



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTOS INMUNOMODULATORIOS DE LAS  
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE  
MÉDULA ÓSEA EN UN MODELO DE  
PRESERVACIÓN PULMONAR EN COBAYOS  
(*Cavia Porcellus*).**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**XIMENA CORTÉS PORTILLO**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JOSÉ LUIS ARREOLA RAMÍREZ**



**Ciudad Universitaria, CDMX, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

<b>DATOS DEL ALUMNO</b>	<b>Cortés Portillo Ximena</b>  <b>5566093562</b>  <b>Universidad Nacional Autónoma De México</b>  <b>Facultad De Ciencias</b>  <b>Biología</b>  <b>311148190</b>
<b>DATOS DEL TUTOR</b>	Dr. José Luis Arreola Ramírez
<b>DATOS DEL SINODAL 1</b>	Dra. Patricia Segura Medina
<b>DATOS DEL SINODAL 2</b>	Dra. Verónica Estela Carbajal Salinas
<b>DATOS DEL SINODAL 3</b>	Dra. María de Lourdes Segura Valdez
<b>DATOS DEL SINODAL 4</b>	Biol. Germán Fernando Gutiérrez Aguilar.
<b>DATOS DEL TRABAJO</b>	<p>“Efectos inmunomodulatorios de las células madre mesenquimales de médula ósea en un modelo de preservación pulmonar en cobayos (<i>Cavia porcellus</i>)”.</p> <p>54 pp.</p> <p>2019</p>



El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Hiperreactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “ISMAEL COSÍO VILLEGAS” ubicado en la Ciudad de México, México.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

---

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de crecer académicamente dentro de sus planteles “Preparatoria No. 5, José Vasconcelos” y “Facultad de Ciencias”. Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” por facilitar el uso de instalaciones y elementos para llevar a cabo esta investigación, la cual forma parte del proyecto “Eficacia en el uso de las células mesenquimales derivadas de médula ósea para el tratamiento de EPOC en modelo de cobaya, cambios leucocitarios y funcionales pulmonares” registrado por el Comité de Investigación y Bioética con el número de protocolo B17-14.

Quisiera, además, agradecer a los integrantes del Departamento de Hiperreactividad Bronquial, en especial a mis tutores y amigos, el Dr. José Luis Arreola Ramírez y el Biol. Jesús Alquicira Mireles: Gracias por su asesoría, tiempo y dedicación, así como por los valiosos consejos en el ámbito científico y personal. Siempre atesoraré los recuerdos que vivimos, en especial esas salidas de campo que a veces parecen tan necesarias ¡Disfruté al máximo mi estancia con ustedes!

A la Dra. Patricia Segura Medina: Gracias por transmitir con tanta pasión su conocimiento e impulsarme a crecer en el ámbito científico es, sin duda, un ejemplo de la mujer que quiero llegar a ser, la admiro mucho.

A la Dra. Verónica Carbajal y a la Biol. Atzallaly Torreblanca: Gracias por proporcionar las células madre mesenquimales indispensables para la elaboración de este proyecto, así como por el tiempo y consejos para pulir mi tesis, lo cual valoro mucho.

Al maestro Germán, por el apoyo en las correcciones y consejos para el día de mi presentación.

A los cobayos: Su aporte a la ciencia es más grande que el de cualquiera de nosotros, gracias.

Finalmente, a mis amigos Eduardo Jasso y Carla López: Gracias por enseñarme que el trabajo es divertido siempre y cuando lo hagas con el equipo correcto. ¡Los amo!

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

---

En mi sentir, los agradecimientos representan el espacio perfecto para decir, con toda sinceridad, que hubiera sido imposible culminar este reto por mi cuenta. Con esto en mente quisiera agradecer principalmente a mis papás, Griselda y José, por apoyar cada una de mis decisiones, gracias por aceptar que la felicidad de su hija viene acompañada de unas botas y una casa de acampar.

Pa', tus canciones estuvieron conmigo en cada viaje, siempre presumo que eres el más auténtico y cool del mundo. Mami, gracias por enseñarme a ser una mujer fuerte e independiente, no sé qué más decir... te debo todo.

A mis hermanos: Paulina, Paola, Roberto, Jorge y por supuesto a mi "cuñadita": Gracias por escucharme hablar de un tema completamente desconocido y con toda la paciencia del mundo, brindarme palabras de ánimo, los valoro mucho. Pau, gracias por ser mi cómplice durante toda la carrera, por reírte conmigo antes de dormir aún en las peores desveladas, por nuestros juegos de "helado" que nos hicieron tan felices y por todos los sábados encerradas en la biblioteca. Eres la mejor alma gemela.

A mis sobrinos: Ariel y Pepito que llegaron a dar felicidad y amor a mi vida. Los amo y siempre trataré de superarme para convertirme en el mejor ejemplo que puedan tener.

A mis amigos, Jacqueline y Antonio: No encuentro las palabras para expresar lo que su amor y apoyo significan para mí. Son, sin duda, lo más preciado que la Universidad me regaló y estoy segura que nuestra historia no ha terminado. Los quiero para toda la vida.

Y por último a Luna, Reinhard y Jasso, ¡Gracias por tanta diversión amigos! Estarán presentes siempre que cuente mis anécdotas favoritas de la Uni, los amo.

**“Por mi raza hablará el espíritu”**

# ÍNDICE

---

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.....	4
AGRADECIMIENTOS PERSONALES.....	5
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS.....	8
ABREVIATURAS .....	10
RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN .....	14
Trasplante de órganos.....	14
Trasplante pulmonar .....	16
<i>Complicaciones</i> .....	18
Preservación.....	19
Daño por Isquemia-Reperusión .....	21
Falla primaria del injerto. ....	24
Respuesta Inflamatoria. ....	25
<i>Sistema inmune innato:</i> .....	25
<i>Sistema inmune adaptativo</i> .....	26
Estrategias para prevenir la Falla primaria del injerto .....	26
Células madre mesenquimales .....	27
Señalización parácrina.....	28
TSG-6 .....	29

JUSTIFICACIÓN .....	31
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVOS.....	32
MATERIAL Y MÉTODO.....	33
Técnica de aislamiento e inmunotipificación de Células madre mesenquimales. ....	33
Animales de estudio .....	33
Instilación de las Células Madre Mesenquimales.....	34
Extracción del bloque cardiopulmonar .....	35
Lavado y preservación pulmonar. ....	36
Pulmón aislado y perfundido. ....	37
Evaluación de mediadores bioquímicos.....	38
Análisis Estadístico .....	39
RESULTADOS.....	39
DISCUSIÓN .....	43
CONCLUSIÓN .....	46
PERSPECTIVAS.....	47
REFERENCIAS .....	48



## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

---

<b>FIGURA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Frecuencia de trasplantes realizados en A) Estados Unidos y B) México.	<b>15</b>
<b>2</b>	Trasplantes de pulmón adultos y pediátricos realizados durante el periodo 1985-2016.	<b>17</b>
<b>3</b>	Mecanismo de lesión en el <b>IRI</b> .	<b>22</b>
<b>4</b>	Formación de ROS en el <b>IRI</b> .	<b>23</b>
<b>5</b>	Radiografía de tórax A) de un paciente con edema pulmonar B) de un paciente sano.	<b>24</b>
<b>6</b>	Morfología de <b>MSC's</b> de médula ósea humana durante el cultivo in vitro. Población homogénea típica de células similares a fibroblastos en el cuarto pasaje.	<b>28</b>
<b>7</b>	Estructura tridimensional de <b>TSG-6</b> .	<b>30</b>
<b>8</b>	Instilación de $5 \times 10^6$ <b>MSC's</b> diluidas en 300 $\mu$ L de medio DMEM vía intratraqueal.	<b>34</b>
<b>9</b>	Esternotomía media para exponer el bloque cardiopulmonar, el pulmón se mantuvo insuflado mediante un ventilador para pequeñas especies para durante todo el proceso de extracción.	<b>35</b>
<b>10</b>	Bloque cardiopulmonar recién obtenido, se muestran las cánulas mediante las cuales se realizó el lavado del lecho pulmonar.	<b>36</b>
<b>11</b>	Corte transversal del corazón a la altura de los ventrículos.	<b>37</b>

<b>12</b>	Bloque cardiopulmonar embebido en <b>SSF</b> y preparado para ser sometido a un proceso de preservación fría	<b>37</b>
<b>13</b>	Bloque cardiopulmonar montando en el Sistema de Pulmón aislado y perfundido	<b>38</b>
<b>CUADRO</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Componentes de distintas soluciones de preservación comúnmente utilizadas en trasplante pulmonar	<b>21</b>
<b>2</b>	Definición de la PGD propuesta por la ISHLT en 2016	<b>24</b>
<b>GRÁFICA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Concentración de <b>TSG-6</b> en Líquido de Perfusión durante una Preservación de 0, 6, 24 horas y posterior tratamiento con <b>MSC's</b> .	<b>40</b>
<b>2</b>	Concentración de <b>IL-1<math>\beta</math></b> en Líquido de Perfusión durante una Preservación de 0, 6, 24 horas y posterior tratamiento con <b>MSC's</b> .	<b>41</b>
<b>3</b>	Concentración de <b>IL-6</b> en Líquido de Perfusión durante una Preservación de 0, 6, 24 horas y posterior tratamiento con <b>MSC's</b> .	<b>42</b>
<b>4</b>	Concentración de <b>TNF-<math>\alpha</math></b> en Líquido de Perfusión durante una Preservación de 0, 6, 24 horas y posterior tratamiento con <b>MSC's</b> .	<b>42</b>

## ABREVIATURAS

SIGLAS	ESPAÑOL	INGLES
ANOVA	Análisis de Varianza	Analysis of variance
ATP	Trifosfato de Adenosina	Adenosine triphosphate
CENATRA	Centro Nacional de Trasplantes	-
CFU	Unidad formadora de colonias	Colony Forming Unity
MSC's	Células madre mesenquimales	Mesenchymal Stem Cells
DAMP's	Patrones moleculares asociados a daño	Damage Associated Molecular Pattern
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	Enzyme linked immunosorbent assay
COPD	Enfermedad Pulmonar obstructiva Crónica	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
ROS	Especies reactivas de oxígeno	Reactive oxygen species
IPF	Fibrosis pulmonar idiopática	Idiopathic Pulmonary Fibrosis
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno	-
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas"	-
IRI	Daño por isquemia-reperfusión	Ischemia Reperfusion Injury
IL-1	Interleucina 1	Interleukin 1

IL-6	Interleucina 6	Interleukin 6
IL-10	Interleucina 10	Interleukin 10
ISHLT	Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón-Pulmón	International Society for Heart & Lung Transplantation
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos	Mitogen Activated Protein Kinases
NF-kB	Factor Nuclear Kappa B	Nuclear Factor-Kappa B
NO	Óxido Nítrico	Nitric Oxide
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Súper óxido	Super oxid
OPTN	Red de obtención y trasplante de órganos	Organ Procurment and Transplantation Network
PGD	Falla primaria del injerto	Primary Graft Dysfunction
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa	Tumoral Necrosis Factor alpha
TSG-6	Factor de necrosis tumoral inducible al gen 6	Tumoral Necrosis Factor alpha Induced Protein 6
UNOS	Red unida para la compartición de órganos	United Network for Organ Sharing
<b>REACTIVOS</b>		
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético	Ethylenediaminetetraacetic acid

FBS	Suero fetal bovino	Fetal Bovine Serum
PBS	Buffer fosfato salino	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehído	-
SSF	Solución Salina Fisiológica	-

## RESUMEN

---

Existen numerosos eventos que impiden la consolidación del trasplante pulmonar en nuestro país, uno de los principales corresponde a que se recurre con frecuencia a métodos de preservación prolongados resultado de imprevistos en los procesos de traslado del órgano y toma de decisiones. Actualmente se sabe que en condiciones de isquemia ocurren una serie de cambios funcionales que durante la reperfusión generan un microambiente de daño caracterizado por la expresión de diversos productos génicos pro-inflamatorios, esta lesión conduce a la generación de falla primaria del injerto, la principal causa de morbilidad y mortalidad post-trasplante, manifestándose con un incremento en la permeabilidad vascular, es decir generación de edema y posible fallo dentro de las primeras 72 horas. En el presente estudio proponemos el uso de Células madre mesenquimales (**MSC's, por sus siglas en inglés**) derivadas de médula ósea como una alternativa que permita atenuar el perfil inflamatorio característico de una preservación prolongada. Se formaron cuatro grupos con una  $n=5$  distribuidos aleatoriamente: “**Control**”, “**Preservado 6 horas**”, “**Preservado 24 horas**”, “**Preservado 24 horas + MSC's**”. Al último grupo se le instiló 5 millones de **MSC's** derivadas de médula ósea vía intratraqueal. Al cabo de un mes se realizó la extracción del bloque cardiopulmonar y se sometieron al periodo isquémico correspondiente utilizando solución salina fisiológica. Finalmente, mediante el modelo de “**Pulmón aislado y perfundido**” se logró obtener el líquido de perfusión para su posterior análisis. La cuantificación de citocinas se llevó a cabo mediante el método de **ELISA** para las pro-inflamatorias (**IL-1 $\beta$** , **IL-6**, **TNF- $\alpha$** ) y anti-inflamatorias (**TSG-6**). Se reportan por primera vez los niveles basales de las citocinas **IL-1 $\beta$** , **TNF- $\alpha$** , **IL-6** y **TSG-6** en diferentes tiempos de preservación en cobayos. Los datos obtenidos indican que las **MSC's** derivadas de médula ósea disminuyen los niveles de citocinas pro-inflamatorias a niveles menores que el “**Grupo Control**” de  $28.9 \pm 0.64$  a  $20.23 \pm 1.08$  pg/mL para el caso de **IL-1 $\beta$** , de  $41.98 \pm 0.99$  a  $34.20 \pm 1.08$  pg/mL para **IL-6** y de  $69.68 \pm 2.22$  a  $41.69 \pm 1.01$  pg/mL para **TNF- $\alpha$** . Respecto a la citocina anti-inflamatoria **TSG-6**, se observó una tendencia al aumento en el grupo con **MSC's**, sin embargo, no se obtuvo una diferencia significativa. Las **MSC's** derivadas de médula ósea modulan significativamente la inflamación, no obstante, para terminar de comprender su inmunomodulación será necesario evaluar otras citocinas anti-inflamatorias, así como realizar alguna técnica de marcaje que permita corroborar su integración al tejido.

## INTRODUCCIÓN

---

### Trasplante de órganos

El trasplante de órganos representa uno de los aportes médicos más relevantes, inicialmente, fue considerado como un “experimento clínico” que gracias a la mejora en aspectos como aceptación cultural, prácticas legales e incremento tecnológico se convirtió en un procedimiento de rutina para pacientes con patologías en etapa terminal [1].

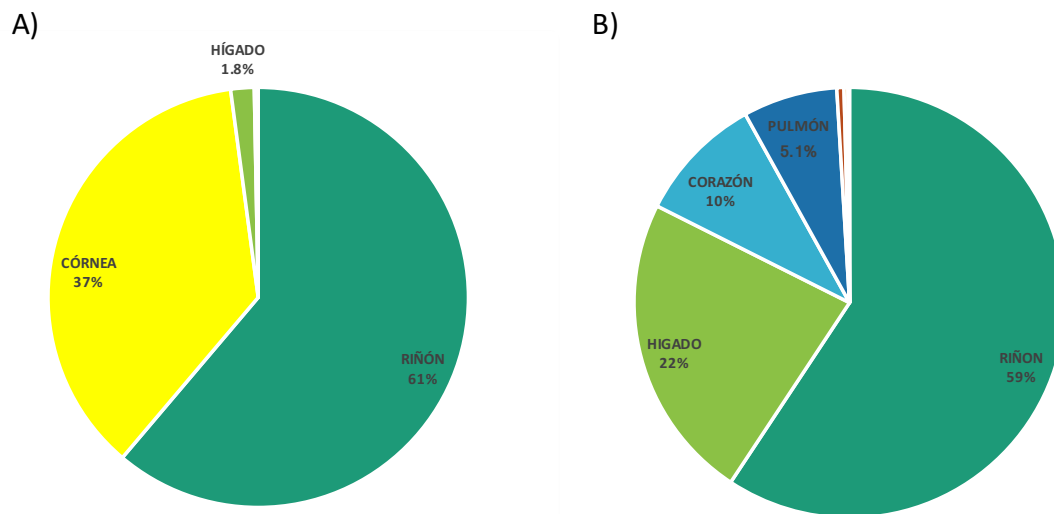
El interés hacia este campo se encuentra evidenciado en representaciones mitológicas de diversas culturas. Un ejemplo corresponde a la quimera descrita por Homero en la *Iliada* o bien en la mitología hindú, donde Shiva concibe un dios con cuerpo humano y cabeza de elefante [1]. No obstante, fue hasta la mitad del siglo XX que el Dr. Joseph E. Murray y col. realizaron el primer trasplante de órgano en humanos. A partir de dicho momento se mostró un progreso evidente, tanto que, para finales del mismo siglo se reportaban intervenciones de piel, hígado, páncreas, corazón y pulmón [2].

Actualmente el trasplante es definido como la acción de trasladar un órgano, tejido o células desde un organismo donador a otro receptor para sustituir en este algo que no es funcional [3]. En México, la Ley General de Salud establece a un donador como aquél individuo que expresó su consentimiento para que, en vida o después morir, su cuerpo o cualquiera de sus componentes fueran utilizados con fines de trasplante a través del **Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA)** [4].

En caso de que la donación sea en vida, se pueden utilizar tejidos que tengan propiedades de regeneración o bien, que su función sea compensada por el organismo, mientras que, en caso de fallecimiento, los injertos a donar dependen exclusivamente del tipo de muerte que

se presente, es decir, en una muerte por paro cardio-respiratorio únicamente se aceptan tejidos como: hueso, piel, córneas, tendones, cartílago y vasos sanguíneos, mientras que, en una muerte de tipo encefálica además de tejidos, se pueden donar órganos como corazón, pulmón, riñón, hígado, intestino y páncreas [5].

Según la base de datos de la **Red unida para compartir órganos (UNOS, por sus siglas en inglés)**, en Estados Unidos, el procedimiento más frecuente corresponde al de riñón, seguido por el hígado, corazón y pulmón [6]. Por el contrario, los tipos de trasplante que predominan en nuestro país no se conocen con certeza debido a que no se cuenta con un registro fiable de número de trasplantes efectuados, no obstante, considerando la lista de espera reportada por el **CENATRA** los más usuales corresponden al de riñón y córnea **(Figura 1, 7)**.



**Figura 1. Frecuencia de trasplantes realizados. A) en Estados Unidos y B) México, obtenido y modificado de UNOS y CENATRA respectivamente [6 y 7].**

Independientemente del órgano a trasplantar, el procedimiento quirúrgico está constituido por las siguientes tres etapas: La extracción, el proceso de preservación (por lo general se



realiza mediante el enfriamiento con una solución específica) y finalmente la implantación en el receptor. Es importante mencionar que la tolerancia isquémica depende de cada órgano. El riñón, por ejemplo, puede almacenarse con seguridad hasta por 24 horas, mientras que otros, como el pulmón exigen tiempos de máximo 8 horas [8] razón por la que, países desarrollados como Estados Unidos y Canadá procuran implantarlos inmediatamente después de su extracción.

### Trasplante pulmonar

Los inicios del trasplante pulmonar se remontan a 1963, cuando el Dr. James Hardy de la Universidad de Mississippi efectuó la técnica a un paciente con carcinoma en el pulmón, mismo que tuvo una sobrevida de 18 días, sin embargo, no fue sino hasta la década de los 80's que el Dr. Joel Cooper de la Universidad de Toronto realizó el primer trasplante de bloque cardiopulmonar con una sobrevida mayor a seis años, marcando así el inicio de una era [9]. Hoy en día, la creación de centros especializados alrededor del mundo ha permitido que este se establezca como tratamiento principal para pacientes con patologías que pueden ser divididas en aquellas de origen obstructivo, tipo intersticial, origen infeccioso crónico y patología vascular [10]. La **Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD, por sus siglas en inglés)** fue por muchos años la principal causa, con aproximadamente un tercio de los procedimientos realizados, sin embargo, actualmente la **Fibrosis pulmonar idiopática (IPF, por sus siglas en inglés)** corresponde a la principal indicación [11].

En el año 2018, La **Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón-Pulmón (ISHLT, por sus siglas en inglés)** registró cerca de 60 mil cirugías comprendidas en el periodo 1985-2016 con un pico máximo de 4661 casos en el último año (**Figura 2, 12**). Respecto a las modalidades clínicamente relevantes, se pueden observar dos: el trasplante bilateral (de

los dos pulmones), seguido del unilateral (un pulmón), no obstante, cabe mencionar que existen otros como el trasplante de un solo lóbulo (trasplante lobar) y el del bloque cardiopulmonar entero (trasplante corazón/pulmón) [10].

## Trasplantes de pulmón (Adultos y pediátricos) Número de trasplantes por tipo de procedimiento y año

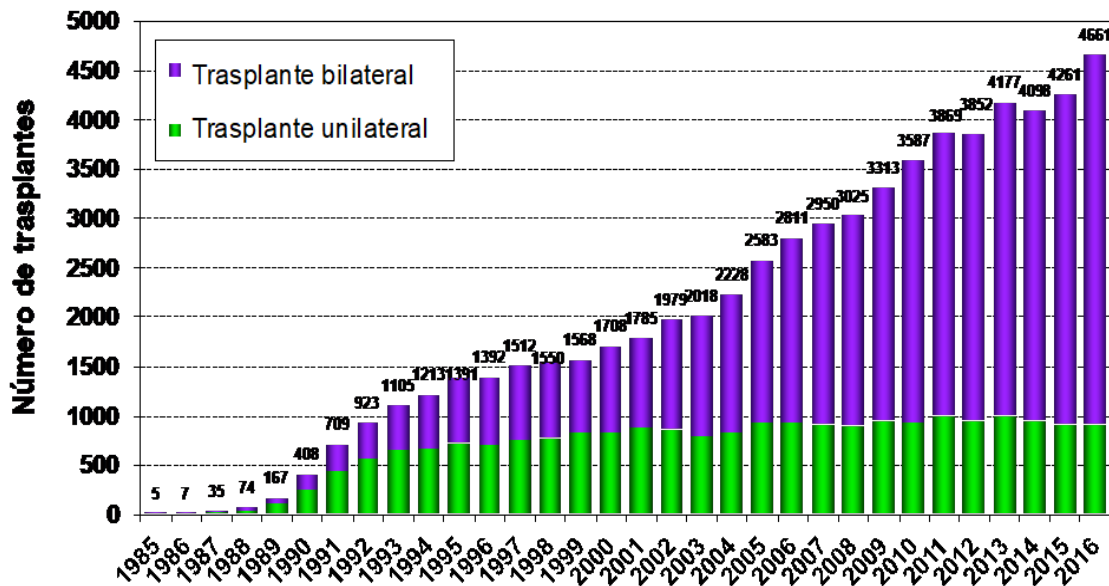


Figura 2. Trasplantes de pulmón, adultos y pediátricos, realizados durante el periodo 1985-2016. Obtenido y modificado de la Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón-Pulmón [12].

En cuanto a México, se han reportado cerca de 36 procedimientos durante el periodo 1989-2018, teniendo lugar en el **Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)**, y en los Centros: “Raza” y “Siglo XXI” del Instituto Mexicano del Seguro Social. El primero fue realizado en 1989 por el Grupo de Trasplante Pulmonar del INER, encabezado por el Dr. Patricio Santillán Doherty y el Dr. Jaime Villalba en un paciente con **IFP**, mismo que

presentó una sobrevida de nueve años, y cuyo deceso se debió a insuficiencia renal crónica [10].

### *Complicaciones*

Como se mencionó anteriormente, la frecuencia del trasplante pulmonar depende del país del que se hable. En Estados Unidos, por ejemplo, la principal complicación corresponde a la creciente lista de espera, donde **UNOS** reporta un total de 1503 pacientes [13], así como a la cantidad de pulmones aptos para cirugía. En México, el **CENATRA** indica existen tres personas en espera del mismo [14]. No obstante, cabe mencionar, que esta diferencia se debe a una incipiente cultura para donación de órganos y no a una ausencia de problemas médicos. En realidad, la mortalidad por **COPD** en nuestro país ha incrementado notoriamente y ocupa entre el cuarto y sexto lugar en la tabla de morbi-mortalidad anual [15]. De acuerdo con un estudio realizado en el **INER**, de 35 donadores potenciales sólo se obtuvieron tres pulmones para trasplante, en parte a que la mayoría de los pacientes no otorgó la autorización para proseguir con la evaluación o bien no contaban con una función pulmonar adecuada [10]. Aunado a esto, el escaso tiempo para la toma de decisiones y traslado del órgano, resultado de la poca tolerancia isquémica del pulmón implica un verdadero reto, particularmente en nuestro país, donde existen únicamente 3 centros especializados concentrados en la capital. Esto incrementa la necesidad de recurrir a procesos de preservación prolongados, mismos que disminuyen la calidad del órgano y ocasionan una lesión inflamatoria post-trasplante severa, conocida como **Daño por isquemia reperfusión (IRI, por sus siglas en inglés)** cuya forma más grave, la **Falla primaria del injerto (PGD, por sus siglas en inglés)** corresponde a la principal causa de mortalidad y morbilidad post-trasplante, manifestándose con un incremento en la

permeabilidad vascular, es decir generación de edema y posible fallo dentro de las primeras 72 horas [16]. A continuación, nos enfocaremos a describir el daño inflamatorio generado durante la preservación y posterior reperfusión del injerto.

## Preservación

La preservación pulmonar tiene por objetivo el mantenimiento de la integridad morfológica y bioquímica del injerto hasta el momento de ser implantado o bien perfundido. Debido al incremento de centros que se especializan en realizar trasplantes, existen parámetros que pueden variar [17]. A continuación, se describen algunos:

- **Tiempo de preservación:** El tiempo de preservación fluctúa entre 4 y 8 horas, sin embargo, varios estudios han demostrado que un tiempo de preservación prolongado resulta en un daño post-operatorio más severo [8].

- **Forma de preservación:** Clínicamente existen dos escenarios; La isquemia ventilada es aquella en la cual el flujo sanguíneo es interrumpido pero la difusión de oxígeno a través del tejido alveolar continua, es decir, el órgano se preserva insuflado para mantener la mayor cantidad de oxígeno disponible, mientras que la isquemia anóxica es aquella en la que el flujo es suspendido totalmente y se preserva sin insuflar [18].

- **Temperatura:** La mayoría de los centros suelen realizarla a 4°C [20] con el fin de disminuir reacciones enzimáticas, oxígeno y otros sustratos requeridos, no obstante, se ha propuesto que temperaturas menores podrían tener efectos benéficos. El desarrollo de nuevos refrigeradores que permiten llegar a un estado de “Súper enfriamiento”, es decir un estado líquido previo al congelamiento, ha permitido observar una mejoría en la viabilidad del injerto después preservar [20]. Por el contrario, otros autores sugieren que mantenerlo con

temperaturas por arriba de los 4°C resultaría más favorable, tal es el caso de aquellos centros que preservan a temperaturas de hasta 10°C [21].

•Elección de soluciones para preservar: Aunque cada una difiere en composición sus objetivos son los mismos: prevenir el edema, retrasar la muerte celular y maximizar el funcionamiento del órgano una vez establecida la perfusión. Se tienen identificadas dos tipos: intracelular y extracelular. Las primeras están caracterizadas por un incremento en la concentración de  $K^+$  y una disminución en la de  $Na^+$ , algunos ejemplos de estas corresponden a “**EuroCollins**” o “**Wisconsin**”. Por el contrario, las extracelulares presentan menores concentraciones de  $K^+$  comparadas con la de  $Na^+$  [Tabla 1,17]. Recientemente se observó que las primeras contribuyen a la producción de **Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés)** y a la generación de espasmos vasculares en el pulmón. Por el contrario, la baja concentración de potasio y la presencia de Dextrano en la Solución “**Perfadex**” parece tener un efecto benéfico pues mantiene la integridad funcional y estructural de células endoteliales lo que conduce a una menor producción de oxidantes y vasoconstrictores. Además, previene la agregación de eritrocitos y mantiene la actividad funcional de la bomba sodio-potasio del epitelio alveolar. Otros autores sugieren que “**Celsior**” proporciona resultados clínicos similares con tendencias adicionales a una mejor sobrevivencia, así como a una menor incidencia de **PGD**, especialmente en periodos de isquemia prolongados [22].

<i>Composición mmol/L</i>	<b>Euro-Collins</b>	<b>Wisconsin</b>	<b>Celsior</b>	<b>Perfadex</b>
	Intracelulares		Extracelulares	
<i>Na</i>	10	28	100	138
<i>K</i>	115	125	15	6
<i>Cl</i>	15	0	41.5	142
<i>Mg</i>	0	0	13	0.8
<i>SO<sub>4</sub></i>	0	4	0	0.8
<i>PO<sub>4</sub></i>	57.5	25	0	0.8
<i>Ca</i>	0	0	0.26	0.3
<i>HCO<sub>3</sub></i>	10	5	0	1
<i>Dextran</i>	0	0	0	50
<i>Glucosa</i>	3.5	0	0	0.9
<i>Rafinosa</i>	0	30	0	0
<i>Lactobionato</i>	0	100	80	0
<i>Glutación</i>	0	3	3	0
<i>Adenosina</i>	0	5	0	0
<i>Alopurinol</i>	0	1	0	0
<i>Pentafracción</i>	0	50	0	0
<i>Glutamato</i>	0	0	20	0
<i>Histidina</i>	0	0	30	0
<i>Manitol</i>	0	0	60	0

**Tabla 1. Componentes de distintas soluciones de preservación comúnmente utilizadas en trasplante pulmonar [17].**

### Daño por Isquemia-Reperfusión

La extracción del órgano donado supone la interrupción del suministro sanguíneo (ISQUEMIA) mismo que se restaura al realizar el trasplante (REPERFUSIÓN) [17]. El IRI se caracteriza por dos fases: La primera, denominada isquemia caliente, incluye el tiempo que pasa desde la interrupción de la circulación del órgano donado hasta el momento en que es embebido en la solución de preservación. La segunda, llamada isquemia fría, es el período que transcurre desde que el órgano es preservado en condiciones de baja temperatura hasta su trasplante en el receptor. Durante la isquemia fría, la ausencia de oxígeno y de nutrientes ocasiona la interrupción de la respiración celular aerobia, lo que conduce a una privación de fosfatos de alta energía como el **Adenosin trifosfato (ATP,**

por sus siglas en inglés) y a la acumulación de productos como ácido láctico. Además, la bomba sodio potasio dependiente de **ATP** queda inoperante y se pierde la regulación de los gradientes iónicos transmembrana. El  $\text{Na}^+$ , por ejemplo, entra a la célula y arrastra consigo un volumen de agua para mantener el equilibrio osmótico con el espacio intersticial del entorno, al mismo tiempo que los iones de  $\text{K}^+$  escapan desde la célula hasta en intersticio, esto desencadena el fallo de membranas celulares y por ende la aparición de edema pulmonar. Por otra parte, existe un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, tanto por la apertura de depósitos intracelulares como por su entrada a través de la membrana, fenómeno que implica la activación de diversas **fosfolipasas** y **finalmente procesos de necrosis o apoptosis celular** (Figura 3, 23).

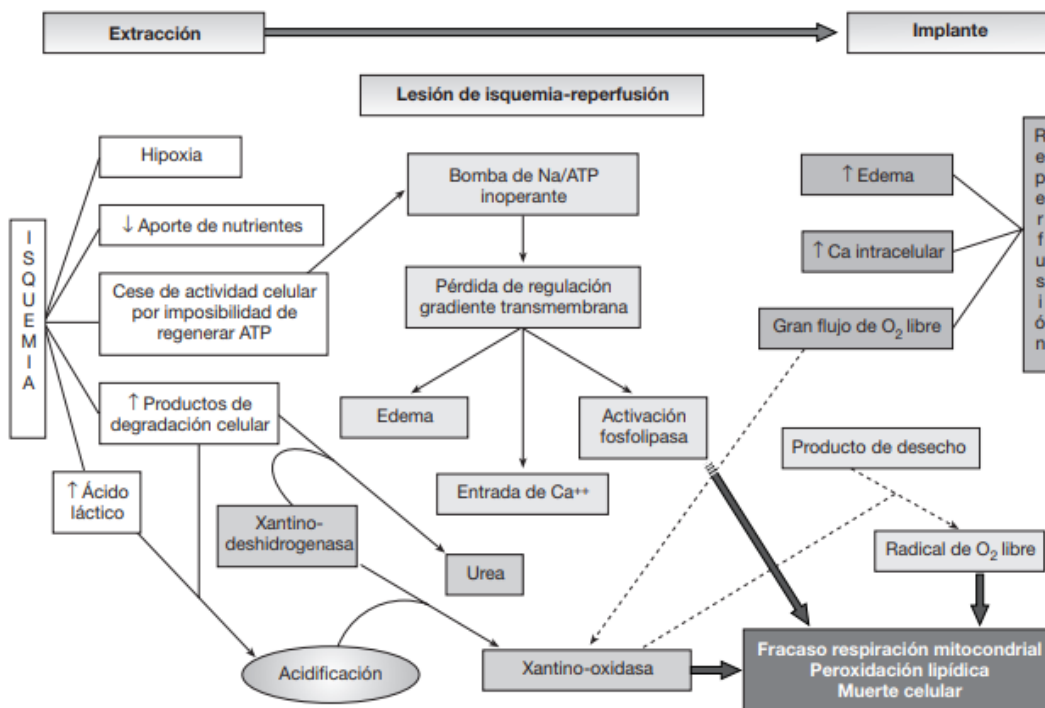


Figura 3. Mecanismo de lesión en el IRI [24].

Por otra parte, la reperfusión o isquemia caliente, está caracterizada por la formación de **ERO's**. La Hipoxantina, un producto del catabolismo del **ATP** acumulado durante la preservación fría, reacciona con el Oxígeno generando **Súper óxido ( $O_2^-$ )**. Por otro lado, la NADPH oxidasa, presente en superficie de membrana de neutrófilos, monocitos y macrófagos, cataliza la reducción del oxígeno en **Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )** y  **$O_2^-$**  (Figura 4, 24).

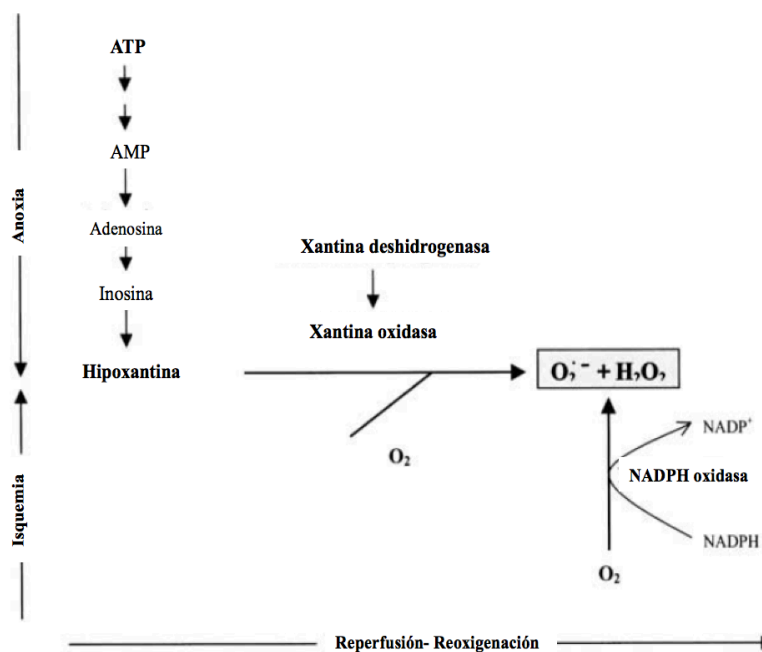


Figura 4. Formación de ROS en el IRI [24].

Además de la formación de estas moléculas, la reperfusión supone su liberación a la circulación sistémica, lo que desencadena una serie de procesos inflamatorios finalmente pueden conducir a generar una **PGD**, por lo que los pacientes requieren ventilación mecánica prolongada y mayor asistencia médica [25].

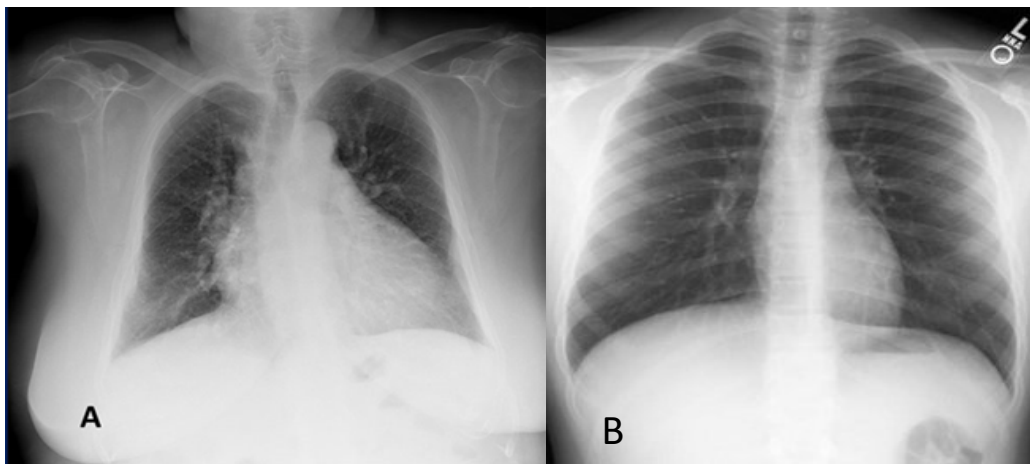


### Falla primaria del injerto.

La **PGD** corresponde a la forma más grave del **IRI** y ocasiona una disminución en la función del pulmón de los pacientes que suele manifestarse dentro de las primeras 72 horas, adicionalmente, se caracteriza por un daño alveolar no específico, edema e hipoxemia, convirtiéndose en la primera causa de morbilidad y mortalidad después de realizar un trasplante donde cerca de 10%-25% la padecen [25]. En 2016, la **ISHLT** publicó que la severidad, es medida por el índice de oxigenación  $PaO_2/FiO_2$ , es decir: presión arterial de oxígeno entre fracción inspirada de oxígeno, después de 6, 24, 48, 72 horas de reperfusión y correlacionada con radiografías de tórax en cada tiempo (**Tabla 2 y Figura 5**). La severidad tipo 2 y 3 se relacionan con un incremento en la tasa de mortalidad a corto y largo plazo [26].

Severidad de la PGD	Índice de oxigenación: $PaO_2/FiO_2$ (mmHg)	Radiografía de torax.
0	Cualquiera.	Normal
1	$>300$	Infiltrados difusos/Edema pulmonar.
2	200-300	Infiltrados difusos/Edema pulmonar.
3	$<200$	Infiltrados difusos/Edema pulmonar.

**Tabla 2. Definición de la PGD propuesta por la ISHLT en 2016 [26].**



**Figura 5. Radiografía de tórax A) de un paciente con edema pulmonar B) de un paciente sano [27].**

Respuesta Inflamatoria.

La respuesta inflamatoria ejercida en el **IRI** se encuentra asociada a la activación del sistema inmune innato y adaptativo.

Sistema inmune innato:

La activación del sistema inmune innato comienza cuando las **ERO's** generadas durante la reperfusión del injerto, promueven que las células epiteliales comiencen a expresar **Patrones moleculares asociados a daño (DAMP's)**, mismos que son reconocidos por los macrófagos residentes del pulmón. Su activación supone la secreción de diversas citocinas pro-inflamatorias mediante las vías de señalización conocidas como **Proteínas cinasas Activadas por Mitogenos (MAPK)** y **Factor nuclear kappa-B (NF-kB)**. Éstas estimulan a las células vecinas para que a su vez produzcan mediadores inflamatorios y se dé el reclutamiento y estimulación de los neutrófilos, generando un microambiente de daño severo [18].

Las citocinas son proteínas que actúan fundamentalmente como reguladores de la respuesta inmunitaria e inflamatoria, pueden ejercer su función a través de un mecanismo autócrino, parácrino o endócrino [28]. Diversos estudios experimentales han demostrado que el **IRI** de órganos sólidos como riñón, hígado y corazón induce la liberación de citocinas inflamatorias que incluyen a **Interleucina 1-β (IL-1β)**, **Interleucina 6 (IL-6)**, **Factor de Necrosis tumoral (TNF-α)** entre otros [18, 24, 28, 29].

El **TNF-α**, es una proteína de 17 kDa, secretada por una amplia variedad de células, incluyendo macrófagos, monocitos, linfocitos, células Natural Killer y neutrófilos. Es inducida por lipopolisacáridos, **IL-1** y factores de crecimiento derivados de plaquetas. Al unirse con sus receptores inicia una cascada de señalización que termina activando diversos

factores de transcripción como **NF-kB**, y Proteínas activadas 1, resultando en la transcripción de distintos mediadores inflamatorios [30].

Por otra parte, **IL-1-β** es una proteína de 15-20 kDa secretada por monocitos, macrófagos, queratinocitos, células endoteliales, neutrófilos, fibroblastos y células del músculo liso, ésta se produce como un precursor inactivo llamado pro **IL-1-β**, el cual responde a un **DAMP** e induce la liberación de la molécula activa, misma que se encuentra implicada en procesos de inflamación y apoptosis [31].

Finalmente, **IL-6** tiene su origen en diversas estirpes celulares, entre las que destacan macrófagos, monocitos, fibroblastos y células endoteliales. Su efecto comienza cuando el receptor de membrana compuesto por dos subunidades denominadas R-IL-6 y gp130 se activan y comienza la transducción de señales, principalmente mediante la vía **Cinasa Janus (JAK, por sus siglas en ingles)** que resulta en la activación del factor de transcripción **STAT** y de **MAPK**, activando genes involucrados en diferenciación, apoptosis y proliferación. [32].

Sistema inmune adaptativo: La activación de las células T durante el proceso de reperfusión ocurre tanto dependiente como independientes de antígeno y son las encargadas de modular la producción de diversas citocinas anti-inflamatorias **como Interleucina 10 (IL-10)** [18].

#### Estrategias para prevenir la Falla primaria del injerto

En la actualidad diversos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en: 1) Optimizar la etapa de preservación pulmonar 2) Expandir los criterios de selección y 3) Reacondicionar el órgano utilizando circuitos de perfusión [8]. El modelo de **“Pulmón aislado y perfundido”** ha ofrecido una alternativa eficaz, pues además de reacondicionar

aquellos pulmones marginales, facilita el uso de fármacos y terapias celulares o génicas que permiten la reparación del tejido antes de la cirugía [33].

El uso de **Células Madre Mesenquimales (MSC's)** ha cobrado gran interés pues se ha demostrado que exhiben efectos inmunomodulatorios, poseen habilidad de diferenciarse en distintas estirpes celulares, migran a sitios de tejido dañado o inflamado, y son posibles efectoras de regeneración [34].

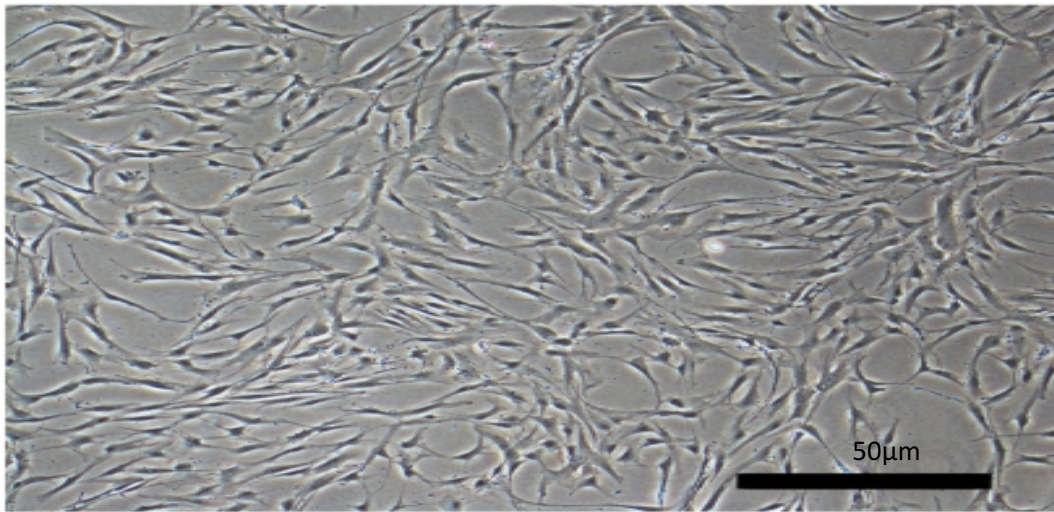
Basándose en los antecedentes de reacondicionamiento de órganos e investigaciones recientes sobre las **MSC's**, Mordant y col. emplearon la técnica de Pulmón aislado y perfundido a un conjunto de pulmones sometidos a 18 horas de preservación, y posteriormente instilaron una dosis de  $50 \times 10^6$  **MSC's** en la arteria pulmonar, demostrando que el tratamiento se asociaba a una disminución de IL-8 en el líquido de perfusión, planteando así un efecto inmunomodulatorio de las **MSC's** durante el **IRI** [35].

#### Células madre mesenquimales

Las **MSC's** son células con capacidad de auto regeneración y diferenciación. Fueron descubiertas en 1970 por Friedenstein y col. a partir de médula ósea y descritas como una población de células no hematopoyéticas, adherentes, con morfología fibroblastoide ó en forma de huso y con capacidad de formar **Unidades Formadoras de Colonia (CFU, por sus siglas en inglés) (Figura 6, 37)**.

Se han logrado aislar a partir de tejidos embrionarios (placenta y cordón umbilical) donde poseen la característica de ser pluripotentes, es decir que pueden diferenciarse en todos los tipos de células que conforman un organismo, y en tejidos adultos (tejido adiposo, cartílago, hueso, piel, músculo, hígado y pulmón) donde se caracterizan por ser multipotentes, y por lo tanto muestran una plasticidad más restringida. Además, se ha

demostrado que las **MSC's** obtenidas a partir de tejido adulto tienen notables ventajas sobre las aisladas a partir de tejidos embrionarios, pues su manipulación resulta más simple, son autólogas y por lo tanto no ocasionan rechazo inmunológico, no presentan limitaciones éticas ni legales y no se encuentra comprobado que produzcan neoplasias [38].



**Figura 6. Morfología de MSC's de médula ósea humana durante el cultivo in vitro. Población homogénea típica de células similares a fibroblastos. Amplificación original 40x. La barra de escala representa 500  $\mu\text{m}$  [37].**

En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular propuso los siguientes criterios mínimos para definir a una **MSC's**: (1) Adherencia al plástico, con la presencia de unidades formadores de colonia, (2) expresión de distintos marcadores de superficie; positivos (CD73, CD90 y CD105) y negativos (CD45, CD34, CD14 o CD11b y CD79 ALPHA o CD19) y (3) potencial de diferenciación osteogénico, condrogénico y adipogénico [34].

#### Señalización parácrina.

Sin importar su origen, las **MSC's** migrantes y residentes son las encargadas de modular la respuesta inflamatoria local y sistémica después del daño, extensos estudios han demostrado que el microambiente generado en una lesión (con diversas citocinas pro-

inflamatorias y moléculas de daño) promueve la atracción y activación de éstas. Anteriormente se creía sus efectos eran ejercidos mediante la integración y posterior especialización en células funcionales, sin embargo, debido a que la mejoría del tejido dañado ocurría instantáneamente no se atribuyó a un proceso de diferenciación celular. Hoy en día, se reconoce que las **MSC's** ejercen sus propiedades inmunomodulatorias mediante señalización parácrina, es decir, a través de la secreción de factores terapéuticos como citocinas anti-inflamatorias (**IL-10**, **TNF- $\alpha$** , **HGF**, **NO**), factores de crecimiento y prostaglandinas [39].

Recientemente se ha descrito que una de las moléculas liberada por las **MSC's** corresponde al **Factor de Necrosis Tumoral Inducible al Gen 6 (TSG-6, por sus siglas en inglés)**. Este es sintetizado en respuesta a distintos mediadores inflamatorios como **TNF- $\alpha$**  e **IL-1 $\beta$**  [40].

#### TSG-6

El **TSG-6** es una proteína de 30-kD, y de unión al receptor celular CD44, hialuronato y proteína de enlace a cartílago. Se expresa constitutivamente en tejidos que tienen una tasa metabólicamente alta (p.e.: el cerebro o los islotes de Langerhans en el páncreas) o en aquellos que proveen una barrera contra el medio ambiente, es decir son constantemente bombardeados con retos antigénicos (pulmón y piel) [41]. Respecto a su composición, se tienen dos dominios bien identificados: LINK y CUB seguido por una secuencia pequeña N-terminal (**Figura 7**). El dominio LINK es el encargado de unir glicosaminoglicanos, como el ácido hialurónico, heparina y heparán sulfato mientras que el dominio CUB es encargado de unir fibronectina. Recientemente se ha descrito que ésta presenta propiedades protectoras para los tejidos, debido a que es capaz de mediar los siguientes efectos anti-

inflamatorios: disminuye la infiltración de neutrófilos en los sitios de inflamación, inhibe la red inflamatoria de proteasas, así como la activación de macrófagos y finalmente al unirse a hialuronato suprime sus efectos inflamatorios. Esto ha ocasionado que se convierta en objeto de estudio para diversos procesos tales como ovulación y desarrollo embrionario [40].

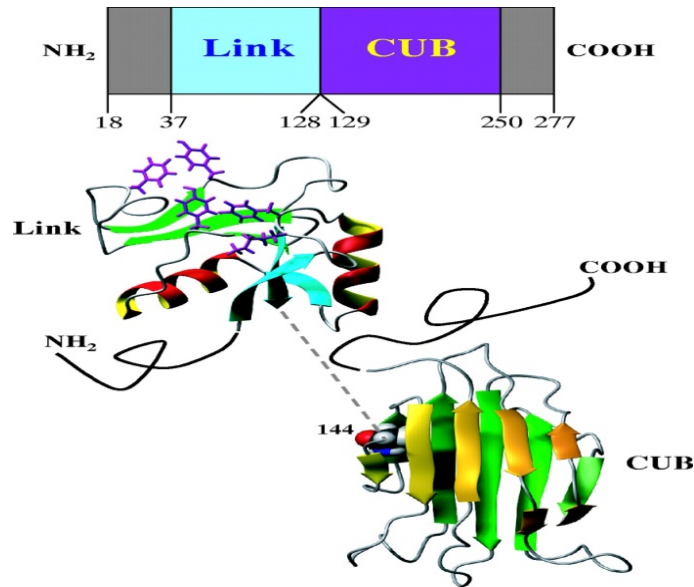


Figura 7. Estructura tridimensional del Factor de Necrosis Tumoral Inducible al Gen 6 [41].

El efecto anti-inflamatorio de esta proteína fue reportado por Prockop y col. de la siguiente manera: Instilaron vía intravenosa una dosis de MSC's en roedores con modelo de infarto cardíaco y posteriormente observaron su migración hacia el pulmón, misma que se relacionó con un fenómeno de regeneración post-infarto. Finalmente examinaron los posibles mediadores responsables de la regeneración identificando una sobre expresión en los niveles de TSG-6 en el pulmón, además notaron que su silenciamiento estaba relacionado con una pérdida de la alternativa terapéutica [42]. El presente trabajo plantea valerse de las propiedades inmunomodulatorias de las MSC's de médula ósea,

principalmente mediante la liberación de TSG-6, para disminuir el **IRI** generado en un periodo de preservación fría prolongado.

## JUSTIFICACIÓN

---

La **PGD** representa una de las complicaciones más comunes del trasplante pulmonar, ésta se asocia con una morbilidad y mortalidad significativas dentro de las primeras 72 horas y se caracteriza por un daño alveolar no específico, edema e hipoxemia. Existen diversas causas relacionadas con su aparición, sin embargo, la más frecuente corresponde al **IRI**, el cual está dado por un incremento de estrés oxidativo, la activación del sistema inmune y la liberación de distintas citocinas de inflamatorias.

En la actualidad, diversos estudios se han enfocado en optimizar la etapa de preservación pulmonar o bien en reacondicionar el órgano utilizando circuitos de perfusión con el fin de expandir el número de pulmones aptos para cirugía. No obstante, se continúan utilizando pulmones con un deterioro severo, principalmente en países donde resulta imposible trasplantar el órgano de manera inmediata y se opta por someter al pulmón a preservaciones prolongadas. En los últimos años, diversos estudios han demostrado que el uso de **MSC's** actúan como inmunomoduladoras en el tratamiento de diversas enfermedades. En consecuencia, resulta interesante explorar si las **MSC's** revierten el perfil inflamatorio generado en el **IRI** durante una preservación pulmonar prolongada.



## HIPÓTESIS

---

La instilación de las **MSC's** ocasiona que exista una modificación en el microambiente pulmonar caracterizado por una disminución de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$ ) y un aumento de la citocina antiinflamatoria (TSG-6) en el líquido de perfusión.

## OBJETIVOS

---

### **Objetivo General**

Determinar el papel inmunomodulatorio de la instilación de **MSC's** en el daño por isquemia-reperfusión en un modelo de preservación pulmonar prolongado.

### **Objetivos particulares**

- Implementar la técnica de Pulmón Aislado y Perfundido con el fin de recuperar el líquido del lecho vascular después de 0, 6 y 24 horas de preservación pulmonar.
- Comparar la expresión de las citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$ ) y antiinflamatorias (TSG-6) en el microambiente pulmonar, en un modelo con y sin **MSC's** mediante la técnica de ELISA.

## MATERIAL Y MÉTODO

---

Técnica de aislamiento e inmunotipificación de Células madre mesenquimales.

Las **MSC's** empleadas en el presente estudio fueron proporcionadas por la Biol. Torreblanca [43], A continuación, se describe brevemente la técnica:

Las **MSC's** fueron aisladas del fémur de cobayos macho de 6 semanas de edad con un peso de 300g en condiciones estériles. Posteriormente las células se cultivaron en Medio de Cultivo Eagle modificado de Dulbecco (**DMEM**) con suero fetal de bovino al 10% y antibióticos. Las **MSC's** que se obtuvieron del tercer pasaje se incubaron con los siguientes anticuerpos: AlexaF-anti-CD29, PerCpCy5.5-anti-CD34, APC/Cy7-anti-CD73, PE/Cy7-anti-CD90, anti-CD44 y anti-CD45 para el análisis de citometría de flujo. Encontrando que **MSC's** expresaron positivamente a los marcadores CD29, CD73, CD90 y CD44 y negativamente los marcadores CD34 y CD45.

### Animales de estudio

Se utilizaron 20 cobayos hembra (*Cavia porcellus*) de 1 a 2 meses de edad con un peso entre 500 y 700 gramos, los cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio bajo un ambiente controlado de temperatura ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), humedad (50-70%), cama estéril y ciclos de luz oscuridad (12:12) con un régimen de alimentación y agua *ad libitum*. Los animales se manejaron de acuerdo a los Lineamientos de la Ley General de Salud de México, a la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio y bajo el protocolo (B17-14) aprobado por el Comité de Investigación, Bioética y Bioseguridad del **INER**.

Se formaron 4 grupos con una n=5 distribuidos de manera aleatoria:

- **Grupo 1: “Control”**
- **Grupo 2: “Preservado 6 horas”**
- **Grupo 3: “Preservado 24 horas”**
- **Grupo 4: “Preservado 24 horas + MSC’s”.**

#### Instilación de las Células Madre Mesenquimales

La instilación de **MSC’s**, se efectuó únicamente a cobayos del grupo experimental.

Se comenzó por anestesiarse a los animales con Pentobarbital sódico (28 mg/Kg i.p, Pisabental®, Pfizer) para posteriormente realizar una pequeña incisión a la altura de la tráquea que permitió aplicar una dosis de  $5 \times 10^6$  células diluidas en 300  $\mu$ L de medio (**Figura 8**), después de la aplicación se procedió a suturar la herida. Finalmente se realizaron los cuidados postoperatorios necesarios para la obtención del bloque cardiopulmonar a los 30 días de la cirugía.



**Figura 8.** Instilación de  $5 \times 10^6$  MSC's diluidas en 300  $\mu$ L de DMEM vía intratraqueal.

## Extracción del bloque cardiopulmonar

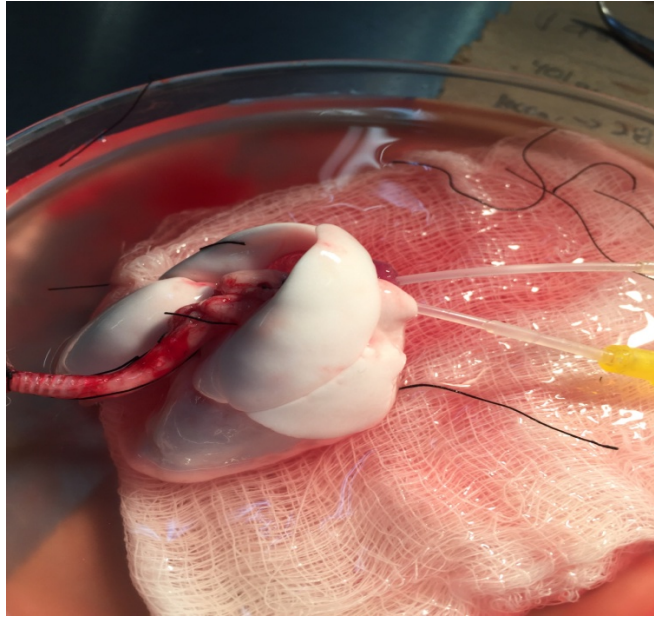
La extracción del bloque cardiopulmonar se realizó a todos los grupos de cobayos.

Cada animal fue anestesiado antes de ser sometido a cirugía, la cual dio inicio con la exposición y canulación de la tráquea para ventilar mecánicamente el pulmón (Starling, Harvard Apparatus, Holliston, MA).

El bloque cardiopulmonar se expuso mediante una esternotomía media (**Figura 9**) que permitió obtener 2 muestras de sangre de 5 mL cada una directamente del ventrículo izquierdo del corazón, las cuales se almacenaron para su uso en posteriores estudios. En seguida, se inyectó heparina (1000 UI) (Rimbipar/ Rimsa) en el ventrículo derecho para evitar la coagulación de la sangre, finalmente y sin dañar el tejido, se removió el bloque de la cavidad torácica (**Figura 10**).



**Figura 9.** Esternotomía media para exponer el bloque cardiopulmonar, el pulmón se mantuvo insuflado mediante un ventilador para pequeñas especies para durante todo el proceso de extracción.

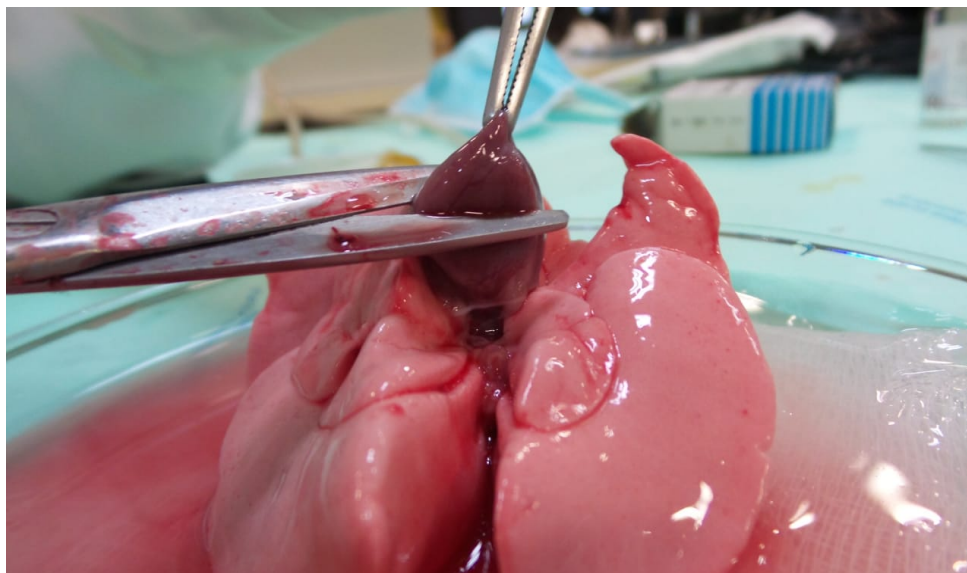


**Figura 10. Bloque cardiopulmoar recién obtenido, se muestran las cánulas mediante las cuales se realizó el lavado del lecho pulmonar.**

#### Lavado y preservación pulmonar.

El lavado del lecho vascular se llevó a cabo realizando un corte transversal a la altura de los ventrículos del corazón, para colocar dos cánulas: una de ellas en la arteria pulmonar y la otra en la aurícula izquierda pasando por el orificio atrio ventricular correspondiente (**Figura 11**). La eliminación de la sangre se llevó a cabo mediante una infusión anterógrada con 100-150 mL de **Solución salina fisiológica (SSF, NaCl al 0.9%)** a través de la cánula pulmonar y a una presión constante de 20 cmH<sub>2</sub>O generada mediante la elevación a 20 cm de altura del reservorio con la solución [44].

Al finalizar el lavado, se pinzó la cánula de la tráquea para asegurar que el lecho vascular mantuviera dicha solución, se obtuvo el peso del bloque cardiopulmoar y finalmente se sumergió en un recipiente con **SSF (Figura 12)**. La preservación se realizó a 4°C por 6 y 24 horas, a excepción del “**Grupo control**”, en el cual el líquido de perfusión se colectó inmediatamente después de la extracción para su posterior análisis.



**Figura 11. Corte transversal del corazón a la altura de los ventrículos.**



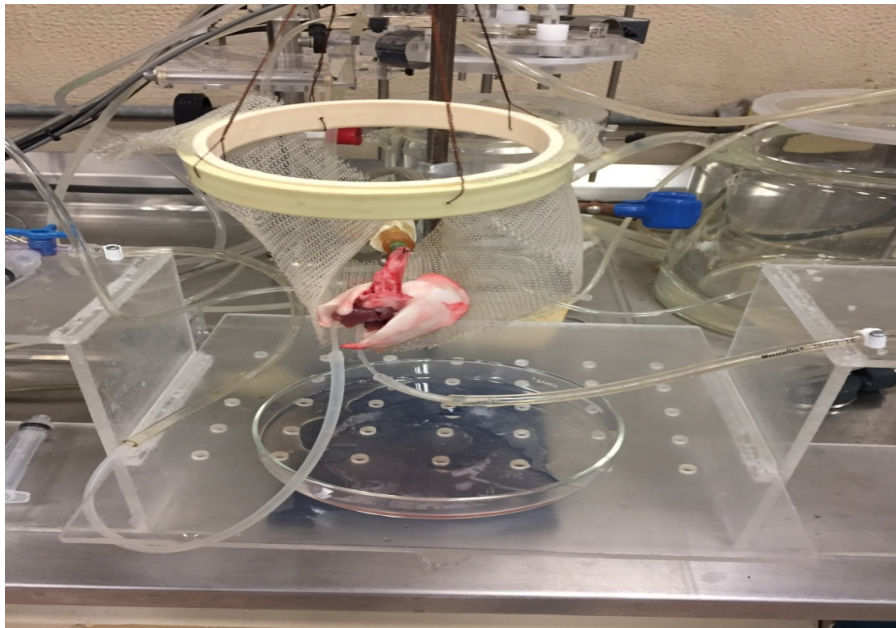
**Figura 12. Bloque cardiopulmonar embebido en SSF y preparado para ser sometido a un proceso de preservación fría**

Pulmón aislado y perfundido.

Después de transcurrir el tiempo de preservación correspondiente, el bloque cardiopulmonar se conectó a un circuito de perfusión re-circulatorio (**Figura 13**)

constituido por una bomba peristáltica de circulación (NY-7550-62 Materflex, Barrington, IL), un indicador de flujo de perfusión, un termostato y una trampa de burbujas, así mismo se montó una hamaca hecha con malla de Marlex® colgada de un transductor de fuerza tensil (FT03, Grass Instruments, Co., Boston, MA).

Se perfundió a un flujo constante de 40 mL/min/Kg haciendo pasar solución artificial de perfusión Krebs-Ringer-bicarbonato, constituida por (g/L): 3.450 NaCl, 1 Glucosa, 0.1789 KCl, 0.447 CaCl<sub>2</sub>, 0.1479 MgSO<sub>4</sub>, 0.08345 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 2.1 NaHCO<sub>3</sub>, y con un pH en intervalos fisiológicos (pH 7.3-7.4) con el fin de desplazar el líquido contenido en el lecho vascular resultante de la preservación. Una vez recolectado se almacenó a -80°C para su posterior análisis.



**Figura 13. Bloque cardiopulmonar montando en el Sistema de Pulmón aislado y perfundido**

Evaluación de mediadores bioquímicos.

Las muestras de tejido, líquido de perfusión y suero se cuantificaron mediante kits comerciales de **Ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés)** de la marca MyBioSource® con los siguientes números de catálogo: Guinea pig

Interleukin-1 $\beta$  (No. MBS726312), Guinea pig Interleukin-6 (No. MBS044586), Guinea pig Interleukin-10 (No. MBS727032), Cavy Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  (No. MBS9303082) y Guinea pig Hyaluronate Binding protein (No. MBS732995). La preparación de reactivos y muestras se efectuó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener densidades ópticas, se utilizó un lector de microplaca Biotel (Módulo Synergy HT) a 450 nm. Posteriormente se obtuvieron las concentraciones mediante el programa Curve Expert® versión 1.4. A todos los datos obtenidos se les calculó el promedio  $\pm$  el **error estándar (e.e)** de la media para finalmente realizar una comparación estadística entre los diferentes grupos.

#### Análisis Estadístico

En análisis estadístico se efectuó utilizando el software **INERSTAT-a v1.7b**, mediante el cual se determinó la diferencia entre los grupos por **Análisis de varianza (ANOVA)**, seguido de una prueba de Tukey para evaluar la diferencia entre dos grupos. Los datos fueron expresados como **promedio  $\pm$  error estándar**. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de  $p < 0.05$  o  $p < 0.01$ .

## RESULTADOS

---

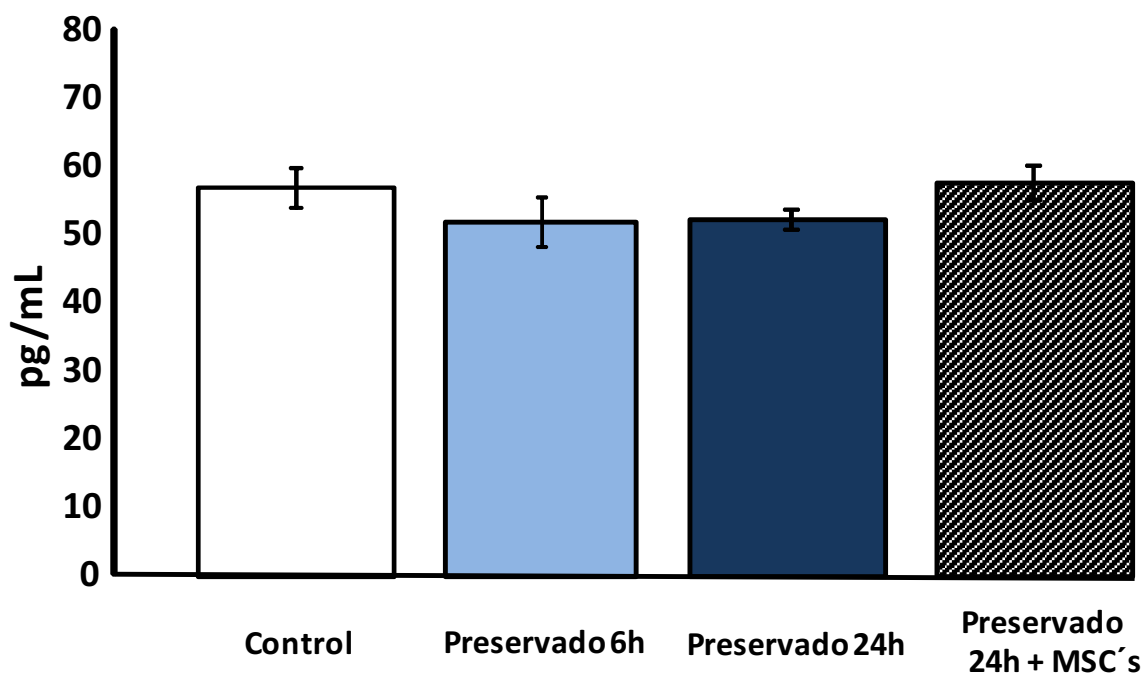
Con el propósito de comprender la inmunomodulación ejercida por las **MSC's** de médula ósea en un modelo de preservación pulmonar prolongada, se realizaron **ELISAS** que permitieron cuantificar los niveles de citocinas inflamatorias (**IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$** ) y anti-inflamatorias (**TSG-6**) a nivel local. Para lograr identificar la efectividad de la propuesta se efectuaron una serie de comparaciones entre 1) Pulmones “control”, es decir, que no fueron



sometidos a un proceso de preservación 2) Pulmones preservados por 6 horas 3) Pulmones preservados por 24 horas y 4) Pulmones preservados por 24 horas y tratados con MSC's.

A pesar de que no se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones locales de TSG-6 (Gráfica 1), se puede apreciar lo siguiente: existe cierta expresión en aquellos grupos que no fueron sometidos a terapia (**Control, Preservados 6 y 24 horas**), así como un ligero aumento en el grupo tratado con MSC's y un restablecimiento en el nivel de expresión entre el grupo "**24 horas + MSC's**" y los pulmones del grupo "**Control**".

### Niveles de TSG-6 en Líquido de Perfusión



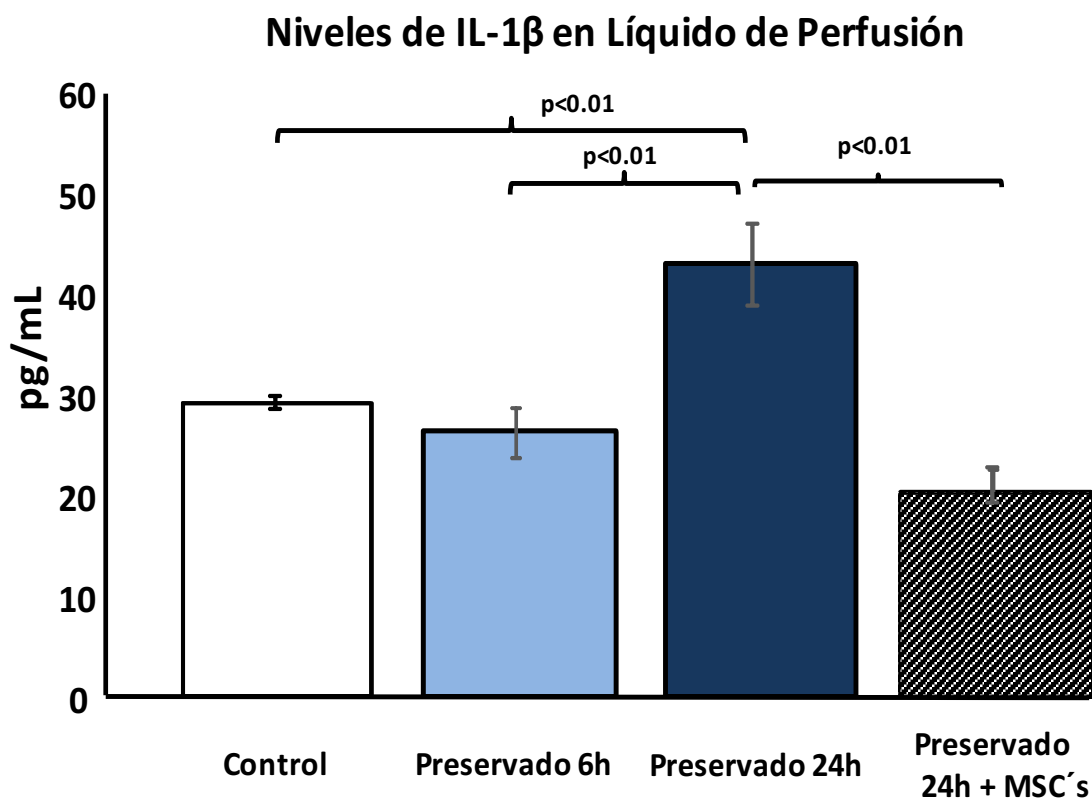
Gráfica 1. Cuantificación de TSG-6 en Líquido de Perfusión de los distintos grupos. No se obtuvo significancia.

Para el caso de la IL-1 $\beta$  (Gráfica 2) podemos observar un incremento en la Preservación de 24 horas, mismo, que no se percibe al recibir el tratamiento con MSC's ( $p < 0.01$ , Prueba Tukey). Por otro lado, se observa una diferencia significativa entre: "**Preservados 6**

horas”- “Preservado 24 horas” y “Sin preservar” – “Preservado 24 horas” ( $p < 0.01$ , Prueba Tukey).

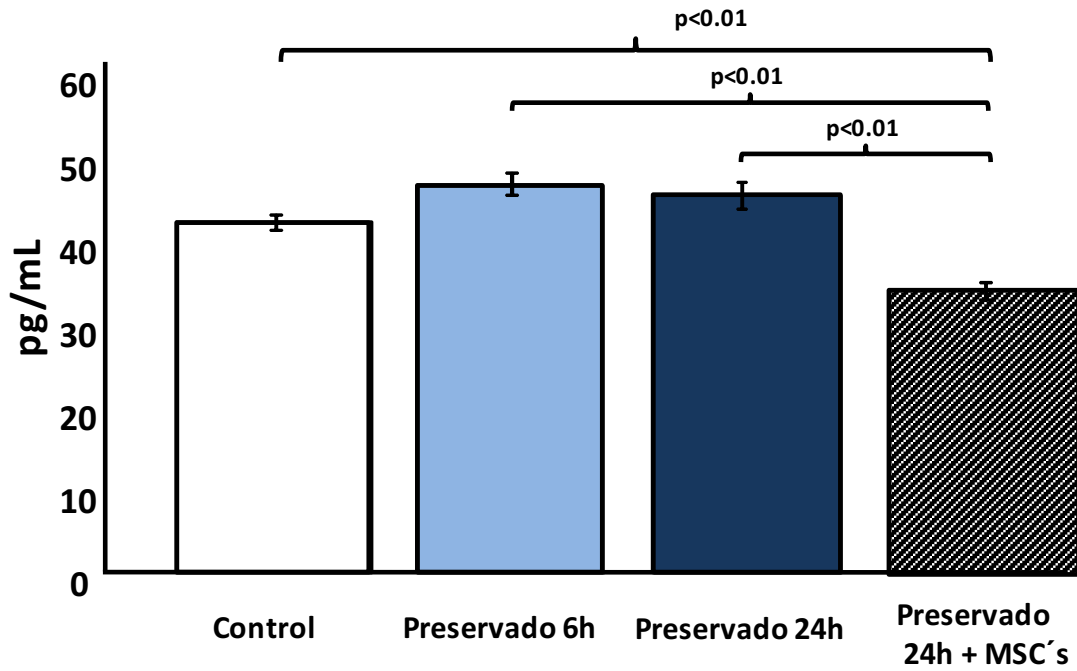
Respecto a las concentraciones locales de **IL-6** (Gráfica 3) observamos que en el grupo sometido al tratamiento con **MSC's** disminuyeron los niveles de expresión comparando con los obtenidos mediante una Preservación de 0, 6 y 24 horas ( $p < 0.01$ , Prueba Tukey).

Finalmente, se observa una disminución de **TNF- $\alpha$**  (Gráfica 4) tras ser sometida al tratamiento con **MSC's** sin embargo para este caso podemos identificar también una sobreexpresión durante la preservación frecuente.



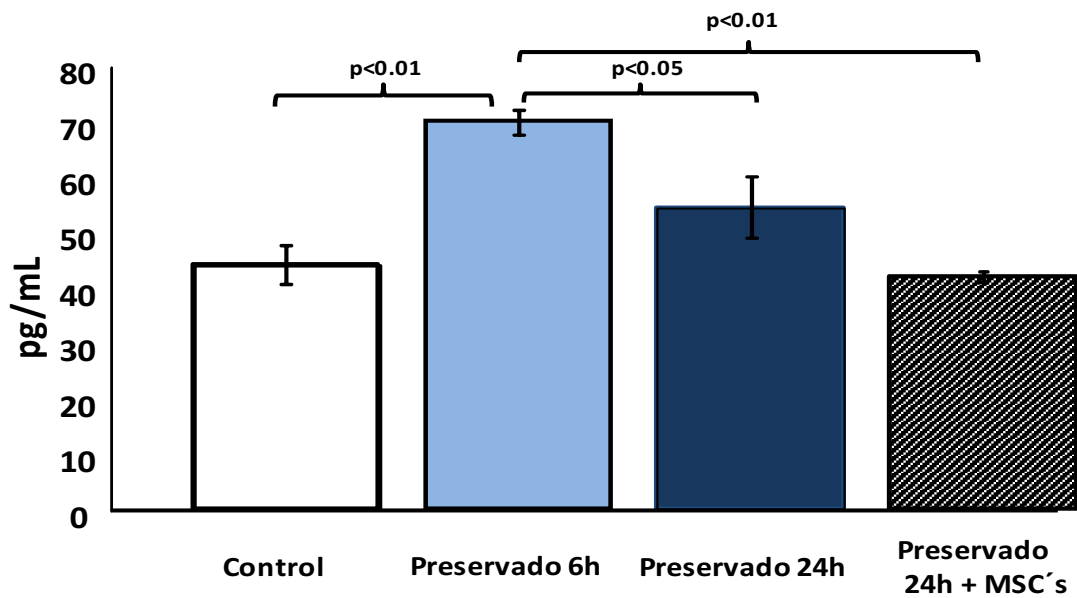
Gráfica 2. Cuantificación de IL-1 $\beta$  en Líquido de Perfusión de los distintos grupos. Se obtuvieron diferencias significativas de  $p < 0.01$  mediante una Prueba Tukey.

### Niveles de IL-6 en Líquido de Perfusión



Gráfica 3. Cuantificación de IL-6 en Líquido de Perfusión de los distintos grupos. Se obtuvieron diferencias significativas de  $p<0.01$  mediante una Prueba de Tukey.

### Niveles de TNF- $\alpha$ en Líquido de Perfusión



Gráfica 4. Cuantificación de TNF- $\alpha$  en Líquido de Perfusión de los distintos grupos. Se obtuvieron diferencias significativas de  $p<0.01$  y  $p<0.05$  mediante una Prueba de Tukey.

## DISCUSIÓN

---

Además de la incipiente cultura para donación que existe en nuestro país, el aumento en tiempos de preservación, producto de la demora en toma de decisiones y traslado del órgano, supone un verdadero reto. Actualmente se sabe que en condiciones de isquemia prolongada ocurren una serie de cambios funcionales que al ser re-perfundidos generan un microambiente de daño caracterizado por la expresión de diversos productos génicos pro-inflamatorios, esto conduce a la generación de **PGD**, la primera causa de morbilidad-mortalidad post trasplante, manifestándose con un incremento en la permeabilidad vascular, es decir generación de edema y posible fallo pulmonar dentro de las primeras 72 horas [24].

En consecuencia, se evaluó el uso de **MSC's** derivadas de médula ósea como posibles agentes atenuantes del perfil inflamatorio generado durante una preservación pulmonar de 24 horas.

Un hallazgo de gran importancia supone el haber descrito por primera vez los niveles de las citocinas **TNF- $\alpha$** , **IL-1 $\beta$** , **IL-6** y **TSG-6** para los diferentes modelos de preservación pulmonar en cobayos: “**Control**”, “**Preservado 6 horas**”, “**Preservado 24 horas**” y “**Preservado 24 horas + MSC's**”, estos datos preliminares podrían sentar la base para otras propuestas que tengan por objetivo atenuar el daño inflamatorio por isquemia-reperfusión y por ende aminorar la **PGD**.

En relación con el microambiente de daño presente en los diferentes modelos de preservación se comienza por analizar los niveles de **TNF- $\alpha$** . Esta citocina muestra un incremento abrupto en el grupo “Preservado 6 horas”, mismo que no ocurre cuando el pulmón es sometido a una preservación de 24 horas, lo que podría explicarse de la siguiente manera: **TNF- $\alpha$**  representa una interleucina fundamental para la respuesta inmune ante

lesiones pues es la encargada de exacerbar el daño en el tejido. Según Barros de Oliveira y col. posteriormente al procedimiento quirúrgico, al trauma o durante las infecciones este mediador es liberado inmediatamente después de la respuesta inflamatoria, lo que podría suponer su disminución después de 24 horas de preservación, más no su desaparición [45].

Por otro lado, se aprecia que la expresión de **IL-1 $\beta$**  se mantiene durante una preservación de 6 horas, pero incrementa después de una prolongada lo que concuerda con lo descrito en la literatura “a mayor tiempo de preservación, mayor daño”. En 2017, Anders y col. reportaron que los pulmones a donar se caracterizaban por un perfil inflamatorio severo y que al bloquear la vía de señalización de **IL-1 $\beta$** , disminuía la activación de las células del endotelio resultando en una menor incidencia de presentar **PGD**, razón por la que la propusieron como un biomarcador de daño [46].

Continuando con la citocina **IL-6**, se muestran niveles similares en ambos tipos de preservación (frecuente y prolongada), de acuerdo con Gebhard y col. esta citocina es un marcador de daño temprano, es decir su pico máximo de expresión se da entre las 4 y 6 horas después de la lesión [47], por lo que sorprenden los resultados obtenidos, especialmente en la preservación de 24 horas. Es importante mencionar que existen estudios que reportan a esta citocina como “inflamatoria” o bien “anti-inflamatoria” según el microambiente en donde se presente [32].

En cuanto a **TSG-6** podemos manifestar que no se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo con **MSC's** y las distintas preservaciones analizadas, no obstante cabe aclarar que a nivel local existen **MSC's** endógenas, así como células del sistema inmune (macrófagos alveolares) capaces de producirla, siempre y cuando existan mediadores inflamatorios presentes [48] como los característicos del **IRI**, razón por la cual, se observa

cierta expresión en aquellos grupos a los que no se les administró la terapia. Por otro lado, existe una tendencia al aumento en el grupo “**Preservado 24 horas + MSC’s**” comparado con los grupos “**Preservado 6 horas**” y “**Preservado 24 horas**”, llegando a niveles parecidos a los obtenidos para el grupo “**Sin preservar**”, es decir nuestra terapia ocasiona que los niveles de esta proteína semejen los obtenidos en un escenario en el cual se cuenta con una estructura pulmonar íntegra que le permite regular la inflamación, además se observa claramente una disminución en los niveles de interleucinas pro-inflamatorias **a niveles menores o similares que el Grupo de pulmones “Sin preservar”**, este fenómeno es explicado en parte a 1) la sinergia de los efectos inmunomodulatorios de las **MSC’s** residentes e instiladas, 2) a su unión al receptor CD44 presente en la superficie de macrófagos alveolares, de manera tal, que disminuyen la señalización por **NF-κB**, modulando así la fase inicial de la respuesta inflamatoria [49], 3) a su capacidad para direccionar la actividad de los macrófagos haciendo que estos cambien de un perfil inflamatorio (M1) a uno anti-inflamatorio (M2) este último caracterizado por la expresión de la citocina **IL-10** [50] y finalmente 4) mediante la supresión de células del sistema inmune innato como las Natural killer. Es importante mencionar, que además de las Natural killer, las **MSC’s** tienen la habilidad de interactuar con otras células del sistema inmune, incluidas: células B, células T, células dendríticas, neutrófilos y macrófagos [48]. Dentro de estas, los macrófagos alveolares parecen estar jugando un rol importante en el presente estudio.

Además, cabe hacer mención que, para todos los casos, se observó la expresión de citocinas inflamatorias en el grupo “**Sin preservar**”, esto se explica de la siguiente manera: aún a expensas del daño por preservación, la extracción del órgano *per se* ocasiona una

interrupción del flujo sanguíneo, misma que genera una lesión por hipoxia, que si bien es mínima (pues no se mantuvo), al ser re-perfundido genera un perfil inflamatorio.

Para terminar de comprender la inmunomodulación de las **MSC's** en el modelo de preservación pulmonar prolongada será necesario evaluar otras citocinas anti-inflamatorias que pudieran explicar el mecanismo por el cual se está disminuyendo el perfil inflamatorio, así como realizar alguna técnica de marcaje de las **MSC's** que permita corroborar su integración al tejido.

## CONCLUSIÓN

---

- Se reportan por primera vez los niveles basales de las citocinas **IL-1 $\beta$** , **TNF- $\alpha$** , **IL-6** y **TSG-6** en diferentes modelos de preservación en cobayos.
- La preservación pulmonar prolongada y la reperfusión mediante el modelo de “Pulmón aislado y perfundido” inducen la expresión de citocinas pro-inflamatorias como: **IL-1 $\beta$** , **TNF- $\alpha$**  e **IL-6**, que disminuyen a niveles menores o similares que el “**Grupo Control**” cuando se utiliza una terapia con **MSC's** derivadas de médula ósea.
- La instilación de **MSC's** derivadas de médula ósea, promueve una tendencia al aumento en los niveles de **TSG-6** en comparación a los grupos “**Preservado 6 horas**” y “**Preservado 24**” horas, así como una expresión similar al “**Grupo Control**” sin embargo, se necesita evaluar otras citocinas antiinflamatorias que pudieran explicar los cambios inmunomodulatorios durante el experimento

## PERSPECTIVAS

---

- Comprobar la integración de las **MSC's**, mediante la Técnica de Hibridación *in situ* Fluorescente (**FISH, por sus siglas en inglés**).
- Identificar la expresión de otras citocinas anti-inflamatorias.
- Incluir cortes histológicos y conteo celular.ç



## REFERENCIAS

---

1. Linden, P. K. (2009). History of solid organ transplantation and organ donation. *Critical care clinics*. 25(1), 165-184.
2. U.S. Department of health & human services. (2019). Organ Procurement and transplantation network: Lung transplantation history. Recuperado de <https://optn.transplant.hrsa.gov/learn/about-transplantation/history/>
3. Real Academia Española. (2019). Definición de “trasplantar”. Recuperado de <http://dle.rae.es/?id=aUCgEj0>
4. Ley general de salud. (2019). Título décimo cuarto: Donación, trasplantes y pérdida de la vida. Recuperado de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/index-t14.htm>
5. Centro Nacional de Trasplantes. (2019). Preguntas más frecuentes de donación y trasplante de órganos y tejidos. Recuperado de [http://www.cenatra.salud.gob.mx/descargas/index/preguntas\\_frecuentes.pdf](http://www.cenatra.salud.gob.mx/descargas/index/preguntas_frecuentes.pdf)
6. United Network for Organ Sharing. (2019). Transplant trends. Recuperado de <https://unos.org/data/transplant-trends/>
7. Centro Nacional de Trasplantes. (2016). Boletín Estadístico-Informativo. Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/210302/CENATRA\\_Bolet\\_n\\_2016\\_10Abril2017\\_FINAL.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/210302/CENATRA_Bolet_n_2016_10Abril2017_FINAL.pdf)
8. Guilbert, E. E., Petrenko, A. Y., Balaban, C. L., Somov, A. Y., Rodriguez, J. V., & Fuller, B. J. (2011). Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 38(2), 125-142.

9. García-Covarrubias, L., Salerno, T. A., Panos, A. L., & Pham, S. M. (2007). Estado actual del trasplante pulmonar. *Gaceta médica de México*. 143(4), 323-332.
10. Santillán-Doherty, P., Jasso-Victoria, R., Olmos-Zúñiga, R., Sotres-Vega, A., Argote-Greene, L. M., Tattersfield, T. E., & Villalba-Caloca, J. (2005). Trasplante de pulmón. *Revista de investigación clínica*. 57(2), 350-357.
11. Kotloff, R. M., & Thabut, G. (2011). Lung transplantation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 184(2), 159-171.
12. International Society of Heart and Lung Transplantation. (2017). Overall Lung Transplantation Statistics. *The Journal of heart and lung transplantation*. 35(10), 1149-1205
13. United Network for Organ Sharing. (2017). Waiting list by organ type. Recuperado de [https://unos.org/data/transplant-trends/#waitlists\\_by\\_organ](https://unos.org/data/transplant-trends/#waitlists_by_organ)
14. Centro Nacional de Trasplantes. (2018). Boletín Estadístico-Informativo. Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/391370/BEICENATRA\\_Vol\\_III\\_No\\_1\\_FINAL\\_17SEP-18.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/391370/BEICENATRA_Vol_III_No_1_FINAL_17SEP-18.pdf)
15. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. (2017). Clínica de EPOC. Recuperado de <http://www.iner.salud.gob.mx/interna/tabaquismo-clinEPOC.html>
16. Shaver, C. M., & Ware, L. B. (2017). Primary graft dysfunction: pathophysiology to guide new preventive therapies. *Expert review of respiratory medicine*. 11(2), 119-128.
17. Padilla, A. M., & Padilla, J. D. (2004). Lung preservation: current practices. *Archivos de Bronconeumología*. 40(2), 86-93.

18. Weyker, P. D., Webb, C. A., Kiamanesh, D., & Flynn, B. C. (2013). Lung ischemia reperfusion injury: a bench-to-bedside review. *Seminars in cardiothoracic and vascular*. 17(1), 28-43
19. Medeiros, I. L., Pêgo-Fernandes, P. M., Mariani, A. W., Fernandes, F. G., Unterpertinger, F. V., Canzian, M., & Jatene, F. B. (2012). Comparison of lung preservation solutions in human lungs using an ex vivo lung perfusion experimental model. *Clinics*. 67(9), 1101-1106.
20. Bruinsma, B. G., Berendsen, T. A., Izamis, M. L., Yeh, H., Yarmush, M. L., & Uygun, K. (2015). Supercooling preservation and transplantation of the rat liver. *Nature protocols*, 10(3), 484.
21. Franco, K. L., & Putnam, J. B. (2005). *Advanced therapy in thoracic surgery*. PMPH-USA. pp329
22. Mohamed, M. S. (2016). A cocktail solution for the *ex vivo* preservation and perfusion of the lung; Shehata solution. *Transplant Open*. (1), 1-3.
23. Escalante Cobo, J. L., & Gallegos, R. (2009). Preservación de órganos. *Medicina intensiva*. 33(6), 282-292.
24. De Perrot, M., Liu, M., Waddell, T. K., & Keshavjee, S. (2003). Ischemia–reperfusion–induced lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 167(4), 490-511.
25. Altun, G. T., Arslantas, M. K., & Cinel, I. (2015). Primary graft dysfunction after lung transplantation. *Turkish journal of anaesthesiology and reanimation*. 43(6), 418.
26. Snell, G. I., Yusen, R. D., Weill, D., Strueber, M., Garrity, E., Reed, A., & Budev, M. (2017). Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft

- Dysfunction, part I: Definition and grading, A 2016 consensus group statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 36(10), 1097-1103.
27. Cardiofamilia. 2019. Vacularización pulmonar. Recuperado de <https://www.cardiofamilia.org/clinica-insuficiencia-cardiaca/pruebas-complementarias/vascularizacion-pulmonar/hipertension-venocapilar.html>
28. Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. M. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Medicina integral: Medicina preventiva y asistencial en atención primaria de la salud*. 39(2), 63-71.
29. Tian, W., Liu, Y., Zhang, B., Dai, X., Li, G., Li, X., Zhang, Z., Du, C., & Wang, H. (2015). Infusion of mesenchymal stem cells protects lung transplants from cold ischemia-reperfusion injury in mice. *Lung*. 193(1), 85-95.
30. Malaviya, R., Laskin, J.D., & Laskin, D.L. (2017). Anti-TNF- $\alpha$  Therapy in Inflammatory Lung Diseases. *Pharmacology and Therapeutics*. 180(1), 90-98.
31. Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & growth factor reviews*. 22(4), 189-195.
32. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles IL-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical journal*. 374(1), 1-20.
33. Tane, S., Noda, K., & Shigemura, N. (2017). Ex vivo lung perfusion: a key tool for translational science in the lungs. *Chest*. 151(6), 1220-1228.
34. Huber-Lang, M., Wiegner, R., Lampl, L., & Brenner, R. E. (2016). Mesenchymal Stem Cells after Polytrauma: Actor and Target. *Stem cells international*. (2016), 6289825.

35. Mordant, P., Nakajima, D., Kalaf, R., Iskender, I., Maahs, L., Behrens, P., & Liu, M. (2016). Mesenchymal stem cell treatment is associated with decreased perfusate concentration of interleukin-8 during ex vivo perfusion of donor lungs after 18-hour preservation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 35(10), 1245-1254.
36. Savukinas, U. B., Enes, S. R., Sjöland, A. A., & Westergren-Thorsson, G. (2016). Concise Review: The Bystander Effect: Mesenchymal Stem Cell-Mediated Lung Repair. *Stem Cells*. 34(6), 1437-1444.
37. Kundrotas, G., Gasperskaja, E., Slapsyte, G., Gudleviciene, Z., Krasko, J., Stumbryte, A., & Liudkeviciene, R. (2016). Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget*. 7(10), 10788.
38. Mata-Miranda, M., Vázquez-Zapién, G. J., & Sánchez-Monroy, V. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y reproducción humana*. 27(3), 194-199.
39. Roemeling-van Rhijn, M., Weimar, W., & Hoogduijn, M. J. (2012). Mesenchymal stem cells: application for solid-organ transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 17(1), 55-62.
40. Lee, R. H., Yu, J. M., Foskett, A. M., Peltier, G., Reneau, J. C., Bazhanov, N., Oh, J. Y., & Prockop, D. J. (2014). TSG-6 as a biomarker to predict efficacy of human mesenchymal stem/progenitor cells (hMSCs) in modulating sterile inflammation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(47), 16766-16771.
41. Day, A. J., & Milner, C. M. (2018). TSG-6: a multifunctional protein with anti-inflammatory and tissue-protective properties. *Matrix Biology*. (2018)

42. Lee, R. H., Pulin, A. A., Seo, M. J., Kota, D. J., Ylostalo, J., Larson, B. L., Semprun-Prieto, L., Delafontaine, P., & Prockop, D. J. (2009). Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell*. 5(1), 54-63.
43. Torreblanca-Roa, A. (2018). *Las células madre mesenquimales de médula ósea modifican los parámetros pletismográficos en un modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en cobayos hembra*. UNAM. México
44. Alquicira, J.M. (2013). Participación de la serotonina en los cambios de permeabilidad vascular en la preservación pulmonar en conejo. UNAM. México
45. Oliveira, C. M. B. D., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Cytokines and pain. *Revista brasileira de anestesiología*. 61(2), 260-265.
46. Andreasson, A. S., Borthwick, L. A., Gillespie, C., Jiwa, K., Scott, J., Henderson, P., & Fildes, J. E. (2017). The role of interleukin-1 $\beta$  as a predictive biomarker and potential therapeutic target during clinical ex vivo lung perfusion. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 36(9), 985-995.
47. Gebhard, F., Pfetsch, H., Steinbach, G., Strecker, W., Kinzl, L., & Brückner, U. B. (2000). Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans?. *Archives of surgery*. 135(3), 291-295
48. Wang, M., Yuan, Q., & Xie, L. (2018). Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: Properties and clinical application. *Stem cells international*, 2018.
49. Lee, R. H., Pulin, A. A., Seo, M. J., Kota, D. J., Ylostalo, J., Larson, B. L., ... & Prockop, D. J. (2009). Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice

because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell*. 5(1), 54-63.

50. Carty, F., Mahon, B. P., & English, K. (2017). The influence of macrophages on mesenchymal stromal cell therapy: passive or aggressive agents?. *Clinical & Experimental Immunology*. 188(1), 1-11.