



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR
EN UN MODELO DE PRESERVACIÓN PULMONAR
PROLONGADO TRATADO CON CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA**

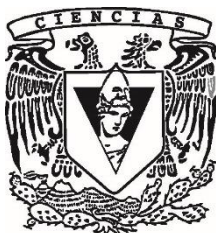
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

EDUARDO ARTURO JASSO SÁNCHEZ



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

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 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.



**INSTITUTO NACIONAL
DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS**
ISMAEL COSÍO VILLEGAS

1. Datos del alumno

Jasso
Sánchez
Eduardo Arturo
5545603033
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311211467

2. Datos de tutor

Dr.
José Luis
Arreola
Ramírez

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Patricia
Segura
Medina

4. Datos del sinodal 2

Biol.
Jesús
Alquicira
Mireles

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Verónica Estela
Carbajal
Salinas

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Jorge Antonio
García
Álvarez

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de la permeabilidad vascular en un modelo de preservación pulmonar prolongado tratado con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea
48 p.
2019

Agradecimientos

Las palabras que busco no existen, pues mis agradecimientos hacia los cobayos no tienen comparación, ya que de ellos fue tomado lo más importante “su vida”. Gracias por permitirme desarrollar este proyecto que estoy seguro ayudará a muchas personas.

Agradezco principalmente a mis padres *Eduardo* y *Yadira* por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; todos mis logros se los debo a ustedes incluyendo este. Ustedes me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos, no sé si hubiera podido lograrlo sin ustedes. Aún no soy como la increíble persona que si son ustedes, pero me seguiré esforzando para serlo. Los dos son mis más grandes Héroes.

Agradezco a mis hermanos Michel y Fiorga Jasso, por estar siempre conmigo apoyándome y diciéndome “estas bien tonto” jaja, fueron mi principal motivación siempre he querido ser como ustedes. Asimismo, agradezco a mis abuelos Fausto, Ana, Leticia y Eduardo (grandes historias he contado de ti), por su incondicional amor y cariño que me han tenido y al resto de mis primos y familia que, aunque no sean mencionados, siempre estarán en mis pensamientos. Y por supuesto agradezco a mi bebé hermoso Michel Eduardo, por mostrarme que con una sonrisa puedes la vida es más sencilla, estoy seguro que cuando crezcas y sepas leer te enorgullecerás de tu tío.

Agradezco ampliamente a mis profesores y amigos Dr. Jesús Luis Arreola, Biol. Jesús Alquicira y Dr. Patricia Segura, por brindarme la oportunidad de trabajar y aprender muchísimo de ustedes, por las interminables risas que teníamos aun trabajando y por la inmensa paciencia que me tuvieron para guiarme durante toda la estancia que estuvimos juntos. Sé que en un futuro estaremos trabajando en conjunto. Asimismo, agradezco a la Dr. Verónica Carbajal, por los consejos brindados que me servirán para toda la vida. Agradezco también a todo el equipo del laboratorio, en serio que me hicieron la vida más sencilla.

También agradezco a Ariadna González, por estar siempre conmigo, apoyarme, comprenderme, tolerarme, hacer que este proceso fuera más fácil y rápido y sobre todo por su amor incondicional, estoy seguro que pronto los dos seremos grandes y exitosos profesionistas, nunca olvidaré todo lo que has hecho por mí. También agradezco a mis extraordinarios e incondicionales amigos (hermanos por elección) Reinhard y Luna, que con ustedes nunca faltó una buena charla, un buen viaje, una buena cerveza y una excelente amistad. Ustedes tres me han transformado la vida. También agradezco a Zyan porque se unió a nuestras vidas para darle más diversión y aventura.

A mis amigas y compañeras de aventuras Carlita y Xi, porque no existiera tesis si ustedes no hubieran estado conmigo hicimos el trío perfecto, nadie mejor que nosotros. Gracias Xi por tu amistad que me has brindado desde hace ya cuatro años y faltan muchas más aventuras, no hay palabras para expresarlo.

Gracias a mi perrito King, quien nos abandonó en el proceso, pero estoy seguro que vamos a volver a coincidir. Y gracias a mi entrañable amigo Oscar Téllez con quien crecí, me formé y de quien tanto aprendí, siempre estaremos juntos. En general ¡Gracias a todos!

Índice

Abreviaturas.....	6
Resumen	7
Introducción.....	8
Trasplante pulmonar	8
Complicaciones del Trasplante Pulmonar	11
Isquemia-reperusión (I/R)	11
Falla Primaria del Injerto	13
Preservación Pulmonar	15
Células Madre Mesenquimales (MSCs).....	20
MSCs en el pulmón	24
Justificación	26
Hipótesis	26
Objetivos.....	27
Objetivo General.....	27
Objetivos particulares	27
Material y Método	27
Animales de estudio	27
Diseño Experimental	28
Instilación de BM-MSCs en la tráquea de Cobayo	29
Extracción del bloque cardiopulmonar.....	31
Lavado y preservación pulmonar	32
Pulmón Aislado y perfundido (PAP).....	33
Medición del coeficiente de filtración capilar (mKf,c)	34
Análisis Estadístico	36
Resultados.....	36
Efectos de la preservación prolongada sobre la permeabilidad vascular	36
Efecto de las BM-MSCs sobre la permeabilidad vascular durante 6 y 24 horas	38
Discusión	40
Conclusiones.....	43
Perspectivas	43
Referencias	44

Abreviaturas

Siglas	En español	En ingles
CMA	Célula Madre Adulta	-
CMH-II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II	-
MSCs	Célula Madre Mesenquimal	Mesenchymal Stem Cells
BM-MSCs	Célula Madre Mesenquimal derivada de médula ósea	Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
FPI	Falla Primaria del Injerto	-
EC	Solución Euro-Collins	-
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno	-
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	-
HGF	Factor Estimulante de Hepatocitos	Hepatocyte Growth Factor
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias	-
I/R	Isquemia/ Reperfusión	-
ISCT	Sociedad Internacional para la Terapia Celular	International Society for Cellular Therapy
ISHLT	Sociedad Internacional para el Trasplante de Corazón y Pulmón	International Society for Heart & Lung Transplantation
MMP-9	Metaloproteinasa de Matriz -9	-
mKf,c	Medición del Coeficiente de Filtración Capilar	-
ON	Óxido Nítrico	-
PAP	Pulmón Aislado y Perfundido	-
Pa	Presión arterial	-
PaO₂	Presión Parcial de Oxígeno arterial	-
Pc	Presión capilar	-
PEEP	Presión Positiva al final de la Expiración	Positive End-Expiratory Pressure
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares	-
Pv	Presión Venosa	-
UNOS	Red Unida para la Compartición de Órganos	United Network for Organ Sharing
UW	Solución Universidad de Wisconsin	University of Wisconsin Solution

Resumen

Introducción: El trasplante pulmonar representa uno de los adelantos más significativos para la medicina actual, constituyéndose como una opción terapéutica bien definida para pacientes que presentan patologías en fase terminal, sin embargo, a pesar de su factibilidad, el 10 al 30% desarrollan Falla Primaria del Injerto (FPI), una complicación vascular que se caracteriza por la disrupción de la barrera alveolo-capilar resultando en generación de edema pulmonar dentro de las primeras 72 horas, estableciéndose, como la principal causa de mortalidad post-trasplante. En la actualidad, se han ideado numerosas estrategias para disminuir la incidencia de FPI, sin embargo, no existe hasta el momento un método 100% eficaz. **Objetivo:** En el presente se evaluó el uso de Células Madre Mesenquimales (MSCs) derivadas de médula para mitigar el daño celular y estabilizar la barrera endotelial después de 6 y 24 horas durante la preservación y evitar el desarrollo de FPI. **Metodología:** Se extrajo el bloque cardiopulmonar de 30 cobayos hembra, los cuales se distribuyeron de manera aleatoria en 5 grupos (n=6): Control, Preservados 6 horas Con y Sin MSCs (previamente obtenidas de médula ósea e instiladas por vía intratraqueal) así como, Preservados 24 horas Con y Sin MSCs. En el grupo Control el coeficiente de filtración capilar (mKf,c) se evaluó inmediatamente después de extraído el bloque cardiopulmonar, en los demás se preservó a 4°C por 6 y 24 horas respectivamente. **Resultados:** En este trabajo encontramos que los pulmones preservados a las 24 horas hubo un incremento de la permeabilidad vascular notable con respecto al grupo Control $p < 0.01$, sin embargo, los pulmones preservados por 6 horas, aunque la permeabilidad vascular era significativamente mayor con respecto al Control, no se observó la generación de edema pulmonar. Por otro lado, cuando los pulmones fueron preservados a 6 y 24 horas en presencia de MSCs los valores de mKf,c disminuyeron hasta un 60.73 % respectivamente. **Conclusión:** La aplicación de MSCs durante la preservación pulmonar a 6 y a las 24 horas, estabilizó la permeabilidad vascular atenuando significativamente la generación de edema pulmonar. evitando el posible desarrollo de FPI. La terapia regenerativa con MSCs podría ser utilizadas para incrementar la viabilidad del pulmón con fines de trasplante, no obstante, son necesarios más estudios para dilucidar su mecanismo en el proceso de preservación.

Introducción

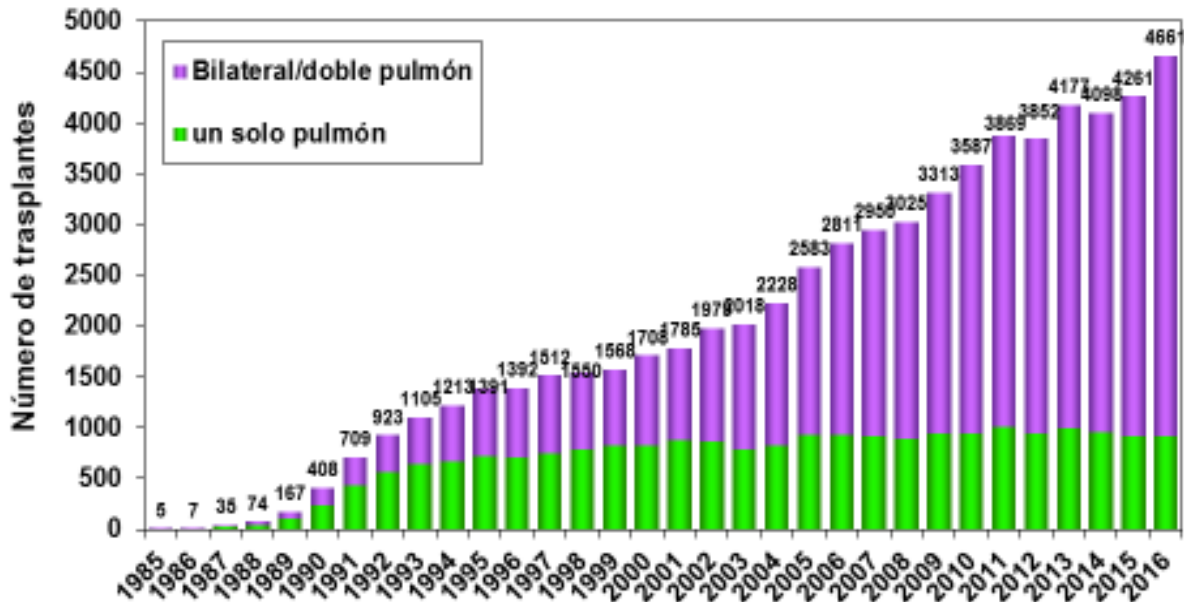
Trasplante pulmonar

El trasplante de órganos es a menudo el único tratamiento efectivo para pacientes con órganos que ya no cumplen con sus funciones básicas, convirtiéndose desde la segunda mitad del siglo XX hasta la actualidad, en uno de los progresos más significativos de la medicina, constituyéndose como una alternativa terapéutica efectiva [1]. La base de datos en la Red Unida para la Compartición de Órganos (UNOS por sus siglas en inglés *United Network for Organ Sharing*) reporta más de medio millón de trasplantes realizados desde 1988 hasta diciembre del 2017, sin embargo, a pesar del claro incremento en la actividad de trasplantes, el número de pacientes en lista de espera se ha incrementado notablemente. [2].

En 1954, se realizó satisfactoriamente el primer trasplante de órgano en humano, llevado a cabo por el Dr. Joseph E. Murray y colaboradores [3]. Para el año 1963 Hardy y compañía habían realizado el primer alotrasplante pulmonar, con una sobrevivencia exitosa de 18 días. Hoy en día se han realizado 67, 260 trasplantes pulmonares hasta junio de 2017 de acuerdo con la Sociedad Internacional para el Trasplante de Corazón y Pulmón (ISHLT por sus siglas en inglés *The International Society for Heart & Lung Transplantation*) [4] (*Gráfica 1*). Sin embargo, no fue sino hasta 1983 cuando se logró el primer trasplante cardiopulmonar exitoso en un paciente con una sobrevivencia mayor a seis años [5], durante este año se iniciaría la era del trasplante pulmonar. En México el primer trasplante pulmonar fue realizado en 1989 en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), se llevó a cabo por el Dr. Patricio Santillán, y el Dr. Jaime Villalba, en un paciente con fibrosis pulmonar, quien sobrevivió 9 años [6]. El Centro Nacional de Trasplantes en México,

(CENATRA) con su reporte más actual, indica que solo se han realizado 22 trasplante de pulmón y en el 2018 solo había tres personas en lista de espera del mismo [6].

Número de trasplantes por año y tipo de procedimiento



Gráfica 1. Registro del número de trasplantes de pulmón desde 1985 hasta 2016 dividido en trasplante bilateral (dos pulmones) y un solo pulmón [88].

Al menos el 50% de los trasplantes pulmonares son realizados debido a La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), mientras que la Fibrosis Pulmonar Idiopática, se encuentra en segundo lugar a nivel mundial [7].

En la actualidad existen cuatro modalidades de trasplante de pulmón: Trasplante unilateral (un solo pulmón), trasplante bilateral doble o secuencial (ambos pulmones), trasplante corazón-pulmón (todo el bloque cardiopulmonar), así como el trasplante lobar (un solo lóbulo pulmonar) que aún está en fase experimental. Aunque el trasplante unilateral fue el primero en realizarse, las últimas dos décadas el trasplante bilateral igualó y superó en frecuencia a dicho tipo de trasplante [8] *ver grafica 1*.

A pesar de los increíbles avances desde que se realizó el primer trasplante pulmonar existen diversos criterios generales que deben cumplirse para el donador y receptor de pulmón [9] (*Tabla 1*).

Tabla 1. Criterios generales para la selección de donadores y receptores de pulmón [8].

Criterios para Donador	Criterios para Receptor	
<ul style="list-style-type: none"> • Edad <55 años • Compatibilidad ABO • Radiografía de tórax (ausencia de infiltrado alveolares o intersticiales) • PaO₂ > 300 mmHg a una FiO₂ 1.0 y PEEP 5 cm H₂O • Ausencia de trauma torácico • Ausencia de patología pulmonar concurrente • Broncoscopia normal sin evidencia de salida de material gastrointestinal o secreciones purulentas • Tinción Gram de esputo sin microorganismos • Ausencia de antecedentes de cirugía torácica • Índice tabáquico < 20 paquetes/año 	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad pulmonar terminal • Esperanza de vida estimada no mayor a 12-18 meses • Ausencia de enfermedades sistémicas acompañantes • Ausencia de enfermedad coronaria significativa • Apego favorable al tratamiento • Estabilidad psicológica sin adicciones • Paciente ambulatorio con oxígeno según necesidad • Sin necesidad de terapia a base de esteroides 	
	<p>Trasplante unilateral:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Edad <65 años • Sin enfermedad pulmonar crónica infecciosa • Enfermedad pulmonar obstructiva (enfisema), restrictiva (fibrosis pulmonar) o vascular 	<p>Trasplante bilateral:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Edad <55 años • Enfermedad pulmonar crónica infecciosa • Enfermedad pulmonar obstructiva o vascular

Nota: Compatibilidad al antígeno al grupo sanguíneo tipo A, B y 0 (ABO); Presión arterial de Oxígeno (PaO₂); Fracción inspirada de Oxígeno (FiO₂); Presión Positiva al Final de la Expiración (PEEP).

Complicaciones del Trasplante Pulmonar

El trasplante pulmonar como alternativa terapéutica no se encuentra exento de complicaciones, en México uno de los problemas es la procuración del pulmón, falta de donadores, ausencia en la cultura sobre donación de órganos, poca investigación en nuestro medio que limita el número de pulmones disponibles, aunado a los pocos métodos clínicos eficaces, para mantener viable el pulmón, restringido a un tiempo corto en donde rara vez excede las seis horas a pesar de utilizar soluciones especialmente diseñadas para dicho propósito. Finalmente, las causas de mortalidad postrasplante se relacionan a la Falla Primaria del Injerto (FPI), secundaria al daño por Isquemia Reperusión (I/R) [10].

Isquemia-reperusión (I/R)

Isquemia es la disminución o interrupción de la circulación sanguínea a través de las arterias en una determinada zona, interrumpiendo el aporte de oxígeno al órgano dicho período hipóxico provoca alteraciones en el potencial de membrana, así como la distribución de iones, incrementando el volumen intracelular, permitiendo que la membrana pierda fluidez y se desorganice el citoesqueleto. Al mismo tiempo se agotan las reservas energéticas, disminuye la producción de algunos agentes bioactivos como la prostaciclina o el óxido nítrico (NO), y se incrementan otros como la endotelina o el tromboxano produciendo cambios en el endotelio [11].

El período de isquemia se divide en dos, isquemia caliente e isquemia fría, la primera incluye el tiempo transcurrido desde que se interrumpe la circulación del órgano hasta el momento de reperusión, la segunda es el período que transcurre un órgano preservado en estado hipotérmico hasta su trasplante en el receptor [12]. Es importante señalar que, a diferencia de otros órganos sólidos en donde el estado de isquemia se corresponde con un

estado de anoxia, el pulmón necesita la presencia de oxígeno intraalveolar (isquemia oxigenada) para mantener su metabolismo durante la preservación [13]. Aunque el pulmón se beneficia de la insuflación con oxígeno, se ha demostrado que la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) también ocurre durante la isquemia [14].

La reperfusión, que es la recuperación del flujo sanguíneo a través de las arterias, nuevas lesiones pulmonares son causadas, provocando un mayor deterioro estructural y funcional. Es evidente que no habría lesiones por reperfusión si no hubiera lesiones por isquemia [15], es decir, la lesión celular y orgánica que comienza a producirse en la fase de isquemia se incrementa en la reperfusión exacerbando los cambios estructurales. En el caso del pulmón, las estructuras blanco del daño por reperfusión son fundamentalmente las células endoteliales, los neumocitos tipo I y II [16]. El edema intersticial y alveolar, así como la congestión vascular difusa y hemorragia intra-alveolar, aparecen dentro de los primeros 5 minutos después de la reperfusión. A las 24 horas el endotelio vascular presenta pérdida de conexión intracelular, ruptura de la continuidad de la membrana alveolocapilar, presentado numerosos espacios [17]. Por tanto, la I/R es un factor importante de morbilidad temprana, después de realizar el trasplante pulmonar [18]. Dicho daño aparece usualmente dentro de las primeras 72 horas post-trasplante, afectando al sistema de intercambio gaseoso y circulación pulmonar, lo que contribuye a una inmediata falla del injerto o pérdida de la función. [19].

Numerosos estudios han indicado que la I/R causa un daño progresivo al injerto pulmonar, en gran parte, al provocar varias reacciones inflamatorias por la liberación de EROs que incluyen al radical super óxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno monoatómico (O) [20]. De tal forma que, en la I/R la producción de EROs se incrementan durante la hipoxia, los cambios metabólicos van a

conducir a un desbalance en su producción y eliminación. Por otro lado, en la reperfusión una enzima llamada xantina-oxidasa, genera O_2 debido a su acción metabólica, este aporte es relativamente inocuo, pero al reaccionar con H_2O_2 se forma el radical $OH\cdot$ y oxígeno monoatómico que son EROs altamente reactivas y peligrosas capaces de causar daño e incluso muerte celular por ataque oxidativo al DNA provocando pérdida en su estructura normal, afectando a las proteínas e induciendo inactivación enzimática, y debido a la peroxidación lipídica, se genera una ruptura de las membranas así como inactivación de los sistemas enzimáticos ligados a membranas, [21,22]. La lesión celular induce activación de neutrófilos y macrófagos, que constituyen el eje central de la respuesta inflamatoria, secuestro leucocitario, agregación plaquetaria e infiltración celular, estableciendo un círculo vicioso lesivo, dicha respuesta provoca un aumento de la permeabilidad vascular originando en el tejido FPI [23].

Si bien, los cambios morfológicos estructurales tardan en aparecer, se inicia toda una serie de fenómenos inflamatorios en los que están implicados múltiples mediadores, los cuales, al interactuar derivan en una lesión por reperfusión [13].

Falla Primaria del Injerto

Debido a la gran diversidad terminológica y la ambigüedad que se genera en relación con Falla Primaria del Injerto, la ISHLT desarrolló en 2005 un documento de consenso sobre los criterios diagnósticos. En él se estableció la definición de FPI como: “edema pulmonar no cardiogénico que ocurren dentro de las primeras 72 horas de reperfusión y es debido a una alteración del propio parénquima pulmonar” [24]. Se ha propuesto que después del trasplante y la reperfusión se valore el pulmón a las 6, 24, 48 y 72 horas con el fin de precisar la afectación pulmonar. Tomando en cuenta solo dos parámetros clínicos 1) radiografía de tórax

para evaluar edema pulmonar y 2) la relación entre la Presión parcial de Oxígeno arterial y la Fracción de Oxígeno inspirado (PaO_2/FiO_2) [25] (**Figura 1**).

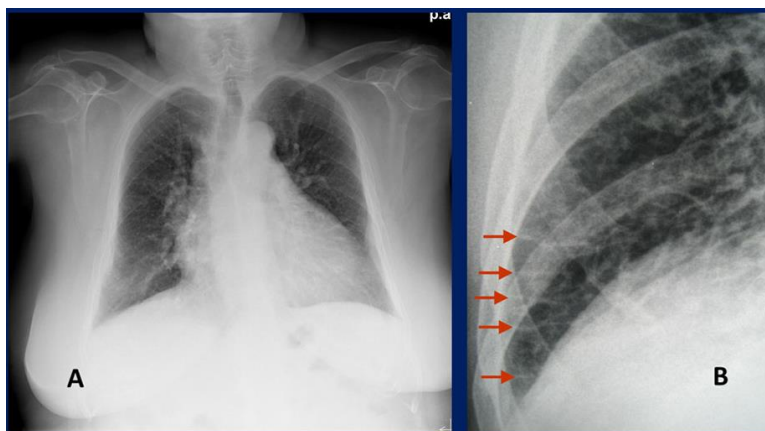
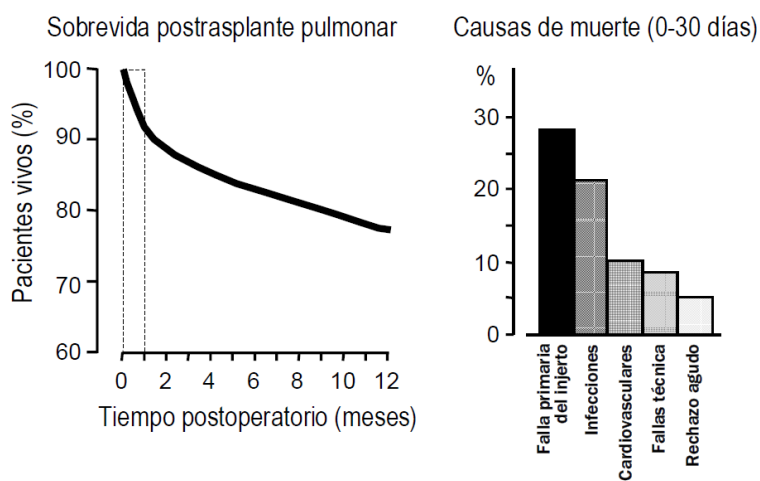


Figura 1. Radiografía de tórax que muestra la filtración de líquidos hacia el espacio intersticial compatible con edema. Recuadro (A) tórax completo, recuadro (B) aproximación al pulmón derecho indicando la filtración de líquidos.

La FPI es la principal causa de morbilidad y mortalidad en la fase precoz del trasplante pulmonar, se estima que afecta entre el 10-25% de los pacientes trasplantados (**Gráfica 2**). Dicha Falla tiene un origen multifactorial, sin embargo, la I/R es el principal motivo por el cual se genera [26].



Grafica 2. Sobrevida de los pacientes en meses y Porcentaje de las causas de muerte conocidas ambos después del trasplante pulmonar. Tomado de Arreola (2009) [26]

Evidencia experimental y clínica sugiere que la FPI se desarrolla con un patrón bifásico, la fase temprana depende de las células (linfocitos T, neutrófilos) presentes en el pulmón donador y la fase tardía resulta con la afluencia de células receptoras [27]. Estudios han sugerido que los macrófagos pulmonares innatos y los linfocitos modulan la primera fase, no obstante, el sello distintivo de la FPI en segunda fase, es migración de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) que van desde la circulación al intersticio y a las vías respiratorias, liberados al tejido pulmonar después de I/R [28]. Asimismo, la producción temprana de EROs desde los macrófagos y el endotelio pulmonar promueve la formación de agentes inflamatorios que reclutan y activan los receptores de neutrófilos, así como linfocitos, quienes luego aumentan el proceso de lesión [28].

Por otra parte, el conocimiento previo sobre los mecanismos fisiopatológicos en la FPI se ha obtenido a través de investigaciones y estudios básicos [29], dichos mecanismos son: lesión alveolar, epitelial, endotelial, marcadores de citocinas o moléculas de adhesión, indicadores de hipercoagulabilidad, proliferación celular, marcadores de inmunidad innata o adquirida, los cuales han tratado de atenuar la FPI [30].

Preservación Pulmonar

A pesar de que otros órganos estén protegidos del ambiente externo, el pulmón es propenso a sufrir daños durante el proceso de donación (como neumonía adquirida por el ventilador, edema pulmonar, barotrauma, etc.) [31], es por ello que, antes de realizar el trasplante de pulmón, un paso fundamental es la preservación del mismo, el cual pretende mantener la viabilidad morfológica, funcional y bioquímica optimizando su actividad una vez implantado, así como mantener la integridad del mismo el mayor tiempo posible [32].

Se ha observado que el tiempo de isquemia ideal para que el pulmón se mantenga funcional al momento de ser trasplantado es de 4-6 horas aproximadamente [33], sin embargo, la procuración a distancia (lejos del sitio en donde se llevará a cabo el trasplante) requiere de la prolongación del tiempo isquémico a 12-24 horas. Carrel en los años 50 reconoció el problema en la preservación de órganos cuando trasplantó un riñón, ideando un mecanismo para mantener el órgano viable en óptimas condiciones [34].

Por años, la preservación estaba enfocada en “preservación estática fría”, un proceso que tiene como objetivo disminuir el metabolismo celular, reducir el consumo de oxígeno, así como de otros sustratos previniendo el deterioro del tejido. La mayoría de los efectos perjudiciales en la hipoxia/isquemia son llevados a cabo por reacciones químicas, por lo tanto, pareciera lógico reducir la temperatura del órgano en respuesta a reducir la actividad enzimática relacionada con esos procesos. Sin embargo, debido a que dicha estrategia no es selectiva, enzimas vitales como la bomba sodio-potasio ($\text{Na}^+ -\text{K}^+$ ATPasa) tiene también decrementos en su función, causando un desequilibrio iónico que lleva a una lesión pulmonar. Además, la acumulación de calcio promueve el daño celular. [35]

Por ello, una composición electrolítica adecuada en las soluciones de preservación es fundamental para mejorar la preservación de órganos con fines de trasplante. De tal forma que, existen dos tipos diferentes de soluciones, las intracelulares y las extracelulares

Soluciones intracelulares

Las soluciones de preservación intracelulares tales como *Euro-Collins (EC)* y/o *Universidad de Wisconsin (UW)* al ser ricas en K^+ evitan que el Na^+ penetre en la célula. Además, para aumentar la presión osmótica extracelular estas soluciones incluyen en su composición sustancias de elevado peso molecular que no pueden atravesar la membrana

celular (impermeabilizantes) [36]. EC utiliza glucosa como impermeabilizante, mientras que la solución de UW, diseñada para preservación de órganos sólidos, utiliza lactobionato y refinosa, ya que la membrana celular es fácilmente atravesada por glucosa. Uno de los problemas que plantean estas soluciones es su elevado contenido de K^+ (**Tabla 2**), lo que favorece la vasoconstricción del lecho pulmonar y la posibilidad de hiperpotasemia tras un proceso de reperfusión [36].

Soluciones extracelulares

Las soluciones de preservación extracelulares tales como *Low-Potassium Dextran*, *Celsior* y *Solucion de Kyoto* tiene características diferentes:

1.- ***Low-Potassium Dextran***: (LPD por sus siglas en inglés) o mejor conocida como Perfadex es baja en K^+ y rica en Na^+ [37], cuyo componente es un coloide (Dextrano 40), agente osmótico activo, que retiene agua en el espacio intravascular, con lo que reduce la agregación eritrocitaria y plaquetaria, asimismo, su bajo contenido en glucosa sería suficiente para mantener el metabolismo celular en hipotermia, al contrario de EC, en que la osmolaridad depende del alto contenido de glucosa la cual es responsable de la desintegración morfológica celular [33,35]. En adición, estudios *in vitro* han demostrado que Perfadex mantiene una mejor actividad funcional de Na^+/K^+ ATPasa del epitelio alveolar durante períodos de isquemia fría en comparación con las soluciones intracelulares [37].

2.- ***Celsior***: desarrollada para preservación cardíaca, ha mostrado resultados satisfactorios en la preservación pulmonar, algunos autores han sugerido que es incluso mejor que la solución Perfadex [33,35,38]. Su composición incluye impermeabilizantes como el manitol y el lactobionato, utilizando como nutriente el ácido glutámico e histidina, quienes juegan un papel importante en la prevención de EROs [38]. La ausencia del Dextran 40 en

esta solución, podría ser una limitante importante en el campo de la preservación pulmonar [18].

3.- **Solución de Kyoto:** desarrollada por Chen y colaboradores, utiliza un disacárido “Trehalosa” que experimentalmente es superior a la glucosa de Perfadex en cuanto a citoprotección se refiere, además de ser químicamente estable en temperaturas de hipotermia. Asimismo, esta solución se ha empezado a usar en el campo clínico, no solo en pulmón sino también para otros órganos como riñón e hígado [39].

Tabla 2. Composición de las soluciones de preservación más utilizadas [38]

Composición	EC modificado	UW	Pelfadex	Celsior
Na ⁺	10	28	138	100
K ⁺	108	125	6	15
Cl ⁻	14	—	142	41,5
Mg ²⁺	—	—	0,8	13
Ca ²⁺	—	—	0,3	0,25
Glucosa	35	—	5	—
Rafinosa	—	30	—	—
Lactobionato	—	100	—	80
Dextrano 40	—	—	50	—
Manitol	—	—	—	60
H-almidón	—	50	—	—
SO ₄ ²⁻	8	4	0,8	—
PO ₄ ³⁻	93	25	0,8	—
HCO ₃ ⁻	8	5	1	—
Histidina	—	—	—	30
Trometamol	—	—	1	—
Adenosina	—	1	—	—
Ácido glutámico	—	—	—	20
Alopurinol	—	1	—	—
Glutación	—	3	—	3
Insulina	—	100	—	—
Metilprednisolona	—	8	—	—
pH	7,4	7,4	7,4	7,4
Osmolaridad	452,0	327	335	320

Por otra parte, algunos autores reportan estudios de preservación pulmonar a diferentes temperaturas entre 10 a 23°C mostrando algunos beneficios a nivel experimental [40], en lugar de usarlas, a 4°C que es la temperatura utilizada en el campo clínico-práctico en la actualidad [41].

Nuevas propuestas han surgido en los últimos años, incluyendo la perfusión continua del órgano a través de una bomba mecánica usando diferentes soluciones a distintas

temperaturas [42]. La máquina de perfusión hipotérmica (HMP por sus siglas en inglés), es un paradigma actual que está siendo estudiada a nivel experimental, y comparación con la preservación estática fría, los resultados de la máquina de perfusión tienen baja incidencia en la generación de la FPI, mejorando el incremento en el flujo arterial después de la reperfusión. Estos resultados sugieren una mejoría en la sobrevivencia del injerto y por tanto en el paciente, si es que esta técnica fuera implementada en el campo clínico [43].

Por otro lado, el pre-acondicionamiento pulmonar ha mostrado notables efectos contra la I/R, probablemente por estimulación del mecanismo de defensa en el tejido. Ese pre-acondicionamiento isquémico es logrado por breves períodos de isquemia y reperfusión reduciendo significativamente el daño causado bajo condiciones normotérmicas [44].

Se han realizado otros intentos para reducir la FPI y mejorar el tiempo de preservación del pulmón, Un ejemplo de ellos es cuando en 2009 *Arreola R.* utilizó un modelo de Pulmón Aislado y Perfundido (PAP) en conejo, él encontró que durante la preservación pulmonar la sustancia P junto con acetilcolina se secretaron hacia el espacio intravascular, con tasas máximas de liberación en los primeros minutos y disminución exponencial durante las 24 horas del estudio, así pues, el deterioro de la permeabilidad vascular producido durante dicha preservación pudo ser evitado mediante el uso de antagonistas específicos, así como inespecíficos de la sustancia P. *Arreola* concluye que la acetilcolina parece no intervenir en los cambios de permeabilidad durante la preservación, ya que la atropina no logró evitar su presentación [26].

En otro estudio realizado en 2013 por *Alquicira M.*, se encontró que la serotonina juega un papel importante en el proceso de Isquemia/Reperfusión al favorecer la lesión endotelial y generación de edema. De tal forma que, el uso de antagonistas de serotonina como la Metiotepina y SB 204741 administrados durante un período isquémico en el modelo

de PAP pudo atenuar significativamente el daño pulmonar [45]. Recientemente, *Martínez F.* en 2017 demostró que la preservación pulmonar promueve una tendencia al aumento en los niveles de MMP-9, lo cual indica que dicha proteína podría participar en el incremento de la permeabilidad vascular, mientras que el uso del inhibidor ONO-4817 durante la preservación tuvo tendencia a disminuir la actividad de MMP-9 atenuando la FPI [46].

A pesar de los grandes esfuerzos realizados desde *Carrel* hasta *Martínez F.* por disminuir FPI reduciendo la permeabilidad vascular, solo muestran resultados satisfactorios a nivel experimental, que no se han consolidado al 100% en la clínica. En la actualidad existen nuevas alternativas que se están explorando, como es el caso de la terapia celular regenerativa.

La terapia celular es un novedoso enfoque el cual se cree tiene potencial para revertir una enfermedad o por lo menos detener su progresión, dicha terapia implica el trasplante de células autólogas (células procedentes del mismo paciente) o alogénicas (células procedentes de un individuo diferente al paciente) [47]. Las Células Madre Mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) han atraído la atención particular de médicos y científicos por su potencial uso en el tratamiento de enfermedades y aplicaciones en el campo clínico [48].

Células Madre Mesenquimales (MSCs)

Las células madre son un grupo específico de células indiferenciadas que tienen un potencial proliferativo elevado y que presentan dos características fundamentales: son capaces de autorrenovarse y tiene la capacidad de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo. Dependiendo de su origen pueden dividirse en Células Madre Embrionarias (CME) y las Células Madre Adultas (CMA), estas

últimas, se diferencian para producir algunos o todos los principales tipos de células especializadas del tejido u órgano [49].

Las CMA pueden diferenciarse en dos poblaciones principales, Células Madre Hematopoyéticas (CMH) formadoras de todos los tipos celulares sanguíneos y células madre estromales o también conocidas como Células Madre Mesenquimales (MSCs) (**Figura 2**) quienes tiene la capacidad de generar hueso, cartílago o células adiposas que favorecen la formación de sangre y tejido conectivo fibroso [50]. Las MSCs fueron identificadas por primera vez en 1966 por *A. J. Fridenstein* y colaboradores, quienes las describían como una pequeña fracción de células provenientes de la médula ósea que se aíslan fácilmente y adhieren a la superficie del tejido rápidamente [51].

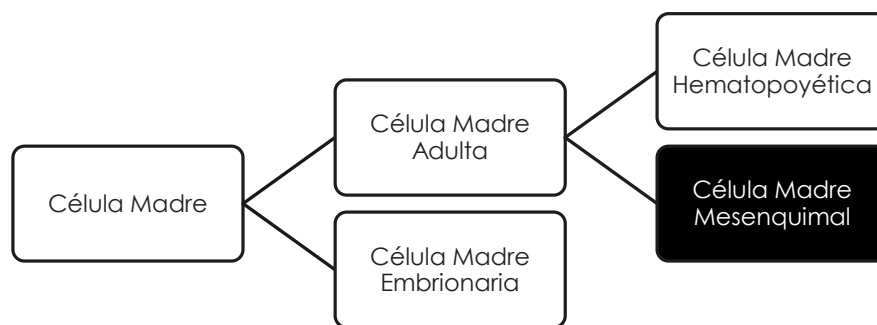


Figura 2. Clasificación de las Células Madre (CM) [50].

Las MSCs por definición pueden diferenciarse a células originarias de la capa mesodérmica del embrión, sin embargo, se ha demostrado que, no solo pueden diferenciarse hacia tipos celulares de origen mesodérmico tales como condrocitos, adipocitos y miocitos, sino que en algunos casos tienen la capacidad de convertirse a neuronas, hepatocitos [52] y estudios recientes han demostrado que pueden transformarse en células del pulmón (neumocitos tipo I y II) [53].

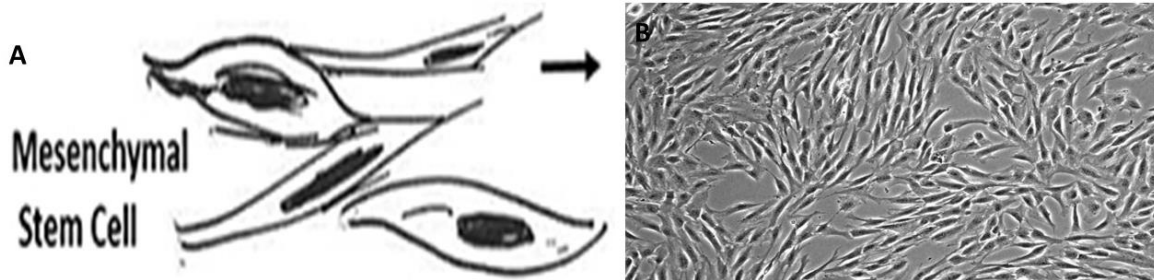


Figura 3. Célula Madre Mesenquimal (MSCs) derivadas de médula ósea en humano. A) Representación esquemática de MSCs, B) fotografía tomada en microscopio de contraste 100x. *Modificado de Pal (2017) [74]*

De acuerdo con la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT por sus siglas en inglés *International Society for Cellular Therapy*), los criterios mínimos que las MSCs deben cumplir son, la adherencia al plástico; diferenciación *in vitro* del trilineaje a adipocitos, condrocitos y miocitos; expresión de antígenos en superficie, así como, ausencia de marcadores superficiales hematopoyéticos (**Tabla 3**) [54].

Las MSCs pueden ser aisladas de diferentes fuentes, entre ellas: la médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre menstrual, el tejido del cordón umbilical, tejido adiposo, páncreas, hígado, pulmón, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, pulpa dental, líquido amniótico y la gelatina de Wharton del cordón umbilical [53,55]. No obstante, los tejidos más utilizados para el aislamiento de MSCs son la médula ósea, la sangre del cordón umbilical y el tejido adiposo [56].

Tabla 3. Requerimientos mínimos de expresión para MSCs. *Modificado de Keating (2012)* [54]

Marcador	Expresión en MSCS	Nomenclatura oficial
CD73	+	<i>5'-ectonucleotidasa</i>
CD90	+	<i>Thy-1 antígeno de superficie</i>
CD105	+	<i>Endoglina</i>
CD11b	-	<i>Integrina, alfa M</i>
CD14	-	<i>Receptor de membrana CD14</i>
CD19	-	<i>Correceptor CD19</i>
CD34	-	<i>Glicoproteína de adhesión CD34</i>
CD45	-	<i>Proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo c</i>
CD79a	-	<i>5'-ectonucleotidasa</i>
HLA-DR ó CMH-II	-	<i>Complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DR</i>

Nota: Cluster of Differentiation (CD, grupos de diferenciación por sus siglas en inglés); Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (CMH-II).

En términos de aplicaciones clínicas, las MSCs han sido probadas en varias áreas: 1) regeneración tisular; 2) células vehículo para terapia génica; 3) mejora del injerto con células madre hematopoyéticas y 4) tratamiento de enfermedades inmunes tal como Artritis Reumatoide, entre muchas otras [57].

El uso de las MSCs está basado en una serie de investigaciones preclínicas, en modelos animales se reportan diferentes efectos de dichas células sobre el tejido cardíaco [58], en el campo oftalmológico se ha reportado en el tratamiento de úlceras corneales y la degeneración de retina [59], han demostrado su eficiencia en el área de cirugía general tratando fístulas, quemados y personas con lesiones cutáneas mostrando regeneración epitelial, angiogénesis y una importante hidratación hística [57], también se han realizado

ensayos clínicos en cuanto a lesiones cerebrales, trastornos neuromusculares, hematológicos y gastrointestinales [60]

Otros estudios también han sido efectivos reduciendo la lesión producida por bleomicina, endotoxinas, ventilación mecánica, bacterias y existen reportes de evidencia preclínica en el trasplante pulmonar. En cuanto las expectativas benéficas al trasplante el uso de MSCs puede incluirse en la prevención de la lesión por I/R a través de sus efectos sobre la permeabilidad vascular [61].

MSCs en el pulmón

A pesar del poco conocimiento sobre los efectos anti-inflamatorios de las MSCs en el campo clínico, estos han sido estudiados en un modelo *ex-vivo* de Pulmón Aislado y Perfundido en humanos, pasada una hora de reperfusión, dichas células demostraron disminuir la afluencia de neutrófilos y casi reestablecieron por completo la histología del pulmón. Se mostraron resultados similares cuando el modelo fue extendido a 10 horas [62]. Además, un potencial rol de MSCs como un factor paracrino es sugerido, posiblemente por reducción de la permeabilidad endotelial y epitelial, ya que tienen potentes efectos estabilizadores sobre la lesión del endotelio vascular mediante inhibición de la permeabilidad endotelial [63].

El daño vascular endotelial es una característica bien definida de la FPI, por tanto, las MSCs podrían ayudar a preservar la barrera endotelial disminuyendo la permeabilidad y protegiendo contra una disrupción inflamatoria de dicha barrera, movilizandoproteínas adherentes de unión a la membrana, limitando la unión de células inflamatorias al endotelio [64,65].

Por otra parte, la línea epitelial alveolar que está compuesta desde células alveolares tipo I y tipo II se asocia al daño en el desarrollo de FPI, incluyendo pérdida de integridad en la barrera alveolocapilar, desregulación vectorial de fluidos alveolares y el desorden sobre la producción de surfactante. Al igual que en el endotelio, las MSCs podrían jugar un rol importante en cuanto a la preservación del epitelio y su función [66].

Se ha visto que células alveolares de tipo II expuestas a diferentes citocinas proinflamatorias en co-cultivo con MSCs, restauraron su permeabilidad epitelial sin necesidad de hacer contacto directo entre células, lo que sugiere un efecto terapéutico por mecanismo paracrino por parte de las células madre (como ya se había mencionado anteriormente) [67]. Similares descubrimientos fueron descritos en un estudio de células epiteliales en ratas expuestas a las mismas citocinas proinflamatorias e hipoxia [68].

Finalmente, McAuley, en un estudio realizado en 2014 utilizó pulmones que no cumplieron todos los requisitos para ser trasplantados, en dichos órganos se evaluó el edema con y sin MSCs, observando que las células instiladas vía intravenosa normalizaron la eliminación del fluido intralveolar [69] lo que es crucial para la recuperación de FPI.

Justificación

A pesar de que en los últimos años el número de centros que desarrollan trasplantes pulmonares ha crecido, los pacientes en lista de espera siguen aumentando y la viabilidad de los órganos durante la preservación se ha convertido en un verdadero reto. Ya que dichos tejidos presentan un deterioro rápido de la función pulmonar, es necesario desarrollar nuevos métodos para optimizar las condiciones de preservación pulmonar mitigando la incidencia en la FPI, el daño endotelial, edema y lesión por I/R, entre otros. En consecuencia, el tratamiento propuesto con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea podría ayudar a preservar el funcionamiento de la barrera endotelial disminuyendo la permeabilidad vascular, siendo instiladas por vía intratraqueal.

Hipótesis

La aplicación de Células Madre Mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSCs) instiladas por vía intratraqueal modifican los cambios de permeabilidad vascular, entonces se mejorará la preservación pulmonar, lo que podría atenuar la Falla Primaria del Injerto.

Objetivos

Objetivo General

1. Evaluar la eficacia del uso de Células Madre Mesenquimales derivadas de médula para mitigar el daño celular y estabilizar la barrera endotelial durante la preservación y evitar el posible desarrollo de FPI.

Objetivos particulares

- Implementar la técnica de pulmón aislado y perfundido para evaluar los cambios en la permeabilidad vascular durante la preservación pulmonar.
- Evaluar la permeabilidad vascular durante la preservación pulmonar midiendo los cambios vasculares del pulmón mediante el coeficiente de filtración capilar (m,KFC) en los diferentes períodos de preservación, en un modelo de pulmón aislado y perfundido.
- Determinar si la instilación por vía intratraqueal de MSCS evita el incremento de la permeabilidad vascular impidiendo el desarrollo de edema pulmonar

Material y Método

Animales de estudio

Se utilizaron 30 cobayos (*Cavia porcellus*) hembra de la cepa Hartley (peso corporal de 500-700g), mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) con una dieta *ad libitum*, bajo un ambiente controlado con una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 50-70% de humedad, aire filtrado, cama estéril y ciclos de luz-

oscuridad 12/12 horas. Los animales fueron manejados de acuerdo con los lineamientos de la Ley General de Salud y las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999, y fue aprobado por el comité de Ciencia y Biótica con clave (B17-14) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Diseño Experimental (Figura 4)

1. Grupo Control: Animales sanos de los cuales se obtuvo el bloque cardiopulmonar e inmediatamente se evaluó su coeficiente de filtración capilar (mKf,c) a cada individuo (n= 6)
2. Grupo 6 horas S/BM-MSCs: Animales sanos de los cuales se obtuvo el bloque cardiopulmonar y fueron preservados por 6 horas, posteriormente se evaluó el coeficiente de filtración capilar (mKf,c) a cada individuo (n= 6)
3. Grupo 6 horas C/BM-MSCs: Animales sanos instilados con CCM de los cuales se obtuvo el bloque cardiopulmonar y fueron preservados por 6 horas, posteriormente se evaluó el coeficiente de filtración capilar (mKf,c) a cada individuo (n= 6)
4. Grupo 24 horas S/BM-MSCs: Animales sanos de los cuales se obtuvo el bloque cardiopulmonar y fueron preservados por 24 horas, posteriormente se evaluó el coeficiente de filtración capilar (mKf,c) a cada individuo (n= 6)
5. Grupo 24 horas C/BM-MSCs: Animales sanos instilados con CCM de los cuales se obtuvo el bloque cardiopulmonar y fueron preservados por 24 horas, posteriormente se evaluó el coeficiente de filtración capilar (mKf,c) a cada individuo (n= 6)

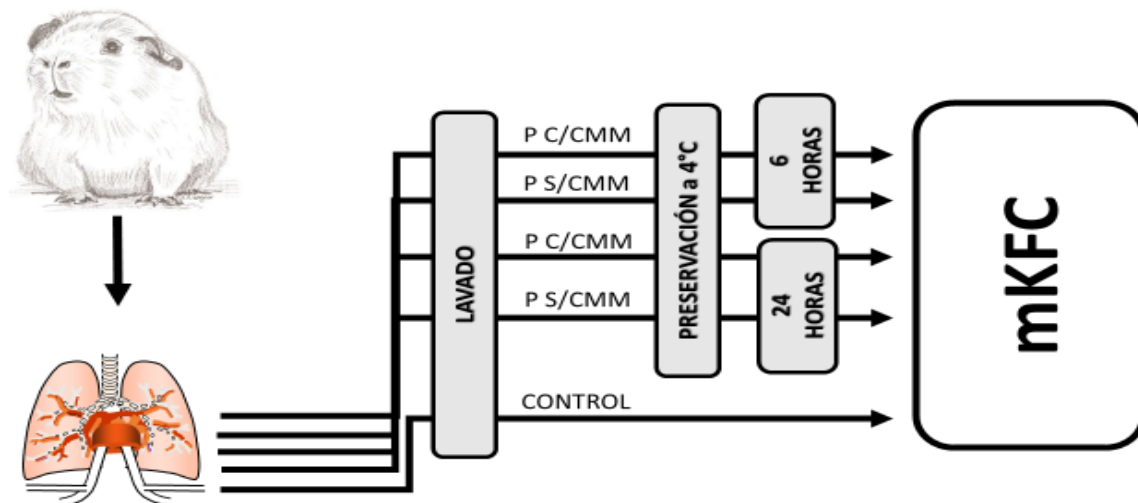


Figura 4. Esquema general sobre la división de grupos experimentales, no experimentales, control y el procedimiento que se realizó respectivamente.

Instilación de BM-MSCs en la tráquea de Cobayo

Obtención de BM-MSCs

Las BM-MSCs fueron donadas por la Dra. Carbajal del INER, el aislamiento e inmunotipificación de las BM-MSCs fue realizado de la siguiente manera: en condiciones estériles fue obtenido el fémur de cobayo, se disecó y limpio del exceso de tejido muscular y conectivo, posteriormente el fémur se cortó de forma longitudinal y se aspiró la médula ósea, está se colocó en PBS y se filtró a través de una malla de 70 μm . Las células se centrifugaron a 1360 rpm durante 10 min, el botón celular obtenido se resuspendió en 5 mL de PBS. Se cultivaron 24×10^6 células en una caja T-75 y se le añadió 12 mL de medio de cultivo (DMEM) con Suero Fetal de Bovino (FBS) al 10% y antibiótico-antimicótico 1%, la caja se colocó a 37°C con 5% de CO_2 y 95% O_2 , en una atmósfera de humedad. Después de 24 horas, se retiró el medio y se lavó la caja T-75 2 veces con DMEM sin FBS y se añadió medio fresco. Las células adheridas a la caja se dejaron crecer hasta que alcanzaron el 80 % de

confluencia. Las células obtenidas del tercer pasaje se utilizaron para la inmunotipificación por citometría de flujo (500 000 células / muestra), se evaluaron los siguientes anticuerpos tanto positivos como negativos para las BM_MSCs: CD29, CD34, CD73, CD90, CD44 y CD45 (Torreblanca, 2018).

Instilación de BM-MSCs

Los cobayos de los grupos 6 horas C/MSCS y 24 horas C/MSCS fueron anestesiados usando pentobarbital sódico (28mg/Kg i.p., Anestosal[®], Pfizer), a continuación, en condiciones estériles, se realizó una pequeña incisión al cuello removiendo los músculos hasta exponer la tráquea, se instilaron 5×10^6 BM_MSCSSs en 1mL de DMEM previamente cargado en una jeringan de 1mL 27G x 13 mm posteriormente, los animales fueron suturados con hilo seda trenzado estéril 2-0 (Atramat[®]). Por último, los cobayos permanecieron en cuidados posoperatorios hasta su completa recuperación, un mes antes de la obtención del bloque cardiopulmonar (*Figura 5*).

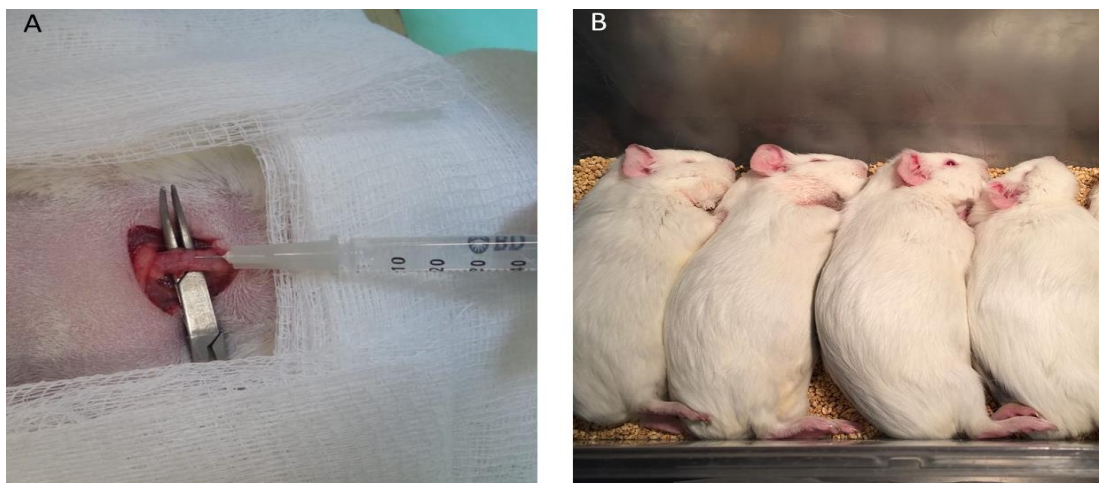


Figura 5. Instilación de BM_MSCSSs en cobayos. A) instilación de BM_MSCSSs (5×10^6 BM_MSCSSs/ mL DMEM). B) cuidado postoperatorio de los cobayos después de la instilación de MB-MSCSs.

Extracción del bloque cardiopulmonar

El bloque cardiopulmonar de cada cobayo fue extraído de la siguiente manera: Cada animal fue anestesiado profundamente con una inyección única de pentobarbital sódico (28mg/Kg i.p, Anestésal[®], Pfizer), posteriormente, se disecó y canuló la tráquea para ventilar los pulmones mecánicamente (volumen corriente de 5mL/Kg, frecuencia respiratoria de 55/rpm) usando un ventilador para pequeñas especies (Starlin, Harvard Apparatus, Holliston, MA), a continuación, se realizó una esternotomía media para exponer el bloque cardiopulmonar (**Figura 6**).

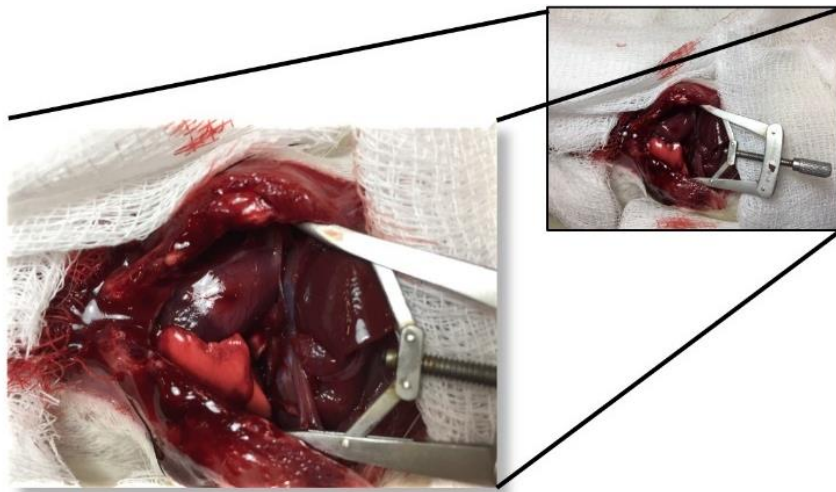


Figura 6. Exposición del bloque cardiopulmonar. En esta imagen se observa el corazón y pulmón

De manera inmediata se inyectó en el ventrículo derecho heparina (1000 UI/Kg), el bloque cardiopulmonar fue removido gentil y rápidamente de la cavidad torácica para ser separado (*Figura 7*).

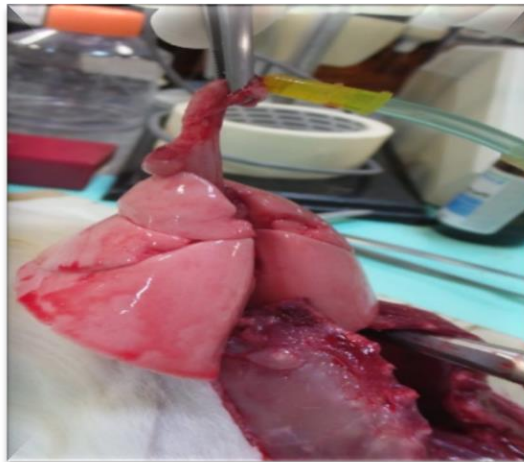


Figura 7. Extracción del bloque cardiopulmonar.

En el corazón se realizó un corte transversal a nivel de las válvulas auriculoventriculares para colocar dos cánulas, las cuales fueron fijadas a la arteria pulmonar y aurícula izquierda con sutura de seda 4-0 pasando por el orificio atrio-ventricular correspondiente. Las estructuras adyacentes fueron incluidas en la ligadura de la arteria pulmonar y aurícula izquierda a fin de disminuir cierta distensibilidad de dichas estructuras que puedan interferir con el registro de la presión vascular.

Lavado y preservación pulmonar

Una vez que el bloque fue obtenido, se mantuvo bajo ventilación mecánica, la sangre que permanece en el lecho vascular de los pulmones fue eliminada mediante la perfusión anterógrada de 100-150 ml de Solución Salina Fisiológica (SSF) (NaCl al 0.9%) a una presión constante de 20cm H₂O (generada mediante la elevación del reservorio con SSF)

(Figura 8). Al final del lavado, se pinzó simultáneamente las cánulas de forma que el lecho vascular mantuviera dicha solución. Los pulmones fueron hiperinsuflados 3 veces el volumen corriente para evitar zonas atelectásicas. El bloque cardiopulmonar fue sumergido en SSF a una temperatura de 4°C durante 6 y 24 horas respectivamente, con excepción de grupo control, del cual se midió inmediatamente su coeficiente de filtración capilar (mKf_c : $mL \cdot min^{-1} \cdot cmH_2O^{-1} \cdot g^{-1}$).

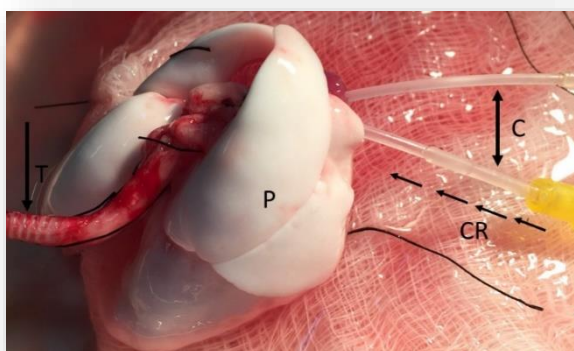


Figura 8. Lavado pulmonar. La flecha T señala la tráquea por la cual se mantiene ventilado constantemente el pulmón. La flecha C muestra las cánulas fijadas a la arteria pulmonar y aurícula izquierda. Por otra parte, las flechas CR indican la circulación anterógrada que sigue de SSF. Finalmente, P indica el bloque pulmonar.

Pulmón Aislado y perfundido (PAP)

Cada bloque cardiopulmonar fue conectado después del período de preservación, a un circuito de perfusión re-circulatorio (*figura 9*), compuesto por una bomba peristáltica de circulación (Polystaltic® Pump Bulchler Instruments) con un indicador de flujo de presión, un termostato y una trampa para burbujas. El bloque fue montado en una hamaca hecha con malla de Marlex®, la cual se colgó a un transductor de fuerza ténsil (FT03, Grass Instruments, Co., Boston, MA). Asimismo, los pulmones fueron ventilados y humedecidos con aire ambiental a una frecuencia de 55/rpm, un volumen corriente de 3 ml/kg a una presión positiva

al final de la expiración (PEEP) de 2 cmH₂O. Los pulmones fueron hiperinsuflados periódicamente para evitar atelectasias.

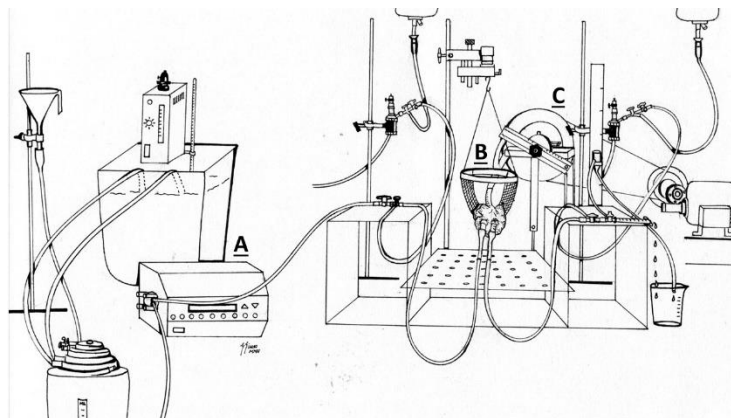


Figura 9. Circuito de perfusión re-circulatorio. **A)** indica la bomba peristáltica de circulación. **B)** muestra el bloque cardiopulmonar montado en una hamaca de malla conectada a un transductor de fuerza tensil. **C)** ventilador para pequeñas especies.

Los pulmones fueron lavados nuevamente haciendo pasar líquido de perfusión para eliminar el remanente de sangre del lecho vascular, posteriormente se perfundió a un flujo constante de 5 mL/min con 500 mL de solución artificial Krebs-Ringer-bicarbonato conteniendo (g): NaCl 6.90, KCl 0.354, CaCl 2H₂O 0.373, KH₂PO₄ 0.162, MgSO₄ 7H₂O 0.293, NaHCO₃ 2.1 y glucosa 0.98. El pH y la temperatura fueron controlados constantemente manteniéndolos en los límites fisiológicos (pH 7.3-7.4, 37°C a 38°C).

Medición del coeficiente de filtración capilar (mKf,c)

La presión arterial (Pa) y venosa (Pv) se registró utilizando dos transductores de presión (Gould Statham) conectados a las cánulas que se colocaron en la arteria pulmonar y la aurícula izquierda. Dichas presiones se ajustaron a cero. Al cabo de 10 a 15 min se obtuvo el equilibrio en el sistema que se caracteriza por un estado isogravimétrico, el cual se logró después de que el peso del pulmón se mantuvo constante, así como las presión arterial y

venosa. La máxima apertura de los vasos sanguíneos se obtuvo cuando la presión arterial fue mayor que la venosa, ésta a su vez fue mayor que la presión al final de la espiración ($P_a > P_v > PEEP$). Los parámetros presión venosa y peso pulmonar se registraron en un polígrafo de canales múltiples (Dynograph Recorder R611, Beckman Instruments, Palo Alto, CA).

Durante 1 hora aproximadamente se llevó a cabo el registro del mKf_c , el cual fue considerado como período de reperfusión. Durante el período de registro, los pulmones fueron desconectados temporalmente (3 min) para evitar la influencia de la ventilación mecánica. La permeabilidad capilar se midió a través del método de doble oclusión, el cual consiste en realizar un pinzamiento simultáneo de las cánulas arterial y venosa, lo que produce un incremento en la P_v y un decremento en la P_a , con una estabilización no mayor a 3 segundos. En estas condiciones, la P_v se consideró como un indicador de la presión capilar (P_c). Aproximadamente 10 segundos después se quitó la doble oclusión y se restableció el flujo. A continuación, la P_v se incrementó en 5 cmH₂O mediante la oclusión parcial del flujo de salida venosa y se mantuvo así durante 3 min, ocasionando el rápido aumento del peso pulmonar por efecto de la congestión capilar, durante los primeros 30-60 segundos, seguido de una ganancia de peso más controlada y lenta, que se asocia con el líquido filtrado a través de los capilares entre los 60 y 180 segundos después de haber iniciado la oclusión parcial del lado venoso. La fase lenta de ganancia de peso se utilizó para calcular el mKf_c . Al final de los 3 min, se realizó una segunda doble oclusión para obtener la P_c . El mKf_c se expresó como $mL \cdot min^{-1} \cdot cmH_2O^{-1} \cdot g^{-1}$, lo que representó el líquido que se filtró a través del capilar (es decir, la ganancia de peso del pulmón, asumiendo que el líquido filtrado tiene una densidad de 1.0) por min de obstrucción venosa, por diferencia de P_c y por gramo de tejido

pulmonar. Este procedimiento se llevó a cabo 3 veces para cada pulmón, obteniendo los promedios y así su posterior análisis.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software INERSTAT-a v1.7 b, mediante el cual se determinó la diferencia entre los grupos por análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de T-student para evaluar la diferencia entre dos grupos. Los datos fueron expresados como promedio \pm error estándar de la media y se consideró que existía diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de significancia fue de $p < 0.05$ en la prueba de T-student.

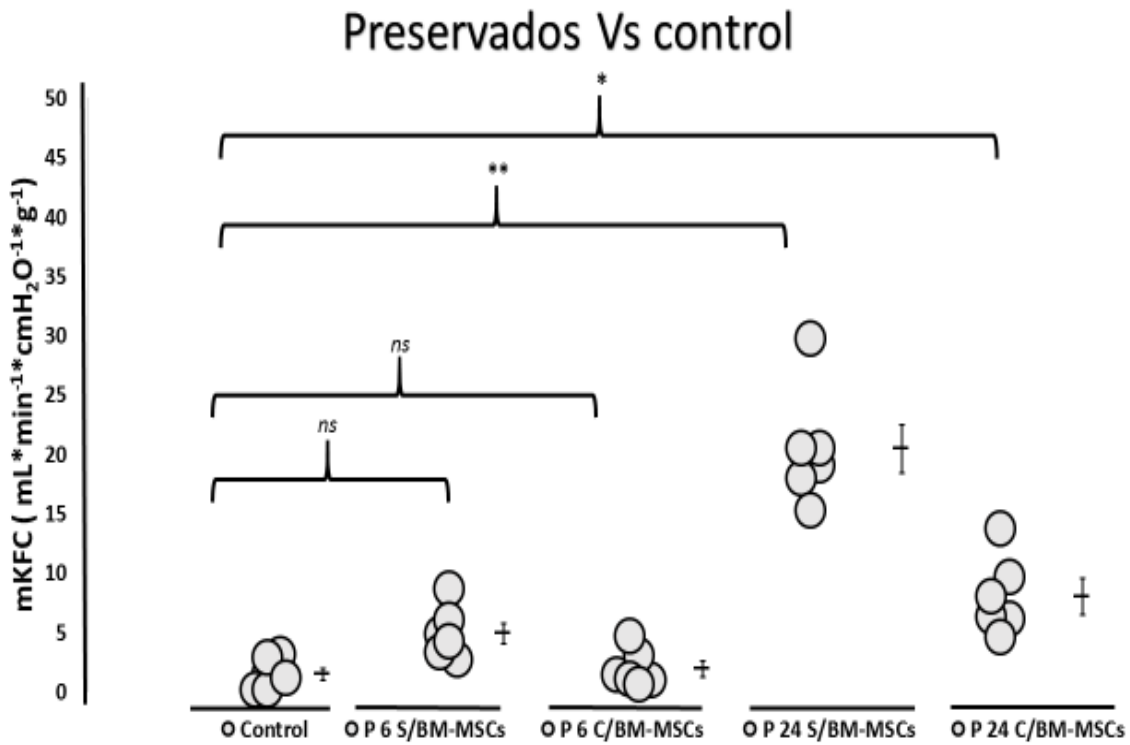
Resultados

Efectos de la preservación prolongada sobre la permeabilidad vascular

En estos experimentos se obtuvo el bloque cardiopulmonar de cada uno de los animales de los diferentes grupos y se evaluó la permeabilidad vascular a través del mKf,c. Encontramos que en los pulmones preservados durante 6 horas S/BM-MSCs hubo un incremento significativo en la permeabilidad vascular ($4.94, \pm 0.87, p < 0.01, n=6$) comparado con el grupo Control ($1.48 \pm 0.52, n=6$). Sin embargo, la permeabilidad vascular disminuyó en los pulmones que fueron instilados previamente con BM-MSCs y preservados durante 6 horas ($1.94 \pm 0.64, n=6$), pero no fue significativo con respecto al grupo control.

Por otro lado, con respecto a los pulmones preservados durante 24 horas S/BM-MSCs, encontramos un incremento en la permeabilidad vascular altamente significativo (20

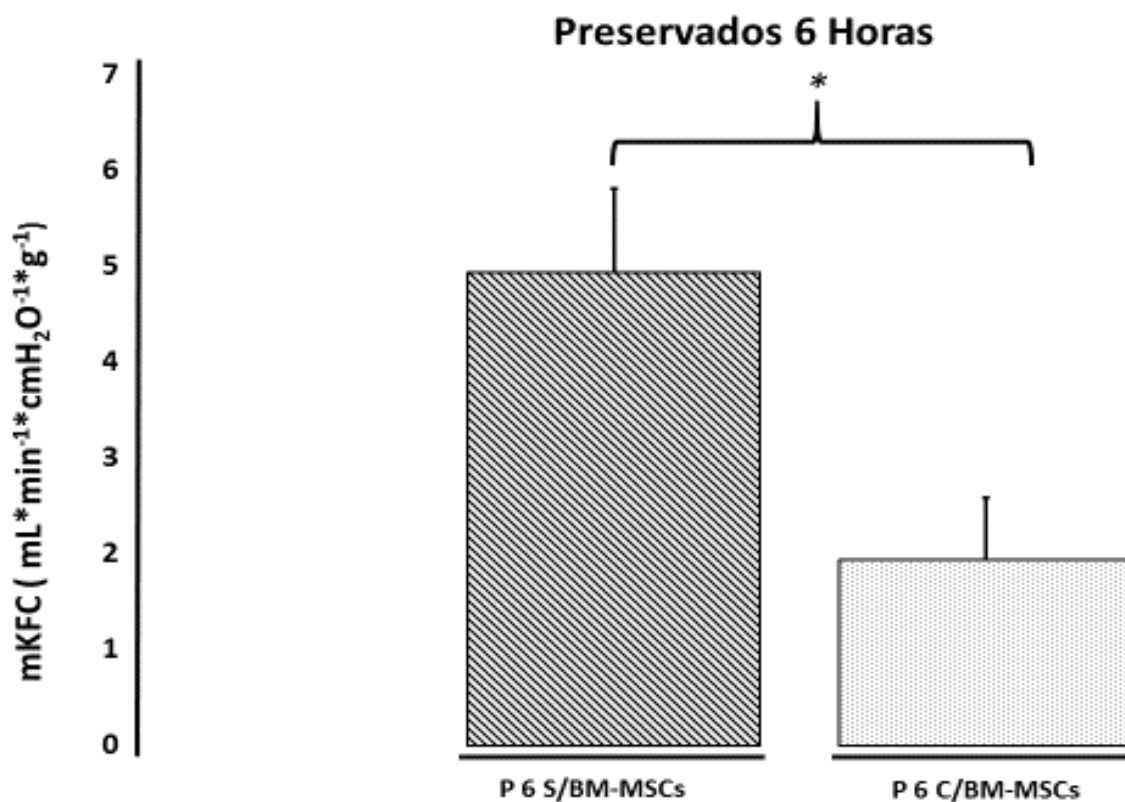
± 2.01 , $p < 0.01$, $n = 6$) con respecto al control. En el caso de los pulmones instilados con BM-
MSCs y preservados durante 24 horas encontramos un incremento un incremento
significativo con respecto al grupo control (8 ± 1.63 , $p < 0.05$, $n = 6$; **gráfica 3**)



Gráfica 3. Permeabilidad vascular durante diferentes periodos de preservación en presencia o ausencia de BM-MSCs. Grupo sin preservar (Control, $n = 6$); preservados durante 6 horas sin BM_MSCs (P 6 S/BM-MSCs, $n = 6$); instilados con BM-MSCs y preservados durante 6 horas (P 6 C/BM-MSCs, $n = 6$); preservados durante 24 horas sin BM_MSCs (P 24 S/BM-MSCs, $n = 6$); instilados con BM-MSCs y preservados durante 24 horas (P 24 C/BM-MSCs, $n = 6$). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns = no significativo.

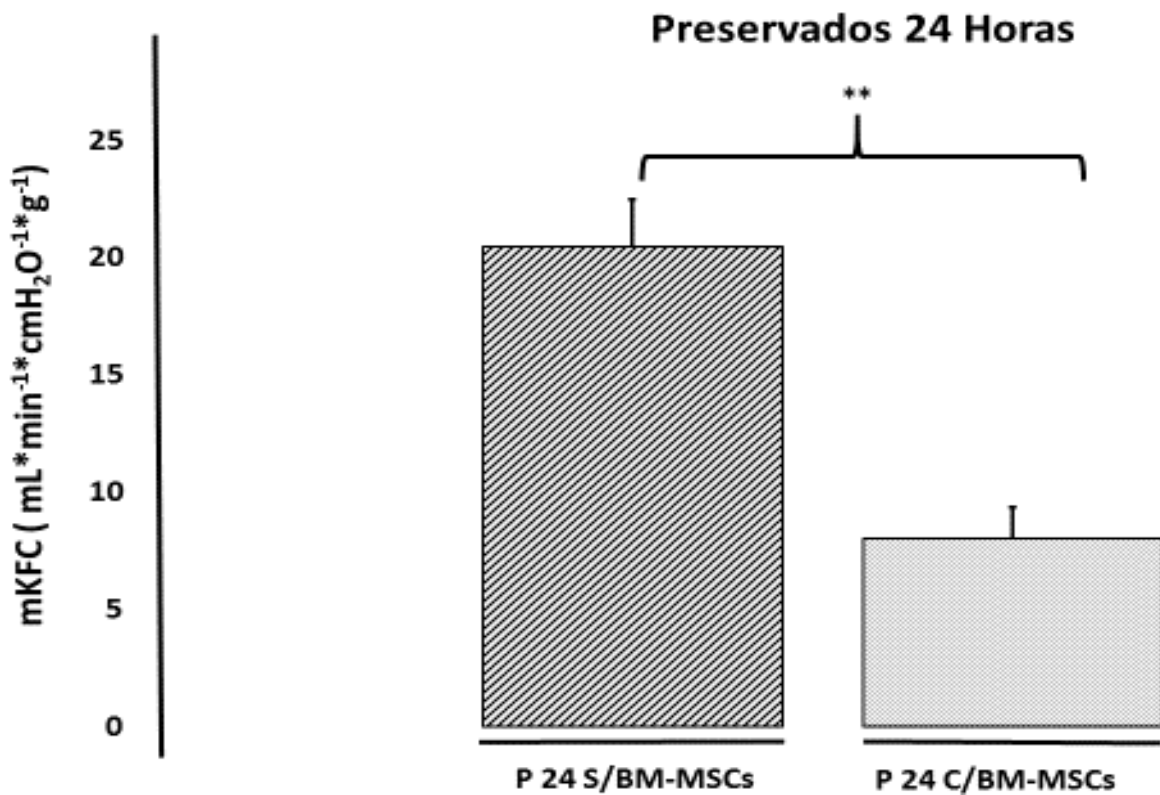
Efecto de las BM-MSCs sobre la permeabilidad vascular durante 6 y 24 horas

La permeabilidad vascular medida de los animales preservados durante 6 horas C/BM-MSCSS fueron 2.54 veces menores respecto a su contra parte (grupo preservado 6 horas S/MB-MSCs) o lo que se traduce como una reducción del 60.73% indicando una disminución significativa $p < 0.05$ en dicho daño vascular (*gráfica 4*).



Gráfica 4. Efecto de las BM-MSCs sobre la permeabilidad vascular en la preservación pulmonar durante 6 horas. Preservados durante 6 horas sin BM-MSCs (P 6 S/BM-MSCs); instilados con BM-MSCs y preservados durante 6 horas (P 6 BM-MSCs). * $p < 0.05$.

En el caso del grupo preservado durante 24 horas C/BM-MSCs en contraste con el preservado 24 horas S/BM-MSCs presentó una disminución significativa en cuanto a la permeabilidad vascular de 2.54 veces $p < 0.01$ (*gráfica 5*) o lo que es igual a una reducción del 60.73% de los valores. Asimismo, se observó que, en ambos casos, tanto en los grupos preservados durante 6 y 24 horas, las BM-MSCs promovieron una disminución del 60.73 % en la permeabilidad vascular.



Gráfica 5. Efecto de las BM-MSCs sobre la permeabilidad vascular en la preservación pulmonar durante 24 horas. Preservados durante 24 horas sin BM-MSCs (P 24 S/BM-MSCs); instilados con BM-MSCs y preservados durante 24 horas (P 24 BM-MSCs). ** $p < 0.01$.

Discusión

En este estudio encontramos que la aplicación de MSCs durante la preservación pulmonar a 6 y a las 24 horas, estabilizó la permeabilidad vascular atenuando significativamente la generación de edema pulmonar. evitando el posible desarrollo de FPI.

El trasplante pulmonar es una terapia quirúrgica para pacientes con enfermedad pulmonar terminal, aplicada cuando la terapia medica falla. Sin embargo, no hay donadores suficientes para satisfacer la demanda del órgano, se estima que en donaciones múltiples solo del 15 al 20%, de los pulmones son viables para el trasplante a nivel mundial [70].

México es uno de los países en que el trasplante pulmonar no se ha podido consolidar debido a varios factores como la incipiente cultura para donación de órganos resultado de los insuficientes esfuerzos institucionales para concientizar a la población, además de escasos pulmones en condiciones necesarias para el trasplante. Aunado a esto, existen diversas complicaciones post-trasplante entre las que destaca la FPI caracterizada por la presencia de edema pulmonar generado en las primeras 72 horas debido a un aumento en la permeabilidad vascular durante el período de Isquemia Reperfusión [71].

En consecuencia, se han desarrollado estrategias para mantener viable al pulmón, algunas de ellas son: el enfriamiento tópico, uso de soluciones de preservación y máquinas de perfusión o propuestas alternas como sugieren, *Arreola J. (2009)*; *Alquicira J. (2013)* y *Martínez F. (2017)*; siendo prometedoras en la parte experimental pero ninguna 100% eficaz en la práctica clínica, actualmente se plantea a las MSCs como una terapia alterna, ya que sus efectos benéficos fueron demostrados en modelos experimentales como asma, EPOC y fibrosis idiopática entre otras [60].

Un resultado importante alcanzado en este trabajo fue estandarizar la técnica de PAP en pulmones de cobayos hembra, sentando las bases en la medición del coeficiente de filtración capilar (mKf,c) para esta modelo, que podrán ser usados en estudios futuros, los cuales servirán como herramienta para seguir evaluando la permeabilidad vascular en diferentes períodos de preservación con el fin de atenuar la FPI.

Los datos obtenidos a partir de la técnica estandarizada PAP mostraron que durante la preservación pulmonar los niveles de mKf,c aumentaron considerablemente en grupos que no fueron tratados con BM-MSCs y tuvieron preservación prolongada (24 horas) cuando fueron comparados respecto al grupo Control, ya que el período de isquemia junto con la reperfusión, como en la literatura se sugiere, provocó desestabilización en la barrera alveolo-capilar dañando el tejido pulmonar aumentando la permeabilidad vascular, corroborándose que mientras más largo sea el período de preservación mayor será el daño endotelial reflejándose en la formación de edema pulmonar [66, 67].

Cuando administramos BM-MSCs por vía intratraqueal, disminuyeron significativamente los niveles de mKf,c en dicha preservación, logrando los efectos esperados. Incluso, hallamos que el grupo preservado 6 horas C/BM-MSCs presentó valores muy similares a los basales, sugiriendo que dichas células posiblemente protegen el endotelio vascular prolongando los tiempos de preservación. Poca es la información que dilucida el mecanismo por el cual las BM-MSCs atenúan el daño vascular, sin embargo, *Wang et. al.* (2017) propusieron al factor de crecimiento hepático (HGF) como una posible molécula clave en la restauración de permeabilidad vascular, ya que es secretado a partir de MSCs y como consecuencia incrementa la expresión de proteínas endoteliales de unión, por otra parte, disminuye la apoptosis en células endoteliales causada por daño I/R [72].

Se ha reportado que para considerar a un órgano con edema este debe presentar niveles altos en el Coeficiente de Filtración Capilar (de 9 a 15 ml*min*cmH₂O*g) [73], en este estudio consideramos niveles mayores a 10 ml*min*cmH₂O*g como edema pulmonar y por tanto “órgano no viable con fines de trasplante”, así como, niveles por debajo de 10 sin edema pulmonar, “órganos aún viables con fines de trasplante”. De la misma forma, consideramos que el nivel basal (grupo Control) es el ideal para nuestros objetivos. De modo tal que, los niveles obtenidos en grupos preservados 6 horas Con y Sin BM-MSCs no generaron edema pulmonar, esto puede deberse a que, como la literatura menciona, los tiempos de preservación no sobrepasaron su límite máximo para generar edema, que es de 6 horas, evitando así dañar el pulmón severamente [32].

Por otro lado, notamos que el valor promedio obtenido para el grupo preservado 6 horas C/MSCS fue 2.54 veces menor que su contraparte 6 horas S/BM-MSCs, mostrando una clara diferencia en cuando al mKf,c. En referencia a los valores obtenidos a partir de los grupos preservados durante 24 horas Con y Sin BM-MSCs, deben resaltarse dos puntos: 1) El grupo preservado durante 24 horas S/BM-MSCs evidenció notablemente el estado de daño vascular (*gráfica 4*) y 2) observamos que en el grupo preservado durante 24 horas adicionado C/BM-MSCs la permeabilidad vascular disminuyó 2.54 con respecto al mismo período de preservación S/BM-MSCs, evitando edema pulmonar, siendo viables para el trasplante pulmonar. En términos de porcentaje, en ambos casos las BM-MSCs tienden a atenuar el daño vascular hasta un 60.73 % demostrando con este hallazgo la eficacia de las células en cuanto a los cambios de permeabilidad vascular.

Con estos resultados preliminares alentadores, observamos que las BM-MSCs atenúan de manera considerable el edema en la preservación pulmonar, es necesario

establecer nuevas estrategias en investigación, como sería el efecto inmunomodulador de estas células para comparar y corroborar dicha eficacia

Conclusiones

- La estandarización del modelo de Pulmón Aislado y Perfundido en cobayos permitió la obtención y análisis de resultados.
- Los valores obtenidos de mKf,c se podrían considerar como una herramienta de evaluación de edema con este modelo.
- El período de preservación pulmonar prolongado induce el aumento de la permeabilidad vascular en comparación con el grupo control, el cual es atenuado significativamente cuando se instilan MSCs derivadas de médula ósea por vía intratraqueal antes de la preservación pulmonar, incluso llegando a niveles similares a los del grupo Control.
- La instilación de MSCs durante la preservación pulmonar disminuyó significativamente el coeficiente de filtración capilar mKf,c evitando el desarrollo de una posible FPI .

- El uso de MSCs en la preservación pulmonar, podría incrementar el número de órganos con fines de trasplante
- Realizar cortes histológicos para evaluar el daño y comparar entre grupos.
- Confirmar la integración y actividad de las MSCs mediante la Técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH).
- Probar otros tiempos de preservación (12, 16 horas).
- Incluir estudios de inmunomodulación de la MSCs.

Referencias

1. “WHO | Human organ transplantation”. *WHO*, <http://www.who.int/transplantation/organ/en/>. Consultado el 17 de abril de 2018.
2. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th adult lung and heartlung transplant report-2012. *J Heart Lung Transplant* 2012;31:1073–86.
3. *Learn about the History of Transplant - OPTN*. <https://optn.transplant.hrsa.gov/learn/about-transplantation/history/>. Consultado el 11 de diciembre de 2018.
4. *ISHLT: The International Society for Heart & Lung Transplantation JHLT* 37(10) (2018): 1155-1206; <https://ishltregistries.org/registries/slides.asp>. Consultado el 29 de enero de 2019.
5. Gadre, Shruti, Jason Turowski, and Marie Budev. "Overview of lung transplantation, heart-lung transplantation, liver-lung transplantation, and combined hematopoietic stem cell transplantation and lung transplantation." *Clinics in chest medicine* 38.4 (2017): 623-640.
6. Mexico. Secretaria de Salud. Centro Nacional de Trasplantes. Estado Actual de Donación y Trasplante en México Anual 2017 [en línea], citado el 4 febrero 2018. Disponible en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/289636/Presentacion_anual_2017.pdf
7. Klein AS, Messersmith EE, Ratner LE, et al. Organ donation and utilization in the United States, 1999–2008. *Am J Transplant* 2010;10:973–86.
8. Santillan DP, Jasso VR, Olmos ZR, et. al. Trasplante de Pulmón. *Rev Inv Clín*. 2005;57 (2): 350-357

9. Weill, David. "Lung transplantation: indications and contraindications." *Journal of thoracic disease* 10.7 (2018): 4574.
10. Laubach, Victor E., and Ashish K. Sharma. "Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury." *Current opinion in organ transplantation* 21.3 (2016): 246.
11. Boutilier RG. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J Exp Biol* 2001;204:3171–81.
12. Casillas-Ramírez, A., et al. "Ischemia-reperfusion syndrome associated with liver transplantation: an update." *Gastroenterologia y hepatologia* 29.5 (2006): 306-313.
13. Piazza, Ornella, et al. "Maximum tolerable warm ischaemia time in transplantation from non-heart-beating-donors." *Trends in Anaesthesia and Critical Care* 3.2 (2013): 72-76.
14. *J Hepatol.* Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences., 25 (1996), pp. 774-80
15. Fehrenbach, Heinz, et al. "Pulmonary ischemia/reperfusion injury: A quantitative study of structure and function in isolated heart-lungs of the rat." *The Anatomical Record* 255.1 (1999): 84-99.
16. Carbognani, P., et al. "Pneumocytes type II ultrastructural modifications after storage in preservation solutions for transplantation." *European surgical research* 29.5 (1997): 319-326.
17. Pickford, M. A., et al. "The pathology of rat lung isografts following 48 or 72-hour cold storage and subsequent reperfusion in vivo for up to 1 month." *International journal of experimental pathology* 73.5 (1992): 685.
18. Den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL (2010) Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299(5):H1283–1299.
19. Tian, Weijun, et al. "Infusion of mesenchymal stem cells protects lung transplants from cold ischemia-reperfusion injury in mice." *Lung* 193.1 (2015): 85-95.
20. Zeng, Min, et al. "Reactive oxygen species contribute to simulated ischemia/reperfusion-induced autophagic cell death in human umbilical vein endothelial cells." *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 20 (2014): 1017.
21. Tsung, Allan, et al. "HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4–dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling." *Journal of Experimental Medicine* 204.12 (2007): 2913-2923.
22. Chabot, F., et al. "Reactive oxygen species in acute lung injury." *European Respiratory Journal* 11.3 (1998): 745-757.
23. Stalp, M., and A. Seekamp. "Ischemia-reperfusion directly increases pulmonary endothelial permeability in vitro." *Shock (Augusta, Ga.)* 11.4 (1999): 259-263.

24. Christie JD, Carby M, Bag R, Corris P, Hertz M, Weill D, ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction. Report of the ISHLT working group on primary lung graft dysfunction: Part II: Definition. A consensus statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant.* (2005);24:1454-9
25. López, VJ Suárez, et al. "Falla primaria del injerto tras el trasplante pulmonar." *Medicina intensiva* 36.7 (2012): 506-512.
26. Arreola Ramírez, José Luis, y Mario Humberto Vargas Becerra. *Papel de la liberación de acetilcolina y sustancia P en el deterioro de la función pulmonar en un modelo experimental de preservación pulmonar en conejo.* 2009. Facultad de Medicina 001-11281-A1-2009.
27. Barr ML, Kawut SM, Whelan TP, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part IV: recipient-related risk factors and markers. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation.* (2005);24(10):1468–1482.
28. Suzuki Y, Cantu E, Christie JD. Primary Graft Dysfunction. *Seminars in respiratory and critical care medicine.* 2013;34(3):305-319.
29. Lee JC, Christie JD. Primary graft dysfunction. *Clinics in chest medicine.* 2011;32(2):279–293.
30. Kawut SM, Okun J, Shimbo D, et al. Soluble p-selectin and the risk of primary graft dysfunction after lung transplantation. *Chest.* 2009;136(1):237–244.
31. Luna Flores Antonia, *Efectos de la asistencia mecánica ventilatoria y preservación pulmonar prolongada sobre la producción y expresión de interleucina 8 en el trasplante pulmonar experimental.* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2012
32. Machuca, Tiago N., Marcelo Cypel, and Shaf Keshavjee. "Advances in lung preservation." *Surgical Clinics* 93.6 (2013): 1373-1394.
33. Padilla, A. M., and J. D. Padilla. "Estado actual de la preservación pulmonar." *Archivos de Bronconeumología* 40.2 (2004): 86-93.
34. Carrel A. Transplantation in mass of the kidneys. *J Exp Med* 1908; 10:98–143
35. Sommer, Sebastian P., et al. "Pulmonary preservation with LPD and celsior solution in porcine lung transplantation after 24 h of cold ischemia." *European journal of cardiothoracic surgery* 26.1 (2004): 151-157.
36. Wittwer, Thorsten, et al. "Celsior solution for improvement of currently used clinical standards of lung preservation in an ex vivo rat model." *European journal of cardiothoracic surgery* 15.5 (1999): 667-671.
37. Sakamaki F, Hoffmann H, Muller C, Dienemann H, Messmer K, Schildberg FW. Reduced lipid peroxidation and ischemia-reperfusion injury after lung transplantation

- using low-potassium dextran solution for lung preservation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1073–1081.
38. De Perrot, Marc, et al. "Ischemia–reperfusion–induced lung injury." *American journal of respiratory and critical care medicine* 167.4 (2003): 490-511.
 39. Chen, F., et al. "Effective application of ET-Kyoto solution for clinical lung transplantation." *Transplantation proceedings*. Vol. 36. No. 9. Elsevier, 2004.
 40. Wang LS, Nakamoto K, Hsieh CM, et al. Influence of temperature of flushing solution on lung preservation. *Ann Thorac Surg* 1993;55:711–5.
 41. Machuca, Tiago N., Marcelo Cypel, and Shaf Keshavjee. "Advances in lung preservation." *Surgical Clinics* 93.6 (2013): 1373-1394.
 42. Bon D, Delpéch PO, Chatauret N, et al. Does machine perfusion decrease ischemia reperfusion injury? *Prog Urol* 2014; 24 (Suppl 1):S44–50.
 43. Cameron, Andrew M., and Jose F. Barandiaran Cornejo. "Organ preservation review: history of organ preservation." *Current opinion in organ transplantation* 20.2 (2015): 146-151.
 44. Soncul, Halim, and Sedat Kalaycioglu. "Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung." *Chest* 115.6 (1999): 1672-1677.
 45. Alquicira Mireles, Jesús, y José Luis Arreola Ramírez. *Participación de la serotonina en los cambios de permeabilidad vascular en la preservación pulmonar en conejo*. Facultad de Ciencias 2013.
 46. Martínez Flores, Daniel, y Jesús Alquicira Mireles. *Participación de la gelatinasa B (MMP-9) en la falla primaria del injerto en un modelo de preservación pulmonar de conejo*. Facultad de Ciencias. 2017.
 47. Bonfield, Tracey L., and Arnold I. Caplan. "Adult mesenchymal stem cells: an innovative therapeutic for lung diseases." *Discovery medicine* 9.47 (2010): 337-345.
 48. Moodley, Yuben, Ursula Manuelpillai, and Daniel J. Weiss. "Cellular therapies for lung disease: a distant horizon." *Respirology* 16.2 (2011): 223-237.
 49. Flores-Figueroa, Eugenia, Juan José Montesinos, and Héctor Mayani. "Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica." *Revista de investigación clínica* 58.5 (2006): 498-511.
 50. NIH Stem Cell Information Home Page. In *Stem Cell Information* [World Wide Web site]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2016 [cited March 1, 2018] Available at

51. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 1966;16(3):381–390.
52. Araújo Farias, Virgínea de. *Obtención y caracterización de células del estroma del cordón umbilical humano*. Granada: Universidad de Granada, 2012.
53. Schilders, Kim AA, et al. "Regeneration of the lung: Lung stem cells and the development of lung mimicking devices." *Respiratory research* 17.1 (2016): 44.
54. Keating, Armand. "Mesenchymal stromal cells: new directions." *Cell stem cell* 10.6 (2012): 709-716.
55. Inamdar, Ajinkya C., and Arati A. Inamdar. "Mesenchymal stem cell therapy in lung disorders: pathogenesis of lung diseases and mechanism of action of mesenchymal stem cell." *Experimental lung research* 39.8 (2013): 315-327.
56. Socarrás-Ferrer, Bertha Beatriz, et al. "Células madre mesenquimales: aspectos relevantes y aplicación clínica en la medicina regenerativa." *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 29.1 (2013): 16-23.
57. Yi, TacGhee, and Sun U. Song. "Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications." *Archives of pharmacal research* 35.2 (2012): 213-221.
58. Ghannam, Soufiane, et al. "Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications." *Stem cell research & therapy* 1.1 (2010): 2.
59. Kolios, George, and Yuben Moodley. "Introduction to stem cells and regenerative medicine." *Respiration* 85.1 (2013): 3-10.
60. Guadix, Juan A., José L. Zugaza, and Patricia Gálvez-Martín. "Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular." *Medicina Clínica* 148.9 (2017): 408-414
61. Mordant, Pierre, et al. "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 (2016): 1245-1254.
62. Lee, Jae W., et al. "Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells in ex vivo human lungs injured with live bacteria." *American journal of respiratory and critical care medicine* 187.7 (2013): 751-760.
63. Chen, Qi-Hong, et al. "Interaction between mesenchymal stem cells and endothelial cells restores endothelial permeability via paracrine hepatocyte growth factor in vitro." *Stem cell research & therapy* 6.1 (2015): 44.
64. Pati, Shibani, et al. "Human mesenchymal stem cells inhibit vascular permeability by modulating vascular endothelial cadherin/ β -catenin signaling." *Stem cells and development* 20.1 (2010): 89-101.

65. Pati, Shibani, et al. "Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit inflammation and preserve vascular endothelial integrity in the lungs after hemorrhagic shock." *PLoS one* 6.9 (2011): e25171.
66. Bhattacharya, Jahar, and Michael A. Matthay. "Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury." *Annual review of physiology* 75 (2013): 593-615.
67. Fang, Xiaohui, et al. "Allogeneic human mesenchymal stem cells restore epithelial protein permeability in cultured human alveolar type II cells by secretion of angiotensin-1." *Journal of Biological Chemistry* 285.34 (2010): 26211-26222.
68. Eklund, Lauri, and Pipsa Saharinen. "Angiotensin signaling in the vasculature." *Experimental cell research* 319.9 (2013): 1271-1280.
69. McAuley, Daniel F., et al. "Clinical grade allogeneic human mesenchymal stem cells restore alveolar fluid clearance in human lungs rejected for transplantation." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 306.9 (2014): L809-L815.
70. Snell, Gregory I., et al. "Availability of lungs for transplantation: exploring the real potential of the donor pool." *The Journal of heart and lung transplantation* 27.6 (2008): 662-667.
71. Fang, Xiaohui, et al. "Allogeneic human mesenchymal stem cells restore epithelial protein permeability in cultured human alveolar type II cells by secretion of angiotensin-1." *Journal of Biological Chemistry* (2010): jbc-M110.
72. Wang, Hualing, et al. "Mesenchymal stem cells microvesicles stabilize endothelial barrier function partly mediated by hepatocyte growth factor (HGF)." *Stem cell research & therapy* 8.1 (2017): 211.
73. Kongstad, L., and P. O. Grände. "The capillary filtration coefficient for evaluation of capillary fluid permeability in cat calf muscles." *Acta physiologica scandinavica* 164.2 (1998): 201-211.
74. Pal, Bidisha, and Bikul Das. "In vitro Culture of Naïve Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Stemness Based Approach." *Frontiers in cell and developmental biology* 5 (2017): 69.