



# QUIMERIZACIÓN DE ORGANOS PARA TRASPLANTE

## **Supervivencia y funcionalidad de órganos en condiciones de cultivo – biomodelo porcino**

ALEJANDRA MARÍA JEREZ VALDERRAMA

Trabajo de grado presentado como requisito  
Para obtener el título de Doctor en Ciencias Biomédicas  
Director: Dr. Oscar Gutiérrez.  
Codirectora: Dra. Laura Rodríguez



UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
SANTIAGO DE CALI  
2017

# QUIMERIZACIÓN DE ORGANOS PARA TRASPLANTE

## **Supervivencia y funcionalidad de órganos en condiciones de cultivo – biomodelo porcino**

ALEJANDRA MARÍA JEREZ VALDERRAMA



UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
SANTIAGO DE CALI  
2017

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto es una pequeña parte de la visión de un soñador, un ser que con su genialidad va más allá de lo que la gente del común ve como una realidad. Alguien que en su vida diaria practica una máxima de Albert Einstein **“La imaginación es más importante que el conocimiento”**. Este trabajo se lo dedico a mi “Profe” Dr. Oscar Gutiérrez, quien me ha dado las bases no solo académicas sino también, las bases para mejorar mi ser día a día, amando lo que hago y manteniendo mi capacidad de asombro en mi quehacer diario, mi gratitud por siempre para usted Profe.

Agradezco a Laura Rodríguez por su incondicional ayuda, por sus enseñanzas y su amistad sincera. A Santiago Castaño e Isabella Echeverri por ser amigos incondicionales, por su apoyo y compañía. A todo el grupo de Medicina Regenerativa, por su colaboración y compañía. A Jaime Muñoz por su gran labor en el laboratorio y su ayuda permanente.

A la Universidad del Valle y a mis profesores quienes siempre estuvieron para mí y me ayudaron en la formación.

Especialmente, mi gratitud infinita a mi familia, a mis padres y hermanos, quienes con su amor, apoyo y fortaleza han estado a mi lado y no me han dejado caer. Mi amor profundo para ellos. Mil y mil gracias a amigos, conocidos, a mis estudiantes....todos en su momento han aportado un grano de arena en mi vida personal y profesional.

## CONTENIDO

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| AGRADECIMIENTOS                                                           | 4  |
| INDICE DE FIGURAS                                                         | 6  |
| INDICE DE TABLAS                                                          | 6  |
| 1. RESUMEN                                                                | 8  |
| 2. INTRODUCCIÓN                                                           | 9  |
| 3. JUSTIFICACIÓN                                                          | 11 |
| 4. MARCO TEÓRICO                                                          | 14 |
| 5. OBJETIVOS                                                              | 22 |
| <b>CAPITULO 1. TRASPLANTE DE PULMÓN QUIMERIZADO EN BIOMODELO PORCINO.</b> | 23 |
| 1.1 INTRODUCCIÓN                                                          | 23 |
| 1.2 HIPÓTESIS                                                             | 25 |
| 1.3 METODOLOGÍA                                                           | 26 |
| 1.4 RESULTADOS                                                            | 37 |
| 1.5 DISCUSIÓN                                                             | 50 |
| <b>CAPITULO 2. TRASPLANTE DE RIÑÓN QUIMERIZADO EN BIOMODELO PORCINO.</b>  | 55 |
| 1.2 INTRODUCCIÓN                                                          | 55 |
| 1.2 HIPÓTESIS                                                             | 57 |
| 1.3 METODOLOGÍA                                                           | 58 |
| 1.4 RESULTADOS                                                            | 63 |
| 1.5 DISCUSIÓN                                                             | 66 |
| 6. CONCLUSIONES                                                           | 68 |
| 7. PERSPECTIVAS                                                           | 70 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA                                                           | 71 |

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proporción de personas de 60 años o más por país. 2015 (11)

Figura 2. Proporción de personas de 60 años o más por país. Proyección para el 2050. (11)

Figura 3. Cambios en la esperanza de vida a partir de 1950, con proyecciones hasta el año 2050, por región de la OMS y en todo el mundo (12)

Figura 4. Esquema experimental para evaluar viabilidad del protocolo de quimerización. (28)

Figura 5. Extracción de células de médula ósea. (29)

Figura 6. Procedimiento quirúrgico. (29)

Figura 7. Quimerización de los pulmones. (31)

Figura 8. Esquema experimental para evaluar viabilidad del pulmón en presencia o ausencia de oxígeno en el protocolo de quimerización. (32)

Figura 9. Esquema experimental para evaluar viabilidad del pulmón quimerizado durante trasplante. (34)

Figura 10. Procedimiento quirúrgico de trasplante. (36)

Figura 11. Tejido pulmonar izquierdo en T0. (38)

Figura 12. Pulmón izquierdo quimerizado T1. (39)

Figura 13. Pulmón izquierdo quimerizado T3. (40)

Figura 14. Tejido pulmonar derecho en T0. (41)

Figura 15. Pulmón derecho no quimerizado T1. (41)

Figura 16. Pulmón derecho no quimerizado T3. (42)

Figura 17. Tejido pulmonar derecho en T0. (43)

Figura 18. Pulmón derecho quimerizado sin oxígeno T1 (44)

Figura 19. Pulmón derecho quimerizado sin oxígeno T3. (44)

Figura 20. Tejido pulmonar izquierdo oxigenado en T0. (45)

Figura 21. Pulmón izquierdo quimerizado oxigenado T1. (46)

Figura 22. Pulmón izquierdo quimerizado y oxigenado T3. (47)

Figura 23. Tejido pulmonar izquierdo en T0. (47)

Figura 24. Pulmón izquierdo quimerizado T1. (48)

Figura 25. Pulmón derecho del receptor. (49)

Figura 26. Esquema metodológico para trasplante de riñón quimerizado. (59)

Figura 27. Extracción de médula ósea en biomodelo porcino. (60)

Figura 28. Procedimiento quirúrgico para la extracción del riñón. (61)

Figura 29. Protocolo de quimerización. (62)

Figura 30. Trasplante de riñón quimerizado. (63)

Figura 31. Necropsia del biomodelo con trasplante renal quimerizado. (64)

Figura 32. Placa histológica de riñón quimerizado. (65)

## **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1: Distribución de los 961 procedimientos (trasplantes de órganos sólidos) (9)

Tabla 2. Condiciones experimentales durante el protocolo de quimerización (30)

Tabla 3. Condiciones experimentales durante el protocolo de quimerización (33)

Tabla 4. Reconocimiento anatómico, destreza y estandarización de dosis en la extracción pulmonar de biomodelo porcino. (37)

## **ABREVIATURAS**

**ECNT:** Enfermedades crónicas no transmisibles

**DM:** Diabetes Mellitus

**HTA:** Hipertensión Arterial

**IR:** Insuficiencia Renal

**Fig.:** figura

**T:** Tiempo

**C.M.:** células madres

**CMH:** células madre hematopoyéticas

**IRT:** insuficiencia renal terminal

**EPT:** Enfermedad pulmonar terminal

## **1. RESUMEN**

Debido al incremento en la necesidad de órganos por parte de la población, producto del cambio en el comportamiento demográfico, donde la población senil va en aumento y por ende, la prevalencia de enfermedades crónicas, daño y falla de muchos órganos, existe un desbalance entre la oferta y la demanda de órganos. Este problema ha llevado a buscar estrategias para suplir la necesidad, que van desde soluciones educativas como campañas para promover la donación de órganos, hasta mejorar los procedimientos quirúrgicos, tratamiento de órganos y manejo de los trasplantes. Una de las estrategias, es optimizar las condiciones del órgano antes de la implantación, dándole un tratamiento que mantenga su viabilidad (cultivo del órgano, control de factores ambientales como temperatura, oxigenación y medios de mantenimiento). Es por ello que el objetivo de este trabajo fue diseñar y evaluar un protocolo de quimerización de órganos que permita no solo la viabilidad del órgano, sino también, una mejor tolerancia inmunológica, evitando la pérdida del órgano por procesos como el rechazo agudo y crónico. Para ello, se trabajó en dos modelos de trasplantes quimerizados (pulmonar y renal) en un biomodelo porcino, demostrando histopatológicamente la viabilidad del órgano con este procedimiento.



## 2. INTRODUCCIÓN

La gran demanda de órganos para trasplante y su insuficiente disponibilidad, ha conducido a la búsqueda de estrategias para optimizar la respuesta al trasplante de órganos, con el fin de evitar su pérdida, y evadir el rechazo inmunológico<sup>1</sup>. Entre las causas que pueden estar incidiendo en la creciente demanda de órganos, se encuentra, el aumento en la expectativa de vida de la población, así como el incremento de la prevalencia de las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT), cáncer, enfermedades autoinmunes, infecciosas, congénitas, trauma, etc<sup>1</sup>. A lo anterior se suma la deficiencia en las campañas para incentivar la donación de órganos en nuestro país.

Para darnos una idea del panorama, el Informe Anual de la Red de Donación y Trasplantes del 2013 de Colombia, nos mostró que en ese momento existían 1767 receptores inscritos en la lista de espera para trasplante de órgano sólido, lográndose realizar solo 961 procedimientos, lo que refleja una tasa 20.4 trasplantes por millón de habitantes. De los pacientes en lista de espera fallecieron en ese año 83 receptores potenciales<sup>1</sup>. En contraste, en este mismo periodo tenemos a España líder en el mundo en trasplantes, con una tasa 88.8 por millón de habitantes<sup>2</sup>.

Tabla 1: Distribución de los 961 procedimientos (trasplantes de órganos sólidos)

| ORGANO         | NUMERO DE TRASPLANTES |
|----------------|-----------------------|
| Riñón          | 674                   |
| Hígado         | 177                   |
| Corazón        | 81                    |
| Pulmón         | 8                     |
| Páncreas       | 1                     |
| Intestino      | 2                     |
| Vías aéreas    | 0                     |
| Riñón/Páncreas | 3                     |
| Riñón/Hígado   | 14                    |
| Multivisceral  | 0                     |
| Corazón/Riñón  | 1                     |
| <b>TOTAL</b>   | <b>961</b>            |

Fuente. INS – Sistema Nacional de Información de Donación y Trasplantes

Para ese año, solo se trasplantaron aproximadamente el 48% de las personas que se encontraban en lista. Otro dato importante es el rescate de los componentes anatómicos en ese mismo año, donde se rescataron casi mil órganos para trasplante, siendo el mayor porcentaje riñón con 676, hígado con 187 y corazón

83, y en menor número, pulmón, páncreas y vías aéreas. Del total de órganos rescatados, 42 órganos se descartaron por diferentes causas tales como: dificultades médicas del donante, tiempos de isquemia excesivos, reporte de biopsia desfavorable, mala perfusión, anomalías anatómicas, etc.

Otro aspecto importante estudiado es el número de donantes reales; para el año 2013, la cantidad de donantes reales fue de 329, lo que representa una tasa de 7.0 por millón de habitantes, siendo una de las más bajas a nivel mundial<sup>1</sup>; (en comparación, países como España tiene una tasa de 35.12, Uruguay una de 17,1, Argentina 13,7 y Brasil 12,7 por millón de habitantes)<sup>2</sup>.

El déficit en la oferta para suplir la demanda de órganos, es un problema no sólo de Colombia, sino que atañe al mundo entero, a pesar de las campañas educativas y la normatividad para favorecer la donación de órganos. Por esta razón, es necesario buscar estrategias para encontrar más donantes, una mejor preservación de los órganos, mejor respuesta sin rechazo inmunológico, y sobre todo la posibilidad de trasplantar órganos de especies diferentes a la humana (xenotrasplantes), siendo esta última una prioridad mientras se encuentra el camino de producirlos a partir de células madre del mismo paciente, sueño que se espera sea una realidad en un futuro cercano.

### 3. JUSTIFICACIÓN:

La población mundial está envejeciendo y la tasa de natalidad está disminuyendo, lo cual cambia el comportamiento demográfico, según lo muestra la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el informe mundial sobre el Envejecimiento y la Salud del 2015, y este fenómeno se puede apreciar en las siguientes gráficas pertenecientes a este documento.

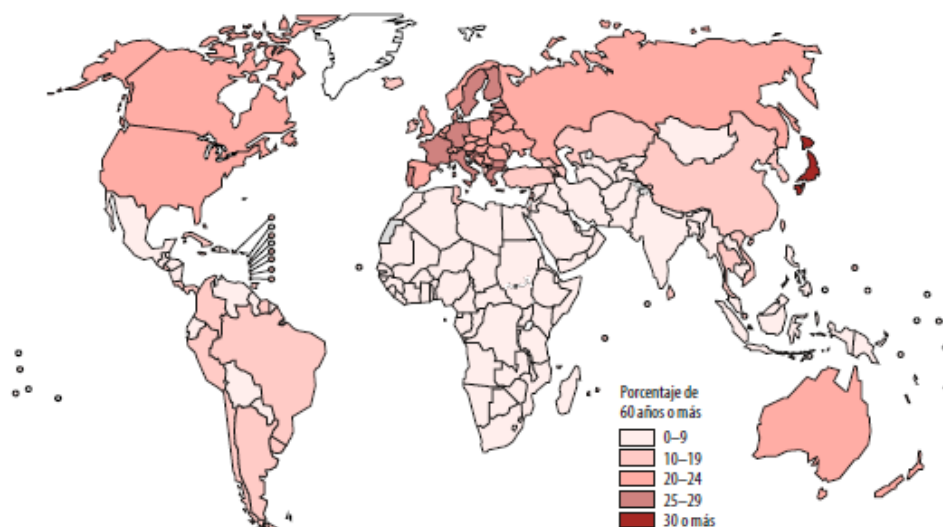


Figura 1. Proporción de personas de 60 años o más por país. 2015

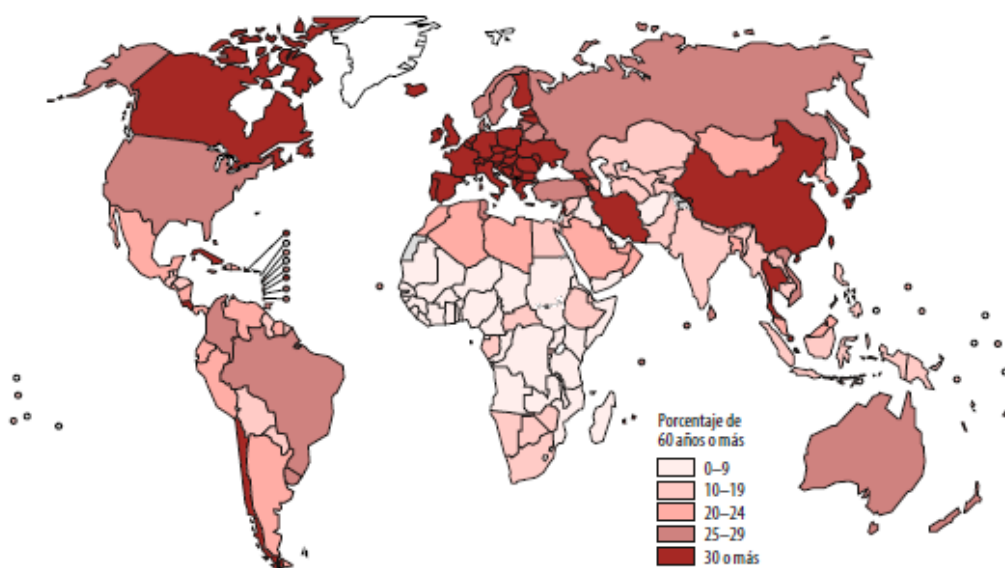


Figura 2. Proporción de personas de 60 años o más por país. Proyección para el 2050.

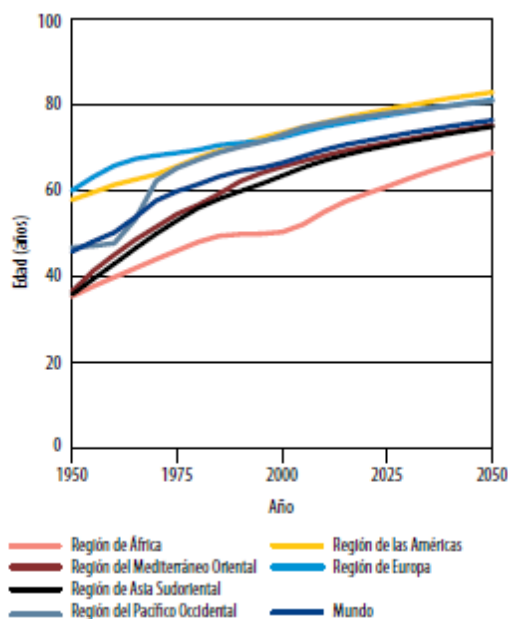


Figura 3. Cambios en la esperanza de vida a partir de 1950, con proyecciones hasta el año 2050, por región de la OMS y en todo el mundo

Hay dos factores asociados al incremento de la población mayor:

1. El aumento de la esperanza de vida: por mejoramiento de las condiciones de vida y salud de la población, los avances en la medicina, la prevención y tratamiento de enfermedades que hasta hace un tiempo eran incurables o producían una alta mortalidad en la población, el mejoramiento en las condiciones higiénicas y mayor acceso a los servicios de salud, entre otros factores.
2. La disminución en las tasas de natalidad: por el uso de métodos anticonceptivos, cambios de estilo de vida (estilos de vida rurales a estilos de vida ciudadanos), educación, ingreso de la mujer en la fuerza laboral, entre otros aspectos<sup>3</sup>.

Las consecuencias de tener una población senil, son el aumento en casos de Enfermedades Crónicas no Transmisibles (ECNT), daños degenerativos que afectan algunos órganos y tejidos producto del mismo envejecimiento, produciendo limitaciones físicas y mentales que conllevan a la pérdida de la calidad de vida de las personas y aumentan los costos sociales de manera significativa.

Analizando una de las ECNT más prevalentes como la Diabetes Mellitus (DM), datos para el 2015, se contaba con 415 millones de personas en el mundo con dicho diagnóstico, de los cuales el 10% tienen DM tipo 1; pero el panorama se

vuelve más sombrío ya que se estimó que para el 2040, serán 642 millones de personas las que padezcan esta enfermedad. En algunas regiones del mundo, el aumento en la incidencia de DM ha sido dramática, como es el caso de México, siendo la prevalencia del 14.9%, e inclusive, en Colombia, se está presentando un crecimiento exagerado.

La prevalencia actual de esta enfermedad en Colombia, es de 8-9% aproximadamente<sup>4</sup>; adicionalmente, la DM, tiene comorbilidades asociadas (se estima que más de la mitad de los pacientes diabéticos presentan Insuficiencia Renal Terminal –IRT-. La falla renal no solo se presenta en pacientes diabéticos, sino también, está muy relacionada con patologías como Hipertensión Arterial, Enfermedades Autoinmunes, etc). Todas estas comorbilidades tienen un alto costo social y económico; la insuficiencia renal, actualmente compromete casi el 2% del gasto de salud total del país sin contar con la disminución de la calidad de vida de los pacientes, la imposibilidad de trabajar y las complicaciones de salud que trae consigo esta condición, amenazando la sostenibilidad de nuestro precario sistema de salud.

Según el informe de la Situación de la Enfermedad Renal Crónica (ERC), Hipertensión Arterial y Diabetes Mellitus en Colombia, para el 2015, se calculó una prevalencia de ERC estadio 5 de 66.8 x cada 100.000 habitantes, presentándose más en hombres que en mujeres<sup>4</sup>, teniendo como alternativa de tratamiento en estadios terminales, diálisis (a un costo social y económico muy alto, pues el 0,5 % de la población consume el 2% del gasto total en salud, sólo en este rubro); el trasplante renal (que disminuye los costos sustancialmente, dando al paciente autonomía, mejor calidad de vida, menos impacto sobre otros órganos, aumentando la expectativa de vida de los pacientes)<sup>4</sup>, tiene la limitación en número para cubrir toda la población necesitada (solo pacientes renales); sin contar otras patologías que tienen como tratamiento trasplante de órganos como (falla cardíaca terminal, DM tipo 1, Falla hepática terminal, etc).

## 4. MARCO TEORICO

### 4.1. Historia de los trasplantes

Jacques de Vorágine (s. XIII), en su libro “Leyenda áurea de la vida de los santos”; hace una compilación de milagros de santos, y en una de las historias describe el milagro realizado por dos santos: San Cosme y San Damián (gemelos del s. III dC, médicos de Siria que fueron martirizados y asesinados por su fe cristiana). Un diácono llamado Justiniano que atendía la iglesia construida en honor a los dos santos, padecía una enfermedad que afectaba su pierna produciéndole gangrena; estando en una condición de muerte inminente y desesperado por el dolor, el diácono se encomendó a estos dos santos. Esa noche, Justiniano soñó con los dos santos y estos amputaron la pierna afectada y realizaron el trasplante de la pierna de un esclavo etíope que había muerto recientemente. Justiniano, se levantó sin dolor y en presencia de otros habitantes de la población, buscó el cadáver del esclavo y pudieron constatar la falta de la extremidad<sup>12</sup>. Este relato de la Edad Media, muestra tal vez en forma de mito el primer trasplante de la historia. Que mucho tiempo después se convirtió en una realidad y se puede apreciar con el trasplante de numerosos órganos vitales y no vitales, tejidos y partes anatómicas que han ayudado a mejorar las condiciones y la calidad de vida de muchos pacientes.

Pero para hablar de trasplantes, se debe pasar por la época del injerto (s. XVIII-XIX), evidenciado en escritos como el del cirujano hindú Sushruta, quien al parecer realizó injertos de piel del mismo individuo o el cirujano chino Hua-To quien posiblemente realizó sustitución de “órganos enfermos”. En el siglo XVIII, se perfecciona el injerto vegetal y se inicia la experimentación del injerto animal, con lo cual, se pudo comprender procesos como cicatrización, regeneración tisular y eventos de rechazo.

En el siglo XIX se da la base científica y terapéutica del injerto, con el trabajo de Berthold de Gotinga sobre injertos de testículo en pollos castrados con resultados favorables. Boronio (1804), experimentó con injertos de piel de oveja sobre el mismo animal (autoinjertos); en 1869 el cirujano Jacques Louis Reverdin, realizó los primeros injertos de piel en humanos, con buenos resultados, dando lugar a la utilización de esta técnica como terapia para pacientes con pérdidas cutáneas. Posteriormente, se aplica esta técnica pero tomando tejido cutáneo de cadáveres o diferentes animales (pero se presentaron fracasos, producto de infecciones y rechazo). Gracias a estos experimentos se pudo aclarar varios conceptos como la compatibilidad entre el parentesco biológico del donante y el receptor, la incompatibilidad entre diferentes especies y los primeros conceptos de la inmunología del trasplante<sup>13</sup>.

Los avances en el campo de los trasplantes dependen del avance en el campo de la cirugía y anestesiología, como fue la introducción del cloroformo, uso de antisépticos y avances en técnicas quirúrgicas como anastomosis vasculares. En la mitad del siglo XIX, Brown Sequard, Wilde y Ludwig, demostraron que la rápida reperfusión de los órganos extraídos permitía la recuperar la viabilidad y funcionalidad del órgano; para 1890, Locke y Ringer, logran resultados similares con la perfusión de órganos con medios nutritivos de sueros sustitutos a la sangre<sup>14</sup>.

El modelo quirúrgico escogido para experimentar fue el riñón, ya que es un órgano doble, con vasos de calibre grande, uréteres también de buen tamaño y fácil maniobra y se puede verificar su funcionalidad con la presencia de orina del paciente. En 1902 se logró trasplantar un riñón de un perro en otro perro con resultados parcialmente favorables (también se realizó otro experimento en un biomodelo canino, de implantar un riñón en el cuello). En 1906 se publica el primer xenotrasplante en humano (trasplante de un riñón de cerdo en el codo de una mujer con síndrome nefrótico), y aunque el órgano falló a los 3 días, se logró producir 1500cc de orina el primer día; ese mismo año se intentó hacer lo mismo pero con un riñón de cabra en el codo de una mujer con anuria, pero a la hora se presentó una trombosis vascular del órgano; se realizaron varios xenotrasplantes con malos resultados y al igual que los injertos, se encaminaron en el estudio del rechazo de los órganos trasplantados de diferentes especies.

En 1924, Williamson en la Clínica Mayo, continuó con los trabajos experimentales de autotrasplantes ayudando en el campo de la inmunología como la compatibilidad sanguínea y su influencia en la aceptación o rechazo del órgano, que era tomado como un fenómeno de hipersensibilidad.

En 1933, el ruso Serge Voronoff logra realizar el primer trasplante renal en humanos, en un joven con falla renal terminal; el riñón donante provenía de un hombre de 60 años recién fallecido. El joven trasplantado murió a los 4 días del procedimiento. Voronoff, continuó su investigación, y en 1949, ya había realizado otros 6 casos similares pero sin obtener buenos resultados.

En 1947 en Boston, el grupo del Dr. Hume, realizó el primer trasplante renal de cadáver *in vivo* en los EEUU, a una paciente que presentaba una falla renal secundaria a un aborto séptico. Se implantó el riñón de un hombre recién fallecido en el codo de la paciente, funcionando por 24 hrs, pero falló en ese tiempo. Durante este período la paciente se recuperó de la falla renal y sobrevivió (aunque su trasplante no), por lo cual, lo consideraron como un éxito. El Dr. Hume y su equipo continuaron con los alotrasplantes pero con implantación externa sobre el muslo de los pacientes (9 casos); también demostró el beneficio de la transfusión

sanguínea previa a los pacientes a trasplantar para demorar el rechazo, y adicionalmente encontró una manera de controlar la presión sanguínea postrasplante realizando la nefrectomía bilateral, logrando con estos cambios adicionales la supervivencia de pacientes hasta por 5 años.

En 1951, se realizó el primer trasplante renal de donante vivo, pero presentó rechazo por incompatibilidad biológica entre el donante y el receptor. En 1954, el Dr. Murray y su equipo realizaron el primer trasplante renal con donante vivo entre gemelos univitelinos y ubicación intrapelvica; el paciente sobrevivió muchos años.

Ya para los años 60, se conocía que para el éxito del trasplante era necesaria la compatibilidad entre el donante y el receptor y se conocía que el sistema inmunológico producía respuesta de rechazo a todo lo extraño, por lo tanto, se hizo necesaria la inmunosupresión para evitar dicho rechazo. Porter, Edelman, Kissmeyer-Nielsen y Tersaki investigaron la inmunología humoral y el grupo de Kahler, Milstein, y colaboradores, la inmunología celular. Otros aportes importante en el campo de la inmunología, lo da Jean Dausset con el descubrimiento del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en 1962, pero su aplicación clínica solo se realizó 10 años después. También 1962, Hamburger logró la tipificación del tejido y en 1966, Kissmeyer-Nielsen incorporaron una prueba cruzada o cross-matching para seleccionar donantes y receptores.

En 1959, en Boston se realizó trasplante renal con éxito entre gemelos dicigóticos previa inmunosupresión; la inmunosupresión se logró con irradiación y tuvo una supervivencia de 20 años. Ya para 1960, se realizaron 3 trasplantes renales en pacientes no emparentados con inmunosupresión por irradiación y utilización de fármacos inmunosupresores como 6-mercaptopurina y corticoesteroides, logrando éxito en el trasplante pero los pacientes fallecieron posteriormente por rechazo crónico y sepsis. Con la introducción de fármaco inmunosupresores, se inicia una época en búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas como metotrexato, ciclosporina, corticoides, entre otros, hasta llegar a la Azatioprina, en la que ya no era necesaria la utilización de la irradiación como mecanismo de inmunosupresión.

También para la década del 60, en muchos países se da el concepto de muerte cerebral, permitiendo la creación de leyes que regulan la donación de órganos para trasplantes. 1967, Belzer inventa una máquina pulsátil que permite mantener perfundido el órgano, disminuyendo el daño por isquemia<sup>13</sup>.

Cada órgano potencialmente trasplantable tiene su propia historia y su propio camino en el área de los trasplantes. Se tomaban paralelamente todos los estudios, como por ejemplo: avances en inmunología, técnica quirúrgica (cirugía vascular, anastomosis), medios de cultivo y preservación, inmunosupresión



farmacológica, entre otros, que ayudaron en su momento para lograr los resultados que hoy en día existe en este campo.

Para llegar al trasplante cardiaco (algo tal vez inimaginable en su momento), se requirieron muchos experimentos como avances en la cirugía cardiaca (sutura de heridas cardiacas, correcciones de malformaciones congénitas como cierre de ductos persistentes, tetralogía de Fallot, etc). En 1946 el ruso Demikhov, comenzó a trasplantar corazones accesorios en el pecho de perros, constituyéndose como el antecedente al trasplante cardiaco heterotópico. En la década de los 50's, se iniciaron los trasplantes cardiacos en perros con posición ortotópica (aunque en ese momento no se había inventado ni la hipotermia, ni el bypass cardiopulmonar).

En la misma época, los Doctores Marcus, Wong y Luisada en Chicago publicaron una nueva técnica de trasplante cardiaco en biomodelo canino. Éste grupo utilizó 3 perros para la cirugía (un perro era donante, otro receptor y el tercer perro era apoyo del corazón donante, mientras se realizaba la cirugía), este método se denominó "Perfusión parabiótica provisional".

Para 1953, en Filadelfia, el grupo del Dr. Neptune, realizó el primer trasplante cardiaco induciendo hipotermia en posición ortotópica en un biomodelo canino; posteriormente, en 1957, Webb y Howard emplearon una bomba oxigenadora durante el procedimiento.

El cirujano Shumway, fue el pionero en el trasplante cardiaco en humanos. En 1960, este cirujano y su grupo publicaron la técnica de trasplante "Shumway" aún utilizada que preserva parcialmente las aurículas y con ayuda de una bomba oxigenadora para el procedimiento; además, aportaron el uso de solución salina isotónica a 4°C, para preservar el corazón.

El 2 de diciembre de 1967 Cristiaan Barnard y su equipo de cirugía, lograron realizar en Sudáfrica el primer trasplante cardiaco exitoso; se trasplantó el corazón de una mujer con diagnóstico de muerte cerebral, a un hombre de 53 años con DM y enfermedad coronaria severa y falla cardiaca terminal; para ello, extrajo el corazón, lo enfrió y lo conectó a una bomba oxigenadora y lo implantó; el trasplante fue un éxito, el corazón empezó a latir en el paciente luego del implante. 12 días después, el paciente empezó a deteriorarse especialmente en su parte respiratoria. En ese momento sospechaban que se estaba presentando rechazo del implante e iniciaron manejo con inmunosupresores, aunque el problema era que el paciente realmente presentaba una sobreinfección por *Pseudomona*, que provocó su muerte 18 días después del trasplante.

El 6 de diciembre de 1967, el doctor Kantrowitz y su grupo de cirujanos lograron en Nueva York realizar el primer trasplante en niños. El donante fue un niño con anencefalia y el receptor un niño de 3 semanas de edad con diagnóstico de atresia tricuspídea y comunicación interauricular. El trasplante se realizó bajo el método de hipotermia, con parada circulatoria completa y luego se consiguió que el corazón tuviera un ritmo sinusal. El problema fue que el paciente presentó complicaciones como acidosis metabólica y respiratoria que lo llevó a la muerte.

El doctor Barnard realizó otro intento en enero de 1968, logrando trasplantar un paciente, realizando su método propuesto y haciendo una modificación en la técnica de Shumway. Este paciente logró vivir 18 meses posterior al trasplante, teniendo una vida casi normal, tiempo en el cual, escribió un libro "Looking at my heart". El grupo de trasplante de Dr. Barnard logró realizar 10 procedimientos (entre 1967-1973), con éxito para la época. En 1971, realizaron trasplante cardíaco y pulmonar en bloque; el paciente sobrevivió 23 días, pero fue el mejor resultado para la época en este tipo de trasplantes. El Dr. Barnard continuó con sus estudios, logrando desarrollar la técnica de trasplante cardíaco heterotrópico (una de sus técnicas se encuentra vigente). Otro intento de este grupo, fue la realización de xenotrasplante, trasplantando el corazón de 2 primates no humanos en 2 hombres, pero los resultados no fueron los esperados.

Solo hasta 1981, se logró realizar con éxito el primer trasplante cardiopulmonar, realizado por el Dr. Reitz y su equipo de la universidad de Stanford.

En 1984, en Texas, Cooley realizó trasplante cardíaco en una niña de 8 meses de edad con éxito, la niña presentó un episodio severo de rechazo manejado con ciclosporina A y corticoides y alcanzó una sobrevida de 13 años<sup>15</sup>. Ya para 1986, se había realizado unos 2000 procedimientos en el mundo y en la actualidad es el procedimiento en el ámbito terapéutico más común.

El trasplante hepático tardó un poco más en realizarse que el renal. En 1963, se realizó sin éxito por parte del Dr. Starzl; sin embargo, para 1967 los resultados mejoraron, gracias a mejoras en la técnica quirúrgica como el Bypass vena/vena, para derivar sangre de la vena cava inferior a la circulación portal. Además del uso de inmunosupresores, elección de candidatos a donantes, mejoras en cuidados post operatorio, entre otros.

En el área de la farmacología, la inmunosupresión ha evolucionado, creando cada vez más fármacos selectivos como la ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, micofenolato de mofetilo, entre otros, hasta llegar a anticuerpos monoclonales. Además han variado los regímenes de inmunosupresión, que inician con dosis altas y se van disminuyendo según la necesidad y respuesta del paciente; esta

combinación de inmunosupresores con diferentes “Blancos” o mecanismos de acción logran un efecto mayor tratando de disminuir efectos adversos.

A pesar de todos los avances en estas terapias, los riesgos de los pacientes producto de la inmunosupresión siempre están presentes, como neoplasias malignas, infecciones graves por agentes infecciosos oportunistas como *Pneumocystis jirovecii*, Citomegalovirus, *Aspergillus*, *Cándida*, etc; además de la posibilidad de toxicidad y reacciones alérgicas.

El éxito del trasplante no solo se ha logrado con los avances quirúrgicos e inmunológicos para evitar el rechazo, sino en el tratamiento del órgano para su preservación. Se conoce que la pérdida de circulación del órganos lo lleva a un tiempo de isquemia, que produce cambios en el metabolismo celular, pasando de un metabolismo aerobio a uno anaerobio; esto le exige a las células mayor sustrato de glucosa para el sostenimiento en la producción de ATP. Además, se acumulan metabolitos tóxicos y ácido láctico que cambian el pH del medio, produciendo fallas a nivel de bombas de membrana, que alteran la concentración de electrolitos como el sodio, el potasio, calcio, etc, alterando la funcionalidad de las membranas y daño en su integridad, traducándose en muerte celular. El propósito de la preservación del órgano, se ha logrado gracias a avances como la hipotermia (el enfriamiento disminuye la tasa metabólica, retrasando los cambios descritos), pero esto no es suficiente, porque la reperfusión trae consigo otros daños que alteran la viabilidad celular. Otro avance fue la producción de soluciones de preservación, con las cuales son minimizada las lesiones ocasionadas por la reperfusión. Estas soluciones contienen electrolitos y un pH muy similar al fisiológico. Entre las soluciones se encuentran: solución de Wisconsin, Euro-Collins, HTK, Custodiol, entre otras. En cuanto a la preservación de órganos, se han buscado estrategias como creación de equipos de perfusión del órgano y se ha empleado en riñón, pulmón, páncreas, entre otros<sup>16</sup>.

Aunque se han logrado grandes avances, todavía falta camino por recorrer, la escasez de órganos para la demanda es un gran problema, siendo una probable solución, la utilización de los xenotrasplantes o la creación de órganos a partir de células madre o materiales biocompatibles; pero para llegar a esto, se necesitarán más estudios sobre inmunología, biotecnología, bioingeniería, etc.

## **4.2 Estrategias de tolerancia**

En algunos pacientes, cuando un órgano falla o deja de cumplir su función, la opción de vida es el trasplante de órganos, que consiste en reemplazar el órgano

en falla por uno funcional, (esto también aplica no solo para órganos, sino para tejidos y componentes anatómicos que permitan hacer este procedimiento); el cual implica el riesgo de ser rechazado inmunológicamente por el receptor.

El sistema inmunológico tiene todo un sistema de reconocimiento de antígenos, los cuales son presentados a moléculas de histocompatibilidad que tienen por función presentarlos a los linfocitos T (células encargadas de la defensa); este sistema se denomina Complejo principal de histocompatibilidad, HLA. Cada complejo tiene un polimorfismo, lo que diferencia de una persona a otra y esto es lo que contribuye a la respuesta inmunológica frente a trasplantes (alotrasplantes = trasplantes de órganos o tejidos entre personas genéticamente diferentes)<sup>5</sup>.

Lo que se busca al realizar un trasplante de órganos o tejidos, es superar esa respuesta inmunológica de rechazo y esto se ha logrado mediante 3 formas:

4.2.1 EMPAREJAMIENTO: es la vía con mayor probabilidad de éxito, se busca el mismo perfil de los antígenos de HLA (órgano del mismo receptor, hermanos gemelos idénticos o se busca en la familia quien tiene el mismo perfil); si una persona necesita un trasplante y esa persona cuenta con varios hermanos, un cuarto de esos hermanos podrían presentar un HLA compatible. Si esto se logra, se requerirá de medicamentos inmunosupresores a bajas dosis y seguramente se obtendrán buenos resultados del trasplante, pero esto solo se puede dar en órganos no vitales como médula ósea o un riñón. Desafortunadamente la mayoría de los trasplantes se hacen con donantes no emparejados.

4.2.2 INMUNOSUPRESIÓN NO ESPECIFICA: este método es el que ha logrado el éxito de la mayoría de los trasplantes en el mundo, se utilizan fármacos con acción sobre el sistema inmunológico, deprimiendo su función para evitar el rechazo de los trasplantes de órganos. Es todo un campo de estudio y cada vez hay más fármacos inmunosupresores que han ayudado con el éxito en los trasplantes. Estos fármacos incluyen esteroides, antimetabolitos, anticuerpos monoclonales y aunque su mecanismo de acción no es específica, tienen selectividad para modificar la funcionalidad de las células T del sistema inmunológico y por esta razón tienen la facultad de modificar la respuesta inmunológica a los trasplantes. El problema de este grupo de fármacos es que al disminuir la respuesta inmunológica en los pacientes trasplantados, estos tienden a tener una mayor susceptibilidad a desarrollar infecciones y algunos tipos cáncer. Lo otro a tener en cuenta, es que a pesar de lo efectivo de su mecanismo de acción, se puede dar rechazo agudo o

crónico a pesar del tratamiento, con pérdida de los órganos trasplantados y riesgo de muerte de los pacientes<sup>6</sup>.

4.2.3 INDUCCIÓN DE TOLERANCIA AL TRASPLANTE: se define como la ausencia de respuesta del sistema inmunológico frente a un antígeno específico, inducida por contacto previo con dicho antígeno. Esto se ha visto especialmente en pacientes a quienes se les ha realizado trasplante de células madre hematopoyéticas del donante al receptor y posterior a esto, se le trasplanta un órgano del mismo donante. Lo que se ha podido encontrar es que en los pacientes trasplantados hay células circulantes del donante dando una forma de QUIMERISMO, que consiste en encontrar información genética del receptor en la circulación (sistémico), produciendo una forma de tolerancia inmunológica y siendo aceptado por el sistema inmunológico como propio<sup>7,8,9</sup>

4.2.4 QUIMERISMO: En medicina se le denomina “quimera”, al organismo formado por células procedentes de diferentes individuos o un individuo con información genética de diferentes personas, por ejemplo: un bebe es la quimera de ambos padres (tiene información genética de la mamá y del papá) y este evento no solo se ve en la gestación, sino también en trasplantes de órganos o transfusiones<sup>10,11</sup>.

QUIMERIZACIÓN: Se le denomina al procedimiento *In vitro* para la formación de quimeras (proceso en que se quiere transferir información genética del receptor al órgano a trasplantar). Originalmente se denominó así al resultado de la fusión de dos o más genes, produciendo uno o múltiples polipéptidos con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales. Las proteínas de fusión recombinantes son creadas artificialmente mediante tecnología de ADN recombinante para su uso en investigación biológica o terapéutica.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un proceso para mejorar la viabilidad del órgano (quimerizado) a trasplantar.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- Evaluar variables del proceso de quimerización de pulmón en un biomodelo porcino para mejorar viabilidad del órgano a trasplantar.
- Evaluar el proceso de quimerización de riñón en un biomodelo porcino para mejorar viabilidad del órgano a trasplantar.

# **CAPITULO 1. TRASPLANTE DE PULMÓN QUIMERIZADO**

## **EN BIOMODELO PORCINO**

### **1.1 INTRODUCCIÓN**

El trasplante pulmonar es una opción terapéutica para pacientes con enfermedad pulmonar avanzada o fase terminal, donde la terapia convencional no funciona, y con una expectativa de vida menor a 2 años<sup>17</sup>.

El primer trasplante unilateral pulmonar en un ser humano fue realizado por el Dr. James Hardy (1963) en la Universidad de Mississippi. El paciente era un prisionero de 58 años condenado a muerte y que padecía de enfisema y cáncer pulmonar y además, presentaba una insuficiencia renal. El pulmón trasplantado provenía de donante cadavérico. El paciente estuvo vivo por 18 días con buena función pulmonar pero murió a causa de la reagudización de su falla renal. En los años siguientes, se continuó con los procedimientos de trasplantes en el mundo, uno de estos, fue en Bélgica en 1968, logrando el paciente una supervivencia de 10 meses. Los siguientes 15 años se realizaron aproximadamente 38 trasplantes pulmonares, todos fatales y la causa de muerte más común era la dehiscencia bronquial. En la Universidad de Toronto, hasta hoy referente en el trasplante pulmonar y en otros lugares, mejoraron las técnicas quirúrgicas y la respuesta inmunológica con el uso de inmunosupresores como la Ciclosporina A, los cuales han dado mejores resultados y una mayor supervivencia en los pacientes trasplantados<sup>14</sup>.

A pesar de los avances quirúrgicos y terapéuticos en el trasplante pulmonar en el mundo, se ha logrado una supervivencia del 78% en el primer año post-trasplante, 65% en el tercer año y 48% en el quinto año. Por esta razón la elección de los candidatos para recibir un trasplante debe cumplir unos criterios: Uno de ellos, es que la expectativa de vida no sea mayor a 2 años, no presentar infecciones activas que pongan en riesgo la viabilidad del trasplante (Ej: VIH), entre otros<sup>18,19</sup>.

El donante también debe cumplir unos criterios, como la edad (no mayor de 55 años), no presentar infecciones y condición clínica aceptable<sup>18,19</sup>.

Las complicaciones de este trasplante pueden darse en la fase aguda (los primeros 30 días del trasplante), con disfunción primaria del injerto, este rechazo agudo se manifiesta en el 40% de los casos en el primer mes y 90% después del año. En el rechazo crónico (después del año del trasplante), la manifestación clínica más

común es la bronquiolitis obliterante, la cual produce una alta mortalidad en los pacientes trasplantados. Otras de las complicaciones es la presencia de infecciones por el uso de fármacos inmunosupresores para evitar el rechazo<sup>20</sup>.

En Colombia se realizó el primer trasplante pulmonar en Medellín en la clínica cardiovascular (1997), y desde esa época hasta hoy se realizan en múltiples sitios del país. Cada vez, el trasplante pulmonar es la opción más adecuada para muchos pacientes que no tienen otra alternativa terapéutica y por esta razón, es necesario seguir buscando mejoras en el procedimiento para aumentar la expectativa y la calidad de vida de los pacientes<sup>21</sup>.

En la actualidad, el trasplante pulmonar, es uno de los más complicados, ya que es un órgano que presenta condiciones especiales, como el contacto con el ambiente por el intercambio gaseoso que conlleva estar en contacto con gérmenes y contaminantes. Aunque se han mejorado las técnicas quirúrgicas y farmacológicas para evitar el rechazo agudo y crónico, como la bronquiolitis obliterante (BOS), no existe un tratamiento eficaz para evitarlo y tratarlo, siendo, quizás la causa más probable de pérdida del trasplante y muerte de los pacientes; por eso la supervivencia de este trasplante a 10 años es tan solo del 20%, sin contar con otros aspectos siempre presentes, como la toxicidad de los inmunosupresores, infecciones por oportunistas y un mayor riesgo para el desarrollo de cáncer, producto de la inmunosupresión.<sup>22,23</sup>

El mantenimiento del órgano, previo al trasplante es determinante para el éxito del procedimiento. Se han ideado alternativas para la conservación y buen estado del órgano, como cámaras de transporte, donde se mantiene insuflado y con intercambio gaseoso, o cámaras que contienen medios de mantenimiento y preservación, todo en búsqueda de disminuir los daños potenciales en el órgano<sup>24</sup>.

En la actualidad, la producción de órganos humanos usando modelos animales, se contempla como una posibilidad viable debido a las estrategias de quimerización, donde se busca por medio de manipulación genética, transferir la información genética humana para la formación de órganos específicos en la etapa embrionaria del modelo animal, convirtiéndolos en híbridos<sup>25</sup>.

Nuestro enfoque busca optimizar, tanto el tratamiento del órgano para que tenga un mejor estado y funcionalidad, así como el éxito del trasplante.

Por ello, una propuesta actual es la quimerización de órganos cuya finalidad es proporcionar un mejor acondicionamiento del órgano a su receptor, evitando el rechazo agudo y crónico.



## 1.2 HIPOTESIS:

- H1: La presencia de células madre hematopoyéticas mejora la viabilidad del órgano a trasplantar entre individuos no relacionados en un biomodelo porcino
- H0: La presencia de células madre hematopoyéticas no mejora la viabilidad del órgano a trasplantar entre individuos no relacionados en un biomodelo porcino
- H2: La presencia de oxígeno durante el proceso *In vitro* del órgano, mejora la viabilidad del órgano a trasplantar.
- H0: La presencia de oxígeno durante el proceso *In vitro* del órgano, no mejora la viabilidad del órgano a trasplantar.

### 1.3. METODOLOGIA

El protocolo metodológico se presentará de forma cronológica, según las variables experimentales analizadas.

Los procedimientos quirúrgicos y de laboratorios como la quimerización se realizaron en el Bioterio, Centro de Habilidades quirúrgicas y en el Laboratorio In Vitro de la Universidad del Valle.

#### 1.3.1 BIOMODELO - CERDO 1: Estudio anatómico y estandarización de procedimiento quirúrgico y anestésico.

Se tomó un biomodelo porcino hembra raza *Zungo Costeño*, con un peso: 20Kg para estudio anatómico y reconocimiento quirúrgico y anestésico.

Equipo de trabajo para procedimiento quirúrgico:

Veterinario

Médico cirujano de tórax

Médico cirujano de trasplantes

Anestesiólogo

Instrumentador

Circulante

Auxiliar de laboratorio

Bacteriólogos

Médicos farmacólogos

**Pre-operatorio.** El biomodelo se mantuvo en ayuno por 12 horas y se trasladó de la pira al Centro de Manualidades quirúrgicas de la Universidad del Valle. El Veterinario y anestesiólogo, canularon 2 vías venosas (una en cada oreja del biomodelo), e iniciaron manejo con líquidos endovenosos (solución salina normal) y le realizaron premedicación anestésica con Xilacina 2mg/kg y Acepromazina 10mg/ml. Es pesado, lavado y afeitado en la zona de la incisión. El biomodelo se

llevó a quirófano y se colocó en posición decúbito prono para la intubación orotraqueal con tubo de 7.0mm. Se posicionó decúbito lateral izquierdo y se conectó a la máquina de anestesia con monitoria constante de los signos vitales (pulsooxímetro, temperatura, presiones centrales).

Se realizó procedimiento quirúrgico bajo anestesia general del biomodelo, con propofol 4 mg/kg y dosis de mantenimiento de 1.3 mg/kg/min, fentanilo 3mg/kg, Ketamina 15 mg/kg y atracurionio 0.6 mg/kg.

**Extracción del órgano:** se realizó Neumonectomia izquierda, para extracción de ese pulmón, siendo el que tiene menos variables anatómicas comparadas con el pulmón derecho, de más fácil acceso e implantación. Se extrajo y se realizó el estudio pertinente. El biomodelo fue sacrificado por medio de eutanasia cumpliendo con los protocolos autorizados por el Comité de Ética Animal.

### **1.3.2 BIOMODELO – CERDO 2: TIEMPO DE QUIMERIZACION IN VITRO Y VIABILIDAD DEL ORGANO**

EL proceso de quimerización se realizó en dos fases:

Se emplearon dos biomodelos: un cerdo macho raza *Zungo Costeño* (donante de células madre hematopoyéticas) y un cerdo hembra raza *Zungo Costeño* a quien se le realizó la neumonectomía total (pulmón derecho sin quimerizar y pulmón izquierdo quimerizado) y se observó viabilidad del tejido con el tiempo en las 2 condiciones. (Figura 4).

Personal que participó en el procedimiento:

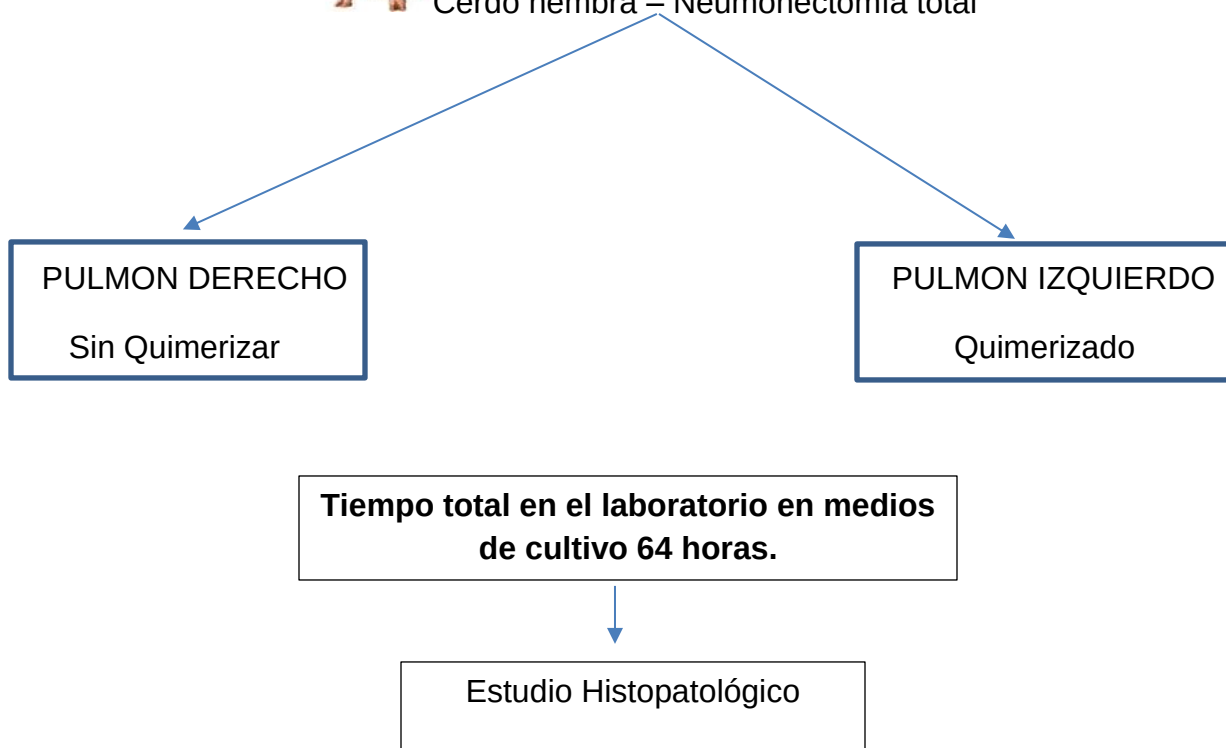
|                                |                         |
|--------------------------------|-------------------------|
| Veterinario                    | Bacteriólogos           |
| Médico cirujano de tórax       | Hematólogo              |
| Médico cirujano de trasplantes | Patólogo                |
| Anestesiólogo                  | Médicos farmacólogos    |
| Instrumentador                 | Auxiliar de laboratorio |
| Circulante                     |                         |



Cerdo macho – donante de las células madres hematopoyéticas

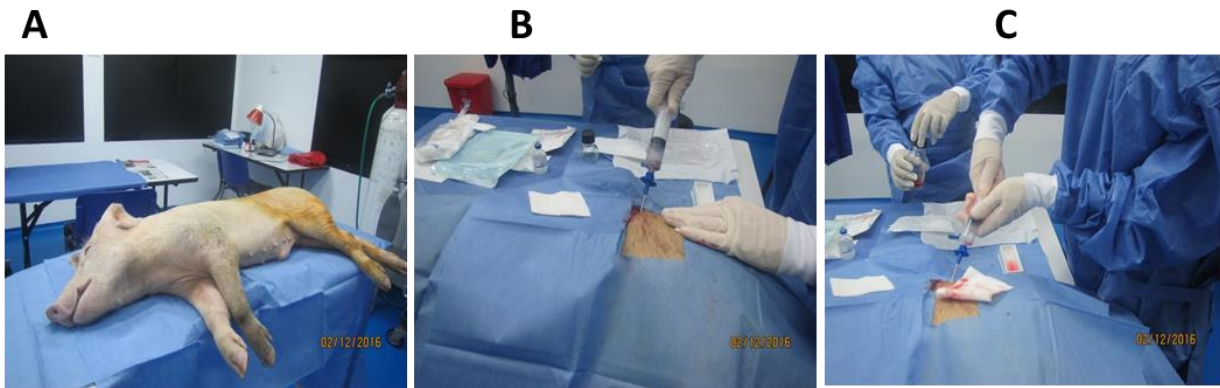


Cerdo hembra – Neumonectomía total



**Figura 4. Esquema experimental para evaluar viabilidad del protocolo de quimerización.**

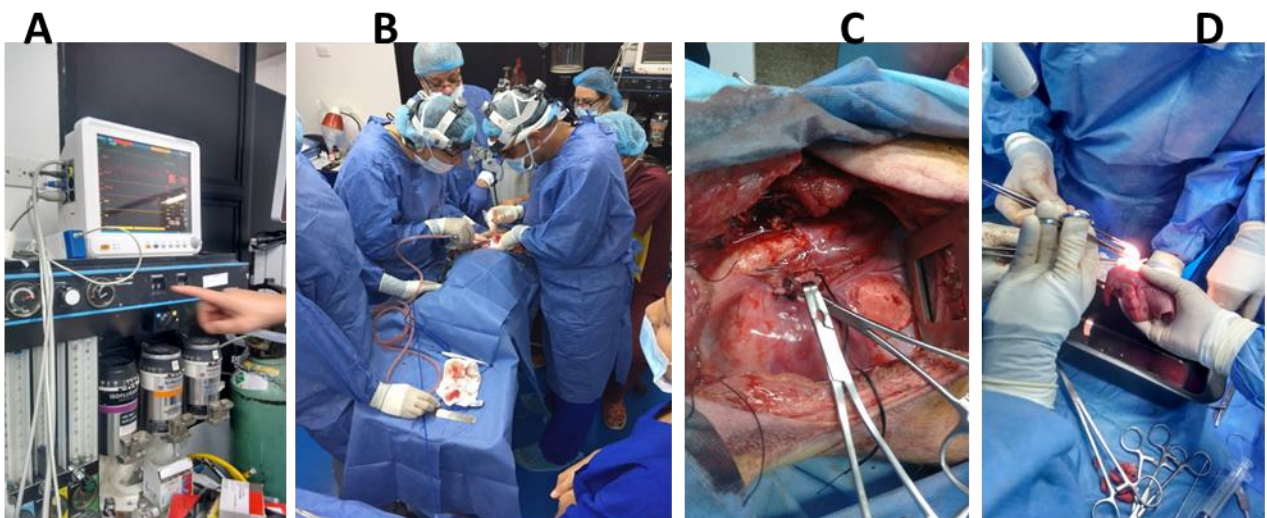
**Día 1:** Se realizó extracción de Células madres hematopoyéticas del cerdo macho con un peso de: 20kg. El procedimiento fue realizado en quirófano bajo todas las condiciones de asepsia, bajo sedación y anestesia (Procedimiento similar al biomodelo1). Se extrajeron 90 ml de médula ósea con solución salina heparinizada. (Fig 5)



**Figura 5. Extracción de células de médula ósea.** A. Biomodelo anestesiado previo al procedimiento. B. Punción de cresta iliaca para extracción de células. C. Recolección de células de médula ósea.

**Día 2:** Se realizó procedimiento quirúrgico de toracotomía con neumonectomía en el cerdo hembra con un peso de 20 kg, bajo anestesia general, (procedimiento prequirúrgico, quirúrgico y postquirúrgico similar al biomodelo 1)

En el procedimiento quirúrgico se realizó reconocimiento de las partes, se realizó disección de bronquio principal de ambos pulmones, arteria y vena pulmonar y posteriormente se canuló la arteria pulmonar para poder realizar lavado y cultivo del órgano en el laboratorio (Fig 6).



**Figura 6. Procedimiento quirúrgico.** A. Monitorización de signos vitales. B. Equipo de trasplantes. C. Toracotomía abierta, visualización pulmonar. D. Rescate pulmonar.

Los pulmones se lavaron en quirófano con solución de lavado HBSS (Fig. 6C) se transportaron en bolsas estériles y fueron llevados a 4°C al laboratorio In Vitro de la Universidad del valle para proceder con la quimerización.

PULMON DERECHO no se quimerizó, solo se realizó el lavado con solución de RPMI y Hanks para remover células sanguíneas del donante por 4 horas a una temperatura de 4°C y luego se dejó en medio de cultivo que contiene nutrientes (aminoácidos, oligoelementos, antibióticos y factores de crecimiento), por 4 horas a la misma temperatura, incrementándose a 30°C por las siguientes 4 horas. Posterior a esto, se mantuvo a temperatura ambiente (20 – 25°C) hasta completar 64 horas. Durante este tiempo siempre se mantuvo control del medio (medición de gases, control de oxígeno y temperatura), cambio de medio cada 12 horas.

PULMON IZQUIERDO se realizó un manejo parecido al derecho con la diferencia que se realizó el procedimiento de quimerización. Se lavó con solución de RPMI y Hanks por 4 horas a temperatura de 4°C, luego se dejó en medio de cultivo por 4 horas a 4°C y posterior a esto se cultivó el pulmón en medio de cultivo más células madre hematopoyéticas del cerdo macho por 4 horas a 30°C. Una vez completado este tiempo, se retiran las células madre, se adiciona medio de cultivo fresco y se mantiene a temperatura ambiente hasta completar 64 horas. Se continuó con monitoria de la oxigenación, temperatura y gases arteriales.

Ambos procedimientos se realizaron en Equipo de Mantenimiento de Órganos fabricado en vidrio (EMOQ -proceso de patente), conectado a un intercambiador de calor que posee dos extremos, mediante un sistema de mangueras, conectando un extremo a la cánula del órgano que va a la arteria pulmonar y el otro a una bomba peristáltica que mantiene el flujo a 15ml/min. El órgano permaneció inmerso en el medio de cultivo durante todo el proceso, manteniendo oxigenación constante con una saturación del 100% y control de la temperatura por medio del intercambiador de calor (tabla 2).

**Tabla 2. Condiciones experimentales durante el protocolo de quimerización**

| PULMON IZQUIERDO                                                                           | PULMON DERECHO                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <b>QUIMERIZADO</b>                                                                         | <b>NO QUIMERIZADO</b>                                                           |
| PRIMER LAVADO: 4° C por 4 horas                                                            | PRIMER LAVADO: 4° C por 4 horas                                                 |
| SEGUNDO LAVADO: 4°C por 4 hrs                                                              | SEGUNDO LAVADO: 4°C por 4 hrs                                                   |
| QUIMERIZACIÓN: Implantación células madre hematopoyéticas: 30°C por 4 hrs. Con oxigenación | MEDIO DE CULTIVO DE MANTENIMIENTO: 30°C por 4 hrs, con oxigenación              |
| MANTENIMIENTO: se cambiará medio de cultivo cada 12 horas. 4°C con oxigenación.            | MANTENIMIENTO: se cambiará medio de cultivo cada 12 horas. 4°C con oxigenación. |

Todo el procedimiento de cultivo y quimerización del órgano se realizó en el cuarto de cultivo del laboratorio IN VITRO de la Universidad del Valle, con todos los protocolos de asepsia y de buenas prácticas de laboratorio (Fig. 7).

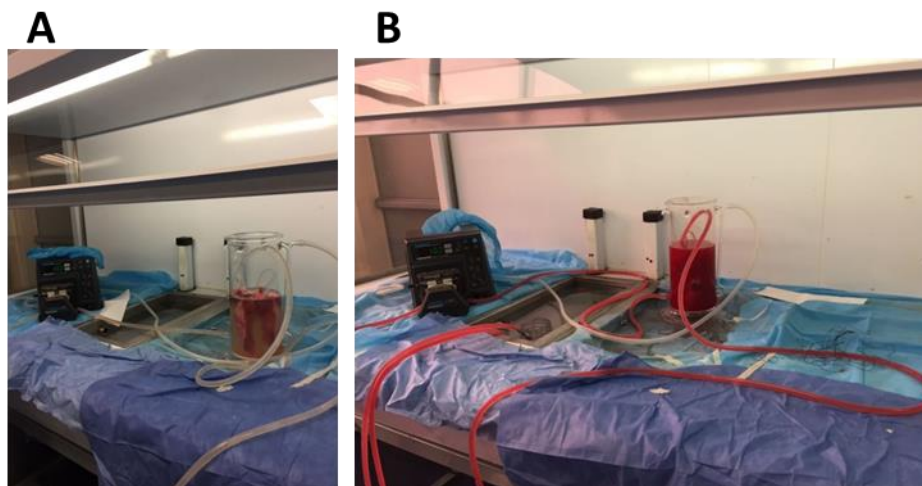


Figura 7. Quimerización de los pulmones. A. Pulmón en medio de cultivo. B. Pulmón con células madre hematopoyéticas, proceso de quimerización.

Se tomaron muestras de tejido en diferentes tiempos para el análisis histopatológico:

T0: antes del procedimiento de laboratorio

T1: inmediatamente después de la quimerización o 12 horas después de la extracción.

T2: 64 horas posterior a la extracción del órgano.

### **1.3.3. BIOMODELO – CERDO 3: QUIMERIZACION IN VITRO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE OXIGENO - VIABILIDAD DEL ORGANO**

Se realizó todo el procedimiento de quimerización del órgano, empleándose 2 biomodelos: un cerdo macho raza *Zungo Costeño* (donante de células madre hematopoyéticas) y un cerdo hembra raza *Zungo Costeño* a quien se le realizó la neumonectomía total, evaluando modificaciones en el protocolo de quimerización (pulmón derecho quimerizado pero sin oxígeno y pulmón izquierdo quimerizado con oxígeno) y se observó viabilidad del tejido durante el tiempo en las dos condiciones (Fig. 8).

Personal que participó en el procedimiento:

Veterinario

Bacteriólogos

Médico cirujano de tórax

Hematólogo

Médico cirujano de trasplantes

Patólogo

Anestesiólogo

Médicos farmacólogos

Instrumentador

Auxiliar de laboratorio

Circulante



Cerdo macho – donante de las células madres hematopoyéticas



Cerdo hembra – Neumonectomía total

PULMON DERECHO

Quimerizado sin oxígeno

PULMON IZQUIERDO

Quimerizado con oxígeno

Tiempo total en el laboratorio en medios  
de cultivo 12 horas.

Estudio Histopatológico

Figura 8. Esquema experimental para evaluar viabilidad del pulmón en presencia o ausencia de oxígeno en el protocolo de quimerización



**Día 1:** Se realizó extracción de Células madres hematopoyéticas del cerdo macho con un peso de: 17kg. El procedimiento fue realizado en quirófano bajo todas las condiciones de asepsia, bajo sedación y anestesia (descritos para el biomodelo 1). Un día antes de la extracción del pulmón, se extrajeron 90ml de médula ósea con solución salina heparinizada de la cresta iliaca del biomodelo, se heparinizó y se guardó a 4°C (de la misma forma que se presenta en la Fig. 5).

**Día 2:** Se realizó toracotomía con neumonectomía en el cerdo hembra de peso 25kg, bajo anestesia general del biomodelo y se realizó un procedimiento similar al anterior, sin variaciones en la parte quirúrgica y clínica (Fig. 6). Los pulmones fueron canulados en su arteria pulmonar intraoperatoriamente, se transportaron en bolsas estériles a temperatura de 4°C y se llevaron al laboratorio In vitro, donde se inició el proceso de quimerización (Fig. 7).

El proceso de quimerización tiene 3 fases: lavado, cultivo con células madre hematopoyéticas y mantenimiento con medio enriquecido. Se realizaron las 3 fases con la diferencia en la oxigenación del medio. El pulmón derecho no se mantuvo oxigenado y el pulmón izquierdo se mantuvo oxigenado durante todo el procedimiento con una saturación del 100%. Se tomaron controles de temperatura, oxigenación (pulmón que lo requería) y toma de gases arteriales, además muestras de tejido para estudio histopatológico (tabla 3).

**Tabla 3. Condiciones experimentales durante el protocolo de quimerización**

| PULMON IZQUIERDO                                                                           | PULMON DERECHO                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CON OXIGENACIÓN</b>                                                                     | <b>NO OXIGENACIÓN</b>                                                                      |
| PRIMER LAVADO: 4° C por 4 horas                                                            | PRIMER LAVADO: 4° C por 4 horas                                                            |
| SEGUNDO LAVADO: 4°C por 4 hrs                                                              | SEGUNDO LAVADO: 4°C por 4 hrs                                                              |
| QUIMERIZACIÓN: Implantación células madre hematopoyéticas: 30°C por 4 hrs. Con oxigenación | QUIMERIZACIÓN: Implantación células madre hematopoyéticas: 30°C por 4 hrs. sin oxigenación |
| MANTENIMIENTO: 12 horas a temperatura 4°C                                                  | MANTENIMIENTO: 12 horas a temperatura 4°C                                                  |

Se tomaron muestras de tejido en los siguientes tiempos:

T0: antes del procedimiento de laboratorio

T1: inmediatamente después de la quimerización o 12 horas después de la extracción.

T2: Final del experimento o 24 horas posterior a la extracción del órgano.

### 1.3.4 BIOMODELO – CERDO 4: TRASPLANTE DE PULMON QUIMERIZADO - VIABILIDAD DEL ORGANO

Se realizó todo el procedimiento de quimerización del órgano, empleándose dos biomodelos: un cerdo macho raza *Zungo Costeño* (donante de células madre hematopoyéticas y receptor del trasplante del pulmón izquierdo quimerizado), y un cerdo hembra raza *Zungo Costeño* a quien se le realizó la neumonectomía izquierda (donante del órgano) y se observó viabilidad y funcionalidad del órgano sin tratamiento farmacológico de inmunosupresión.

Personal que participó en el procedimiento:

|                                |                         |
|--------------------------------|-------------------------|
| Veterinario                    | Bacteriólogos           |
| Médico cirujano de tórax       | Hematólogo              |
| Médico cirujano de trasplantes | Patólogo                |
| Anestesiólogo                  | Médicos farmacólogos    |
| Instrumentador                 | Auxiliar de laboratorio |
| Circulante                     |                         |



Cerdo **macho** – donante de las células madres hematopoyéticas y receptor del órgano a trasplantado (pulmón izquierdo quimerizado)



Cerdo **hembra** – Neumonectomía izquierda (donante del órgano)

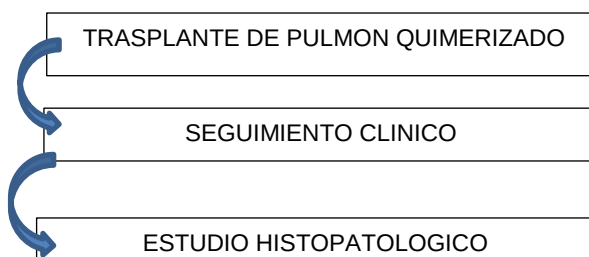


Figura 9. Esquema experimental para evaluar viabilidad del pulmón quimerizado durante trasplante.

**Día 1:** Se realizó extracción de Células madres hematopoyéticas del cerdo macho con un peso de: 19 Kg. El procedimiento fue realizado en quirófano bajo todas las condiciones de asepsia, bajo sedación y anestesia (procedimiento ya explicado en el biomodelo 1). Se extrajeron 50 ml de médula ósea en solución salina heparinizada de la cresta iliaca del biomodelo, se heparinizó y se conservaron refrigeradas a una temperatura: 4°C (según Fig. 5).

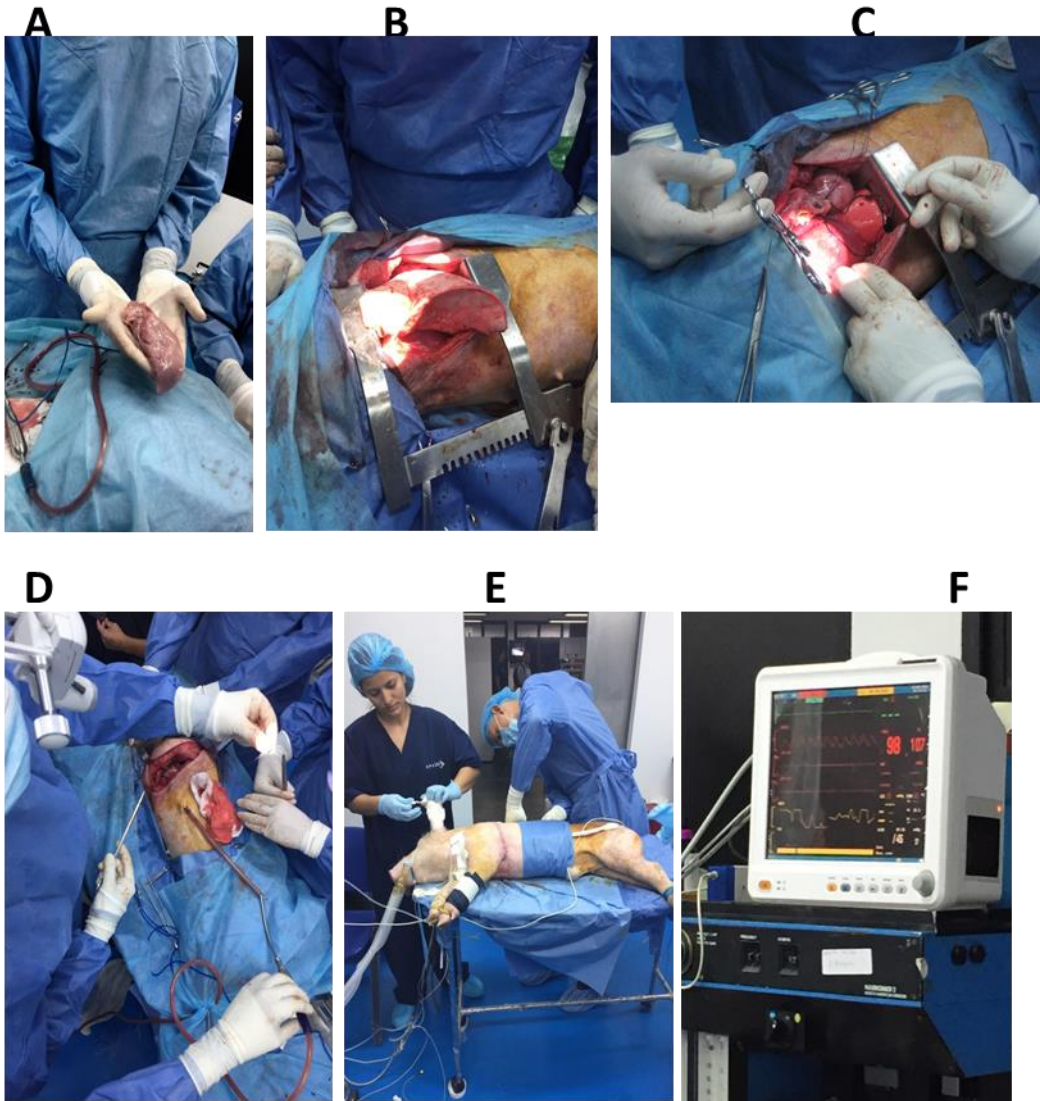
**Día 2:** Se realizó procedimiento quirúrgico de toracotomía con neumonectomía izquierda en el cerdo hembra de peso 20 Kg, bajo anestesia general del biomodelo y se realizó un procedimiento quirúrgico similar a los anteriores (Fig. 6), sin variaciones en el procedimiento, se llevó el pulmón izquierdo al laboratorio In vitro donde se realizó el tratamiento del órgano para quimerización.

El primer lavado se llevó a cabo en el quirófano con solución de HBSS, una vez en el laboratorio, el pulmón, previamente canulado, se conectó al sistema de flujo y temperatura, manteniéndose con medio de lavado por 4 horas a 4°C, luego se realizó retiró el medio de lavado y se agregó medio de cultivo fresco, al que se adicionaron células madre hematopoyéticas para dejarlas en circulación por 4 horas a 30°C, todo este tiempo en presencia de oxígeno con una saturación del 100%. Una vez concluido el proceso de quimerización, el pulmón es retirado del sistema para ser transportado en bolsas estériles a la sala de cirugía para ser implantado. En el quirófano, al biomodelo receptor se le ha extraído el pulmón izquierdo, para inmediatamente recibir el pulmón quimerizado (Fig. 10). Posterior al trasplante, el biomodelo se mantuvo monitorizado y estable, manejando el dolor con Buprenorfina y Meloxicam.

Se tomaron muestras de tejido en diferentes tiempos:

T0: sin tratamiento en el laboratorio

T1: Post-mortem 30 horas después de la extracción del órgano.



**Figura 10. Procedimiento quirúrgico de trasplante.** A. Recepción de órgano quimerizado. B. Extracción de pulmón izquierdo del biomodelo receptor. C. Implantación del órgano quimerizado. D. Cierre de la incisión a nivel de tórax. E. Cierre de piel y recuperación del biomodelo. F. Monitorización posquirúrgica de signos vitales.

### 1.3 RESULTADOS:

#### 1.3.1 BIOMODELO - CERDO 1: Estudio anatómico y estandarización de procedimiento quirúrgico y anestésico.

Se logró realizar un reconocimiento de las estructuras anatómicas del biomodelo porcino, las complicaciones para intubar y lograr adquirir la habilidad para hacerlo sin problema, escoger el pulmón izquierdo como el estándar para la realización de los trasplantes por su anatomía que lo hace más fácil su extracción e implantación. Se logró verificar las dosis de los fármacos, la estabilización del biomodelo y el seguimiento de signos vitales y paraclínicos (tabla 4).

**Tabla 4. Reconocimiento anatómico, destreza y estandarización de dosis en la extracción pulmonar de biomodelo porcino.**

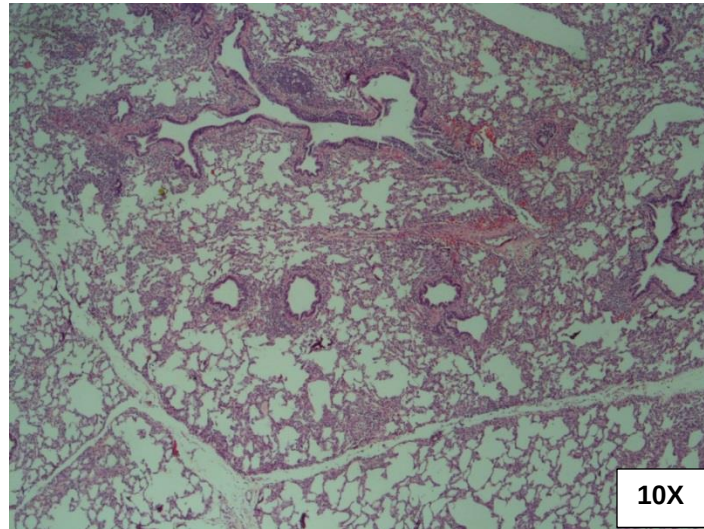
| Aspectos             | Conclusión                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Anatómicos           | <b>Pulmón izquierdo:</b> un bronquio principal, facilita la anastomosis<br><b>Pulmón derecho:</b> dos bronquios principales, dificulta anastomosis<br>Peso del biomodelo no inferior a 20 Kg, preferiblemente superior para facilitar cirugía |
| Dosis de anestésicos | Xilacina al 2% (2.5 mg/Kg)<br>Tramadol (5 mg/Kg)<br>Ketamina (10mg/Kg)<br>Atropina (0.04 mg/Kg)<br>Fentanilo (0.02 mg/Kg)<br>Isoflurano al 1%                                                                                                 |
| Tiempo de extracción | 4 horas desde que el animal es sedado                                                                                                                                                                                                         |

#### 1.3.2 BIOMODELO – CERDO 2: TIEMPO DE QUIMERIZACION IN VITRO Y VIABILIDAD DEL ORGANO

En este experimento se tomaron los dos pulmones del donante. El pulmón derecho sin tratamiento de quimerización, pero mantenido por 64 horas en condiciones de laboratorio con los medios de cultivo y mantenimiento. El pulmón izquierdo se quimerizó, y se mantuvo en las mismas condiciones de laboratorio que el pulmón derecho, por 64 horas, ambos mantenidos con saturación de oxígeno en el medio.

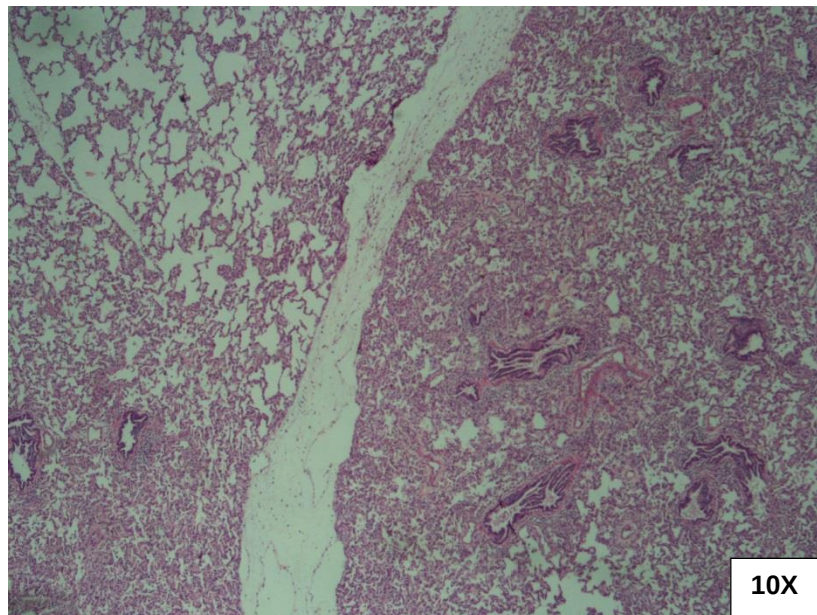
Para el pulmón izquierdo, durante el T0, previo a la quimerización, se aprecia un tejido pulmonar viable, sin daño alveolar, sin alteraciones en el estroma, vasos sanguíneos, bronquios y pleura en buen estado (Fig. 11).

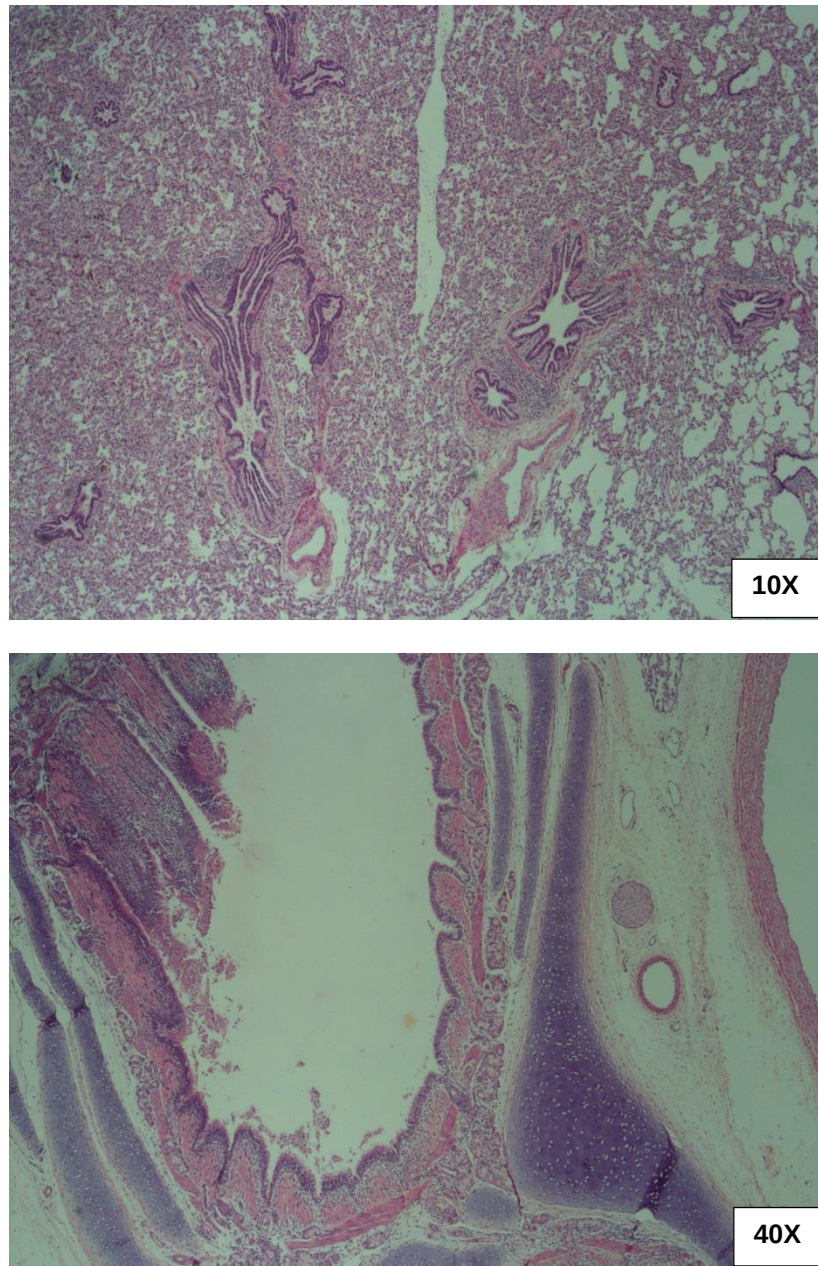




**Figura 11. Tejido pulmonar izquierdo en T0.** Inmediatamente después de ser extraído del donante.

Para el mismo pulmón 12 horas después del explante e inmediatamente después de concluir el proceso de quimerización con las células madre hematopoyéticas, se observa un pulmón más congestivo, con daño alveolar (colapso alveolar leve) en parches. Cartílago viable, sin daño vascular; en general un tejido viable y en buenas condiciones (Fig. 12).

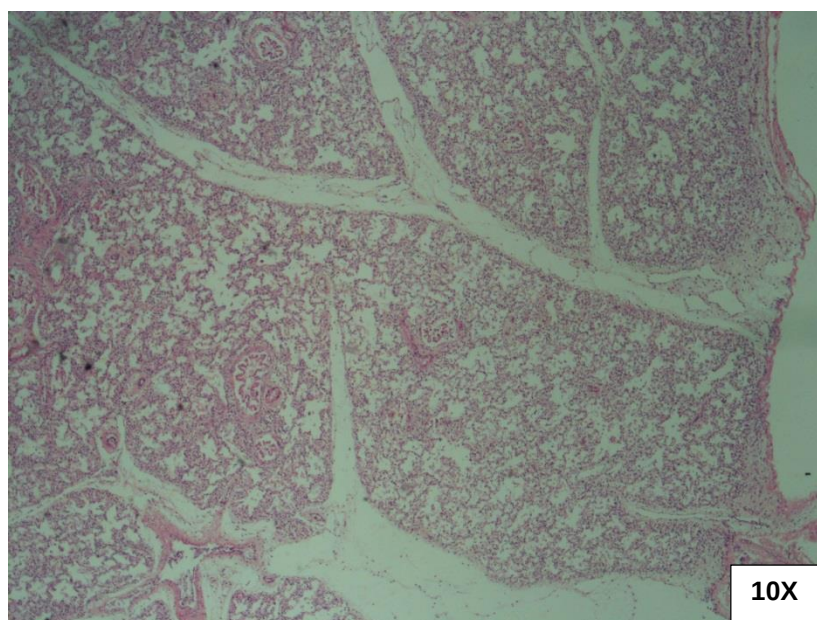
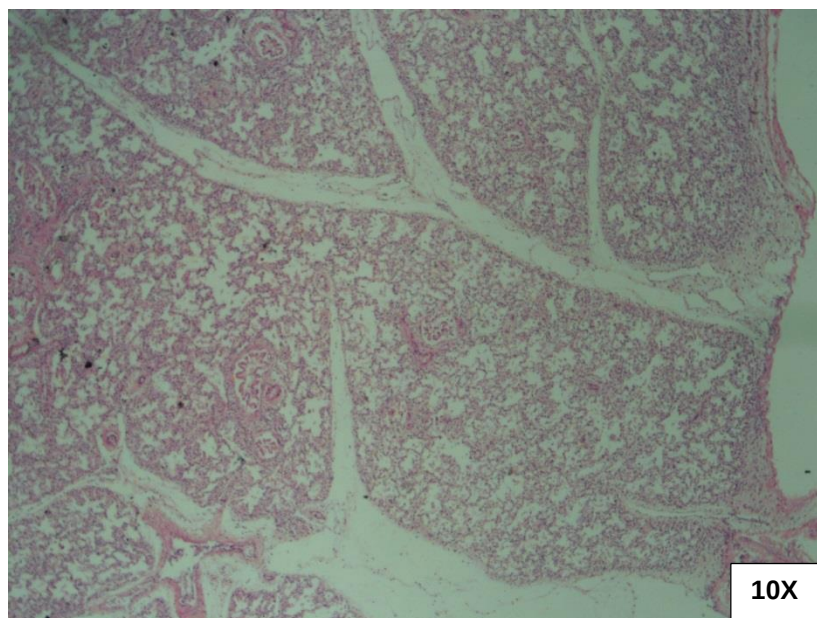




**Figura12. Pulmón izquierdo quimerizado T1. 12 horas después del explante**

Las últimas muestras T3 (64 horas después del explante), la apariencia macroscópica, de un pulmón hepatizado, de mal aspecto y color oscuro. Se observa un tejido pulmonar con daño alveolar masivo, con compromiso mayor de adentro hacia afuera, la pleura es viable, pero con compromiso del componente vascular. No se observa colonización de bacterias (Fig. 13).

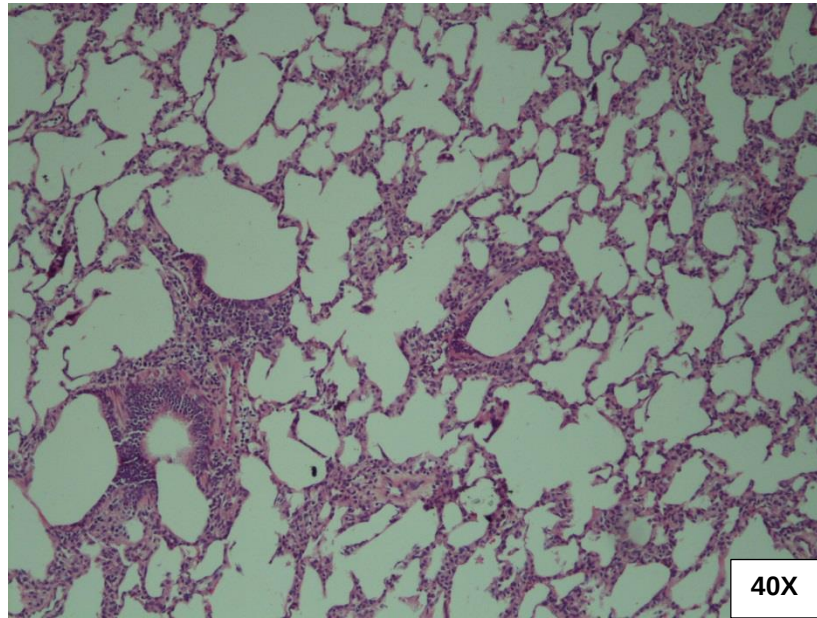




**Figura 13. Pulmón izquierdo quimerizado T3. 64 horas posteriores al explante.**

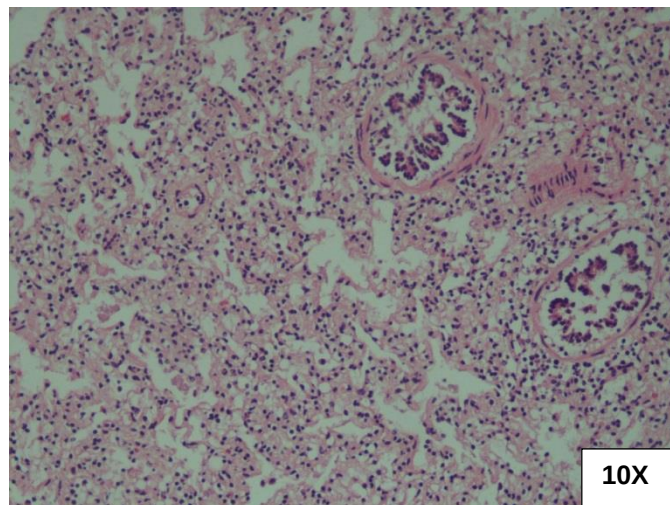
De igual manera, para el pulmón derecho que no fue sometido a quimerización, en el T0, una vez se extrae del donante se observa un tejido pulmonar normal y viable, sin alteración en sus estructuras (Fig. 14)





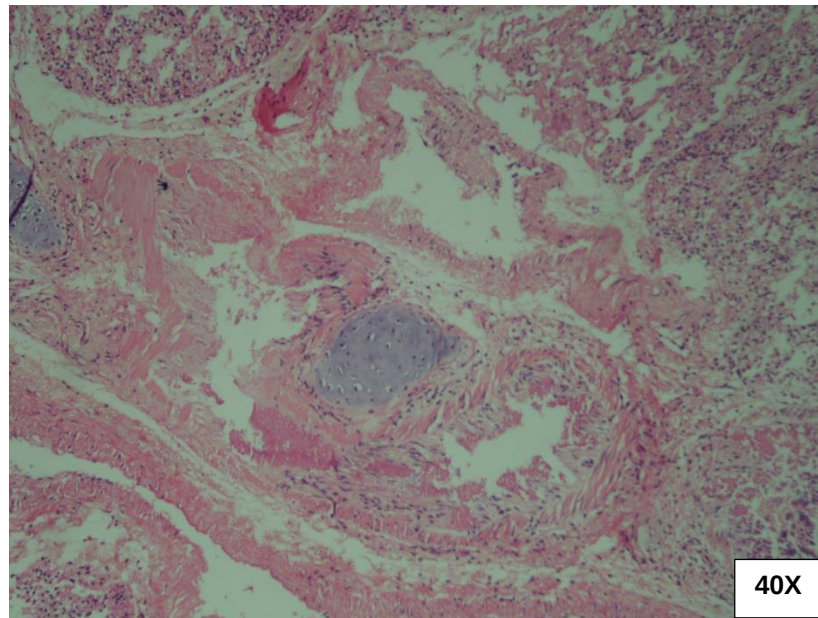
**Figura 14. Tejido pulmonar derecho en T0.** Inmediatamente después de ser extraído del donante

Para el mismo pulmón 12 horas después del explante (T1), siendo lavado y mantenido con medio de cultivo, con la única diferencia que a este no se le adicionaron las células madre hematopoyéticas, se observa un tejido pulmonar congestivo, con presencia de daños alveolares leves, sin embargo hay mantenimiento de las estructuras. (Fig. 15).



**Figura 15. Pulmón derecho no quimerizado T1.** 12 horas después del explante.

Por último a las 64 horas después en el mismo pulmón, se observa daño más extenso en alveolos, daño epitelial, conservación del cartílago, mayor consolidación. (Fig. 16).



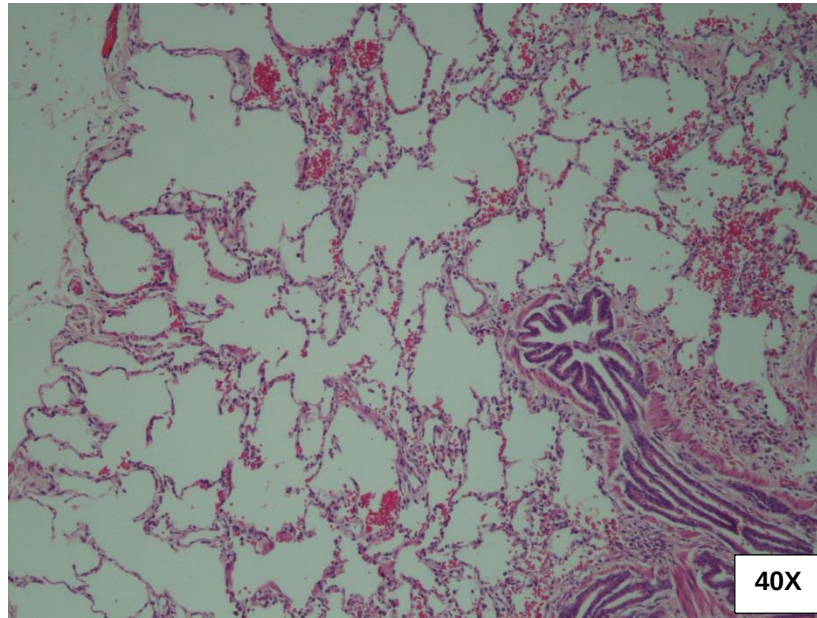
**Figura 16. Pulmón derecho no quimerizado T3.** 64 horas posteriores al explante.

### **1.3.3 BIOMODELO – CERDO 3: QUIMERIZACION IN VITRO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE OXIGENO - VIABILIDAD DEL ORGANO**

En este experimento se tomaron los dos pulmones del donante y ambos se quimerizaron, pero al pulmón izquierdo se realizó el procedimiento en presencia de oxígeno y al pulmón derecho sin presencia de oxígeno. Se mantuvieron por 24 horas posteriores al explante.

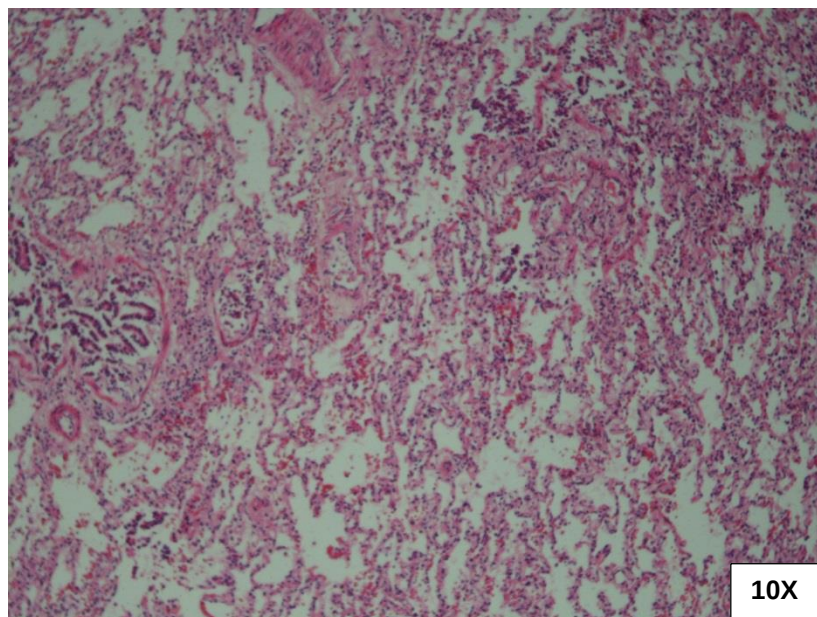
El pulmón derecho quimerizado y sin oxígeno, en el T0 (inmediatamente después de su extracción, previo a quimerización), evidencia una arquitectura sin alteraciones, sin daño alveolar, ni vascular, con presencia de componente sanguíneo en vasos, no colonización de bacterias u hongos.

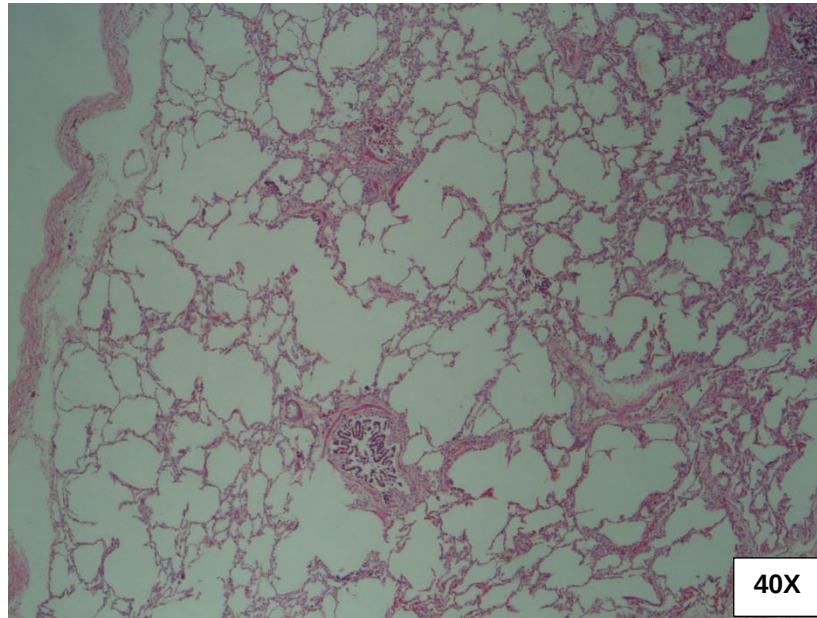




**Figura 17. Tejido pulmonar derecho en T0.** Inmediatamente después de la extracción.

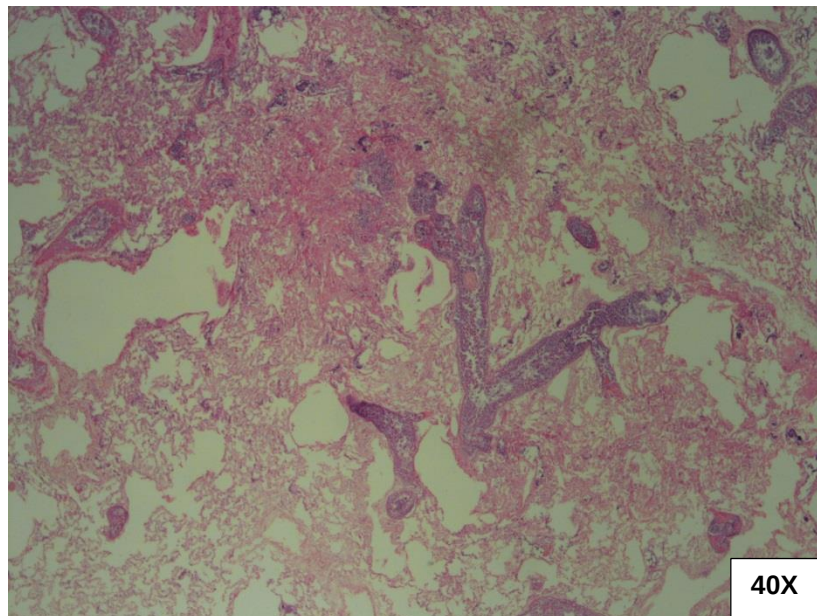
Para el mismo pulmón 12 horas después del explante (T1), siendo lavado y mantenido con medio de cultivo, con la única diferencia que este carece de saturación de oxígeno en el medio de lavado, cultivo y de mantenimiento. Se observa un tejido pulmonar más congestivo con colapso alveolar en parches, bronquios, epitelio bronquial normal. Cartílago viable, vasos sin componentes sanguíneos. Tejido viable (Fig. 18).





**Figura 18. Pulmón derecho quimerizado sin oxígeno T1. 12 horas después del explante.**

Por último a las 24 horas después de la extracción del mismo pulmón, se observa daño alveolar masivo, zona de hepatización, tejido lisado. Daño epitelial y zonas de hepatización del tejido. (Fig. 19).

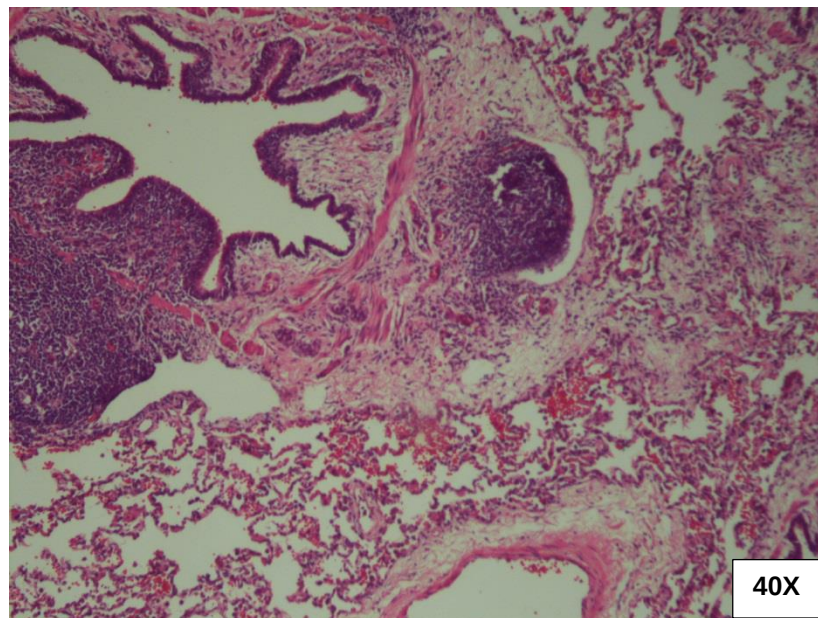
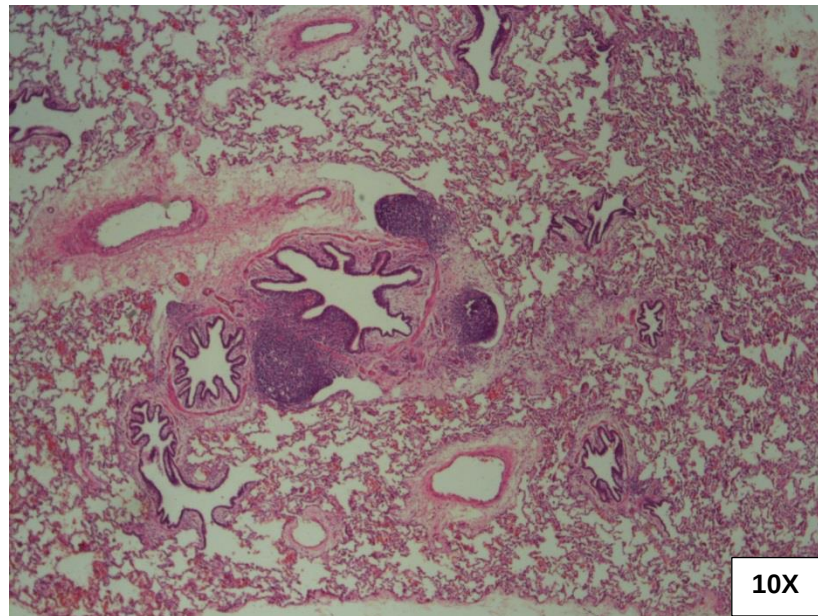


**Figura 19. Pulmón derecho quimerizado sin oxígeno T3. 24 horas post-explante.**

Para el pulmón izquierdo, el cual contó con saturación de oxígeno de principio a fin, en el T0, inmediatamente extraído y previo a la quimerización, se observa un

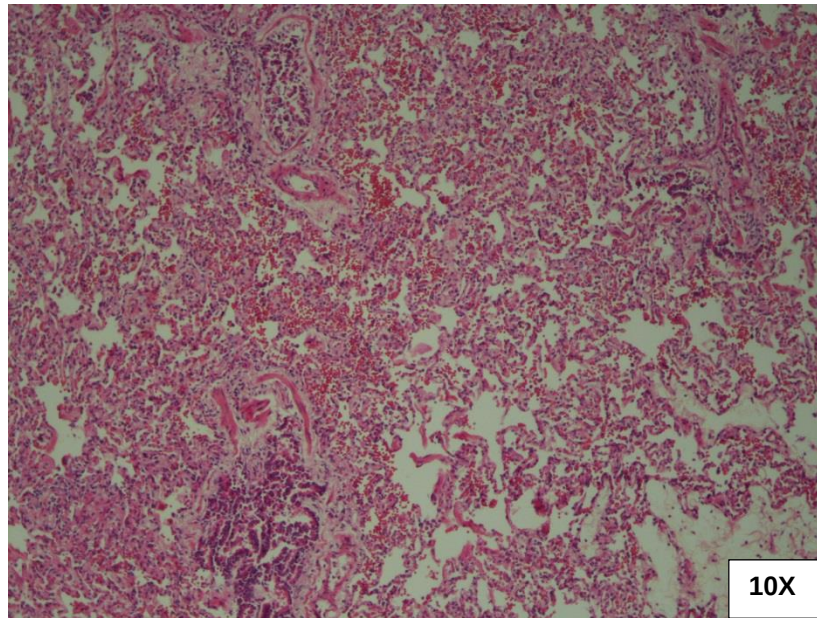


tejido sin alteraciones, tejido linfoide en buen estado, sin daño alveolar, bronquial, vascular, ni alveolar. Presencia de eritrocitos (Fig. 20).



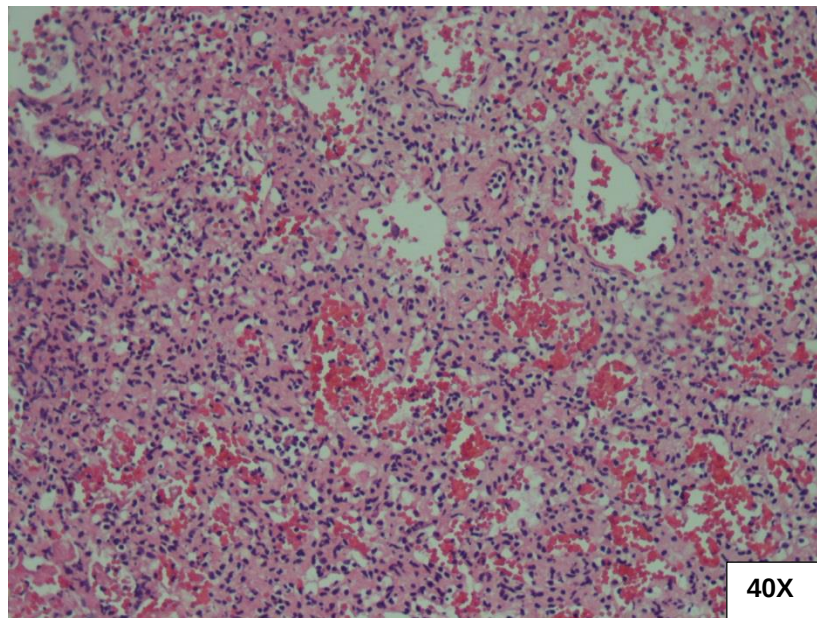
**Figura 20. Tejido pulmonar izquierdo oxigenado en T0.** Inmediatamente después del explante.

Continuando en el mismo pulmón, 12 horas después del explante e inmediatamente finalizada la quimerización (T1), se observan zonas con daño alveolar (colapso) en parche; sin embargo, el tejido es viable (Fig. 21).

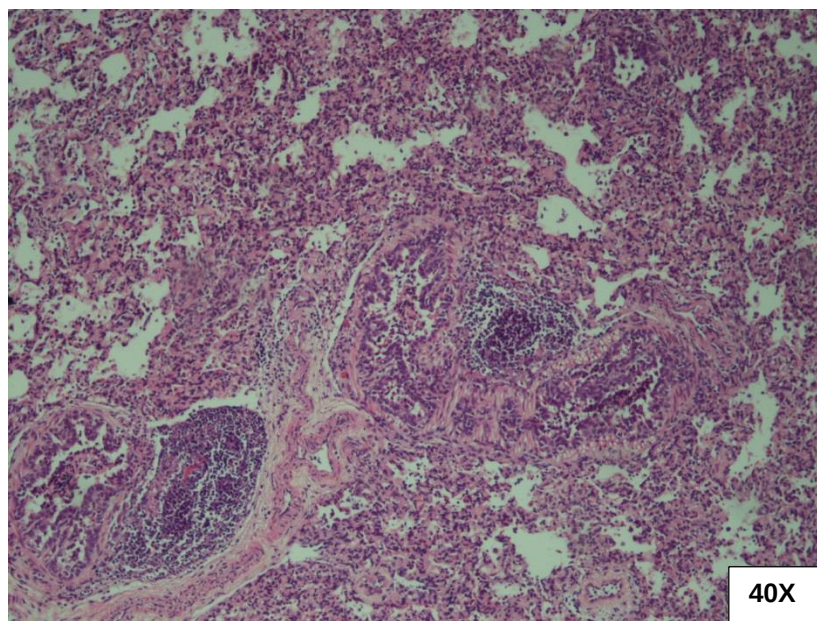


**Figura 21. Pulmón izquierdo quimerizado oxigenado T1. Pulmón post-quimerización**

Por último, 24 horas después del explante (T3), se observa consolidación del tejido en parches, hay daño mayor alveolar sin daño epitelial. (Fig. 22).





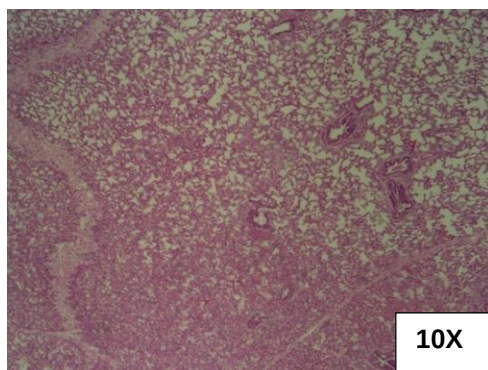


**Figura 22. Pulmón izquierdo quimerizado y oxigenado T3. 24 horas post-explante.**

#### **1.3.4 BIOMODELO – CERDO 4: TRASPLANTE DE PULMON QUIMERIZADO - VIABILIDAD DEL ORGANO**

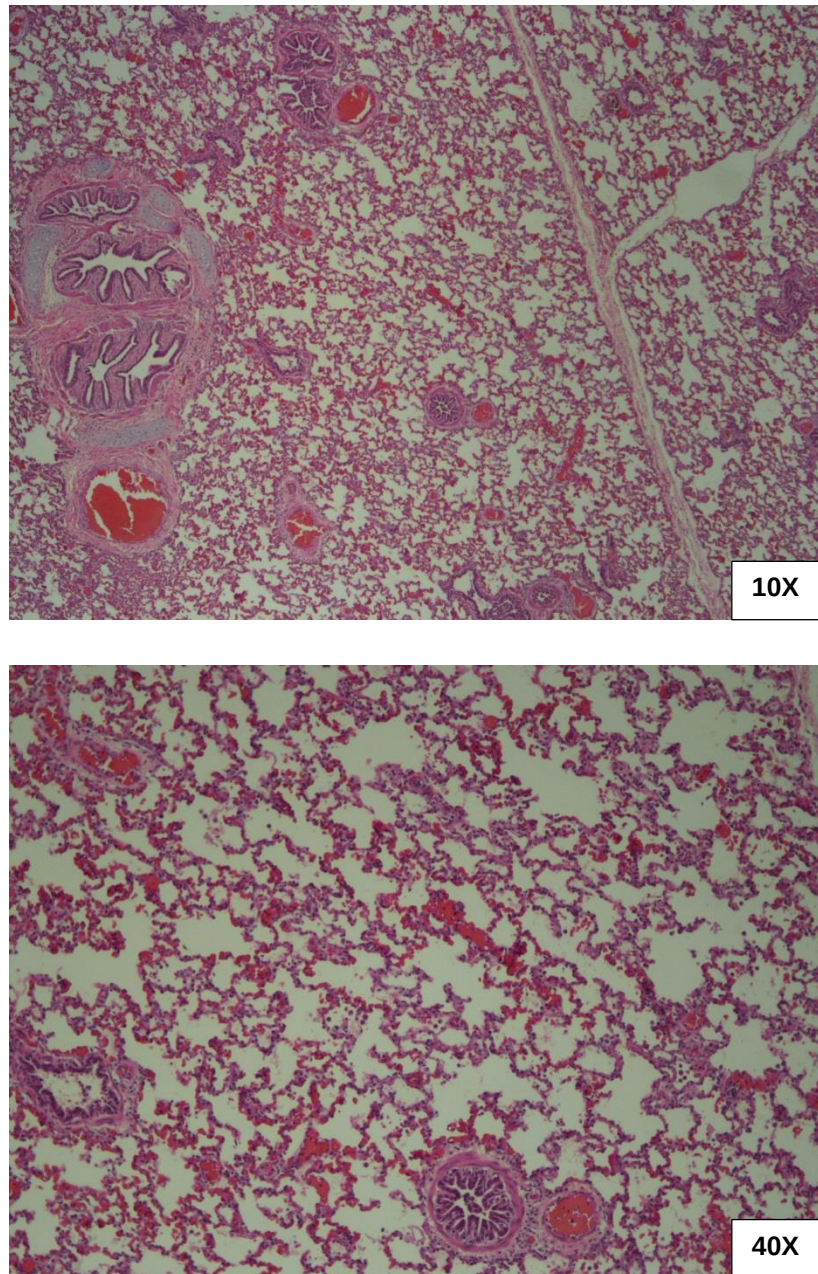
Se realizó extracción de pulmón izquierdo a biomodelo porcino hembra y se trató el pulmón con técnica de quimerización, se implantó en un biomodelo porcino macho. El biomodelo a quien le realizaron el trasplante duró aproximadamente 4 horas posterior a la cirugía y se tomó muestra en la autopsia del pulmón izquierdo (trasplantado) y el derecho como control.

De esta manera, se evaluó la histopatología del pulmón izquierdo previo a quimerización (T0), donde se observa un tejido pulmonar sin alteraciones y viable (Fig. 23).



**Figura 23. Tejido pulmonar izquierdo en T0. Inmediatamente después del explante.**

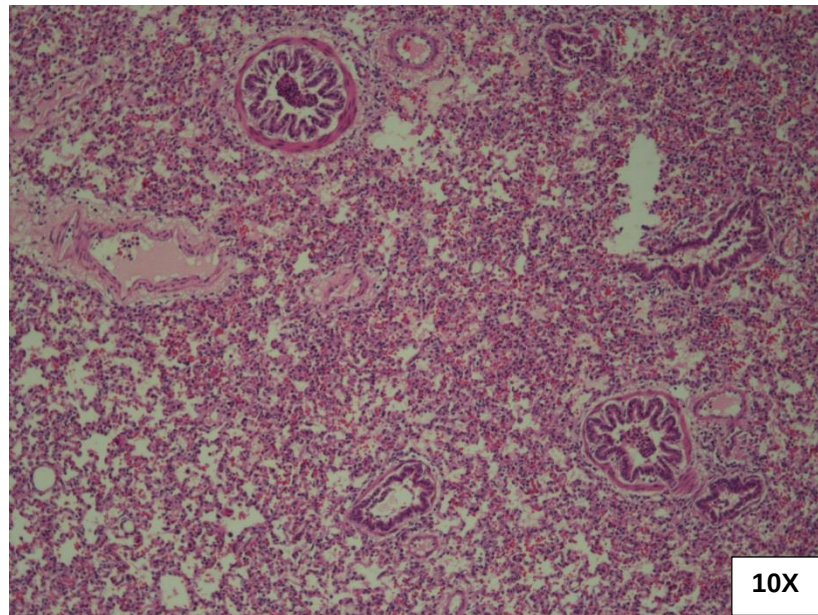
Cuatro horas después del implante, el biomodelo entra en falla cardíaca y sufre un paro cardíaco, tomando la siguiente muestra seis horas después del implante, ya en etapa post-mortem (T1). Se observa un leve colapso alveolar en algunas zonas. Sin grandes alteraciones. Cartílago en buen estado, sin cambios. Vasos sanguíneos con eritrocitos en el interior, sin daño endotelial. No se presenta fibrosis, el componente linfóide se encuentra en buen estado. No hay presencia de zonas de isquemia. No se evidencia componente inflamatorio. No hay presencia de colonias bacterianas (Fig. 24).



**Figura 24. Pulmón izquierdo quimerizado T1.** Pulmón posterior a la quimerización y trasplante (post-mortem)



De igual manera, el pulmón derecho no quimerizado y nunca extraído del biomodelo receptor, fue analizado histopatológicamente como un control, observándose una arquitectura sin alteraciones con un poco de congestión y algo de colapso alveolar (Fig. 25)



**Figura 25. Pulmón derecho del receptor.** Control de trasplante y quimerización

## 1.4 DISCUSIÓN

El trasplante pulmonar se realiza cada vez más frecuentemente, como una opción terapéutica para los pacientes con daño pulmonar terminal. A pesar de los adelantos en este campo, es el trasplante con resultados menos favorables comparado con otros órganos como el corazón, riñón o el hígado, que tienen una mayor supervivencia y menos rechazo a corto y largo plazo<sup>25</sup>.

Este trasplante tiene como consecuencia cambios en la dinámica respiratoria, cambios fisiopatológicos en el parénquima pulmonar, circulación pulmonar, caja torácica, entre otros aspectos y además, el uso de inmunosupresores que traen consigo todas las consecuencias de la inmunomodulación (riesgo a infecciones y cáncer)<sup>25</sup>.

La isquemia-reperfusión es una condición que se presenta cuando se suspende la circulación sanguínea (como es el caso del trasplante durante el explante e implante) y posterior conexión circulatoria, con reoxigenación<sup>26</sup>.

Se han estudiado muchos modelos animales y en humanos sobre el impacto de síndrome isquemia-reperfusión, las alteraciones hemodinámicas, gasométricas y bioquímicas que producen en el pulmón y efecto directo sobre la viabilidad del órgano postrasplante.<sup>26</sup>

La injuria del pulmón por isquemia-reperfusión, está relacionada directamente con la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), daño endotelial, activación del complemento, liberación de citocinas inflamatorias, produciendo diversos grados de injuria, por lo cual se ha estudiado diversos mecanismos para disminuir este daño, uno de ellos es la temperatura (isquemia en frío), para bajar la tasa metabólica y disminuir el deterioro, uso de medios de cultivo y mantenimiento del órgano, la insuflación del órgano mientras se trasplanta, perfusión retrograda pulmonar, ventilación mecánica y ventilación líquida, el uso de perfluorocarbono, el uso de antioxidantes uso como N-acetilcisteína, vasodilatadores, entre otros<sup>27,28,29</sup>.

Con base en lo anterior, nuestro protocolo de quimerización toma en cuenta variables que inciden significativamente en la isquemia-reperfusión, como son la saturación de oxígeno, la temperatura y el tiempo de cultivo con células madre hematopoyéticas. Se observó que un prolongado mantenimiento del órgano fuera del organismo, pese a mantenerlo en condiciones controladas *in vitro*, conduce a un deterioro irreversible de la funcionalidad del tejido. Aunque se presentaron inconvenientes durante el experimento que pretendía evaluar la significancia de la saturación de oxígeno en el medio de cultivo, se pudo apreciar en el T3 un daño

del tejido más pronunciado en el pulmón que se cultivó sin oxigenación, comparado con el oxigenado.

Elahimehr et al, 2016 reportaron un mecanismo para inducir tolerancia inmunológica en trasplantes, realizando infusiones de células madre hematopoyéticas en el receptor previo al trasplante del órgano (produciendo un quimerismo mixto), disminuyendo el rechazo<sup>30</sup>.

Pero la pregunta es la siguiente: Para que quimerizar un organismo de 70 kilos si se puede quimerizar el órgano con células madre hematopoyéticas del receptor de tan solo unos cuantos Kg? ¿Para qué exponer a un receptor de órgano trasplantado con células del donante antes del trasplante para que la información quede en las células del receptor y cuando se realice el trasplante, el organismo ya tenga cierta tolerancia al órgano y evitar el rechazo? Esa exposición previa puede traer una reacción inmunológica fuerte de rechazo y poner en riesgo la vida y la salud del paciente.

En cambio, si exponemos al órgano antes de ser trasplantado con células madre del receptor, este órgano tendría información genética del receptor y al trasplantarlo, el sistema inmunológico lo identificaría como propio o al menos, produciría una respuesta disminuida al rechazo del órgano.

Pero que son las células madre y porque nos podrían aportar ayuda en el mantenimiento del órgano y en la respuesta inmunológica?

Las células madre tienen como función la renovación y tienen la capacidad de responder a estímulos y señales del medio ambiente que le permiten diferenciarse en varias líneas con funciones y características determinadas.

Su clasificación es la siguiente:

1. Según su origen: Embrionarias o adultas
2. Según el potencial de diferenciación: Totipotenciales, pluripotenciales, unipotenciales.  
Totipotenciales: pueden dar origen a un organismo completo (gran capacidad de diferenciación).  
Pluripotenciales: originan células de cualquier capa embrionaria (ectodermo, endodermo, mesodermo), generando tipo de células como: células madre hematopoyéticas, mesenquimales y neuronales.
3. Unipotenciales: tienen menor capacidad de diferenciación y en este grupo se encuentra las células madre epidérmicas<sup>32</sup>.

En nuestro caso hemos decidido trabajar con células madre hematopoyéticas (CMH), que tiene como función la renovación celular de la línea celular sanguínea

que está formada por: línea blanca (células linfoides) Neutrófilos, Linfocitos, Mastocitos, Monocitos, Eosinófilos, entre otros. Línea roja: Eritrocitos y Línea trombocítica: plaquetas y megacariocitos<sup>32</sup>. Su origen se encuentra en diversos sitios como placenta, bazo, hígado fetal y médula ósea.

La médula ósea es el sitio de más fácil acceso y se mantiene durante toda la vida posnatal. Se encuentra al interior del hueso trabecular y tiene características de un tejido graso. Además, tiene células estromales que provienen de células mesenquimales como: adipocitos, fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales y células no mesenquimales como macrófagos y células dendríticas. Esto es lo que le da sostén para la formación y mantenimiento de células hematopoyéticas y estas a su vez producen factores de crecimiento, citocinas, entre otras células<sup>34</sup>.

Se han realizado múltiples estudios, uno de los primeros estudios fue el del Dr. James Till y su equipo en 1961, quienes demostraron en un modelo murino irradiado, la capacidad de proliferación de las CMH. En los 70's, se logró cultivar en laboratorio estas células, las cuales proliferaron y se diferenciaron por largos periodos<sup>32</sup>.

Se ha identificado en las CMH, que durante su proceso de maduración, expresan genes que codifican para diferentes proteínas de membrana y que su función es la señalización celular para activación celular, proliferación, migración, adhesión y apoptosis. Estas proteínas de membrana o receptores han sido utilizadas en los estudios en la formación de diversas líneas celulares, ya que pueden ser blancos para la formación de diversos linajes y esto es causado por factores de transcripción que regulan la proliferación, diferenciación y la función de las CMH<sup>35</sup>. Algunos de estos factores son por ejemplo: GATA1: media la proliferación y diferenciación de la línea eritroide, Megacariocitos, eosinófilos y mielóide; GATA2: interviene en la maduración de los eritrocitos; PU.1: proliferación de línea mielóide, entre otros.

Aunque se han identificado estos factores de transcripción como reguladores de la hematopoyesis, también se puede pensar que aún falta mucho por conocer (mas factores de transcripción), comportamiento de estos según las vías de señalización, factores epigenéticos, que pueden conducir a la activación de nuevos factores o nuevos blancos que produzca activación, proliferación y diferenciación hacia otras líneas celulares no hematopoyéticas, sino mesenquimales<sup>36</sup>.

Por esta razón, en la actualidad, las CMH, son muy utilizadas en experimentos tanto *In vitro* como *In vivo* porque mantienen la capacidad de diferenciarse y

proliferar, utilizándose en el tratamiento de muchas enfermedades hematológicas, trastornos metabólicos, inmunodeficiencias.<sup>32</sup>

Esto sería un factor determinante para lograr la quimerización del órgano. Cuando se realiza la extracción del órgano, se cambia totalmente el medio ambiente del mismo, a pesar de tenerlo en condiciones de laboratorio (oxigenación, temperatura, medios de cultivo, etc), el órgano pasa por un estado de estrés, cambiando el ambiente celular y produce activación de vías de señalización, que pueden incidir en la activación de factores de transcripción. El órgano al estar en un medio de cultivo con CMH a una temperatura de 30°C, permite que estas señales se presenten y activen las CMH, llevándolas a diferenciarse en otras líneas celular no hematopoyéticas como por ejemplo: células endoteliales, fibroblasto, etc. Es por ello que nuestro protocolo simula el medio fisiológico para evitar que se activen vías de señalización de regulación adversa.

En el grupo de investigación se realizaron 3 experimentos anteriores, donde se logró extraer médula ósea y cuantificar la cantidad de células madre, la cual es muy similar a la que se reporta en la bibliografía,  $6,6 \times 10^4$  células/ml se obtiene de extracción directa por cresta iliaca en las células de médula ósea porcina y se decide la utilización para el tratamiento del órgano la médula ósea entera, sin separar sus componentes (células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, células madre no mesenquimales), ya que todos los componentes permiten el sostén y una mejor señalización celular para el mantenimiento y funcionamiento de estas líneas celulares<sup>52</sup>.

En el grupo de investigación se cuenta con antecedentes de la quimerización de órgano no vital (tráquea) exitoso, realizado en humano<sup>33</sup>. La quimerización se realizó en el órgano, no a la paciente, y el tratamiento de la tráquea en el laboratorio. Esto se llevó a cabo siguiendo la metodología anteriormente expuesta. La paciente tuvo un postquirúrgico sin complicaciones, utilizó inmunosupresión a dosis bajas por 4 meses, siendo esta retirada hasta la fecha. La paciente no ha presentado signos de rechazo del órgano, no toma tratamiento inmunosupresor y el cáncer no ha presentado recidivas. Durante el proceso se tomaron biopsias del tejido trasplantado, sin alteraciones ni signos de rechazo agudo. Se realizaron Electroferogramas a los 4 meses postrasplante, mostrando un quimerismo mayor al 50%. A los 6 años, un nuevo electroferograma mostró un quimerismo del 100% (la transferencia de la información genética de la paciente al órgano es completa)<sup>33</sup>.

Este antecedente exitoso, fue el punto de partida para probar este protocolo en otros órganos, especialmente el pulmón que presenta muchos retos, comparado con otros órganos.

El experimento que incluye el trasplante de pulmón quimerizado, presentó ciertos inconvenientes durante el implante del órgano quimerizado, ya que el biomodelo entro en paro cardiaco tres veces, de los cuales salió y sobrevivió 4 horas postrasplante, respirando por sus propios medios, con una saturación de oxígeno de 94%. El biomodelo presentó una hemorragia masiva (producto de una coagulación intravascular diseminada, o ruptura de un vaso sanguíneo o daño de alguna sutura). El estudio histopatológico muestra que el pulmón quimerizado se encuentra en buenas condiciones, con viabilidad total del tejido, con colapso alveolar leve en algunas zonas, no alteraciones del estroma, del cartílago, endotelio. No evidencia de rechazo agudo. De igual manera, al evaluar el pulmón derecho (pulmón no trasplantado), las placas histológicas muestran una mayor congestión que el pulmón tratado, lo cual puede ser producto de las complicaciones durante la cirugía, ya que hay un desvío de toda la circulación hacia ese pulmón mientras se realiza el procedimiento quirúrgico y a la posición del biomodelo sobre la mesa de cirugía.

Es importante resaltar que grupos de investigación como los del Dr. Kobayashi, reportaron la adición de blatocistos como complementación en la generación de órganos entre especies diferentes. Estos estudios se basan en la generación de fetos animales, deficientes de un órgano específico, utilizando el espacio vacío como nicho para el crecimiento y diferenciación del órgano a partir de células madre pluripotenciales (CMP) alogénicos o xenogénicos, llevando, finalmente, a la formación de un órgano sólido<sup>34-38</sup>. Una aproximación más invasiva que la nuestra pero con la misma finalidad.



## **CAPITULO 2. TRASPLANTE DE RIÑÓN QUIMERIZADO EN BIOMODELO PORCINO**

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

El trasplante renal es el procedimiento de elección para tratar al paciente con Insuficiencia Renal Terminal (IRT), procedimiento que ha logrado avanzar tanto, que en la práctica médica son más los beneficios que los riesgos<sup>37</sup>; lo que se ha logrado en este campo incluye desde mejoras en técnicas quirúrgicas, mantenimiento y preservación del órgano, tratamientos de inmunosupresión y manejo de las complicaciones<sup>38</sup>

De toda la historia de los trasplantes, se reconoce como el primer trasplante de riñón exitoso, el practicado en 1954 en la ciudad de Boston a unos gemelos idénticos, a partir de este evento, se inicia una nueva era en la medicina, proporcionando otra alternativa terapéutica a los pacientes con IRT. El desarrollo del trasplante entre los años 60's a los 80's, lograron una supervivencia hasta del 90% comparada con los primeros intentos, donde la supervivencia era casi nula. La introducción de la Ciclosporina en la década de los 80's, constituyó la diferencia en la sobrevida de los pacientes trasplantados, mejorando la tasa de supervivencia al año a más de 90% y del injerto casi del 80% y en los último años se ha logrado la combinación de fármacos inmunosupresores con diferentes mecanismos de acción que logran un efecto mayor y una mejor selectividad<sup>37</sup>.

En la parte quirúrgica del trasplante renal, se ha identificado complicaciones que pueden ocasionar morbilidad y mortalidad en los pacientes trasplantados. En los años 70 se calculó una tasa de complicaciones hasta un 30%, en la actualidad es hasta de un 15% o menos.

En la parte de tratamiento y preservación del órgano se ha logrado identificar el tiempo máximo de sobrevida del órgano en isquemia fría, hasta 20 horas y el tiempo medio de cirugía es de casi 50 min.

Para tener éxito en el trasplante, no solo es importante lo mencionado anteriormente, el receptor y su condición clínica, marca la diferencia, la edad, y comorbilidades. En la actualidad, se tienen criterios de selección y manejo del paciente antes, durante y posterior al trasplante. Al incluir al paciente en la lista de espera, se le realizan varios paraclínicos, entre los cuales se encuentra, la tipificación sanguínea y HLA (mayor supervivencia se ve relacionada directamente con la histocompatibilidad entre el donante y el receptor).

Para la selección del donante, se tienen dos posibilidades: Donante renal vivo, el cual se justifica por la escasez de órganos comparada con la demanda y se tienen

mejores resultados cuando hay cercanía familiar e histocompatibilidad entre el donante y el receptor. La segunda opción es el donante cadavérico, en donde se mira la compatibilidad con el grupo sanguíneo y el HLA, además la edad del donante y el receptor<sup>39</sup>.

Hoy en día las contraindicaciones absolutas para la realización del trasplante son pocas: como ser VIH+, presentar una neoplasia maligna con expectativa de vida inferior a un año, o enfermedad crónica de iguales características a la anterior, enfermedad psiquiátrica no controlada y abuso de sustancias psicoactivas.

A pesar de ser un procedimiento muy común con una supervivencia hasta de 20 años, se presentan las complicaciones propias de la cirugía como infecciones, obstrucción de la vía urinaria, formación de fístulas, sangrado, trombosis de la vena renal, estenosis de la arteria renal, infarto renal, entre otros. Las infecciones que más frecuentemente se presentan son las ocasionadas por: bacterias como por ejemplo: E.coli, Klebsiella y Pseudomona (especialmente, bacterias gram negativas); Además de otros agentes infecciosos como virus (Citomegalovirus, Herpes virus, Hepatitis B y C, etc) y hongos; entre los cuales se encuentra: Cándida, Aspergillus los cuales producen una alta morbi-mortalidad. La predisposición a infecciones se debe principalmente al procedimiento invasivo, el uso de inmunosupresores, el uso de sondas y comorbilidades del paciente como Diabetes Mellitus<sup>37</sup>, aunque el avance en fármacos antibióticos, antimicóticos y antivirales, vacunas, han logrado mejorar la expectativa y la calidad de vida de los pacientes trasplantados.

El uso de tratamiento con inmunosupresores, conlleva otros riesgos como el desarrollo de cáncer, ya que se pudo observar en los pacientes trasplantados un aumento en la incidencia de esta patología (3 a 5 veces mayor que la población general y este riesgo se incrementa con la duración a la exposición a la inmunosupresión. Pero para el desarrollo de estas neoplasias malignas no solo se necesita la exposición a estos fármacos, sino factores adicionales como historia familiar, coinfección viral con virus oncogénicos, exposición a factores químicos, físicos o medioambientales como la luz solar, entre otros. Uno de los cánceres más común en los pacientes inmunosuprimidos es el cáncer de piel, pero otras neoplasias asociadas se encuentran: Linfomas, Carcinoma de pulmón, Sarcoma de Kaposi, Leucemias, mama, entre otros<sup>37,38</sup>.

Por esta razón, a pesar de los avances en el trasplante renal, se buscan alternativas que minimicen los riesgos y los efectos adversos propios del tratamiento, además la escasez de órganos y la larga lista de pacientes en espera de un trasplante. Es un camino largo y que muchos grupos de investigación buscan esas alternativas con bioingeniería (riñones artificiales), creación de

órganos a partir de células madre, xenotrasplantes, membranas artificiales, entre otros.

## **2.2 HIPOTESIS:**

H1: La quimerización de riñón permite la viabilidad del órgano a trasplantar en un biomodelo porcino.

H0: La quimerización de riñón no permite la viabilidad del órgano a trasplantar en un biomodelo porcino.

## 2.3 METODOLOGIA

El procedimiento quirúrgico y de laboratorio se realizó en el Bioterio, Centro de Habilidades quirúrgicas y en el Laboratorio In Vitro de la Universidad del Valle.

Se realizó el trasplante de riñón quimerizado cumpliendo las 3 etapas del proceso:

1. Extracción quirúrgica del riñón del donante con canulación y lavado del órgano.
2. Extracción de las células madre hematopoyéticas del receptor, para realizar la quimerización del órgano en el laboratorio
3. Implantación del órgano quimerizado en el receptor.

Se tomaron 2 biomodelos porcinos para la realización de este procedimiento (Fig 26)

PORCINO 1: RAZA: *Pietrain*

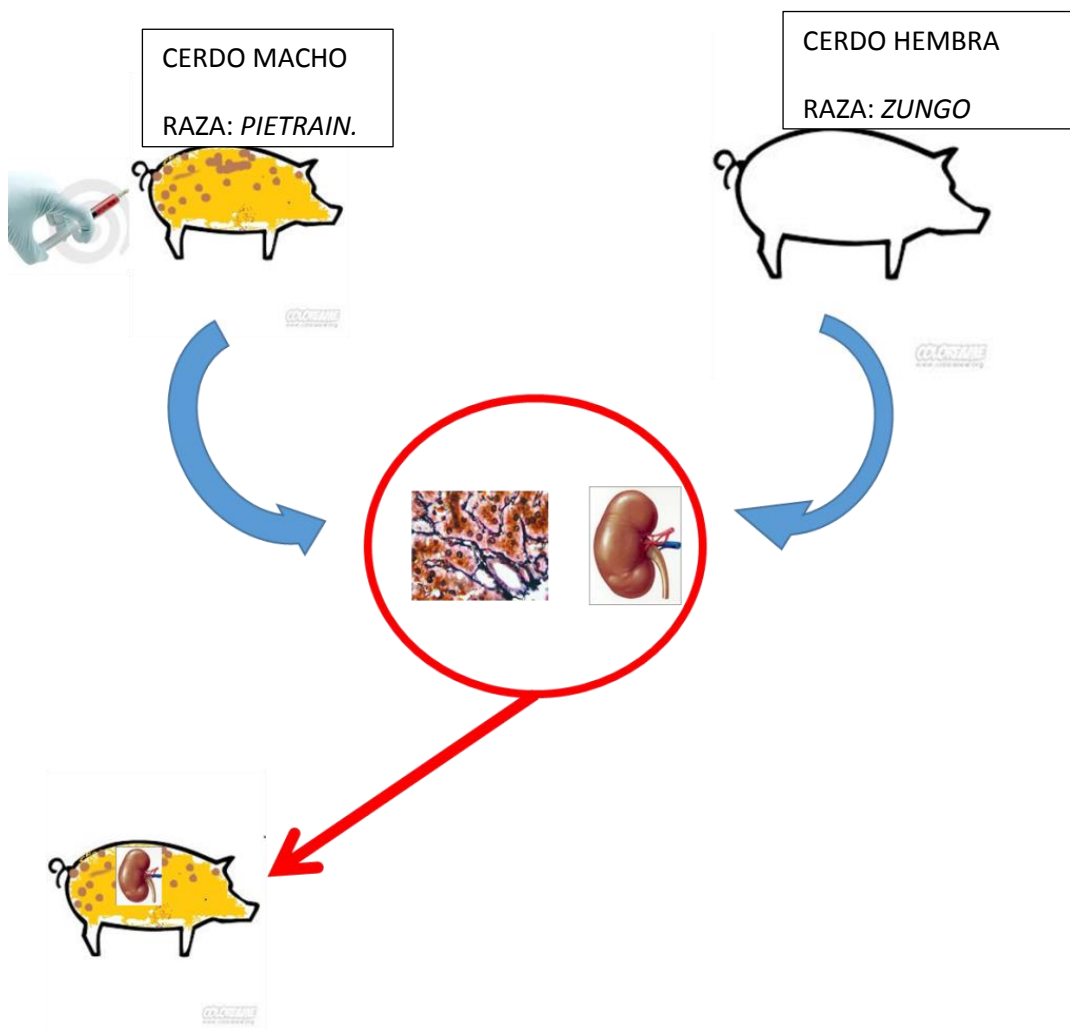
SEXO: masculino

FUNCIÓN: donante de células madre hematopoyéticas y  
RECEPTOR del órgano.

PORCINO 2: RAZA: *Zungo costeño* (cerdo criollo)

SEXO: Femenino

FUNCIÓN: DONANTE del órgano.



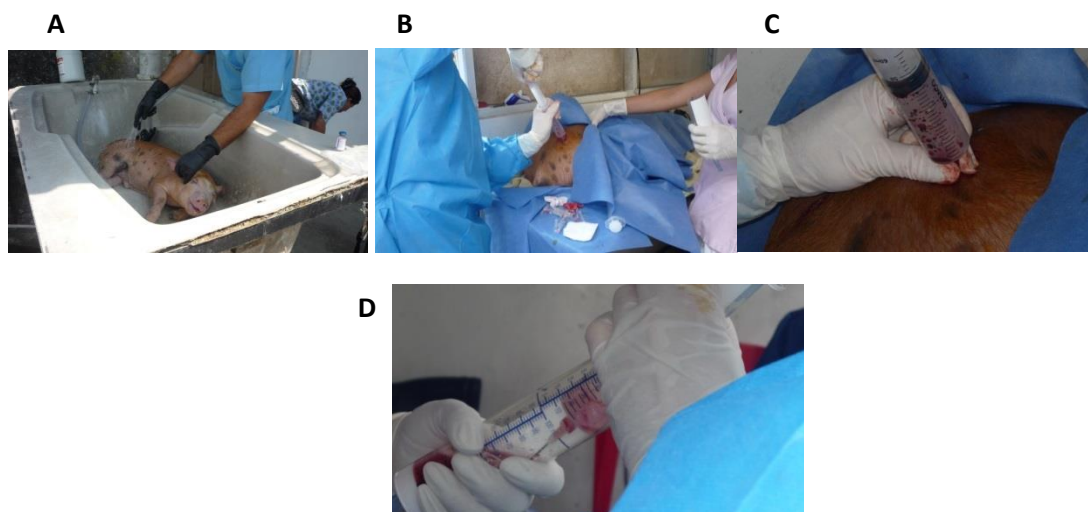
**Figura 26. Esquema metodológico para trasplante de riñón quimerizado.**

1. Personal que participó en el procedimiento:
2. Veterinario
3. Médico cirujano de trasplantes
4. Anestesiólogo
5. Instrumentador
6. Circulante
7. Bacteriólogos
8. Hematólogo
9. Patólogo
10. Médicos farmacólogos
11. Auxiliar de laboratorio

### 2.3.1. EXTRACCIÓN DE CELULAS MADRE HEMATOPOYETICAS:

**Día 1:** Se realizó extracción de Células madres hematopoyéticas del cerdo macho raza *Pietrain*, con un peso de: 30 kg El procedimiento fue realizado en quirófano bajo todas las condiciones de asepsia, bajo sedación y anestesia con Maleato de acepromazina 10mg/ml, Ketamina Clorhidrato, Xilacina 2.5mg/kg y Roxicaina al 2% inyectable y se mantuvo con Ambú la parte respiratoria del biomodelo, se

extrajeron 50ml de sangre con solución salina heparinizada de la médula ósea de la cresta iliaca del biomodelo; se guardó en, en bolsa de transferencia tipo TERUFLEX Blood Bags®, para su posterior refrigeración a una temperatura: 4°C (Fig 27).



**Figura 27. Extracción de médula ósea en biomodelo porcino.** A. Lavado del biomodelo. B. Punción de la cresta iliaca. C. Extracción de células de médula ósea. D. Almacenamiento de células extraídas.

### 2.3.2 Extracción del órgano

**Día 2: Pre-operatorio.** El biomodelo se mantuvo en ayuno por 12 horas. Se canularon dos vías venosas (una en cada oreja del biomodelo), se inició manejo con líquidos endovenosos (solución salina normal). Luego, se realizó sedación con Xilacina 2mg/kg y Acepromazina 10mg/ml. El biomodelo fue preparado (pesado, lavado y afeitado en zona quirúrgica).

El cerdo hembra de raza *Zungo Costeño* con un peso de 30Kg fue llevado a quirófano y se colocó en posición decúbito prono para la intubación orotraqueal con tubo de 7.5mm. Se posicionó decúbito lateral izquierdo y se conectó a la máquina de anestesia con monitoria constante de los signos vitales (pulsooxímetro, temperatura, presiones centrales).

Se realizó inducción anestésica con Propofol 4mg/kg y se dejó dosis de mantenimiento 1.3 mg/kg/min, Ketamina 15mg/kg y fentanilo 3mg/kg, relajante muscular con Atracuronio 0,6mg/kg y manejo del dolor con Tramadol 5 mg/kg.



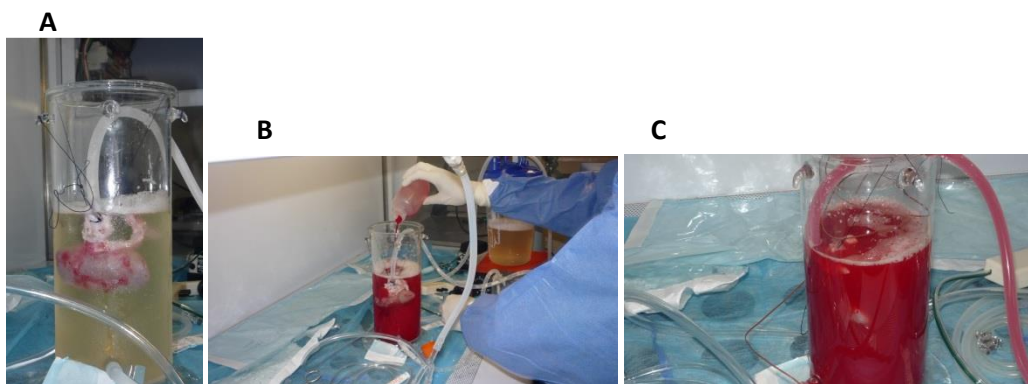
**Extracción del órgano:** Se realizó procedimiento quirúrgico por parte del equipo de cirugía, cumpliendo el protocolo de disección, se extrajo el riñón izquierdo y posteriormente, se sacrificó el biomodelo según protocolos aprobados por el Comité de Ética Animal.

Se extrajo el riñón izquierdo al cual se le canuló la arteria renal en sala de cirugía, se realizó el primer lavado con Custodiol a una temperatura de 4°C, se transportó en bolsas para trasplante y se llevó al Laboratorio In Vitro de la Universidad del Valle para continuar con el tratamiento del órgano y quimerización del mismo.



**Figura 28. Procedimiento quirúrgico para la extracción del riñón.** A. se observa el biomodelo en posición decubito supino y listo para iniciar el proceso. B. Cirugía abierta abdominal. C. Canulación del órgano extraído.

En el laboratorio (Cuarto limpio), se ingresó el órgano y se instaló en la cámara para cultivo de órganos (EMO-Q – en proceso de patente), se conectó a un sistema de flujo a 15 ml/min, se realizó el primer lavado con Custodiol a 4°C por 4 horas, luego se retiró la solución de lavado y se realizó el segundo lavado con medio de cultivo (contiene factores de crecimiento, aminoácidos, electrolitos, antibiótico, antimicótico) por 4 horas a 4°C. Se retiró el medio de cultivo y se agregó medio de cultivo nuevo más células madre hematopoyéticas (50ml de la extracción del día anterior, cerdo macho, raza *Pietrain*), se aumentó la temperatura a 30°C y se dejó en circulación por 6 horas (Fig 29). Todos los procedimientos realizados en laboratorio tienen oxígeno presente con saturación del 100% (medido por gasometría). Cuando se finalizó la quimerización en laboratorio, se desconectó el órgano se transportó en bolsas estériles para trasplantes y se llevó a quirófano, cuando el cerdo receptor estuvo listo para la implantación del órgano quimerizado.



**Figura 29. Protocolo de quimerización.** A. Riñón en medio de lavado. B y C. Riñón con el medio de cultivo y con la adición de células madre.

### 2.3.3 Implante del órgano

**Implante del órgano quimerizado:** El protocolo del manejo pre-operatorio y anestésico se repitió, al igual que el abordaje quirúrgico, se extrajo el riñón izquierdo y luego se implantó el riñón izquierdo quimerizado. Se realizó inspección sobre posibles hemorragias y funcionalidad del órgano. El biomodelo se cerró y se dejó en cuidados intensivos (quirófano) al cuidado de veterinario, se dio manejo del dolor con Meloxicam y Buprenorfina, se continuó monitorización por 24 horas (según evolución clínica). Posteriormente fue llevado a la Piara, donde se le asignó un lugar adecuado (temperatura, abastecimiento de alimento y agua), se vigiló evolución clínica por 5 días.

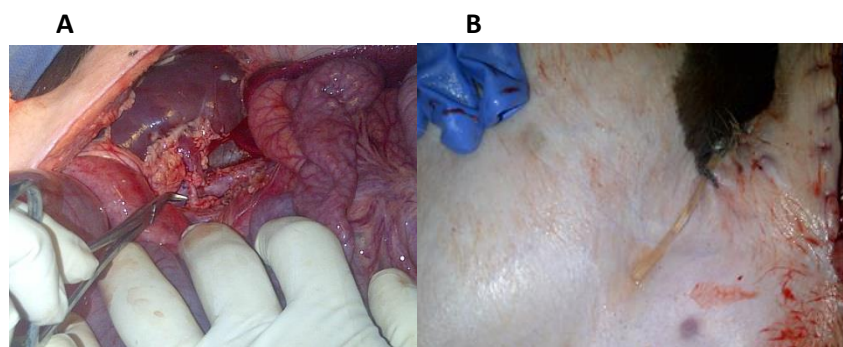
Al quinto día se llevó nuevamente a sala de cirugía, se sacrificó el animal según protocolo de Eutanasia, aprobado por el Comité de Ética. Se extrajo el riñón implantado y se tomaron muestras para su análisis histopatológico.

## 2.4 RESULTADOS

Se realizó la extracción de riñón izquierdo de biomodelo porcino hembra, sin complicaciones intraoperatorias, se llevó el riñón al laboratorio In Vitro para su procesamiento y quimerización. El riñón extraído presentaba un buen color, sin evidencia macroscópica de hemorragia o daño.

La quimerización se realizó con células madre hematopoyéticas que fueron extraídas el día anterior al implante del biomodelo porcino macho y receptor del órgano quimerizado. El medio de cultivo y lavado se mantuvo con oxígeno todo el tiempo, con una saturación del 100% (medido por gasometría) y tratando de mantener un pH fisiológico.

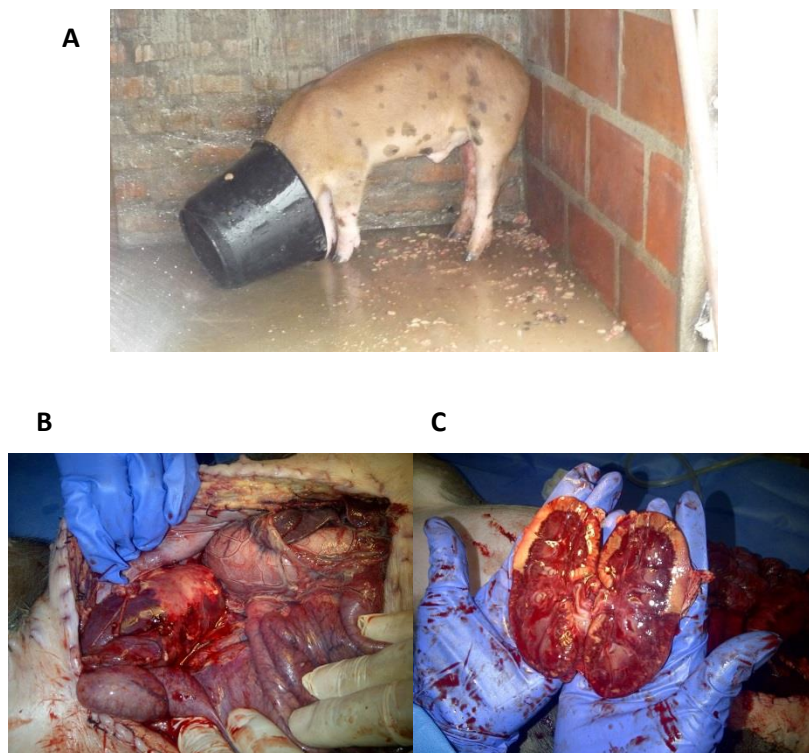
Posterior a la quimerización (14 horas después de su extracción), se llevó el órgano quimerizado a quirófano, donde se encontraba preparado al cerdo receptor, se extrajo el riñón izquierdo propio y se realizó el implante del riñón tratado. Se pudo observar el riñón de buen color, sin signos macroscópicos de isquemia o necrosis. Se implantó e inmediatamente perfundió y funcionó, con producción de orina (Como se puede observar en la Fig. 30).



**Figura 30. Trasplante de riñón quimerizado.** A. Implante del órgano. B. Funcionalidad del órgano.

Post-quirúrgico (24 horas después), el biomodelo no presenta alteración, con buena evolución clínica y manejo del dolor, es llevado a la Piara donde realizaron controles médicos durante 5 días.

El biomodelo presentó buen estado general, sin signos de infección, sin fiebre, frecuencia cardíaca y respiratoria entre los parámetros normales, buen apetito, toma de agua y excreció de orina en parámetros normales, no presentó signos de hemorragia o daño en las suturas quirúrgicas. (Fig. 31).

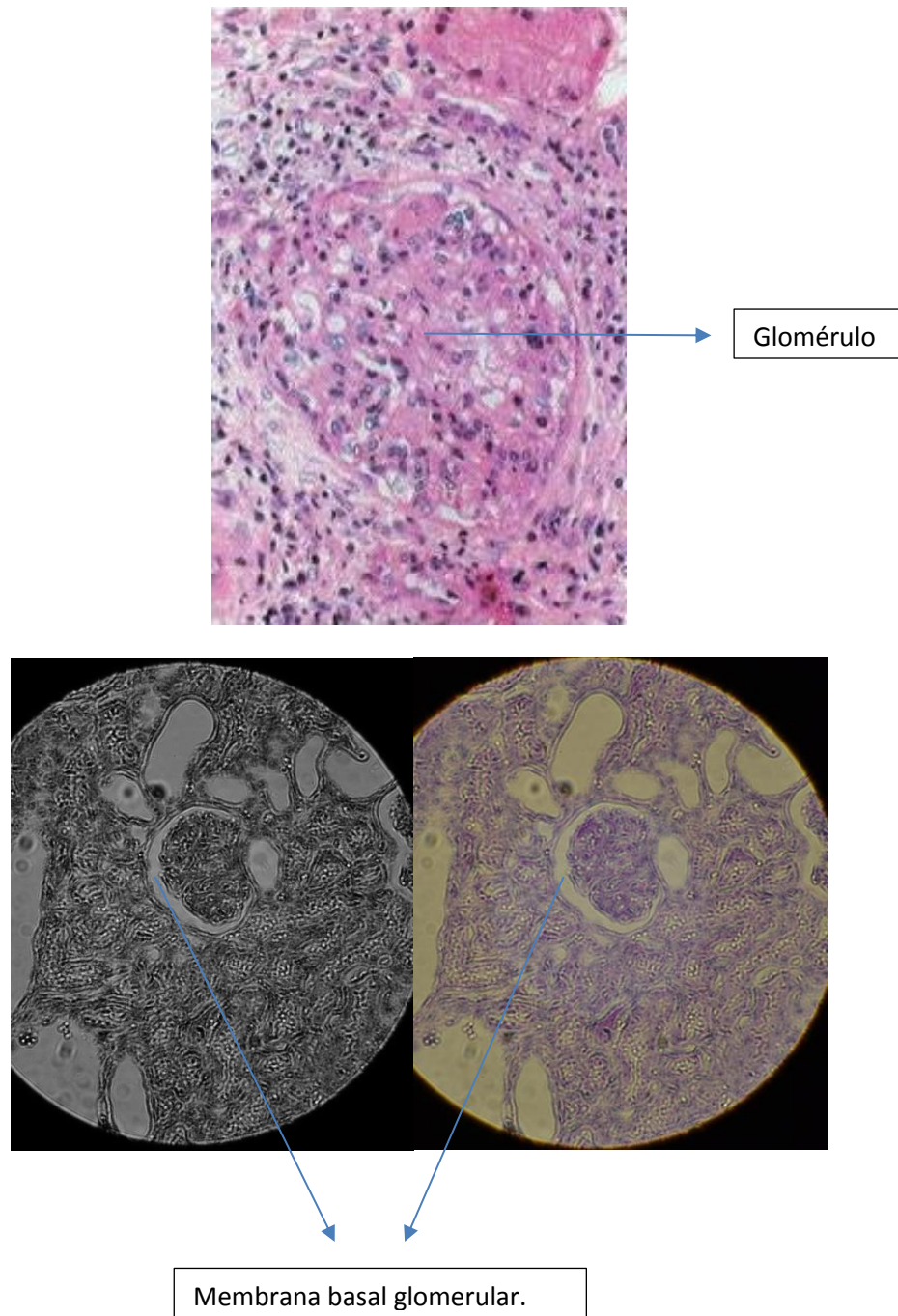


**Figura 31. Necropsia del biomodelo con trasplante renal quimerizado.** A. Tres días después de ser trasplantado con el riñón quimerizado. B. Apertura del biomodelo (necropsia). C. El riñón quimerizado y trasplantado hace 5 días es extraído mostrando zona de isquemia.

Al quinto día, el biomodelo fue trasladado a sala de cirugía para sacrificarlo (según protocolo de Eutanasia) y se extrajo el riñón quimerizado. El riñón en su aspecto macroscópico presentó buenas condiciones generales, buen color en general, pero con una zona de isquemia en el polo superior (Fig. 31).

El análisis posquirúrgico, mostró que el biomodelo presentaba una variante anatómica, UNA ARTERIA POLAR, la cual no fue vista por los cirujanos y esta zona quedó sin perfusión durante el tiempo que estuvo implantado en el biomodelo.

Biopsias de riñón quimerizado (Fig. 32)



**Figura 32. Placa histológica de riñón quimerizado.** Se observa glomérulos en buen estado, viables, sin alteraciones en su arquitectura. Membrana basa intacta. No evidencia de inflamación, ni signos de isquemia. Sin colonización bacteriana o micótica.



## 2.5 DISCUSIÓN:

El modelo porcino fue el modelo experimental escogido para la realización del trasplante renal quimerizado, ya que por su anatomía y fisiología semejante a la humana, permite un abordaje más sencillo. El tamaño del biomodelo y de los órganos permite al cirujano maniobrar con más facilidad y tratar de semejar una cirugía en humanos. Se utilizaron cerdos de diferentes razas (el donante del riñón *Zungo Costeño*, hembra y el receptor y donante de células madre hematopoyéticas un *Pietrain* macho), ambos con pesos y edades similares. El tamaño del cerdo permite un mejor abordaje quirúrgico, los diámetros de la vasculatura y el tamaño de los órganos, permiten una mejor visibilidad en el quirófano.

Este tipo de razas de cerdos son adaptables, se aclimatan rápidamente y son de más fácil manejo<sup>36</sup>.

En cuanto al protocolo anestésico se construyó gracias a protocolos ya establecidos en varios centros experimentales en el mundo y a la experticia del veterinario por lo cual, se escogieron varios fármacos de administración endovenosa como Propofol, Ketamina, Xilacina, fentanilo, entre otros, por su efectividad, seguridad y fácil adquisición. Se utilizó un anestésico local adicional, (Roxicaina) para el procedimiento de extracción de células madre. Para manejo del dolor se escogieron fármacos potentes y de vida media larga como Buprenorfina y Meloxicam, con buena respuesta analgésica<sup>38</sup>.

El abordaje quirúrgico fue laparotomía (vía abierta), permitiendo un mejor acceso y una mejor visibilidad a los cirujanos, aunque tiene sus desventajas como un mayor trauma para el biomodelo, mayor dolor, más tiempo de recuperación y cicatrización frente a un abordaje laparoscópico<sup>39</sup>.

Aunque el trasplante renal es uno de los procedimientos médicos más comunes y su éxito es más del 90% a 1 año y se han encontrado pacientes con sobrevida mayor a 17 años, se buscan alternativas para no usar o disminuir el uso de inmunosupresores y evitar los daños propios de esta terapia como infecciones oportunistas, toxicidad, cáncer, entre otros<sup>40-45</sup>.

Muchos grupos en el mundo estudian mecanismos para producir órganos a partir de especies heterologas<sup>46-51</sup>. Estos grupos se han enfocado en la quimerización de tejido renal, especialmente para xenotrasplantes<sup>46-51</sup>. Este tipo de abordajes plantea la modificación genética de embriones para producir órganos quiméricos, a diferencia de nuestro enfoque, que aunque tiene ciertas similitudes, ya que en ambos casos se pretende transferir la información genética del receptor al donante del órgano para una mejor tolerancia inmunológica sin llegar a la manipulación

genética de embriones, siendo menos invasiva pero igual de efectiva entre individuos no relacionados. En el trasplante de riñón quimerizado se logró evidenciar funcionalidad y viabilidad del injerto, lo que se traduce en primera instancia en que no se presentó rechazo agudo durante los 5 días postrasplante.

Es determinante evitar el rechazo agudo y crónico los cuales se presentan a pesar de los avances en la farmacología, con pérdida del órgano. Además, la cantidad de personas con necesidad de un trasplante renal y el déficit en la cantidad de órganos, lleva a buscar otras opciones terapéuticas como el xenotrasplante<sup>43,44</sup>.



## 6. CONCLUSIONES

1. El modelo porcino presenta ventajas para la realización de experimentos de abordaje quirúrgico, respuesta clínica y paraclínica que se quieran comparar con el humano y esto se debe a la similitud anatómica y fisiológica. Además, es un modelo de fácil acceso y manejo, que no pone en riesgo la supervivencia de la especie.
2. El tratamiento en el laboratorio del órgano antes del implante es importante y permite una viabilidad del mismo. Aspectos como el mantenimiento del órgano en un medio de cultivo rico en aminoácidos, factores de crecimiento, oligoelementos, oxígeno y sustancias como N-acetilcisteína, mejoran las condiciones del órgano y limitan el daño producto de la isquemia-reperfusión.
3. El tiempo de procesamiento del órgano antes del implante tiene un límite, se pudo constatar, que la viabilidad del órgano por fuera del organismo en medio de cultivo no debe superar las 24 horas para tener una mejor respuesta en el trasplante. Se logró establecer un protocolo claro de quimerización de órganos, con tiempos y condiciones determinadas.
4. En el trasplante pulmonar, el daño alveolar por colapso es lo más común y este se presenta por falta de insuflación del pulmón. Una manera de disminuir este daño, es buscar el mecanismo de mantener insuflado el pulmón durante el cultivo, pero esto requiere de controles estrictos, porque al aplicar una presión mayor sobre el pulmón, podría ocasionar más daño que beneficio. Otra solución sería el uso de surfactante en el medio de cultivo que permitiría una conservación de los alveolos.
5. El daño en el pulmón se apreciaba por zonas, siendo la parte interna la más afectada comparada con la parte externa, esto nos da idea sobre la perfusión en el momento del cultivo del órgano, la cual se realiza por medio de la arteria pulmonar y al parecer no es suficiente para cubrir todo el pulmón.
6. La médula ósea está formada por células madre hematopoyéticas que su función es la producción y diferenciación de células de linaje sanguíneo, pero además, está formada por células madre no hematopoyéticas, las cuales se diferencian a otros tipos de células como células adiposas, fibroblastos, endoteliales, etc. Las células madre responde a estímulos del medio accionando factores de transcripción que permiten la formación de células hematopoyética o de otro linaje. Esta podría ser la respuesta, porque la quimerización de órganos permite una mejor supervivencia del

órgano, con una mejor aceptación inmunológica (ya que además, el órgano presentaría información genética del receptor).

7. En el trasplante renal, se logró implementar todo el protocolo de quimerización, logrando una supervivencia y funcionalidad del órgano. No se evidenció rechazo agudo del trasplante.
8. Se estableció una nueva línea de investigación, donde reúne el conocimiento de las ciencias básicas y clínicas en búsqueda de soluciones a problemas de gran envergadura que atañen a la sociedad actual y que producen costos muy altos a nivel económico, social y humano.

## 7. PERSPECTIVAS

1. Esto es parte de una línea de investigación, donde reúnen instituciones académicas y de salud en búsqueda de soluciones a problemas de salud, como es el trasplante de órganos. La necesidad imperiosa de tener órganos para trasplante y la escasez de los mismos, hace que se busquen alternativas para afrontar el problema. Alternativas como tratar de disminuir o anular la respuesta inmunológica a los órganos trasplantados, que permitiría a los pacientes a no depender farmacológicamente de inmunosupresores que traen consigo efectos adversos propios de su mecanismo (disminución de la funcionalidad del sistema inmunológico), que pone en una situación de vulnerabilidad a las infecciones y al desarrollo de malignidades en los pacientes trasplantados.
2. Otra alternativa es la exploración del uso de órganos no humanos, como “xenotrasplantes”, quimerización de órganos fetales en animales y producción de órganos a partir de células madre. Esto resolvería la problemática de la escasez de órganos y disminuiría el costo social y económico de los pacientes que están a la espera de un órgano.
3. Este tipo de estudios muestra que en una visión general el enfoque experimental está dando resultados, el siguiente paso es evaluar a nivel molecular el éxito del procedimiento y así poder esclarecer más el panorama y la viabilidad de los xenotrasplantes.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Informe anual red de donación y trasplantes - 2013. Instituto Nacional de Salud. Bogotá. Vol 3, 2013
2. Newsletter Transplant. Vol 19. N°1 sept 2014
3. Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud. Organización Mundial de la Salud. 2015
4. Situación de la Enfermedad Renal, Hipertensión Arterial y Diabetes Mellitus en Colombia. Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo. 2015
5. Ruiz C, Arias M, Lopez M, Pastor J. Inmunobiología del trasplante. Estudios inmunológicos del donante y el receptor del trasplante renal. Nefrología al día. 2012.
6. Starzl TE: Immunosuppressive therapy and tolerance of organ allografts. N Engl J Med 2008, 358:407-411
7. Toungouz M, Donckier V, Goldman M: Tolerance induction in clinical transplantation: the pending questions. Transplantation 2003, 75:58S-60S.
8. Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, Benike C, Millan MT, Shizuru JA, Hoppe RT, Lowsky R, Engleman EG, Strober S: Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. N Engl J Med 2008, 358:362-368.
9. Mattheus J, Ramos E, Bluestone J. Clinical trials of transplant tolerance: Slow but steady progress. American Journal Transplantation 2003; 3: 794-803
10. Ruiz-Argüello G, Bordes-Aznar J, Diaz-Caballero N, Ruiz-Delgado G. La importancia del quimerismo en medicina. Gaceta médica de México. 2004.
11. Fleta Asin B et al. Quimerismo: Origen e implicaciones médicas. Rev Clin Esp. 2006;206(7):340-2
12. De la Voragine S. La leyenda dorada. Editorial Alianza, 2008.
13. Gonzalez M, Garcia J.M. Trasplante Renal. Editorial Aula Médica. España. 2000.
14. Da Lozzo, A. Historia del trasplante pulmonar en el mundo y en la Argentina. Rev. Hosp. Ital. B.Aires 2013; 33(3): 111-119.
15. García S. Historia del trasplante cardíaco “El triunfo del ingenio”. Insuf Card 2014; (Vol 9) 4:184-191.
16. Watson C. Dark J. Organ transplantation: historical perspective and current practice. British Journal of Anaesthesia 2012. 108(S1): i29-i42.
17. Grupo de trabajo de la SEPAR. Trasplante pulmonar. Arch Bronconeumol 2001; 37; 307-315.
18. Martinez L. Trasplante pulmonar. Criterios de selección y evaluación de candidatos. Neumosur 2000; 12(2): 123-33

19. Borro JM. Actualización del trasplante pulmonar en España. Arch Bronconeumol. 2005; 41: 457-67
20. Arcasoy S, Kotloff R. Lung transplantation. N. Engl. J Med. 1999; 340: 1081-91.
21. Alzate F. Panorama global del trasplante pulmonar: más allá de un órgano. MED.UIS. 2011; 24(2): 155-8
22. Data for National Graft Survival from Scientific Registry of Transplant Recipients ([www.srtr.org/csr/current/centers/default.aspx](http://www.srtr.org/csr/current/centers/default.aspx))
23. Woodrow JP, Shlobin OA, Barnett SD, Burton N, Nathan SD: Comparison of bronchiolitis obliterans syndrome to other forms of chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. J Heart Lung Transplant 2010, 29:1159-64.
24. Roman M, Nair S, Tsui S, Dunning J, Parmar J. Ex vivo lung perfusion: A comprehensive review of development and exploration of future trends. Transplantation 2013; 96: 509-518.
25. Laporta R, Lazaro M, Varela A, Usseti P. Seguimiento a largo plazo del paciente trasplantado pulmonar. Arch Bronconeumol. 2014; 50(2): 67-72
26. Adiego C, Gonzalez-Casaurrán G, Azcarate L, Isea J, and cols. Procedimiento de autotrasplante pulmonar en cerdo como modelo experimental para el estudio del síndrome isquemia-reperfusión. Arch Bronconeumol 2011; 47(6): 283-289.
27. Inci I, Erne B, Arni S and cols. Prevention of primary graft dysfunction in lung transplantation by N-acetylcysteine after prolonged cold ischemia. Journal of heart and lung transplantation. 2010; 29(11): 1293-1301.
28. Sener G, Tosun O, Sehirili A. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. Life Science. 2003; 72(24): 2707-2718.
29. Salatti R, Feijó C. Oxidative stress and lung ischemia-reperfusion injury. Oxidative medicine and cellular longevity. 2015
30. Elahimehr R, Scheinok A, McKay D. Hematopoietic stem cells and solid organ transplantation. Transplantation reviews. 2016.
31. Dominguez M, Romero-Ramirez H, Rodriguez J. Células madre hematopoyéticas: origen, diferenciación y función. Rev. Med UV, 2015: 30-37
32. Jones B, McTaggart S. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: From culture to clinic. Experimental Hematology 2008; 36: 733-741.
33. Gutierrez O, Tintinago L, Criollo W, Jerez A and cols. Six years without immunosuppression after larynx and trachea transplantation tolerance induction by chimeration. A case report. (sometime rev. Colombia Médica)
34. Mikkola H, Orkin S. The journey of developing hematopoietic stem cells. Development. 2006; 133(19): 3733-44

35. Wognum A, Eaves A, Tomas T. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of medical research*. 2003; 34 (6): 461-75
36. Rossant J. Stem cells: the magic brew. *Nature*. 2007; 448(7151): 260-2
37. T. Kobayashi, T. Yamaguchi, S. Hamanaka, M. Kato-Itoh, Y. Yamazaki, M. Ibata, *et al.* Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell*, 142 (2010), 787–799
38. H. Matsunari, H. Nagashima, M. Watanabe, K. Umeyama, K. Nakano, M. Nagaya, *et al.* Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (2013), 4557–4562.
39. Garcia-Garcia G, Harden P, Chapman Jeremy (representación del World kidney day steering committee 2012. *Nefrología* 2012; 32(1): 1-6
40. Garcia de Jalón A, Pascual D, Trávez M and cols. Trasplante renal. Técnica y complicaciones. *Actas Urol. Esp.* 2003; 27(9): 662-677.
41. Gomez-Roel X, León-Rodríguez E. Neoplasias malignas en receptores de trasplante rena. *Rev. Investigación Clínica*. 2005; 57(2): 225-229.
42. Martin P, Errasti P. Trasplante renal. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2006; 29 (2): 79-92
43. Bestard J, Raventós C, Celma A, Rosal M, and cols. El modelo porcino en la cirugía experimental del trasplante renal. *Actas Urol Esp* 2008; 32(1): 91-101.
44. Kaiser G, Heuer M, Furhauf N, Kuhne C, Broelsch C. General handling and anesthesia for experimental surgery in pigs. *J Surg Res*. 2006; 130(1): 73-79.
45. Simforoosh N, Basiri A, Tabibi A, Shakhassalim N, Hosseini M. Comparison of laparoscopic and open donor nephrectomy: a randomized controlled trial. *BJU Int*. 2005; 95(6): 851-855.
46. T. Yokoo, A. Fukui, T. Ohashi, Y. Miyazaki, Y. Utsunomiya, T. Kawamura, *et al.* Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. *J Am Soc Nephrol*, 17 (2006), pp. 1026–1034 (riñón)
47. 10- T. Yokoo, T. Ohashi, J.S. Shen, K. Sakurai, Y. Miyazaki, Y. Utsunomiya, *et al.* Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005), pp. 3296–3300
48. 11- K. Matsumoto, T. Yokoo, H. Matsunari, S. Iwai, S. Yokote, T. Teratani, *et al.* Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue. *Stem Cells*, 30 (2012), pp. 1228–1235

- 49.12- S. Yokote, H. Matsunari, S. Iwai, N. Yamanaka, A. Uchikura, H. Fujimoto, *et al.* Uterine excretion strategy for stem cell-generated embryonic kidneys. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (2015), pp. 12980–12985
- 50.13- M.R. Hammerman. Xenotransplantation of embryonic pig kidney or pancreas to replace the function of mature organs. *J Trasplant*, 2011 (2011), p. 501749
- 51.15- B. Dekel, T. Burakova, F.D. Arditti, S. Reich-Zeliger, O. Milstein, S. Aviel-Ronen, *et al.* Human and porcine early kidney precursors as a new source for transplantation. *Nat Med*, 9 (2003), pp. 53–60
52. Peterbauer-Scherb *et al.* Isolation of pig bone marrow mesenchymal stem cells suitable for one-step procedures in chondrogenic regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2010; 4: 485–490.