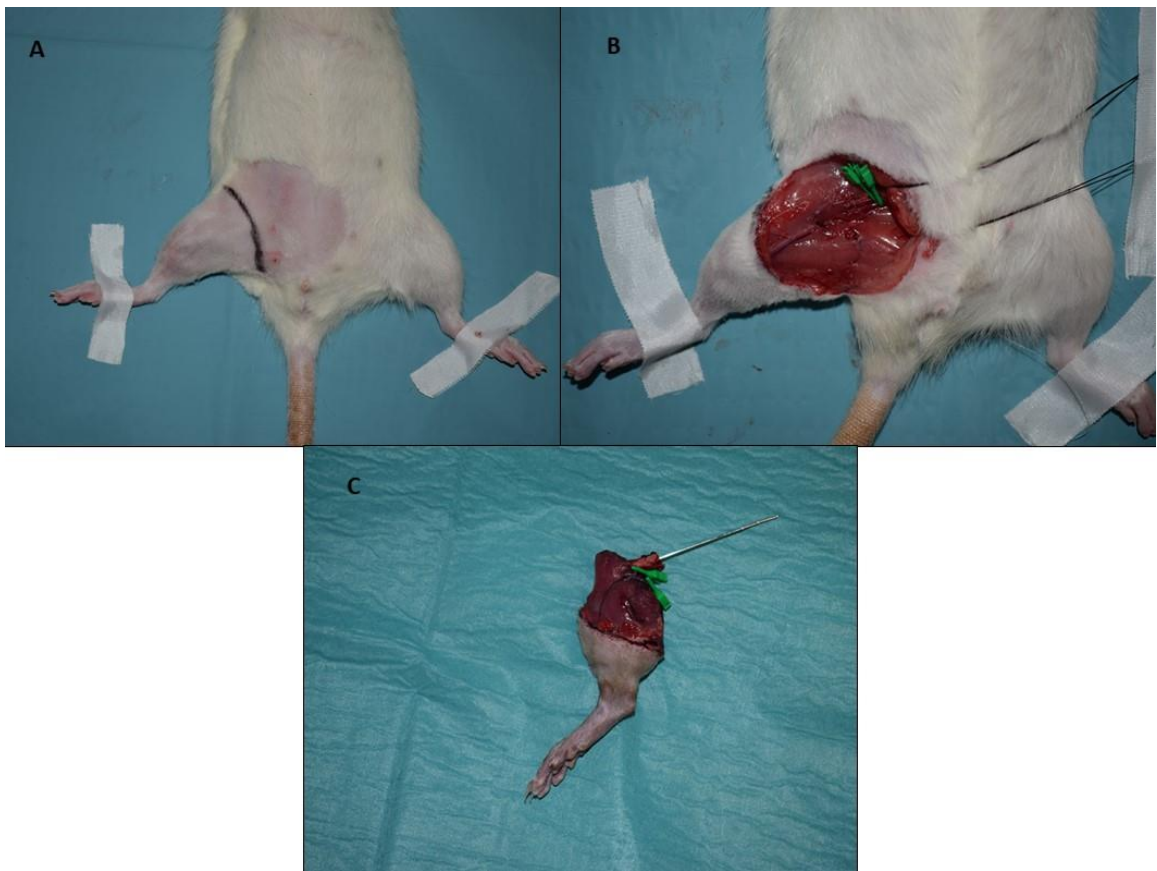


Figura 12: Animal receptor. A. Marcaje de incisión cutánea. B. Preparación de vasos femorales. Extremos distales ya ligados y extremos proximales con clamp temporal hasta la anastomosis. C. Aloinjerto animal donante.

Para facilitar el procedimiento, primero se aseguró el aloinjerto mediante sutura cutánea con puntos sueltos de seda de 4/0. A continuación, se realizó la anastomosis microquirúrgica termino-terminal de los vasos femorales con sutura monofilamento irreabsorbible de 10/0 con aguja de 5,1 mm 3/8c (Ethilon®, Johnson & Johnson) (307).

Las anastomosis vasculares fueron todas termino-terminales tanto para la vena como para la arteria, realizándose a nivel del tercio proximal del muslo del animal. No se realizaron neurorrafias, miorrafas ni fijación ósea a nivel proximal. En el estudio preliminar, se realizó el trasplante de la pata de forma completa, pero la falta de sensibilidad y el arrastre de la misma provocaban heridas y úlceras que obligaban a desestimarlas para el estudio al simular un posible rechazo y porque incitaban al animal a la manipulación de la misma. Para evitar el arrastre del aloinjerto y sus posibles complicaciones, se optó por la amputación del pie a nivel del tobillo. El muñón se realizó mediante una osteotomía de tibia y peroné, y posterior cobertura de la misma con el bíceps femoral, para evitar la ulceración del mismo. El aloinjerto se colocó en posición heterotópica a nivel inguinal y se suturó con puntos de colchonero horizontales con seda de 4/0, dejando una isla cutánea de 20x15 mm para la monitorización del rechazo. Por último, se aplicó povidona yodada en solución al 10% en la incisión (Betadine®, Meda) y se protegió el trasplante con gasas y apósitos estériles adherentes (ver *Figura 13*).

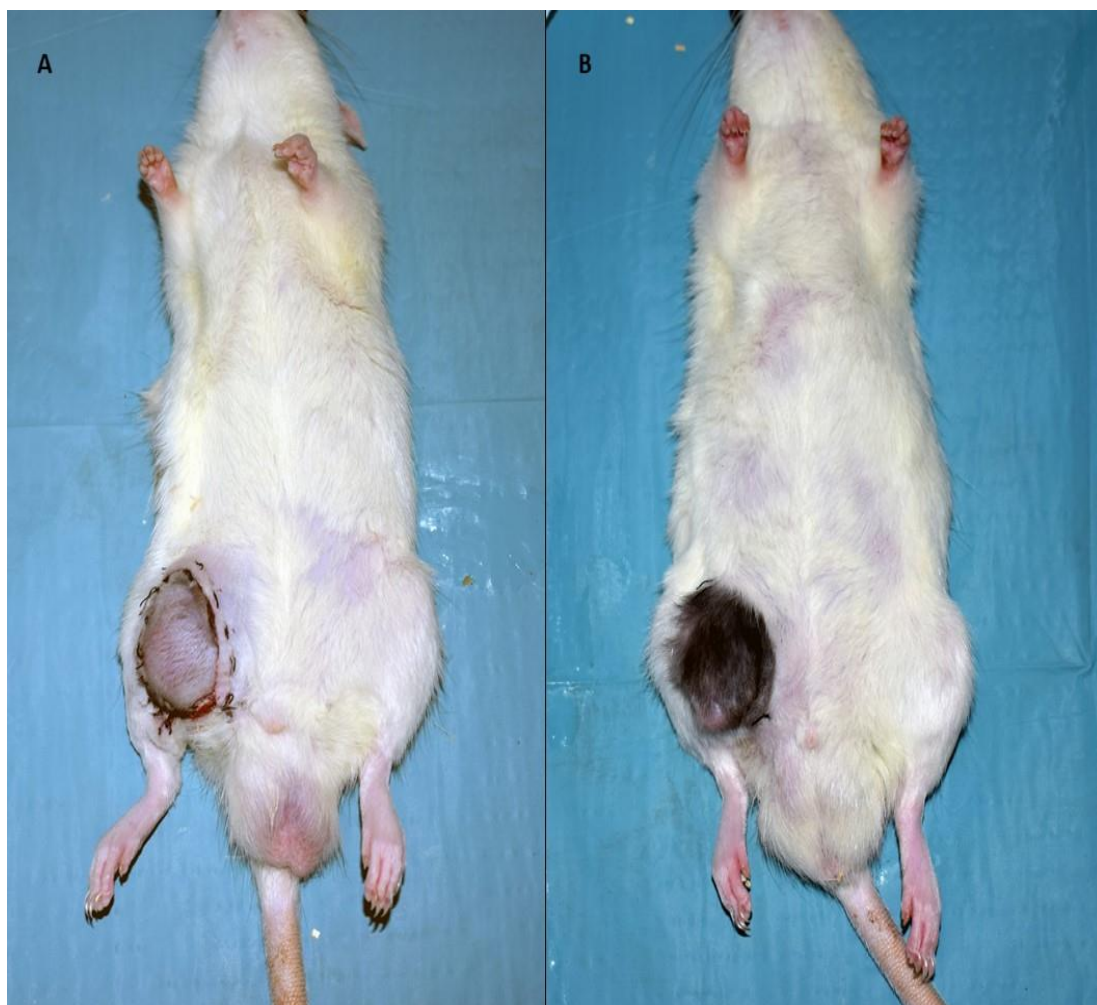


Figura 13: Animal receptor. A. Postoperatorio inmediato. B. a los 30 días posoperatorio.

3.1.3. Protocolo de curas

Durante las primeras 48 horas desde la intervención quirúrgica se vigiló la isla cutánea cada 12 horas, comprobando el color y relleno capilar. A partir de ahí se llevó a cabo una revisión diaria de todos los animales trasplantados durante las 2 primeras semanas, realizándose curas con povidona yodada al 10% (Betadine®, Meda) y protegiendo el trasplante con gasas y 2 apósitos estériles adherentes semicircunferenciales, dejando libre el aparato excretor del animal. A partir de los 15 días postoperatorios se retiraron los puntos de forma alterna dejando el aloinjerto sin cubrir.

3.1.4. Protocolo de inmunosupresión

En todos los grupos de experimentación los animales receptores recibieron terapia inmunosupresora diaria con CsA (Sandimmun® de Novartis, Basel, Suiza) a dosis decrecientes. Durante la primera semana postoperatoria los animales recibieron 16 mg/Kg de CsA s.c., para después ir disminuyendo la dosis semanalmente a 8 mg/Kg, 4 mg/Kg y 2 mg/Kg, respectivamente. A partir de la quinta semana (35 días postrasplante), se dejó de administrar la CsA (218,219).

3.1.5. Valoración clínica del rechazo agudo del aloinjerto

El miembro trasplantado fue inspeccionado diariamente buscando signos de rechazo, incluyendo edema, eritema, descamación, alopecia, epidermólisis, exudación o necrosis cutánea (315) (ver *Figura 14*).



Figura 14: Animal receptor. Rechazo agudo a los 27 días postoperatorios en una rata del grupo control.

3.1.6. Valoración de la Enfermedad Injerto contra Huésped

Todos los animales fueron inspeccionados diariamente buscando la aparición de EICH. Los criterios clínicos evaluados incluyeron: eritema cutáneo (valorado a nivel de la oreja), hiperqueratosis de las almohadillas plantares, dermatitis, pérdida de peso,

aparición descuidada del pelo y diarrea. Se considera que el animal presentaba un episodio agudo de EICH si aparecían al menos 4 de los criterios mencionados (219).

3.1.7. Toma de muestras y protocolo de extracción

Bajo anestesia inhalatoria, se tomaron 0,5-1 mL de sangre periférica en un tubo heparinizado a través de la vena caudal de la cola de la rata. Estas extracciones se realizaron antes del acondicionamiento (72 horas antes del trasplante), el día del trasplante (0 horas), y posteriormente a los 7, 21, 30, 45 y 60 días postoperatorios, y siempre que el animal se sacrificara por presentar un episodio de RA (218).

Cuando el aloinjerto presentó un episodio de RA con alopecia o desepitelización macroscópica, el animal fue anestesiado para la extracción de sangre periférica. Así mismo, se procedió a la retirada del aloinjerto, que se preservó en formol para su estudio histológico. Tras la extracción, el animal receptor se sacrificó con una inyección intracardiaca de 1 ml de cloruro potásico, y se ratificó la ausencia de pulso y respiración.

3.2. Análisis del bienestar animal

Todos los animales fueron evaluados diariamente bajo la supervisión de la doctora Carlota Largo Aramburu, responsable del Animalario del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz. Se analizó la aparición y color del pelaje, las mucosas y las almohadillas plantares. Así mismo, se examinó la presencia de dolor mediante la escala de muecas para roedores (Grimace Scale, ver *Figura 10*) (313). También se tuvo en cuenta su actividad, su comportamiento, el modo de caminar y de respirar. Se registraron la presencia de episodios diarreicos y el peso de cada animal se midió semanalmente.

3.3. Estudio histológico

3.3.1. Procesamiento de las muestras

Todas las muestras de tejido en fresco se fijaron de manera individual en tampón de formalina al 10% con un pH de 7 durante 24-48 horas a temperatura ambiente. Una vez fijados los aloinjertos se incluyeron en parafina según protocolo estándar. Del bloque parafinado se realizaron cortes seriados (5 μ m) con microtomo (Leica® RM2555, Wetzlar, Alemania) recogiendo las secciones de tejido en portas tratados Dako® (FLEX IHC Microscope Slides de Dako®, California, EEUU), para su posterior procesamiento. En cortes a distintas alturas se realizó la tinción de hematoxilina-eosina (H-E), obteniéndose los núcleos en azul, el citoplasma y la fibrina en rosa, y los glóbulos rojos y la musculatura en rojo anaranjado. Las muestras se estudiaron mediante un sistema de análisis de imagen, compuesto por un microscopio Olympus® BX14 (Olympus®, Tokio, Japón) acoplado a una cámara, empleando el software Image ProPlus® (Media Cybernetics®, Washington, EEUU) de análisis de imagen. Las imágenes se obtuvieron con una magnificación de $\times 10$.

3.3.2. Gradación del episodio de rechazo agudo

De cada aloinjerto se escogieron 5 niveles al azar de manera enmascarada y se muestrearon de forma aleatoria cinco campos microscópicos que contuvieran elementos cutáneos. La gravedad del episodio de rechazo se estableció en las biopsias cutáneas por dos observadores distintos, según la clasificación de Banff de 2007 para alotrasplantes compuestos vascularizados (ver *Tabla 2*) (136).

3.3.3. Valoración cuantitativa del infiltrado leucocitario muscular

En las muestras musculares de cada aloinjerto, se escogieron de forma enmascarada cinco niveles al azar. Se muestrearon de manera aleatoria cinco campos microscópicos para valorar la presencia o no de infiltrado leucocitario por dos observadores distintos. Los infiltrados se valoraron de manera semicuantitativa de 0 a 4 (0: nada; 1: leve; 2: moderada; 3: intenso; 4: muy intenso).

3.4. Citometría de flujo en sangre periférica

Las muestras de sangre periférica se incubaron inicialmente con una solución de lisis (FACS lysis solution, 555899 BD Biosciences, Nueva Jersey, EEUU) según especifica el fabricante. Posteriormente, para realizar la tinción extracelular utilizamos anticuerpos antirrata frente los linfocitos T maduros (antiCD3, eBioG4.18, eBioscience, San Diego, EEUU), los linfocitos T Helper (antiCD4, 17-0040, eBioscience, San Diego, EEUU) y los linfocitos T citotóxicos (antiCD8, 25-0084, eBioscience, San Diego, EEUU). También se valoró la presencia de quimerismo linfoide en todas las muestras de sangre periférica, con anticuerpos frente al CMH clase I de RT1 (anti-MHC-ClassI-RT1, MCA156F, AbD Serotec, Kidlington, Reino Unido). Estas células fueron incubadas con los anticuerpos especificados durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Después de la tinción, las células fueron procesadas y analizadas utilizando el citómetro de flujo Navio (Beckman Coulte, California, EEUU). Para todo ello se utilizaron controles de isotipo apropiados para cada experimento.

3.5. Medición de niveles de citoquinas

Los marcadores de las reacciones inflamatorias producidas, tanto en el caso de desarrollarse tolerancia como en los casos de rechazo, se determinaron mediante

citometría de flujo (BD FACS Calibur, Nueva Jersey, EEUU) utilizando el kit “Cytometric Bead Array” (CBA) Flex Set (558309, 558305; BD Biosciences, Nueva Jersey, EEUU) y siguiendo el protocolo del fabricante. Este método se basa en un inmunoensayo con microesferas que son capaces de medir diferentes moléculas en muestras de suero. El principio de esta técnica se basa en que cada microesfera se encuentra conjugada con un anticuerpo específico que reconoce nuestro analito de interés en la muestra, y la ficoeritrina (PE, BD Biosciences, Nueva Jersey, EEUU) como reactivo de detección. Después de la incubación, forman un complejo medible por un citómetro de flujo (BD FACS Calibur, Nueva Jersey, EEUU). Los datos recopilados se analizaron con FCAP Array Software versión 3.0 (BD Biosciences, Nueva Jersey, EEUU). El estudio se focalizó en las citoquinas TNF- α e INF- γ .

3.6. Análisis estadístico

Los datos se procesaron informáticamente mediante una base de datos en formato Microsoft Excel® (Microsoft, Redmond, WA, EEUU), que más tarde fue importada para su tratamiento estadístico en el programa SPSS® versión 22 ((IBM SPSS Statistics, Inc., Chicago, IL, EEUU). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas que presentaron una probabilidad de error menor del 5% ($p < 0,05$).

Las variables cuantitativas continuas se describieron como media y desviación estándar. Las variables cualitativas se describieron mediante frecuencias absolutas y frecuencias relativas expresadas en porcentaje. El análisis descriptivo de variables cualitativas se representó de forma gráfica como sectores, barras o BoxPlot.

El análisis de supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan-Meier, y los resultados se compararon mediante la prueba de Log-Rank. Las comparaciones entre variables cualitativas se realizaron mediante el test de chi-cuadrado; entre variables

cuantitativas continuas, se empleó el test no paramétrico de Kruskal Wallis; y en el caso de comparaciones pareadas entre variables cuantitativas continuas, se utilizó el test ANOVA de medidas repetidas, junto con el test de Greenhouse-Geisser. Cuando el resultado era significativo, se empleó el test a posteriori de Bonferroni (Bonferroni Post Hoc Test) para explorar comparaciones múltiples entre todos los grupos.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados del protocolo quirúrgico experimental

Se realizaron 41 trasplantes de extremidad posterior en ratas, de las cuales 35 sobrevivieron a la cirugía (85,36%). El tiempo medio de la intervención fue de 195,58 minutos (desviación estándar (DS) 27,05 minutos) y el tiempo medio de microcirugía fue de 96,9 minutos (DS 20,14 minutos). No hubo diferencias estadísticamente significativas en el tiempo quirúrgico ni en el tiempo de la microcirugía entre los distintos grupos ($p = 0,827$ y $p = 0,446$, respectivamente).

Las complicaciones se dividieron en intraoperatorias y postoperatorias (ver *Figuras 16 y 17*). Dentro de las intraoperatorias, hubo 6/14 éxitos por pérdidas hemáticas y/o problemas respiratorios (14,63%) y 8/14 (19,51%) complicaciones a nivel de la anastomosis microvascular, entendida como patencia negativa de la arteria, la vena o ambas, que hubo que revisar en el mismo acto quirúrgico. De éstos últimos, 3/8 (37,5%) evolucionaron favorablemente y 5/8 (62,5%) presentaron signos de fracaso de la microcirugía con color cianótico y sin relleno capilar al día siguiente de la intervención, llevándose a cabo una nueva revisión de la microcirugía. De estos trasplantes cuyas microanastomosis tuvieron que ser revisadas al día siguiente de la intervención, ninguno evolucionó favorablemente, y los animales fueron sacrificados según el protocolo de experimentación. Entre las complicaciones postoperatorias, encontramos 2 (4,88%) úlceras en el muñón del trasplante por decúbito de la tibia y peroné (ver *Figura 15*), y 4 (9,76%) animales presentaron mordeduras en el testigo cutáneo del trasplante por autocanibalismo. En ambos casos hubo que sacrificar estos animales por posible interferencia con los parámetros del estudio, especialmente los marcadores de respuesta inflamatoria. De todos los trasplantes realizados, hubo que desestimar 17/41 (41,46%)

por las complicaciones mencionadas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la tasa de complicaciones entre los distintos grupos ($p= 0,926$).

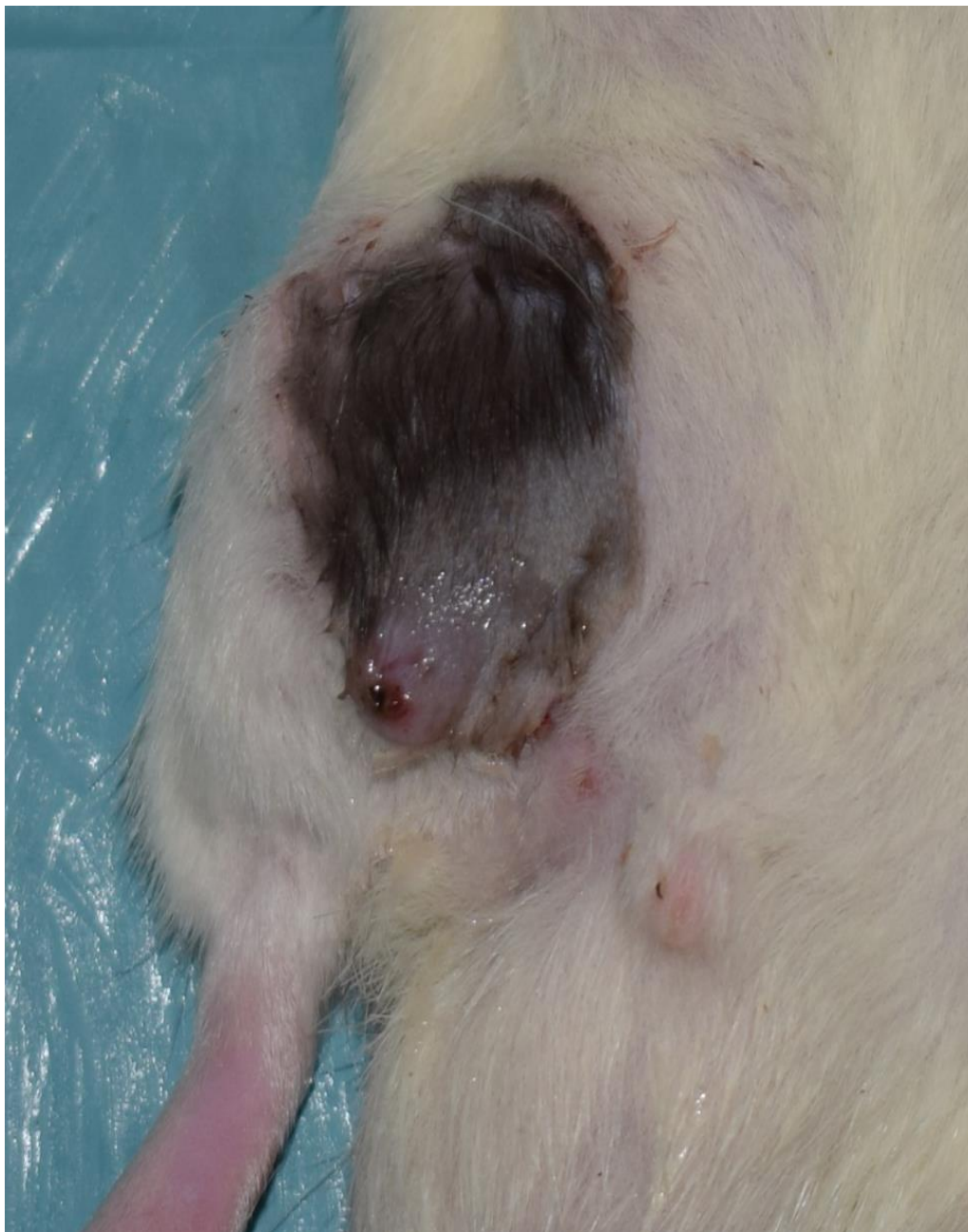


Figura 15: Úlcera por decúbito en el trasplante.

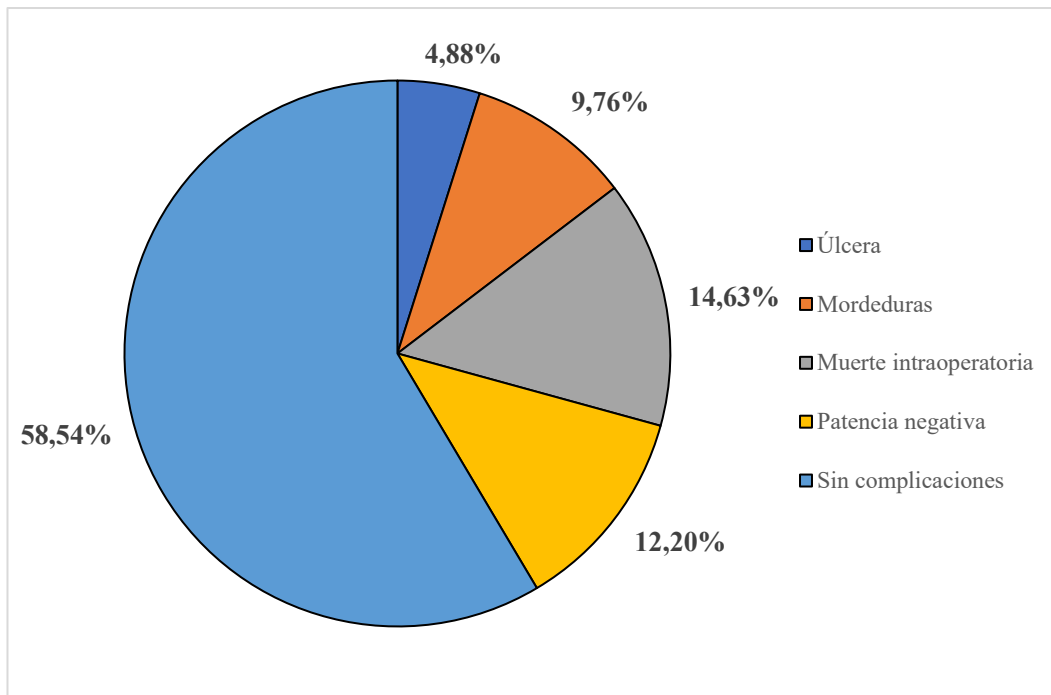


Figura 16: Complicaciones.

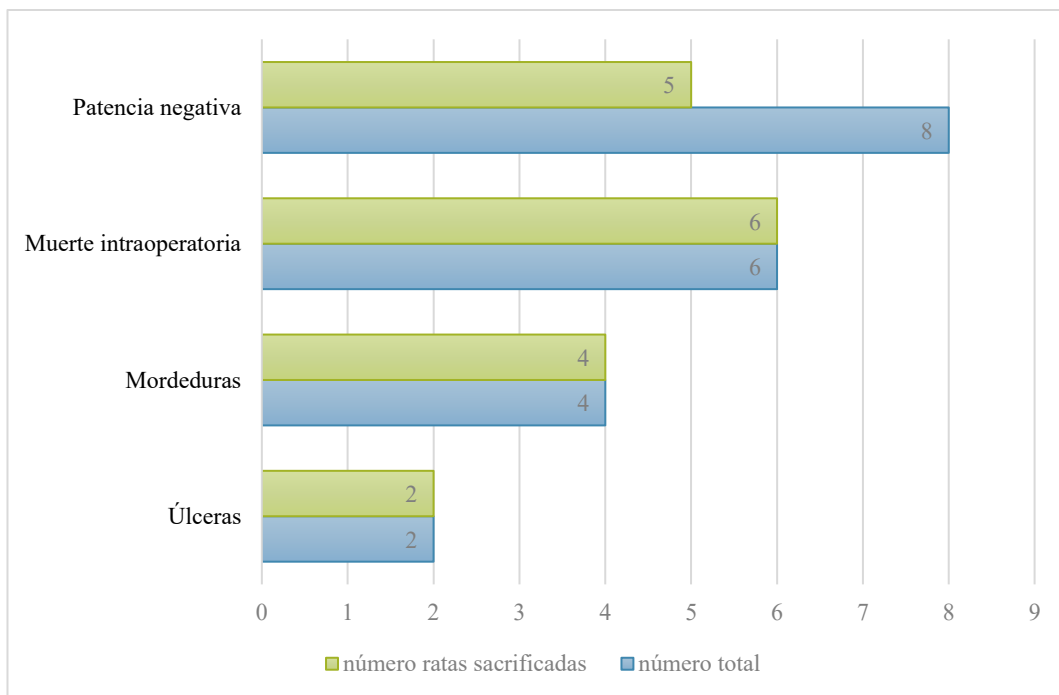


Figura 17: Complicaciones intra y posoperatorias. Se muestra el número total de casos por complicación (azul) junto al número final de animales que fueron sacrificados como consecuencia de ello. Se observa que de los 8 animales que presentaron un fallo en la microcirugía inicial, se consiguió su rescate en 3 de ellos (37,5%).

El tiempo medio de cirugía en los animales que habían sufrido algún tipo de complicación fue de 214,41 minutos (DS 23,70) y el tiempo medio de microcirugía 103,7 minutos (DS 19,74). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de animales que no había sufrido ninguna complicación, cuyo tiempo medio de cirugía fue de 181,61 (DS 21,28) y de microcirugía de 89,04 (DS 12,65) ($p=0,001$ y $p=0,02$). Analizando cada una de las complicaciones por separado se pudo observar que la media de tiempo quirúrgico en aquellos animales que murieron intraoperatoriamente por pérdida hemática o problemas respiratorios fue de 221,66 minutos (DS 111,33), mientras que en animales que no sufrieron esta complicación fue de 191,11 minutos (DS 24,26) ($p=0,02$). Además, los animales que presentaron un fallo en la microanastomosis vascular también tuvieron un tiempo de cirugía mayor (213,75 (DS 25,03) minutos vs 191,18 (DS 25,98) minutos, $p=0,032$). No se encontraron diferencias entre las demás complicaciones y los tiempos quirúrgicos (ver *Tabla 4*).

Complicación	Muerte por pérdida hemática			Fallo anastomosis			Úlceras muñón			Mordeduras		
	si	no	p	si	no	p	si	no	p	Si	no	p
Tiempo cirugía (minutos)(DS)	221,6 (29,94)	191,11 (24,26)	0,02*	213,75 (25,03)	191,18 (25,98)	0,032*	190 (14,4)	195,87 (27,63)	0,976	220 (14,14)	192,94 (26,89)	0,067
Tiempo microanastomosis (minutos)(DS)	111,33 (25,97)	94,42 (18,3)	0,171	106 (15,05)	94,63 (20,74)	0,146	120 (28,28)	95,7 (19,4)	0,176	98,75 (6,29)	96,7 (21,14)	0,534

Tabla 4: Comparación entre las complicaciones quirúrgicas y los tiempos quirúrgicos y los tiempos de la microcirugía.

4.2. Supervivencia del aloinjerto

Los animales del grupo I comenzaron a presentar episodios de RA 10 días después del cese de la administración de CsA (mediana 40 días, rango intercuartílico [RIQ] 44-40 días). Los animales de experimentación del grupo II, que habían recibido preconditionamiento con LPS, presentaron el episodio de RA a partir del segundo mes tras la cirugía del trasplante (mediana 68 días, RIQ 71-61 días). De forma similar ocurrió en los grupos III y IV, que había recibido GAL 72 y 24 horas antes del trasplante respectivamente (mediana 70 [RIQ 73-69] y 70 [RIQ 74-69] días, respectivamente). La diferencia entre el grupo I y el resto de grupos preconditionados fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$ en todos los casos). Las diferencias entre los grupos II, III y IV no fueron estadísticamente significativas (entre II y III $p = 0,327$, entre II y IV $p = 0,203$, entre III y IV $p = 1$) (ver *Figura 18* y *Tabla 5*).

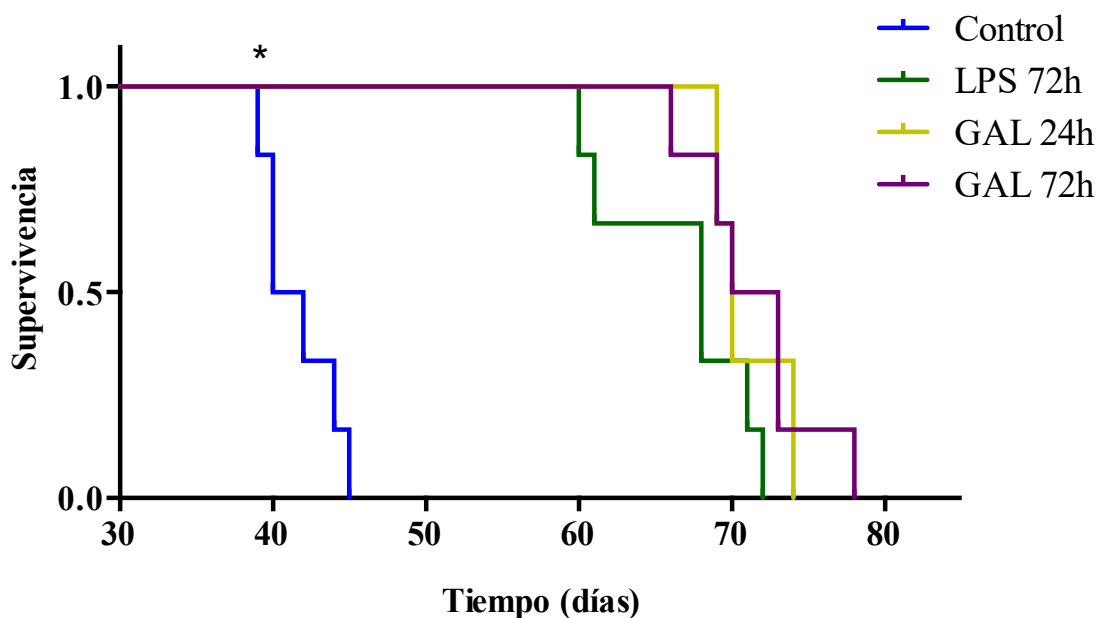


Figura 18: Tiempo de supervivencia de los trasplantes de extremidad posterior en los grupos I a IV. El preconditionamiento con GAL y LPS permitió un tiempo hasta el rechazo más prolongado de manera estadísticamente significativa respecto al grupo control ($p < 0,001$).*

GRUPO	Mediana (días)	Rango intercuartílico (días)	Intervalo de confianza al 95% (días)
I	40	44-40	37,6-42,4
II	68	71-61	60,08-75,92
III	70	73-69	66,79-73,20
IV	70	74-69	68,86-71,13

Tabla 5: Tiempo de supervivencia de los trasplantes de extremidad posterior en los grupos I a IV.

4.3. Análisis del bienestar animal

Entre los animales que recibieron un acondicionamiento con LPS (grupo II), cinco (83,3%) presentaron episodios diarreicos a lo largo de su evolución. Así mismo, uno (16,7%) del grupo IV también lo presentó. Ninguno de los animales de los grupos I y III presentaron episodios diarreicos. Las diferencias en la tasa de complicaciones en cuanto a la aparición de episodios diarreicos del grupo II comparado con los grupos I, III y IV fue estadísticamente significativa ($p=0,02$).

Todos los animales perdieron peso durante las primeras dos semanas postrasplante, independientemente del grupo, evidenciándose su recuperación a partir de la tercera semana. Los animales del grupo I presentaron una pérdida ponderal media de 29.13 ± 18.33 gramos; los de grupo II, tuvieron una pérdida media de 84.12 ± 6.55 gramos; los del grupo III, perdieron 31.93 ± 12.39 gramos; y en el grupo IV fue de 22.40 ± 13.83 gramos. No se encontraron diferencias significativas al comparar estas pérdidas ponderales entre los grupos I, III y IV ($p=1,00$, en todos los casos). Sin embargo, cuando comparamos la pérdida de peso de los grupos I, III y IV, con la pérdida de peso del grupo II, si se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$ entre el grupo II y el resto de

grupos). A pesar de la pérdida de peso inicial en los primeros 15 días postoperatorios, todos los animales aumentaron el peso progresivamente desde entonces. Así, desde el día 40 postoperatorio, todos los grupos precondicionados presentaron un peso similar, aunque siempre se mantuvieron por debajo del grupo control (ver Figuras 19 y 20).

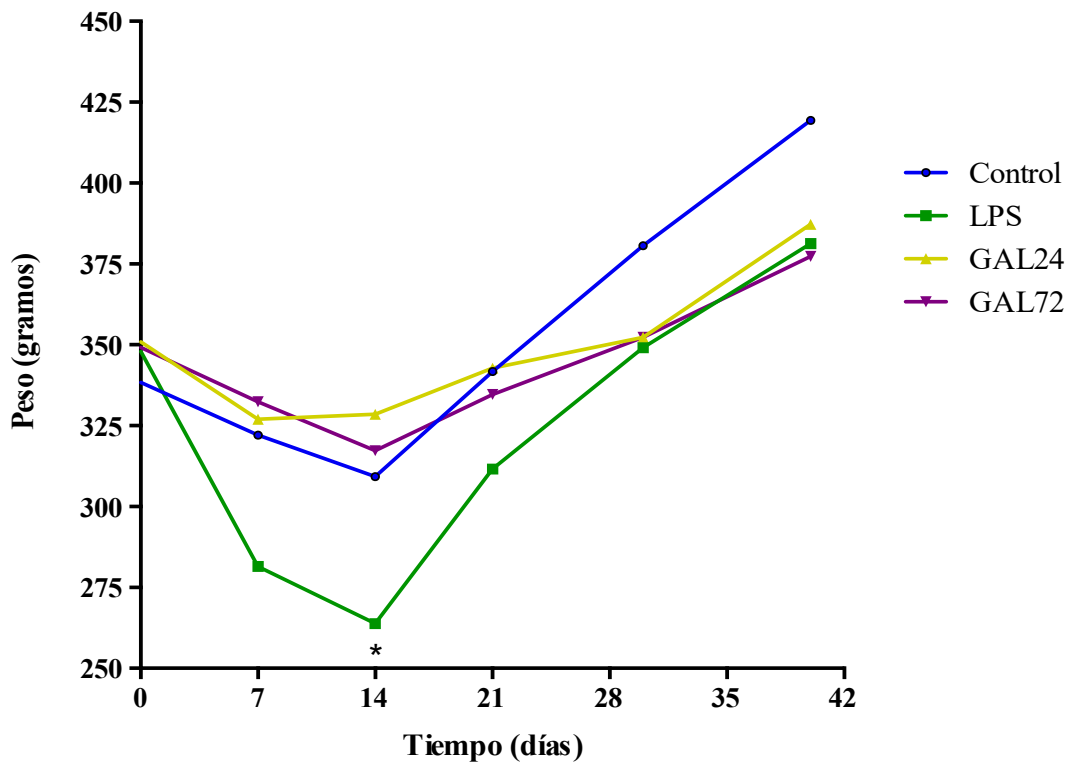


Figura 19: Variación del peso entre grupos. Evolución temporal del peso de los animales de cada grupo durante las semanas posteriores al trasplante.

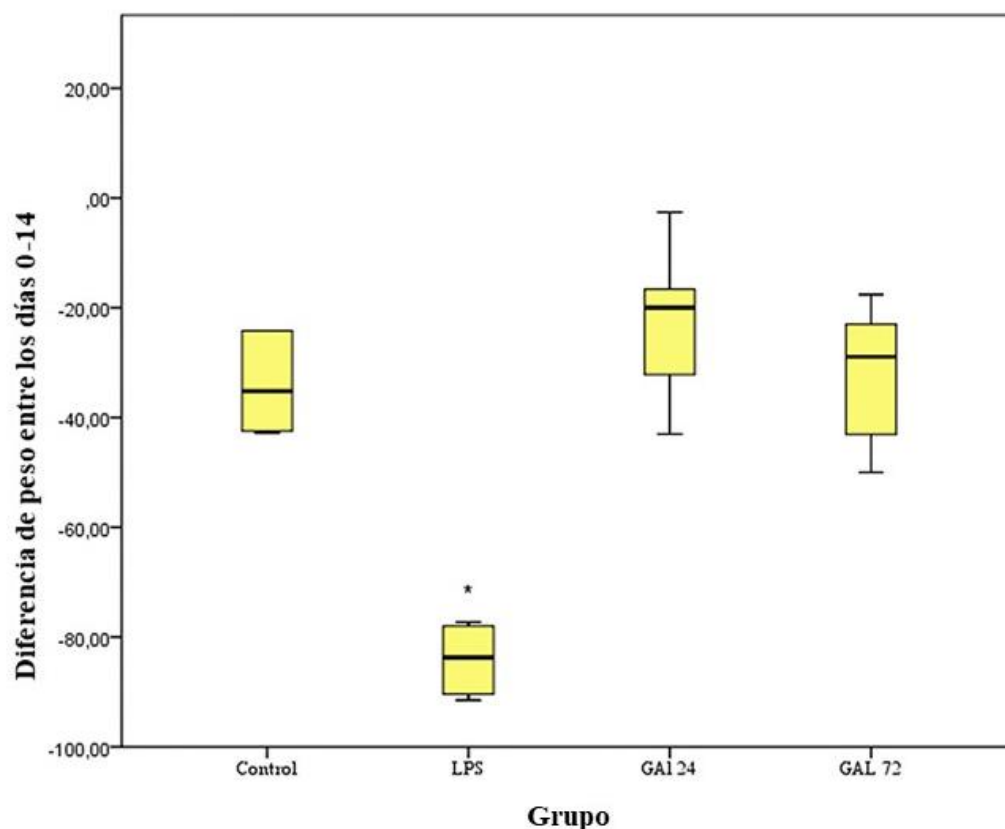


Figura 20: Variación del peso entre los grupos. Esta gráfica indica las diferencias de peso entre los días 0-14 p.o. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas del grupo II con respecto al resto de los grupos ($p < 0,001$).

4.4.Resultados histológicos

4.4.1. Gradación del episodio de rechazo agudo

Las biopsias cutáneas de los animales del grupo control presentaron un intenso infiltrado linfocitario a nivel dermoepidérmico y perivascular, con espongiosis y queratinolisis. Presentaban gran distorsión de la arquitectura cutánea, con desaparición de las papilas dérmicas e infiltrados perivasculares (ver *Figura 21*). Los episodios de RA en las biopsias de piel de este grupo tuvieron una mediana de 3 (RIQ 2,75-3,25) en la clasificación de Banff (ver *Tabla 2*). En contraste, el resto de grupos precondicionados (grupos II, III y IV), presentaron en su histología cutánea un leve infiltrado linfocitario a

nivel dermis respetando la arquitectura cutánea. No se observó alteración de las papilas dérmicas y los vasos, folículos y glándulas sebáceas se encontraron en su mayoría preservados (ver Figuras 22, 23 y 24). Cuando medimos la intensidad del rechazo dentro de la clasificación de Banff, el grupo II presentó una mediana de 1 (RIQ 1-2); el grupo III presentó una mediana de 1 (RIQ 1-1,25) y el grupo IV tuvo una mediana de 2 (RIQ 1-2). En el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos II ($p= 0,001$), III ($p< 0,001$) y IV ($p= 0,002$), respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos precondicionados (entre los grupos II y III, $p =1,00$; entre los grupos II y IV, $p=1,00$ y entre los grupos III y IV, $p=0,716$) (ver Figura 25).

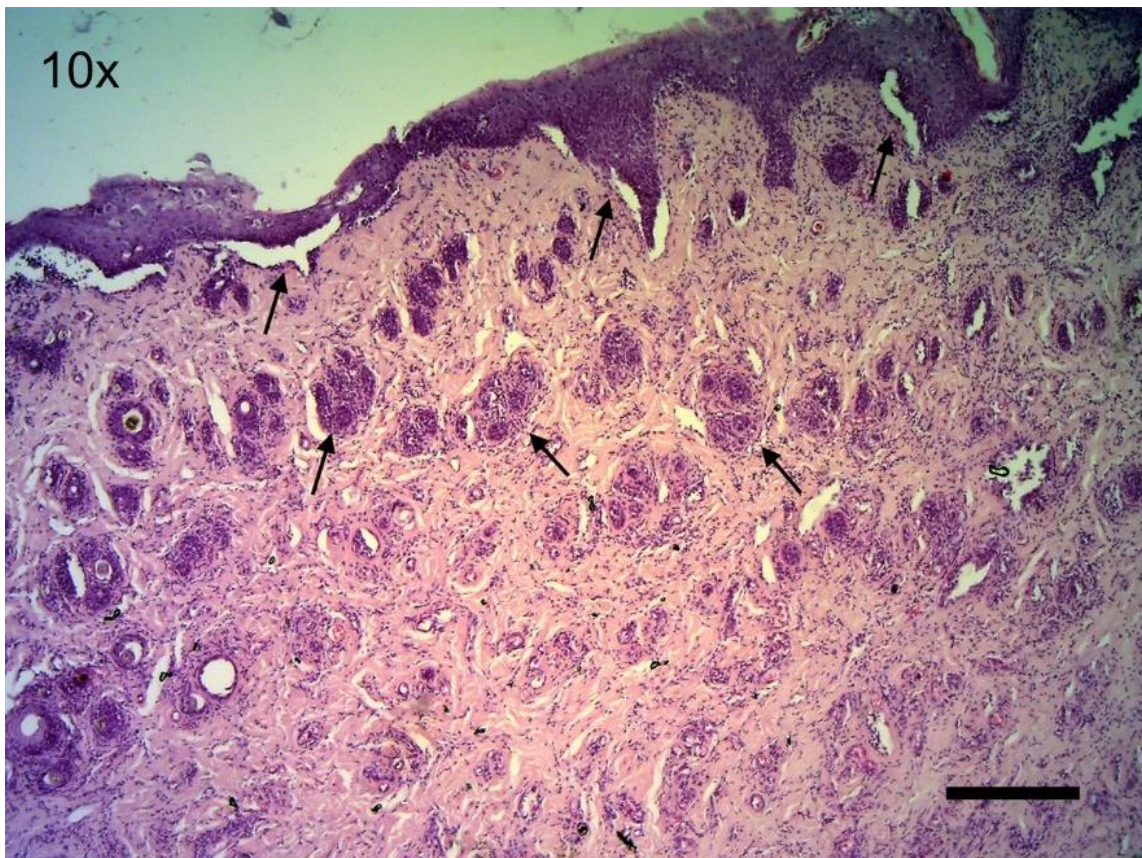


Figura 21: Imagen representativa de microscopia óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de biopsias de piel de un animal de grupo control que ha sufrido RA grado III según la clasificación de Banff. Se observa importante infiltrado linfocitario dermoepidérmico y perivascular, con gran distorsión de la arquitectura cutánea. Hay espongiosis a nivel de la unión dermoepidérmica. (Barra de escala = 200 μ m. Imágenes obtenidas a 10X).

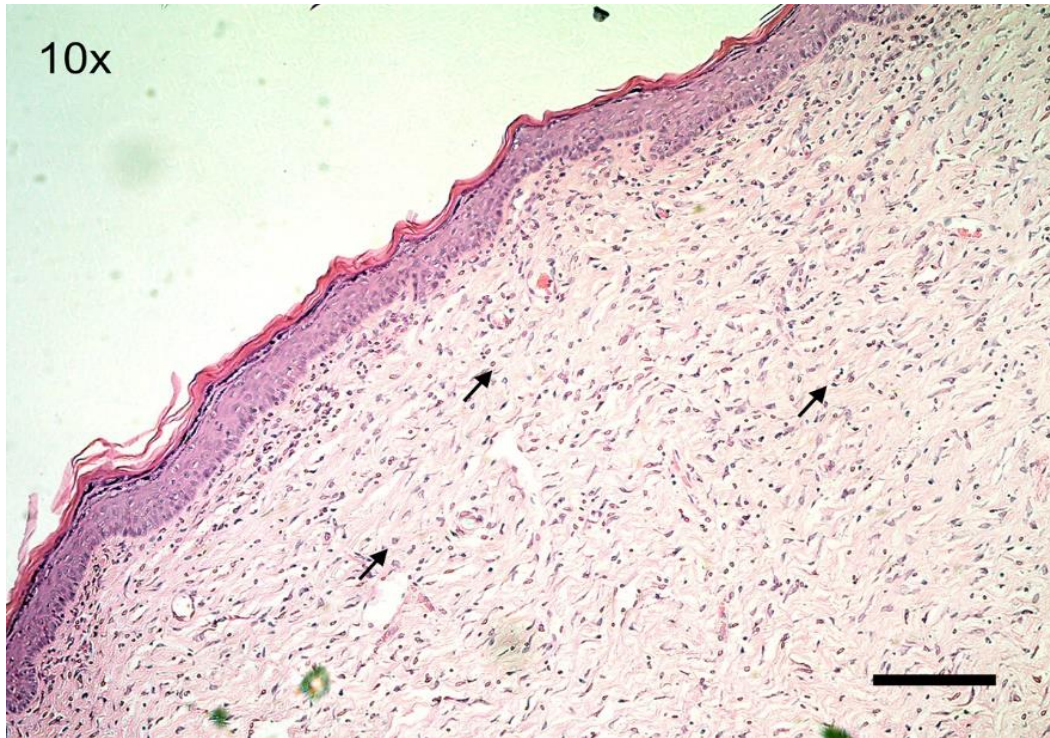


Figura 22: Imagen representativa de microscopía óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de biopsias de piel de un animal del grupo II que han sufrido RA grado I según la clasificación de Banff. Observamos un leve infiltrado linfocitario dermoepidérmico, sin alteración de la estructura cutánea. (Barra de escala = 200µm. Imágenes obtenidas a 10X).

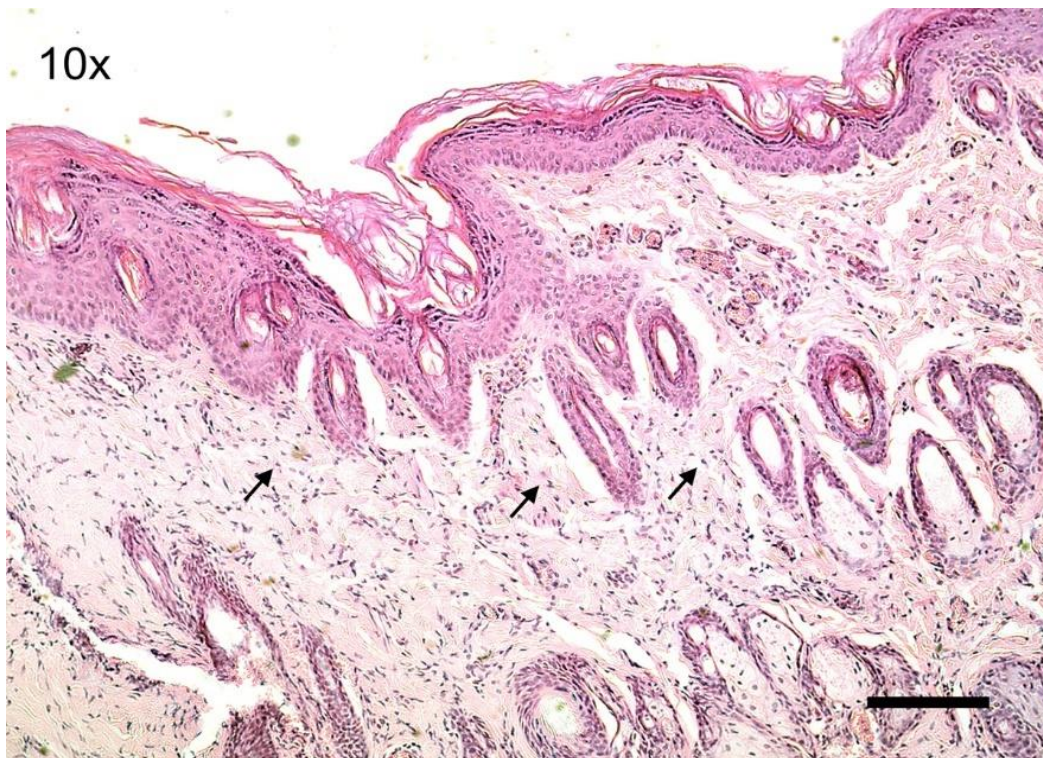


Figura 23: Imagen representativa de microscopía óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de biopsias de piel de un animal del grupo III que ha sufrido RA grado I según la clasificación de Banff. Al igual que en la imagen anterior vemos un leve infiltrado linfocitario a nivel dermoepidérmico y perivascular, con la estructura cutánea mantenida. (Barra de escala = 200µm. Imágenes obtenidas a 10X).

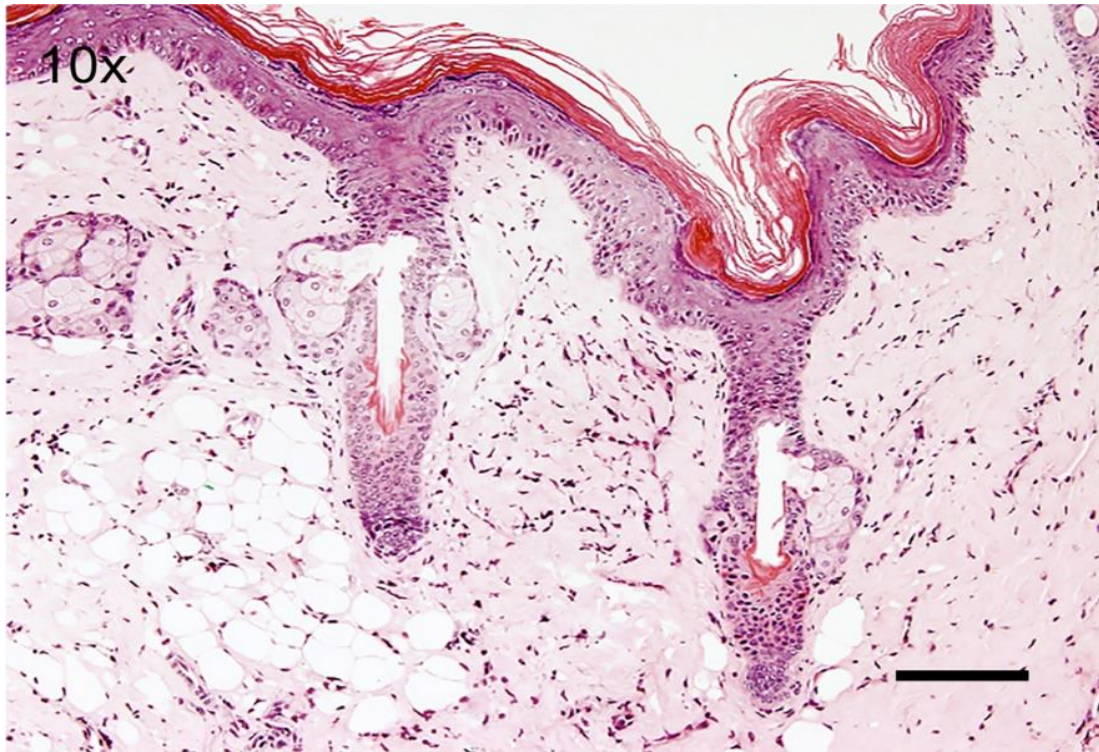


Figura 24: Imagen representativa de microscopía óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de biopsias de piel de un animal del grupo IV que ha sufrido RA grado I según la clasificación de Banff. Observamos escaso infiltrado dérmico y dermoepidérmico, con mantenimiento de la arquitectura cutánea y respeto de los anejos cutáneos. (Barra de escala = 200µm. Imágenes obtenidas a 10X).

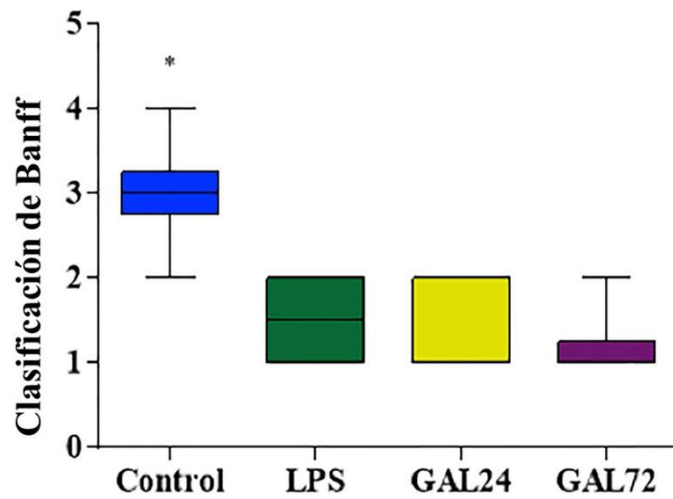


Figura 25: Representación en boxplot de las comparaciones entre los diferentes grupos en cuanto a la mediana en la clasificación de Banff 2007 (* $p < 0,05$).

4.4.2. Valoración cuantitativa del infiltrado leucocitario muscular

En las biopsias musculares de los animales del grupo I, se observó un importante infiltrado linfocitario perimisial y perivascular, con distorsión de la estructura fascicular ordenada habitual (ver *Figura 26*). Por el contrario, las biopsias de los grupos II, III y IV, mostraron menor infiltrado linfocitario, manteniendo la arquitectura fascicular normal (ver *Figuras 27, 28 y 29*). Estos hallazgos se reflejaron en la medición semicuantitativa del infiltrado leucocitario muscular, donde el grupo control presentó una mediana de 3 (RIQ 2,75-3,25), en el grupo II fue de 1 (RIQ 1-2), en el grupo III también de 1 (RIQ 1-2) y, por último, el grupo IV presento una mediana de 1 (RIQ 0-2). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo I y los grupos II ($p < 0,001$), III ($p < 0,001$) y IV ($p < 0,001$). No se encontraron diferencias significativas con los grupos precondicionados ($p = 1,000$ en todos ellos) (ver *Figura 30*).

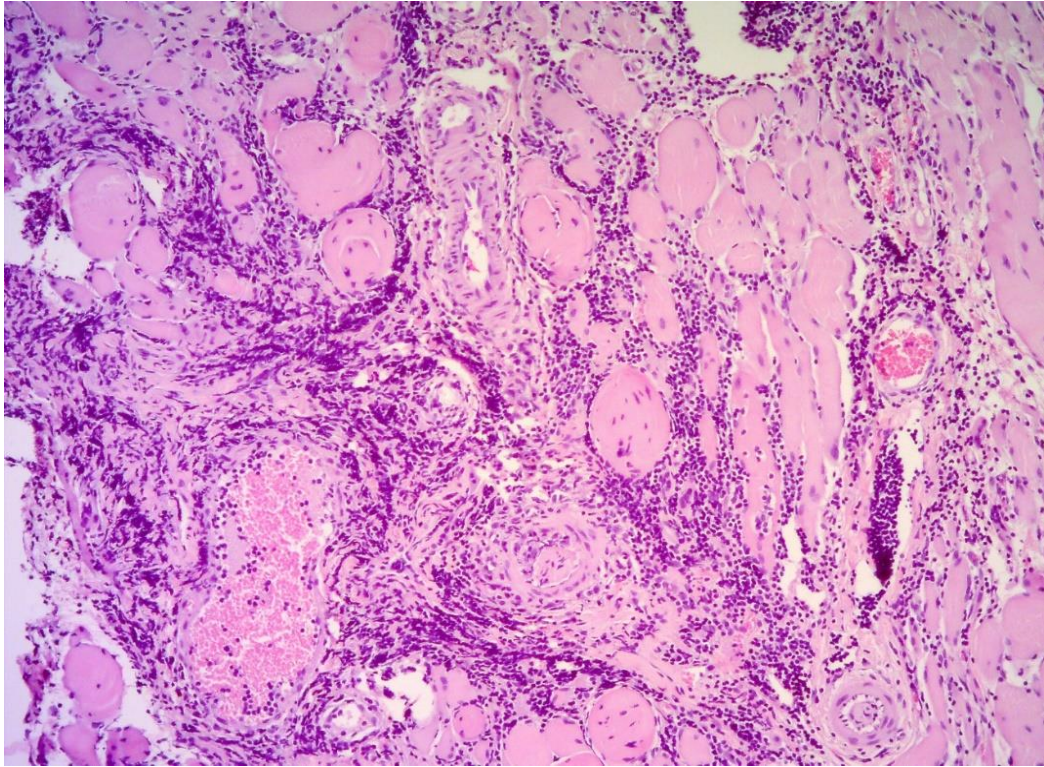


Figura 26: Imagen representativa de microscopía óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de una biopsia muscular de una rata grupo control que ha sufrido rechazo agudo. Se observa un importante infiltrado linfocitario perimisial y perivascular, que distorsiona la arquitectura fascicular normal. (Barra de escala = 200 μ m. Imágenes obtenidas a 10X).

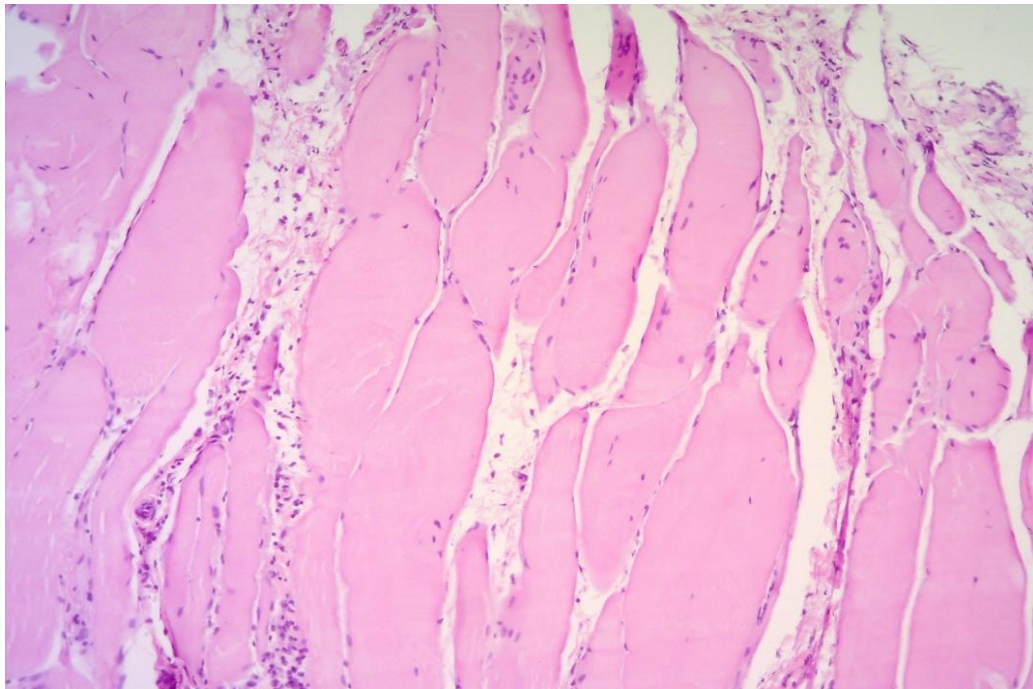


Figura 27: Imagen representativa de microscopía óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de una biopsia muscular de una rata del grupo II que ha sufrido rechazo agudo. Se observa un infiltrado perimisial mucho más leve que en la imagen anterior. (Barra de escala = 200 μ m. Imágenes obtenidas a 10X).

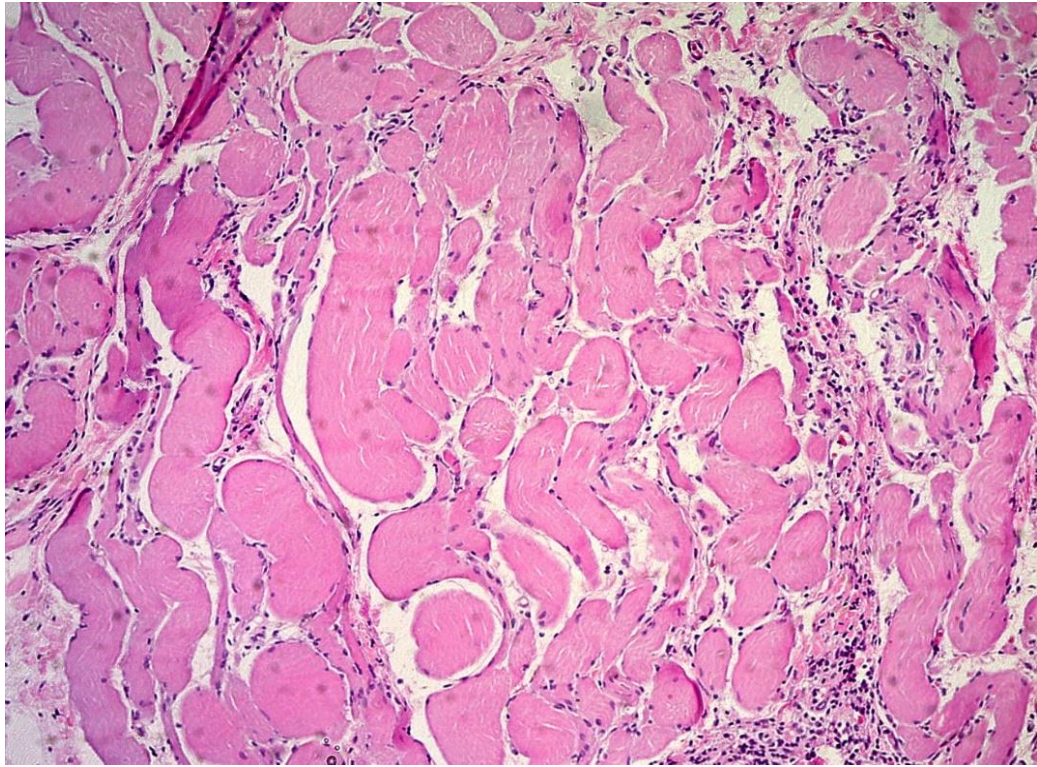


Figura 28: Imagen representativa de microscopía óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de una biopsia muscular de una rata del grupo III que ha sufrido rechazo agudo. Se observa un leve infiltrado linfocitario con arquitectura fascicular respetada. (Barra de escala = 200µm. Imágenes obtenidas a 10X).

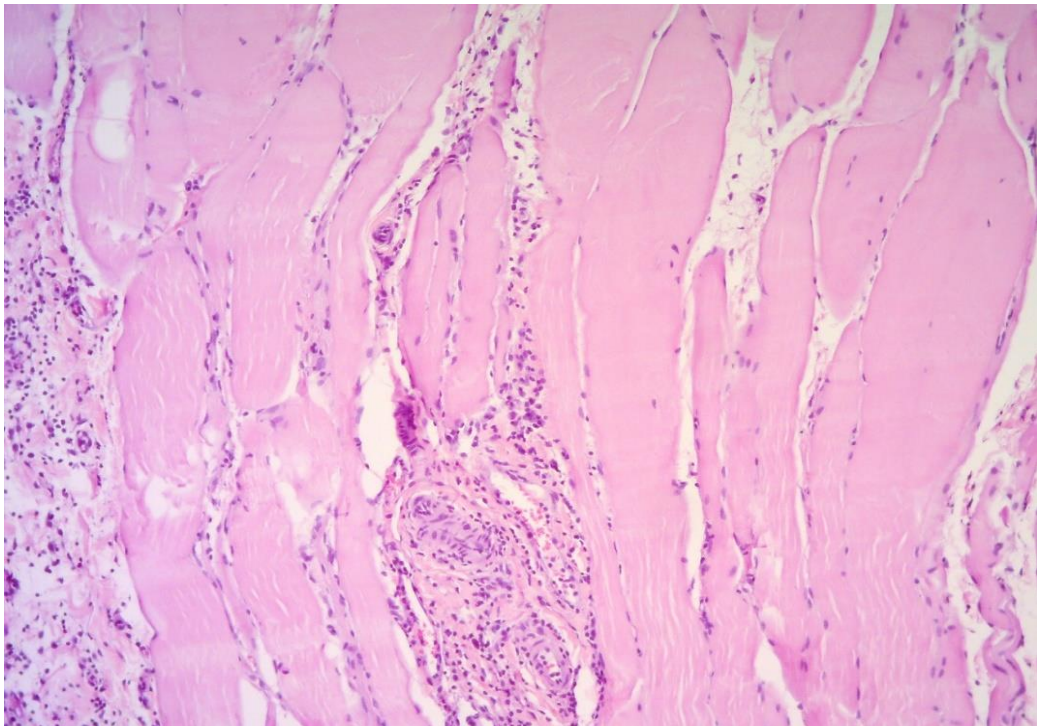


Figura 29: Imagen representativa de microscopía óptica (tinción con hematoxilina-eosina) de una biopsia muscular de una rata del grupo IV que ha sufrido rechazo agudo. Se observa un infiltrado linfocitario leve entorno a los fascículos musculares, respetando su arquitectura. (Barra de escala = 200µm. Imágenes obtenidas a 10X).

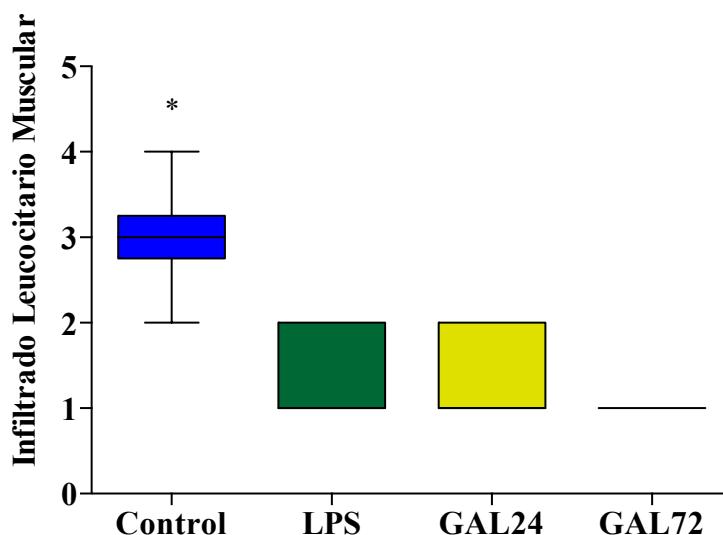


Figura 30: Representación en boxplot de las comparaciones entre los diferentes grupos en cuanto a la mediana en la gradación semicuantitativa del infiltrado leucocitario muscular (* $p < 0,05$).

4.5. Citometría de flujo en sangre periférica

El porcentaje total de linfocitos T ($CD3^+$) en el grupo I, aumentó después del trasplante hasta el día 7 después del mismo ($31,41\% \pm 13,78\%$), disminuyendo después hasta el día del episodio de RA. En el grupo II, se observó inicialmente una reducción en la tasa de linfocitos, comenzando el día de la cirugía y alcanzando un nivel mínimo en el séptimo día posoperatorio ($18,5\% \pm 8,34\%$). De manera similar, en los grupos III y IV, se observó primero una reducción en la tasa total de linfocitos $CD3^+$ hasta el día 7 ($17,66\% \pm 12,36\%$ y $23,10\% \pm 10,58\%$, respectivamente). Sin embargo, estas diferencias entre los grupos precondicionados y el grupo control en el día 7 postoperatorio no fueron significativas ($p = 0,225$, $p = 0,167$ y $p = 1,00$, entre los grupos I y los grupos II, III, IV, respectivamente). En la *Figura 31*, se observa una representación mediante diagramas de dispersión de puntos, el análisis de los linfocitos $CD3^+$ en sangre periférica de los distintos grupos en el día 7 postoperatorio. Podemos observar cómo, aun no habiendo diferencias significativas, se aprecia una mayor concentración de estas células en el grupo control en

comparación con el resto de grupos. Más tarde, la tasa de linfocitos comenzó a aumentar en todos los grupos precondicionados hasta el día 21 después del trasplante. Luego el nivel bajó hasta el día del rechazo (ver *Figura 32*).

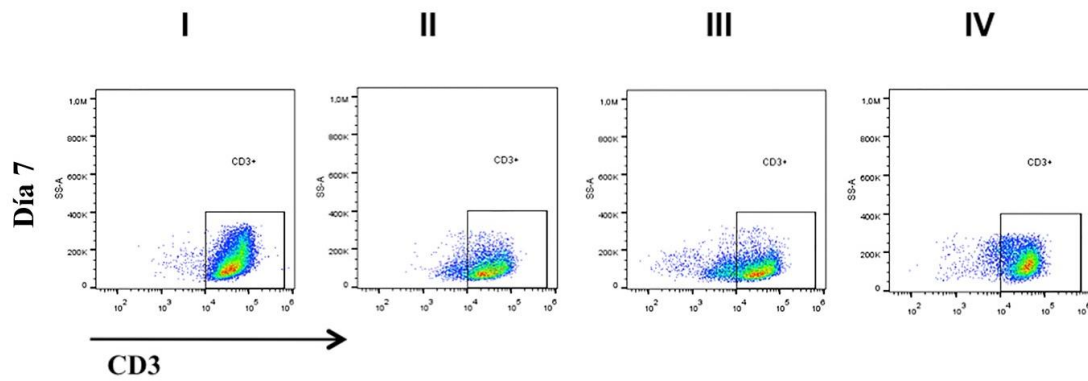


Figura 31: Representación mediante imágenes de dot-plot del análisis de linfocitos T CD3+ en los diferentes grupos, medidos en sangre periférica en el día 7 postoperatorio, empleando citometría de flujo.

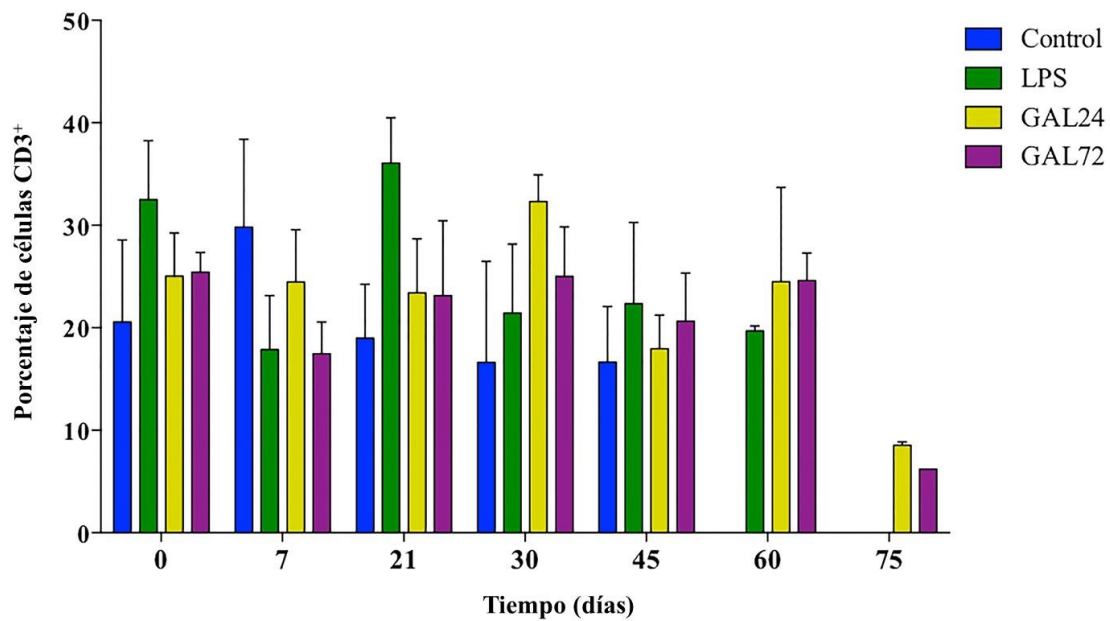


Figura 32: Representación mediante diagrama de barras de la evolución temporal de los porcentajes de linfocitos T (CD3+) durante las semanas posteriores al trasplante.

El quimerismo en sangre periférica está determinado por el porcentaje de células T del donante (tanto CD8⁺/RT1ⁿ como CD4⁺/RT1ⁿ) detectado en el animal receptor. El máximo nivel de quimerismo en el grupo I, en términos de porcentaje absoluto, fue el más bajo de todos los grupos; presentó un pico en el día 30 después del trasplante (2,06%±0,36% células negras CMH-I; 0,046%±0,024% CD4⁺; y 0,046%±0,012% CD8⁺), con una reducción a niveles mínimos en el día 45 (0,598%±0,296% células negras CMH-I; 0,194%±0,102% CD4⁺; y 0,028%±0,018% CD8⁺). El nivel máximo de quimerismo en el grupo II, se observó entre los días 21 y 30 después del trasplante (2,30%±0,13% células negras CMH-I; 0,764%±0,168% CD4⁺; y 0,075%±0,027% CD8⁺). Lo mismo se observó en los picos de quimerismo del grupo III a los 21 días (2,63%±1,46% células negras CMH-I; 0,441%±0,209% CD4⁺; y 0,262%±0,048% CD8⁺) y en el grupo IV a los 21 días (2,47%±0,19% células negras CMH-I; 1,05%±0,078% CD4⁺; y 0,198%±0,065% CD8⁺). Se observaron diferencias estadísticamente significativas para las células negras CMH clase I entre el grupo I y el resto de grupos (p=0,04, grupo II; p=0,002, grupo III; y p=0,002, grupo IV) (ver *Figura 33*); también para las células CD4⁺ entre los grupos I y II (p<0,001), III (p<0,001) y IV (p<0,003) (ver *Figura 34*). No se encontraron diferencias significativas para los linfocitos T CD8⁺ entre los grupos I y II (p=0,614). Al comparar el grupo I y los grupos III y IV, sí que se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p<0,001 en ambos) (ver *Figura 35*).

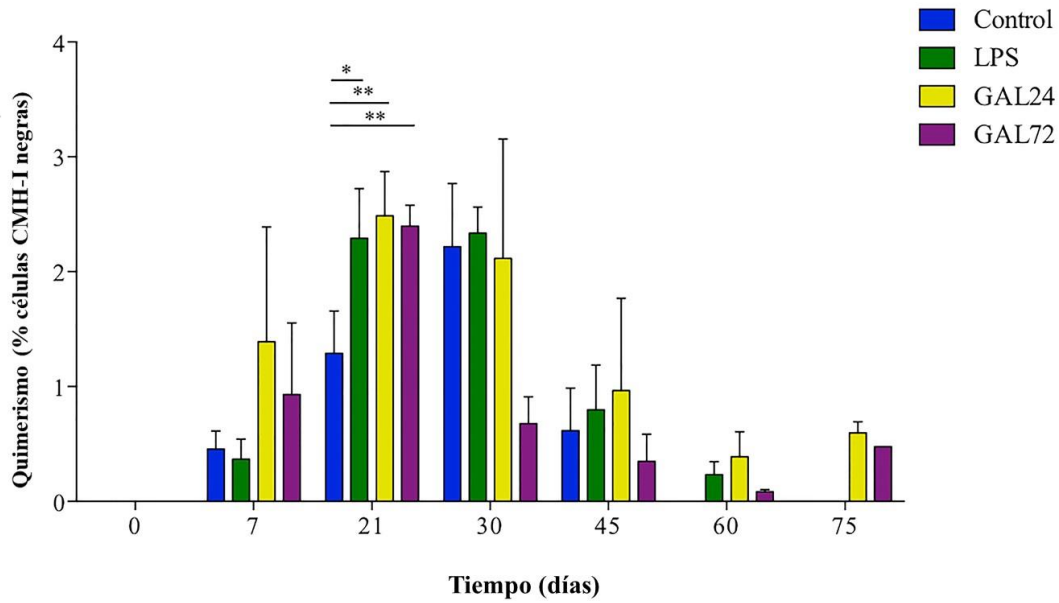


Figura 33: Representación mediante diagrama de barras del porcentaje total de células con CMH-I de la rata Brown Norway (quimerismo) en la sangre periférica del animal receptor en las semanas posteriores al trasplante. Se observa como el preconditionamiento con LPS y GAL aumenta el nivel de quimerismo en sangre periférica. (*p<0,005, **p<0,001).

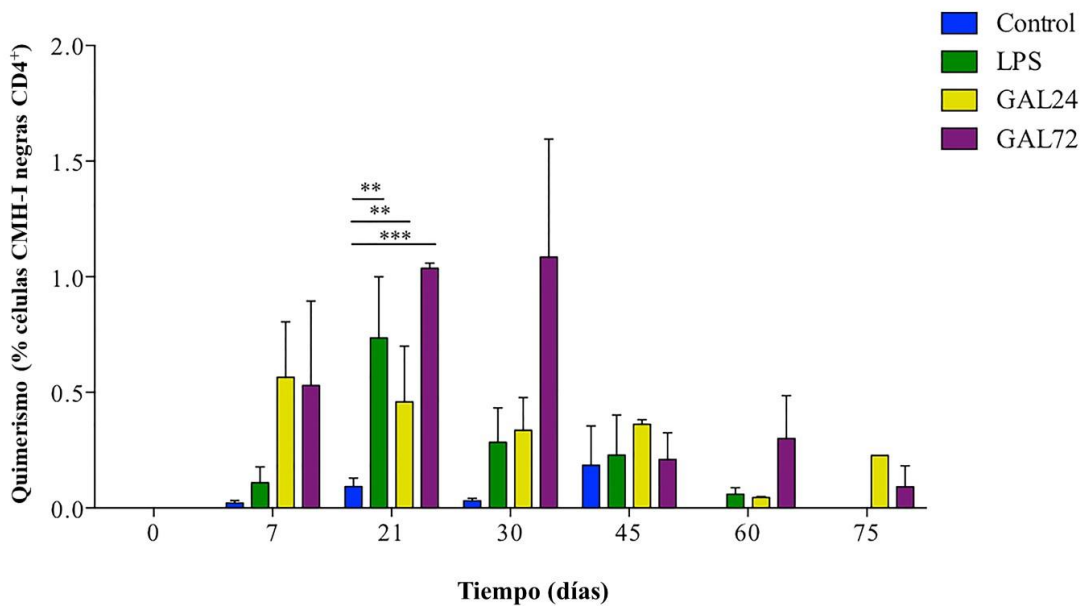


Figura 34: Representación mediante diagrama de barras del porcentaje total de células T con CMH-I CD4+ de rata Brown Norway en sangre periférica del animal receptor (p<0,001).**

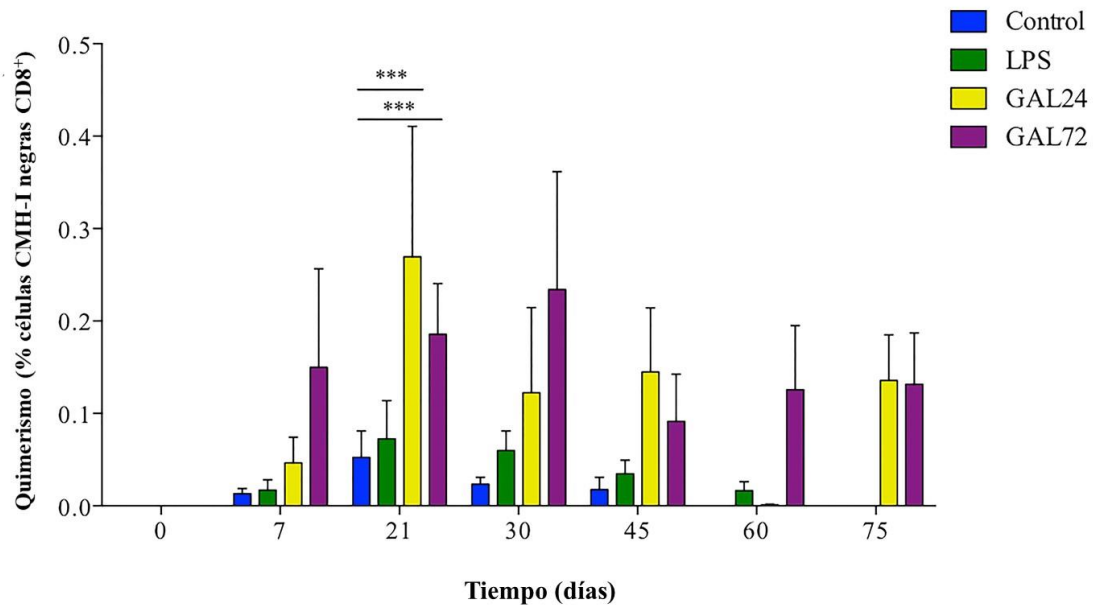


Figura 35: Representación mediante diagrama de barras del porcentaje total de células T con CMH-I CD8⁺ de rata Brown Norway en sangre periférica del animal receptor (**p<0,001).

4.6. Niveles de expresión de citoquinas

Los niveles plasmáticos de citoquinas medidas por citometría de flujo mediante “arrays” de proteínas se muestran en las Figuras 36 y 37.

En el grupo I, el patrón de expresión y producción de TNF- α (ver Figura 36) tuvo un ascenso progresivo hasta la retirada de CsA (30 días después de la cirugía, media 363,96 \pm 131,87 picogramos [pg]/ml). A continuación, se observó un ascenso más pronunciado (media en el día 45 de 1049,7 \pm 628,93 pg/ml) hasta el día del rechazo del trasplante. El patrón de expresión en los grupos precondicionados con LPS y GAL fue diferente. En el grupo II, la producción máxima se observó a los 3 días del precondicionamiento, coincidiendo con el día de la cirugía (3023,00 \pm 1443,83 pg/ml;), siendo significativamente mayor respecto a las cifras encontradas en el grupo control en el mismo momento ($p=0,010$). Después la intervención quirúrgica, en lugar de aumentar como podría esperarse, se produjo un descenso paradójico hasta el día 7 después del

trasplante ($1711,17 \pm 220,41$ pg/ml; $p < 0,001$). A partir de entonces, se mantuvo estable, descendiendo nuevamente el día 60 hasta el episodio de RA. El grupo III, presentó una progresión similar al grupo II, con un pico máximo el día de la cirugía ($2911,42 \pm 2053,23$ pg/ml), significativamente mayor al grupo control ($p = 0,014$). Después presentó un descenso de los niveles el día 7 p.o. ($1654,67 \pm 642,56$ pg/ml, $p = 0,001$) y continuó con una progresión estable hasta el día del RA. El grupo IV, al igual que el resto de grupos precondicionados, presentó un pico significativo respecto al control el día del trasplante ($2299,73 \pm 520,91$ pg/ml, $p = 0,047$). Sin embargo, no hubo un descenso de los niveles tras la cirugía ni tampoco un aumento de los mismos como cabría esperar, manteniéndose estable hasta el día 30, cuando comenzó a descender sus niveles hasta el día 60.

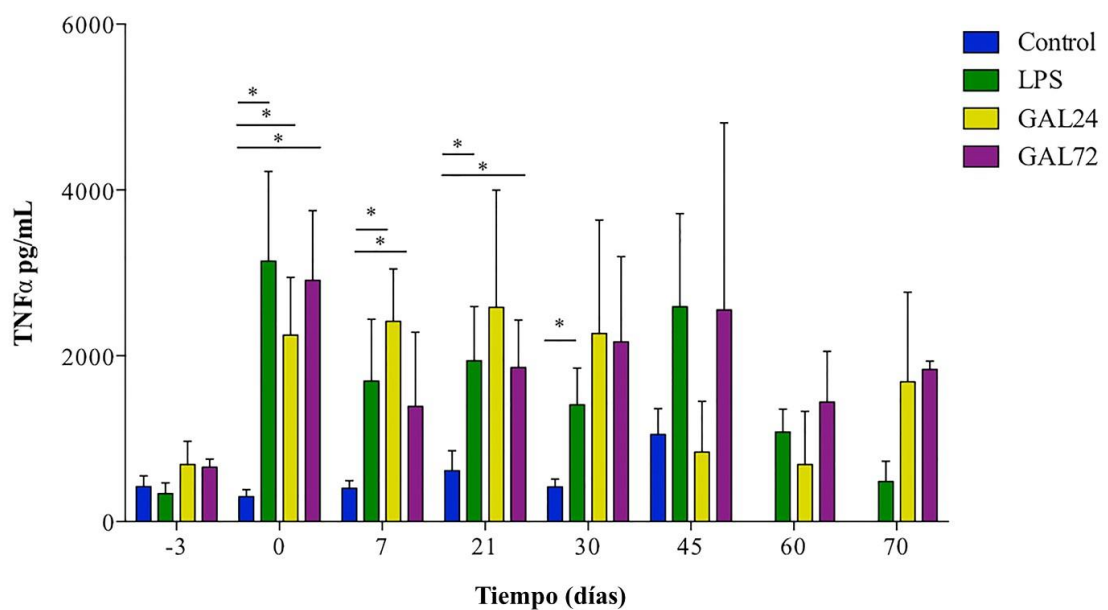


Figura 36: Progresión de los niveles TNF- α en plasma durante el estudio (* $p < 0,005$).

Respecto a los niveles de expresión del IFN- γ (ver *Figura 37*), la progresión en el grupo control mostró un ascenso continuado hasta el día 30 p.o. A partir de este momento ascendió de forma abrupta hasta el día del episodio de RA, cuando alcanzó su máximo nivel medio ($125,31 \pm 82,90$ pg/ml). En el grupo II, se observó un ascenso significativo al compararlo con el resto de grupos, desde el día de la administración del LPS, alcanzando su punto máximo el día 7 después de la cirugía (403.95 ± 11.92 pg/ml) ($p < 0.001$, $p < 0.001$ y $p = 0,005$, en la comparación del grupo II con los grupos I, III y IV, respectivamente). A continuación, se observó una caída hasta el día 30 ($77,68 \pm 28,37$ pg/ml), momento en que empezó un ligero aumento hasta el día del RA. Los grupos III y IV mostraron una progresión similar al grupo II, pero con un pico significativamente menor en el día 7 después de la cirugía (126.01 ± 42.71 pg/ml en el grupo III ($p < 0,001$) y 281.99 ± 78.65 en el grupo IV ($p = 0,005$).

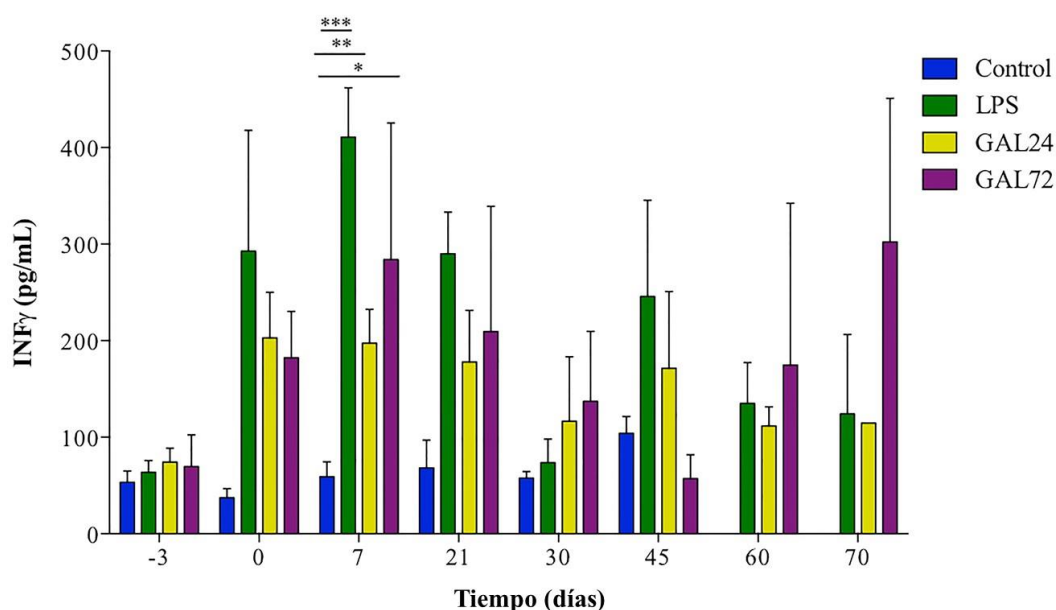


Figura 37: Progresión de los IFN- γ en plasma durante el estudio ($p < 0,005$, ** $p < 0,001$).*

5. DISCUSIÓN

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios con el objetivo de desarrollar tolerancia en modelos de AVCs, incluidos algunos que exploran el mecanismo de tolerancia a endotoxina (218,221,299,316). Hasta donde sabemos, el empleo de LPS o GAL para su inducción aún no se ha aplicado en el campo de los AVC. Este estudio muestra un modelo de trasplante de pata posterior en rata en posición heterotópica a nivel inguinal tras haber realizado un acondicionamiento del animal con LPS o GAL. Con él, hemos podido demostrar el objetivo principal del estudio: el desarrollo de episodios de RA se retrasa de manera significativa en los grupos acondicionados con LPS o GAL en comparación con el grupo control.

El modelo microquirúrgico experimental presentó una mortalidad intraoperatoria y en el postoperatorio inmediato del 14,63% (6/41). El tiempo medio de la intervención quirúrgica fue de 195,58 minutos (DS 27,05 minutos) y el tiempo medio de microcirugía fue de 96,9 minutos (DS 20,14 minutos). Estos tiempos se pueden justificar por la curva de aprendizaje del modelo experimental. No se comporta como un factor de confusión, ya que no se encuentran diferencias significativas en ninguno de los tiempos entre los distintos grupos ($p= 0,827$ y $p=0,446$, para el tiempo de intervención quirúrgica y el tiempo de microcirugía respectivamente). La incidencia de complicaciones fue del 48,78%, y se observó un tiempo quirúrgico significativamente mayor en este grupo ($p=0,001$). Un mayor tiempo de intervención se asocia a una mayor pérdida de fluidos, hipotermia por exposición y una mayor probabilidad de vasoespasmos, lo cual conlleva un peor pronóstico quirúrgico (317). De acuerdo con esta afirmación, en nuestro estudio se observó una duración de la intervención quirúrgica significativamente mayor en los animales que sufrieron un éxitus intraoperatorio por pérdida hemática o problemas respiratorios (221,6 minutos [DS 29,94 minutos]; $p=0,02$). De los animales que

presentaron complicaciones intraoperatorias a nivel de la anastomosis microvascular, solo el 37.5% (3/8) se lograron rescatar con éxito, mientras que en el 62,5 % (5/8) acabó fracasando el trasplante. Factores como la pérdida de fluidos, que condiciona un enlentecimiento del flujo sanguíneo, la hipotermia que favorece el vasoespasmo o la friabilidad del vaso en una anastomosis secundaria podrían contribuir a este hecho. Así mismo, un tiempo quirúrgico prolongado, como hemos mencionado, conllevaría más pérdidas hemáticas, más tiempo de hipotermia y más tiempo de isquemia del trasplante. Esto daría lugar a un enlentecimiento de la circulación con mayor estasis vascular y una mayor tasa de trombosis asociado al síndrome por isquemia-reperfusión (318). En nuestro estudio los animales que sufrieron esta complicación tuvieron un tiempo medio de cirugía mayor (213,75 [DS 25,03] minutos vs 191,18 [DS 25,98] minutos, $p=0,032$) así como de anastomosis microquirúrgica (106,25 [DS 15,05] vs. 94,63 [DS 20,74]), aunque éste último no fue estadísticamente significativo ($p=0,146$). Por otro lado, de los 8 animales que presentaron una patencia negativa en la cirugía, tres pertenecían al grupo precondicionado con LPS. Aunque el análisis no fue estadísticamente significativo frente al resto de grupos ($p=0,0691$), si parece mostrar una tendencia estadística. La inflamación sistémica secundaria a su administración se asocia a un estado procoagulante que podría explicar la mayor tasa de trombosis vascular en este grupo. Las células endoteliales no son un simple recubrimiento del interior de los vasos sanguíneos, sino que tienen funciones biológicas, como la modulación de la coagulación a través de la expresión de trombomodulina, la regulación de flujo microvascular, la expresión de moléculas de adhesión, la regulación de la migración de células a los tejidos y la modulación del tono vascular (319). Cuando el organismo se expone al LPS y se desencadena una respuesta inflamatoria sistémica, las células endoteliales presentan una disminución de la expresión de los niveles de trombomodulina y el heparansulfato, y hay

un incremento de la síntesis de Factor Tisular. Esto produce la activación de la vía extrínseca de la coagulación modificando el equilibrio procoagulante /anticoagulante a favor del primero (320).

La TE supone un mecanismo fisiológico clave de limitación del daño y abre una importante oportunidad al campo de la terapia en diferentes patologías. Se ha demostrado a través de estudios en animales que la inducción de TE protege del daño por isquemia-reperfusión en órganos como el hígado, el riñón, el intestino o el cerebro (308,321,322). Esto, llevado a la práctica clínica, podría suponer una oportunidad para el tratamiento de patologías como el ictus isquémico y una oportunidad para el desarrollo de tolerancia en el campo del trasplante. Un estudio reciente de alotrasplante cardiaco en ratones llevado a cabo por el equipo de Ishiyama et al, plantearon utilizar el efecto inmunomodulador que supone el preconditionamiento con LPS a dosis subletales. Hasta donde conocemos, es el primer intento de llevar el mecanismo de tolerancia a endotoxina al trasplante de órganos. Entre sus resultados se obtuvo un mayor tiempo de supervivencia en los grupos preconditionados (16 días) respecto a los grupos control (8 días) de forma estadísticamente significativa ($p < 0,01$) (299). Sin embargo, el reto inmunológico que supone el alotrasplante vascularizado compuesto, entre otras cosas por la presencia de la piel, no ha sido planteado hasta la fecha. En nuestro estudio, en el grupo preconditionado con LPS, también se observó un tiempo significativamente más largo hasta la aparición de un episodio de RA en comparación con el grupo control (mediana: 68 días; RIQ: 71-61; $p < 0,001$). Esto nos permite afirmar, que la inmunorregulación que supone la TE también puede ser aplicada al terreno del AVC. La TE es un mecanismo adaptativo diseñado para proteger al huésped de lesiones inflamatorias causadas por una exposición excesiva a LPS (254). Pero este fenómeno, como hemos visto, no solo se limita a la protección contra una dosis posterior y elevada de LPS. El pretratamiento con LPS

también atenúa la producción de citoquinas proinflamatorias en respuesta a otros estímulos diferentes como la infección por bacterias gram positivas, la lesión por isquemia-reperfusión de los órganos o el shock hemorrágico (254,323). A nivel experimental se ha podido comprobar que esto se debe a la existencia de tolerancia cruzada entre los agonistas de TLR. Es decir, la exposición a LPS atenúa la respuesta inflamatoria en respuesta a otros TLR (TLR-2, TLR-5, etc) (295,324,325). Esto explicaría el mayor tiempo de supervivencia de los trasplantes de nuestro estudio en el grupo precondicionado con LPS. El sistema inmune tras el estímulo con LPS sufre una reprogramación a nivel génico que supone una anulación o disminución de la respuesta a posteriores estímulos que, en condiciones normales, producirían una respuesta inflamatoria importante, como es el caso de una cirugía de AVC.

Sin embargo, en el grupo precondicionado con LPS, se observó un número significativamente mayor de complicaciones, principalmente representadas por una mayor pérdida de peso y el desarrollo de episodios de diarrea. Estos hallazgos coinciden con el estudio previo de Ishiyama et al, y se atribuyeron al estado de inflamación sistémica inicial que supone la administración de LPS en el animal (299,326). El SRIS se caracteriza por una situación hipermetabólica, con aumento del gasto energético, y una situación hipercatabólica, con degradación proteica aumentada. Se trata de un mecanismo denominado por algunos autores como “autocanibalismo séptico”, que utiliza el organismo para suministrar sustratos necesarios para mantener los procesos de defensa inmunitaria y reparación tisular. Esto trae como consecuencia el desgaste de la masa proteica con una desnutrición progresiva, y con ello una pérdida de peso en un corto espacio de tiempo (días) si no se toman las medidas adecuadas (327). El hipermetabolismo está mediado por un aumento de las hormonas contrarreguladoras, citoquinas (como TNF- α e IL-6), mediadores lipídicos y fragmentos del complemento

(328). Este gasto energético alcanza un pico entre los 3-4 días desde el insulto inicial y persiste elevado hasta 10 días después si no se presentan complicaciones que perpetúen el hipermetabolismo, en cuyo caso se prolongaría la situación (329). En nuestro estudio, todos los animales perdieron peso durante las primeras dos semanas. Esto se explica por la situación de estrés que supone una cirugía como el trasplante alogénico de extremidad posterior. Sin embargo, la pérdida de peso en los animales del grupo precondicionado con LPS fue significativamente mayor que en el resto de grupos. Esto puede ser debido a la reacción inflamatoria sistémica que supone la administración de LPS, que comienza 3 días antes de la cirugía. Además, entre las complicaciones mencionadas también se registró un aumento significativo en el número de deposiciones diarreicas en el grupo precondicionado con LPS, lo cual podría también justificar la mayor pérdida de peso en este grupo. En diversos estudios se ha visto que la endotoxemia provoca una disrupción del tránsito y la motilidad intestinal, produciendo una mayor contracción desde el yeyuno hasta el colon, resultando en un tránsito intestinal rápido (330–332). Al igual que la hipotensión que se produce durante la circulación de endotoxina, la alteración del tránsito está mediada por el óxido nítrico (NO). La administración de endotoxina induce la expresión de la NO sintasa produciendo un aumento de la concentración de óxido nítrico en el endotelio vascular (333). Se ha demostrado en diversos estudios tanto en animales como en humanos que, a nivel intestinal, el NO participa en la inhibición no adrenérgica no colinérgica del músculo liso longitudinal (332,334,335). La sobreproducción de NO que se produce durante la endotoxemia da lugar a un aumento de la motilidad intestinal y, como consecuencia, un aumento del tránsito con la aparición de diarreas.

La activación del complejo receptor de LPS por el lípido A induce una producción masiva de citoquinas proinflamatorias, activación leucocitaria e inflamación, lo cual es beneficioso para eliminar infecciones bacterianas a nivel local pero puede causar una

inflamación sistémica severa e incluso un shock cuando se emplean altas dosis de LPS (326). Al igual que ocurre con otros regímenes de tolerancia, o con el tratamiento inmunosupresor crónico, los efectos secundarios a la administración de LPS son inadmisibles en el contexto de un AVC, ya que conduciríamos a un paciente sano a una situación de SRIS con la morbimortalidad que implica. Por ello, y dado la potencial utilidad de la TE en el campo de la terapéutica, surge la necesidad de encontrar inmunomoduladores diferentes de LPS, que no produzcan la reacción inflamatoria sistémica inicial, pero que puedan generar una TE. Así, surgieron los análogos del lípido A, como el lípido A monofosforilado (MPLA, del inglés *Monophosphoryl lipid A*) o el fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP, del inglés *Aminoalkyl Glucosamidine Phosphate*), que presentan una actividad proinflamatoria atenuada, pero conservan su actividad inmunomoduladora (326). Cambios en el número, disposición y longitud de las cadenas laterales de ácidos grasos así como la ubicación de los grupos cargados, alteran en gran medida las propiedades biológicas de lípido A, dando lugar a nuevas moléculas que de manera preferente activan la vía TRIF de señalización intracelular, en lugar de la vía MyD88 (336,337). El MPLA se sintetiza mediante ingeniería genética a partir de *Salmonella minnesota 595* (338). Se ha visto que su administración sistémica induce TE en humanos y animales de experimentación, objetivado por el descenso en la concentración de citoquinas proinflamatorias y la atenuación de las alteraciones hemodinámicas en respuesta a una administración posterior de LPS (339,340). Debido a sus propiedades, se ha utilizado como inmunoadyuvante en preparaciones de vacunas, como la del virus de papiloma humano y el virus de la hepatitis B actualmente disponibles (341). El AGP es otro inmunomodulador cuyo uso profiláctico ha mostrado un aumento de la supervivencia en roedores tras una dosis letal con *Listeria monocytogenes*, virus influenza y *Yersinia pestis* (342,343). Así mismo, el tratamiento con AGP demostró, en

un modelo experimental, la disminución de la carga bacteriana y una mejora de la supervivencia en la neumonía tularémica (344). Sin embargo, su objetivo clínico continúa siendo objeto de estudio (326). En la línea de estos inmunomoduladores, se ha visto que el GAL a nivel experimental induce un estado refractario en macrófagos, de forma que posteriores estímulos con LPS no producen un aumento de las citoquinas proinflamatorias, como TNF- α (305). En nuestro estudio, el grupo III, preconditionado con GAL 72 horas antes del trasplante, presentó una mediana de tiempo hasta la aparición del episodio de RA de 70 (RIQ 73-69) días, y en el grupo IV (preconditionado con GAL 24 horas antes del trasplante), la mediana fue 70 (RIQ 74-69) días. Ambos grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo II donde la mediana de días respecto al RA fue de 68 (RIQ 71-61) ($p=0,138$), pero sí respecto al grupo control (en ambos, $p<0,001$). En un estudio reciente en roedores en el que se administró GAL intraperitoneal, se demostró la inducción de TE en los macrófagos y células dendríticas, con una respuesta inflamatoria inicial atenuada en comparación con la resultante de la administración de LPS (304). De acuerdo con este hecho, el efecto inmunorregulador que supone la TE podría explicar el mayor tiempo de supervivencia de los trasplantes en los grupos preconditionados con GAL. Además, en nuestro estudio se observó una reducción de peso en las 2 primeras semanas significativamente menor que el grupo II ($p<0,001$, en ambos grupos preconditionados con GAL), así como una menor incidencia de episodios diarreicos ($p=0,02$). Este hecho se atribuyó a la mejor respuesta sistémica inicial producida por este tipo de pretratamiento, como se establecieron en los estudios de Toledano et al y Namal et al (304,305). Este hallazgo abriría la posibilidad del empleo de GAL a nivel clínico para inducir un estado de TE por su menor morbilidad, y con este estudio se ha señalado su posible aplicación en el campo del AVC.

El estado refractario inducido por la TE también se hizo patente en la intensidad del RA. A nivel macroscópico, en el momento del rechazo, todos los trasplantes exhibieron pérdida parcheada de pelo, eritema y descamación a nivel de la isla cutánea. Pero es en el análisis de las biopsias a nivel microscópico, donde en el grupo control se observó un mayor infiltrado linfocitario a nivel dermoepidérmico y perivascular respecto a los grupos precondicionados. En las biopsias musculares se encontraron signos análogos, con un mayor infiltrado linfocitario perimisial y desestructuración de los fascículos. Todo ello con una intensidad, medida por la escala de Banff 2007 y la escala semicuantitativa de infiltrado leucocitario tisular, significativamente mayor que en los grupos precondicionados. Esto es atribuible a la influencia del precondicionamiento con LPS y GAL. Estos hallazgos fueron similares a los encontrados en órganos sometidos a isquemia-reperfusión en estudios experimentales de TE. Aunque la supervivencia de los trasplantes en general ha ido aumentando de manera continua en las últimas décadas, el daño por isquemia-reperfusión es una de las principales causas de daño tisular y fallo o rechazo precoz de los trasplantes (345). Las células dañadas por este mecanismo atraen a células del sistema inmune que liberan citoquinas proinflamatorias como el TNF- α provocando una reacción inflamatoria que dañará del tejido trasplantado. A partir de este hecho, se han llevado a cabo estudios en animales empleando la TE en modelos de isquemia-reperfusión a nivel hepático y renal demostrando un menor daño histológico asociado al trasplante (346,347). A nivel hepático el grupo precondicionado con LPS mostró un daño significativamente menor que el grupo control, con un leve infiltrado linfocitario, escasa vacuolización celular y manteniendo la estructura del lóbulo hepático. Por el contrario, el grupo control mostró una desestructuración lobular hepática, con gran infiltrado linfocitario, vacuolización celular, hemorragia y necrosis (346). Un estudio similar en el riñón, mostro cambios similares: el grupo control presentó una necrosis

generalizada afectando inicialmente al túbulo proximal y después también a la nefrona distal, congestión capilar intersticial difusa a nivel de la médula externa y edema intracelular. En el grupo con TE se observó un menor grado de lesión de las células del túbulo proximal, con menor congestión vascular y menor edema intracelular que el grupo anterior (347). La inmunorregulación que supone la TE, da lugar a una alteración en la expresión de citoquinas por las células inmunes activadas dando lugar a una respuesta más atenuada al rechazo (305). En nuestro estudio, las patas posteriores de los animales trasplantados también se sometieron a un tiempo de isquemia mientras se realizaba la preparación del sitio receptor. La posterior reperusión pudo de la misma forma dañar el tejido. Sin embargo, en los grupos que habían sido precondicionados y sometidos a TE, el daño tisular tanto a nivel cutáneo como a nivel muscular fue significativamente menor respecto al grupo control. El daño por isquemia-reperusión del trasplante podría estar reducido gracias a la TE, y de este modo explicaría también el menor grado de intensidad de rechazo en los grupos precondicionados.

La incidencia de RA en los AVC durante el primer año es de alrededor del 85%, y por tanto es más elevada que en cualquier otro tipo de trasplante, siendo la piel generalmente el tejido más afectado (69). Esto puede ser debido en parte al diagnóstico precoz que supone la monitorización del componente cutáneo de los AVC. Por el contrario, la monitorización de otros trasplantes debe basarse en la detección de marcadores tardíos de disfunción del órgano, como la elevación de la creatinina sérica en el trasplante renal o la reducción de la fracción de eyección en los pacientes receptores de un trasplante cardíaco. El periodo prolongado de isquemia relativa y posterior lesión por isquemia-reperusión, como hemos visto, contribuye a crear un estado inflamatorio local, lo cual a su vez facilita la presentación de antígenos del donante al sistema inmune del receptor, promoviendo el rechazo. Sin embargo, esto no debería ser la causa principal de

la alta incidencia de RA en los AVCs, ya que los TOS también sufren ese periodo de isquemia y no sufren rechazo en la misma proporción. La alta incidencia de éste, junto a la especial susceptibilidad del componente cutáneo a sufrirlo, sugiere un factor intrínseco a la piel que contribuye a su inmunogenicidad (348). Estudios recientes han demostrado la presencia de grandes cantidades de células T memoria presentes en la piel y células de Langerhans que contribuyen a la homeostasis inmune y a la activación de las células T reguladoras de la piel (349). De hecho, las células de Langerhans se consideran CPAs y tienen la función de activar y diferenciar directamente las células T mediante la secreción de citoquinas y quimiocinas. Así la piel se comporta como un órgano con función inmune de reconocimiento y efector al mismo tiempo, pudiendo actuar de forma paralela e independiente al sistema inmune general (349). Un adulto normal presenta 1×10^6 células T/cm² de piel, que equivale casi al doble de las células T presentes en la sangre. De ellas casi el 80% no expresan CD62L y CCR4, lo cual implica un fenotipo de célula T efectora (125). De forma general las células T efectoras permanecen en la circulación hasta que son reclutadas por los tejidos inflamados, pero en la piel se encuentran en condiciones basales (350). Todos estos hallazgos pueden explicar la alta incidencia de RA en el componente cutáneo de los AVC. En nuestro estudio, la isla de piel del trasplante mostró un grado de rechazo menor en los grupos precondicionados respecto al grupo control, y se logró prolongar el tiempo hasta RA, pero no la tolerancia indefinida, lo cual se podría explicar por la presencia de este sistema inmune cutáneo que no estaba precondicionado en ningún grupo, ya que el LPS o el GAL solo se administró al animal receptor.

Coincidiendo con los resultados del estudio del grupo de Ishiyama et al, en los grupos precondicionados observamos una reducción del porcentaje de linfocitos totales (CD3⁺) tras la cirugía (18,5%±8,34% en el grupo II; 17,66%±12,36% en el grupo III y 23,10%±10,58% en el grupo IV), mientras que el grupo control mostró un aumento inicial

del mismo (31,41%±13,78%). Durante el estado de TE, los monocitos presentan una elevada actividad fagocítica, pero la capacidad de presentación de antígenos se encuentra deteriorada (258). El aumento de la fagocitosis se asocia a un aumento en la expresión en su superficie de la molécula CD64 (258). El deterioro en la presentación de antígenos es debido a una menor expresión de las moléculas del CMH clase II (como HLA-DR), así como de la molécula de coestimulación CD86 (258,262). El mecanismo íntimo de la disminución en la expresión del CMH clase II en la TE, se muestra en el estudio de Wolk et al (351). En él, se vio una reducción de la síntesis del CMH a nivel intracelular, junto a una menor expresión de la cadena invariable y la inhibición de la síntesis de las proteasas catepsinas encargadas de la escisión de la cadena invariable. Así mismo, se encontró reducida la expresión de HLA-DM necesario para que el CMH clase II se una al péptido antigénico, y una disminución de la exportación de los complejos CMH clase II a la superficie celular. La regulación a la baja de HLA-DR, de la cadena invariable y el HLA-DM, se relaciona con la menor actividad transcripcional atribuida a la disminución de la expresión de CIITA. La interferencia simultánea a diferentes niveles de regulación puede explicar el efecto potente y duradero de la disminución de la presentación de antígenos en el estado de TE (351). Algunos estudios han propuesto la participación de IL-10 y TGF- β en la regulación a la baja de estas moléculas mencionadas (352). El deterioro en su actividad como CPAs, supone una disminución de la presentación de antígenos a los linfocitos y con ello, una mayor dificultad para desencadenar una respuesta inmune adaptativa, lo que resulta en una reducción de la proliferación de los linfocitos T (262). Por otra parte, la ausencia de señal coestimuladora por falta de la molécula B7 (CD86) da lugar a un estado de anergia y apoptosis de las células T (353). Esta disminución linfocitaria mediante apoptosis celular parece deberse a la señalización intracelular de IRAK-M y PDL-1 (354). En esta misma línea, en pacientes con sepsis o politraumatismos

ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos se ha observado una disminución drástica de los recuentos de linfocitos circulantes (355). Basándose en estos hechos, se han llevado a cabo estudios en animales y humanos, que han demostrado la existencia de una profunda apoptosis de células T CD4⁺, células B y células dendríticas, mientras que no se ha observado este hallazgo en las células T CD8⁺, monocitos/macrófagos y células NK (356,357). Así mismo, modelos experimentales en ratones que carecían de linfocitos T y B, presentaron una mayor susceptibilidad al shock endotóxico (265). Todo ello subraya la importancia de la apoptosis de las células inmunes en la mediación de la inmunosupresión inducida por un estado de sepsis (254). En resumen, la disminución de la población linfocitaria total observada en nuestro estudio puede ser debido tanto a la limitación de la expansión clonal de los linfocitos al no ser estimulados por las CPAs y/o a una mayor apoptosis celular. Esto es consistente con el retraso en la aparición de los episodios de RA de los grupos precondicionados ($p < 0,001$). El menor porcentaje linfocitario global también podría explicar la menor intensidad del rechazo observado en el estudio histológico en los grupos precondicionados en comparación con el grupo control (grupo I, $p = 0,038$; grupo III, $p = 0,0169$; y grupo IV, $p = 0,0383$).

Se observó un porcentaje significativamente más elevado de quimerismo en los grupos precondicionados respecto al grupo control entre los días 21 y 30 ($p = 0,04$, grupo II; $p = 0,002$, grupo III; y $p = 0,002$, grupo IV), principalmente a expensas de los linfocitos T CD4⁺ (grupo II $p < 0,001$, III $p < 0,001$ y IV $p < 0,003$). Se ha demostrado que las células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ juegan un papel importante en la tolerancia al trasplante, pudiendo prevenir el rechazo del injerto (358). En 1990, Hall et al demostraron en su estudio de alotrasplante cardíaco en ratas tratadas con CsA, un mayor tiempo de supervivencia sin sufrir un episodio de RA (>100 días), y lo atribuyeron a un aumento de la población de células T CD4⁺ supresoras que expresaban OX39 (CD25) (359).

Numerosos estudios de protocolos de tolerancia no mieloablativos, como el empleo de anticuerpos monoclonales contra CD4⁺, CD8⁺ o CD 154⁺, o la inoculación intratímica de un antígeno del donante, condujeron a la generación de células CD4⁺CD25⁺ reguladoras (360–363). Sin embargo, la actividad reguladora puede no limitarse estrictamente a las células T CD4⁺ CD25⁺ ya que se ha visto en el estudio de Graca et al que células T CD4⁺ CD25⁻ pueden ejercer también una función supresora, aunque de forma menos importante que las anteriores (361). Además, se ha visto que las células T CD4⁺ reguladoras no solo modulan la tolerancia al trasplante, si no también pueden retrasar el desarrollo de una posible EICH (364,365). Por tanto, las células T CD4⁺ reguladoras juegan un papel importante en la inmunotolerancia del trasplante, aunque el control de su actividad continúa siendo estudiada (366). Se ha visto que la función de estas células se va a ver limitada por concentraciones elevadas de citoquinas proinflamatorias o por la activación de las células T a través de CD28 (367,368). Así mismo, las células T efectoras activadas son menos susceptibles a la supresión de las células T reguladoras respecto a las células T en reposo (369). En un estudio realizado por el equipo de Caramalho et al, demostraron que las células T reguladoras expresan TLR y pueden ser activadas por LPS (370). Se observó que la activación por el LPS de estas células mejoraba la actividad supresora. Sin embargo, la activación de las CPA por LPS deprimía esta actividad, atribuido al aumento de la concentración de citoquinas proinflamatorias como IL-6 (371). Por tanto, la inhibición del rechazo del trasplante va a depender en parte del equilibrio entre la acción supresora y el estado inflamatorio del huésped. No obstante, no todas las CPA parecen reaccionar de la misma manera. Un estudio sobre inmunotolerancia en trasplante hepático, mostró como la preestimulación de las células estrelladas del hígado con LPS aumentaba la población de las células T CD4⁺ reguladoras mediante contacto célula-célula, al mismo tiempo que inducían apoptosis de las células T CD4⁺ convencionales a

través de la molécula Fas/Fas ligando (372). Otro estudio reciente de pretratamiento de células dendríticas con LPS mostró un aumento de la expansión de células T reguladoras CD4⁺ CD127⁺3G11⁻, sugiriendo la posibilidad de inmunoterapia mediante la expansión de este subgrupo celular (373). En nuestro estudio, durante la inflamación sistémica inicial que ocurre en los grupos precondicionados, la función de estas células podría estar presente pero bastante controlada por la inhibición por parte de las CPA y las concentraciones elevadas de citoquinas proinflamatorias; pero cuando las CPA entran en un estado refractario de TE, estas células aumentarían permitiendo un mayor tiempo de supervivencia hasta el episodio de RA. De esta forma, el incremento de las células T reguladoras podría indicar una mayor inmunorregulación a nivel del sistema inmune adaptativo, y explicar el tiempo más prologado sin desarrollar un episodio de RA en los grupos pretratados con LPS o GAL.

El estado de quimerismo mixto observado en nuestro estudio no fue estable, si no que el porcentaje de células del animal donante disminuía a medida que nos acercábamos al día del episodio de RA. Esto podría justificar el hecho de que no se alcanzara la tolerancia definitiva al trasplante. No obstante, estudios con quimerismo transitorio, sugieren que, aunque inicialmente se requiera la presencia de quimerismo para inducir tolerancia, podría no ser necesario su mantenimiento a largo plazo (201). En el estudio de Boruget et al., se realizaron 12 AVC en cerdos. Los animales del grupo que habían recibido un ciclo corto de CsA, presentaron tolerancia (>150 días). En ellos se observó que, aunque había quimerismo en sangre periférica en el postoperatorio temprano (2,2% al sexto día postoperatorio), éste pasaba a ser indetectable a partir del día 19 postoperatorio (374). De esta forma, el fenómeno de microquimerismo se ha cuestionado ampliamente y actualmente se podría interpretar más como una consecuencia que como la causa de la tolerancia a una alotrasplante (375).

La administración de LPS produce tanto *in vitro* como *in vivo*, una respuesta inflamatoria inicial caracterizada por la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-23 por parte de las células sistema inmune innato, especialmente de los monocitos y macrófagos (297). Éstas van a producir una estimulación y expansión linfocitaria con la consiguiente liberación de citoquinas como la IL-1, IL-2 e IFN- γ . El IFN- γ es una citoquina producida fundamentalmente por linfocitos y células NK, y su expresión aumenta en los procesos de infección y respuesta inflamatoria sistémica que se produce durante la sepsis (376). En nuestro estudio en el grupo precondicionado con LPS, se observó una respuesta inflamatoria inicial reflejada en el aumento de TNF- α e IFN- γ , que se mantiene hasta el día del trasplante. En los grupos precondicionados con GAL también se observó un aumento de estas citoquinas, pero con menor intensidad que en el grupo II, sobre todo el IFN- γ ($p < 0,001$). Coincidiendo con estos resultados, estudios *in vitro* demostraron una respuesta inflamatoria menor, medida mediante los niveles de TNF- α en las células expuestas a GAL respecto aquellas expuestas a LPS (304,305). Si bien es verdad que el menor aumento de TNF- α en los grupos precondicionados con GAL no es tan evidente como en los otros estudios citados, hay que tener en cuenta que éstos fueron *in vitro*. Nuestro estudio, al ser *in vivo*, puede estar sometido a cambios inducidos por otras citoquinas u otros factores que no se han analizado. De igual manera, el mayor aumento de TNF- α e IFN- γ en el grupo precondicionado con LPS, revela una mayor respuesta inflamatoria en este grupo y justifica la mayor presencia de efectos adversos en forma de pérdida de peso y episodios diarreicos acaecidos en los animales de este grupo en comparación con el grupo control y los grupos precondicionados con GAL ($p < 0,001$ y $p = 0,02$, respectivamente).

En estudios tanto *in vitro* como *in vivo* de TE, se ha visto que, tras un segundo estímulo con LPS se observa un cambio en el fenotipo inflamatorio de estas células a otro

antiinflamatorio, caracterizado por la liberación de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 o TGF- β (265,295,296,377). En nuestro estudio, a partir del día del trasplante se observó una disminución drástica de las citoquinas proinflamatorias en los grupos precondicionados. Esto se atribuyó a un cambio en el fenotipo de los monocitos/macrófagos a un estado antiinflamatorio a consecuencia de la TE. El mecanismo molecular es la inhibición de la ruta MyD88 por IRAK-M y la activación del TLR por una ruta independiente de éste que es la vía TRIF/TRAM. Esto va a producir una sobreexpresión de citoquinas antiinflamatorias y va a provocar la incapacidad de los monocitos para producir citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- α (278). El papel de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 es controvertido. Por un lado, para algunos autores la IL-10 juega un papel crucial en la TE, induciendo la expresión de miR-187, que es un regulador negativo de TNF- α , IL-6 e IL-12 cuando se activa el TLR-4 en monocitos (378). Sin embargo, para otros autores no es tan importante ya que se ha visto que ratones *knockout* para IL-10 reproducen igualmente un fenotipo de TE cuando son expuestos a LPS (379). Esto sugiere que otros factores antiinflamatorios como TGF- β , IL-1RA, SLP-1 y los glucocorticoides puedan producir TE sin necesidad de la IL-10 (377).

La cirugía del trasplante en nuestro caso, ha actuado como segundo insulto al sistema inmune, mediante un mecanismo de tolerancia cruzada entre el primer estímulo con LPS y el propio trasplante. Las células del sistema inmune, tras el estímulo con LPS y GAL, no fueron capaces de responder al estímulo que supone la intervención quirúrgica. Se ha visto que cirugías mayores, como intervenciones neuroquirúrgicas, cirugía cardíaca o pacientes politraumatizados, pueden desarrollar un estado inmune refractario, similar a la TE, donde se produce una disminución de las citoquinas proinflamatorias tras el evento quirúrgico (323). Este hecho podría justificar la caída de citoquinas en nuestro estudio en

los grupos precondicionados, pero también se vería en el grupo control y en nuestro estudio esto no sucede. Por el contrario, el patrón de expresión y producción de TNF- α , mostró un ascenso progresivo desde la cirugía hasta la retirada de la CsA, momento a partir del cual se observó un ascenso más pronunciado hasta el día del RA.

El estado refractario de los macrófagos supone una dificultad para activar la respuesta inmune adaptativa, y se va a reflejar en el patrón de respuesta de las citoquinas. Las células T CD4⁺ helper pueden ser divididas en Th₁ y Th₂, distinguiéndose según el patrón de citoquinas que producen (380). Las células Th₁ producen INF- γ , IL-2 y TNF- α , mientras que las células Th₂ producen IL-4, IL-5 e IL-10. En nuestro estudio, tras la cirugía, los grupos precondicionados mostraron una reducción de las citoquinas Th₁ (INF- γ y TNF- α), lo que podríamos inferir de forma indirecta en un desbalance a favor de la respuesta Th₂. La respuesta mediada por Th₁ estimula directamente la inmunidad mediada por células, mientras que una respuesta Th₂ está asociada con la inmunidad humoral (381). Estudios previos en pacientes con sepsis han mostrado que durante una infección sistémica se produce un cambio hacia una respuesta de citoquinas tipo Th₂, pudiendo dar lugar a un defecto en la inmunidad celular (298). Este desequilibrio también se observó en el estudio de Ishiyama et al y explicaría por un lado la disminución de linfocitos T inicial y además contribuye al retraso en los episodios de RA en los grupos precondicionados (299). Además, el INF- γ es el activador principal de las funciones de los monocitos y, por tanto, la disminución del mismo por la capacidad reducida de las células T para producirlo, contribuye a perpetuar el estado refractario de los monocitos. Esto es, la disminución de la capacidad de producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α y disminución de la capacidad de presentación de antígenos por disminución de la expresión del CMH clase II (382).

El mecanismo último implicado en la supresión de las células T y la polarización hacia la respuesta Th₂ que aparece durante la TE no está del todo dilucidado. En un modelo experimental de sepsis en ratones se observó una expansión de la población celular mielóide inmadura GR-1⁺ C11b⁺ en médula ósea, bazo y ganglios linfáticos mediada por la vía de señalización intracelular MyD88. La disminución de las células T y la polarización hacia el linaje Th₂ se atribuyó a la acción de estas células (383). Por otra parte, en un estudio llevado a cabo por el grupo de Patel et al, se vio que el CIITA desempeña un papel clave en la represión de la expresión de citoquinas de tipo Th₂, haciendo que las células T CD4⁺ se diferencien hacia el linaje Th₁ (384). Por tanto, la reducción de la expresión de CIITA que se produce durante la TE como hemos mencionado anteriormente y/o la expansión de células mieloides inmaduras con capacidad reguladora en el contexto de la TE podría ser una de las causas de la hipotética polarización Th₂ observada en este estudio.

Muchos estudios han postulado que la TE representa un estado de inmunosupresión, haciendo al huésped más susceptible a infecciones secundarias. Esta presunción también se ha observado en pacientes con sepsis, traumatismos graves y grandes quemados, todos los cuales están predispuestos a infecciones secundarias (323,377). Se ha demostrado que las respuestas de citoquinas proinflamatorias son necesarias para la eliminación de microorganismos durante una infección. De hecho, los ratones deficientes en citoquinas proinflamatorias como INF- γ y TNF- α son resistentes a las lesiones inflamatorias, pero altamente susceptibles a infecciones bacterianas subletales (385,386). Además, la TE conduce a un aumento de la producción de IL-10 en respuesta al segundo estímulo de LPS o análogo. Los efectos de la IL-10 incluyen la inhibición de la producción de citoquinas Th₁ y la atenuación de la expresión del CMH clase II así como de las moléculas coestimuladoras presentes en los macrófagos (378). Los niveles elevados de IL-10

también son característicos de los pacientes que han sufrido un traumatismo grave, lo cual puede contribuir al estado de inmunoparálisis posterior (323). Se ha visto que la administración exógena de IL-10 da lugar a una supresión de la producción de IFN- γ e IL-12 de la misma forma que sucede cuando existe TE, lo cual lleva a la supresión de las respuestas inmunes y aumenta la susceptibilidad a la infección (387). Sin embargo, Varma et al, demostraron que ratones con TE tras la administración de LPS con supresión de IFN- γ e IL-12 y aumento de IL-10, pudieron eliminar una infección por *Pseudomonas aeruginosa* de manera más efectiva que los ratones no tolerantes (388). Esto se atribuyó a que el agotamiento de IL-10 en los animales con TE, hizo que aumentara el aclaramiento bacteriano, lo cual sugiere que la IL-10 presenta un impacto negativo en el aclaramiento de bacterias pero no lo suficiente para evitarlo por completo (388). Aunque existen estudios que informan de la mayor susceptibilidad a la infección después de la exposición previa a LPS, hay otros que demuestran que el tratamiento sistémico con dosis bajas o moderadas de LPS aumentan la respuesta inmune innata en modelos de infección (389). Deng et al demostraron que la administración de LPS en ratones conducía a una eliminación mejorada de bacterias mediada por macrófagos en un modelo de sepsis polimicrobiana (390). En otros estudios se observó que ratones pretratados con LPS mostraban una reducción drástica de la carga bacteriana tras la inoculación de *Pseudomonas aeruginosa* o *Salmonella typhimurium*, a pesar de concentraciones reducidas de INF- γ , TNF- α , IL-6 e IL-12 (391,392). Esto sugiere que las citoquinas proinflamatorias pueden no ser completamente necesarias para desarrollar una respuesta inmune innata competente o bien que la TE mejora de alguna forma el aclaramiento bacteriano. La mejoría de la respuesta inmune innata ante la TE no sólo se limita a las bacterias gram negativas, sino que se extiende a una gran variedad de modelos de infección bacteriana (como gram positivos o sepsis polimicrobiana) y fúngica (393–395). Muchos

estudios han demostrado que los agonistas de TLR4 poseen capacidad de generar TE y mejorar a su vez las respuestas a patógenos microbianos. Así, el MPLA ha demostrado proteger contra el desarrollo de neumonía en un estudio con ratones expuestos a shock hemorrágico no letal (396). También se ha observado esta protección en modelos de infección bacteriana sistémica (397). De la misma forma, el preconditionamiento con AGP demostró esta mejoría al disminuir la carga bacteriana y mejorar la supervivencia en un modelo experimental de la neumonía tularémica (344). Por extensión, podemos decir que empleo de GAL podría proporcionar también esta protección, pero aún no hay evidencia científica al respecto. Además, este enfoque podría tener una relevancia clínica significativa, de forma que la administración exógena de agonistas de TLR-4 a pacientes que van a someterse a intervenciones de alto riesgo quirúrgico, pacientes politraumatizados o grandes quemados, reducirían en base a estos estudios la incidencia de infecciones nosocomiales severas (326).

El mecanismo último de la mejora de la respuesta inmune en la TE no ha sido del todo dilucidado. El mayor reclutamiento de células mieloides en respuesta a patógenos microbianos es una opción plausible, que además puede estar mediada por un aumento de la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos y/o células endoteliales lo que conlleva una mejor quimiotaxis (395).

De acuerdo con Hettiarachy et al, la estrategia para desarrollar un estado de tolerancia debe de cumplir una serie de criterios para que pueda tener relevancia clínica (210). El primer criterio es que el régimen preconditionamiento debe evitar la morbilidad injustificable. Esto excluye todas las formas de radiación corporal, incluso la no mieloablativa. Siguiendo esta premisa, el uso de LPS como preconditionamiento, podría ser bastante cuestionable. La posible aplicación en la práctica clínica es el otro criterio a cumplir en una estrategia de tolerancia en el contexto de un alotransplante. Esto significa

que debería poder realizarse dentro de las 24 horas previas a la intervención quirúrgica. Al comparar el grupo precondicionado con GAL 24 horas antes del trasplante con el grupo precondicionado 72 horas antes, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo hasta la aparición del episodio de RA, ni en morbilidad asociada, ni en fluctuaciones de la población linfocitaria ni en los niveles de quimerismo en sangre periférica, presentando un patrón de citoquinas paralelo. Por lo tanto, el precondionamiento con GAL podría administrarse en posteriores estudios tan solo 24 horas antes y así valorar la opción de introducción en la práctica clínica.

Como hemos visto, la respuesta inmune a los antígenos del alotrasplante depende de múltiples factores como la disparidad del CMH entre donante y receptor, la antigenicidad de los distintos componentes trasplantados, el tratamiento inmunomodulador empleado y la diversidad de la respuesta inmune genéticamente dependiente. A pesar de ello, parece que la TE abre una vía hacia la tolerancia inmunitaria en el campo del AVC. La administración de LPS no es un procedimiento que podamos considerar plausible dada la morbilidad asociada, por lo que es necesario el desarrollo de análogos de LPS no tóxicos que permitan desarrollar este enfoque en situaciones clínicas. De ahí la relevancia de este estudio, al haber demostrado como el GAL, análogo de LPS, no presenta diferencias significativas en cuanto a la supervivencia del aloinjerto sin la morbilidad potencial de un estado de respuesta inflamatoria sistémica inicial. Así mismo, el precondionamiento con GAL en las primeras 24 horas antes del trasplante no presenta diferencias significativas respecto a los resultados del grupo precondicionado con GAL 72 horas antes, lo que facilitaría un análisis posterior para ver si fuera posible su extrapolación a la práctica clínica.

5.1. Limitaciones del estudio

Este estudio presenta una serie de limitaciones que hay que tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos. Se trata de un modelo experimental en roedor con una ventana de observación corta y un número limitado de animales, determinada estadísticamente para la ejecución del modelo experimental. Esto impidió detectar con suficiente potencia algunos parámetros como la disminución de la población linfocitaria total entre el grupo control y el resto de grupos precondicionados, o los niveles de la citoquina TNF- α entre los grupos precondicionados. Así mismo, la limitación en la cantidad de la muestra extraída de sangre periférica para no interferir en el bienestar del animal, limitó el análisis más exhaustivo de las diferentes subpoblaciones linfocitarias, como las células T reguladoras, así como los niveles de otras citoquinas como IL-10.

Otra limitación fue el modelo de implantación heterotópica del aloinjerto, así como la ausencia de neurorrafias, miorrafias y osteosíntesis, que limitaron el análisis de la función de la extremidad trasplantada.

Por otra parte, el régimen de tratamiento inmunosupresor con CsA, se basó en estudios experimentales previos realizados por nuestro equipo, pero difiere del utilizado habitualmente en la práctica clínica. Se podrían plantear nuevos estudios empleando anticuerpos monoclonales como terapia de inducción asociado o no a una terapia de mantenimiento en dosis decrecientes.

Por último, la falta de estudios previos del GAL y el LPS en el área del AVC ha impedido conocer de entrada los datos como cantidad, frecuencia o regularidad en la administración de los compuestos, para alcanzar unos objetivos precisos. Por ello, el siguiente paso en esta investigación sería una administración semanal regular de GAL,

con el fin de evaluar si la TE se perpetúa en el tiempo, logrando un mayor tiempo de supervivencia e incluso, en el mejor de los casos, la tolerancia clínica.

6. CONCLUSIONES

El mecanismo de tolerancia a endotoxina mediante el preconditionamiento con lipopolisacárido y galactomanano, retrasa la aparición de episodios de rechazo agudo en el aloinjerto. Esto nos permite rechazar la hipótesis nula, confirmar la hipótesis alternativa, y verificar el objetivo principal del trabajo en este modelo. No se encontraron diferencias en el tiempo transcurrido hasta el rechazo entre los grupos preconditionados. Así mismo, no se encontraron diferencias entre el preconditionamiento con galactomanano en las primeras 24 horas pretrasplante y el grupo preconditionado con galactomanano 72 horas antes. Esto requiere primero de un estudio de no inferioridad para confirmarlo, pero facilitaría la extrapolación del modelo a la práctica clínica. No obstante, se necesitan más estudios para desarrollar estrategias con galactomanano que permitan alcanzar un estado de tolerancia y la supervivencia indefinida del aloinjerto, en ausencia de inmunosupresión asociada.

En cuanto a los objetivos secundarios:

- El preconditionamiento con Lipopolisacárido genera una morbilidad en el animal que no es asumible en la práctica clínica de un alotrasplante vascularizado compuesto. El preconditionamiento con Galactomanano presenta un número significativamente menor de efectos adversos en comparación con el Lipopolisacárido.
- El análisis de las muestras de la histología cutánea y muscular ha demostrado una menor intensidad del grado de rechazo en los grupos preconditionados.
- El análisis de la población linfocitaria mediante citometría de flujo refleja una alteración temporal en la respuesta inmune adaptativa secundario al estado de tolerancia a endotoxina.

- El quimerismo mixto ha mostrado ser de mayor intensidad y duración en los grupos precondicionados.
- Los niveles de expresión de citoquinas han permitido comprobar el estado de tolerancia a endotoxina en el alotrasplante vascularizado compuesto, y el comportamiento de la respuesta inflamatoria a nivel molecular.
- El desarrollo del protocolo experimental de alotrasplante de pata posterior en ratas ha permitido el entrenamiento microquirúrgico durante más de 300 horas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Peacock EE. Homologous composite tissue grafts of the digital flexor mechanism in human beings. *Plast Reconstr Surg.* 1960 Apr;7:418-21.
2. Landin L, Meningaud, JP, Barret JP, Jablecki J M, E SS et al. Proceedings of the 2th Composite tissue allotransplantations meeting. 2013.
3. Kaufman CL, Bhutiani N, Ramirez A, Tien HY, Palazzo MD, Galvis E, et al. Current status of vascularized composite allotransplantation. *American Surgeon.* 2019 Jun 1;85(6):631-637.
4. Black KS, Hewitt CW, Fraser LA, Osborne JG, Achauer BM, Martin DC, et al. Cosmas and Damian in the Laboratory. *New England Journal of Medicine.* 1982 Feb 11;306(6):368-9.
5. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat.* 1943 Jul;77(Pt 4):299-310.4.
6. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc.* 1956 Jan 28;160(4):277-82.
7. Merrill JP, Murray JE, Takacs FJ, Hager EB, Wilson RE, Dammin GJ. Successful transplantation of kidney from a human cadaver. *JAMA.* 1963 Aug 3;185:347-53.
8. J.J. GF, R.G. F-C, R.L. S. The Untold Story of the First Hand Transplant: Dedicated to the Memory of one of the Great Minds of the Ecuadorian Medical Community and the World. *J Reconstr Microsurg.* 2019 Mar;35(3):163-167.
9. Gilbert R. Hand transplanted from cadaver is reamputated. *Med Trib Med News.* 1964;5:23.

10. Diaz-Siso JR, Bueno EM, Sisk GC, Marty FM, Pomahac B, Tullius SG. Vascularized composite tissue allotransplantation - state of the art. *Clin Transplant*. 2013;27(3):330–7.
11. Ustüner 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 Dec 27;66(12):1581–7.
12. 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 May 31;344(22):1676-9.
13. Hofmann GO, Kirschner MH, Wagner FD, Brauns L, Gonschorek O, Bühren V. Allogeneic vascularized transplantation of human femoral diaphyses and total knee joints - First clinical experiences. In: *Transplantation Proceedings*. 1998 Sep;30(6):2754-61.
14. Diefenbeck M, Wagner F, Kirschner MH, Nerlich A, Mückley T, Hofmann GO. Management of acute rejection 2 years after allogeneic vascularized knee joint transplantation [4]. *Transplant International*. 2006 Jul;19(7):604-6.
15. Dubernard JM, Owen E, Herzberg G, Lanzetta M, Martin X, Kapila H, et al. Human hand allograft: Report on first 6 months. *Lancet*. 1999 Apr 17;353(9161):1315-20.
16. Tobin GR, Breidenbach WC, Ildstad ST, Marvin MM, Buell JF, Ravindra K V. The History of Human Composite Tissue Allotransplantation. *Transplant Proc*. 2009 Mar;41(2):466-71.
17. Jones JW, Gruber S a, Barker JH, Breidenbach WC. Successful hand

- transplantation. One-year follow-up. Louisville Hand Transplant Team. *N Engl J Med*. 2000 Aug 17;343(7):468-73.
18. Petruzzo P, Badet L, Gazarian A, Lanzetta M, Parmentier H, Kanitakis J, et al. Bilateral hand transplantation: Six years after the first case. *Am J Transplant*. 2006 Jul;6(7):1718-24.
 19. Petruzzo P, Sardu C, Lanzetta M, Dubernard JM. Report (2017) of the International Registry on Hand and Composite Tissue Allotransplantation (IRHCTT). *Curr Transplant Reports*. 2017.
 20. Landin L, Bonastre J, Casado-Sanchez C, Diez J, Ninkovic M, Lanzetta M, et al. Outcomes with respect to disabilities of the upper limb after hand allograft transplantation: A systematic review. *Transplant International*. 2012 Apr;25(4):424-32.
 21. Shores JT, Brandacher G, Lee WPA. Hand and upper extremity transplantation: An update of outcomes in the worldwide experience. *Plast Reconstr Surg*. 2015 Feb;135(2):351e-360e.
 22. Fageeh W, Raffa H, Jabbad H, Marzouki A. Transplantation of the human uterus. *Int J Gynecol Obstet*. 2002 Mar;76(3):245-51.
 23. Ozkan O, Akar ME, Ozkan O, Erdogan O, Hadimioglu N, Yilmaz M, et al. Preliminary results of the first human uterus transplantation from a multiorgan donor. *Fertil Steril*. 2013 Feb;99(2):470-6.
 24. Elçin S. Bebé de madre con útero implantado sale de la unidad de cuidados intensivos en hospital de Turquía. 2020.
 25. Brännström M, Dahm Kähler P, Greite R, Mölne J, Díaz-García C, Tullius SG. Uterus transplantation: A rapidly expanding field. *Transplantation*. 2018

- Apr;102(4):569-577.
26. Johannesson L, Kvarnström N, Mölne J, Dahm-Kähler P, Enskog A, Diaz-Garcia C, et al. Uterus transplantation trial: 1-Year outcome. *Fertil Steril*. 2015 Jan;103(1):199-204.
 27. Brännström M, Dahm-Kähler P. Uterus transplantation and fertility preservation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2019 Feb;55:109–16.
 28. Levi DM, Tzakis AG, Kato T, Madariaga J, Mittal NK, Nery J, et al. Transplantation of the abdominal wall. *Lancet*. 2003 Jun 28;361(9376):2173-6.
 29. Birchall M. Tongue transplantation. *Lancet (London, England)*. 2004 May 22;363(9422):1663.
 30. Dubernard JM, 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 Dec 13;357(24):2451-60.
 31. Barret JP, Gavaldà J, Bueno J, Nuvials X, Pont T, Masnou N, et al. Full face transplant: The first case report. *Ann Surg*. 2011 Aug;254(2):252-6.
 32. Pomahac B, Pribaz J, Eriksson E, Bueno EM, Diaz-Siso JR, Rybicki FJ, et al. Three patients with full facial transplantation. *N Engl J Med*. 2012 Feb 23;366(8):715-22.
 33. Rifkin WJ, David JA, Plana NM, Kantar RS, Diaz-Siso JR, Gelb BE, et al. Achievements and Challenges in Facial Transplantation. *Annals of Surgery*. 2018 Aug;268(2):260-270.
 34. Lantieri L, Grimbert P, Ortonne N, Suberbielle C, Bories D, Gil-Vernet S, et al. Face transplant: long-term follow-up and results of a prospective open study.

- Lancet. 2016 Oct 1;388(10052):1398-1407.
35. Hu W, Lu J, Zhang L, Wu W, Nie H, Zhu Y, et al. A Preliminary Report of Penile Transplantation. *European Urology*. 2006 Oct;50(4):851-3.
 36. Bateman C. World's first successful penis transplant at tygerberg hospital. *South African Medical Journal*. 2015 Apr;105(4):251-2.
 37. Zuker RM, Redett R, Alman B, Coles JG, Timoney N, Ein SH. First successful lower-extremity transplantation: Technique and functional result. *J Reconstr Microsurg*. 2006 May;22(4):239-44.
 38. Cavadas PC, Thione A, Carballeira A, Blanes M. Bilateral transfemoral lower extremity transplantation: Result at 1 year. *Am J Transplant*. 2013 May;13(5):1343-9.
 39. Petruzzo P. The international registry on hand and composite tissue transplantation. 2019.
 40. Swanson EW, Cheng H-T, Lough DM, Lee WPA, Shores JT, Brandacher G. Lower Extremity Allotransplantation: Are We Ready for Prime Time? *Vasc Compos Allotransplantation*. 2015 Apr 3;2(2):37-46.
 41. Krishnan G, Du C, Fishman JM, Foreman A, Lott DG, Farwell G, et al. The current status of human laryngeal transplantation in 2017: A state of the field review. *Laryngoscope*. 2017 Aug;127(8):1861-1868.
 42. Jonczyk MM, Tratnig-Frankl P, Cetrulo CL. Genitourinary vascularized composite allotransplantation: a review of penile transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2019 Dec;24(6):721-725.
 43. Molitor M, Oliverius M, Sukop A. Abdominal wall allotransplantation. *Biomed*

- Pap. 2018 Sep;162(3):184-189.
44. Grajek M, Maciejewski A, Giebel S, Krakowczyk Ł, Ulczok R, Szymczyk C, et al. First Complex Allotransplantation of Neck Organs: Larynx, Trachea, Pharynx, Esophagus, Thyroid, Parathyroid Glands, and Anterior Cervical Wall. *Ann Surg.* 2017 Aug;266(2):e19-e24.
 45. Leonard DA, Cetrulo CL, McGrouther DA, Sachs DH. Induction of tolerance of vascularized composite allografts. *Transplantation.* 2013 Feb 15;95(3):403-9.
 46. Cipriani R, Contedini F, Santoli M, Gelati C, Sgarzani R, Cucchetti A, et al. Abdominal wall transplantation with microsurgical technique. *Am J Transplant.* 2007 May;7(5):1304-7.
 47. Schimmelpfennig R, Kritzmire S. multi visceral and abdominal wall transplantation after gastrointestinal perforation in juvenile dermatomyositis. *J Chem Inf Model.* 1989.
 48. Haveman JW, Tempelman TM, Hofker HS, Khoe PC, Dijkstra G, Werker PM. First combined intestinal and abdominal wall transplantation in the Netherlands. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2016; 160:A9788.
 49. Agarwal S, Dorafshar AH, Harland RC, Millis JM, Gottlieb LJ. Liver and vascularized posterior rectus sheath fascia composite tissue allotransplantation. *Am J Transplant.* 2010 Dec;10(12):2712-6.
 50. Ravindra K V., Martin AE, Vikraman DS, Brennan T V., Collins BH, Rege AS, et al. Use of Vascularized Posterior Rectus Sheath Allograft in Pediatric Multivisceral Transplantation-Report of Two Cases. *Am J Transplant.* 2012 Aug;12(8):2242-6.
 51. Gerlach UA, Vrakas G, Sawitzki B, Macedo R, Reddy S, Friend PJ, et al.

- Abdominal Wall Transplantation: Skin as a Sentinel Marker for Rejection. *Am J Transplant*. 2016 Jun;16(6):1892-900.
52. Brännström M, Johannesson L, Bokström H, Kvarnström N, Mölne J, Dahm-Kähler P, et al. Livebirth after uterus transplantation. *Lancet*. 2015 Feb 14;385(9968):607-616.
 53. Carbonnel M, Revaux A, Menzhulina E, Karpel L, Snanoudj R, Le Guen M, et al. Uterus Transplantation with Live Donors: Screening Candidates in One French Center. *J Clin Med*. 2020 Jun 25;9(6):2001.
 54. Carmona F, Rius M, Díaz-Feijoo B, Musquera M, Tort J, Alcaraz A. Uterine transplantation. First viable case in Southern Europe. *Med Clin (Barc)*. 2020 Mar 26;156(6):297-300.
 55. Cavadas PC, Landin L, Thione A, Rodríguez-Pérez JC, Garcia-Bello MA, Ibañez J, et al. The Spanish experience with hand, forearm, and arm transplantation. *Hand clinics*. 2011 Nov;27(4):443-53, viii.
 56. Cavadas PC, Ibañez J, Thione A. Secondary surgery for functional improvement after hand transplantation. *Ann Plast Surg*. 2011 Oct;67(4):421-2.
 57. Cavadas PC, Ibez J, Thione A. Surgical aspects of a lower face, mandible, and tongue allotransplantation. *J Reconstr Microsurg*. 2012 Jan;28(1):43-7.
 58. Gomez-Cia T, Sicilia-Castro D, Infante-Cossio P, Barrera-Pulido F, Gacto-Sanchez P, Lagares-Borrego A, et al. Second human facial allotransplantation to restore a severe defect following radical resection of bilateral massive plexiform neurofibromas. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2011 Feb;127(2):995-996.
 59. Sicilia-Castro D, Gomez-Cia T, Infante-Cossio P, Gacto-Sanchez P, Barrera-Pulido F, Lagares-Borrego A, et al. Reconstruction of a severe facial defect by

- allotransplantation in neurofibromatosis type 1: A case report. *Transplant Proc.* 2011 Sep;43(7):2831-7.
60. Lengelé BG. Current Concepts and Future Challenges in Facial Transplantation. *Clinics in Plastic Surgery.* 2009 Jul;36(3):507-21.
61. Barret JP, Serracanta J, Collado JM, Garrido A, Salamero P, Pont T, et al. Full face transplantation organization, development, and results-The Barcelona experience: A case report. In: *Transplantation Proceedings.* 2011 Nov;43(9):3533-4.
62. Jones EY. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol.* 1997 Feb;9(1):75-9.
63. Abbas A, Lichtman A PS. Complejo principal de histocompatibilidad y presentación antigénica a los linfocitos T. In: *Inmunología celular y molecular.* 8ª. 2015. p. 115–22.
64. Bodmer JG, Marsh SG, Parham P, Erlich HA, Albert E, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1989. *Immunobiology.* 1990 Feb;180(2–3):278–92.
65. Womer KL, Sayegh MH, Auchincloss H. J. Involvement of the direct and indirect pathways of allorecognition in tolerance induction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2001 May 29;356(1409):639-47.
66. Kasahara M, Flajnik MF, Ishibashi T, Natori T. Evolution of the major histocompatibility complex: a current overview. *Transpl Immunol.* 1995 Mar;3(1):1–20.
67. Hors J, Busson M, Bouteiller AM, Raffoux C, Betuel H, Fauchet R, et al. Dissection of the respective importance of HLA-A,B,DR matching in 3,789 prospective kidney transplants. *Transplant Proc.* 1987 Feb;19(1 Pt 1):687–8.

68. Williams RC, Opelz G, McGarvey CJ, Weil EJ, Chakkera HA. The risk of transplant failure with hla mismatch in first adult kidney allografts from deceased donors. *Transplantation*. 2016 May;100(5):1094-102.
69. Bonastre J, Landin L, Diez J, Casado-Sanchez C, Casado-Perez C. Factors influencing acute rejection of human hand allografts: A systematic review. *Annals of Plastic Surgery*. 2012 Jun;68(6):624-9.
70. Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. 1987. *J Immunol*. 2010 Jun 1;184(11):5935–8.
71. Bach F, Hirschhorn K. Lymphocyte interaction: A potential histocompatibility test in vitro. *Science* (80-). 1964; Feb 21;143(3608):813-4.
72. Oriol R. Tissular expression of ABH and Lewis antigens in humans and animals: expected value of different animal models in the study of ABO-incompatible organ transplants. *Transplant Proc*. 1987 Dec;19(6):4416–20.
73. Lai PK, Waterfield JD, Gascoigne NR, Sharrock CE, Mitchison NA. T-cell responses to minor histocompatibility antigens. *Immunology*. 1982 Oct;47(2):371–81.
74. Steinmuller D, Tyler JD. Evidence of skin-specific alloantigens in cell-mediated cytotoxicity reactions. *Transplant Proc*. 1980 Sep;12(3 Suppl 1):107–13.
75. Rumyantsev SN. Constitutional and non-specific immunity to infection. *Rev Sci Tech l'OIE*. 1998 Apr 1;17(1):26–42.
76. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007 Feb;19(1):24–32.
77. Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, Lakkis FG. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest*. 2003;

- May;111(10):1571-8.
78. Lin T, Zhou W, Sacks SH. The role of complement and Toll-like receptors in organ transplantation. *Transplant International*. 2007 Jun;20(6):481-9.
 79. Oyama JI, Blais C, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, et al. Reduced Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Toll-Like Receptor 4-Deficient Mice. *Circulation*. 2004; Feb 17;109(6):784-9.
 80. Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, Inoue Y. Immunologic “ignorance” of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med*. 2000 Jun;6(6):686-8.
 81. Celli S, Albert ML, Bousso P. Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat Med*. 2011 Jun;17(6):744-9.
 82. Lin CM, Gill RG. Direct and indirect allograft recognition: Pathways dictating graft rejection mechanisms. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2016 Feb;21(1):40-4.
 83. Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant*. 2017 Jan;17(1):28-41.
 84. Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: Implications for transplantation tolerance. *Transplant Immunology*. 2002 Aug;10(2-3):101-8.
 85. Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: Current perspectives. *Transplantation*. 2012 Jan 15;93(1):1-10.

86. Gould DS, Auchincloss H. Direct and indirect recognition: The role of MHC antigens in graft rejection. *Immunology Today*. 1999 Feb;20(2):77-82.
87. Biedermann BC, Pober JS. Human endothelial cells induce and regulate cytolytic T cell differentiation. *J Immunol*. 1998 Nov 1;161(9):4679-87.
88. Halloran PF. T cell-mediated rejection of kidney transplants: A personal viewpoint: Minireview. *American Journal of Transplantation*. 2010 May;10(5):1126-34.
89. Thaunat O. Humoral immunity in chronic allograft rejection: Puzzle pieces come together. *Transplant Immunology*. 2012 Mar;26(2-3):101-6.
90. Zarkhin V, Kambham N, Li L, Kwok S, Hsieh SC, Salvatierra O, et al. Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney Int*. 2008 Sep;74(5):664-73.
91. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int*. 1993 Jun;43(6):1333-8.
92. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature Reviews Immunology*. 2009 Jan;9(1):15-27.
93. Pouliquen E, Koenig A, Chen CC, Sicard A, Rabeyrin M, Morelon E, et al. Recent advances in renal transplantation: Antibody-mediated rejection takes center stage. *F1000Prime Reports*. 2015 May 12;7:51.
94. Smith RN, Colvin RB. Chronic alloantibody mediated rejection. *Seminars in Immunology*. 2012 Apr;24(2):115-21.
95. Behr TM, Feucht HE, Richter K, Reiter C, Spes CH, Pongratz D, et al. Detection

- of humoral rejection in human cardiac allografts by assessing the capillary deposition of complement fragment C4d in endomyocardial biopsies. *J Hear Lung Transplant*. 1999 Sep;18(9):904-12.
96. Sijpkens YW, Joosten SA, Wong MC, Dekker FW, Benediktsson H, Bajema IM, et al. Immunologic risk factors and glomerular C4d deposits in chronic transplant glomerulopathy. *Kidney Int*. 2004 Jun;65(6):2409-18.
 97. 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 Mar 15;87(5):776-81.
 98. 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 Jul 27;84(2):265-7.
 99. Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney Int*. 2001 Jan;59(1):334-41.
 100. Feucht HE, Lederer SR, Kluth B. Humoral alloreactivity in recipients of renal allografts as a risk factor for the development of delayed graft function. *Transplantation*. 1998 Mar 15;65(5):757-8.
 101. Figarella-Branger D, Civatte M, Bartoli C, Pellissier J-F. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve*. 2003 Dec;28(6):659–82.
 102. Pirenne J, Pirenne-Noizat F, de Groote D, Vrindts Y, Lopez M, Gathy R, et al. Cytokines and organ transplantation. A review. *Nuclear Medicine and Biology*.

- 1994.
103. Pirenne J, Noizat-Pirenne F, De Groote D, Vrindts Y, Lopez M, Gathy R, et al. Intraoperative cytokines production during orthotopic liver transplantation. In: *Transplant International Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*. 1992 Apr;21(3):545-55.
 104. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *European Journal of Biochemistry*. 1990 Sep 11;192(2):245-61.
 105. Campbell DA, McCurry K, Colleti L HJ. Cytokine biology and transplantation. In: Kunkel SL RD, editor. *Cytokines in health and disease*. New York; 1992. p. 353–70.
 106. Noronha IL, Eberlein-Gonska M, Hartley B, Stephens S, Cameron JS. In situ expression of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-2 receptors in renal allograft biopsies. *Transplantation*. 1992 Dec;54(6):1017-24.
 107. Romagnani S. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the “natural” immune response? *Immunol Today*. 1992 Oct;13(10):379-81.
 108. Tilney NL, Whitley WD, Diamond JR, Kupiec-Weglinski JW, Adams DH. Chronic rejection—An undefined conundrum. *Transplantation*. 1991 Sep;52(3):389-98.
 109. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res*. 1985 Sep 11;13(17):6361–73.
 110. Parameswaran N, Patial S. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages Narayanan. *Adv Glob Chang Res*. 2010; 20(2):87-103.

111. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation*. 2003 Jan;10(1):45-65.
112. Chen G, Goeddel D V. TNF-R1 signaling: A beautiful pathway. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1634-5.
113. Wong ET, Tergaonkar V. Roles of NF- κ B in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci*. 2009 Mar 1;116(6):451-65.
114. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012 Jan 19;119(3):651-65.
115. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):487-501.
116. Gray PW, Goeddel D V. Cloning and expression of murine immune interferon cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Oct;80(19):5842-6.
117. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*. 2004 Dec;202:8-32.
118. Rao A. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today*. 1994 Jun;15(6):274-81.
119. Maher S, Romero-Weaver A, Scarzello A, Gamero A. Interferon: Cellular Executioner or White Knight? *Curr Med Chem*. 2007; 14(12):1279-89.
120. Stark GR. How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 18(5-6):419-23.
121. Abbas AK, Lichtman AH. Cytokines. In: *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. San Francisco, Boston: Elsevier/Saunders, Philadelphia; 2007. p. 243-73.

122. Mühl H, Pfeilschifter J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon- γ . *Int Immunopharmacol*. 2003 Sep;3(9):1247–55.
123. Thuong M, Petruzzo P, Landin L, Mahillo B, Kay S, Testelin S, et al. Vascularized composite allotransplantation – a Council of Europe position paper. *Transplant International*. 2019 Mar;32(3):233-240.
124. Fischer S, Lian CG, Kueckelhaus M, Strom TB, Edelman ER, Clark RA, et al. Acute rejection in vascularized composite allotransplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2014 Dec;19(6):531-44.
125. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K-I, Dowgiert RK, et al. The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. *J Immunol*. 2006 Apr 1;176(7):4431–9.
126. Issa F. Vascularized composite allograft-specific characteristics of immune responses. *Transplant International*. 2016 Jun;29(6):672-81.
127. Baan CC, Weimar W. Intra-graft cytokine gene expression: implications for clinical transplantation. *Transpl Int*. 1998;11(3):169–80.
128. Kamoun M. Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. In: *Clinical Biochemistry*. 2001 Feb;34(1):29-34.
129. Dvorak HF, Mihm MC, Dvorak AM, Barnes BA, Galli SJ. The microvasculature is the critical target of the immune response in vascularized skin allograft rejection. *J Invest Dermatol*. 1980 May;74(5):280–4.
130. Bhan AK, Mihm MC, Dvorak HF. T cell subsets in allograft rejection. In situ characterization of T cell subsets in human skin allografts by the use of monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1982 Oct;129(4):1578–83.

131. 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 Mar;87(3):401–11.
132. Kanitakis J, Badet L, Petruzzo P, Béziat JL, Morelon E, Lefrançois N, et al. Clinicopathologic monitoring of the skin and oral mucosa of the first human face allograft: Report on the first eight months. *Transplantation.* 2006 Dec 27;82(12):1610–5.
133. Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *American Journal of Transplantation.* 2005 Nov;5(11):2611-8.
134. Schneeberger S, Gorantla VS, van Riet RP, Lanzetta M, Vereecken P, van Holder C, et al. Atypical acute rejection after hand transplantation. *Am J Transplant.* 2008 Mar;8(3):688–96.
135. Schuind F, Abramowicz D, Schneeberger S. Hand transplantation: the state-of-the-art. *J Hand Surg Eur Vol.* 2007 Feb;32(1):2–17.
136. 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. In: *American Journal of Transplantation.* 2008 Jul;8(7):1396-400.
137. Siemionow M, Ozturk C. Face transplantation: outcomes, concerns, controversies, and future directions. *J Craniofac Surg.* 2012 Jan;23(1):254–9.
138. Kauke M, Safi A-F, Zeghibe A, Haug V, Kollar B, Nelms L, et al. Mucosa and Rejection in Facial Vascularized Composite Allotransplantation. *Transplantation.* 2020 Dec;104(12):2616-2624.
139. Sellarés J, De Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: The dominant role of

- antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*. 2012 Feb;12(2):388-99.
140. Thaunat O, Louedec L, Dai J, Bellier F, Groyer E, Delignat S, et al. Direct and indirect effects of alloantibodies link neointimal and medial remodeling in graft arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Oct;26(10):2359-65.
141. 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? *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2015 Dec;20(6):596-601.
142. Schneeberger S, Gorantla VS, Brandacher G, Zeevi A, Demetris AJ, Lunz JG, et al. Upper-extremity transplantation using a cell-based protocol to minimize immunosuppression. *Ann Surg*. 2013 Feb;257(2):345-51.
143. 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 Jun;14(6):1446-52.
144. Petruzzo P, Kanitakis J, Badet L, Pialat JB, Boutroy S, Charpulat R, et al. Long-term follow-up in composite tissue allotransplantation: In-depth study of five (hand and face) recipients. *Am J Transplant*. 2011 Apr;11(4):808-16.
145. 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. In: *American Journal of Transplantation*. 2014 Feb;14(2):272-83.
146. Bachelet T, Couzi L, Lepreux S, Legeret M, Pariscoat G, Guidicelli G, et al. Kidney intragraft donor-specific antibodies as determinant of antibody-mediated

- lesions and poor graft outcome. *Am J Transplant*. 2013 Nov;13(11):2855-64.
147. Martin L, Guignier F, Bocrine O, D'Athis P, Rageot D, Rifle G, et al. Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplants recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation*. 2005 May 27;79(10):1459-61.
148. Uehara S, Chase CM, Kitchens WH, Rose HS, Colvin RB, Russell PS, et al. NK Cells Can Trigger Allograft Vasculopathy: The Role of Hybrid Resistance in Solid Organ Allografts. *J Immunol*. 2005 Sep 1;175(5):3424-30.
149. Petruzzo P, Dubernard JM. The International Registry on Hand and Composite Tissue allotransplantation. *Clin Transpl*. 2011;247-53.
150. Fischer S, Kueckelhaus M, Pauzenberger R, Bueno EM, Pomahac B. Functional outcomes of face transplantation. *Am J Transplant*. 2015 Jan;15(1):220-33.
151. McAlister VC, Haddad E, Renouf E, Malthaner RA, Kjaer MS, Glud LL. Cyclosporin versus tacrolimus as primary immunosuppressant after liver transplantation: A meta-analysis. *Am J Transplant*. 2006 Jul;6(7):1578-85.
152. Reitamo S, Remitz A. An update on current pharmacotherapy options in atopic dermatitis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2014 Aug;15(11):1517-24.
153. Schmook T, Kraft J, Benninghoff B, Nindl I, Roewert J, Ulrich C, et al. Treatment of cutaneous chronic graft-versus-host disease with topical pimecrolimus. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Jul 16;36(1):87-8.
154. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen JP, Suberbielle C, Anglicheau D, et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: A population-based study. *Lancet*. 2013 Jan 26;381(9863):313-9.

155. Sharif A, Racusen L, Montgomery R, Kraus E. Risk for BK viremia and nephropathy after desensitization. *Transplantation*. 2014 Jul 27;98(2):e7-8.
156. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2005 Oct;56(1):23-46.
157. Dubernard JM, Petruzzo P, Lanzetta M, Parmentier H, Martin X, Dawahra M, et al. Functional Results of the First Human Double-Hand Transplantation. *Ann Surg*. 2003 Jul;238(1):128-36.
158. Sosin M, Ceradini DJ, Levine JP, Hazen A, Staffenberg DA, Saadeh PB, et al. Total face, eyelids, ears, scalp, and skeletal subunit transplant: A reconstructive solution for the full face and total scalp burn. *Plast Reconstr Surg*. 2016 Jul;138(1):205-219.
159. Petruzzo P, Dubernard JM. World experience after more than a decade of clinical hand transplantation: update on the French program. *Hand clinics*. 2011 Nov;27(4):411-6, vii.
160. Hautz T, Engelhardt TO, Weissenbacher A, Kumnig M, Zelger B, Rieger M, et al. World experience after more than a decade of clinical hand transplantation: update on the Innsbruck program. *Hand clinics*. 2011 Nov;27(4):423-31, viii.
161. Kaufman CL, Breidenbach W. World experience after more than a decade of clinical hand transplantation: update from the Louisville hand transplant program. *Hand clinics*. 2011 Nov;27(4):417-21, vii-viii.
162. Jabłęcki J. World experience after more than a decade of clinical hand transplantation: update on the Polish program. *Hand clinics*. 2011 Nov;27(4):433-42, viii.

163. Lanzetta M, Petruzzo P, Margreiter R, Dubernard JM, Schuind F, Breidenbach W, et al. The International Registry on Hand and Composite Tissue Transplantation. In: *Transplantation*. 2005 May 15;79(9):1210-4.
164. Diaz-Siso JR, Parker M, Bueno EM, Sisk GC, Pribaz JJ, Eriksson E, et al. Facial allotransplantation: A 3-year follow-up report. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2013 Nov;66(11):1458-63.
165. Roche NA, Blondeel PN, Vermeersch HF, Peeters PC, Lemmens GMD, De Cubber J, et al. Long-term multifunctional outcome and risks of face vascularized composite allotransplantation. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2015 Oct;26(7):2038-46.
166. Silva AL, Fusco DR, Nga HS, Takase HM, Bravin AM, Contti MM, et al. Effect of sirolimus on carotid atherosclerosis in kidney transplant recipients: data derived from a prospective randomized controlled trial. *Clin Kidney J*. 2018 Dec;11(6):846-852.
167. Daniel JM, Dutzmann J, Brunsch H, Bauersachs J, Braun-Dullaeus R, Sedding DG. Systemic application of sirolimus prevents neointima formation not via a direct anti-proliferative effect but via its anti-inflammatory properties. *Int J Cardiol*. 2017 Jul 1;238:79-91.
168. De Fijter JW. Cancer and mTOR inhibitors in transplant recipients. *Transplantation*. 2017 Jan;101(1):45-55.
169. Westvik TS, Dermietzel A, Pomahac B. Facial restoration by transplantation: The Brigham and Women's face transplant experience. *Ann Plast Surg*. 2015 May;74 Suppl 1:S2-8.
170. Kaufman CL, Ouseph R, Kutz JE, Manon-Matos Y, Blair B, Marvin MR.

- Incidence of Successful Steroid Weaning in a Series of 8 Hand Transplant Recipients. *Vasc Compos Allograft Transplantation*. 2014.
171. Kahan BD. Role of cyclosporine: present and future. *Transplant Proc*. 1994 Oct;26(5):3082-7.
 172. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent. *Agents Actions*. 1994 Jul;6(4):468-75.
 173. June CH, Ledbetter JA, Gillespie MM, Lindsten T, Thompson CB. T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol*. 1987 Dec;7(12):4472-81.
 174. Shihab FS. Cyclosporine nephropathy: Pathophysiology and clinical impact. *Seminars in Nephrology*. 1996 Nov;16(6):536-47.
 175. De Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: Long-term consequences and challenges for the future. *American Journal of Kidney Diseases*. 2000 Feb;35(2):333-46.
 176. Scott JP, Higenbottam TW. Adverse Reactions and Interactions of Cyclosporin. *Med Toxicol Adverse Drug Exp*. 1988; 3(2):107-27.
 177. Shibasaki F, Hallin U, Uchino H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *Journal of Biochemistry*. 2002 Jan;131(1):1-15..
 178. Nankivell BJ, Chapman JR, Bonovas G, Gruenewald SM. Oral cyclosporine but not tacrolimus reduces renal transplant blood flow. *Transplantation*. 2004 May 15;77(9):1457-9.
 179. Vincenti F, Larsen CP, Alberu J, Bresnahan B, Garcia VD, Kothari J, et al. Three-year outcomes from BENEFIT, a randomized, active-controlled, parallel-group

- study in adult kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2012 Jan;12(1):210-7.
180. Cendales L, Bray R, Gebel H, Brewster L, Elbein R, Farthing D, et al. Tacrolimus to Belatacept Conversion Following Hand Transplantation: A Case Report. *Am J Transplant*. 2015 Aug;15(8):2250-5.
181. Grahammer J, Weissenbacher A, Zelger BG, Zelger B, Boesmueller C, Ninkovic M, et al. Benefits and limitations of belatacept in 4 hand-transplanted patients. *Am J Transplant*. 2017 Dec;17(12):3228-3235.
182. Poirier N, Azimzadeh AM, Zhang T, Dilek N, Mary C, Nguyen B, et al. Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Sci Transl Med*. 2010 Feb 3;2(17):17ra10.
183. Zhang T, Fresnay S, Welty E, Sangrampurkar N, Rybak E, Zhou H, et al. Selective CD28 blockade attenuates acute and chronic rejection of murine cardiac allografts in a CTLA-4-dependent manner. *Am J Transplant*. 2011 Aug;11(8):1599-609.
184. Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, Besse T, Grabensee B, Klein B, et al. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: A report of the european tacrolimus multicenter renal study group. *Transplantation*. 1997 Aug 15;64(3):436-43.
185. Opelz G, Döhler B. Lymphomas after Solid Organ Transplantation: A Collaborative Transplant Study Report. *Am J Transplant*. 2004 Feb;4(2):222-30.
186. Conrad A, Petruzzo P, Kanitakis J, Gazarian A, Badet L, Thaunat O, et al. Infections after upper extremity allotransplantation: a worldwide population cohort study, 1998-2017. *Transpl Int*. 2019 Jul;32(7):693-701.

187. Howsare M, Jones CM, Ramirez AM. Immunosuppression maintenance in vascularized composite allotransplantation: What is just right? *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2017 Oct;22(5):463-469.
188. Hautz T, Brandacher G, Engelhardt TO, Pierer G, Lee WPA, Pratschke J, et al. How reconstructive transplantation is different from organ transplantation and how it is not. In: *Transplantation Proceedings*. 2011 Nov;43(9):3504-11.
189. Faustman D. Strategies for circumventing transplant rejection: Modification of cells, tissues and organs. *Trends in Biotechnology*. 1995 Mar;13(3):100-5.
190. Rossini AA, Greiner DL, Mordes JP. Induction of immunologic tolerance for transplantation. *Physiological Reviews*. 1999 Jan;79(1):99-141.
191. Kawai T, Benedict Cosimi A, Colvin RB, Powelson J, Eason J, Kozlowski T, et al. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation*. 1995 Jan 27;59(2):256-62.
192. Hautz T, Brandacher G, Zelger B, Gorantla VS, Lee AWP, Pratschke J, et al. Immunologic aspects and rejection in solid organ versus reconstructive transplantation. *Transplant Proc*. 2010 Nov;42(9):3347-53.
193. Gorantla VS, Demetris AJ. Acute and chronic rejection in upper extremity transplantation: what have we learned? *Hand clinics*. 2011 Nov;27(4):481-93, ix.
194. Wekerle T, Blaha P, Koporc Z, Bigenzahn S, Pusch M, Muehlbacher F. Mechanisms of tolerance induction through the transplantation of donor hematopoietic stem cells: Central versus peripheral tolerance. In: *Transplantation*. 2003 May 15;75(9 Suppl):21S-25S.
195. Fuchs EJ. Transplantation tolerance: From theory to clinic. *Immunological Reviews*. 2014 Mar;258(1):64-79.

196. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nature Immunology*. 2010 Jan;11(1):21-7.
197. Sachs DH, Sykes M, Kawai T, Cosimi AB. Immuno-intervention for the induction of transplantation tolerance through mixed chimerism. *Seminars in Immunology*. 2011 Jun;23(3):165-73.
198. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775-87.
199. Steger U, Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells develop in mice not only during spontaneous acceptance of liver allografts but also after acute allograft rejection. *Transplantation*. 2006; Nov 15;82(9):1202-9.
200. Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi L. Role and mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transpl Immunol*. 2007 Feb;17(2):120-9.
201. Siemionow M, Nasir S. Impact of donor bone marrow on survival of composite tissue allografts. *Annals of Plastic Surgery*. 2008 Apr;60(4):455-62.
202. Prabhune KA, Gorantla VS, Perez-Abadia G, Francois CG, Vossen M, Laurentin-Perez LA, et al. Composite tissue allotransplantation in chimeric hosts part II. A clinically relevant protocol to induce tolerance in a rat model. *Transplantation*. 2003 Dec 15;76(11):1548-55.
203. Ayhan S, Tugay C, Porvasnik S, Crownover R, Siemionow M. Effect of low-dose donor radiation on acute rejection of composite limb allografts. In: *Transplantation Proceedings*. 2000 May;32(3):588-90.
204. Janczewska S, Ziolkowska A, Durluk M, Olszewski WL, Lukomska B. Fast

- lymphoid reconstitution after vascularized bone marrow transplantation in lethally irradiated rats. *Transplantation*. 1999 Jul 27;68(2):201-9.
205. Janczewska S, Ziolkowska A, Interewicz B, Majewski T, Olszewski WL, Lukomska B. Vascularized bone marrow transplanted in orthotopic hind-limb stimulates hematopoietic recovery in total-body-irradiated rats. *Transpl Int*. 2000; 13 Suppl 1:S541-6.
206. Lee WPA, Randolph MA, Weiland AJ, Yaremchuk MJ. Prolonged survival of vascularized limb tissue allografts by donor irradiation. *J Surg Res*. 1995 Nov;59(5):578-88.
207. McKenzie JL, Beard MEJ, Hard DNJ. The effect of donor pretreatment on interstitial dendritic cell content and rat cardiac allograft survival. *Transplantation*. 1984 Oct;38(4):371-6.
208. Foster RD, Ascher NL, McCalmont TH, Neipp M, Anthony JP, Mathes SJ. Mixed allogeneic chimerism as a reliable model for composite tissue allograft tolerance induction across major and minor histocompatibility barriers. *Transplantation*. 2001 Sep 15;72(5):791-7.
209. Gammie JS, Li S, Kawaharada N, Colson YL, Yousem S, Ildstad ST, et al. Mixed allogeneic chimerism prevents obstructive airway disease in a rat heterotopic tracheal transplant model. *J Hear Lung Transplant*. 1998 Aug;17(8):801-8.
210. Hettiaratchy S, Melendy E, Randolph MA, Coburn RC, Neville DM, Sachs DH, et al. Tolerance to composite tissue allografts across a major histocompatibility barrier in miniature swine. In: *Transplantation*. 2004 Feb 27;77(4):514-21.
211. Ozsahin M, Pene F, Cosset JM, Laugier A. Morbidity after total body irradiation. *Semin Radiat Oncol*. 1994 Apr;4(2):95-102.

212. Hou SM, Liou TC, Chu RM, Yeh LS. Comparison of different immunologic modalities on rat limb allotransplantation. *Transplant Proc.* 2002 Jun;34(4):1320-1.
213. Wekerle T, Kurtz J, Ito H, Ronquillo J V., Dong V, Zhao G, et al. Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):464-9.
214. Lukomska B, Durlik M, Cybulska E, Olszewski WL. Comparative analysis of immunological reconstitution induced by vascularized bone marrow versus bone marrow cell transplantation. *Transpl Int.* 1996; 9 Suppl 1:S492-6.
215. Lukomska B, Janczewska S, Durlik M, Olszewski WL. Kinetics of bone marrow repopulation in lethally irradiated rats after transplantation of vascularized bone marrow in syngeneic hind limb. *Ann Transplant.* 2000; 5(1):14-20.
216. Bolton EM, Gracie JA, Briggs JD, Kampinga J, Bradley JA. Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat. *J Exp Med.* 1989 Jun 1;169(6):1931-46.
217. Heidecke CD, Hancock WW, Jakobs F, Zantl N, Kurrle R, Westerholt S, et al. α/β -T cell receptor-directed therapy in rat cardiac allograft recipients: Treatment prior to alloantigen exposure prevents sensitization and abrogates accelerated rejection. *Transplantation.* 1995 Jan 15;59(1):78-84.
218. Siemionow M, Ortak T, Izycki D, Oke R, Cunningham B, Prajapati R, et al. Induction of tolerance in composite-tissue allografts. *Transplantation.* 2002 Nov 15;74(9):1211-7.
219. Siemionow MZ, Izycki DM, Zielinski M. Donor-specific tolerance in fully major

- histocompatibility complex-mismatched limb allograft transplants under an anti- $\alpha\beta$ T-cell receptor monoclonal antibody and cyclosporine a protocol. *Transplantation*. 2003 Dec 27;76(12):1662-8.
220. Ozer K, Izycki D, Zielinski M, Siemionow M. Development of donor-specific chimerism and tolerance in composite tissue allografts under $\alpha\beta$ -T-cell receptor monoclonal antibody and cyclosporine a treatment protocols. *Microsurgery*. 2004; 24(3):248-54.
221. Ozer K, Oke R, Gurunluoglu R, Zielinski M, Izycki D, Prajapati R, et al. Induction of tolerance to hind limb allografts in rats receiving cyclosporine A and antilymphocyte serum: Effect of duration of the treatment. *Transplantation*. 2003 Jan 15;75(1):31-6.
222. Elster EA, Blair PJ, Kirk AD. Potential of costimulation-based therapies for composite tissue allotransplantation. In: *Microsurgery*. 2000; 20(8):430-4.
223. Foster RD, Pham S, Li S, Aitouche A. Long-term acceptance of composite tissue allografts through mixed chimerism and CD28 blockade. *Transplantation*. 2003 Sep 27;76(6):988-94.
224. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16:111-35.
225. Tung TH, Mackinnon SE, Mohanakumar T. Prolonged limb allograft survival with CD40 costimulation blockade, T-cell depletion, and megadose donor bone-marrow transfusion. *Microsurgery*. 2005; 25(8):624-31.
226. Tung TH, Mackinnon SE, Mohanakumar T. Combined treatment with CD40 costimulation blockade, T-cell depletion, low-dose irradiation, and donor bone marrow transfusion in limb allograft survival. *Ann Plast Surg*. 2005

- Nov;55(5):512-8.
227. Fernández FG, McKane B, Marshbank S, Patterson GA, Mohanakumar T. Inhibition of obliterative airway disease development following heterotopic murine tracheal transplantation by costimulatory molecule blockade using anti-CD40 ligand alone or in combination with donor bone marrow. *J Hear Lung Transplant.* 2005 Jul;24(7 Suppl):S232-8.
 228. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol.* 2012; 30:531-64.
 229. Webster KE, Walters S, Kohler RE, Mrkvan T, Boyman O, Surh CD, et al. In vivo expansion of t reg cells with il-2-mab complexes: induction of resistance to eae and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J Exp Med.* 2009 Apr 13;206(4):751-60.
 230. Xu H, Dahiya S, Wang L, Akimova T, Han R, Zhang T, et al. Utility of IL-2 Complexes in Promoting the Survival of Murine Orthotopic Forelimb Vascularized Composite Allografts. *Transplantation.* 2018; Jan;102(1):70-78.
 231. Jindal R, Unadkat J, Zhang W, Zhang D, Ng TW, Wang Y, et al. Spontaneous resolution of acute rejection and tolerance induction with IL-2 fusion protein in vascularized composite allotransplantation. *Am J Transplant.* 2015 May;15(5):1231-40.
 232. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
 233. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing.

- Cell Transplantation. 2010; 19(6):667-79.
234. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25Highforkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2009 Apr;156(1):149-60.
235. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3722-9.
236. Parekkadan B, Tilles AW, Yarmush ML. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Autoimmune Enteropathy Independently of Regulatory T Cells. *Stem Cells*. 2008 Jul;26(7):1913-9.
237. Kuo YR, Chen CC, Shih HS, Goto S, Huang CW, Wang CT, et al. Prolongation of composite tissue allotransplant survival by treatment with bone marrow mesenchymal stem cells is correlated with T-cell regulation in a swine hind-limb model. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Feb;127(2):569-579.
238. Kuo YR, Chen CC, Goto S, Lee I Te, Huang CW, Tsai CC, et al. Modulation of immune response and T-cell regulation by donor adipose-derived stem cells in a rodent hind-limb allotransplant model. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Dec;128(6):661e-672e.
239. 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*. 2006 Sep;6(9):2121-33.

240. Scandling JD, Busque S, Shizuru JA, Lowsky R, Hoppe R, Dejbakhsh-Jones S, et al. Chimerism, graft survival, and withdrawal of immunosuppressive drugs in HLA matched and mismatched patients after living donor kidney and hematopoietic cell transplantation. *Am J Transplant*. 2015 Mar;15(3):695-704.
241. Leventhal JR, Elliott MJ, Yolcu ES, Bozulic LD, Tollerud DJ, Mathew JM, et al. Immune reconstitution/immunocompetence in recipients of kidney plus hematopoietic stem/facilitating cell transplants. *Transplantation*. 2015 Feb;99(2):288-98;
242. Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, Egawa H, Kiuchi T, Fujita S, et al. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation*. 2001 Aug 15;72(3):449-54.
243. Feng S, Ekong UD, Lobritto SJ, Demetris AJ, Roberts JP, Rosenthal P, et al. Complete immunosuppression withdrawal and subsequent allograft function among pediatric recipients of parental living donor liver transplants. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2012 Jan 18;307(3):283-93.
244. Benítez C, Londoño MC, Miquel R, Manzia TM, Abraldes JG, Lozano JJ, et al. Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology*. 2013 Nov;58(5):1824-35.
245. Spitzer TR, Delmonico F, Tolkoff-Rubin N, McAfee S, Sackstein R, Saidman S, et al. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: The induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation*. 1999 Aug 27;68(4):480-4.
246. Elias N, Benedict Cosimi A, Kawai T. Clinical trials for induction of renal allograft

- tolerance. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2015 Aug;20(4):406-11.
247. Kawai T, Sachs DH, Sykes M, Cosimi AB. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *New England Journal of Medicine*. 2013 May 9;368(19):1850-2.
248. Kawai T, Sachs DH, Sprangers B, Spitzer TR, Saidman SL, Zorn E, et al. Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am J Transplant*. 2014 Jul;14(7):1599-611.
249. Swearingen B, Ravindra K, Xu H, Wu S, Breidenbach WC, Ildstad ST. Science of composite tissue allotransplantation. *Transplantation*. 2008 Sep 15;86(5):627-35.
250. Ravindra K V., Ildstad ST. Immunosuppressive protocols and immunological challenges related to hand transplantation. *Hand clinics*. 2011 Nov;27(4):467-79, ix.
251. Beutler B. SHIP, TGF- β , and endotoxin tolerance. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):134-5.
252. O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2007 May;7(5):353-64.
253. Foster SL, Medzhitov R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clinical Immunology*. 2009 Jan;130(1):7-15.
254. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology*. 2009 Oct;30(10):475-87.
255. Julian MW, Strange HR, Ballinger MN, Hotchkiss RS, Papenfuss TL, Crouser ED.

- Tolerance and cross-tolerance following toll- like receptor (TLR)-4 and -9 activation are mediated by IRAK-M and modulated by IL-7 in murine splenocytes. *PLoS One*. 2015 Jul 28;10(7):e0132921.
256. Kox M, De Kleijn S, Pompe JC, Ramakers BP, Netea MG, Van Der Hoeven JG, et al. Differential ex vivo and in vivo endotoxin tolerance kinetics following human endotoxemia. *Crit Care Med*. 2011 Aug;39(8):1866-70.
257. Escoll P, Del Fresno C, García L, Vallés G, Lendínez MJ, Arnalich F, et al. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Nov 14;311(2):465-72.
258. Del Fresno C, García-Río F, Gómez-Piña V, Soares-Schanoski A, Fernández-Ruíz I, Jurado T, et al. Potent Phagocytic Activity with Impaired Antigen Presentation Identifying Lipopolysaccharide-Tolerant Human Monocytes: Demonstration in Isolated Monocytes from Cystic Fibrosis Patients. *J Immunol*. 2009 May 15;182(10):6494-507.
259. López-Collazo E, del Fresno C. Pathophysiology of endotoxin tolerance: Mechanisms and clinical consequences. *Critical Care*. 2013 Nov 14;17(6):242.
260. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*. 2007 Jun 21;447(7147):972-8.
261. Karp CL, Wysocka M, Ma X, Marovich M, Factor RE, Nutman T, et al. Potent suppression of IL-12 production from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. *Eur J Immunol*. 1998 Oct;28(10):3128-36.
262. Wolk K, Döcke WD, Von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood*. 2000 Jul

- 1;96(1):218-23.
263. López-Collazo E, Gómez-Piña V, Arnalich F. Understanding immune dysfunctions in sepsis patients. *Critical Care*. 2010;14(4):435.
 264. Møller K. Of cells and men: Ex vivo and in vivo tolerance to lipopolysaccharide. *Critical Care Medicine*. 2011 Aug;39(8):1997-8.
 265. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: A new skin for the old ceremony. *Molecular Medicine*. 2008; 14(1-2):64-78.
 266. O'Carroll C, Fagan A, Shanahan F, Carmody RJ. Identification of a Unique Hybrid Macrophage-Polarization State following Recovery from Lipopolysaccharide Tolerance. *J Immunol*. 2014 Jan 1;192(1):427-36.
 267. Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, et al. Mechanism of endotoxin desensitization: Involvement of interleukin 10 and transforming growth factor β . *J Exp Med*. 1995 May 1;181(5):1887-92.
 268. Elborn JS. Cystic fibrosis. *The Lancet*. 2016 Aug;4(8):617-626.
 269. del Fresno C, Gómez-Piña V, Lores V, Soares-Schanoski A, Fernández-Ruiz I, Rojo B, et al. Monocytes from cystic fibrosis patients are locked in an LPS tolerance state: Down-regulation of TREM-1 as putative underlying mechanism. *PLoS One*. 2008 Jul 16;3(7):e2667.
 270. Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: Induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*. 1997 Jul 15;96(2):396-9.

271. Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, Shibata Y, Nitobe J, Miyamoto T, et al. Toll-Like Receptor-2 Modulates Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. *Circulation*. 2003 Dec 9;108(23):2905-10.
272. del Fresno C, Soler-Rangel L, Soares-Schanoski A, Gómez-Piña V, González-León MC, Gómez-García L, et al. Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *J Endotoxin Res*. 2007; 13(1):39-52.
273. Koennecke HC, Belz W, Berfelde D, Endres M, Fitzek S, Hamilton F, et al. Factors influencing in-hospital mortality and morbidity in patients treated on a stroke unit. *Neurology*. 2011 Sep 6;77(10):965-72.
274. Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C, Locati M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum Immunol*. 2009 May;70(5):325-30.
275. del Fresno C, Otero K, Gómez-García L, González-León MC, Soler-Ranger L, Fuentes-Prior P, et al. Tumor Cells Deactivate Human Monocytes by Up-Regulating IL-1 Receptor Associated Kinase-M Expression via CD44 and TLR4. *J Immunol*. 2005 Mar 1;174(5):3032-40.
276. Soares-Schanoski A, Jurado T, Córdoba R, Siliceo M, Fresno C del, Gómez-Piña V, et al. Impaired antigen presentation and potent phagocytic activity identifying tumor-tolerant human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jun 29;423(2):331-7.
277. Wadhwa PD, Morrison VA. Infectious Complications of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Semin Oncol*. 2006 Apr;33(2):240-9.
278. Biswas SK, Bist P, Dhillon MK, Kajiji T, del Fresno C, Yamamoto M, et al. Role

- for MyD88-Independent, TRIF Pathway in Lipid A/TLR4-Induced Endotoxin Tolerance. *J Immunol.* 2007 Sep 15;179(6):4083–92.
279. Xiong Y, Medvedev AE. Induction of endotoxin tolerance in vivo inhibits activation of IRAK4 and increases negative regulators IRAK-M, SHIP-1, and A20. *J Leukoc Biol.* 2011 Dec;90(6):1141-8.
280. Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell.* 2002 Jul 26;110(2):191-202.
281. Wiersinga WJ, Veer CVT, Van Den Pangaart PS, Dondorp AM, Day NP, Peacock SJ, et al. Immunosuppression associated with interleukin-1R-associated-kinase-M upregulation predicts mortality in Gram-negative sepsis (melioidosis). *Crit Care Med.* 2009 Feb;37(2):569-76.
282. Arts RJW, Joosten LAB, van der Meer JWM, Netea MG. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. *J Leukoc Biol.* 2013 Feb;93(2):209-15.
283. Wilson AG. Epigenetic Regulation of Gene Expression in the Inflammatory Response and Relevance to Common Diseases. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1514-9.
284. Baltimore D, Boldin MP, O’Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: New regulators of immune cell development and function. *Nature Immunology.* 2008 Aug;9(8):839-45.
285. Vergadi E, Vaporidi K, Tsatsanis C. Regulation of endotoxin tolerance and compensatory anti-inflammatory response syndrome by non-coding RNAs. *Frontiers in Immunology.* 2018 Nov 20;9:2705.

286. Hao S, Baltimore D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol.* 2009 Mar;10(3):281-8.
287. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002; ;71:635-700.
288. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994 Feb;8(2):217-25.
289. Harvill ET, Preston A, Cotter PA, Allen AG, Maskell DJ, Miller JF. Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect Immun.* 2000 Dec;68(12):6720-8.
290. O'Neill L. The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochemical Society transactions.* 2000 Oct;28(5):557-63.
291. Bäckhed F, Normark S, Schweda EKH, Oscarson S, Richter-Dahlfors A. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: A biological role for LPS modifications. *Microbes Infect.* 2003 Oct;5(12):1057-63.
292. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008 May;42(2):145-151.
293. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):885-91.
294. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LAJ. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature Reviews Immunology.* 2005 Jun;5(6):446-58.

295. Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, et al. Induction of In Vitro Reprogramming by Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 Agonists in Murine Macrophages: Effects of TLR “Homotolerance” Versus “Heterotolerance” on NF- κ B Signaling Pathway Components. *J Immunol.* 2003 Jan 1;170(1):508-19.
296. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Signal Transduction in Endotoxin-Tolerized Mouse Macrophages: Dysregulation of Cytokine, Chemokine, and Toll-Like Receptor 2 and 4 Gene Expression. *J Immunol.* 2000 Jun 1;164(11):5564-74.
297. Draisma A, Pickkers P, Bouw MPWJM, Van Der Hoeven JG. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. *Crit Care Med.* 2009 Apr;37(4):1261-7.
298. Lauw FN, Ten Hove T, Dekkers PEP, De Jonge E, Van Deventer SJH, Van Der Poll T. Reduced Th1, but not Th2, cytokine production by lymphocytes after in vivo exposure of healthy subjects to endotoxin. *Infect Immun.* 2000 Mar;68(3):1014-8.
299. Ishiyama K, Ohdan H, Tokita D, Shishida M, Tanaka Y, Irei T, et al. Induction of endotoxin tolerance inhibits alloimmune responses. *Transpl Immunol.* 2006 Nov;16(3-4):158-65.
300. Latge JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, Diaquin M, Sarfati J, Wieruszeski JM, et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 1994 Dec;62(12):5424-33.
301. Fontaine T, Latgé JP. Galactomannan produced by *Aspergillus fumigatus*: An update on the structure, biosynthesis and biological functions of an emblematic

- fungal biomarker. *Journal of Fungi*. 2020 Nov 12;6(4):283.
302. Werner JL, Metz AE, Horn D, Schoeb TR, Hewitt MM, Schwiebert LM, et al. Requisite Role for the Dectin-1 β -Glucan Receptor in Pulmonary Defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol*. 2009 Apr 15;182(8):4938-46.
303. Saijo S, Iwakura Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol*. 2011 Aug;23(8):467-72.
304. Perera N, Yang FL, Lu YT, Li LH, Hua KF, Wu SH. *Antrodia cinnamomea* galactomannan elicits immunostimulatory activity through toll-like receptor 4. *Int J Biol Sci*. 2018 Jul 27;14(10):1378-1388.
305. Toledano V, Hernández-Jiménez E, Cubillos-Zapata C, Flandez M, Álvarez E, Varela-Serrano A, et al. Galactomannan downregulates the inflammation responses in human macrophages via NF κ B2/p100. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015:942517.
306. Basak S, Kim H, Kearns JD, Tergaonkar V, O'Dea E, Werner SL, et al. A Fourth $\text{I}\kappa\text{B}$ Protein within the NF- κB Signaling Module. *Cell*. 2007 Jan 26;128(2):369-81.
307. Doi K. Homotransplantation of limbs in rats: A preliminary report on an experimental study with nonspecific immunosuppressive drugs. *Plast Reconstr Surg*. 1979 Nov;64(5):613-21.
308. Vartanian KB, Stevens SL, Marsh BJ, Williams-Karnesky R, Lessov NS, Stenzel-Poore MP. LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury. *J Neuroinflammation*. 2011 Oct 14;8:140.
309. Siemionow M, Kulahci Y. Experimental Models of Composite Tissue Allograft

- Transplants. *Semin Plast Surg.* 2007 Nov;21(4):205-12.
310. 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 May;10(5):1200-9.
 311. Bonastre-Juliá J, Landín-Jarillo L, Casado-Pérez C. Preservación en frío y rechazo crónico, desarrollo de un modelo de trasplante de extremidad posterior en ratas. *Cir Plast Ibero-Latinoamericana.* 2015.
 312. Gerçek A, Eti Z, Gögüş FY, Sav A. The analgesic and anti-inflammatory effects of subcutaneous bupivacaine, morphine and tramadol in rats. In: *Agri.* 2004 Jul;16(3):53-8.
 313. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain.* 2011 Jul 29;7:55.
 314. Adamson LA, Huang WC, Breidenbach WC, Rahhal D, Xu H, Huang Y, et al. A modified model of hindlimb osteomyocutaneous flap for the study of tolerance to composite tissue allografts. *Microsurgery.* 2007; 27(7):630-6.
 315. Zdichavsky M, Jones JW, Ustuner ET, Ren X, Edelstein J, Maldonado C, et al. Scoring of skin rejection in a swine composite tissue allograft model. *J Surg Res.* 1999 Jul;85(1):1-8.
 316. Okayama J, Ko S, Kanehiro H, Kanokogi H, Hisanaga M, Ohashi K, et al. Bone marrow chimerism and tolerance induced by single-dose cyclophosphamide. *J Surg Res.* 2004 Jul;120(1):102-10.
 317. Wilson JL, Morritt AN, Morrison WA. Avoiding complications. In: Saunders WB, editor. *Flaps and Reconstructive Surgery.* China; 2009. p. 117–24.

318. Pradka SP, Ong YS, Zhang Y, Davis SJ, Baccarani A, Messmer C, et al. Increased Signs of Acute Rejection With Ischemic Time in a Rat Musculocutaneous Allograft Model. *Transplant Proc.* 2009 Mar;41(2):531-6.
319. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998 May 15;91(10):3527-61.
320. Hack CE, Zeerleder S, Dhainaut JF, Taylor F, Reinhart K. The endothelium in sepsis: Source of and a target for inflammation. In: *Critical Care Medicine.* 2001 Jul;29(7 Suppl):S21-7.
321. Heemann U, Szabo A, Hamar P, Muller V, Witzke O, Lutz J, et al. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury: Possible connection to an interleukin-6-dependent pathway. *Am J Pathol.* 2000 Jan;156(1):287-93.
322. Domínguez Fernández E, Siemers F, Flohé S, Nau M, Schade FU. Effects of endotoxin tolerance on liver function after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *Crit Care Med.* 2002 Jan;30(1):165-70.
323. Flohé S, Lendemans S, Schade FU, Kreuzfelder E, Waydhas C. Influence of surgical intervention in the immune response of severely injured patients. *Intensive Care Med.* 2004 Jan;30(1):96-102.
324. Jacinto R, Hartung T, McCall C, Li L. Lipopolysaccharide- and Lipoteichoic Acid-Induced Tolerance and Cross-Tolerance: Distinct Alterations in IL-1 Receptor-Associated Kinase. *J Immunol.* 2002 Jun 15;168(12):6136-41.
325. Li CH. Bacterial lipoprotein-induced self-tolerance and cross-tolerance to LPS are associated with reduced IRAK-1 expression and MyD88-IRAK complex

- formation. *J Leukoc Biol.* 2006 Apr;79(4):867-75.
326. Bohannon JK, Hernandez A, Enkhbaatar P, Adams WL, Sherwood ER. The immunobiology of toll-like receptor 4 agonists: from endotoxin tolerance to immunoadjuvants. *Shock.* 2013 Dec;40(6):451–62.
327. Alverdy JC. Hypermetabolism and Nutritional Support in Sepsis. *Surg Infect (Larchmt).* 2018; 19(2):163-167.
328. Hasenboehler E, Williams A, Leinhase I, Morgan SJ, Smith WR, Moore EE, et al. Metabolic changes after polytrauma: An imperative for early nutritional support. *World Journal of Emergency Surgery.* 2006 Oct 4;1:29.
329. De Lorenzo Y Mateos AG. Séptima Lección Jesús Culebras. Respuesta inflamatoria sistémica y disfunción/fracaso multiorgánico tras una agresión: implicaciones metabólicas. *Nutr Hosp.* 2017 Feb 1;34(1):244-250.
330. Wirthlin DJ, Cullen JJ, Spates ST, Conklin JL, Murray J, Caropreso DK, et al. Gastrointestinal transit during endotoxemia: The role of nitric oxide. In: *Journal of Surgical Research.* 1996 Feb 1;60(2):307-11.
331. Cullen JJ, Caropreso DK, Ephgrave KS. Effect of endotoxin on canine gastrointestinal motility and transit. *J Surg Res.* 1995 Jan;58(1):90-5.
332. Cullen JJ, Mercer D, Hinkhouse M, Ephgrave KS, Conklin JL. Effects of endotoxin on regulation of intestinal smooth muscle nitric oxide synthase and intestinal transit. *Surgery.* 1999 Mar;125(3):339-44.
333. Gray GA, Schott C, Julou-Schaeffer G, Fleming I, Parratt JR, Stoclet J -C. The effect of inhibitors of the l-arginine/nitric oxide pathway on endotoxin-induced loss of vascular responsiveness in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol.* 1991 May;103(1):1218-24.

334. Stark ME, Bauer AJ, Szurszewski JH. Effect of nitric oxide on circular muscle of the canine small intestine. *J Physiol*. 1991 Dec;444:743-61.
335. Burleigh DE. Ng-nitro-l-arginine reduces nonadrenergic, noncholinergic relaxations of human gut. *Gastroenterology*. 1992 Feb;102(2):679-83.
336. Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* (80-). 2007 Jun 15;316(5831):1628-32.
337. Cekic C, Casella CR, Eaves CA, Matsuzawa A, Ichijo H, Mitchell TC. Selective activation of the p38 MAPK pathway by synthetic monophosphoryl lipid A. *J Biol Chem*. 2009 Nov 13;284(46):31982-91.
338. Pfaar O, Cazan D, Klimek L, Larenas-Linnemann D, Calderon MA. Adjuvants for immunotherapy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2012 Dec;12(6):648-57.
339. Astiz ME, Rackow EC, Still JG, Howell ST, Cato A, Von Eschen KB, et al. Pretreatment of normal humans with monophosphoryl lipid A induces tolerance to endotoxin: A prospective, double-blind, randomized, controlled trial. *Crit Care Med*. 1995 Jan;23(1):9-17.
340. Astiz ME, Rackow EC, Kim YB, Weil MH. Monophosphoryl lipid A induces tolerance to the lethal hemodynamic effects of endotoxemia. *Circ Shock*. 1991 Feb;33(2):92-7.
341. Alving CR, Peachman KK, Rao M, Reed SG. Adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*. 2012 Jun;24(3):310-5.
342. Baldrige JR, Cluff CW, Evans JT, Lacy MJ, Stephens JR, Brookshire VG, et al. Immunostimulatory activity of aminoalkyl glucosaminide 4-phosphates (AGPs):

- Induction of protective innate immune responses by RC-524 and RC-529. *Journal of Endotoxin Research*. 2002;8(6):453-8.
343. Airhart CL, Rohde HN, Bohach GA, Hovde CJ, Deobald CF, Lee SS, et al. Induction of innate immunity by lipid A mimetics increases survival from pneumonic plague. *Microbiology*. 2008 Jul;154(Pt 7):2131-2138.
344. Lembo A, Pelletier M, Iyer R, Timko M, Dudda JC, West TE, et al. Administration of a Synthetic TLR4 Agonist Protects Mice from Pneumonic Tularemia. *J Immunol*. 2008 Jun 1;180(11):7574-81.
345. Klune JR, Tsung A. Molecular Biology of Liver Ischemia/Reperfusion Injury: Established Mechanisms and Recent Advancements. *Surgical Clinics of North America*. 2010 Aug;90(4):665-77.
346. Li J, Lai X, Chen Y, Niu B, Gong J. Endotoxin tolerance attenuates liver ischemia/reperfusion injury by down-regulation of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 in Kupffer cells. *Transplant Proc*. 2011 Sep;43(7):2531-5.
347. Godet C, Goujon JM, Petit I, Lecron JC, Hauet T, Mauco G, et al. Endotoxin tolerance enhances interleukin-10 renal expression and decreases ischemia-reperfusion renal injury in rats. *Shock*. 2006 Apr;25(4):384-8.
348. Leonard DA, Kurtz JM, Cetrulo CL. Vascularized composite allotransplantation: Towards tolerance and the importance of skin-specific immunobiology. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2013 Dec;18(6):645-51.
349. Seneschal J, Clark RA, Gehad A, Baecher-Allan CM, Kupper TS. Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. *Immunity*. 2012 May 25;36(5):873-84.
350. Jiang X, Clark RA, Liu L, Wagers AJ, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. Skin infection

- generates non-migratory memory CD8 + T RM cells providing global skin immunity. *Nature*. 2012 Feb 29;483(7388):227-31.
351. Wolk K, Kunz S, Crompton NEA, Volk HD, Sabat R. Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance. *J Biol Chem*. 2003 May 16;278(20):18030-6.
352. Schröder M, Meisel C, Buhl K, Profanter N, Sievert N, Volk H-D, et al. Different Modes of IL-10 and TGF- β to Inhibit Cytokine-Dependent IFN- γ Production: Consequences for Reversal of Lipopolysaccharide Desensitization. *J Immunol*. 2003 May 15;170(10):5260-7.
353. Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK. CD28/B7 costimulation: A review. *Critical Reviews in Immunology*. 1998; 18(5):389-418.
354. Zhou Y, Xia Q, Wang X, Fu S. Endotoxin tolerant dendritic cells suppress inflammatory responses in splenocytes via interleukin-1 receptor associated kinase (Irak)-m and programmed death-ligand 1 (pdl-1). *Med Sci Monit*. 2018;
355. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine*. 2003 Jul 11;24:4798-4806.
356. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, et al. Depletion of Dendritic Cells, But Not Macrophages, in Patients with Sepsis. *J Immunol*. 2002 Mar 1;168(5):2493-500.
357. Efron PA, Martins A, Minnich D, Tinsley K, Ungaro R, Bahjat FR, et al. Characterization of the Systemic Loss of Dendritic Cells in Murine Lymph Nodes During Polymicrobial Sepsis. *J Immunol*. 2004 Sep 1;173(5):3035-43.
358. Taams L, Vukmanovic-Stejic M, Salmon M, Akbar A. Immune regulation by CD4+ CD25+ regulatory T cells: Implications for transplantation tolerance.

- Transpl Immunol. 2003 Jul-Sep 2003;11(3-4):277-85.
359. Hall BM, Pearce NW, Gurley KE, Dorsch SE. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporinte. III. Further characterization of the CD4⁺ suppressor cell and its mechanisms of action. *J Exp Med.* 1990 Jan 1;171(1):141-57.
360. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25⁺ CD4⁺ Regulatory T Cells Prevent Graft Rejection: CTLA-4- and IL-10-Dependent Immunoregulation of Alloresponses . *J Immunol.* 2002 Feb 1;168(3):1080-6.
361. Graca L, Thompson S, Lin C-Y, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Both CD4⁺ CD25⁺ and CD4⁺ CD25⁻ Regulatory Cells Mediate Dominant Transplantation Tolerance . *J Immunol.* 2002 Jun 1;168(11):5558-65.
362. Trani J, Moore DJ, Jarrett BP, Markmann JW, Lee MK, Singer A, et al. CD25⁺ Immunoregulatory CD4⁺ T Cells Mediate Acquired Central Transplantation Tolerance . *J Immunol.* 2003 Jan 1;170(1):279-86.
363. Maurik A van, Herber M, Wood KJ, Jones ND. Cutting Edge: CD4⁺ CD25⁺ Alloantigen-Specific Immunoregulatory Cells That Can Prevent CD8⁺ T Cell-Mediated Graft Rejection: Implications for Anti-CD154 Immunotherapy . *J Immunol.* 2002 Nov 15;169(10):5401-4.
364. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: New therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med.* 2002 Aug 5;196(3):401-6.
365. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Garrison Fathman C, Strober S. Donor-type CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2002 Aug 5;196(3):389-

- 99.
366. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2011 Feb;11(2):119-30.
367. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):287-96.
368. Ermann J, Szanya V, Ford GS, Paragas V, Fathman CG, Lejon K. CD4 + CD25 + T Cells Facilitate the Induction of T Cell Anergy . *J Immunol*. 2001 Oct 15;167(8):4271-5.
369. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of Human CD4 + CD25 +high Regulatory T Cell Function . *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6210-7.
370. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 2003 Feb 17;197(4):403-11.
371. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* (80-). 2003 Feb 14;299(5609):1033-6.
372. Dangi A, Sumpter TL, Kimura S, Stolz DB, Murase N, Raimondi G, et al. Selective Expansion of Allogeneic Regulatory T Cells by Hepatic Stellate Cells: Role of Endotoxin and Implications for Allograft Tolerance. *J Immunol*. 2012 Apr 15;188(8):3667-77.
373. Zhou F, Zhang GX, Rostami A. LPS-treated bone marrow-derived dendritic cells induce immune tolerance through modulating differentiation of CD4+ regulatory T cell subpopulations mediated by 3G11 and CD127. *Immunol Res*. 2017

- Jun;65(3):630-638.
374. Bourget JL, Mathes DW, Nielsen GP, Randolph MA, Tanabe YN, Ferrara VR, et al. Tolerance to musculoskeletal allografts with transient lymphocyte chimerism in miniature swine. *Transplantation*. 2001 Apr 15;71(7):851-6.
 375. Wood K, Sachs DH. Chimerism and transplantation tolerance: Cause and effect. *Immunology Today*. 1996 Dec;17(12):584-7; discussion 588.
 376. Wang D, Zhong X, Huang D, Chen R, Bai G, Li Q, et al. Functional polymorphisms of interferon-gamma affect pneumonia-induced sepsis. *PLoS One*. 2014 Jan 24;9(1):e87049.
 377. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Critical Care*. 2006 ;10(5):233.
 378. Rossato M, Curtale G, Tamassia N, Castellucci M, Mori L, Gasperini S, et al. IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF- α , IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 6;109(45):E3101-10.
 379. Berg DJ, Kühn R, Rajewsky K, Müller W, Menon S, Davidson N, et al. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest*. 1995 Nov;96(5):2339-47.
 380. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*. 1996 Mar;17(3):138-46.
 381. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996 Oct 31;383(6603):787-93.

382. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to Interferon- γ . *Annu Rev Immunol.* 1997; 15:749-95.
383. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1 +CD11b+ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med.* 2007 Jun 11;204(6):1463-74.
384. Patel DR, Kaplan MH, Chang C-H. Altered Th1 Cell Differentiation Programming by CIITA Deficiency. *J Immunol.* 2004 Nov 1;173(9):5501-8.
385. Dai WJ, Bartens W, Köhler G, Hufnagel M, Kopf M, Brombacher F. Impaired macrophage listericidal and cytokine activities are responsible for the rapid death of listeria monocytogenes-infected IFN- γ receptor-deficient mice. *J Immunol.* 1997 Jun 1;158(11):5297-304.
386. Rothe J, Lesslauer W, Lötscher H, Lang Y, Koebel P, Köntgen F, et al. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to IMF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature.* 1993 Aug 26;364(6440):798-802.
387. van der Sluijs KF, van Elden LJR, Nijhuis M, Schuurman R, Pater JM, Florquin S, et al. IL-10 Is an Important Mediator of the Enhanced Susceptibility to Pneumococcal Pneumonia after Influenza Infection. *J Immunol.* 2004 Jun 15;172(12):7603-9.
388. Varma TK, Durham M, Murphey ED, Cui W, Huang Z, Lin CY, et al. Endotoxin priming improves clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in wild-type and interleukin-10 knockout mice. *Infect Immun.* 2005 Nov;73(11):7340-7.
389. Mason CM, Dobard E, Summer WR, Nelson S. Intraportal Lipopolysaccharide

- Suppresses Pulmonary Antibacterial Defense Mechanisms. *J Infect Dis.* 1997 Nov;176(5):1293-302.
390. Deng M, Scott MJ, Loughran P, Gibson G, Sodhi C, Watkins S, et al. Lipopolysaccharide Clearance, Bacterial Clearance, and Systemic Inflammatory Responses Are Regulated by Cell Type–Specific Functions of TLR4 during Sepsis. *J Immunol.* 2013 May 15;190(10):5152-60.
391. Murphey ED, Fang G, Varma TK, Sherwood ER. Improved bacterial clearance and decreased mortality can be induced by LPS tolerance and is not dependent upon IFN- γ . *Shock.* 2007 Mar;27(3):289-95.
392. Lehner MD, Ittner J, Bundschuh DS, Van Rooijen N, Wendel A, Hartung T. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. *Infect Immun.* 2001 Jan;69(1):463-71.
393. Rayhane N, Fitting C, Lortholary O, Dromer F, Cavaillon JM. Administration of endotoxin associated with lipopolysaccharide tolerance protects mice against fungal infection. *Infect Immun.* 2000 Jun;68(6):3748-53.
394. Murphey ED, Fang G, Sherwood ER. Endotoxin pretreatment improves bacterial clearance and decreases mortality in mice challenged with *Staphylococcus aureus*. *Shock.* 2008 Apr;29(4):512-8.
395. Wheeler DS, Lahni PM, Denenberg AG, Poynter SE, Wong HR, Cook JA, et al. Induction of endotoxin tolerance enhances bacterial clearance and survival in murine polymicrobial sepsis. *Shock.* 2008 Sep;30(3):267-73.
396. Roquilly A, Broquet A, Jacqueline C, Gautreau L, Segain JP, De Coppet P, et al. Toll-like receptor-4 agonist in post-haemorrhage pneumonia: Role of dendritic and

natural killer cells. *Eur Respir J.* 2013 Nov;42(5):1365-78.

397. Romero CD, Varma TK, Hobbs JB, Reyes A, Driver B, Sherwood ER. The toll-like receptor 4 agonist monophosphoryl lipid A augments innate host resistance to systemic bacterial infection. *Infect Immun.* 2011; 79(9):3576-87.

8. ANEXOS

8.1.Premio derivado de la presente tesis

Premio nacional de residentes en el 52º Congreso de Sociedad Española de Cirugía Plástica Reconstructiva y Estética (SECPRE), celebrado en Bilbao en mayo de 2017, con el trabajo: *Inducción de tolerancia con lipopolisacárido y galactomanano en un modelo de trasplante de tejido compuesto.*

8.2.Beca concedida de la presente tesis

Beca de 12.000 euros concedida por la fundación IdiPAZ, dentro de la “Convocatoria IdiPaz/FIBHULP de ayudas a grupos de investigación constituidos” del año 2015. Título del proyecto: “*Inducción de tolerancia con Galactomanano en un modelo de trasplante de extremidad posterior en ratas*”. Director: Dr. Jorge Bonastre Juliá.

8.3. Publicaciones derivadas de la presente tesis

1. Rubio Yanchuck M, Bonastre Julia J. Inducción de tolerancia con lipopolisacarido en modelo de trasplante de tejido compuesto. Cir. plást. iberolatinoam 2018. 44 (3): 121-122.
2. Rubio M, Toledano V, Bonastre J, Diez J, Aguirre L, Lopez-Collazo E. Induction of Endotoxin Tolerance delays acute rejection in a hind-limb transplantation model in rats. Plast Reconstr Surg. Aceptada y pendiente de publicación; fecha estimada: Febrero 2022. PRS-D-20-00767

8.4. Comunicaciones a congresos derivadas de la presente tesis

1. 52º Congreso Nacional de la SECPRE. Comunicación oral: *Inducción de tolerancia con lipopolisacárido y galactomanano en un modelo de trasplante de tejido compuesto*. Fecha: 18-20 de mayo 2017. Bilbao (España).
2. 22º Congreso Ibero Latinoamericano de Cirugía Plástica y Reconstructiva (FILACP): *Inducción de tolerancia con lipopolisacárido y galactomanano en un modelo de trasplante de tejido compuesto*. Fecha: 23-26 de mayo de 2018. Lima (Perú).

8.5. 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 de Bienestar Animal (CEBA) con fecha 4 de abril de 2016 (número de proyecto CEBA-01-2016), certificando el cumplimiento de la normativa vigente en experimentación animal (directiva del Consejo de Europa publicada el 22 de septiembre de 2019; 2010/63/UE).

No existe relación comercial ni financiera entre el presente trabajo, su tutor y colaboradores, y los productos que en él se enumeran. La medicación inmunosupresora fue suministrada de forma gratuita por el propio IdiPAZ.

Las imágenes no originales contenidas en la presente tesis se publican con permiso de las editoriales propietarias de sus derechos de autor (Elsevier, Biomed Central, Creative Commons Attribution Licence y SAGE). Los derechos para su uso han sido

cedidos por Rightslink con números de licencia 5181481094002, 5181471323688,
5158671319128, 5158671135809.