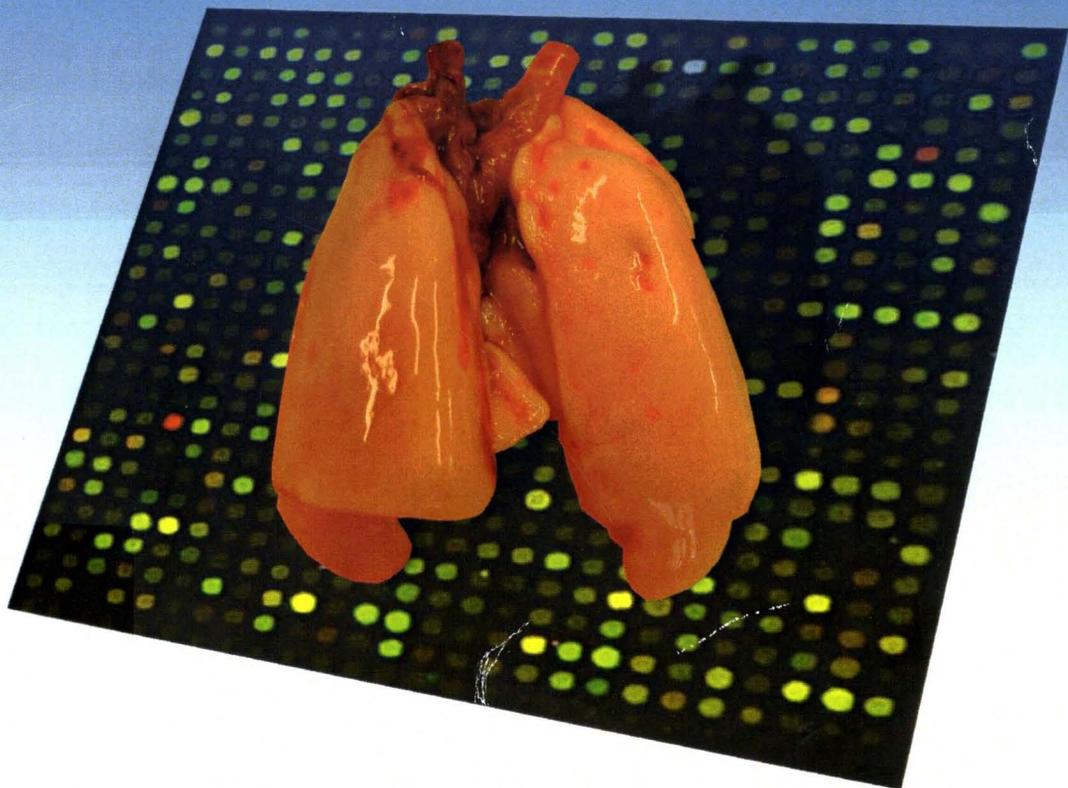


Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria



Una aproximación al estudio molecular del rechazo crónico en el trasplante pulmonar experimental mediante la tecnología de DNA microarrays



SERVICIO DE INVESTIGACIÓN Y TERCER CICLO
REGISTRO DE TESIS DOCTORALES

Nº 220

FECHA: 28-4-2009

EL FUNCIONARIO



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
SUBDIRECCIÓN DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

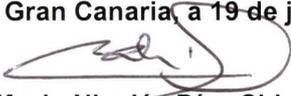
Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Magfco. de esta Universidad, y finalizada la defensa y discusión de esta tesis doctoral, los señores miembros del Tribunal, emiten la siguiente calificación global:

SOBRESALIENTE "CON LAUDO"

Votos favorables:

CINCO

Las Palmas de Gran Canaria, a 19 de junio de 2009.


El Presidente: D. Bonifacio Nicolás Díaz Chico


El Secretario: D. Ricardo Chirino Godoy


El Vocal: D. Andrés Varela de Ugarte


El Vocal: D. Joaquín Calatayud Gastardi


El Vocal: D. Bernardino Clavo Varas


El Doctorando: D. Ricardo A. García Herrera

ANEXO I

D. ANTONIO FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ DIRECTOR DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

INFORMA QUE:

El Consejo del Instituto toma el acuerdo de dar el consentimiento para la tramitación de la tesis doctoral titulada: “Una Aproximación al Estudio Molecular del Rechazo Crónico en el Transplante Pulmonar Experimental Mediante la Tecnología de DNA MICROARRAYS”, presentada por el doctorando D. Ricardo Alfonso García Herrera y dirigida por los Drs. D. Norberto Santana Rodríguez, D. Leandro Fernández Pérez, D. José Luis Martín Barrasa y D. José Carlos Rodríguez Pérez

Y para que conste y a efectos de lo previsto en el artículo 73.2 del Reglamento de estudios de doctorado de esta Universidad, firma la presente en Arucas, a quince de abril de dos mil nueve.



ANEXO II

Instituto: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Programa de doctorado: "Sanidad Animal"

Título de la tesis: "Una Aproximación al Estudio Molecular del Rechazo Crónico en el Transplante Pulmonar Experimental Mediante la Tecnología de DNA MICROARRAYS

Tesis doctoral presentada por: D. Ricardo Alfonso García Herrera

Dirigida por: los Drs.: D. Norberto Santana Rodríguez, D. Leandro Fernández Pérez, D. José Luis Martín Barrasa y D. José Carlos Rodríguez Pérez Fecha.

Arucas, a 15 de abril de 2009



EL DIRECTOR DEL IUSA

★ Edo.: Antonio J. Fernández Rodríguez



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL
Y SEGURIDAD ALIMENTARIA
PROGRAMA DE DOCTORADO: SANIDAD ANIMAL

TÍTULO DE LA TESIS

**“UNA APROXIMACIÓN AL ESTUDIO MOLECULAR DEL RECHAZO CRÓNICO
EN EL TRASPLANTE PULMONAR EXPERIMENTAL MEDIANTE LA
TECNOLOGÍA DE DNA MICROARRAYS”**

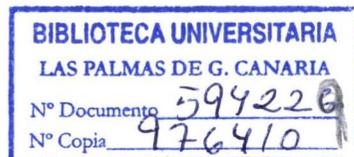
Tesis Doctoral presentada por:

D. RICARDO ALFONSO GARCÍA HERRERA

SYA P.P.



Dirigida por los doctores:



DR. NORBERTO SANTANA RODRÍGUEZ.

DR. LEANDRO FERNÁNDEZ PÉREZ.

DR. JOSÉ LUIS MARTIN BARRASA.

DR. JOSÉ CARLOS RODRÍGUEZ PÉREZ.

El Director,
(firma)

El Director,
(firma)

El Director
(firma)

El Director,
(firma)

El Doctorando
(firma)

Las Palmas de Gran Canaria a, 17 de Abril de 2009



Servicio
Canario de la Salud

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN



NORBERTO SANTANA RODRÍGUEZ, DOCTOR EN MEDICINA CON INTENSIFICACIÓN PARA LA ACTIVIDAD INVESTIGADORA EN EL SISTEMA NACIONAL DE SALUD DEL MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO, INSTITUTO DE SALUD CARLOS III.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado *“Aproximación al estudio molecular del rechazo crónico en el trasplante pulmonar experimental mediante la tecnología de DNA Microarrays”* ha sido realizado por D. RICARDO ALFONSO GARCÍA HERRERA, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín y en el Laboratorio de Farmacología de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, bajo mi dirección y asesoramiento, una vez revisada la presente memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Las Palmas de Gran Canaria a quince de abril de dos mil nueve.

Fdo.: NORBERTO SANTANA RODRÍGUEZ



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

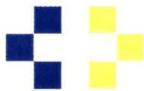
LEANDRO FRANCISCO FERNÁNDEZ PÉREZ, PROFESOR TITULAR DE LA
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“Aproximación al estudio molecular del rechazo crónico en el trasplante pulmonar experimental mediante la tecnología de DNA Microarrays”** ha sido realizado por D. RICARDO ALFONSO GARCÍA HERRERA, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín y en el Laboratorio de Farmacología de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, bajo mi dirección y asesoramiento, una vez revisada la presente memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Las Palmas de Gran Canaria a quince de abril de dos mil nueve.

Fdo.: LEANDRO FRANCISCO FERNÁNDEZ PÉREZ



Servicio
Canario de la Salud

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN



JOSE LUIS MARTIN BARRASA, DOCTOR EN VETERINARIA, PROFESOR ASOCIADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Y VETERINARIO RESPONSABLE EN SALUD Y BIENESTAR ANIMAL DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE GRAN CANARIA DR. NEGRÍN, VINCULADO AL ORGANISMO PÚBLICO DE INVESTIGACIÓN: SERVICIO CANARIO DE LA SALUD.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “*Aproximación al estudio molecular del rechazo crónico en el trasplante pulmonar experimental mediante la tecnología de DNA Microarrays*” ha sido realizado por D. RICARDO ALFONSO GARCÍA HERRERA, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín y en el Laboratorio de Farmacología de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, bajo mi dirección y asesoramiento, una vez revisada la presente memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Las Palmas de Gran Canaria a quince de abril de dos mil nueve.

Fdo.: JOSÉ LUIS MARTÍN BARRASA



Servicio
Canario de la Salud

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN



JOSE CARLOS RODRÍGUEZ PÉREZ, DOCTOR EN MEDICINA, PROFESOR TITULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA SALUD EN LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Y JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE GRAN CANARIA DR. NEGRÍN.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “*Aproximación al estudio molecular del rechazo crónico en el trasplante pulmonar experimental mediante la tecnología de DNA Microarrays*” ha sido realizado por D. RICARDO ALFONSO GARCÍA HERRERA, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín y en el Laboratorio de Farmacología de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, bajo mi dirección y asesoramiento, una vez revisada la presente memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Las Palmas de Gran Canaria a quince de abril de dos mil nueve.

Fdo.: JOSÉ CARLOS RODRÍGUEZ PÉREZ

El proyecto de investigación que ha permitido la realización de esta tesis doctoral ha sido **financiado** por:

1.-Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR).

Proyecto de Investigación: “*Estudio de los mecanismos genéticos y moleculares responsables de la lesión de isquemia-reperfusión y del rechazo en el trasplante pulmonar experimental*”.

Año de concesión: 2004.

Investigador Principal: Dr. Norberto Santana Rodríguez

2.-Fundación para la Investigación Mútua Madrileña (Fundación MM).

Proyecto de Investigación: “*Mecanismos genéticos y moleculares responsables de la lesión de isquemia-reperfusión y del rechazo en el trasplante pulmonar*”.

Año de concesión: 2005.

Investigador Principal: Dr. Norberto Santana Rodríguez



Al Dr. Ricardo García, Mi Padre,

A mi madre Beatriz,

A Daniel y Monica,



Esta TESIS es una muestra de tenacidad, constancia, perseverancia y esfuerzos aunados de muchas personas, con la alegría de llegar a la recta final deseo dejar plasmado mi agradecimiento a todas y cada una de las personas que de una forma u otra han ayudado a que esto sea hoy una realidad. Trataré de hacer menciones especiales de todos ellos con el temor de poder olvidar u omitir a alguien por descuido, por lo que ruego disculpas anticipadas.

Dr. Norberto Santana Rodríguez, gracias por saberme llevar por el camino que ha culminado en esta Tesis Doctoral, me es imposible enumerar todas las cosas positivas que he aprendido de ti en este proceso, por ello y mucho mas, gracias eternas.

Dr. *Leandro Fernández Pérez*, no soy capaz de expresar mi gratitud, por tu incansable apoyo, jamás ha crecido en mi tanta admiración académica, amigo de las noches más largas de mis últimos días, aun no sé, si decir que fue buena idea diseñar un sitio web para tus correcciones que llegaron a ser masivas e imprescindibles.

Dr. *José Luis Martín Barrasa*, siempre con tu sencillez y gran sonrisa. Gracias por tu amplio conocimiento en el Bienestar Animal.

Dr. José Carlos Rodríguez Pérez, muchas gracias por todos los consejos que han hecho que la escritura de este manuscrito se engrandezca.

A la Dra. M^a Dolores Fiuza Pérez, gracias eternas, nunca había vivido tanta intensidad frente al ordenador de nadie, pasando desde el júbilo extremo hasta la más amarga desespera. Consejera, amiga, y sobre todo, un excelente ser humano.

A mis compañeros de la Unidad de Investigación: Arantzazu Anabitarte, Pedro Llontop, Yeray González, Yanira Brito, Patricia Gonzalez, gracias.

A Juan R. Verona por tu brillante colaboración en la portada y presentación.

De la misma manera no podría omitir el mencionar a mi gran amigo Ismael Arias y familia, siempre han cuidado de mi persona, convirtiéndose en mi familia española de adopción, y como olvidar a otro fiel amigo y confidente Borja Cuadrado. Jamás dejar de mencionar a todos mis compañeros socios del club SOZI de la UCM, a todos, gracias.

A mis Amigos Jorge de Mena y Cristina Camacho, mis hermanos. Siempre estuvieron en los buenos y malos momentos, con gran paciencia, muchos y buenos consejos, los cuales sirvieron para mi formación personal.

A mis padres y hermanos por el cariño manifiesto hacia mí. Gracias por ser un pilar importante en mi vida e inculcarme el amor por el trabajo y el estudio. Ellos han sido un apoyo importante desde Méjico.

A Méjico y España mis dos países, uno por nacimiento y otro por adopción.



Finalmente, a Héctor Avendaño Carrillo†, hermano mío, tu prematura partida ha dejado en mí un vacío enorme imposible de cubrir, escribo estas líneas para hacer constar mi cariño y admiración por ti.

Me gustaría que todo aquel que lea estos agradecimientos pudiera reproducir en su mente, mi lenta elocuencia y mi más singular sonrisa. Y debidó a que las lagrimas impiden que pudiera seguir escribiendo no queda más que decir, a todos muchas gracias.

Ricardo A. García Herrera.



El trasplante pulmonar (TP) es una opción terapéutica aplicable en el estadio final de la patología pulmonar no maligna. Desde la década de los 80 se han realizado más de 21.000 TP y aunque la mayoría de los pacientes mejoran su calidad de vida, la supervivencia global se ha estancado en un 53% a los 5 años. Esto se debe en gran parte a las complicaciones y a la escasa repercusión clínica de los trabajos experimentales sobre las mismas, de forma que la incidencia del rechazo apenas se ha modificado en los 10 últimos años. De hecho, el rechazo crónico (RC), proceso fibroproliferativo que conduce a la fibrosis del injerto, continúa siendo el talón de Aquiles del TP. Estas evidencias clínicas demandan un esfuerzo en la investigación experimental básica dirigido al conocimiento de los genes y mecanismos moleculares involucrados en el RC. Con este deseo se ha desarrollado la presente Tesis.

Para ello se ha diseñado un estudio de experimentación animal con un total de 25 ratas Sprague-Dawley. Los animales se han distribuido en 2 grupos: a) un grupo control (n=5) al que se le extrajo muestras de pulmón sano y b) un grupo problema (n=20, 10 donantes y 10 receptores) al que se le realizó un trasplante pulmonar unilateral izquierdo. Se ha valorado: a) evolución clínica, b) estudio histológico, c) apoptosis y d) determinaciones genéticas mediante microarrays y PCR en tiempo real.

Los hallazgos histológicos demostraron cambios característicos de la respuesta al rechazo crónico con desaparición del parénquima pulmonar e infiltración por células linfoplasmocitarias. El estudio inmunohistoquímico mostró una elevada positividad tanto para marcadores anti-apoptóticos (Bcl-2) como proapoptóticos (Bax, Caspasa 3). El uso de la técnica de microarrays ha permitido identificar 326 genes que incrementaron su nivel de expresión en más de un 50% mientras que 387 lo reducían en la misma intensidad. Los genes regulados en respuesta al rechazo crónico están significativamente representados por las respuestas biológicas relevantes para este modelo: “regulación de la apoptosis”, “actividades de ribosomas”, “presentación y procesamiento de antígenos”, “respuesta inmune” y “respuesta al estrés celular. El rechazo crónico se asocia con un incremento de los niveles de MCP-1, TGF-B e IGF-1 en el pulmón trasplantado cuyas funciones están íntimamente relacionadas con los procesos biológicos identificadas en los microarrays, lo que sugiere que participan de forma muy activa en el RC. Desde el punto de vista translacional podrían ser analizados con más detalle para comprobar su utilidad como biomarcadores que permitieran monitorizar la evolución de los pacientes trasplantados de pulmón.

Nuestro estudio ha aportado un análisis genómico básico al estudio del trasplante pulmonar experimental y ha demostrado que la técnica de microarrays resulta muy eficaz para analizar los cambios genómicos asociados al rechazo crónico. Esto muestra el poder potencial de los microarrays de ADN para identificar nuevas dianas moleculares relacionadas con los cambios fisiopatológicos que sufre el pulmón trasplantado. Estas dianas podrían ser manipuladas para regular la respuesta inmune/inflamatoria exacerbada o para contribuir al desarrollo de tratamientos más selectivos capaces de proteger al pulmón trasplantado del rechazo.



Índice



I.-INTRODUCCIÓN	1
1.-TRASPLANTE PULMONAR	1
1.1-Historia y evolución del trasplante pulmonar	1
1.2- Indicaciones del trasplante pulmonar. Criterios de selección del receptor	4
1.2.1.-Valoración de la comorbilidad del receptor	5
1.2.2.-Contraindicaciones relativas para ser receptor	6
1.2.3.-Contraindicaciones absolutas	7
1.2.4.-Estudios básicos en el potencial receptor de trasplante pulmonar	7
1.2.5.-Criterios específicos de inclusión en la lista de espera	8
1.2.5.1.-Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	8
1.2.5.2.-Fibrosis quística	8
1.2.5.3.-Fibrosis pulmonar	9
1.2.5.4.-Hipertensión pulmonar	10
1.2.6.-Trasplante pulmonar pediátrico	11
1.3.-Selección del donante	12
1.3.1.-Donantes en muerte cerebral	13
1.3.2.-Valoración del donante en muerte cerebral	14
1.3.3.-Donantes en asistolia	16
1.3.4.-Donantes vivos	19
1.3.5.-Selección del receptor compatible	19
1.3.6.-El mantenimiento del donante en muerte cerebral	20
1.4.-Obtención y preservación del pulmón	21
1.4.1.-La extracción pulmonar	21
1.4.2.-Preservación pulmonar	25
1.4.2.1.-Tiempo de isquemia	26
1.4.2.2.-Temperatura	27
1.4.2.3.-Insuflación pulmonar	27
1.4.2.4.-FiO ₂	28
1.4.2.5.-Soluciones de preservación	28
1.4.2.6.-Alternativas en la mejora de la preservación pulmonar	29
1.5.-Implante en el receptor	30
1.6.-Complicaciones del trasplante pulmonar	31
1.6.1.-Lesión de isquemia–reperfusión	31
1.6.2.-Rechazo pulmonar	37
1.6.2.1.-Rechazo hiperagudo	37

1.6.2.2.-Rechazo agudo	37
1.6.2.3.-Rechazo crónico	40
1.6.3.-Otras complicaciones	42
1.6.3.1.-Hipotensión	42
1.6.3.2.-Hipertension pulmonar	42
1.6.3.3.-Tromboembolismo pulmonar	42
1.6.3.4.-Infecciones	43
1.6.3.4.1.-Infecciones bacterianas	43
1.6.3.4.2.-Infecciones víricas	44
1.6.3.4.3.-Infecciones por hongos	44
1.6.3.4.4.-Otras infecciones	45
1.6.3.5.-Complicaciones anastomóticas	45
1.6.3.5.1.-De la vía aérea	45
1.6.3.5.2.-Vasculares	46
1.6.3.6.-Complicaciones del abordaje	46
1.6.3.7.-Complicaciones pleurales	47
1.6.3.7.1.-No Infecciosas	47
1.6.3.7.2.-Infecciosas	48
1.6.3.8.-Complicaciones neurológicas	48
1.6.3.9.-Complicaciones abdominales	49
1.6.3.10.-Miopatía	49
1.6.3.11.-Procesos linfoproliferativos	49
1.7.-Resultados del trasplante pulmonar	50
1.7.1.-Supervivencia	50
1.7.1.1.-Trasplante cardiopulmonar	51
1.7.1.2.-Trasplante pulmonar	51
1.7.2.-Calidad de vida	52
2.-APLICACIÓN DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL ESTUDIO DEL	54
TRASPLANTE PULMONAR	
2.1.-Nuevas estrategias disponibles en genómica	54
2.2.-Regulación de la expresión génica	54
2.3.-Estudios de expresión génica usando DNA microarrays	56
2.4.-Evolución del análisis de datos obtenidos de los microarrays	58
2.5.-La identificación de los genes diferencialmente regulados	59
2.6.-Anotación funcional (Gene Ontology –GO-) de los genes regulados	61



2.7.- PCR y PCR cuantitativa en tiempo real	63
II.-JUSTIFICACIÓN	65
III.-OBJETIVOS	67
IV.-MATERIAL Y MÉTODO	69
1.-Material	69
1.1.-Animales de experimentación	69
1.2.-Salas, equipos y material inventariable	70
1.3.-Material quirúrgico	70
1.4.-Medicación anestésica y analgésica	71
1.5.-Reactivos	71
2.-Método	72
2.1.-Diseño del estudio	72
2.1.1.-Diseño de los microarrays	72
2.2.-Técnica quirúrgica	72
2.2.1.-Extracción del pulmón donante	72
2.2.2.-Implante en el receptor	74
2.3.-Obtención y procesamiento de las muestras	76
2.3.1.-Sacrificio del animal trasplantado	76
2.4.- Mediciones	77
2.4.1.-Respuesta clínica al trasplante	77
2.4.2.-Determinaciones histológicas	77
2.4.3.-Determinaciones de la apoptosis	77
2.4.4.-Determinaciones genómicas	78
2.4.4.1.-Extracción de RNA y síntesis de cDNA	78
2.4.4.2.-Determinación de la expresión genómica mediante qRT-PCR	78
2.4.4.3.-Fabricación de los microarrays	80
2.5.-Análisis de imagen, normalización y estadística	80
2.5.1.-Microarrays	80
2.5.2.- Real Time PCR	80
V.-RESULTADOS	81
1.-Evolución clínica postoperatoria	81
2.-Determinaciones histológicas	81
3.-Determinación de la apoptosis	83
4.-Análisis de los cambios en la expresión de genes	84
4.1.-Microarrays	84

4.2.-Real Time PCR	85
VI.-DISCUSIÓN	90
VII.-CONCLUSIONES	97
VIII.-BIBLIOGRAFÍA	99
IX.-ANEXO: TABLAS DE MICROARRAYS Y FIGURAS	109



Abreviaturas



ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosindifosfato
ADVP	adicto a drogas por vía parenteral
AMP	adenosinmonofosfato
ATP	adenosintrifosfato
BO	bronquiolitis obliterante
BTB	biopsia transbronquial
CA ⁺⁺	Calcio
CEC	circulación extracorpórea
CMV	Citomegalovirus
cc	centímetro cúbico
cm	centímetro
Col4a1	Colágeno tipo IV
Ctgf	Factor de crecimiento del tejido conectivo
CV	capacidad vital
DBP	dextrano bajo en potasio
DLCO	capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono
EC	Eurocollins
ECMO	Circulación extracorpórea con oxigenador de membrana
EPN	edema pulmonar neurogénico
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
Fe	Hierro
Fe ⁺²	ion ferroso
Fe ⁺³	ion férrico
FEV ₁	volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FiO ₂	fracción de oxígeno inspirado
FP	fibrosis pulmonar
FPI	fallo primario de injerto
FR	frecuencia respiratoria
H ⁺	protones
H ₂ O	agua

H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
Hg	mercurio
HLA	antígenos de histocompatibilidad
h	horas
HTP	hipertensión pulmonar
im	intramuscular
l	litro
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-2	Interleukina-2
IL-8	Interleukina-8
IL-12	Interleukina-12
INF- γ	Interferón gamma
IOT	Intubación orotraqueal
ip	intraperitoneal
iv	intravenoso
Fn1	Fibronectina 1
K ⁺	potasio
Kg	Kilogramos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de Monocitos-1
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mm	milímetros
Na ⁺	Sodio
NAD	nicotinamida adenina dinucleotido
NADH	nicotiamida adenina dinucleotido reducido
ng	nanogramos
NO	óxido nítrico
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Oxígeno
OH ⁻	radicales hidroxilo

ONT	Organización Nacional de Trasplantes
PCO ₂	presión parcial de anhídrido carbónico
PEEP	presión positiva al final de la espiración
PGE1	Prostaglandina E1
P	Fósforo
PO ₂	presión parcial de oxígeno
PVC	presión venosa central
RA	rechazo agudo
RC	rechazo crónico
RHA	rechazo hiperagudo
RLO	radicales libres de oxígeno
rpm	respiraciones por minuto
Rx	radiografía
sc	subcutáneo
SOCS2	Suppressor of cytokine signalling 2
SOCS3	Suppressor of cytokine signalling 3
TCP	trasplante cardiopulmonar
TEP	tromboembolismo pulmonar
TGFB-1	transforming growth factor beta 1
TNF- α	Tumor necrosis factor alfa
TP	trasplante pulmonar
UI	unidades internacionales
UMI	Unidad de medicina intensiva
UW	Universidad de Wisconsin
VC	volumen corriente

Introducción



1 EL TRASPLANTE PULMONAR

El trasplante pulmonar (TP) es una opción terapéutica aplicable en el estadio final de la patología pulmonar no maligna, que incluye afecciones de la vía aérea, parénquima pulmonar y circulación pulmonar. Desde 1980 se han realizado más de 21000 trasplantes en todo el mundo (uní o bipulmonares). Este número se va incrementando, habiendo mejorado de forma considerable la supervivencia gracias a los avances en la preparación preoperatoria, preservación del órgano, técnica quirúrgica, inmunosupresión y control postoperatorio. Aunque la supervivencia actual global ronda el 50% a los 5 años, la mayoría de los pacientes trasplantados experimentan una mejora considerable de su calidad de vida, lo que ha consolidado a este procedimiento quirúrgico.

1.1.-Historia y evolución del trasplante pulmonar

El TP experimental se inició en la Unión Soviética cuando *Demikov* realizó, en 1946, el primer trasplante cardiopulmonar en un perro. Un año más tarde efectuaría un trasplante unipulmonar⁽¹⁾. En un principio, además de valorar las posibilidades de supervivencia del perro sometido a trasplante, los estudios fisiopatológicos iban dirigidos a conocer la repercusión hemodinámica y las posibilidades de que el órgano trasplantado asumiera la función respiratoria.

La pregunta que se hacían todos los autores, y en especial los grupos de *Hardy*^(2, 3) y *Veith*⁽⁴⁾, era si el pulmón implantado sería capaz de asumir dicha función. Para ello, usaban un modelo experimental de autotrasplante y homotrasplante, con ligadura de la arteria pulmonar contralateral. En ese sentido, en Europa destacaron los estudios experimentales de *Wildevuur*⁽⁵⁾, de *Noirclerc*⁽⁶⁾ y de *Levasseur*⁽⁷⁾ y en nuestro país, los trabajos de la *Fundación Jiménez Díaz*⁽⁸⁾, del *Hospital de la Santa Cruz y San Pablo* y de la *Facultad de Medicina de Madrid*.

El primer autor que realizó un TP experimental con éxito fue el francés *Metras*⁽⁹⁾ quien, en 1950, publicó su serie de 20 trasplantes con supervivencias de 3 semanas. La importancia del trabajo de este autor radica en que introdujo la técnica del implante pulmonar que apenas se ha modificado con el paso del tiempo, siendo la secuencia preferida para las anastomosis la del bronquio, seguido de la arteria y por último de la aurícula.

Sin embargo, los primeros TP en clínica humana tuvieron un resultado desalentador. *Hardy*⁽³⁾ realizó, en 1963, el primer TP unilateral izquierdo, en el *Mississippi Medical Center*, falleciendo el enfermo a los 15 días de insuficiencia renal. En 1971, *Hugh-Jones*⁽¹⁰⁾, consiguió una supervivencia de 2 meses, en un paciente afecto de alveolitis fibrosante sometido a un TP derecho que falleció por dehiscencia



bronquial. En 1972, *Veith*⁽¹¹⁾, obtuvo una supervivencia de 6 meses en un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) que murió de una hemoptisis masiva por erosión de una arteria bronquial. *Nelems*⁽¹²⁾ en 1977 intervino en Toronto a un paciente afecto de una lesión pulmonar por inhalación que falleció al 18° día por dehiscencia de la sutura bronquial.

La mayor supervivencia fue la conseguida por *Deron*⁽¹³⁾ del Hospital Universitario de Gante al realizar un TP derecho a un paciente silicótico que falleció a los 10 meses de una neumonía. De los 38 primeros pacientes trasplantados, en los que la inmunosupresión se realizó principalmente con corticoides y azatioprina, desde el de *Hardy* en 1963 al de *Nelems* en 1977, sólo 9 sobrevivieron más de 15 días. La mayor parte de estos pacientes fallecieron por infección y dehiscencia de la anastomosis bronquial.

Sin duda, la dehiscencia de la anastomosis constituía un serio problema y por ello se diseñaron determinadas estrategias técnicas para intentar evitarla. En 1970 *Trummer*⁽¹⁴⁾ describió la sección bronquial del donante en la proximidad de la bifurcación, haciendo un implante de bronquio corto y su posterior cobertura con los tejidos vecinos; mientras que *Veith*⁽¹⁵⁾ describió la técnica del telescopado bronquial. A su vez, la escuela de Toronto iniciaba el estudio experimental de la isquemia del bronquio en el segmento distal de la anastomosis en el autotrasplante, comprobando que el restablecimiento de la circulación arterial bronquial tardaba alrededor de 4 semanas en producirse⁽¹⁶⁾.

En este sentido, *Lima*⁽¹⁷⁾ comprobó que la dosis de prednisona administrada para la inmunosupresión del paciente, 2 mg/kg/día, tenía un efecto adverso sobre la cicatrización bronquial. Con la aparición de la ciclosporina, *Goldberg*⁽¹⁸⁾ observó un número significativamente menor de dehiscencias de la anastomosis bronquial cuando la utilizaban como alternativa a la prednisona. Con el fin de paliar la isquemia como factor determinante en esta problemática, *Dubois*⁽¹⁹⁾ estudió el papel de la omentopexia en la revascularización bronquial. Comprobó que el epiplón era capaz de restablecer comunicaciones con la circulación bronquial distal 4 días después del trasplante, preservando la viabilidad de la anastomosis bronquial.

Con posterioridad, *Saunders*⁽²⁰⁾ publicó en 1984 un trabajo experimental, en el que la utilización de la ciclosporina como sustituto de la prednisona y el uso de la omentopexia demostró excelentes resultados.

Tras su primer fracaso, el grupo de TP de Toronto intentó por segunda vez realizar un TP en 1982, esta vez dirigido por *Cooper*⁽²¹⁾. El paciente afecto de una fibrosis pulmonar (FP) por paraquat fue tratado mediante TP bilateral secuencial, con un intervalo de 17 días y con circulación extracorpórea con oxigenador de membrana

(ECMO). El paciente murió al día 71 del segundo trasplante por una fístula entre la tráquea y la arteria innominada.

Sin duda, la publicación, ese mismo año, de *Reitz*⁽²²⁾ de los resultados obtenidos en la Universidad de Stanford con el trasplante cardiobipulmonar (TCP) en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca secundaria a hipertensión pulmonar (HTP), supuso un gran estímulo ante un panorama desolador.

Este estímulo, junto con el interés mostrado a nivel experimental y el análisis de la experiencia mundial, que ponía de manifiesto que los receptores trasplantados estaban en situación clínica catastrófica, determinaron que el grupo de Toronto iniciara un programa de trasplante unipulmonar en pacientes afectados de FP que no estuvieran en situación terminal. En 1983 realizaron un TP derecho en un paciente de 58 años afecto de FP, el cual fue dado de alta hospitalaria a las 6 semanas, con una buena calidad de vida hasta su fallecimiento, seis años y medio más tarde, por insuficiencia renal⁽²³⁾.

Algunos años más tarde se presentaron las primeras revisiones con resultados a largo plazo. En 1987, *Cooper*⁽²⁴⁾ presentó los 5 primeros casos de TP unilateral con sólo un fallecimiento, y en 1989 *Pearson* presentó 16 TP unilaterales con sólo 4 muertes. Con ello se iniciaba la andadura clínica de la cirugía del TP.

Sin embargo, quedaba por solventar el TP bilateral para la patología séptica y, por aquel entonces, el enfisema pulmonar. Tras la experiencia del grupo de Stanford⁽²⁵⁾, se pensó que el TCP podría ser una alternativa al TP bipulmonar. Sin embargo, este procedimiento presentaba dos inconvenientes, la elevada mortalidad de la técnica (25-30%), y el hecho de que se añadía un trasplante cardíaco innecesario, ante el incremento creciente que había en la demanda de corazones dado el aumento de centros trasplantadores.

Para obviar este problema, *Dark*⁽²⁶⁾ realizó en 1986 un trabajo experimental en primates a los que realizaban un trasplante en bloque de ambos pulmones sin el corazón, con buenos resultados tanto a corto como a largo plazo. La intervención quirúrgica se realizó sin circulación extracorpórea (CEC) y bajo parada circulatoria en hipotermia de 20° C y cardioplejia.

Posteriormente, el grupo de Toronto^{(26),(27)} incorporó el procedimiento a la clínica humana, comunicando en 1988 seis casos de trasplante en bloque. El principio básico de la intervención era conservar el corazón del receptor. El bloque donante se conectaba mediante una única sutura traqueal, sutura de la arteria pulmonar, y anastomosis del parche del atrio del donante, portador de las 4 venas pulmonares, a la cavidad auricular izquierda del receptor.

El mayor inconveniente del implante en bloque era el de la cicatrización de la vía aérea. De los primeros 16 casos presentados por *Patterson*⁽²⁸⁾, 3 desarrollaron una necrosis isquémica fatal en la tráquea y ambos bronquios. La prevalencia de esta complicación fue mayor en el TP bipulmonar que en los TCP. Una explicación del hecho podía residir en la falta de la irrigación colateral coronario-bronquial; pues ya en 1932 *Hudson*⁽²⁹⁾ confirmó la existencia de anastomosis entre los circuitos coronario y bronquial.

En Europa, *Noirclerc*⁽³⁰⁾ propugnó la anastomosis bronquial bilateral tanto para el TP bilateral como para el TCP. La finalidad de esta variante técnica fue acortar la longitud del bronquio principal en el donante para minimizar el riesgo de la isquemia. Para ello tuvo en cuenta la vía retrógrada de vascularización bronquial a expensas de las anastomosis entre las arterias pulmonares y las bronquiales descritas por *París y López-Merino*⁽³¹⁾.

Finalmente, el TP bilateral secuencial en un único acto operatorio, realizado a nivel experimental por el grupo de *Alican*⁽³²⁾ y el de *Veith*⁽¹¹⁾, en el año 1971, logró imponerse y hoy día se considera como el TP ideal.

En 1990 *Pasque*⁽³³⁾ presentó los 3 primeros pacientes operados con esta técnica y el año siguiente el mismo grupo de St. Louis comunicó otros 24 casos⁽³⁴⁾. Sus principales indicaciones fueron la fibrosis quística (FQ), las bronquiectasias y aquellos pacientes con enfisema que precisaron el TP bilateral. Las ventajas más destacables fueron: a) la anastomosis a nivel bronquial, dejando “in situ” el corazón del receptor, reducía al máximo las complicaciones isquémicas en la cicatrización de la vía aérea, b) se obviaba la necesidad de CEC de inicio, y sólo se empleaba de necesidad cuando las circunstancias hemodinámicas y de intercambio gaseoso lo requerían (25% de los casos), c) se mantenía la inervación cardíaca, y se evitaba la disección de la tráquea, región subcarinal y mediastino posterior del receptor, d) no precisaba isquemia cardíaca cuando se realizaba la sutura del parche atrial, como ocurría en el caso del trasplante en bloque. Con todo ello, se evitaba deteriorar a los pacientes con disfunción miocárdica y se prevenía la inestabilidad hemodinámica postoperatoria.

En nuestro país fue el grupo de *Astudillo* el que realizó los 3 primeros TP secuenciales bipulmonares en 1992⁽³⁵⁾, aunque la actividad del TP comenzó en España en 1990 en el Hospital Universitario La Fe de Valencia con un TCP⁽³⁶⁾.

1.2.-Indicaciones del TP. Criterios de selección del receptor

Dado que el número de posibles receptores de TP es superior a la oferta de donantes, se han elaborado una serie de guías internacionales^{(37),(38)}, con el fin de acondicionar los recursos existentes a los candidatos más óptimos. Aunque en nuestro



medio es mucho menor, el tiempo medio de espera en lista para TP a nivel internacional es de 1 a 2 años. Por ello, los posibles candidatos deben cumplir una serie de condiciones generales y específicas de su enfermedad de base, factores de peor pronóstico, que justifiquen un TP antes de 2 años.

1.2.1.-Valoración de la comorbilidad del receptor

Cuando se valora un paciente como posible candidato a TP, hay que asegurarse de que se han optimizado todos los tratamientos posibles. El TP es una rara opción en pacientes agudos críticos, si previamente no se había considerado esta opción terapéutica. En el estudio preoperatorio se incluye la valoración de la comorbilidad de estos pacientes, debiendo estar controlada cuando son incluidos en lista de espera.

Dado que los pacientes mayores tienen peor supervivencia global que los pacientes jóvenes, existen normativas internacionales con respecto a la edad que limita la indicación de TP. Para un TCP se establece el límite de edad en 55 años, para el TP unilateral en 65 años y para el TP bilateral en 60 años⁽³⁹⁾.

Tabla I: Comorbilidad en el receptor de TP

1.- Comorbilidad respiratoria
<i>Infecciones respiratorias</i>
<i>Carcinoma broncogénico</i>
<i>Cor pulmonale</i>
<i>Neumotórax</i>
<i>Embolismo pulmonar</i>
2.-Comorbilidad cardiovascular
<i>Enfermedad coronaria</i>
<i>Fallo ventricular izquierdo</i>
<i>Hipertensión arterial</i>
<i>Accidente vascular</i>
3.-Efectos secundarios de los tratamientos
<i>Corticoides</i>
<i>Inmunosupresores</i>
4.-Otras
<i>Infecciones no respiratorias</i>
<i>Alteraciones digestivas en la FQ</i>
<i>Reflujo gastrointestinal</i>
<i>Úlcera péptica</i>
<i>Enfermedad diverticular</i>
<i>Osteoporosis</i>
<i>Malnutrición/caquexia</i>
<i>Problemas psicosociales</i>



En un posible candidato a TP, además de investigar la comorbilidad asociada que puede complicar el resultado del trasplante, tenemos que valorar la posibilidad de dañar otros órganos y ponerlos en situación terminal, de forma que sea una contraindicación general para el TP.

1.2.2.-Contraindicaciones relativas para ser receptor

Son contraindicaciones relativas para incluir a un posible receptor en lista de espera, los siguientes⁽⁴⁰⁾:

1. **Osteoporosis sintomática.** El estudio preoperatorio incluye siempre una densitometría ósea. Previo al trasplante se debe tratar cualquier problema metabólico óseo, tanto en los pacientes con enfermedad sintomática como asintomática.
2. **Enfermedades musculoesqueléticas que afecten al tórax.** Como la cifoescoliosis severa. Cualquier enfermedad progresiva neuromuscular es contraindicación absoluta.
3. **Enfermedades del colágeno o diabetes.** Añaden un mayor riesgo al manejo postquirúrgico de estos pacientes, no considerándose contraindicación absoluta salvo que exista otro órgano en situación terminal además del pulmón.
4. **Corticoides.** Ocasionan problemas en el manejo postoperatorio (necrosis avascular, osteoporosis, diabetes, hipertensión, miopatías), si se han usado durante años. Se considera óptima una dosis inferior a 20 mg/día de prednisolona o prednisona.
5. **Estado nutricional.** Se debe corregir todo peso corporal que esté por debajo del 70% y/o superior al 130% del ideal, dado que es un importante predictor de la supervivencia.
6. **Hábitos adictivos.** Alcohol, tabaco, narcóticos, etc. El paciente debe permanecer al menos 6 meses libre de adicción a estas sustancias.
7. **Otras.** Problemas psicosociales, ventilación invasiva, colonización por hongos y micobacterias atípicas.

En el momento actual la comorbilidad supone un factor de riesgo para el resultado del TP, pero no una contraindicación como ocurría al principio.



1.2.3.-Contraindicaciones absolutas

Las principales contraindicaciones absolutas para el TP son⁽⁴⁰⁾:

1. **Disfunción de otro órgano importante.** En particular la alteración renal con un aclaramiento de creatinina inferior a 50 mg/ml/min, dado el impacto negativo de la medicación inmunosupresora sobre la función renal. Asimismo, un paciente con enfermedad coronaria intratable o disfunción ventricular izquierda, debe considerarse apto para un TPC y no un TP bipulmonar.
2. **Infección por HIV.**
3. **Enfermedad neoplásica.** A excepción de los epitelomas basocelulares, el paciente debe estar completamente libre de enfermedad al menos 2 años. El período libre de enfermedad deberá ser superior a 5 años para los tumores renales, el cáncer de mama en estadio II o superior, el cáncer de colon en grado superior al A de Dukes, y el melanoma grado III o superior.
4. **Hepatitis B antígeno positivo.**
5. **Hepatitis C.** Precisa biopsia hepática que pruebe el daño histológico del hígado.

1.2.4.-Estudios básicos en el potencial receptor de TP

A todos los pacientes se les deben realizar unos estudios rutinarios que nos den información sobre los factores pronósticos de la enfermedad de base y de la comorbilidad asociada. Se debe intentar que todas las exploraciones se realicen en su hospital de origen, dejando para los centros de TP sólo algunas específicas o las que supongan un alto riesgo para el paciente, evitando así la duplicidad de procedimientos. Los estudios básicos incluyen⁽⁴¹⁾:

- **Hemograma, coagulación y bioquímica general.**
- **Proteinograma y aclaramiento de creatinina (orina de 24 h).**
- **Grupo sanguíneo. Anticuerpos irregulares y citotóxicos.**
- **Antígenos de histocompatibilidad (HLA) y poblaciones linfocitarias.**
- **Serología completa, parásitos en heces y Mantoux.**
- **Cultivo y antibiograma de esputo, orina y nasofaríngeo.**
- **Radiografías (Rx) PA y lateral de tórax.**
- **Tomografía computadorizada toraco-abdominal de alta resolución.**
- **Pruebas funcionales respiratorias completas.**
- **Gammagrafía de ventilación-perfusión.**
- **Test de esfuerzo estandarizado: 6 min de marcha.**
- **Electro y ecocardiograma.**
- **Ecocardiografía de estrés o coronariografía (riesgo coronario y en mayores de 55 años).**
- **Metabolismo óseo.**



1.2.5.- Criterios específicos de inclusión en lista de espera

Además de evaluar globalmente al paciente, debemos profundizar en aquellos factores de riesgo específicos para cada una de las patologías pulmonares, con el fin de identificar el período de “ventana de trasplante”, o período en el cual se debe de plantear esta opción terapéutica⁽⁴²⁾.

1.2.5.1.-Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) no bronquiectásica, como el enfisema, la bronquitis crónica y la bronquiolitis obliterante, debe ser considerado como potencial candidato a TP si cumple los siguientes criterios:

- ✓ $FEV_1 < 25\%$.
- ✓ $PCO_2 \geq 55 \text{ mmHg}$.
- ✓ Hipertensión pulmonar con cor pulmonale crónico.

Los pacientes con una PCO_2 elevada y oxigenoterapia domiciliaria crónica de largo tiempo tienen peor pronóstico, por lo que deben de ser evaluados con carácter preferente.

Hasta ahora, estos parámetros junto con la edad, se han identificado tradicionalmente como los mejores índices pronósticos evolutivos. Sin embargo, no existen parámetros funcionales que permitan establecer claramente el momento idóneo para su inclusión en programa de trasplante, ya que estos pacientes pueden tener supervivencias prolongadas con un programa de rehabilitación y oxigenoterapia⁴⁰. Otros factores pronósticos como el estado nutricional y el grado de hipertensión pulmonar son también importantes, aunque su impacto sobre la supervivencia está menos definido. Recientemente, se ha identificado un nuevo índice denominado "**BODE**" que consiste en un sistema multivariable (**B** índice de masa corporal, **O** grado de obstrucción, **D** grado de disnea, **E** capacidad de ejercicio) con mayor poder predictivo de riesgo de muerte que el VEMS en los pacientes con EPOC⁴¹, y quizás en un futuro próximo ayude a seleccionar mejor los pacientes para trasplante.

Clásicamente, estos pacientes han sido sometidos a un TP unilateral. Sin embargo, hoy día está aumentando el número de pacientes con EPOC que se tratan con un TP bilateral.

1.2.5.2.-Fibrosis quística

Tanto en la FQ como en otros tipos de bronquiectasias, se da la particularidad de que los pacientes presentan colonización por patógenos en ocasiones multiresistentes e

incluso panresistentes. Suelen hallarse la *Pseudomona aeruginosa* y con menos frecuencia la *Burkholderia cepacia*.

La presencia de un germen panresistente no es una contraindicación absoluta para el trasplante, si bien aumenta la morbilidad y la mortalidad en el periodo postoperatorio inmediato. La mortalidad en los casos multiresistentes es similar a la del resto de los trasplantados. Todo paciente colonizado por gérmenes panresistentes debe ser remitido a un centro trasplantador con posibilidad de realizar pruebas de sensibilidades antibióticas y valorar distintas combinaciones de antibióticos que sean efectivas “in vivo”.

Los criterios que identifican a los pacientes con FQ o bronquiectasias como candidatos a TP en período de ventana, y que suponen una expectativa de supervivencia inferior al 50% a los 2 años, son los siguientes:

- ✓ $FEV_1 < 30\%$.
- ✓ $PCO_2 > 50 \text{ mmHg}$.
- ✓ $PO_2 < 55 \text{ mmHg}$.

Las mujeres jóvenes con estos parámetros tienen peor pronóstico, y por tanto deben ser remitidas para valoración con carácter urgente a un centro de referencia de TP.

Además de los criterios clásicos expuestos, son signos de alerta: a) *el deterioro progresivo de la función respiratoria incluso con un FEV_1 superior al 30% del previsto que condicione un aumento del número de hospitalizaciones*, b) *el deterioro rápido del FEV_1* , c) *la hemoptisis masiva recidivante*, y d) *la desnutrición severa a pesar del tratamiento médico correcto*. Ante estas situaciones en la FQ, el paciente debe ser remitido a una unidad de TP para un contacto inicial.

En todas las enfermedades sépticas se debe plantear un TP bipulmonar. Además en la FQ debe estar controlada la comorbilidad asociada: insuficiencia pancreática, colonizaciones por gérmenes, déficits nutricionales o diabetes, que pueden complicar el periodo postoperatorio y los resultados a corto y largo plazo.

1.2.5.3.-Fibrosis pulmonar

Los pacientes con FP idiopática suelen ser los de más edad en los grupos de TP y, con frecuencia, presentan patología extrapulmonar (alteraciones digestivas, cardíacas, efectos secundarios de la medicación inmunosupresora, corticoides) y pulmonar secundaria (carcinoma broncogénico, TBC pulmonar, zonas de bronquiectasias colonizadas por patógenos). Entre los problemas más frecuentes se incluyen los efectos



secundarios de los corticoides y la enfermedad coronaria, que sistemáticamente debemos buscar en el estudio preoperatorio. Para evaluar esta enfermedad es muy útil realizar una prueba de esfuerzo, dado que en ocasiones las pruebas respiratorias no traducen la gravedad de la misma.

La optimización del tratamiento en estos pacientes incluye la retirada de la medicación esteroidea y otros agentes inmunosupresores, dado que estamos en un estadio terminal y no han demostrado un claro beneficio.

Los pacientes con FP idiopática que cumplan los siguientes criterios deberán ser considerados como posibles candidatos en ventana de TP:

- ✓ *Enfermedad sintomática y progresiva no controlada con esteroides o inmunosupresores (desaturación en reposo y/o con el ejercicio), demostrada con controles cada 3 meses evaluando la respuesta al tratamiento.*
- ✓ *Deterioro de la función pulmonar, incluso en pacientes con escasos síntomas.*
- ✓ *Capacidad vital (CV) entre el 60 y 70% y/o capacidad de difusión pulmonar del monóxido de carbono (DLCO) entre el 50 y 60%.*

La FP asociada a una enfermedad sistemática como ocurre en la esclerodermia, la artritis reumatoide, la sarcoidosis o postquimioterapia deben considerarse individualmente. En general, se requiere que exista poca actividad sistémica de la enfermedad y que cumplan todos los criterios generales médicos. Además, deben haber fracasado todas las demás opciones terapéuticas. Cumplidos estos requisitos, se aplican los mismos criterios que para la FP idiopática. En los casos de FP es recomendable, siempre que se pueda, un TP bipulmonar frente al unilateral.

1.2.5.4.-Hipertensión pulmonar

La HTP severa, sin enfermedad cardíaca congénita, ocurre de forma primaria o bien secundaria a otra enfermedad. Las causas de HTP secundaria incluyen la enfermedad tromboembólica, la enfermedad venooclusiva, la hemangiomatosis capilar, los fármacos y las conectivopatías.

Estos pacientes tienen generalmente un mal pronóstico, presentando las peores cifras de supervivencia tras el TP. Dados los avances en la terapia vasodilatadora a largo plazo, en todos estos pacientes de forma previa se debe haber realizado una prueba de vasoreactividad y haber instaurado medicación vasodilatadora. La optimización del tratamiento médico incluye oxigenoterapia, antagonistas del calcio (Ca^{++}), anticoagulación y prostaciclina en infusión y/o en aerosol. En algunos casos, requieren



tratamiento quirúrgico (septostomía atrial o endarterectomía), dependiendo del proceso primario desencadenante.

Al igual que ocurre en la FQ, los pacientes con HTP primaria o secundaria, deben de ser evaluados en un centro con experiencia en tratamiento vasodilatador antes del trasplante. Los criterios que debe cumplir un paciente con HTP, sin enfermedad cardíaca congénita, para ser considerado en ventana de TP son los siguientes:

- ✓ *Enfermedad sintomática y progresiva, a pesar del tratamiento óptimo médico y/o quirúrgico que condiciona una disnea grado III-IV en la escala de la New York Heart Association (NYHA).*
- ✓ *Índice cardíaco menor de $21/\text{min}/\text{m}^2$, presión en la aurícula derecha superior a 15 mmHg y presión media en la arteria pulmonar superior a 55 mmHg.*

En la HTP secundaria a enfermedad cardíaca congénita (Síndrome de Eisenmenger), el papel de la medicación vasodilatadora en el período pretrasplante no está bien establecido, considerándose el TP ante todo paciente con síntomas progresivos y disnea grado III-IV de la NYHA, a pesar de tratamiento óptimo. En todos los casos de HTP se realiza un TP bipulmonar o un TCP.

1.2.6.-Trasplante pulmonar pediátrico

En la edad pediátrica las enfermedades más frecuentes subsidiarias de TP son las enfermedades vasculares cardiopulmonares: HTP primaria, HTP asociada a enfermedad estructural cardíaca, estenosis de las venas pulmonares, enfermedad parenquimatosa, anomalías congénitas pulmonares y problemas de adaptación pulmonar a la vida extrauterina. Al igual que en los adultos, es necesario optimizar el tratamiento médico, incluyendo los vasodilatadores y el oxígeno (O_2), antes de que el niño sea considerado como candidato a TP. No existen indicadores pronósticos en estos pacientes, dada la diversidad de las enfermedades que se incluyen en este apartado. No obstante, los criterios empíricos para considerarlos candidatos a TP son los siguientes:

- ✓ *Deterioro de la enfermedad a pesar del tratamiento médico y/o quirúrgico correcto.*
- ✓ *Moderado o grave compromiso funcional (NYHA III-IV).*
- ✓ *Fallo ventricular derecho, cianosis importante o bajo gasto cardíaco.*

En los casos de HTP debida a enfermedad parenquimatosa pulmonar o anomalía del desarrollo, no existen criterios específicos que indiquen si son candidatos a TP,



necesitando una valoración individual para indicar este procedimiento. Incluidas entre estos raros procesos, se hallan la hernia diafragmática congénita, la deficiencia congénita de surfactante pulmonar (proteína B), y la enfermedad pulmonar enfisematosa quística congénita.

Existen otras enfermedades que condicionan un TP en el niño como la FQ, bronquiolitis obliterante (BO), FP y la displasia broncopulmonar. Existen pocos datos sobre los factores predictivos de supervivencia, y como ocurre en las enfermedades vasculares, los pacientes deben considerarse como posibles candidatos cuando presenten disnea progresiva grado III-IV a pesar del tratamiento correcto. En el caso de la FQ, las guías aplicadas en adultos son adecuadas para la población pediátrica.

En general, se realiza un TP bipulmonar. Sólo en casos con severa deformidad torácica o cirugía torácica previa que condicionan un excesivo riesgo quirúrgico, se considera la realización de un TP unipulmonar para minimizar dicho riesgo⁽⁴³⁾.

1.3.-Selección del donante

La demanda de órganos para trasplantar supera con mucho la oferta. De hecho, la escasez de donantes pulmonares es el factor que más limita el crecimiento del TP. Son muchas las circunstancias que se hallan en este desbalance entre oferta y demanda de órganos⁽⁴⁴⁾: condicionantes médicos, culturales, legales y religiosos, influyen en la actitud de la población para la donación. Aún hay médicos que no están preparados para identificar a un potencial donante pulmonar y procurar los cuidados necesarios para preservar el pulmón en condiciones óptimas para el TP. Hay además detalles de la preservación del pulmón que entran en conflicto con la de otros órganos como el riñón, que se hallan más generalizados.

Se estima que sólo el 10-15% de los donantes multiorgánicos tienen pulmones aceptables para TP^{(45),(46)}. Esta escasez viene, en gran medida, condicionada por la dificultad para prevenir el daño pulmonar asociado a la muerte cerebral.

Los problemas en el mantenimiento del donante y preservación del órgano se han relacionado de forma directa con el fallo primario del injerto pulmonar (FPI)^(47, 48). Éste rápido deterioro de la función pulmonar tras el implante y la revascularización del órgano, se asocia a una elevada morbilidad y mortalidad^(49, 50).

En un intento por compensar la escasez de donantes pulmonares, se han adoptado diferentes medidas. Desde la posibilidad de obtener pulmones procedentes de donantes a corazón parado^(51, 52), de donantes vivos emparentados genéticamente que donan algún lóbulo pulmonar, sobre todo en edad pediátrica^(53, 54), hasta la investigación del xenotrasplante que plantea una interesante perspectiva de futuro⁽⁵⁵⁾.



Por lo tanto, la obtención de órganos para TP puede realizarse de varios tipos de donantes:

1. Donante cadáver. Son todos los donantes fallecidos y, en función de que el diagnóstico y certificación de la muerte se base en el cese de las funciones encefálicas o cardiorrespiratorias, pueden distinguirse en:

- Donante en muerte cerebral.
- Donante en asistolia.

2. Donante vivo. Se considera donante vivo a aquella persona que efectúe la donación en vida de aquellos órganos, o parte de los mismos, cuya extracción sea compatible con la vida y cuya función pueda ser compensada por el organismo del donante de forma adecuada y suficientemente segura.

En general, cuando hablamos de donación pulmonar nos referimos a órganos extraídos de un paciente vivo en situación de muerte cerebral.

1.3.1.-Donantes en muerte cerebral

La donación de órganos de cadáver es una situación relativamente nueva que viene unida a la definición de muerte cerebral, concepto descrito por primera vez en 1959⁽⁵⁶⁾ y reconocido a nivel internacional⁽³⁷⁾. Se define la muerte cerebral como el *cese irreversible de la actividad de ambos hemisferios cerebrales y del troncoencéfalo*. Los sistemas vitales cardiovascular y respiratorio se mantienen, en este caso, por medio de apoyo artificial.

La legislación española contempla y regula esta situación en la Ley 30/1979, de 27 de Octubre, que en su artículo 10 dice: *“Los órganos para cuyo trasplante se precisa la viabilidad de los mismos, sólo pueden extraerse del cuerpo de la persona fallecida previa comprobación de la muerte cerebral, basada en la constatación y concurrencia, durante 30 min al menos, y la persistencia 6 h después del comienzo del coma, de los siguientes signos: a) ausencia de respuesta cerebral con pérdida de conciencia, b) ausencia de respiración espontánea, c) ausencia de reflejos cefálicos, con hipotonía muscular y midriasis y d) electroencefalograma plano demostrativo de inactividad bioeléctrica cerebral. Los citados signos no serán suficientes ante situaciones de hipotermia inducida artificialmente o de administración de sustancias depresoras del sistema nervioso central”*.

El 5 de Enero del 2000 entró en vigor el Real Decreto 2.070/1999 de 30 de diciembre por el que se regulan las actividades de obtención y utilización clínica de órganos humanos y que modifica algunos aspectos de la Ley anteriormente citada.



Como aportaciones fundamentales, el nuevo Real Decreto contempla y define la figura del donante vivo y la del donante a corazón parado y amplía el uso de las pruebas para el diagnóstico de muerte cerebral como la arteriografía de cuatro vasos.

Tras excluir situaciones que pudieran dificultar el diagnóstico clínico, un paciente que presente una exploración clínica de muerte cerebral y una prueba instrumental de soporte diagnóstico concluyente, puede ser diagnosticado de muerte encefálica sin que sea preciso esperar el período de observación.

La arteriografía de los cuatro vasos es concluyente en el caso de nula perfusión; sin embargo, precisa el traslado del donante al servicio de radiología, lo que puede resultar complejo dado la inestabilidad hemodinámica que presentan algunos donantes.

1.3.2.-Valoración del donante en muerte cerebral

Desde 1989, la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) centraliza, coordina y distribuye toda la donación y trasplante de órganos a nivel nacional, generando un eficiente modelo que incluso ha sido exportado a otros países⁽⁵⁷⁾.

Ante la situación de muerte cerebral y contando con la aceptación familiar y las autorizaciones legales para la donación, la ONT informa de los datos clínicos y antropométricos del donante al Centro de Coordinación de Trasplantes del hospital. Los donantes pulmonares suelen ser donantes multiorgánicos.

La evolución de todo paciente trasplantado está directamente relacionada con la funcionalidad del órgano que recibe. Por ello la primera premisa que debemos considerar es si el pulmón donante es funcionalmente válido.

<i>Tabla II: Requisitos del donante</i>	<i>Tabla III: Contraindicaciones para la donación</i>
✓ <i>Edad < 50 años</i>	✗ <i>Edad > 60 años</i>
✓ <i>Compatibilidad ABO y de tamaño</i>	✗ <i>Secreciones purulentas</i>
✓ <i>Rx de tórax normal</i>	✗ <i>Rx de tórax con condensaciones</i>
✓ <i>PO₂ > 300 mmHg (FiO₂=100% y PEEP= 5 cm H₂O)</i>	✗ <i>PO₂ < 300 mmHg</i>
✓ <i>No fumador ó < 15 paquetes/año</i>	✗ <i>Fumador de > 20 paquetes/año</i>
✓ <i>No trauma torácico</i>	✗ <i>Enfermedad infecciosa o ADVP</i>
✓ <i>No aspiración o sepsis</i>	✗ <i>Trauma torácico severo</i>
✓ <i>No antecedentes pulmonares</i>	✗ <i>EPOC o cirugía torácica previa</i>
	✗ <i>Enfermedad neoplásica</i>



Para considerar óptimo a un donante pulmonar, éste debe cumplir unos criterios básicos^(58, 59), aceptados de forma generalizada con pequeñas modificaciones, y no presentar ninguna contraindicación para la donación.

Son pocas las contraindicaciones absolutas, con cierta elasticidad de criterio para algunas de ellas como el antecedente de tabaquismo o el límite de edad. Así, podemos aceptar como donante a un paciente de más de 55 años siempre que comprobemos el buen estado funcional pulmonar. De esta manera surge el concepto de *donante subóptimo*, empleado con buenos resultados⁽⁴⁶⁾, por lo que cada caso de donación debe ser estudiado de forma individual. Se ha identificado que la mayor edad del donante constituye un factor de riesgo significativo en el TP⁽⁴⁷⁾. En cualquier caso, debemos tener presentes las limitaciones que existen y tratar de ofrecer al paciente que se trasplanta el mejor pulmón posible.

Para aceptar inicialmente como válido al donante pulmonar, nos basamos en la información que recibimos sobre sus antecedentes clínicos y quirúrgicos, hábitos tóxicos, causa de muerte cerebral, tiempo de ventilación mecánica invasiva, analítica, gasometría, Rx de tórax, temperatura, serología y cultivo de aspirado bronquial. La Rx de tórax es fundamental para detectar traumatismos, focos neumónicos, contusiones y colecciones intratorácicas. Es conveniente realizar una fibrobroncoscopia ante la presencia de secreciones purulentas espesas, un deterioro gasométrico o sospecha de broncoaspiración.

Tras realizar la extracción pulmonar, durante la preparación en banco del órgano, se debe realizar una inspección directa de los bronquios tras la división traqueal con toma de muestras para tinción de Gram y cultivo de bacterias y hongos. La información de los cultivos de las secreciones orientará la profilaxis antibiótica postrasplante.

La presencia de un traumatismo torácico con fracturas costales o hemo neumotórax asociado no excluye al paciente como donante salvo si existe una importante contusión pulmonar subyacente. Si la lesión es unilateral, puede emplearse el otro pulmón tras confirmar su funcionalidad y buen estado, siendo preciso a veces pinzar la arteria pulmonar para repetir la gasometría. El dato que mejor determina la correcta funcionalidad del pulmón donante es la gasometría arterial. Debe realizarse tras 5 min de ventilación con una FiO₂ del 100% y una presión positiva espiratoria en la vía aérea (PEEP) de 5 cm de agua, con parámetros ventilatorios que permitan conseguir la normocarbia. Cuando la PO₂ en estas condiciones es superior a 300 mmHg de forma reiterada al menos en dos ocasiones, una de ellas inmediatamente antes de la cirugía de extracción, asumimos que la funcionalidad del pulmón es adecuada para el TP, salvo que existan alteraciones macroscópicas objetivadas en el campo quirúrgico. El hecho de que la PO₂ sea inferior a 300 mmHg sugiere la presencia de una alteración significativa



del cociente ventilación/perfusión, por lo general en relación con contusiones, aspiraciones, neumonitis y/o atelectasias indetectables en la Rx de tórax.

Es fundamental valorar la gasometría evolutiva del potencial donante, pues un deterioro progresivo puede indicar de forma precoz un problema parenquimatoso. Con frecuencia se observa que el deterioro gasométrico se produce como consecuencia de la sobrecarga de líquidos empleada para el mantenimiento hemodinámico del donante. La PO_2 mejora al forzar la diuresis, incrementar el volumen respiratorio y ventilar con PEEP sin que esto contraindique la donación.

Sin embargo, el deterioro progresivo de la función pulmonar en el donante es también consecuencia directa de la muerte cerebral⁽⁵⁹⁾. Durante la fase inicial de la misma se produce una descarga catecolamínica masiva, que provoca en el pulmón la pérdida de la integridad de la membrana alvéolo-capilar, permitiendo el paso hacia el alvéolo de albúmina y otras macromoléculas. Aparece así el llamado edema pulmonar neurogénico (EPN), caracterizado por la riqueza en proteínas que presenta el líquido trasudado hacia el espacio alveolar, cuyas características son similares a las del plasma.

Aunque no existe un tratamiento específico del EPN, el tratamiento del mismo incluye el mantenimiento de PEEP de 5 cm de H_2O , y la expansión del volumen intravascular de forma adecuada, vigilando la presión venosa central (PVC). El donante pulmonar debe mantenerse “seco”, con una PVC por debajo de 10 cm de H_2O . Esto suele entrar en conflicto con el mantenimiento de otros órganos como el riñón en los que se prefiere lo contrario para maximizar el flujo de sangre renal y la diuresis.

Hay que reseñar que uno de los factores determinantes del desarrollo del EPN, y quizás el más importante, es el tiempo transcurrido entre el diagnóstico de muerte cerebral y la extracción de los órganos. Cuanto mayor sea el tiempo entre ambos, más probabilidades de aparición de este cuadro clínico.

1.3.3.-Donantes en asistolia

Los cadáveres donantes de órganos a corazón parado fueron la única fuente de órganos para trasplantes hasta la aceptación universal por la comunidad científica de que la muerte encefálica supone la muerte del individuo. Ésta no fue reconocida legalmente en España hasta la promulgación en 1979 de la Ley de Trasplantes. Hasta entonces, había que esperar en aquellos cadáveres en muerte encefálica a que tuviera lugar la asistolia. Por tanto, en España y en el resto de la comunidad internacional, los primeros trasplantes procedentes de donantes cadáveres procedían de donantes en asistolia. Posteriormente, el gran desarrollo de los trasplantes de donantes en muerte cerebral, dio lugar a la práctica desaparición de los programas de extracción de donantes en asistolia, en parte porque la logística y la operatividad era mucho más sencilla y por



otro lado porque la viabilidad de los órganos obtenidos de donantes en muerte cerebral era muy superior a la de los donantes en asistolia.

El déficit progresivo de órganos para trasplante respecto a una mayor demanda, ha renovado el interés en los cadáveres donantes en asistolia⁽⁶⁰⁾. Varios equipos españoles a mediados de la década de los ochenta reinician la extracción de órganos para trasplante procedentes de este tipo de donantes⁽⁶¹⁾.

Fruto de los progresos en este campo tiene lugar en marzo de 1995 en Maastricht, *The first international workshop in non-heart-beating donors*⁽⁶²⁾, donde se expuso la experiencia de los distintos grupos, se consensuaron los aspectos técnicos, éticos y legales que debían presidir este programa de extracción y se acordó constituir un banco internacional, con la información de los resultados del trasplante utilizando estos donantes. Además se estableció una clasificación de donantes en asistolia con diferentes categorías (Tabla IV).

Tabla IV. Clasificación de los donantes en asistolia

<i>I</i>	<i>Ingreso cadáver</i>
<i>II</i>	<i>Resucitación infructuosa</i>
<i>III</i>	<i>A la espera de paro cardiaco, hace referencia a los casos en que se decide desconectar la ventilación artificial</i>
<i>IV</i>	<i>Paro cardiaco en un donante en muerte cerebral</i>

En noviembre de ese mismo año en España, organizado por la ONT se celebró en Madrid la *Reunión Nacional de Consenso sobre donantes de órganos a corazón parado*, y posteriormente se produce la modificación de la Ley de Trasplantes, mediante el Real Decreto 2070⁽⁶³⁾ del 30 de diciembre de 1999, por el que se regula las actividades de obtención y utilización clínica de órganos humanos, validando la obtención de órganos de donantes en asistolia, siempre que se puedan aplicar procedimientos de preservación de los mismos, en la persona fallecida. Un aspecto fundamental de este Real Decreto es que permite la inmediata autorización judicial para la obtención de los órganos, con lo que se agiliza la logística necesaria para dar eficacia a este procedimiento de extracción.

Respecto a los donantes pulmonares en asistolia, constituye uno de los campos en los que más se ha investigado en la última década, a partir de la hipótesis de que el tejido pulmonar pueda ser viable tras la muerte del organismo y que estos pulmones puedan ser válidos para trasplante, incluso si se extraen tras un periodo considerable de



tiempo tras la muerte^(58, 64). Esta hipótesis se sustenta en el concepto de que el pulmón es el único órgano sólido trasplantable, que no necesita de la perfusión vascular para permitir la respiración celular, ya que se produce directamente a través de la membrana alveolar en un proceso, completamente pasivo. Además se ha demostrado la viabilidad del pulmón tras la muerte del organismo, mediante la observación de que células epiteliales pulmonares pueden ser cultivadas a partir de muestras obtenidas en cadáveres.⁽⁶⁴⁾

Con el propósito de demostrar esta hipótesis, se han desarrollado innumerables estudios experimentales que, con el tiempo han identificado importantes avances en este aspecto, como son: el conocimiento de un adecuado intercambio gaseoso tras 2 horas de isquemia caliente y sin circulación pulmonar⁽⁶⁴⁾, que este periodo seguro de isquemia caliente podía aumentarse hasta 4 horas si se heparinizaba al receptor⁽⁶⁵⁾, o que el método de elección para obtener una excelente preservación pulmonar, es el enfriamiento tóxico de pulmones no ventilados, alcanzando periodos de preservación de 12 a 24 horas⁽⁶⁶⁾.

A partir de estos avances, se realizan los dos primeros trasplantes pulmonares clínicos procedentes de donantes en asistolia. El pionero fue *Love y cols.*⁽⁶⁷⁾, y más recientemente *Steen y cols.*⁽⁶⁸⁾, publicaron en 2001 un TP utilizando un donante intrahospitalario en asistolia, preservando los pulmones mediante frío tóxico durante 65 minutos tras la parada cardíaca, siendo extraídos 3 horas después de la muerte. Desgraciadamente, ambos receptores fallecieron meses más tarde, aunque la función pulmonar que demostraron era satisfactoria.

En España, fruto de la necesidad de obtener más donantes, se inician programas de donantes en asistolia. En Madrid el Hospital Clínico San Carlos (HCSC), comienza en 1989 un programa de extracción renal y hepática a partir de “donantes controlados”, o sea los tipos III y IV de la clasificación de Maastrich, y a partir de 1995 incluyen los donantes “no controlados” que corresponden a los tipos I y II, obteniéndose buenos resultados, sobre todo con los trasplantes renales⁽⁶⁹⁾.

Conscientes de la posibilidad de rentabilizar la logística y experiencia en preservación de donantes en asistolia del grupo del HCSC, en junio de 2002 los componentes del equipo de TP del Hospital Universitario Puerta de Hierro (HUCPH) se plantearon iniciar un programa conjunto de extracción pulmonar, comenzando con una fase preclínica de evaluación funcional de los pulmones, de este tipo de donantes. Como consecuencia de ello se comprobó la viabilidad macroscópica, funcional e histológica de los injertos pulmonares evaluados. Durante este periodo se sistematizó la metodología de la preservación y evaluación funcional, así como la coordinación de los distintos equipos participantes, y se sometió el programa a la aprobación del Comité de Ética de su hospital. En la actualidad, han realizado 34 trasplantes pulmonares de este tipo, y



con esta experiencia, se abre una puerta importante que aumenta el número de potenciales donantes pulmonares, sobre todo teniendo en cuenta el origen extrahospitalario de los donantes utilizados⁽⁶⁹⁾.

1.3.4.-Donantes vivos

Nos referimos a los trasplantes de lóbulos pulmonares procedentes de familiares o personas relacionadas con los pacientes. Surge de la necesidad de trasplantar pacientes, generalmente niños o adolescentes, que estando en lista de espera sufren un empeoramiento de su situación clínica y en los que no es previsible un trasplante de donantes cadáver en breve plazo⁽⁷⁰⁾. Constituye un porcentaje mínimo de los trasplantes pulmonares anuales, realizándose en pocos centros, debido a una serie de peculiaridades que entraña este programa, que son:

- *Se trata de un trasplante lobar bilateral, por lo que precisan de dos donantes vivos, de los que se utiliza un lóbulo pulmonar en cada uno, generalmente los lóbulos inferiores. Como el procedimiento involucra a tres personas, la posible morbilidad y mortalidad se triplica.*
- *Son necesarios tres equipos quirúrgicos simultáneos, si bien cuenta con la ventaja de que se trata de una cirugía programada.*
- *Plantea problemas éticos, sobre la decisión de los familiares a la hora de aceptar o no este tipo de trasplante.*

Uno de los grupos pioneros y con más experiencia en este campo es el de Los Ángeles, que ya en 1994 comunica sus indicaciones, la técnica quirúrgica así como sus resultados en pacientes con fibrosis quística⁽⁷¹⁾. Uno de los aspectos pendientes de aclarar, en este tipo de trasplante, es la incidencia de rechazo agudo (RA) y sobre todo de rechazo crónico (RC) respecto a los trasplantes pulmonares de donantes cadáver.

1.3.5.-Selección del receptor compatible

Una vez determinada la validez del pulmón donante, debemos determinar quién es el receptor más adecuado para el mismo. Para ello consideraremos una serie de criterios definidos de compatibilidad donante-receptor⁽⁷²⁾. Como medida primordial, el donante ha de ser compatible en grupo sanguíneo ABO, prescindiendo del factor Rh.

En lo referente a la adecuación del tamaño, generalmente podemos determinarla de forma aproximada a partir de los datos antropométricos de los que disponemos. Un pulmón demasiado pequeño podría plantear dificultades para ocupar una gran cavidad torácica. De la misma forma, un pulmón demasiado grande podría incluso impedir el cierre de la toracotomía o provocar un taponamiento cardíaco por compresión. En ocasiones, se practican reducciones de volumen del pulmón donante para ajustar el



tamaño al receptor con buenos resultados postoperatorios⁽⁷¹⁾, aunque esta medida debe reservarse para situaciones de urgencia o dificultad de conseguir un donante adecuado por motivos de tamaño.

Como medidas estandarizadas para equiparar el tamaño de donante y receptor pueden emplearse los diámetros transversales y longitudinales del tórax o bien el perímetro torácico submamario. También se han correlacionado la edad, sexo y estatura con el cálculo de la CV teórica. Según algunos autores, éste sería el parámetro que mejor correlacionaría la adecuación del pulmón donante al receptor⁷¹.

$$CV \text{ hombres} = (0,0600 \times \text{altura en cm}) - (0,0214 \times \text{edad en años}) - 4,650$$

$$CV \text{ mujeres} = (0,0491 \times \text{altura en cm}) - (0,0216 \times \text{edad en años}) - 3,590$$

Se suelen emplear pulmones de mayor tamaño que los del receptor en los trasplantes unipulmonares, en los que se recomienda que el pulmón donante tenga una CV teórica 1,2 a 1,5 veces mayor que el receptor. Se puede considerar como norma para el resto, que las dimensiones pulmonares adecuadas para trasplante serían las del tamaño pulmonar que el receptor tendría si no padeciera la enfermedad.

La compatibilidad en la serología de citomegalovirus, que en un tiempo se consideró fundamental dada la alta incidencia, morbilidad y mortalidad tras el trasplante, hoy ha pasado a un segundo plano gracias al empleo de una profilaxis eficaz con ganciclovir⁷².

1.3.6.-El mantenimiento del donante en muerte cerebral

Como ya sabemos, el donante de órganos presenta una serie de alteraciones derivadas de la situación de muerte cerebral que deben ser corregidas para un correcto mantenimiento de los diferentes órganos hasta el momento de su extracción. El cese de la respiración espontánea, la pérdida del control circulatorio con aparición de alteraciones hemodinámicas, la disregulación térmica y otras alteraciones endocrino metabólicas requieren una monitorización y cuidados que repercutirán en el éxito o el fracaso del trasplante⁽⁵⁹⁾.

Desde hace tiempo se sabe que el pulmón es el órgano que más rápidamente se degrada tras la muerte cerebral⁽⁵⁸⁾. Por ello es necesario conocer las peculiaridades que presenta su mantenimiento, que incluye los cuidados en la Unidad de Medicina Intensiva (UMI), en el acto de la extracción, y en la preservación y preparación hasta el momento de ser implantado.



El donante multiorgánico debe considerarse un paciente en estado crítico, por lo que debe ser monitorizado de forma amplia y continua. Los principios para el cuidado de todo donante multiorgánico han de incluir:

1. *Mantenimiento de la estabilidad hemodinámica, asegurando la perfusión de los órganos vitales y una correcta oxigenación tisular.*
2. *Corrección de los desbalances hidroelectrolíticos y sanguíneos.*
3. *Mantenimiento de la normotermia.*
4. *Prevención de las infecciones.*

El donante pulmonar ideal será aquel que está correcta pero no excesivamente hidratado, con temperatura normal, presión arterial media mayor de 70 mmHg, diuresis superior a 1 cc/kg/h, gasometría correcta con FiO_2 del 40%, hematocrito superior al 30% y un ionograma normal. Manteniendo esta situación hasta el momento de la extracción, conseguiremos que la mayoría de donantes potenciales puedan convertirse en trasplantes efectivos⁽⁵⁹⁾.

1.4.-Obtención y preservación del pulmón

1.4.1.-La extracción pulmonar

El acto anestésico-quirúrgico⁽⁷³⁾ debe ser considerado como una prolongación del mantenimiento del donante en la UMI, por lo que es preciso mantener la monitorización de la frecuencia cardíaca, tensión arterial, PVC, saturación de O_2 , FiO_2 y diuresis⁷⁵. Se recomienda la ventilación con respirador volumétrico con $FiO_2 < 40\%$ y un volumen de 12-15 ml/kg a 14-16 ciclos/min para mantener una $PaO_2 > 90$ mmHg. Si fuera preciso mejorar la ventilación del donante es preferible utilizar PEEP (3-5 cm de H_2O) que aumentar la FiO_2 . Igualmente, es necesario mantener al donante normotenso, incluso administrando catecolaminas y controlar la administración de fluidos, manteniendo una $PVC < 10$ cm de H_2O , para evitar el edema pulmonar, como hemos comentado antes.

Una vez trasladado el donante a la mesa quirúrgica y antes de iniciar la extracción, realizamos una última gasometría para valorar la función pulmonar, después de ventilar al paciente con PEEP de 5 cm de H_2O y FiO_2 de 100% durante 5 min. Si la PO_2 es > 300 mmHg, consideramos en principio que los pulmones son válidos, salvo anomalías en la visión directa. Si el donante no lleva tratamiento antibiótico se suele administrar una dosis profiláctica previa a la cirugía (cefalosporina de tercera generación) y un bolo de 500 mg de metilprednisolona i.v. Los corticoides se usan por sus propiedades antiinflamatorias, sobre todo sobre las citokinas. Recientemente se ha podido demostrar en donantes



pulmonares a los que se les administró metilprednisolona (15 mg/kg), una mejor oxigenación antes de pinzar la aorta⁽⁷³⁾.

El abordaje se realiza por esternotomía media, seccionando o extirpando el timo. Salvo en el TCP, en el que es preciso seccionar la tráquea a nivel del tronco venoso innominado, rara vez se precisa la disección y referencia de dicho tronco. Se abren ambas cavidades pleurales, comprobando el estado de los pulmones para descartar contusiones, edema, atelectasias, nódulos o enfermedad pleural, que pudieran limitar la funcionalidad de los pulmones. Tras esta comprobación visual, aceptamos o rechazamos de forma definitiva el órgano.

A continuación se abre el pericardio en T invertida, fijándolo con puntos al borde de la esternotomía. Se disecciona y se referencia la aorta en el tronco, así como la vena cava superior que debe separarse de la arteria pulmonar derecha en el seno de Thiele, para evitar lesionarla durante la extracción. También hay que eludir la lesión de la vena ácigos, que no es preciso ligar. Al final se disecciona la vena cava inferior.

Con sutura vascular de 3/0, se da un punto en bolsa de tabaco en la raíz aórtica para colocar el sistema de cardioplejia (este paso no es preciso si el corazón no es válido). Acto seguido, con sutura vascular de 4/0, se realiza otra bolsa de tabaco en el tronco de la arteria pulmonar para colocar el sistema de perfusión, en la mitad del espacio comprendido entre la válvula pulmonar y la bifurcación de la arteria.

Tras la administración de heparina i.v., 3 UI/kg de peso, se procede a colocar la aguja de cardioplejia y la cánula de perfusión pulmonar que se conecta al sistema de perfusión. Se administra una ampolla de 500 microgramos de PGE₁ diluida en un goteo de 50 cc de dextrosa al 5% i.v. o bien directamente en bolo en la arteria pulmonar. Para facilitar su difusión, es importante comprobar que no existan zonas de atelectasia y, en caso de que existan, es preciso airearlas, siendo suficiente la ventilación con una PEEP mínima (2-3 cm H₂O).

La PGE₁, no sólo se usa como un potente vasodilatador que favorece una perfusión más homogénea, sino también como protector de las células del endotelio. En este sentido, previene la adhesión de los neutrófilos, inhibe la agregación plaquetaria, estabiliza la membrana de los lisosomas, e incrementa la producción de adenosinmonofosfato (AMP), todos agentes citoprotectores del endotelio. Sin embargo, el papel de la PGE₁ en la preservación pulmonar continúa siendo controvertido. En un reciente estudio experimental se ha demostrado que el efecto vasodilatador se consigue con soluciones extracelulares bajas en potasio, tales como la solución de dextrano baja en potasio (DBP), con la solución de Eurocollins (EC) o la de la Universidad de Wisconsin (UW). Es necesario aumentar las dosis que se suelen utilizar habitualmente o asociar a la PGE₁ un bloqueador de los canales del Ca⁺⁺⁽⁷³⁾.



Una vez administrada la PGE₁ y con todos los equipos quirúrgicos preparados y los sistemas purgados, iniciamos la extracción al pinzar la aorta, momento en que se inicia el tiempo de isquemia. Se liga la vena cava superior, se secciona la vena cava inferior para favorecer el desagüe del circuito mayor y la aurícula izquierda a nivel de la orejuela o la desembocadura de las venas pulmonares para el drenaje del circuito menor. Al realizar estas secciones hay que dejar suficiente tejido para las anastomosis de los injertos hepático (cava inferior) y pulmonar (aurícula).

Una vez habilitado el drenaje de ambos circuitos, se procede a administrar las soluciones de cardioplejia, si el corazón es válido, y de perfusión pulmonar a 4° C, a una dosis de 60 cc/kg. Las bolsas que contienen la solución se colocan a unos 2 metros del suelo, lo que garantiza una presión de perfusión de 15 a 20 mmHg. Durante todo el tiempo que dura la perfusión pulmonar se mantiene una ventilación pulmonar suave. Se deben evitar las atelectasias pero también las hiperinsuflaciones, mientras se enfrían localmente los pulmones llenando las cavidades pleurales con suero fisiológico a 4° C.

Tras finalizar la perfusión anterógrada, se completa la sección de la vena cava inferior, con cuidado de no lesionar la vena pulmonar inferior derecha. Si es necesaria la cardiectomía, que es lo más frecuente, se abre la aurícula izquierda dejando en el lecho un parche posterior que engloba las cuatro venas pulmonares. Es preciso dejar un borde auricular de unos 3-4 mm a nivel de la entrada de las venas pulmonares para poder realizar la anastomosis vascular.

Se continúa con la sección de la vena cava superior y, si se considera oportuno, se liga y secciona el tronco venoso innominado. A continuación se secciona la aorta y el tronco de la arteria pulmonar, a nivel de la bifurcación de las arterias pulmonares derecha e izquierda, con lo que se extrae finalmente el corazón.

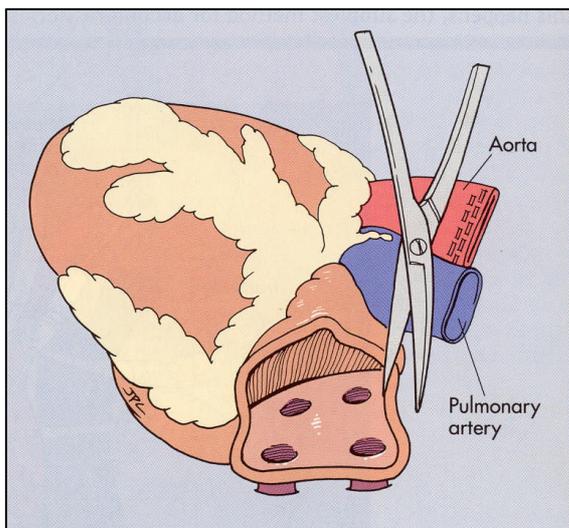


Fig. 1: Sección de la aurícula izquierda

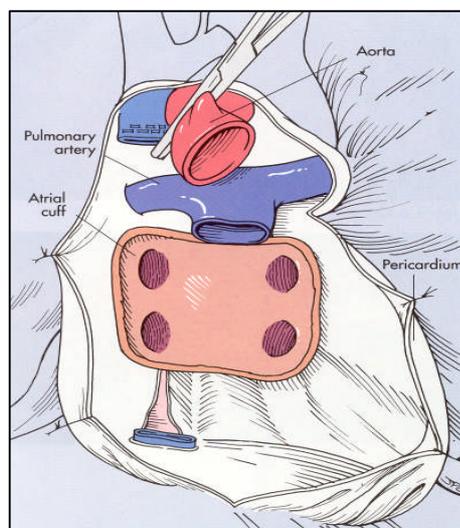


Fig. 2: Cardiectomía

Se inicia entonces la extracción pulmonar, y se realiza una segunda perfusión, esta vez por vía retrógrada a través de las venas pulmonares hasta que por la arteria salga líquido claro, ya que como demostró Varela⁽⁷⁴⁾, la preservación anterógrada es incompleta al obviarse la circulación bronquial. Se completa la sección del pericardio en sus caras laterales y posteriores, y se seccionan ambos ligamentos pulmonares, con lo que se van separando los pulmones en sentido craneal. Se libera cuidadosamente el pericardio posterior y ambas pleuras mediastínicas, respetando el esófago, hasta la carina. Se procede entonces a dar la vuelta al pulmón derecho con lo que se

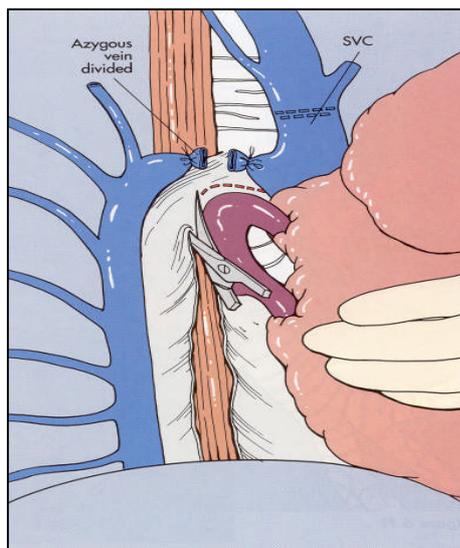


Fig. 3: Disección pulmonar derecha

expone la pleura mediastínica posterior derecha que se secciona, incluyendo la vena ácigos. Con esto se libera el esófago de la tráquea en su vertiente derecha. Se procede de igual forma en el lado izquierdo hasta el cayado aórtico, que es necesario liberar en su cara inferior para seccionar el ductus, teniendo cuidado de no lesionar la arteria pulmonar izquierda. Se completa así la separación de la tráquea y del esófago en su vertiente izquierda y se extrae el bloque bipulmonar mediante sutura mecánica y sección de la tráquea por encima de la carina. Se solicita antes al anestesiista que movilice y retire parcialmente el tubo endotraqueal, que aspire las secreciones y que vuelva a ventilar, extrayendo los pulmones en semi-insuflación.

Una vez extraídos, los pulmones se almacenan en una bolsa estéril de plástico, con solución de preservación a 4° C. La bolsa se introduce en otras dos bolsas estériles de plástico para mayor seguridad y finalmente en una nevera con hielo para mantenerlos en hipotermia. Con posterioridad, y manteniendo la hipotermia, se realiza la cirugía de banco para separar y preparar ambos pulmones, para lo cual se divide la cara posterior de la aurícula izquierda, el pericardio

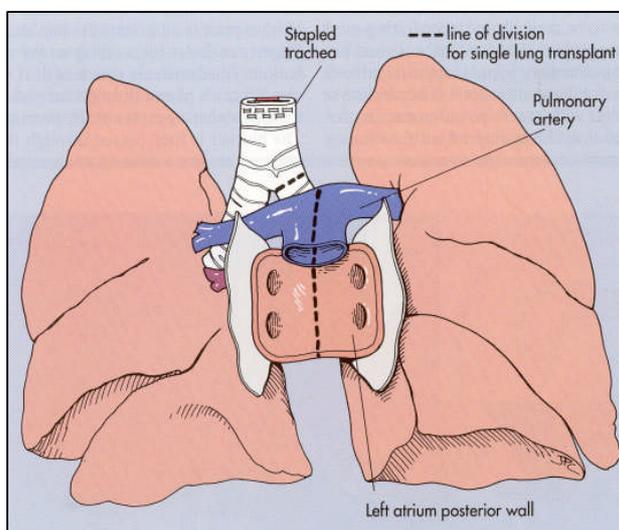


Fig. 4: Separación del bloque bipulmonar

posterior, la arteria pulmonar en su división y ambos bronquios principales a nivel de la carina traqueal. Una vez separados los pulmones, se realiza un lavado y un aspirado bronquial para análisis bacteriológico.

1.4.2.-Preservación pulmonar

Según la International Society for Heart and Lung Transplantation, el fallo primario del injerto (FPI) es el responsable de un tercio de la mortalidad postoperatoria (primeros 30 días) y del 15% de los fallecimientos ocurridos durante los tres primeros meses en los pacientes a los que se les ha realizado un TP⁽⁶⁷⁾. El término FPI se ha relacionado con una mala preservación pulmonar, como antes se ha comentado. Nada más lejos de la realidad. La preservación pulmonar es un eslabón más en un proceso bastante complejo, como es el TP, y el FPI puede acontecer durante el mantenimiento del donante, en el periodo de isquemia, en la implantación pulmonar o en el periodo perioperatorio⁽⁶⁸⁾.

Durante algún tiempo se ha mantenido la idea de que la mayor parte de las lesiones tisulares que acontecen en cualquier territorio de nuestra economía tras un periodo de isquemia eran debidas a la reperfusión. La activación celular, sobre todo de los neutrófilos, y su posterior acumulación en el tejido reperfundido, jugarían un papel importante en la producción de radicales libres de oxígeno (RLO) y de enzimas proteolíticos lo que, en definitiva, determinaría las alteraciones del endotelio capilar y la producción de edema.

Sin embargo, se podido demostrar que todo se inicia con la isquemia⁽⁶⁹⁾. Se ha podido comprobar, de forma experimental, que no es imprescindible la presencia de neutrófilos para inducir las lesiones de isquemia-reperfusión (LIR). Los cultivos aislados de células del endotelio de la arteria pulmonar pueden generar RLO que, a su vez, atacarían de forma directa al endotelio⁽⁷⁰⁾. En condiciones de hipotermia, se han podido comprobar también importantes lesiones en el endotelio vascular a partir de las 3 h de preservación⁸¹.

La preservación pulmonar es muy delicada debido a la fragilidad del tejido pulmonar ante la isquemia. La LIR, como otras formas de lesión aguda pulmonar, es producida por múltiples factores. Entre ellos figuran la estimulación de los leucocitos y las plaquetas, la formación de RLO, la activación del complemento y de otros mediadores inflamatorios y la presencia de metabolitos del ácido araquidónico. Ello determina una disfunción del endotelio pulmonar y de las células alveolares tipo II, como veremos más adelante. El conocimiento de estos mecanismos de respuesta del pulmón ante la isquemia-reperfusión ha sido la base para la puesta en marcha de múltiples estrategias con el fin de mantener el pulmón en las mejores condiciones y el mayor tiempo posible para ser implantado.

Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de trabajos de experimentación dedicados, tanto al mejor conocimiento de la preservación pulmonar como a la importancia del endotelio pulmonar o de las células alveolares tipo II⁽⁷²⁾, el impacto que han tenido en la práctica clínica ha sido escaso. No existe en la actualidad un protocolo específico para la preservación de este órgano. Es más, se sigue cuestionando si las distintas estrategias



desarrolladas en el campo experimental han demostrado ser superiores a la simple preservación pulmonar en hipotermia⁽⁷⁵⁾.

Lo evidente es que la primera experiencia clínica, publicada por el *grupo de Toronto* en abril de 1988, con excelentes resultados en 11 trasplantes unipulmonares por FP, puso de manifiesto que la simple inmersión en EC a 4° C, sin perfusión del lecho vascular pulmonar, era un buen método de preservación por cuanto que en cinco ocasiones el tiempo de isquemia fue superior a las 5 h⁽⁷⁶⁾.

El *grupo de St. Louis* ha podido comprobar que los cambios en la permeabilidad pulmonar ocurren durante la preservación pulmonar, y que está condicionada por el *tiempo de isquemia, la temperatura de preservación, la fracción de O₂ inspirado⁽⁷⁷⁾ y la solución de preservación empleada*. Esta alteración en la permeabilidad capilar está condicionada por la presencia de RLO⁽⁷⁷⁾, comprobando que la administración al donante de óxido nítrico (NO) inhalado mejora la función del pulmón preservado una vez que es implantado, atenuando las lesiones que acontecen durante la preservación⁽⁷⁷⁾.

1.4.2.1.-Tiempo de isquemia

En la actualidad, se desconoce en la práctica clínica cual es el tiempo de isquemia del injerto pulmonar y, aunque se acepta que está entre las 6-8 h, no es de extrañar que soporte tiempos de isquemia superiores. Aunque para algunos autores la isquemia superior a las 5 h determina una peor supervivencia de los pacientes trasplantados⁽⁷⁸⁾, para otros, los tiempos de isquemia de hasta 6 h no influyen de forma significativa en la supervivencia. Se comprobó que existía una buena preservación durante 4 h, concluyendo que un mayor tiempo de isquemia, hasta 6 h, determinaba una aceptable pero peor respuesta al implante (PO₂ significativamente menor). *Ueno⁽⁷⁹⁾* refirió una peor función en el período postoperatorio inmediato con tiempos de isquemia superiores a las 8 h. Este hecho no condicionó una mayor estancia en la unidad de reanimación o en el hospital, si bien esta conclusión ha sido cuestionada por el diseño y análisis estadístico utilizado.

Novick⁽⁸⁰⁾ correlacionó la supervivencia en el TP con la edad del donante y el tiempo de isquemia, y comprobó que éste último no influyó en la mortalidad precoz después del trasplante, mientras que sí que estuvo condicionada cuando el donante tenía menos de 10 ó más de 51 años. Mediante un análisis multivariante comprobó que ambas variables condicionaron la supervivencia a un año, sobre todo si el donante era mayor de 51 años y el tiempo de isquemia era mayor de 6 h.

El problema se complica aún más. *Glanville⁽⁸¹⁾* comprobó, al comparar 20 TP unipulmonares de donante único (pulmones compartidos), en los que el tiempo de isquemia fue significativamente menor en el primer pulmón implantado (164 ± 53 min) que en el segundo (377 ± 53 min), que éste no condicionó el tiempo de intubación, el



intercambio gaseoso precoz, la estancia hospitalaria y la supervivencia a un año. Sin embargo, encontró un mayor número de episodios de rechazo agudo (RA) en los primeros 3 meses en el grupo con menor tiempo de isquemia, así como un mayor número de eventos infecciosos.

A vista de los resultados, es difícil tener una visión clara del papel que juega el tiempo de isquemia en el éxito o el fracaso del TP. Sin embargo, en todos los grupos trasplantadores continúa existiendo la lucha contra el tiempo.

1.4.2.2.-Temperatura

Se sabe que la isquemia pulmonar es mejor tolerada en condiciones de hipotermia que de normotermia. Sin embargo, también se desconoce la temperatura óptima de preservación.

Los 4 °C continúan siendo la temperatura más utilizada para la perfusión y almacenamiento del pulmón. Sin embargo otros grupos, en base a los resultados obtenidos en determinados trabajos experimentales tanto *in vitro*⁽⁸²⁾ como *in vivo*⁽⁸³⁾, prefieren los 10 °C como temperatura de preservación. *Haniuda*⁽⁸⁴⁾, pudo comprobar que el coeficiente de filtración capilar, es decir la medida de la permeabilidad capilar a los fluidos, sufría un serio deterioro si el pulmón se mantenía en normotermia, mientras que no se modificaba si se mantenía a 1 °C ó a 10 °C.

1.4.2.3.-Insuflación pulmonar

Al igual que la temperatura, el pulmón tolera mejor la isquemia ventilado que en atelectasia⁹⁵. Mantener los pulmones sin zonas atelectásicas durante la perfusión facilita el lavado pulmonar. Un aumento excesivo de la presión alveolar puede dificultar la perfusión por aumento de la presión capilar. El problema radica en conocer cuál es el volumen óptimo de insuflación.

Algunos trabajos experimentales *in vivo* demostraron que el almacenamiento de los pulmones hiperinsuflados (PEEP de 30 cm de H₂O) mejoraban significativamente los parámetros de función pulmonar una vez implantado⁽⁸⁵⁾, por lo que algunos grupos mantienen los pulmones con una PEEP de 25 ó 35 cm de H₂O⁽⁸⁵⁾. Sin embargo, otros estudios demostraron lo contrario, es decir, un aumento del edema de reperfusión⁽⁸⁴⁾.

Estudios *ex vivo* han puesto de manifiesto un aumento del coeficiente de filtración del capilar pulmonar en los pulmones hiperinsuflados, por lo que recomiendan evitar el barotrauma⁽⁸⁴⁾. En este sentido, *Meyers*⁽⁸⁶⁾ extrae los pulmones con el grado de insuflación que determina la capacidad funcional residual. Recientemente, *De Campos*⁽⁸⁷⁾ ha estimado



de forma experimental que el volumen de insuflación óptimo es el 50% de la capacidad pulmonar total.

1.4.2.4.-FiO₂

Date⁽⁸⁸⁾ comprobó en un estudio experimental que las células pulmonares requieren de la presencia de O₂ para mantener su metabolismo, lo cual es imprescindible para la preservación y su posterior disponibilidad y que el consumo de O₂ es mayor a 10 °C que a 1 °C.

Por otro lado, el grupo de *St. Louis* ha comprobado que se produce un aumento de la permeabilidad capilar cuando los pulmones son insuflados con una FiO₂ alta, al favorecer la producción de RLO⁽⁸⁴⁾. Es por ello aconsejable utilizar durante la extracción y el posterior almacenamiento pulmonar, una FiO₂ inferior al 40%.

1.4.2.5.-Soluciones de preservación

No existe un protocolo específico de preservación pulmonar. Salvo un grupo, el de *Harefield*, que continúa utilizando como método de preservación el enfriamiento mediante circulación extracorpórea (CEC), el resto de grupos utilizan el lavado del lecho vascular pulmonar con distintas soluciones de preservación a través de la arteria pulmonar (vía anterógrada) y/o de las venas pulmonares (retrograda).

Desde que en 1984, el grupo de *Stanford* introdujo en la práctica clínica la perfusión y el mantenimiento pulmonar utilizando solución de EC modificada, numerosos grupos la han empleado⁽⁵⁸⁾.

Por otro lado, la introducción de la solución de UW en la práctica clínica ha sido uno de los eventos más importantes en la esfera del trasplante de los órganos abdominales, hasta el punto de que es la única solución de preservación utilizada. Este hecho propició la realización de una serie de trabajos experimentales en los que ha quedado patente que la solución de UW consigue una buena preservación pulmonar, sobre todo si se compara con la solución de EC.

La presencia en su composición de determinados agentes no metabolizables, sobre todo la rafinosa, determina un aumento de la presión oncótica extracelular, lo que previene el edema celular. Otros componentes como el glutatión, que reduce la producción de citokinas, el alopurinol como “limpiador” de RLO y la adenosina como precursor del adenosintrifosfato (ATP), vasodilatador del lecho vascular pulmonar, disminuirían la lesión sobre el endotelio vascular. Por otro lado, la ausencia de glucosa aminoraría el metabolismo celular. La mayor viscosidad de esta solución favorecería una distribución más homogénea durante la perfusión pulmonar.



En la práctica clínica son escasos los trabajos dedicados a comparar dichas soluciones de perfusión y parece desprenderse de su análisis que la solución de la UW es superior a la de EC⁽⁸⁹⁾. Sin embargo, son series no randomizadas.

Otras soluciones, como la de DBP o la de Celsior⁽⁹⁰⁾ se han desarrollado más a nivel experimental. En ese sentido, el grupo de *Keshavjee* demostró que la solución de DBP (Perfadex[®]) mejoraba de forma significativa la funcionalidad pulmonar en comparación con la de EC disminuyendo la LIR. El grupo de *Date* observó que el añadir un 1% de glucosa a esta solución servía de sustrato para el metabolismo aeróbico en los pulmones semi-insuflados permitiendo prolongar el tiempo de isquemia⁽⁸¹⁾.

En un reciente estudio clínico, el grupo de Munich ha comunicado que la solución de DBP ofrece unos resultados significativamente mejores, tanto en la mortalidad postoperatoria como en la supervivencia, que los obtenidos con la solución de EC. Los datos obtenidos han sido el resultado de una observación secuencial durante un período de 4 meses, lo que ha condicionado al grupo, desde una perspectiva ética, a no poner en marcha un ensayo prospectivo y randomizado, ante los buenos resultados obtenidos con la solución de DBP⁽⁷⁹⁾.

1.4.2.6.-Alternativas en la mejora de la preservación pulmonar

Se han estudiado numerosas sustancias desde el punto de vista experimental para mejorar tanto la preservación pulmonar como la respuesta al injerto, sin embargo su extrapolación a la práctica clínica ha sido muy escasa^(91, 92). Hasta ahora, como ya hemos comentado, solo los corticoides y la PGE₁ se utilizan en la preservación pulmonar a nivel clínico, aunque recientemente se están incorporando las sustancias generadoras de NO.

El NO juega un papel fundamental en la homeostasis tisular. Su producción endógena puede verse alterada por distintos estímulos, como la isquemia-reperfusión. Por este motivo, la administración de NO puede jugar un papel importante en el TP⁽⁹³⁾, comprobándose unos mejores resultados en los pacientes trasplantados con importante disfuncionalidad del injerto, cuando se les administra NO inhalado. Con el fin de obtener una mejor preservación pulmonar, *Meyers*⁽⁹⁴⁾ ha añadido recientemente a la solución de preservación EC modificada, nitroprusiato sódico (a dosis de 10 mg/l), no sólo por su efecto vasodilatador, sino también como generador de NO.

Por otro lado, a nivel experimental se han intentado desarrollar determinadas estrategias quirúrgicas en relación a la preparación de la isquemia del pulmón donante o del control en la perfusión del pulmón implantado, también con escasa extrapolación en la clínica humana. A nivel clínico, destaca el reciente trabajo de *Lick*⁽⁹⁵⁾, con buenos resultados en 5 pacientes en los que se ha modificado la perfusión pulmonar.



1.5.-Implante en el receptor

El implante pulmonar ⁽⁹⁵⁾se inicia con la preparación de la ingle ipsilateral al trasplante, con disección de la arteria y vena femorales en los casos de implante unilateral en los que se prevea la necesidad de CEC.

La incisión torácica depende del tipo de TP. En el unilateral se realiza una toracotomía posterolateral amplia a través del 5º espacio intercostal con o sin resección de la 6ª costilla. En el bipulmonar se opta por una toracotomía anterolateral bilateral por el 4 ó el 5º espacio intercostal, con o sin sección transversal del esternón (incisión de Clam-Shell).

Tras la apertura del tórax se procede a la liberación pulmonar mediante la sección de las adherencias y del ligamento pulmonar. El primer pulmón que se trasplanta es aquel cuya función pulmonar es más deficiente, es decir el que tiene peor perfusión. A continuación se procede a la disección del hilio pulmonar y a pinzar la arteria pulmonar para evaluar la tolerancia y el adecuado control hemodinámico y gasométrico durante el implante del pulmón.

En ocasiones la indicación de CEC está clara, como en los casos de HTP. Sin embargo, en el resto de los casos, la decisión es difícil y plantea serias dudas en función de los riesgos y beneficios que supone su uso, como son las complicaciones hemorrágicas postoperatorias o el FPI.

Una vez liberado el pulmón, se realiza una neumonectomía extrapericárdica, lo más distal posible, incluyendo en el pedículo arterial remanente la primera rama segmentaria en el lado izquierdo. La disección de la arteria pulmonar llevará implícita la sección del ligamento arterioso. Con sección mecánica se cortan las estructuras vasculares y con sutura mecánica el bronquio a nivel de la carina de división de los bronquios lobares, evitando la disección de los tejidos peribronquiales.

Al final, se realiza una amplia apertura del pericardio alrededor de las venas pulmonares y se procede a la colocación del pulmón a implantar en la cavidad pleural posterior, cubriéndolo con bolsas plásticas y hielo pilé.

El implante se inicia con la anastomosis bronquial termino-terminal. Se secciona, previa comprobación del bloqueo unipulmonar con el tubo de doble luz, el muñón bronquial, dejando aproximadamente 1-1.5 cm de bronquio principal. Se inicia la anastomosis con dos suturas de PDS[®] 4-0 en las uniones membrano-cartilaginosa, efectuando una sutura continua de la parte membranosa y con puntos sueltos de la cartilaginosa.



A continuación se lleva a cabo la anastomosis de la arteria pulmonar. Tras pinzar la arteria lo más proximal posible, con la pinza en situación craneocaudal para no entorpecer la anastomosis auricular, se enfrentan las ramas segmentarias con el fin de evitar torsiones. Se abre el muñón arterial y se procede a realizar una sutura continua de la cara posterior y anterior con Prolene® de 5-0, dejando sin anudar la sutura en la cara anterior.

La anastomosis auricular se completa con la colocación de la pinza lo más proximal posible en situación caudo-craneal. Se abren los muñones de las venas pulmonares y se realiza una anastomosis termino-terminal con Prolene® de 4-0, dejando sin anudar la sutura en la cara anterior.

Al paciente se le administran 500 mg de metilprednisolona i.v. antes de la reperusión de cada pulmón para evitar el RA del injerto.

Se reanuda la ventilación y se retira de forma lenta y progresiva, la pinza de la arteria pulmonar, comprobando que existe flujo hacia la aurícula izquierda y que se vacía el circuito de aire. Dicha maniobra se repite con la vena pulmonar, anudando finalmente la cara anterior de ambas estructuras vasculares.

1.6.-Complicaciones del TP

A pesar de los avances conseguidos en el campo del TP tanto a nivel técnico como en el control de la inmunosupresión, aún existen numerosos problemas que debemos tener presentes, complicaciones que no somos capaces de resolver o bien nuevas situaciones que requieren un nuevo planteamiento. Todo esto promueve una continua investigación sobre la manera de prevenir y resolver las posibles complicaciones del TP. De hecho, la mayoría de los trasplantados requieren atención médica o reingreso hospitalario por alguna complicación en algún momento a lo largo de su evolución.

Algunas de estas complicaciones aparecen en el periodo postoperatorio precoz, mientras que otras aparecen de forma más tardía. Algunas son consecuencia directa del procedimiento quirúrgico, mientras que otras derivan del órgano trasplantado, bien por la adaptación del organismo a la nueva situación o bien como consecuencia de los tratamientos que se aplican para mantener su funcionalidad.

1.6.1.-Lesión de isquemia-reperusión

Más que una complicación en sí, la LIR es un hecho casi constante tras un TP y en el periodo postoperatorio inmediato. Se caracteriza por un daño alveolar inespecífico, edema pulmonar e hipoxemia dentro de las primeras 72 h del TP a consecuencia del propio trasplante, bien secundario a la isquemia y reperusión o bien a la preservación. Se cree que también incide en su aparición la interrupción del drenaje linfático a nivel pulmonar y



hay evidencias del importante papel que juegan los RLO en la patogénesis del edema⁽⁸¹⁾, como hemos comentado con anterioridad.

Desde un punto de vista etiopatogénico, cuando un tejido es sometido a isquemia, la ausencia de O₂ genera una serie de acontecimientos que si no se detienen abocan hacia la muerte celular. La anoxia hace que disminuyan los niveles de ATP, deteniéndose el metabolismo energético. La prolongación de la isquemia implica que ese ATP no se pueda regenerar y por lo tanto la célula entra en una corriente de degeneración irreversible. El metabolismo se vuelve anaerobio para intentar mantener los máximos niveles de ATP pero la célula acaba muriendo por alteración de la membrana celular y del intercambio iónico.

En condiciones normales, y en las mitocondrias, tiene lugar el proceso de fosforilación oxidativa, mediante el cual la cadena de transporte de electrones desde el nicotinamida adenina reducido (NADH) al O₂, catalizado por la citocromo oxidasa mitocondrial, se convierte en la principal fuente de energía.



En condiciones de hipoxia, la fosforilación oxidativa no puede llevarse a cabo, y por lo tanto se produce un acumulo de NADH con un descenso de los niveles de ATP. Como compensación, se activa el metabolismo anaerobio con consumo de piruvato y producción de lactato, nicotinaminoducleótido (NAD) y ATP. Sin embargo, esta vía de generación de energía es menos productiva que la aeróbica e insuficiente para cubrir las necesidades celulares, ya que se generan 2 moléculas de ATP frente a las 36 de la aeróbica, con acumulo de adenosindifosfato (ADP) y AMP.

A su vez, la producción de lactato inhibe la glicolisis y desciende el pH, lo que puede generar la rotura de los lisosomas e iniciar la digestión celular. Cuando la bomba de sodio-potasio (Na⁺-K⁺) deja de actuar, se acumula Na⁺ intracelular y potasio K⁺ extracelular alterándose la polaridad de la membrana celular y la tonicidad del medio intracelular con la consiguiente entrada de agua en la célula y la producción del edema celular.

Por otro lado, el *estrés oxidativo*⁽⁹⁶⁾ al que se someten las células en situaciones extremas, se caracteriza por la producción de especies reactivas de O₂, RLO, como el anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y los radicales hidroxilo (OH⁻). Estas moléculas, en particular los OH⁻ son muy inestables y reaccionan con la primera estructura que se encuentran, los lípidos de la membrana celular. El daño celular producido por la peroxidación lipídica puede variar desde un incremento de la permeabilidad celular hasta la lisis celular. Se ha descrito la generación de especies intracelulares de O₂ en la mayoría de las células del parénquima pulmonar, células endoteliales y macrófagos del pulmón trasplantado.



Existen dos mecanismos de producción de estas moléculas⁽⁹¹⁾, uno deriva de la acumulación de *hipoxantina* y la conversión de la enzima xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa durante la anoxia con degradación de la hipoxantina en O_2^- después de la reoxigenación. El segundo depende del *sistema NADPH oxidasa* que está presente sobre todo en la membrana de los neutrófilos y macrófagos, y que cataliza la reducción de O_2 en H_2O_2 y O_2^- .

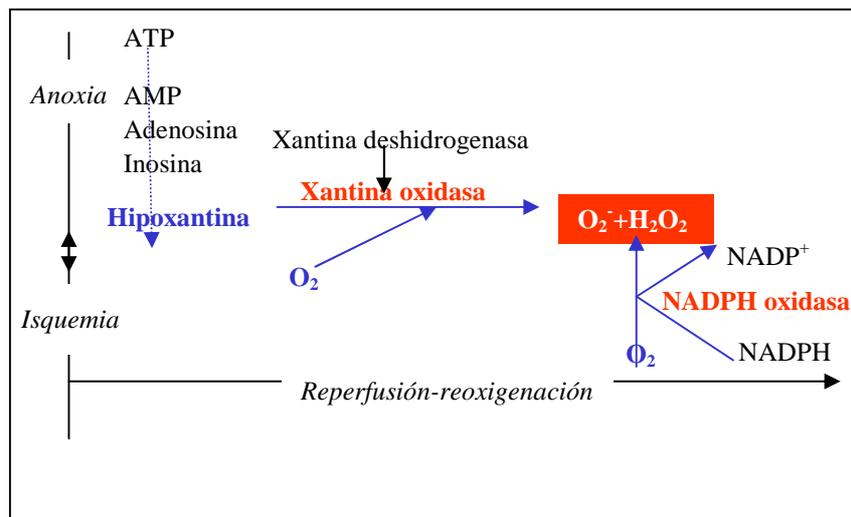


Fig. 5: Producción de RLO

El fenómeno isquemia-reperfusión se suele corresponder con anoxia-reoxigenación⁽⁹¹⁾ en los órganos trasplantados. Sin embargo, en el pulmón es diferente porque los alveolos contienen O_2 durante la preservación, que ayuda a mantener el metabolismo aeróbico y prevenir la hipoxia. Además, en el pulmón se debe distinguir el estrés oxidativo producido por la hipoxia del producido por la isquemia.

La *hipoxia* es la responsable de la disminución de ATP y del correspondiente incremento de la hipoxantina como consecuencia de la degradación de ATP, ADP y AMP, con generación de O_2^- cuando el O_2 es reintroducido con la reperfusión y/o la ventilación. Este fenómeno puede bloquearse con productos inhibidores de la xantina oxidasa como el alopurinol. En cambio, la *isquemia* caracterizada por la ausencia de flujo sanguíneo dentro del pulmón puede producir peroxidación lipídica y daño oxidativo a pesar de la presencia de O_2 . El mecanismo no está asociado con la depleción de ATP y puede ocurrir durante el período de almacenamiento por acción de la NADPH oxidasa.

El endotelio parece ser una de las dianas de la oxidación durante la isquemia. Las células endoteliales son muy sensibles a las fuerzas físicas resultantes de la variación del flujo sanguíneo y son capaces de transformar estas fuerzas en señales eléctricas y bioquímicas. La ausencia del componente mecánico del flujo sanguíneo durante la isquemia estimula la despolarización de la membrana de las células endoteliales con



activación de la NADPH oxidasa, factor nuclear-KB y la óxido nítrico sintetasa dependiente de Ca^{++} .

Por otro lado, la *isquemia* a la que se somete el pulmón activa los macrófagos del donante, que producen citocinas proinflamatorias. La interleukina-8 (IL-8), interleukina-12 (IL-12), factor de necrosis tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) e interferón gamma ($\text{INF-}\gamma$), responsables durante la *reperusión* de activar a los linfocitos T y los neutrófilos residentes en el pulmón, producen a su vez más citocinas ($\text{INF-}\gamma$, IL-8), perpetuando el daño pulmonar.

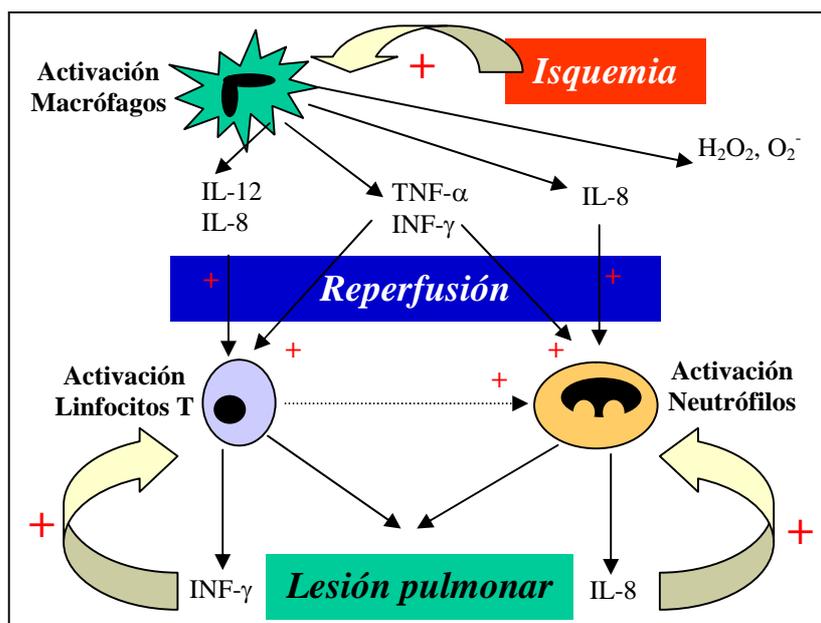


Fig. 6: Mecanismo de producción de la lesión pulmonar por la isquemia-reperusión

Además, la *isquemia* hace que se expresen moléculas de adhesión en los neutrófilos y en las células endoteliales. Esto favorece la migración quimiotáctica de los neutrófilos, aumenta la producción de los factores procoagulantes responsables de las microtrombosis vasculares que impiden el retorno de sangre tras la reperusión y activa la NADPH oxidasa de los macrófagos y neutrófilos.

El mecanismo patogénico de la LIR se complica si tenemos en cuenta que la *hipotermia*, esencial para el mantenimiento del pulmón, se asocia con algunos de los procesos deletéreos vistos. Entre ellos se hallan el *estrés oxidativo*, la *inactivación de la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$* , el *incremento de Ca^{++} intracelular*, la *liberación de hierro (Fe)* y la *inducción de la muerte celular programada (apoptosis)* que induce también la expresión de moléculas de adhesión en la membrana celular y la liberación de mediadores proinflamatorios y procoagulantes.

El incremento de Ca^{++} intracelular por liberación a partir de sus depósitos intracelulares o por el trasiego patológico a través de la membrana celular, junto a las



alteraciones del pH puede alterar numerosos procesos que inducen la muerte celular. La elevada concentración de Ca^{++} citosólica favorece la conversión de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa potenciando el efecto deletéreo de los RLO.

El Fe, elemento esencial para la vida celular puede ser muy tóxico en condiciones de estrés por su participación en la generación de RLO. En su forma libre, oscila entre su forma oxidada (Fe^{3+}) y su forma reducida (Fe^{2+}) y cataliza la transformación de H_2O_2 y O_2^- en OH^- a través de lo que se conoce como reacción de Fenton.



Fig. 7: Reacción de Fenton

A diferencia de la muerte celular por necrosis que se ha observado a nivel experimental en los pulmones trasplantados de ratas entre las 6 y 12 h de isquemia en frío, la apoptosis no se presenta durante la isquemia, sino que aparece rápidamente tras la reperfusión y no se relaciona con la función pulmonar.

La inducción de la apoptosis está modulada por dos vías. La *vía intrínseca* que implica a las mitocondrias y que es activada por los RLO y la *vía extrínseca* que es activada a través de señales procedentes de los receptores de membrana de muerte celular cuando se unen a ellos sus respectivos ligandos, como son el TNF y Fas. La primera vía se activa en la fase precoz de la reperfusión, mientras que la segunda tarda varias horas en hacerlo.

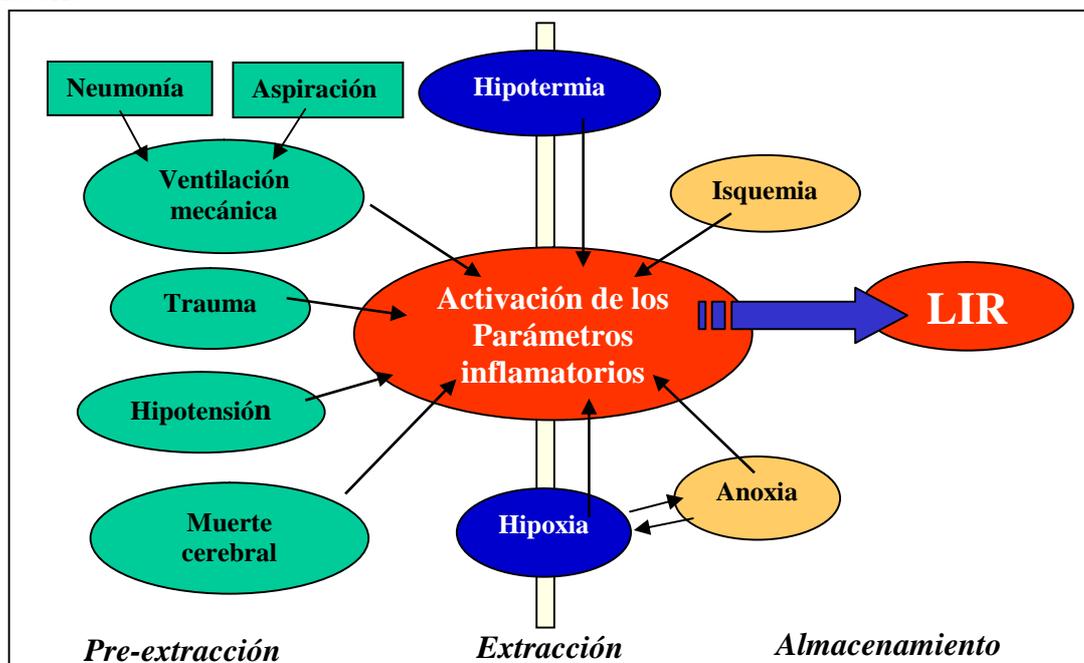


Fig. 8: Factores que influyen en la generación de la LIR



A todo esto hay que sumarle además, el efecto orgánico deletéreo que se produce en el potencial donante antes y durante la extracción pulmonar derivado de la muerte cerebral, la ventilación mecánica y sus complicaciones o el propio traumatismo que provocó la muerte del paciente. Estos fenómenos influyen de forma decisiva en la aparición y el grado de presentación de la LIR en el receptor⁽⁹⁷⁾.

Por otro lado, el empleo de la CEC durante la cirugía también contribuye a la aparición de la LIR⁽⁹⁷⁾, probablemente por activación de los neutrófilos y liberación de RLO. A veces, no obstante, es difícil determinar si la CEC es la causa o la consecuencia, al tener que emplearla por el edema tras el implante del primer pulmón.

La LIR se manifiesta, desde el punto de vista radiológico como un infiltrado alveolointersticial difuso con traducción clínica de un deficiente intercambio gaseoso. El espectro clínico abarca desde una leve hipoxemia con escasos infiltrados radiológicos hasta un cuadro similar a un distrés respiratorio del adulto.

Las medidas terapéuticas van sobre todo encaminadas a la prevención, con un adecuado protocolo de extracción pulmonar, reduciendo la isquemia, cuidando la manipulación y limitando el aporte de líquidos en el implante. Una vez establecido, las medidas van enfocadas a favorecer el balance hídrico negativo, empleando diuréticos y catecolaminas, aunque controlando siempre la función renal. Con medidas adecuadas de soporte, el edema de reperfusión suele autolimitarse, y mejora o se resuelve de forma espontánea en 36 a 72 h⁽⁹⁸⁾.

Se han utilizado diferentes términos⁽⁸¹⁾ para describir a este síndrome: edema de reimplantación, respuesta de reimplantación, daño de reperfusión, edema de reperfusión, FPI y disfunción prematura del injerto.

El término FPI corresponde a la forma más severa de la lesión de isquemia-reperfusión que describe un fallo de la función y deterioro progresivo del órgano recién implantado. La relevancia de la disfunción precoz del pulmón trasplantado no está bien definida y, como hemos visto antes, se le atribuye la responsabilidad de un tercio de la mortalidad postoperatoria (en los primeros días) y hasta del 15% de los fallecimientos ocurridos durante los 3 primeros meses en los pacientes trasplantados⁽⁹⁸⁾.

Además de esta significativa morbi-mortalidad en el periodo postoperatorio precoz, la LIR severa se asocia con un incremento del riesgo de RA que puede ocasionar una disfunción del injerto a largo plazo.

El FPI suele aparecer en las primeras 24 h y en la mayoría de los casos es reversible. Se ha descrito con mayor frecuencia en los TP unipulmonares y se manifiesta, desde el punto de vista clínico, como un infiltrado pulmonar difuso en la Rx de tórax, que



traduce la presencia de un edema pulmonar no cardiogénico uni o bilateral. Esta situación obliga a mantener al paciente intubado y ventilado con un alto aporte de O₂, y a emplear NO. El cociente PaO₂/FiO₂ se mantiene siempre por debajo de 150⁽⁹⁹⁾. Otras terapias más novedosas y aún con escasa experiencia clínica son la aplicación de surfactante pulmonar, la administración de PGE₁, la inhibición del complemento o la administración de antagonistas de los factores activadores de las plaquetas⁽¹⁰⁰⁾.

A pesar de la disminución de su incidencia con las mejoras en la preservación, el FPI es probable que haya sido sobreestimado, atribuyéndosele una responsabilidad exagerada en el fracaso del trasplante por otros motivos acontecidos durante la cirugía o en el periodo postoperatorio. El estudio de pulmones compartidos, es decir, el TP unipulmonar a dos receptores diferentes a partir de un único donante, orienta a que el papel de la preservación en el FPI es probablemente menor de lo que hasta ahora se le atribuye⁽⁹⁸⁾.

1.6.2.-Rechazo pulmonar

Existen tres categorías de rechazo pulmonar⁽⁸⁵⁾ con distintas alteraciones histológicas y clínicas: el rechazo hiperagudo (RHA), el RA y el crónico (RC).

1.6.2.1.-Rechazo hiperagudo

El RHA tiene lugar minutos después de la reperfusión y se debe a la presencia de anticuerpos presentes en el receptor. Es una complicación superada en la práctica con la compatibilidad ABO entre el donante y el receptor y la determinación del porcentaje de anticuerpos citotóxicos en el receptor⁽⁸⁵⁾.

1.6.2.2.-Rechazo agudo

El RA es otra de las complicaciones frecuentes en el periodo postoperatorio precoz, sobre todo, en los 3 primeros meses y en especial en las 2 primeras semanas, aunque puede ocurrir en cualquier momento de la vida del receptor. Así el 75 % de los receptores desarrolla un RA durante los primeros 30 días y un 60% de todos los casos de RA ocurren durante el primer año.

Es la expresión de una respuesta inflamatoria mediada por células al reconocer los linfocitos del receptor al pulmón trasplantado como extraño. La disparidad de los antígenos de histocompatibilidad (HLA) entre el donante y el receptor, sobre todo en los locus HLA-DR y HLA-B, son el mayor factor de riesgo para un RA. Al reconocer como extraño el pulmón se produce la activación de los linfocitos T que liberan citoquinas, sobre todo interleukina-2 (IL-2), responsables de la proliferación celular mononuclear y de la expresión de los HLA de clase II (HLA-DP, DQ, DR) en el epitelio bronquial y en el



endotelio. Estos antígenos, no presentes de forma habitual, aumentan la superficie antigénica de las células del receptor perpetuando la reacción inmunológica¹¹⁹.

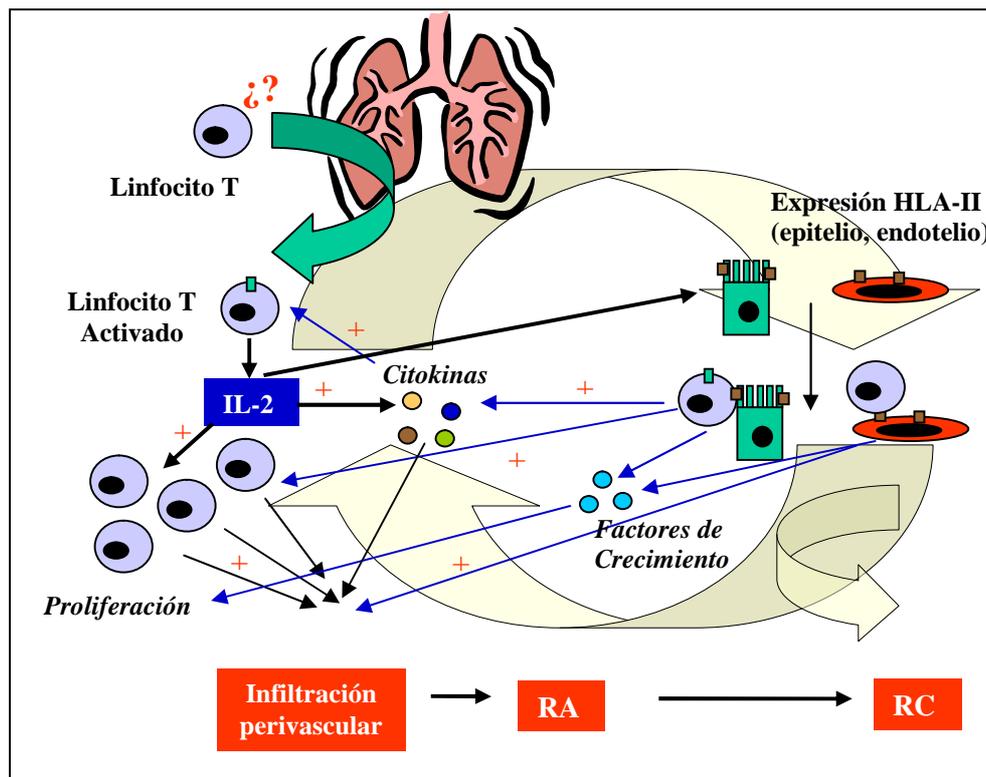


Fig. 9: Mecanismo de producción del rechazo pulmonar

La clínica del RA es bastante inespecífica, desde pacientes asintomáticos hasta los que presentan disnea, tos y fiebre, objetivándose hipoxemia e infiltrados difusos en la Rx de tórax, así como una caída de los volúmenes en la espirometría que mejoran hasta su situación basal semanas después del tratamiento⁽¹⁰¹⁾. Hay que tener en cuenta que la Rx de tórax puede ser normal después del primer mes, por lo que la normalidad radiológica no descarta un episodio de RA^(85, 101).

El diagnóstico diferencial se debe realizar en especial con las infecciones y la LIR, pero a veces es bastante complejo. La biopsia transbronquial (BTB) es necesaria para confirmar el diagnóstico, mostrando un infiltrado de mononucleares a nivel perivascular. Su rentabilidad, no obstante es baja, siendo necesaria la realización de, al menos, 5 biopsias de uno o más lóbulos pulmonares para conseguir una sensibilidad y especificidad de hasta el 94% y 90% respectivamente. Esto resulta difícil, dada la situación de compromiso respiratorio del paciente y conlleva un alto riesgo de complicaciones, sobre todo sangrado o neumotórax. En los pacientes asintomáticos, la BTB demuestra evidencias histológicas de RA mínimo o ligero en más del 30% de los pacientes⁽¹⁰¹⁾.

El diagnóstico puede hacerse por criterios clínicos o histológicos, aunque se debe intentar obtener una muestra histológica siempre que el paciente lo permita. Los criterios

clínicos se aceptan como diagnóstico en el periodo postoperatorio inmediato, cuando su incidencia es alta y en ocasiones la situación del paciente contraindica la BTB.

La actitud más extendida consiste en observar la respuesta al tratamiento con un choque de esteroides, 500 mg/12h de metilprednisolona, una vez descartada la existencia de infección. Si en las 12 h siguientes se objetiva una clara mejoría, se confirma la sospecha de rechazo. Si existen dudas se puede repetir el bolo de esteroides al 2º y 3º días consecutivos. La falta de respuesta al tratamiento corticoideo nos debe hacer sospechar y valorar otras posibilidades como infecciones poco frecuentes o problemas en las anastomosis venosas.

En 1995 el *Lung Rejection Study Group* estandarizó una nomenclatura para el diagnóstico de RA basándose en el grado de infiltración linfocitaria. Este hallazgo no es específico y puede observarse en la neumonía por Citomegalovirus, *Pneumocystis Carinii*, enfermedad linfoproliferativa postrasplante, problemas de preservación, zona de biopsias previas o posible recurrencia de la enfermedad primitiva como la sarcoidosis. Por este motivo, se aconseja realizar también un lavado broncoalveolar con cultivo y estudio de la celularidad para descartar otros procesos patológicos⁽¹⁰²⁾.

Tabla V: Grados de RA (LRSG 1995)	
<i>Grado de infiltración linfocitaria perivascular (A)</i>	
Grado A0	<i>No rechazo</i>
Grado A1	<i>Mínimo</i>
Grado A2	<i>Ligero</i>
Grado A3	<i>Moderado</i>
Grado A4	<i>Severo</i>

El tratamiento del RA se basa en la inmunosupresión. Todos los pacientes trasplantados reciben ciclosporina A, azatioprina y corticoides. Las dosis empleadas son variables, necesitando mantener unas dosis de ciclosporina de 250 a 350 ng/ml en el primer año postrasplante. La dosis de azatioprina es de 2 mg/Kg/día y la de la prednisona es de 0,5 mg/Kg/día durante los 3 primeros meses descendiendo de forma gradual hasta una dosis de mantenimiento de 0,15 mg/kg/día.

En general, se acepta que deben tratarse todos los RA a partir del grado A2. La piedra angular del tratamiento del brote de RA consiste en bolos de metilprednisolona i.v. (1g/día durante 3 días consecutivos) seguidos de un aumento de la dosis normal de prednisona de 0,5 a 1 mg/Kg/día y un descenso posterior. Aunque la mayoría de los pacientes mejoran con la primera dosis de esteroides, la presencia de un rechazo



persistente o recurrente, obliga a modificar el tratamiento inmunosupresor y vigilar las posibles complicaciones.

Tabla VI: Inmunosupresores actuales
1.-Inmusupresores básicos (inhibidores de la síntesis de IL-2)
Ciclosporina A
Tacrolimus
2.-Agentes anti-mitóticos de soporte
Azatioprina
Micofenolato mofetil
3.-Corticoides
4.-Agentes inductores (anticuerpos monoclonales)
Globulina antilinfocítica/OKT3/globulina anti-timocítica
Daclizumab/basiliximab

Se han evidenciado factores histológicos que predicen la resistencia al tratamiento convencional esteroideo. Un mayor grado de rechazo (A3-A4), la presencia de linfocitos B, la presencia intraluminal de tejido de granulación y la expresión en las células mononucleares de los antígenos C494 y C219 son factores predictores de persistencia de rechazo o resistencia al tratamiento esteroideo.

En estos casos no hay unanimidad en cuanto al tratamiento inmunosupresor. Se suele aplicar terapia citolítica con anticuerpos monoclonales OKT3 o globulina antitimocítica con resultados variables. Otros tratamientos con menos experiencia clínica incluyen la irradiación total linfocitaria, fotoféresis, tacrolimus o los aerosoles de ciclosporina⁽¹⁰²⁾.

A pesar de todo ello, aunque se resuelva el episodio de RA refractario, la incidencia de RC no se modifica. De hecho, la recurrencia de episodios de RA se ha relacionado directamente con el desarrollo de RC⁽¹⁰²⁾.

1.6.2.3.-Rechazo crónico

El RC, con la bronquiolitis obliterante (BO) como manifestación principal, continúa siendo el talón de Aquiles del TP. A pesar de la acusada mejoría en la supervivencia inmediata, la supervivencia a largo plazo para los receptores de un TP es baja en comparación con otros órganos sólidos. La alta presencia de BO, proceso fibroproliferativo que conduce a la obliteración de la vía aérea y a la fibrosis del injerto, es responsable de esta limitada supervivencia.



La incidencia de BO es alta en los 2 primeros años del TP pero los pacientes permanecen en riesgo indefinido, siendo el riesgo acumulativo para la BO del 60-80% entre los 5 y 10 años del TP. Hoy por hoy, la BO es indetectable en la fase preclínica y no suele tener tratamiento satisfactorio. De hecho, pasado el primer año, representa la principal causa de muerte de los pacientes con TP⁽¹⁰³⁾.

La fase inicial de la enfermedad es de carácter insidioso, con disnea progresiva y tos. La colonización de la vía aérea por *Pseudomona Aeruginosa* es común y produce brotes recurrentes de bronquitis purulentas.

A diferencia del RA, la confirmación histológica por BTB es problemática, con una sensibilidad igual o inferior al 17%. Dada la dificultad diagnóstica se introdujo el concepto de síndrome de bronquiolitis obliterante como expresión funcional de un RC que provoca la caída de la función respiratoria, en concreto del $FEV_1 \leq$ al 80% del pico obtenido después del trasplante, no justificado por otra causa.

Los hallazgos histológicos presentes en la BO sugieren que existen dos procesos distintos que abocan el uno al otro. Por un lado, existe una inflamación de las estructuras bronquiolares de origen inmune y/o infeccioso que conduce a una respuesta fibroproliferativa de los bronquiolos y bronquio de la vía aérea de mayor tamaño con progresiva obstrucción y fibrosis del injerto. La lesión de la BO se considera activa si se acompaña de infiltración linfocítica peribronquiolar o inactiva si la infiltración es escasa o ausente.

Tabla VII: Clasificación clínica del SBO	
Grado 0	<i>FEV₁ > 80% del basal</i>
Grado 1	<i>FEV₁ = 66-79%</i>
Grado 2	<i>FEV₁ = 51-65%</i>
Grado 3	<i>FEV₁ < 50%</i>
<i>A: no BO o no biopsia; B: BO</i>	
<i>FEV₁ base: media de dos mejores valores</i>	

Como ya hemos comentado, el factor de riesgo más importante para el desarrollo de BO son los episodios previos de RA, además de la neumonía citomegálica, la bronquiolitis linfocítica, la isquemia de la vía aérea y la ausencia de coincidencia del sistema HLA entre donante y receptor⁽¹⁰³⁾.

La bronquiolitis linfocítica o inflamación linfocítica no fibrosante de la vía aérea se detecta con frecuencia en las biopsias postrasplante. A menudo la precede o sigue a los episodios de RA y se ha asociado a un incremento del riesgo para desarrollar BO. Su



diagnóstico debe alertar al clínico hacia un posible cambio del tratamiento inmunosupresor.

El tratamiento del RC consiste en aumentar la inmunosupresión, pero no existe una terapia que haya demostrado una eficacia superior. Se considera que es efectiva cuando se consigue ralentizar la caída de la función pulmonar o estabilizarla, dado que la mejoría es poco probable. Una vez establecido el diagnóstico, la enfermedad puede seguir un curso lento y progresivo o estacionarse, bien de forma espontánea o como respuesta al tratamiento⁽¹⁰³⁾.

1.6.3.-Otras complicaciones

1.6.3.1.-Hipotensión

Tras el TP es frecuente que los pacientes estén hipotensos, sobre todo si han requerido CEC, debido sobre todo a la disminución de las resistencias periféricas. La necesidad de mantener balances hídricos negativos para minimizar el edema agrava aún más la hipotensión. Para remontarla hay que evitar la sobrecarga de fluidos y se requiere por lo general el empleo de inotrópicos, estabilizándose a los pocos días tras la cirugía. Se ha relacionado con la liberación por parte de los leucocitos y plaquetas de citoquinas y otros factores humorales⁽⁹⁸⁾.

1.6.3.2.-Hipertensión pulmonar

Tras el TP se produce una reestructuración de la hemodinámica del circuito pulmonar. Es frecuente comprobar que los pacientes presentan elevaciones de las cifras de presión arterial pulmonar durante las primeras 24 ó 48 h postrasplante, sobre todo si aparece edema de reperfusión. Esta hipertensión puede afectar al mantenimiento hemodinámico general del paciente y, si bien la mayoría de las veces no precisa medidas terapéuticas especiales, en otras ocasiones es preciso emplear PGE₁ y NO⁽⁹⁸⁾.

1.6.3.3.-Tromboembolismo pulmonar

Los pacientes con TP deben ser considerados de alto riesgo para el desarrollo de trombosis venosa profunda, y la profilaxis del tromboembolismo pulmonar (TEP) en ellos debe ser muy rigurosa, con heparinas de bajo peso molecular, movilización de extremidades y vigilancia de los catéteres. Se ha estimado un 12% de incidencia de TEP en pacientes con TP y TCP. Puesto que en el pulmón trasplantado no existe circulación bronquial, la repercusión del TEP es mayor que en otros pacientes, con una mortalidad de hasta el 42%⁽⁹⁸⁾.



1.6.3.4.-Infecciones

Al estar en contacto con el exterior, el pulmón es más susceptible a la agresión de los agentes externos. El paciente inmunodeprimido presenta menor capacidad de defensa frente a las infecciones, en especial a nivel pulmonar. Las infecciones son dos veces más frecuentes en receptores pulmonares que en receptores de corazón e hígado y se estima que constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad postoperatoria del TP.

La infección puede ser adquirida, transmitida desde el donante, o bien propagada desde el pulmón nativo en los TP unipulmonares, o desde los senos paranasales y/o vías aéreas superiores. Además de la exposición al exterior, entre los factores que favorecen la infección están la inmunosupresión, la denervación del pulmón trasplantado con depresión del reflejo tusígeno y abolición del reflejo mucociliar, y la interrupción del drenaje linfático⁽⁹⁸⁾.

1.6.3.4.1.-Infecciones bacterianas

La neumonía bacteriana es la infección más frecuente, apareciendo hasta en el 66% de los TP⁽¹⁰⁴⁾. Su incidencia es mayor en los primeros 6 meses tras el TP, con una prevalencia del 35% en las 2 primeras semanas después de la cirugía. Esta cifra puede reducirse al 10% cuando se aplica una profilaxis antibiótica de amplio espectro y se trata cualquier patógeno potencial detectado en los análisis bacteriológicos de esputo durante los primeros 10 días.

Los gérmenes que se aíslan con más frecuencia son los Gram negativos, especialmente la *Pseudomona aeruginosa*, seguidos por el *Staphylococcus aureus* y el *Haemophylus influenzae*⁽¹²⁶⁾. A pesar de la conocida transmisión de patógenos desde el donante al receptor, los pacientes con FQ que padecen frecuentes infecciones pretrasplante por *Pseudomonas* no parecen sufrir una mayor incidencia de infecciones respiratorias que el resto de trasplantados en el periodo postoperatorio inmediato. Sin embargo, cuando desarrollan neumonía postoperatoria, este organismo está casi siempre implicado.

La tuberculosis es más frecuente en la población trasplantada que en la población normal, y parece acertado realizar quimioprofilaxis en los pacientes con TP⁽⁷⁷⁾.

La bronquitis bacteriana es muy frecuente entre los trasplantados pulmonares, y representa el 25% de las infecciones bacterianas tras el TP. Este proceso es más frecuente entre los pacientes con FQ y se ve también favorecido cuando el paciente es portador de alguna prótesis endobronquial o presenta un RC, contribuyendo al desarrollo de bronquiectasias en la BO.



La mediastinitis es una grave complicación, que aparece con mayor frecuencia tras disecciones amplias del mediastino como en los TCP o cuando aparecen dehiscencias de la anastomosis respiratoria. Más rara es la secundaria a osteomielitis esternal.⁽⁷⁷⁾

1.6.3.4.2.-Infecciones víricas

La infección por *Citomegalovirus* (CMV) es la segunda infección más frecuente en el paciente con TP, aunque aparece más tarde, de 1 a 4 meses tras el TP y nunca antes de la 2ª semana después del trasplante. No todos los pacientes que adquieren una infección por CMV desarrollan la enfermedad⁽¹⁰⁵⁾. La incidencia de infección está directamente relacionada con el estado serológico del receptor y su concordancia con el del donante, y el peligro infeccioso dependerá del régimen de inmunosupresión. La prevalencia de infección por CMV es menor cuando el donante y el receptor son negativos, aunque cuando estos pacientes adquieren la infección desarrollan la enfermedad en un 80%. Esta prevalencia es también elevada en receptores positivos con donantes positivos. Por último, un paciente seropositivo con donante negativo puede reactivar la infección latente con replicación viral debido a la inmunosupresión.

La enfermedad puede manifestarse de forma insidiosa, como hepatitis, gastroenteritis, colitis, retinitis, o un cuadro generalizado con importante postración. No obstante la neumonía es la manifestación más frecuente en el TP, con fiebre, tos, deterioro respiratorio e infiltrados difusos en la Rx, planteando muchas veces el diagnóstico diferencial con el RA. La infección por CMV puede ser diagnosticada por serología, o detección de virus en la BTB o lavado broncoalveolar, y se ha asociado con una mayor incidencia de RC.

El ganciclovir es el tratamiento más eficaz para la neumonía por CMV, teniendo en cuenta que inhibe la replicación viral pero no erradica la infección latente. También puede usarse como profilaxis a partir del 10º día postoperatorio, disminuyendo a menos del 15% la elevada mortalidad que con anterioridad se asociaba al CMV.

La infección por Herpes simple no plantea una excesiva problemática gracias a la efectividad del tratamiento y la profilaxis con aciclovir. Otros virus como el *Epstein-Barr* juegan un papel en el TP poco definido, habiéndose relacionado con la aparición de procesos linfoproliferativos⁽¹⁰⁵⁾.

1.6.3.4.3.-Infecciones por hongos

Las infecciones fúngicas pueden ocurrir en el periodo postoperatorio temprano o tardío. Aunque es frecuente aislar *Candida albicans* en los cultivos de esputos postoperatorios, su presencia se suele deber a una colonización de la vía aérea. La neumonía por Cándida es rara, pero si se produce suele ser fatal. También puede originar



mediastinitis, aneurismas micóticos e infección diseminada. Se trata con fluconazol o anfotericina B.

La infección por *Aspergillus* aparece entre el 20% y 40% de los receptores pulmonares. La enfermedad se presenta hasta en el 25-60% de los pacientes infectados y se caracteriza por bronquitis ulcerativa o pseudomembranosa, neumonía y aspergilosis diseminada. La afectación inflamatoria del árbol respiratorio puede provocar estenosis de la vía aérea a distintos niveles y en su forma ulcerativa propiciar la aparición de una fístula broncoarterial con hemoptisis masiva y un pronóstico ominoso. La variedad predominante es el *Aspergillus fumigatus*.

El diagnóstico se hace por fibrobroncoscopia, aislando el hongo en el aspirado y en las biopsias de las lesiones ulcerativas. El tratamiento puede hacerse con itraconazol y anfotericina B en aerosol, aunque la neumonía o la aspergilosis generalizada requieren el empleo de anfotericina i.v, principalmente en su forma liposomal, menos tóxica, aunque en general los resultados son malos a pesar del tratamiento. En el periodo postoperatorio está indicada la profilaxis con fluconazol y aerosoles de anfotericina B⁽¹⁰⁵⁾.

1.6.3.4.4.-Otras infecciones

La infección por *Pneumocystis carinii* supone un grave riesgo para los pacientes inmunodeprimidos. La mortalidad asociada a la neumonía por este germen es considerable y por ello es obligada la profilaxis con cotrimoxazol que ha demostrado una alta efectividad¹¹⁷.

1.6.3.5.-Complicaciones anastomóticas

1.6.3.5.1.-De la vía aérea

Aunque las mejoras en la técnica y en la profilaxis infecciosa han reducido su prevalencia, hasta el 15% de los pacientes con TP presentan algún tipo de complicación en la anastomosis de la vía aérea. Esta puede ser una dehiscencia de mayor o menor grado en el periodo precoz, o bien una estenosis o broncomalacia de forma más tardía.

Es posible objetivar una relación directa entre la aparición de complicaciones de la sutura bronquial con las infecciones respiratorias. Su incidencia es mayor entre los pacientes con FQ o bronquiectasias, patologías sépticas por definición. Salvo excepciones, en dehiscencias de más del 50% de la luz que requieren corrección quirúrgica, el resto de casos pueden ser tratados con medidas conservadoras: fibrobroncoscopias repetidas para control y limpieza bronquial y antibioterapia adecuada según los cultivos.



En su evolución se puede producir una estenosis por la cicatrización bronquial. Si se produce una dificultad al paso de aire, está indicado el tratamiento con láser, dilataciones neumáticas y prótesis autoexpandibles⁽⁹⁷⁾.

1.6.3.5.2.-Vasculares

Mediante ecografía transesofágica postoperatoria, se han detectado estenosis de las venas pulmonares hasta en el 29% de los pacientes con TP.

El grado de estenosis repercute en la evolución a corto plazo. Cuando la obstrucción de la vena pulmonar es completa, se produce un infarto pulmonar en un plazo de 4-6 h⁽¹¹⁹⁾. Es importante pensar en la posibilidad de este cuadro, pues la clínica que produce es inespecífica y la Rx muestra un infiltrado difuso que plantea el diagnóstico diferencial con la infección, el RA o la LIR. Aunque se han comunicado resultados aceptables con la utilización de un activador del plasminógeno para lisar el trombo, cuando se comprueba una obstrucción significativa es preciso repararla con angioplastia o cirugía, y en ocasiones la única opción terapéutica es la lobectomía o el trasplante.

La estenosis de la arteria pulmonar es poco frecuente y plantea una problemática con un enfoque terapéutico similar al antes expuesto para la anastomosis venosa, si bien en este caso existe una hipoperfusión del pulmón afecto. El diagnóstico suele hacerse por ecografía transesofágica o angiografía y aunque se puede intentar el tratamiento con dilatación neumática y endoprótesis, con frecuencia requiere corrección quirúrgica⁽¹²⁰⁾.

1.6.3.6.-Complicaciones del abordaje

Las complicaciones de la esternotomía, desde defectos de la unión hasta la dehiscencia esternal completa o la osteomielitis, aparecen hasta en el 34% de pacientes tras el TP. La aparición de problemas en la fijación esternal puede provocar molestias persistentes o afectar la mecánica ventilatoria, requiriendo en ocasiones una reintervención y nueva fijación esternal.

El efecto retardante de la cicatrización producido por los esteroides, provoca que aparezcan dehiscencias de la herida quirúrgica a cualquier nivel, afectando a diferentes planos musculares, incluso hasta la dehiscencia total de la toracotomía. Cuando aparece requiere reparación quirúrgica⁽¹⁰⁶⁾.



1.6.3.7.-Complicaciones pleurales

1.6.3.7.1.-No infecciosas

Las complicaciones no infecciosas del espacio pleural aparecen hasta en un 22% de los TP, siendo la más frecuente el neumotórax⁽¹³¹⁾. La aparición de fuga persistente y de un neumotórax recurrente tras el TP nos orienta sobre la existencia de pequeñas dehiscencias con fistulización broncopleural a nivel de la anastomosis bronquial. En ocasiones está producido por pequeñas bullas o blebs en el pulmón donante o por lesiones superficiales en el parénquima durante la cirugía de extracción o implante. El tratamiento debe ser conservador en la mayoría de los casos, manteniendo los drenajes pleurales y requiriendo en pocos casos la corrección quirúrgica.

Por lo general se busca que los tamaños pulmonares del donante y del receptor sean equivalentes. Sea por error en las mediciones o bien por la situación de emergencia, en ocasiones puede existir bastante discordancia entre los tamaños pulmonares del donante y receptor. Un pulmón demasiado pequeño no ocupará toda la cavidad torácica. Uno demasiado grande puede impedir el cierre del tórax e incluso provocar una compresión cardíaca con taponamiento.

En el caso de pulmones grandes, puede emplearse con éxito la reducción del tamaño pulmonar, incluso resecciones lobares. Es más frecuente que los pulmones sean demasiado pequeños, sobre todo en casos de enfisemas o FQ con cavidades sobredimensionadas. En éstos puede aparecer una imagen de neumotórax persistente en los controles radiológicos, a pesar de los drenajes y una exudación y acumulo de líquido secundarios en el espacio pleural. Aunque este hecho no supone un problema serio por sí mismo ya que con el tiempo el líquido tiende a reabsorberse, sí podría convertirse en una grave complicación si se infecta⁽¹⁰⁶⁾.

La supuesta compresión del pulmón trasplantado por el pulmón nativo en los casos de TP unipulmonar por enfisema, se da con menos frecuencia de lo que en principio se podría esperar. En ocasiones, cuando se objetivan bullas gigantes con crecimiento progresivo, es preciso resecarlas.

El derrame pleural seroso y recurrente es frecuente después del TP⁽¹²³⁾. La disrupción de los linfáticos pulmonares y el aumento de la permeabilidad capilar se han propuesto como factores que contribuyen a su aparición. Durante los primeros 10 días el débito va disminuyendo, mostrando una disminución del contenido en proteínas y una elevación de los linfocitos en el mismo. El tratamiento consiste en el mantenimiento inicial de los drenajes pleurales hasta objetivar la ausencia de débito. Las colecciones líquidas pleurales de aparición tardía se deben tratar con drenaje pleural y se ha de pensar siempre en la manifestación inicial de un RA, sobre todo si el líquido es un exudado.



La hemorragia postoperatoria contribuyó de forma importante a la morbimortalidad en los primeros TP⁽¹⁰⁶⁾. En la actualidad, cuando requiere reexploración de la cavidad torácica, continúa siendo una causa importante de mortalidad precoz⁽¹⁰⁷⁾.

La persistencia de sangrado por los drenajes pleurales genera problemas hemodinámicos, restricción respiratoria en caso de acumulo pleural y aumento de los requerimientos de líquidos y transfusiones, contribuyendo a la disfunción postoperatoria precoz del injerto⁽⁷⁵⁾. Entre los factores que pueden predisponer al sangrado destacan la existencia de paquipleuritis extensa y el empleo de CEC. Esta última se asocia con la aparición de disfunción plaquetar y fibrinólisis que favorecen la aparición de la hemorragia postoperatoria. El empleo de aprotinina como hemostático se ha mostrado eficaz en la disminución de las hemorragias postoperatorias, sobre todo en casos en los que se ha utilizado CEC. El empleo de ésta durante la cirugía debe restringirse en la medida de lo posible⁽⁷⁵⁾.

1.6.3.7.2.-Infecciosas

La incidencia del empiema pleural en los pacientes con TP es del 3,6%⁽¹⁰⁸⁾. La profilaxis antibiótica, la vigilancia radiológica y los cuidados de los drenajes pleurales, con evacuación precoz de las colecciones líquidas minimizan esta complicación. Cuando aparece, es una infección muy grave con una importante mortalidad asociada.

Suele producirse de forma precoz y está producido por la misma flora microbiana que contamina la vía aérea. En los TP bipulmonares con incisión de “clam-shell”, puede afectar a ambas cavidades pleurales. La presencia de dehiscencias de la anastomosis bronquial y el mantenimiento prolongado de los tubos de drenaje favorecen su aparición. Como en cualquier otro empiema, el tratamiento consiste en drenaje y antibioterapia⁽¹²⁹⁾.

1.6.3.8.-Complicaciones neurológicas

La paresia o parálisis diafragmática aparece hasta en un 30% de los TP y suele ser secundaria a la lesión yatrógena del *nervio frénico* durante la exéresis del pulmón nativo. La disfunción diafragmática provocada por dicha lesión puede retrasar la retirada de la ventilación mecánica y la recuperación del paciente, aunque su repercusión a largo plazo suele ser limitada.

Algo más frecuente es la lesión del *nervio recurrente laríngeo* durante las maniobras de disección del hilio pulmonar izquierdo, a nivel del cayado aórtico. Se traduce en una parálisis de la cuerda vocal izquierda con disfonía, aunque no tiene una repercusión significativa en la mecánica respiratoria⁽¹⁰⁸⁾.



1.6.3.9.-Complicaciones abdominales

La aparición de complicaciones abdominales después del TP constituye una fuente de morbilidad y mortalidad nada despreciable⁽¹³¹⁾. Entre ellas se incluyen el íleo prolongado, la isquemia intestinal, la colitis, la perforación de colon y la colelitiasis.

Las complicaciones abdominales son responsables de hasta un 22% de las muertes postrasplante y, en el caso de perforación de colon, la mortalidad entre los pacientes se incrementa hasta el 50% a pesar del tratamiento quirúrgico. Entre los enfermos trasplantados por FQ, es frecuente la aparición de cuadros de obstrucción intestinal distal, equivalente al íleo meconial, en el curso postoperatorio inmediato, si se les suspende el aporte de enzimas pancreáticos. Por ello, aunque no exista ingesta oral, deberá mantenerse la pauta de ingesta de enzimas a la mitad de la dosis habitual, asociando agentes mucolíticos como la acetilcisteína.

1.6.3.10.-Miopatía

Los pacientes con insuficiencia respiratoria crónica tienen una disfunción del metabolismo oxidativo músculo-esquelético que persiste a pesar de la mejora en la oxigenación tras el TP. Existen referencias sobre la aparición precoz de casos de miopatía severa postoperatoria. Aunque son múltiples los mecanismos que parecen intervenir en su aparición, se ha relacionado sobre todo con el empleo crónico y/o a altas dosis de corticoides. También parecen jugar un importante papel algunos relajantes musculares.

Aunque en sí no es una complicación seria y suele ser reversible a medio plazo tras reducir la dosis de esteroides, la aparición de miopatía prolonga la necesidad de ventilación mecánica, demora la recuperación del paciente, favorece las infecciones y ocasiona de forma indirecta una mayor morbilidad y mortalidad⁽¹⁰⁹⁾.

1.6.3.11.-Procesos linfoproliferativos

La terapia inmunosupresora favorece la aparición de procesos linfoproliferativos tras el TP en un rango que oscila entre el 2% y el 9% de los casos. Se ha relacionado también con el virus de *Epstein-Barr*, aunque el papel de éste en la oncogénesis no está bien definido, como ya hemos comentado.

El paciente puede presentar desde una proliferación policlonal de linfocitos lentamente progresiva hasta un proceso proliferativo monoclonal de alta malignidad. La manifestación inicial puede ser un infiltrado o nódulos en la Rx de tórax. Es característico que este tipo de procesos aparezcan en el primer año postrasplante. No suelen afectar al sistema nervioso central y suelen responder a la reducción de la inmunosupresión.



La base del tratamiento la constituye la reducción de la inmunosupresión en la medida de lo posible y, en casos de enfermedad localizada, la extirpación de la masa tumoral. También puede emplearse quimioterapia convencional y aciclovir. En los casos de falta de respuesta, la supervivencia es inferior a 6 meses⁽¹⁰⁸⁾.

1.7.-Resultados del TP

Hemos visto que el TP o TCP representan una alternativa terapéutica, una vez que se han agotado los recursos médicos convencionales y el paciente tiene una esperanza de vida corta a causa de su enfermedad pulmonar o cardiopulmonar. La finalidad última del trasplante va dirigida a conseguir prolongar esa vida con una buena calidad de la misma.

Supervivencia y calidad de vida son pues los dos conceptos claves a evaluar en los resultados de esta técnica quirúrgica. El número de trasplantes efectuados puede dar una idea de la actividad y experiencia alcanzadas por un determinado grupo, pero nunca debe ser el parámetro indicativo de su eficiencia. Ambos conceptos vienen condicionados, por un lado por el tipo de trasplante realizado, los episodios de rechazo e infección y la repercusión de los mismos, además de por las complicaciones generales acaecidas como consecuencia de la inmunosupresión.

Por otro lado, también está condicionado por el grado de comprensión de la enfermedad y responsabilidad por parte del paciente, conocedor del riesgo que entraña el menosprecio de cualquier síntoma o el abandono de la medicación inmunosupresora, y, no menos importante, por su actitud general y la de su entorno ante su nueva situación⁽¹⁰⁸⁾.

1.7.1.-Supervivencia

La supervivencia apenas ha variado en los últimos años a pesar de las mejoras en la preservación, la técnica quirúrgica y los cuidados postoperatorios. En EE.UU., con una tasa de donación baja y listas de espera de alrededor de 2 años, se tiende a incluir a pacientes en mejor situación clínica. Sin embargo en nuestro país⁽⁴⁰⁾, donde el tiempo de espera es significativamente inferior, se incluye a pacientes en una peor situación clínica. Esto implica, por un lado una esperanza de vida inferior sin trasplante y por otro, un riesgo preoperatorio añadido superior.

El registro internacional de trasplantes publicado por la *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) facilita cada año la supervivencia global, por entidades y por tipo de trasplante, considerando diferentes factores de riesgo. Los datos de este mismo registro permiten valorar la tendencia en el tipo de trasplante y en las indicaciones.



1.7.1.1.-Trasplante cardiopulmonar

El número de TCP alcanzó un pico en 1989 para luego decrecer, siendo las indicaciones más comunes para su realización la HTP, la enfermedad cardíaca congénita y la FQ. La supervivencia actual es de alrededor del 60% al año y del 21% a los 11 años del trasplante. Hay que tener en cuenta que estos datos se obtienen fusionando los de diferentes grupos de trasplante a nivel mundial. El análisis multifactorial indica como principales factores de riesgo la ventilación mecánica previa, la experiencia del centro trasplantador y edad del donante.

El rechazo inespecífico del injerto, la infección y los factores técnicos/hemorrágicos, son los principales factores de riesgo en el periodo postoperatorio inmediato. La infección lo es en el periodo postoperatorio medio y ésta y la BO en el tardío. La vasculopatía del injerto cardíaco se presenta en una minoría de casos⁽⁴⁰⁾.

1.7.1.2.-Trasplante pulmonar

La supervivencia global del TP considerada desde el año 1991 es aproximadamente de un 70% al año, 54% a los 3 años y de un 42% a los 5 años⁽⁴⁰⁾. Se ha descrito una mayor supervivencia tardía para el trasplante bipulmonar en algunas series, no observándose diferencias de supervivencia en otras.

La escasez de donantes es un factor limitante en casi todos los países y condiciona el tipo de trasplante a realizar, al margen de la propia indicación clínica. Esto hace que en nuestro país, donde esto no es todavía un problema acuciante, la inclinación sea hacia la realización de un TP bipulmonar, siempre y cuando el mismo no suponga un factor de riesgo perioperatorio añadido.

La supervivencia tras un retrasplante es mucho más baja, con unas cifras de un 45%, 37% y 31% al año, 2 años y 3 años respectivamente. Habría que considerar aquí las indicaciones, el riesgo preoperatorio asumido y la situación crítica de los pacientes sometidos al mismo.

El análisis multifactorial de los diferentes factores de riesgo de mortalidad analizados, permite concluir que la ventilación mecánica previa, el retrasplante, la enfermedad cardíaca congénita, la HTP y la edad superior a 55 años, tanto del receptor como del donante, son los principales factores que condicionan la supervivencia durante el primer año⁽¹¹⁰⁾.

La cuestión que se puede plantear es si, a pesar de los esperanzadores resultados obtenidos, se ha conseguido modificar la curva de supervivencia con respecto a aquellos pacientes que no han recibido un TP. Esta cuestión es muy relevante en la EPOC.



Existen varios trabajos, y el análisis efectuado por *Geertsman*⁽¹¹¹⁾ es quizás, el más objetivo al utilizar como grupo control a pacientes en lista de espera de TP. Considerando que durante el tiempo que permanecen en la misma se benefician de su inclusión en programas de tratamiento preoperatorio, optimizando el mismo, lo cual mejora su condición física y nutricional. Este autor comparó a dicho grupo con pacientes que presentaban idéntica enfermedad y situación clínica, en quienes se había desestimado el trasplante. Así durante los años 1990-1995 se analizaron la edad, la espirometría la PCO₂ y PO₂ y el diagnóstico, de un total de 157 pacientes en lista, de los cuales al final se trasplantaron 76. La supervivencia a 1 y 2 años en lista fue del 78% y 58% respectivamente. Tras el trasplante, la supervivencia fue del 79% y 64% en el mismo período. La reducción del riesgo de muerte, calculada mediante un análisis multivariante con regresión de Cox, fue del 55%, y en particular para pacientes con enfisema fue del 77%.

La experiencia del centro trasplantador, con una obligada curva de aprendizaje, es otro factor a considerar. Resulta imprescindible la extubación precoz, la reanudación inmediata de la rehabilitación y de la movilización y una nutrición ajustada a los requerimientos postoperatorios, en particular atendiendo a la corrección de la hipoproteinemia. El seguimiento estrecho del paciente es también un hecho a tener en cuenta. La adecuada instrucción del paciente, la disponibilidad del personal médico para una óptima atención sanitaria, la inmunosupresión controlada minimizando el riesgo de infección, rechazo y/o yatrogenia, secundarios a la misma, resultan imprescindibles⁽¹¹⁰⁾.

1.7.2.-Calidad de vida

Es fundamental considerar la calidad de vida. No se disponen de cuestionarios que permitan evaluar de forma adecuada la calidad de vida tras el trasplante. No obstante, muchos pacientes prefieren sacrificar la cantidad por la calidad. Un punto a tener en cuenta es el impacto que sobre el entorno sociofamiliar supone pasar de la atención durante años a un enfermo limitado por la disnea, a una persona en la que de repente desaparece dicha limitación. Este hecho puede ser causa incluso de conflictos de relación.

La limitación física para las actividades habituales y el desempeño de una actividad laboral son parámetros indicativos de calidad de vida. Un 80% de los receptores de TP no muestran limitaciones en su actividad diaria al año de efectuarse el trasplante, el 14% realizan sus tareas cotidianas con algo de ayuda y sólo el 4% las efectúan con total dependencia⁽⁶⁶⁾. Sin embargo, el porcentaje de pacientes que realizan una vida laboral activa es bajo. En este sentido habría que matizar los motivos, puesto que, en muchos casos, se debe, bien a que se perpetúa la situación de baja laboral previa derivada de la propia enfermedad o bien a la dificultad real que supone el desempeño de un trabajo que no permite un cambio a un puesto con un horario y un ritmo flexibles o un cambio de



actividad. Por otro lado, los niños que consiguen volver a la escuela después del TP presentan un rendimiento menor que el de sus compañeros.

La frecuencia obligada en los controles médicos, las hospitalizaciones repetidas, así como la aparición de complicaciones, alteran la calidad de vida de los pacientes. Un 45% no requieren hospitalización durante el primer año y un 24% y 17% son hospitalizados por infección o infección con rechazo respectivamente. Además de las mencionadas, las complicaciones más frecuentes al año y a los tres años son la hipertensión arterial de causa renal (45% y 62%), disfunción renal (20% y 22%), hiperlipidemia (8% y 16%), diabetes (15% y 13%) y neoplasias, (5% y 3%) sobre todo linfomas⁽¹¹²⁾.

La evolución funcional después del TP uni o bilateral es buena, siendo mejor en estos últimos. Mejoran mucho los parámetros ventilatorios entre los 3 y 6 meses postrasplante, tiempo en el que desaparecen las restricciones inherentes al procedimiento como son el dolor, las alteraciones mecánicas de la pared torácica o la disfunción de los músculos respiratorios. La hipoxemia y la hipercapnia se corrigen. La capacidad de ejercicio mejora de tal forma que los pacientes pueden realizar una vida activa normal⁽¹¹⁰⁾.



2.1.-Nuevas estrategias disponibles en genómica

En el año 2001 se publicó la secuencia completa del genoma humano, y poco después se completó la del ratón y otras especies ⁽¹¹³⁾. Esta información, constituye una excelente base para la investigación de los procesos moleculares relacionados con múltiples procesos patológicos o el mecanismo de acción de hormonas y fármacos. Sin embargo, la secuencia del genoma sólo nos aporta una información estructural del mismo y aún estamos muy lejos de conocer la anotación funcional de la mayor parte de los genes. Para intentar llenar este vacío, se ha desarrollado rápidamente la genómica funcional y en la actualidad disponemos de técnicas que permiten explorar a gran escala y con rapidez las funciones del genoma de múltiples especies.

En la actualidad, se dispone de diversas técnicas de alta capacidad (“ómicas”) para explorar las funciones de los genes como son: microarrays de DNA, chips de SNP, etc., estas técnicas se usan para estudiar las interacciones proteína-proteína o proteína-ADN. Este tipo de investigación difiere en gran parte de las estrategias clásicas seguidas hasta ahora en investigación básica donde la hipótesis de partida era generalmente una pregunta sencilla ⁽¹¹⁴⁾. Actualmente, cuando se plantea un estudio de miles de genes o proteínas, es difícil predecir el resultado final. Sin embargo, gracias a las técnicas de alto rendimiento, se han podido construir mapas o redes que describen con mayor precisión un proceso biológico ⁽¹¹⁵⁾. Por otra parte basados en técnicas de alto rendimiento se tornan cada día más complejos, debido a la elevada cantidad de datos que generan, hoy día ya se habla de la biología de los sistemas (System Biology) como un nuevo campo de investigación que combina la biología con las matemáticas, la estadística y la informática, esta es una combinación perfecta para controlar, diseñar y en analizar con precisión este tipo de investigaciones.

2.2.-Regulación de la expresión génica

Todas las células del organismo poseen la misma información genética, pero es la expresión de determinado número de genes lo que define a los distintos tipos celulares. Esta expresión diferencial determina la producción y la activación de determinadas proteínas en respuesta por ejemplo, a los procesos de desarrollo celular e influencia ambiental. Algunos genes se expresan en niveles constantes en muchos tipos celulares, mientras que otros sólo se expresan en determinadas células o en respuesta a determinados estímulos.



Los genes codifican proteínas, y son estas las que llevan a cabo las distintas funciones en la célula determinando sus propiedades. La producción de proteínas a partir de la información genética está regulada a distintos niveles (fig. 10).

El primer nivel hace referencia a la integridad física del ADN, que como es sabido se encuentra fuertemente empaquetado en la cromatina, la cual controla el grado al que pueden actuar los reguladores de la transcripción y la maquinaria de RNA polimerasa sobre determinados genes.

El inicio de la transcripción está estrictamente controlado por la presencia de co-reguladores y cofactores. El ARN producido es sometido a distintos procesos de maduración que afectará a sus propiedades. La funcionalidad del ARN mensajero (ARNm) depende del transporte desde el núcleo al citosol, de la estabilidad y ratio de degradación, y de la eficiencia translacional del transcrito. Y por último, la función y estabilidad de las proteínas producidas está regulada por modificaciones postraslacionales, por su localización y por su interacción con otras proteínas o ligandos. Lo ideal sería estudiar todos estos procesos dinámicos del genoma y las proteínas de manera conjunta, pero hasta ahora las técnicas de alta resolución sólo permiten mediciones estacionarias ⁽¹¹⁶⁾.

El inicio de la transcripción está regulado por una gran variedad de factores de transcripción. Algunos elementos en el inicio de la transcripción génica son comunes a muchas células, como lo son los factores de transcripción generales o la maquinaria de la ARN polimerasa. En última instancia, la cantidad de un ARN específico en una célula depende por tanto de la disponibilidad de todos estos factores.

La ARN polimerasa interacciona con la región promotora de un gen para el inicio de la transcripción. Cada factor es capaz de reconocer una región específica en el ADN ⁽¹¹⁷⁾. Puede ocurrir que determinados nucleótidos presentes en la región promotora condicionen una interacción más o menos intensa. El mecanismo general se resume de esta manera. El factor de transcripción IID se une a la caja-TATA, localizada en la región promotora. Se recluta al resto de la maquinaria ARN polimerasa y se inicia la transcripción. Estos factores controlan las proteínas y los ARNm que van a ser producidas en una célula, dándole así especificidad al sistema ⁽¹¹⁸⁾.

Distintos tipos de células pueden tener el mismo tipo de factores, pero es la diferencia en la concentración de éstos y las distintas combinaciones entre ellos lo que permite la activación o la inhibición de determinados genes en un momento dado. Así, dependiendo del lugar del DNA al que se unan los factores de transcripción en relación con el punto de inicio de la misma, y en qué combinación, se puede mediar la activación o la inhibición de determinados genes específicos. Incluso factores que no se han unido



al ADN pueden influir sobre este proceso pudiéndose unir a otros que si se encuentran interaccionando con el material genético ⁽¹¹⁹⁾.

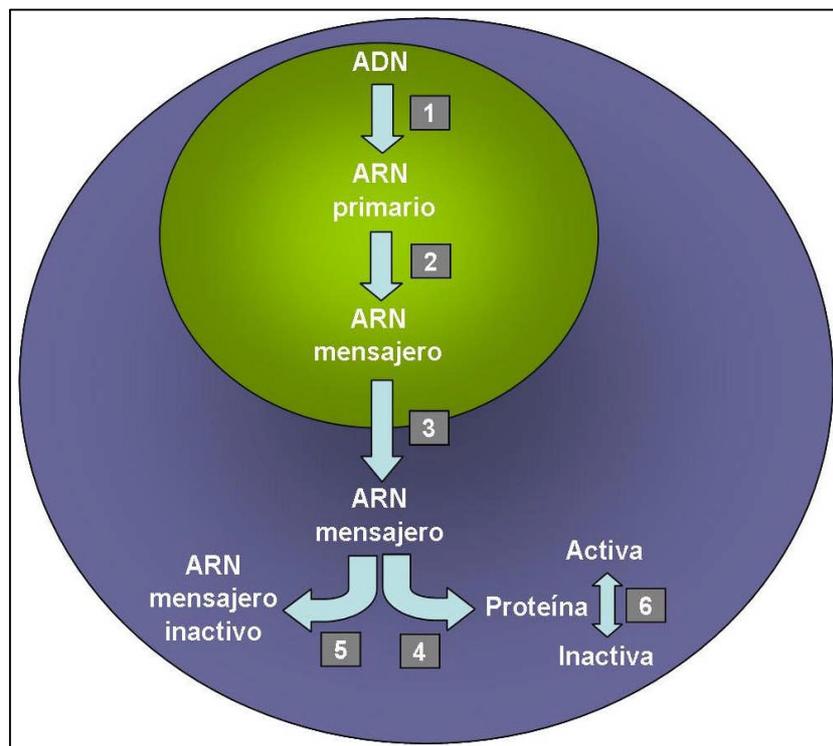


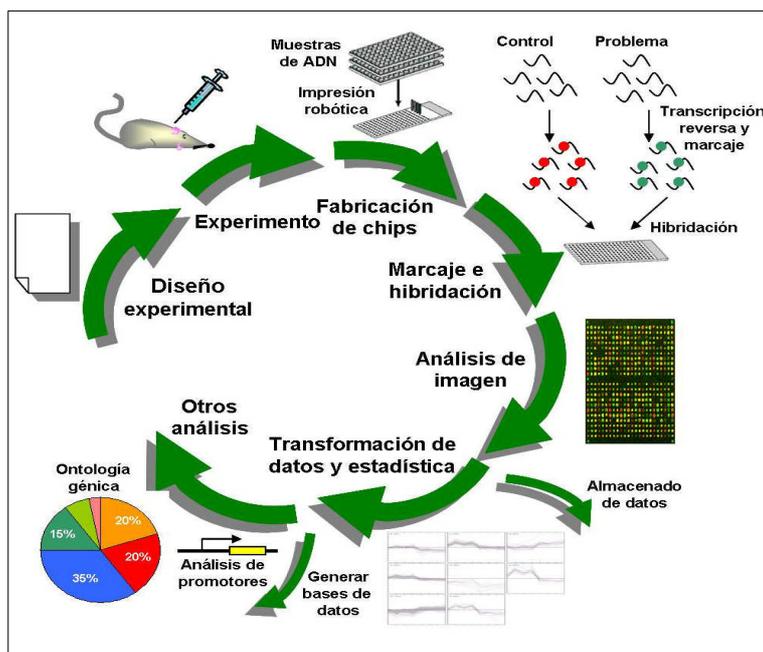
Fig. 10. Expresión génica en células eucariotas

2.3.-Estudios de expresión génica usando DNA Microarrays

En el año 1995 se publicó el primer artículo que usaba la tecnología llamada microarrays o biochips de ADN para el estudio de la expresión génica ⁽¹²⁰⁾. Esta técnica revolucionaria permitió la medición de la expresión de miles de genes en un único experimento. Gracias a esta tecnología en poco tiempo se aumentaron los conocimientos en muchos campos, se describió exhaustivamente el ciclo celular de la levadura o la respuesta de los fibroblastos humanos al suero ⁽¹²¹⁾. La técnica ha evolucionado desde entonces, y su uso se ha extendido notablemente, pero el principio y la esencia inicial permanecen. Básicamente, existen dos formas diferentes de medir expresión de genes mediante microarrays: 1) los ensayos de un canal ó 2) ensayos de doble canal ⁽¹²²⁾.



Los chips de un canal están constituidos por oligonucleótidos que han sido sintetizados e impresos sobre un soporte de vidrio mediante fotolitografía, de manera que distintas muestras se corresponden con un mismo gen ⁽¹²³⁾. Este tipo de microarrays son comercializados por Affymetrix GeneChips. Una única muestra de ARN se marca e hibridiza



en cada ensayo. Tras lavar *Fig. 11. Proceso de realización de un experimento con microarrays de ADN* se mide la cantidad de ARN unido a cada oligonucleótido. Por otra parte, los chips de doble canal están constituidos por muestras de ADN en forma de oligonucleótidos o bien productos de PCR, que son transferidos a un soporte de vidrio de superficie químicamente modificada de tal forma que cada punto sobre el cristal contiene ADN de un único gen.

El proceso se puede describir resumidamente de la siguiente manera: 1) se extrae el ARN de dos muestras que se deseen comparar, por ej. tejidos tratados y no tratados, 2) se marca con dos fluorocromos distintos, uno para cada muestra. Este marcaje se realiza en el proceso de producción de ADNc a partir de cada ARNm, 3) se combinan las muestras marcadas y se realiza una hibridación conjunta de ambas muestras sobre un mismo chip y 4) por último, el chip se lava y se lee haciendo uso de un escáner láser que excita a cada fluorocromo por separado y registra la señal producida para cada uno de ellos sobre cada uno de los puntos del chip. El nivel de señal dado es proporcional al nivel de expresión de un determinado gen contenido en el chip. Se determinará el nivel de expresión para un gen concreto calculando el ratio existente entre ambos fluorocromos para cada punto. De esta manera se puede saber de manera cuantitativa como influye un tratamiento o condición experimental concreta sobre la expresión particular de los genes contenidos en el chip.

La principal aplicación que se le ha dado y se le sigue dando a la tecnología de microarrays de ADN es la de estudios de expresión génica y se ha convertido en una de las técnicas más comunes cuando se quieren abordar estudios de alto rendimiento a escala genómica. No obstante, también puede ser empleada para estudios a gran escala de expresión de proteínas, metilación del ADN, *splicing* alternativos, polimorfismos o factores de transcripción ⁽¹²⁴⁾. Su uso ha quedado claramente reflejado en el número de

publicaciones que presentan la palabra *microarrays* como clave, o en su título, o en su resumen las cuales han crecido exponencialmente desde 1995. En cualquier caso conviene puntualizar que el análisis de los niveles de expresión génica de una célula no permite el entendimiento de los procesos propios de ella, ya que no es el ARN la molécula efectora de los procesos celulares, sino las proteínas. Algunos estudios han demostrado que la cantidad de ARN es proporcional al de las proteínas para las que codifica ⁽¹²⁵⁾, mientras que otros demuestran lo contrario. Se ha observado incluso que los datos referidos a expresión génica no pueden correlacionarse con los datos relacionados con la interacción entre proteínas. En resumen, la medición de los niveles de expresión génicos sólo nos permite describir el estado de una célula bajo una determinada condición y en un momento dado. Por último debemos ser conscientes sobre algunas limitaciones que deben tenerse en consideración cuando se usan los microarrays. Por ejemplo: 1) algunas informaciones específicas solo pueden desvelarse por otros métodos como la inmunohistoquímica que dan resultados más precisos de manera individual gen por gen ; 2) el diseño del estudio y procesamiento de la muestra deben de ser muy bien controlados ya que la variabilidad en su extracción o recolección podrían afectar o artefactar el resultado; 3) una mala técnica en la elaboración del marcaje podría interferir en la lectura por la falta de una adecuada identificación o algún defecto en la coloración dar una lectura errónea del microarrays ó 4) esta tecnología es casi exclusiva de universidades o centros de investigación debido al alto costo que tiene además de necesitar, de complejos paquetes de bioinformática para el análisis de datos ⁽¹²⁶⁾.

2.4.-Evolución del análisis de datos obtenidos de los microarrays

El principio sobre el que radica esta técnica permanece invariable desde el inicio. No obstante a lo largo del tiempo se ha ido optimizando con el objetivo de mejorar los resultados por ejemplo los chips fabricados con productos de PCR (ADN) se han ido desplazando por el de oligonucleótidos. El motivo de este cambio es la especificidad de los segundos frente a los primeros ⁽¹²⁷⁾. A su mayor especificidad hay que unir que los oligonucleótidos pueden ser diseñados para genes específicos o incluso para variantes de un determinado gen. La técnica destinada a imprimir los puntos sobre el chip también ha mejorado con los años; pasando del uso de portaobjetos al de cristales de superficie modificada químicamente, lo que ha permitido aumentar la señal de los chips y disminuir el ruido de fondo. Aún con todo esto, las principales mejoras realizadas conciernen al análisis bioinformático o estadístico de los datos. Para ello, se han desarrollado potentes programas bioinformáticos que ayudan a analizar e interpretar la enorme cantidad de datos generados. En la actualidad están en desarrollo programas de inteligencia artificial que sean capaces de orientar en un sentido biológico o en otro los datos obtenidos ⁽¹²⁸⁾.



En el primer artículo publicado que hacía uso de biochips, el análisis de los mismos era bastante sencillo ⁽¹²⁹⁾. Por ejemplo, se asumía que la mayoría de los genes medidos no deberían cambiar entre las dos situaciones experimentales comparadas. Según este principio, la señal de fluorescencia procedente de los dos fluorocromos se normalizaba de la misma manera mediante un factor de corrección común y se determinaba que un gen estaba diferencialmente expresado si el cociente entre los valores de ambos fluorocromos estaba por encima de un punto de corte de dos. En aquel momento no se aplicaba ningún tipo de algoritmo para corregir y normalizar los valores, ni suficientes replicados. Tampoco se realizaban controles de calidad ni hibridaciones invertidas (*dye swap*) para corregir la eficiencia del marcaje. Finalmente, los datos se presentaban en una lista más o menos burda donde aparecían los genes diferencialmente expresados y no se incluían estudios complementarios a la mera medición génica. Cada laboratorio podía usar la estrategia de análisis que quisiera, y en muchas ocasiones las bases de datos generadas no estaban disponibles públicamente ⁽¹³⁰⁾. En la actualidad, se sigue asumiendo que la mayoría de los genes medidos en un chip no cambian, pero el proceso de análisis es diferente. Para poder publicar los datos referidos a microarrays se han de enviar las bases de datos completos, con una buena descripción. El desarrollo experimental ha de ser un punto importante y se exigen un número mínimo de replicados (mínimo 3 por grupo experimental) ⁽¹³¹⁾. Debido a que hoy se conoce que el comportamiento de los fluorocromos es distinto y que dan fluorescencias diferentes se usan criterios de normalización basados en algoritmos ⁽¹³²⁾, y es muy habitual realizar en los replicados hibridaciones invertidas para corregir estos errores de eficiencia de marcaje. También de potentes algoritmos para determinar qué genes están significativamente regulados y para corregir los valores de P en relación al número total de genes interrogados.

Sin duda, el mayor avance se ha realizado en los programas destinados al análisis e interpretación de datos. Existen paquetes de aplicaciones informáticas en el mercado o bien de distribución libre para el visualizado y análisis de chips. Por último, deben ser complementados con estudios de interpretación de los datos que sean capaces de darle una orientación biológica o mecánicas más precisas a los resultados.

2.5.-La identificación de los genes diferencialmente regulados

Un objetivo central en los experimentos de chips es determinar el conjunto de genes que estén diferencialmente expresados entre las condiciones experimentales que se comparan. En nuestro caso, el tejido pulmonar trasplantado (rechazo crónico) en comparación con tejido pulmonar intacto. Esto no siempre es un camino fácil, considerando el gran número de genes que están siendo evaluados y las variaciones biológicas y técnicas en sus medidas de expresión. Una aproximación o selección basada en el “fold-change” de un valor arbitrario, todavía usada en muchos estudios, adolece de no proporcionar ningún intervalo de confianza para los genes seleccionados.



Esto resultará en la selección de falsos positivos, con muchos genes que realmente no han sufrido cambios reales en los niveles de expresión y que son más propensos a verse afectados por el ruido de las mediciones y otros artefactos ⁽¹³³⁾. Afortunadamente, hoy en día disponemos de tests estadísticos que permiten corregir dicho problema y analizan correctamente los datos de los microarrays.

Debido al costo relativamente elevado de los microarrays, el número de replicados es normalmente pequeño, especialmente cuando se comparan con el gran número de genes testados o interrogados. Esto supone un problema significativo para el análisis estadístico, como es el hecho de que sólo hay disponible un número limitado de medidas para estimar la varianza individual de cada gen ⁽¹³³⁾. En la actualidad disponemos de métodos estadísticos que han sido desarrollados para el análisis de datos de microarrays teniendo en cuenta los aspectos citados y que combinan el análisis de la varianza específica de cada gene con la global de todos los genes. Este incremento en la sensibilidad y especificidad para detectar los cambios de expresión ha añadido una ventaja esencial sobre los métodos convencionales como el T test estándar, el cual resulta totalmente inapropiado para determinar correctamente la expresión diferencial de genes en un estudio de microarrays. Para poder realizar una estadística, se necesita analizar un número mínimo de medidas replicadas. Debe hacerse una distinción importante entre las medidas de microarrays obtenidas de los replicados técnicos y de los biológicos. La expresión de muchos genes, particularmente aquellos involucrados en respuestas al estrés, son muy sensibles a pequeñas diferencias en el tratamiento o las condiciones de crecimiento celular. Por lo tanto, medidas repetidas sobre una única muestra biológica son mucho menos significativas que medidas repetidas sobre diferentes replicados biológicos. Cuando se desean encontrar diferencias de expresión, se debe prestar especial atención al número de replicados biológicos.

Otro aspecto relevante tiene que ver con el elevado número de genes (miles) que en un experimento de microarrays se analizan simultáneamente, los niveles de significación estándares no son los apropiados para establecer unos límites de confianza adecuados. Cuando se considera un experimento con 27000 genes, como es nuestro caso, e incluso aplicando un nivel relativamente conservador de $P = 0.01$ para cada gen, resultaría en 270 genes regulados significativamente. Esto ocurriría incluso si el número de verdaderos positivos fuera realmente mucho más bajo. Para corregir esto es importante que los valores de P se ajusten con un test de “múltiples pruebas de corrección” (MTC; multiple-testing correction). El MTC ajusta el valor de P de cada gen por el número de tests que se hayan realizado, es decir, por el número total de sondas interrogadas en el chip. El inconveniente de estos métodos de corrección es que tienden a ser bastante conservadores y pueden reducir el poder para reconocer resultados significativos. Por lo tanto, en los experimentos con chips donde se esperan múltiples cambios de expresión de genes, es, frecuentemente, justificable aceptar un pequeño número de falsos positivos para beneficiar el incremento del poder estadístico



y muchos estudios asumen el control de la proporción de falsos positivos o FDR (False Discovery Rate), estableciendo un nivel de corte del 5-10% ⁽¹³⁴⁾.

Otros análisis de datos más sofisticados se basan en agrupamiento de genes. Básicamente, se pueden clasificar en métodos de agrupamiento sin supervisión o supervisados. Los métodos no supervisados se usan para visualizar y agrupar genes según su patrón de expresión a lo largo de la serie experimental sin usar un conocimiento preestablecido sobre ellos. Por el contrario, los agrupamientos supervisados permiten agrupar los genes en relación al conocimiento previo de su función. Los agrupamientos génicos pueden hacerse en función de otros criterios. Por ejemplo, se pueden analizar los promotores de los genes regulados para determinar lugares de unión para los factores de transcripción de dichos genes. Con este conocimiento, es posible crear redes que interconecten unos genes con otros, etcétera. Las posibilidades quedan limitadas según el poder estadístico de los análisis realizados, la calidad de los datos obtenidos, la posibilidad de disponer del programa informático adecuado y de la imaginación (o pregunta) del investigador.

Una estrategia interesante de análisis es el agrupamiento no supervisado para identificar grupos de genes co-regulados. La hipótesis detrás de este abordaje es que deben de existir mecanismos comunes que provocan una co-regulación de un determinado grupo de genes, sobre todo si estos genes se comportan de manera similar en distintas situaciones biológicas. La explicación molecular para esto es que deben de existir uno o más factores de transcripción que se unan a las regiones promotoras de esos genes. Estos factores pueden ser identificados estudiando las secuencias promotoras para los lugares de unión. Las vías de señalización que llevan a la activación de la transcripción para determinados genes puede ser descubiertas si identificamos los factores de transcripción involucrados. Esta forma de plantear los experimentos es inversa a la utilizada clásicamente en el estudio de los mecanismos de señalización celular, pero es perfectamente válida como ha quedado demostrado en estudios sobre levaduras ⁽¹³⁵⁾. Otra aplicación muy útil de esta tecnología, es usarla para clasificar muestras o situaciones biológicas. Por ejemplo, para clasificar a los tumores en distintos subgrupos. Por supuesto, el uso de chips para realizar clasificaciones puede ser empleado en otro tipo de investigaciones, como por ejemplo para conocer las acciones bioquímicas de distintos fármacos ⁽¹³⁶⁾.

2.6.-Anotación funcional (Gene Ontology –GO-) de los genes regulados

En la actualidad, existe un consorcio internacional para establecer la Ontología de los Genes (GO; Gene Ontology). El objetivo del Proyecto GO es proporcionar un vocabulario común para nombrar a los genes y a las proteínas ⁽¹³³⁾ y ayudar a los investigadores a agruparlos según su función. La anotación de los genes no es un proceso sencillo, ya que muchos participan en muchas vías y lo que es más



importante, más de la mitad del genoma humano o de ratón no tiene aun una función conocida. Aun así, la anotación funcional de algunos genes permite conocer mejor la funcionalidad de otros así como la posible identificación de las funciones de nuevos genes ⁽¹³⁴⁾. Esta podría conseguirse, mediante la extracción de los datos disponibles en la literatura o en bases de datos públicas como es el ENSEMBL (www.ensembl.org). Pero esta labor podría convertirse en un trabajo interminable cuando tenemos que anotar cientos o miles de genes. Lo más habitual es usar los criterios de clasificación del proyecto GO. Este proyecto GO facilita un vocabulario estructurado y controlado que puede ser usado para describir sistemáticamente las propiedades de los productos de los genes. GO intenta evitar las confusiones que puedan emerger cuando se usan términos diferentes para describir características similares (p.ej., poro o canal) y corrige posibles sesgos cuando los investigadores se concentran en sólo unas características particulares comunes a los genes de interés sin tener en cuenta la frecuencia con la cual esta característica está representada en el resto del genoma. La estructura del proyecto GO se fundamenta en tres ontologías que clasifican a los genes de acuerdo a: 1) procesos biológicos, 2) componentes celulares y 3) funciones moleculares. Este lenguaje o clasificación nos permite asignar o identificar una función potencial en una lista de genes. Obviamente, la asignación correcta a un determinado término GO debe acompañarse por un valor P que nos indica la probabilidad de encontrar al azar genes de esa clase particular en una lista determinada. Por otra parte, los valores de P asignados a las categorías GO deben interpretarse con precaución cuando se asocian a un pequeño número de genes (p.ej, $n < 5$). Es decir, la inclusión de un sólo gen anotado para un término GO raro resultará en que ese término sea descrito con una elevada significación estadística, y puede incluso sacar del rango a otros términos GO comunes que estén presentes en una frecuencia mucho más elevada en la lista de genes de interés. Para controlar este problema, las P reportadas deben ser ajustadas a favor de los términos GO que estén apoyados en un mayor número de genes (6, 7).

Otra dificultad añadida es el ajustar los valores P para los cientos de categorías GO que son interrogadas, es decir calcular los FDR ⁽¹³⁵⁾. En esta Tesis se ha utilizado diferentes herramientas bioinformáticas como DAVID, que estiman los FDR para cada categoría GO aportando unos valores de P más realistas. Sin embargo, a pesar de la potencia estadística de estos análisis, las anotaciones funcionales de los genes y consecuentemente sus clasificaciones GO son, en la actualidad, incompletas. Esto significa que habrá un “sesgo” inevitable hacia los mecanismos mejor estudiados. Por el contrario, la no asignación de GO significativas nunca debe tenerse en cuenta como una ausencia de relevancia biológica, y sí como una excelente oportunidad para descubrir funciones biológicas novedosas ⁽¹³⁶⁾.

2.7.-PCR y PCR cuantitativa en tiempo real

Gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede obtener un número muy alto de copias de ADN partiendo de un fragmento determinado del mismo ⁽¹³⁷⁾. Básicamente, consiste en someter al ADN a un ciclo de temperaturas siguiéndose estos pasos: (i) desnaturalización, (ii) alineamiento de los cebadores y (ii) extensión.

Una evolución importante de esta tecnología ha sido el desarrollo de la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). La RT-PCR sigue el principio de la PCR convencional, pero con una serie de ventajas. Igualmente se necesita un ADN (cADN), una polimerasa, unos cebadores y unos fluorocromos ⁽¹³⁹⁾. Debido a que cada nuevo fragmento sintetizado lleva incorporado fluorocromos, es posible saber exactamente y en cada ciclo la cantidad de moléculas sintetizadas, que será proporcional a la señal de fluorescencia emitida. La cinética de la reacción de amplificación es por tanto conocida y registrada. Un algoritmo específico convierte la señal luminosa en un número que es usado por nosotros para saber cuánto se está generado en un determinado pocillo y en un determinado momento ⁽¹⁴⁰⁾. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en esta técnica son de dos tipos; agentes intercalantes (SYBR Green) y sondas específicamente diseñadas que tienen incorporados los fluorocromos (Taqman). En esta Tesis Doctoral se ha hecho uso del primero de los sistemas. Esta técnica es muy rápida y fiable, y permite hacer estudios de expresión génica con facilidad, especificidad y elevada sensibilidad ^{(141) (142)}.





Justificación



El trasplante de órganos y tejidos ha llegado a revolucionar la Medicina, incorporándose a la rutina terapéutica de un número cada vez mayor de centros en casi todos los países desarrollados. Esto ha sido posible gracias a una selección de los receptores cada vez más rigurosa, a una mejor técnica quirúrgica y anestésica, a la mejora de los cuidados postoperatorios y al desarrollo de la inmunología y de la farmacología en el campo de los inmunosupresores y los antimicrobianos.

El TP es una opción terapéutica aplicable en el estadio final de la patología pulmonar no maligna, que incluye afecciones de la vía aérea, del parénquima pulmonar y la circulación pulmonar. Representa una alternativa terapéutica, incuestionable para prolongar la vida con la mejor calidad posible, una vez que se han agotado los recursos médicos convencionales y el paciente tiene una esperanza de vida corta a causa de su enfermedad de base. La finalidad última del TP es conseguir prolongar esa vida con una buena calidad de la misma.

Desde la década de los 80 se han realizado más de 21.000 TP (uni o bipulmonares), con un incremento progresivo de la supervivencia gracias a las mejoras ya comentadas, la optimización del tratamiento, la recuperación e inclusión de pacientes inicialmente desestimados o una disminución de las complicaciones postoperatorias. Sin embargo, la prevalencia de esta supervivencia ha sufrido un estancamiento.

Aunque la mayoría de los pacientes trasplantados experimentan una mejora considerable de su calidad de vida, la supervivencia actual global ronda sólo el 53% a los 5 años. Esto se debe en gran parte a que, a pesar de los múltiples trabajos experimentales desarrollados sobre las complicaciones del TP, éstos han tenido escasa repercusión en la práctica clínica, de forma que la incidencia del rechazo apenas se ha modificado en los 10 últimos años. En concreto, el RC continúa siendo el talón de Aquiles del TP y la supervivencia a largo plazo para los receptores de un TP sigue siendo baja en comparación con la de otros órganos sólidos.

Estas evidencias clínicas demandan un esfuerzo en la investigación experimental básica. En concreto, un esfuerzo dirigido al conocimiento de los genes y mecanismos moleculares involucrados en el RC. Con este deseo se ha desarrollado la presente Tesis. Este conocimiento podría ayudar a entender la fisiopatología del RC y sentar una base más sólida para identificar dianas moleculares que permitan desarrollar estrategias terapéuticas específicas y que, en última instancia, ayuden a mejorar la esperanza de vida de los pacientes sometidos a TP.





Objetivos



- I.-*“Realizar el análisis histopatológico de los cambios asociados con el rechazo crónico en el modelo de trasplante pulmonar experimental en ratas”.*
- II.-*“Identificar, mediante microarrays de ADN, todos los cambios en expresión de genes asociados con el rechazo crónico en el pulmón trasplantado”.*
- III.-*“Realizar la clasificación funcional de los cambios de expresión génica como estrategia para identificar los mecanismos moleculares asociados con el rechazo crónico en el pulmón trasplantado”.*
- IV.-*“Cuantificar la expresión génica, mediante PCR en tiempo real, de algunos genes asociados con el rechazo crónico en el pulmón trasplantado”.*





Material y Método



1

MATERIAL

1.1.-Animales de experimentación

Para el desarrollo del modelo de trasplante pulmonar, se han utilizado ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley (SD) de 4ª generación, machos, de 5 meses de edad y pesos que han oscilado entre los 300 y 320 gr. Esta generación de animales se ha obtenido en el bioterio de la Unidad de Investigación (Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín) a partir de una colonia de reproductores (1ª generación) procedente del Centro de producción Animal de Harlan Interfauna Ibérica SL (Barcelona, España).



Fig. 12: Rata Sprague-Dawley

Los animales han sido destetados a los 21 días de edad y se han ubicado en jaulas de Makrolón III de 20 x 35 x 55 cm (Allentown Inc., Panlab S.L., Barcelona, España) con 4 animales por jaula. El ciclo de luz ha sido de 12h/12h (luz/oscuridad), con una intensidad de 270 lux. Se ha mantenido una temperatura ambiental de $21 \pm 1^\circ \text{C}$, una humedad relativa de $50 \pm 5\%$ y un sistema de ventilación de 15-20 renovaciones/h. Han sido alimentados *ad libitum* con una dieta comercial de mantenimiento en pellets con la siguiente composición: 15% proteína bruta, 4% grasa bruta, 4% celulosa bruta, 5% cenizas brutas, 12 mg/Kg CuO, 15000 UI/kg Vitamina A, 1500 UI/kg Vitamina D3 y 80mg/kg Vitamina E (R.02-E Standard Diet, Prolabor, España). El agua de bebida también se ha administrado *ad libitum* y se ha purificado por un sistema de ósmosis inversa (Edstrom Industries, Waterford, WI, USA). La monitorización microbiológica de rutina, de acuerdo a las recomendaciones de la Federación de Asociaciones Europea de Animales de Laboratorio (Federation of European Laboratory Animal Associations, FELASA), no ha revelado presencia de patógenos en ratas durante el periodo del estudio experimental.



Siguiendo las recomendaciones de FELASA, se ha supervisado en todo momento la conducta, el estrés y el bienestar de los animales. De este modo se han valorado signos fisiológicos oculares (hematoporfirina y hundimiento del globo ocular), respiratorios (estornudo, flujo nasal y frecuencia respiratoria), aspecto externo (piloerección, lordosis, deshidratación y pérdida de peso) y signos de actividad anormal (somnia, anorexia, automutilación y vocalización).

Los protocolos quirúrgicos, terapéuticos, de manejo y eutanasia en los animales, se han ajustado en todo momento a las exigencias y recomendaciones internacionales y nacionales: Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, Directiva del Consejo Europeo 86/609, Real Decreto Español 1201/2005 y la Ley 32/2007⁽¹⁴³⁾

1.2.-Salas, equipos y material inventariable

Quirófano, sala de pre y postoperatorio y laboratorio de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Dr. Negrín. Ventilador Servo-900C[®] (Siemens, Suecia). Microscopio Zeiss OPMI[®] 9-12,5x (West, Alemania). Nevera de 4 °C. Congelador Revco de -70 °C.



Fig. 13: Microscopio.

1.3.-Material quirúrgico

Paños quirúrgicos estériles, catéteres de venopunción n° 14 y 16 (Abbocath[®], Abbott, Sligo, Irlanda), cuffs (catéteres de venopunción cortados en cilindros de 3 mm, con una base de 1,5 mm y una lengüeta de 1,5 mm), sistemas de sueros, bisturís n° 22, jeringas de insulina, agujas subcutáneas e intramusculares, tijeras de Metzemaum y Mayo, pinzas de Kocher, mosquitos, pinzas de disección, pinzas de Adson, pinzas de microcirugía, tijeras de microcirugía, microclamps vasculares de 3,4 mm (Yasargil[®], Medicom, Alemania), aplicador de microclamps, portaagujas, suturas de Vycril[®] (Johnson and Johnson, Madrid, España) y seda 3/0, ligaduras de Prolene[®] de 6/0 y 7/0, torundas y gasas estériles.



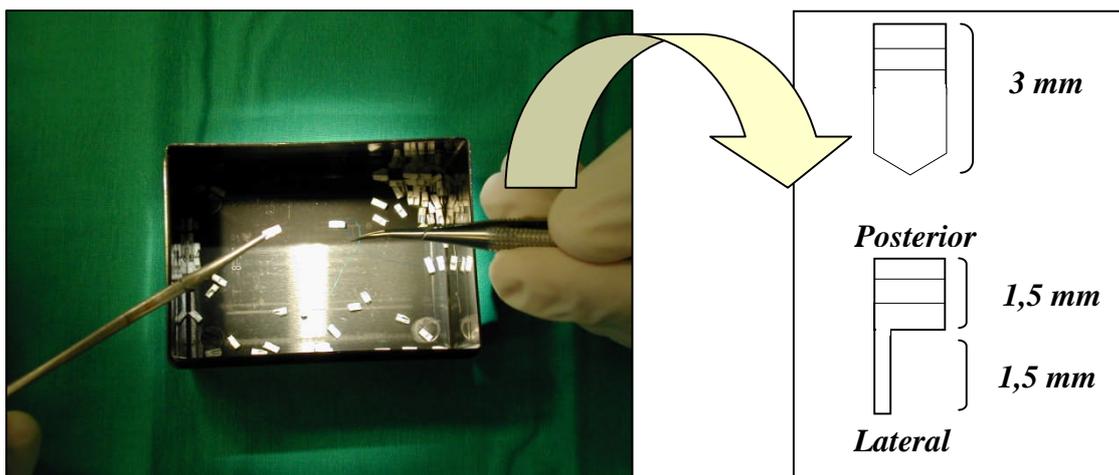


Fig. 14: Cuffs

1.4.-Medicación anestésica y analgésica

Los fármacos que se han empleado en la anestesia de los animales han sido: lidocaína 1% (Xilonibsa[®], Inibsa, Barcelona, España), medetomidina (Domtor[®], Pfizer, Madrid, España), ketamina (Ketolar 500[®], Pfizer, Madrid, España) y atropina 1% (Atropina[®], Braun, Madrid, España). El efecto de la medetomidina se ha revertido con su antagonista, el atipamezol (Antisedan[®], Pfizer, Madrid, España.) Como analgésico postoperatorio se ha empleado la buprenorfina (Buprex[®], Shering-Plug. Barcelona. España).



Fig. 15: Medicación

1.5.-Reactivos

Para purificar el RNA se usó TRI-Reagent de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El bromuro de etidio de Pierce (Rockford, IL). Para la síntesis del cDNA se usó el kit Script cDNA síntesis (BioRad). Los cebadores fueron fabricados por Thermo Electrón (www.thermo.co). Para realizar las PCRs a tiempo real se usó SYBR Green (Foster City, CA). Para los experimentos de microarrays, se usó el kit Pronto Universal Hybridization (Promega). El resto de reactivos procedían de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

2 MÉTODO

2.1.-Diseño del estudio

Se diseñó un estudio de experimentación animal con un total de 25 ratas SD. Los animales se han distribuido en 2 grupos: a) un grupo control (n=5) al que se le extrajo muestras de pulmón sano y b) un grupo problema (n=20, 10 donantes y 10 receptores) al que se le realizó un trasplante pulmonar unilateral izquierdo con técnica microquirúrgica de cuffs ⁽¹⁴³⁾. A ninguno de los animales se les administró inmunosupresores ni antibióticos postoperatorios para no interferir con los resultados del estudio.

2.1.1.-Diseño de los microarrays.

Las muestras problema procedían de tres animales trasplantados y sacrificados a los tres meses del trasplante. El nivel de expresión diferencial en estos pulmones trasplantados se comparó, en tres chips con muestras independientes, usando siempre el mismo RNA de referencia. Este RNA de referencia se obtuvo de pulmones sanos procedentes de animales de la misma edad y sexo.

2.2.-Técnica quirúrgica

2.2.1.-Extracción del pulmón donante

El animal donante ha sido sometido a anestesia general con tiopental sódico (60 mg/kg) intraperitoneal (ip.). Una vez anestesiado se ha rasurado la parte anterior del tórax, se ha realizado una intubación orotraqueal y se ha ventilado al animal con una presión inspiratoria de 12-14 cmH₂O con una relación inspiratoria /expiratoria (I/E) de 1:2, 60 rpm, una fracción inspirada de oxígeno (FiO₂) de 0.21 y una presión positiva al final de la espiración (PEEP) de 2 cm de H₂O.

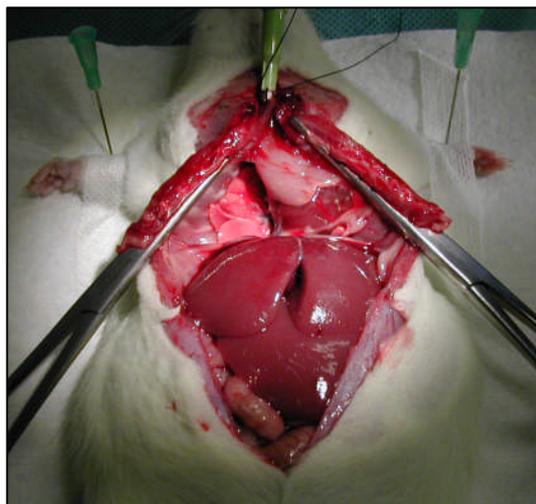


Fig. 16: Esterno-laparotomía media



Con la rata en decúbito supino se ha realizado una laparotomía media e inmediatamente se han inyectado 300 UI/100g de heparina sódica en la vena cava inferior. A continuación se ha realizado una esternotomía media y se ha abierto el tórax ampliamente con dos pinzas de Kocher.

Se ha procedido a la sección del timo y a continuación de la aorta abdominal, de la vena cava caudal torácica, de la aurícula izquierda y derecha. Mediante la sección del cono de la arteria pulmonar y con un Abbocath® nº 16 ó 18, se han perfundido los pulmones con suero fisiológico a 4 °C. Si la perfusión ha sido homogénea se ha procedido a la ligadura y sección de la tráquea con el pulmón en semi-insuflación y a la extracción del bloque cardiopulmonar mediante tracción, separándolo del esófago, con sección de los troncos supraaórticos, aorta, venas cavas y ligamento pulmonar.

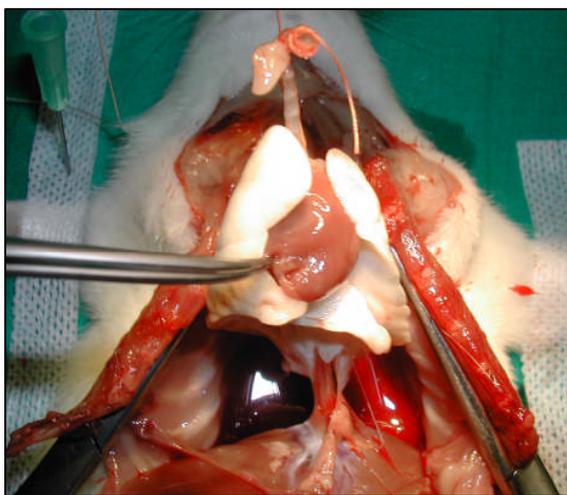


Fig. 17: Extracción del bloque cardiopulmonar

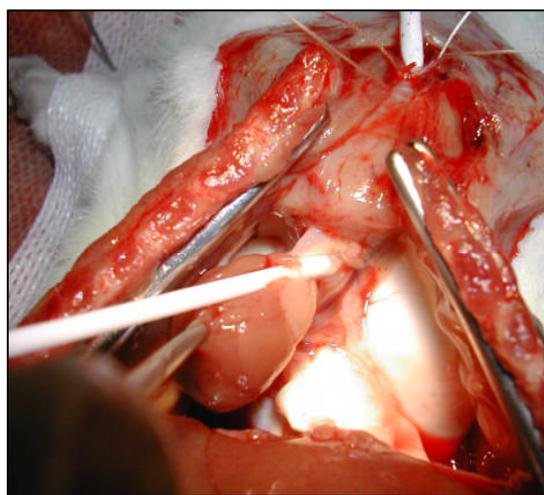


Fig. 18: Perfusión a través de la arteria pulmonar

Una vez que se ha extraído el bloque, con microscopio, se ha procedido a la disección de la arteria, vena y bronquio izquierdos con sección distal al hilio de los mismos y separación del pulmón izquierdo, pinzando el bronquio con un pinza microvascular para mantener el pulmón en semi-insuflación.

En esos momentos se ha procedido a la colocación de los “cuffs” y finalmente al almacenamiento del pulmón a 4 °C en suero fisiológico frío hasta el momento del implante.

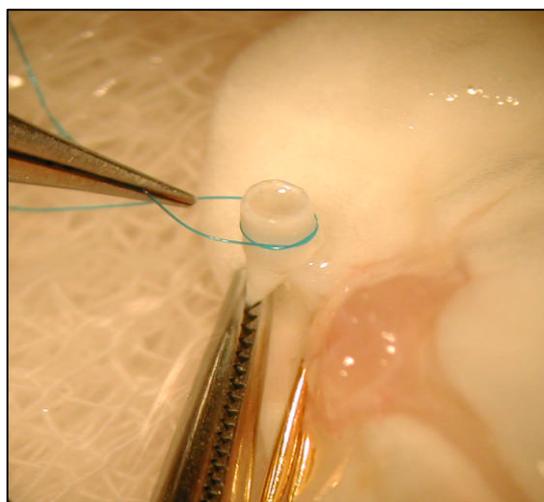


Fig. 19: colocación de cuffs



Fig. 20: Almacenamiento a 4°C

2.2.2.-Implante en el receptor

En esta fase el animal receptor ha sido sometido a anestesia general con medetomidina (0,5 mg/kg) sc., ketamina (75 mg/kg) ip. y atropina (0,04 mg/kg) im. Una vez anestesiado, se ha rasurado el hemitórax izquierdo, se ha procedido a realizar la IOT y se ha ventilado al animal con los mismos parámetros que en la extracción.

Se ha colocado al animal en decúbito lateral derecho y se ha realizado una toracotomía posterolateral izquierda sobre el 4º espacio intercostal. Se ha utilizado como separador torácico un blefarostato, por un corte próximo al pulmón se ha realizado un pequeño ojal en la cavidad torácica y se le ha colocado un clip de hojas, que ha servido de tracción. A continuación se ha cauterizado una arteriola próxima a la vena pulmonar y el plexo arteriolar peribronquial.

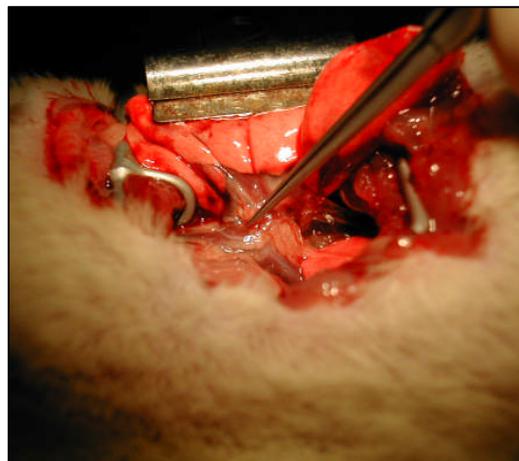


Fig. 21: Cauterización del plexo peribronquial

Se ha procedido a la disección del hilio pulmonar con identificación de la arteria, bronquio y vena pulmonar. Se han colocado ligaduras y pinzas microvasculares, próximas al corazón, a cada una de ellas. Se han seccionado, próximas al pulmón, la arteria y la vena y se han lavado intravascularmente con suero heparinizado.

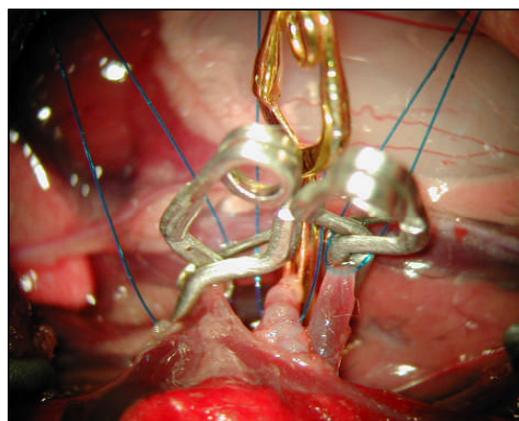


Fig. 22: Hilio pulmonar disecado

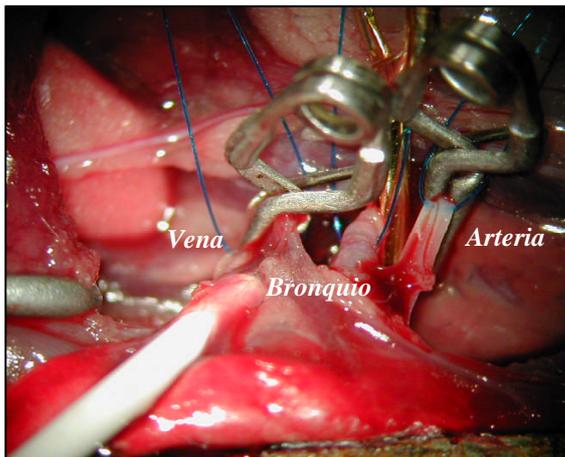


Fig. 23: Lavado intravascular de la vena

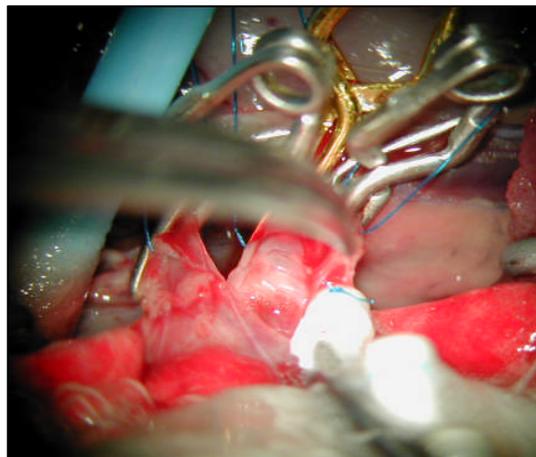


Fig. 24: Introducción del cuff en la arteria

Posteriormente, se ha realizado la misma operación en el bronquio y se ha procedido a realizar las anastomosis mediante la introducción de los cuffs dentro de cada una de las estructuras correspondientes. Se ha mantenido la posición del cuff con una pinza microvascular que se ha colocado perpendicular a la lengüeta y se han fijado las anastomosis anudando sobre ellas con las ligaduras.

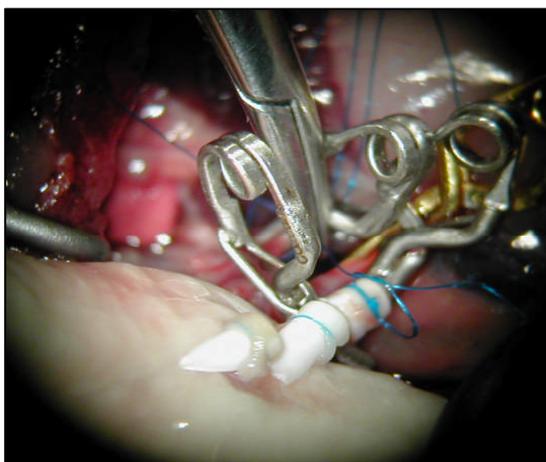


Fig. 25: Fijación de la anastomosis arterial

Finalmente, se ha reperfundido lentamente abriendo la pinza de la vena, a continuación el bronquio para ventilar el pulmón y eliminar las atelectasias y en último lugar, de forma lenta y progresiva la pinza de la arteria.



Fig. 26: Reperfundición del injerto pulmonar



Fig. 27: Aspecto final del implante pulmonar

Una vez que se ha reperfundido y ventilado el pulmón implantado, se ha introducido dentro de la cavidad pleural. Se ha procedido a la sección del pulmón nativo del receptor y se ha retirado el separador torácico.

Se ha colocado un drenaje pleural de pequeño calibre (Pleurecath®) conectado a una jeringa, se ha secado con torundas el líquido de la cavidad y se ha efectuado el cierre de la toracotomía. Una vez cerrada la piel se le ha administrado al animal atipamezol y buprenorfina (0,05mg/kg). Se ha aspirado a través de la jeringa conectada al drenaje para devolver a la cavidad pleural su presión negativa y cuando el animal ha presentado respiración espontánea se ha retirado el drenaje.

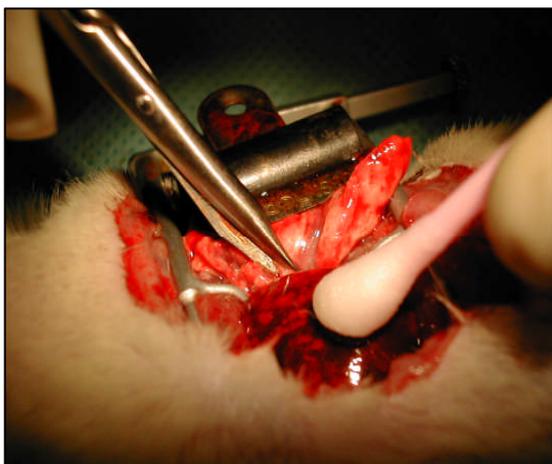


Fig. 28: Sección del pulmón nativo

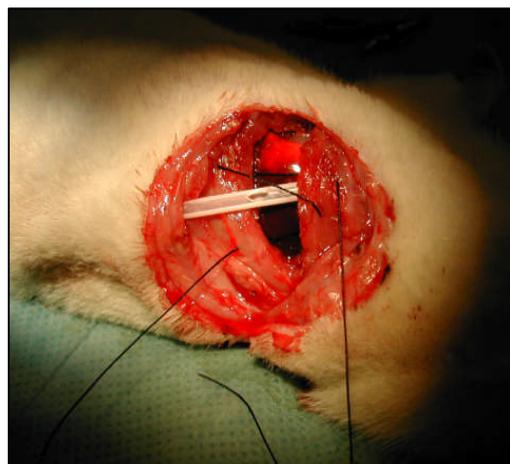


Fig. 29: Drenaje pleural y cierre de la toracotomía

2.3.-Obtención y procesamiento de las muestras

2.3.1.-Sacrificio del animal trasplantado

El sacrificio de los animales trasplantados se ha realizado a los 3 meses del implante. Para ello el receptor ha sido sometido a anestesia general profunda con los mismos protocolo anestésico que para el trasplante. Una vez anestesiado se ha rasurado la parte anterior del tórax, se ha realizado una traqueostomía y se ha ventilado al animal con el mismo VC y FR que en la extracción e implante.

Con la rata en decúbito supino se ha realizado una laparo-esternotomía media y se ha abierto el tórax ampliamente con dos pinzas de Kocher. Se ha seccionado el timo y se ha elevado el lóbulo superior derecho mediante tracción con un clip de hojas, para disecar la arteria pulmonar y el bronquio principal derechos, que se han

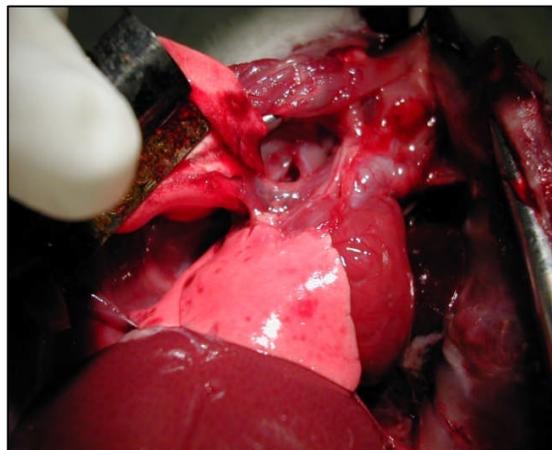


Fig. 30: Pulmón trasplantado atelectásico

pinzado con una pinza microvascular. En estos momentos, se ha disminuido el VC a 0,5 ml/100g y se ha aumentado la FR a 100 rpm. De esta forma, el gasto cardiaco y la ventilación se han dirigido exclusivamente al pulmón izquierdo, que ha presentado un mayor o menor grado de atelectasia en el momento de la extracción.

A los 5 min, se ha seccionado la aorta abdominal y se ha ligado la tráquea con el pulmón en semi-insuflación. Tras la parada cardiorrespiratoria, se ha extraído el bloque cardiopulmonar de forma similar a como se ha hecho en la extracción pulmonar del donante. Una muestra del pulmón se ha congelado en N₂ líquido y almacenado a -80°C hasta su uso. Posteriormente, se ha perfundido a través de la tráquea con formaldehído al 1%, para ser finalmente almacenado en un bote con el mismo conservante.

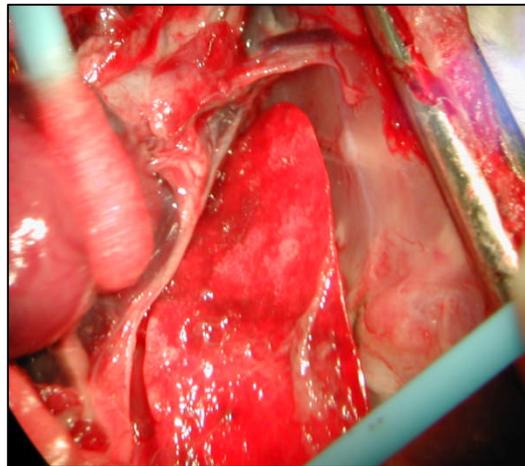


Fig. 31: Pulmón trasplantado reperfundido

2.4.-Mediciones

2.4.1.-Respuesta clínica al trasplante

Se ha valorado la presencia de hemoptisis, insuficiencia respiratoria y, si se ha producido el fallecimiento antes del periodo de sacrificio, considerando el momento y posible causa de la muerte.

2.4.2.-Determinaciones histológicas

Se han realizado con el fin de determinar el grado de lesión pulmonar existente, mediante técnicas anatomopatológicas convencionales: tinción de hematoxilina-eosina y microscopia óptica. Se ha determinado la presencia de edema pulmonar, congestión vascular, hemorragia alveolar y signos de reacción pleural que se han clasificado en ausente, leve, moderado y severo. El grado rechazo se ha determinado según la clasificación internacional del rechazo pulmonar postrasplante en grado 0 (ausencia de rechazo), grado 1 (muy leve), grado 2 (leve), grado 3 (moderado) y grado 4 (severo), según la presencia de infiltrado mononuclear peribronquial y perivascular.

2.4.3.-Determinaciones de la apoptosis

Se han realizado con el fin de valorar la presencia y el grado de muerte celular programada relacionada con el rechazo crónico pulmonar. Para ello se ha determinado



la presencia de la misma mediante tinción inmunohistoquímica de las muestras de pulmón trasplantado con los marcadores Caspasa 3, Bax y Bcl2 (Genscript, UK). El grado de apoptosis se ha clasificado en leve (+), moderado (++) y severo (+++) según la intensidad del marcaje inmunohistoquímico.

2.4.4.-Determinaciones genómicas

2.4.4.1.- Extracción de RNA y síntesis de cDNA

La homogenización de las muestras congeladas se ha realizado en Tri-Reagent (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) en frío con un homogenizador Polytron PT-3100 (Kinematica AG, Basel, Suiza) y un vástago PT-DA 3012/2T (Kinematica AG, Basel, Suiza). Se han aplicado 28000 rpm durante 30 segundos y se ha comprobado la total desintegración del tejido.

En la extracción del RNA total con Tri-Reagent se han seguido las instrucciones del fabricante excepto en la primera precipitación, donde en lugar usar $\frac{1}{2}$ Isopropanol por unidad de volumen inicial de Tri-Reagent, se ha añadido $\frac{1}{4}$ de Citrato Na/NaCl y $\frac{1}{4}$ de Isopropanol por unidad de volumen inicial de Tri-Reagent. El método de aislamiento del RNA con el reactivo Tri-Reagent se basa en una modificación comercial del método clásico descrito por Chomczynski y Sacchi ⁽¹⁴⁴⁾.

Una vez se ha obtenido el RNA, se ha determinado su pureza química (ratio 28S/18S), se ha realizado la tinción con bromuro de etidio y electroforesis desnaturizante en gel de agarosa (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA).

Las muestras de RNA han sido tratadas con 2 μ l de RQ1 DNase (1U/ μ l, Promega, Madison, WI) para eliminar la posible contaminación de DNA. Para la síntesis del cDNA, se usó el kit Script cDNA síntesis (BioRad). Se mezclaron 2 μ g de RNA total con 4 μ l 5x de la mezcla de reacción conteniendo “random primers” y la transcriptasa reversa en un volumen final de 20 μ l. La mezcla se mantenía durante 5 minutos a 25°C para permitir el correcto anillamiento de los cebadores y durante 1 hora a 42°C para producirse la extensión. Finalmente las muestras se han mantenido a 80°C durante 15 minutos con el propósito de inactivar la transcriptasa reversa para que no interfiriera en la PCR.

2.4.4.2.- Determinación de la expresión genómica mediante qRT-PCR

Se ha determinado la expresión de Socs2, Socs3, IGF-1, MCP-1, TGFB-1, Col4a, Fn1 y Ctgf. Se ha utilizado un termociclador de capilares LightCycler® 1.5 (Roche, Mannheim, Alemania), con el kit “LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I” (Roche, Cat. No. 12 239 264 001) y el software de Lightcycler 3. 5. 3. y se han



seguido las instrucciones del fabricante. Los cebadores que se han usado para cada uno de los genes del estudio han sido diseñados utilizando el software online “Primer3” (<http://frodo.wi.mit.edu/>) y posteriormente se han optimizado con la temperatura de anillado y la concentración de MgCl₂. La especificidad de los cebadores ha sido comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa, se ha observado que generaba una banda del tamaño esperado. El fragmento amplificado se ha analizado mediante una curva de *melting* que permite la identificación y diferenciación de las variantes genéticas.

Los cebadores específicos que se han empleado y las condiciones de la qRT-PCR en tiempo real han sido recogidos en la tabla VIII. Los resultados han sido corregidos mediante el gen Polr2a1 (RNA polimerasa II subunidad a) como housekeeping gene⁽¹⁴⁵⁾.

<i>Tabla VIII: Condiciones de la PCR en tiempo real</i>					
<i>Gen</i>	<i>Numero</i>	<i>Descripción</i>	<i>Prime Foward</i>	<i>Prime Reverse</i>	<i>Tamaño (bp)</i>
<i>Polr2a</i>	XM_343922	<i>RNA polimerasa II polipetido A</i>	CAGGCAAGC AAATCTTCTC C	ACCAGAGAGCC TGCTGATGT	199
<i>IGF-1</i>	NM_00108247 9	<i>Factor de crecimiento ligado a insulina 1</i>	TCTGAGGAG GCTGGAGAT GT	GTTCCGATGTTT TGCAGGTT	240
<i>TGFB-1</i>	NM_021578	<i>Factor de transformación de crecimiento, beta 1</i>	TGAGTGGCT GTCTTTTGAC G	TGGGAGTGATC CCATTGATT	146
<i>Col4a1</i>		<i>Colágeno IV alfa1</i>	GCCAAGTGT GCATGAGAA GA	AGCGGGGTGTG TTAGTTACG	
<i>Socs2</i>	NM_058208	<i>Señalador de supresor de citoquina 2</i>	GACGGGAAA TTCAGATTGG A	AATGCTGAGTC GGCAGAAAGT	213
<i>Socs3</i>	NM_053565	<i>Señalador de supresor de citoquina 3</i>	CCTTTGAGG TTCAGGAGC AG	CGTTGACAGTCT TCCGACAA	165
<i>MCP-1</i>	NM_031530	<i>Proteína quimiotáctica de Monocito-1.</i>	CAGTTAATGC CCCCTCAC C	TTCCTTATTGGG GTCAGCAC	164
<i>Fn1</i>		<i>Fibronectina 1</i>	GTGGCTGCC TTCAACTTCT C	AGTCCTTTAGG GCGGTCAAT	
<i>Ctgf</i>		<i>Factor de crecimiento de tejido conectivo</i>	AGACCTGTG CCTGCCATTA C	ACTTCGGTGGG GTGTTTTTC	242



2.4.4.3.- Fabricación de los microarrays

Los microarrays fueron fabricados en el KTH Microarray Center (Suecia) (www.biotech.kth.se). Para estos experimentos se usaron chips que contenían unos 27000 oligos representando unos 24000 genes de *Rattus Norvegicus*.

2.5.- *Análisis de imagen, normalización y estadística*

2.5.1.- *Microarrays*

Las imágenes de microarrays se analizaron utilizando el paquete informático GenePix Pro 6.0 software (Axon Instruments, Union City, CA) mediante la utilidad automática y manual. Los ratio Cy5/Cy3 han sido normalizados utilizando el método de selección para aumentar el rango de intensidad-dependiente y disminuir el rango de mediciones de algunos artefactos a través de metodología de SMA (Statistics for Microarray) (www.bioconductor.org). Se determinó la diferencia expresada de los genes utilizando la paquetería SAM, una técnica estadística con la que han sido evaluados de manera similar al termino estadístico P realizando una medición con el false discovery rate (FDR) donde la mínima de expresión era considerada como significante.

A los genes identificados como regulados por SAM se le añadió un punto de corte basado en un nivel de regulación, el 1.5 (50%) (\log_2 ratio treated/untreated \geq |0.59|) del pulmón trasplantado y se clasificaron por su funcionalidad y forma individual y se agruparon utilizando la utilidad DAVID (Database for Annotation and Visualisation and Integrated Discovery: [http:// www.david.abcc.ncifcr.gov](http://www.david.abcc.ncifcr.gov)).

2.5.2.- *Real Time PCR / Análisis estadístico*

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS0 (2005, SPSS Inc. Illinois USA) la versión 15.0. El nivel de significación estadística se estableció para una $\alpha=0.05$. Desde el punto de vista descriptivo, las variables cuantitativas se muestran como media aritmética y desviación típica o como mediana con máximo y mínimo. Las variables cualitativas se trataron analizando la frecuencia absoluta de la aparición de cada una de las categorías así como las frecuencias relativas. Para comparar las diferencias de medias se utilizó la U de Mann Whitney.



Resultados



1.-Evolución clínica postoperatoria

Dos de los animales trasplantados 2 fallecieron antes del sacrificio a los 3 meses, uno por insuficiencia respiratoria y hemoptisis a las 72 horas del trasplante debido a un infarto pulmonar masivo y otro a los 7 días del mismo sin que pudiéramos identificar macroscópicamente la causa de la muerte, por lo que han sido eliminados del estudio. El resto de los animales trasplantados (8) fueron presentando una buena evolución postoperatoria. No se observaron dehiscencias ni infecciones de la herida quirúrgica en ninguno de los animales.

En la tabla IX, se expresan los tiempos de la *extracción* (desde el inicio de la cirugía en el donante hasta el momento de la extracción del bloque cardiopulmonar), *de banco* (desde la extracción del bloque cardiopulmonar hasta finalizar la colocación de los cuffs), *del implante* (desde el inicio de la cirugía en el receptor hasta finalizar el cierre de la toracotomía) y *de isquemia del injerto* (desde el momento de clampaje de la aorta torácica durante la extracción hasta el momento de la reperfusión arterial del injerto en el receptor).

<i>Tabla IX: Tiempos invertidos en la realización de los TP experimentales</i>	
Tiempos	Media \pm SD en minutos
Tiempo de extracción	40,25 \pm 14,78
Tiempo de banco	33,13 \pm 6,51
Tiempo de implante	101,25 \pm 33,03
Tiempo de isquemia	300,63 \pm 52,40

La alta variabilidad observada en el tiempo de isquemia pulmonar se debió a tiempos de implante pulmonar más largos debido a dificultades técnicas en la realización del implante en dos animales. Un caso por dificultades en la ejecución de la anastomosis venosa dada la tendencia al desgarro de la pared superior de la vena pulmonar del receptor y en otro caso por la necesidad de deshacer y volver a rehacer la anastomosis arterial debido a una rotación de la arteria pulmonar donante que paso desapercibida en el momento del su implante, ambas se resolvieron satisfactoriamente obteniendo un trasplante adecuado y funcional.

2.-Determinaciones histológicas

En todos los pulmones trasplantados se observaron los mismos hallazgos macroscópicos durante la necropsia. En concreto, observamos una desaparición de la morfología y función ventilatoria, apreciándose un muñón fibrótico. Se observaban las anastomosis con cuffs que ocupaba la mitad de la cavidad pleural izquierda, además de un crecimiento compensador del pulmón no trasplantado que alcanzaba la cavidad



pleural izquierda conservando un aspecto normal. Al corte de ese muñón se han apreciado unas cavidades quísticas con contenido mucoso de coloración amarillo-verdosa.

El estudio microscópico también mostró hallazgos similares en todos los pulmones trasplantados. En concreto, observamos una desaparición del parénquima pulmonar y persistencia de los bronquios y bronquiolos dilatados y rodeados de manguitos de células linfoplasmocitarias. Esto, estaba acompañado de una intensa vasculitis característica de un cuadro de RC severo. En el pulmón no trasplantado no se observaron signos de afectación pulmonar, solo en 1 caso que mostraba un infiltrado linfocitario peribronquial leve.

En la tabla X, se muestran los hallazgos microscópicos que han sido evaluados en los pulmones trasplantados.

<i>Tabla X: Hallazgos histológicos con hematoxilina-eosina</i>					
<i>Grupo</i>	<i>Edema</i>	<i>Congestión</i>	<i>Hemorragia</i>	<i>Reacción</i>	
				<i>Pleural</i>	<i>Rechazo</i>
<i>R 1</i>	no	no	no	no	grado 4
<i>R 2</i>	no	no	no	no	grado 4
<i>R 3</i>	no	no	no	no	grado 4
<i>R 4</i>	no	no	no	no	grado 4
<i>R 5</i>	no	no	no	no	grado 4
<i>R 6</i>	no	no	no	no	grado 4
<i>R 7</i>	no	no	no	no	grado 4
<i>R 8</i>	no	no	no	no	grado 4

En las siguientes figuras se muestran algunos de los hallazgos histológicos descritos en el pulmón trasplantado.

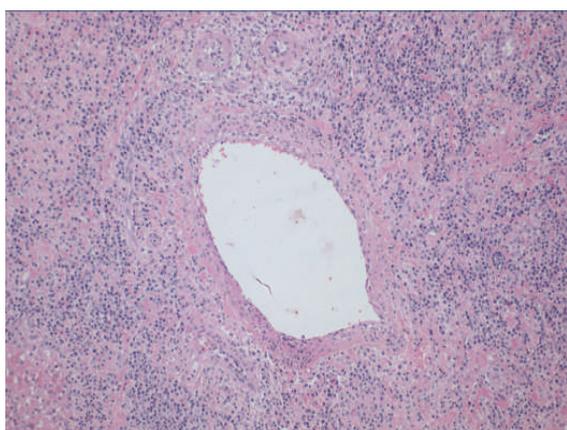


Fig.32: Infiltrado linfoplasmocitario perivascular

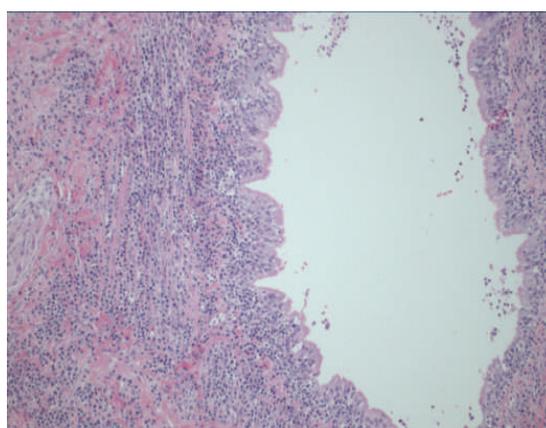


Fig. 33: Manguitos linfoplasmocitarios peribronquiales

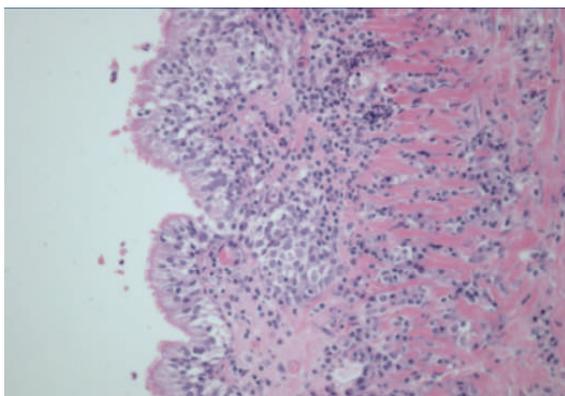


Fig.34: Infiltrado linfoplasmocitario en el espesor de la pared bronquial perivascular

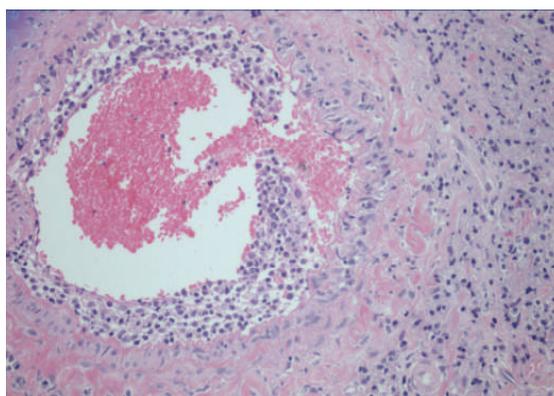


Fig.35: Manguito linfocitario perivascular e intensa endotelitis

3.-Determinación de la apoptosis

En la tabla XI se muestran los resultados del estudio inmunohistoquímico del pulmón trasplantado. En concreto, se detectaron células con marcadores positivos para Bax, Bcl2 y Caspasa 3. Estos marcadores se localizaban en los manguitos peribronquiales, perivasculars y en las células endoteliales donde se observan los hallazgos histológicos de rechazo crónico. En los animales controles no se ha observado marcaje celular positivo con estos marcadores.

<i>Tabla XI: Marcadores de apoptosis en los pulmones con rechazo crónico</i>			
Grupo	Bax	Bcl2	Caspasa 3
R 1	++	++	++
R 2	++	++	++
R 3	+++	+++	+++
R 4	+++	+++	+++
R 5	++	++	++
R 6	++	++	++
R 7	++	++	++
R 8	++	++	++

A continuación se muestran algunas imágenes representativas de la apoptosis realizada en los pulmones trasplantados:

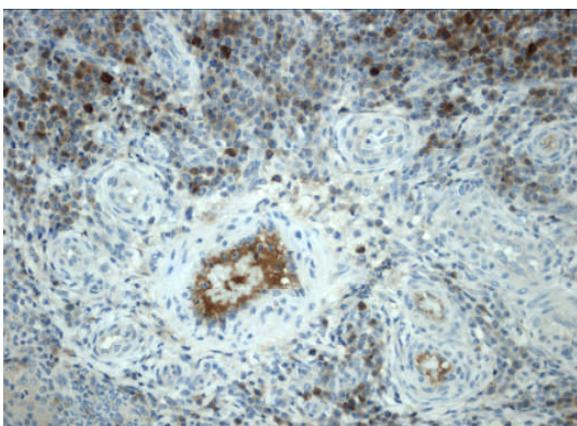


Fig.36: BCL2 células endoteliales y linfoides positivas

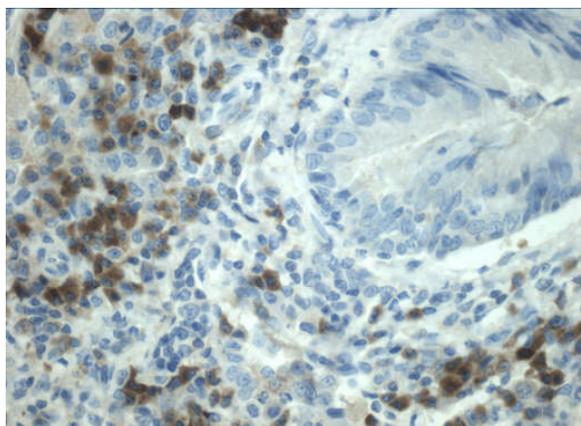


Fig.37: Caspasa células linfoides peribronquiales positivas



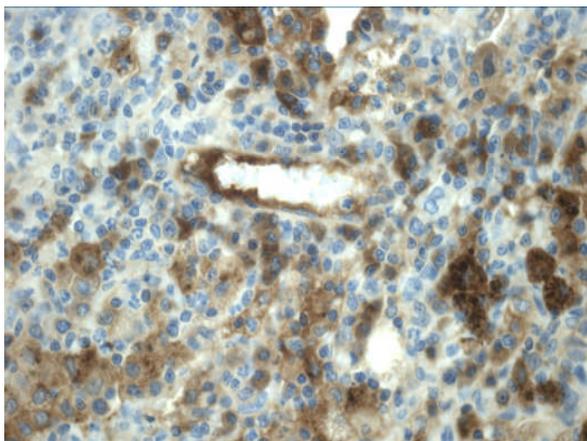


Fig.38: BCL2 células endoteliales y linfoides perivasculares positivas

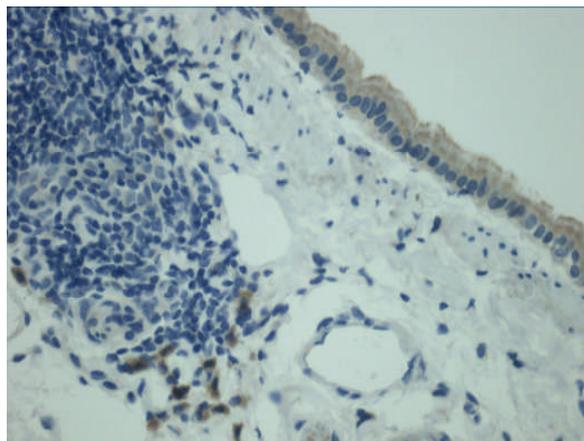


Fig.39: BCL2 acúmulo linfoide peribronquial con aisladas células positivas

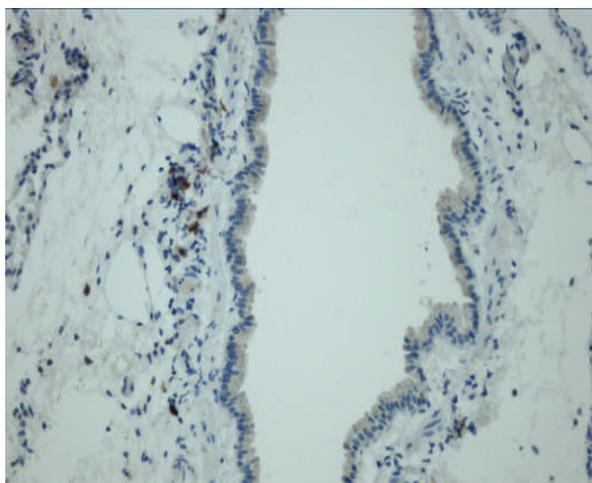


Fig.40: Caspasa con células positivas aisladas bronquiales

4.-Análisis de los cambios en la expresión de genes

4.1.-Microarrays

-Identificación de los cambios globales de expresión de genes en el pulmón trasplantado en respuesta al RC.

En primer lugar, se identificaron los genes diferencialmente expresados en el pulmón trasplantado con respecto al tejido pulmonar intacto. Después de realizada la normalización ⁽¹⁴⁶⁾ de los tres chips tal como se describió en la sección de Material y Métodos, se utilizó un primer criterio de filtración basado en el número de sondas detectadas en los replicados biológicos. Se seleccionaron sólo las sondas que detectadas en al menos 2 de los 3 chips analizados y el resto se consideraron sin significado y se eliminaron del análisis. Las 4.413 sondas que pasaron este filtro se analizaron usando el test estadístico “one class” del programa SAM (4) y se identificaron como genes regulados sólo aquellos con un valor de FDR < 10%. Con este análisis obtuvimos una

lista de 1.869 genes que estaban regulados diferencialmente ($q < 10\%$) en respuesta al rechazo crónico en el pulmón trasplantado (Anexo: tabla 1).

Cuando al criterio de selección $FDR < 10\%$ se le añadió un segundo criterio de filtración basado en el nivel de ratio de expresión (pulmón trasplantado/pulmón sano) de $\log_2 > |0.56|$ (50% de cambio), se obtuvo la lista restringida a 713 genes regulados en el pulmón trasplantado. De los 713 genes, 326 incrementan su nivel de expresión con respecto al pulmón sano en más del 50% (Anexo: tabla 2), mientras que 387 (Anexo: tabla 3) lo reducían en la misma proporción. Los cambios de expresión (mediana; \log_2) a los largo de 3 hibridaciones independientes fueron de 0,78 (rango: 0,56 a 3,25) y -0.74 (rango: -3,68 a -0,56) para los genes inducidos o reprimidos, respectivamente (Figura 41).

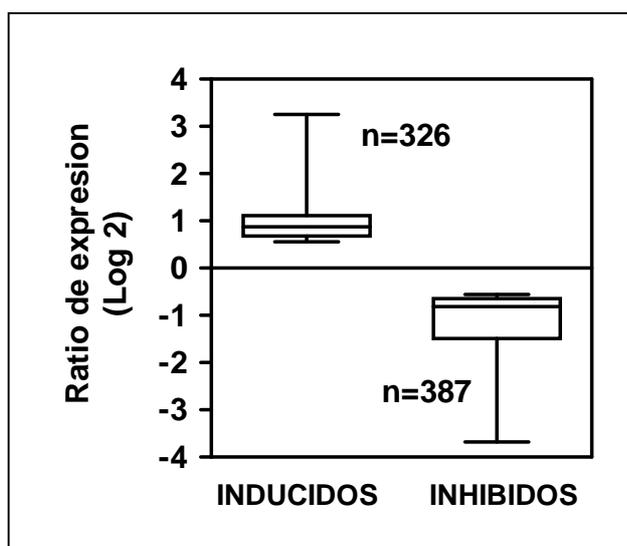


Fig.41: genes regulados e inhibidos

-Identificación de las categorías funcionales (GO) y vías de señalización (KEGG) más representadas en el conjunto de genes regulados en el pulmón trasplantado en respuesta al RC.

A continuación se utilizó la herramienta DAVID para identificar las anotaciones biológicas (entre miles de términos GO relacionados) significativamente asociadas con los genes regulados por el RC al trasplante pulmonar. Este análisis trabaja con la premisa de que un valor de P bajo, para una clase GO determinada, no implica que todos los genes de esa clase estén significativamente alterados. El razonamiento para incluir a genes que manifiestan un cambio moderado en sus niveles de expresión, se basa en el concepto de que esos genes pueden ser altamente relevantes a la función biológica asociada al RC cuando los situamos en un contexto amplio de muchos genes que interactúan entre ellos. Por este motivo, en este análisis se han utilizado todos los genes con un $FDR < 10\%$ sin aplicar el criterio de filtración basado en un nivel de regulación predeterminado ($\log_2 > |0.56|$ o 50% de cambio). Hay que resaltar que este análisis clasifica a los genes analizados en grupos funcionalmente relacionados sobre la base de los términos GO comunes y no sólo por su nombre individual.



Un primer análisis de las clases GO asociadas con todos los genes regulados por el RC del pulmón trasplantado nos permite visualizar a muchos procesos biológicos relevantes para este modelo experimental (anexo: tabla 4). En concreto, podemos destacar los siguientes: “antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC”, “apoptosis”, “cell mediated immunity”, “cell development”, “cell proliferation”, “chemotaxis”, “growth”, “immunoglobulin mediated immune response”, “lung development”, “muscle development”, “regulation of signal transduction”, “response to stress”, entre otras. La tabla 5 (anexo: tabla 5), nos muestra que la categoría KEGG (pathway) más representada corresponde con “ribosome” lo que sugiere una elevada actividad ribosomal en las células del tejido analizado. Este mismo análisis se efectuó de forma independiente sobre el conjunto de genes inducidos o inhibidos.

Entre los genes inducidos (anexo: tabla 6), destaca una elevada representación de categorías GO como “cellular development”, “biological regulation” o “response to stress”. La tabla 7 (anexo: tabla 7) nos muestra que la categoría KEGG (pathway) “ribosome” (véase figura 1 y listado de la tabla 8 del anexo) es la más representada entre los genes inducidos.

Entre los genes inhibidos (anexo: tabla 9) destaca también una elevada representación de la categoría “response to stress” junto a “antigen processing and presentation”, o “immune response” entre otras. La tabla 10 (anexo: tabla 10) nos muestra que, precisamente, la categoría KEGG (pathway) “antigen processing and presentation” (véase figura 2 y listado en tabla 11 del anexo) es la más representada entre los genes inducidos.

Es interesante destacar que los procesos biológicos GO relacionados con la respuesta al estrés están ampliamente representados tanto entre los genes inducidos (anexo: tabla 12) como entre los inhibidos (anexo: tabla 13) lo cual sugiere que es un evento de extrema importancia dentro de la fisiopatología del RC.

4.2.-Real Time PCR

En la tabla XII se muestra los resultados de los genes analizados por RTPCR en del pulmón trasplantado. Los datos han sido normalizados en función de la Polr2a y estandarizados según la media o mediana del grupo control por lo que se presentan como cambios relativos en relación al mismo. Todos los datos se han expresado en función de la media y su desviación típica, excepto Socs2 que se ha expresado como los valores de la mediana con su máximo y mínimo dada la dispersión del grupo control. El valor de “p” estima las diferencias entre el grupo control y el trasplantado mediante el test de la U de Mann-Whitney.

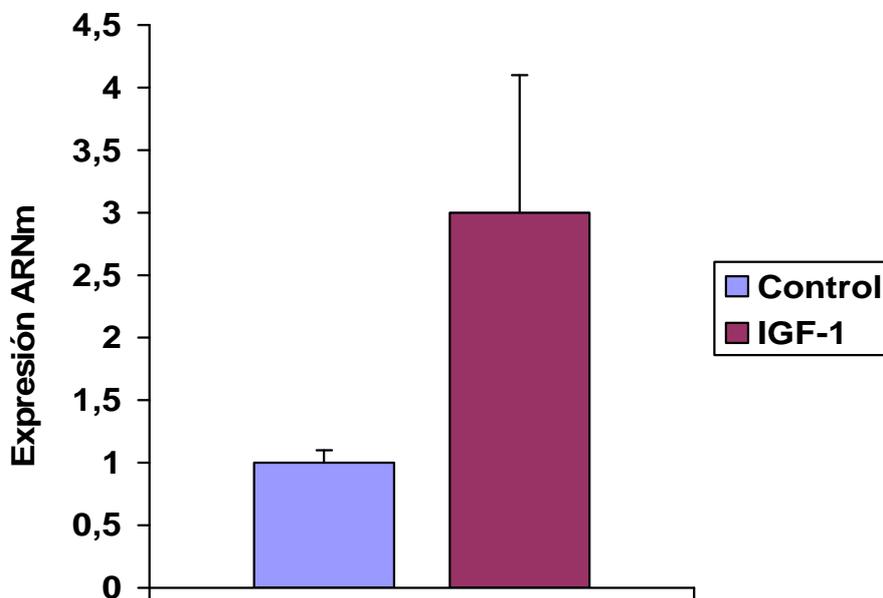


<i>Tabla XII: expresión génica del pulmón trasplantado</i>			
<i>Genes</i>	<i>Control</i>	<i>Trasplantado</i>	<i>P</i>
<i>Socs2*</i>	1,07(0,74-3,58)	1,47(0,75-3,49)	0,624
<i>Socs3</i>	1 ± 0,36	3,56 ± 2,79	0,327
<i>IGF-1</i>	1 ± 0,10	3 ± 1,11	0,014
<i>MCP-1</i>	1 ± 0,40	25,9 ± 23,9	0,014
<i>TGFB-1</i>	1 ± 0,37	3,10 ± 0,61	0,021
<i>Col4a1</i>	1 ± 0,29	1,60 ± 0,70	0,142
<i>Fnl</i>	1,03 ± 0,64	2,37 ± 1,84	0,221
<i>Ctgf</i>	1 ± 0,14	0,60 ± 0,76	0,142

*mediana, máximo y mínimo

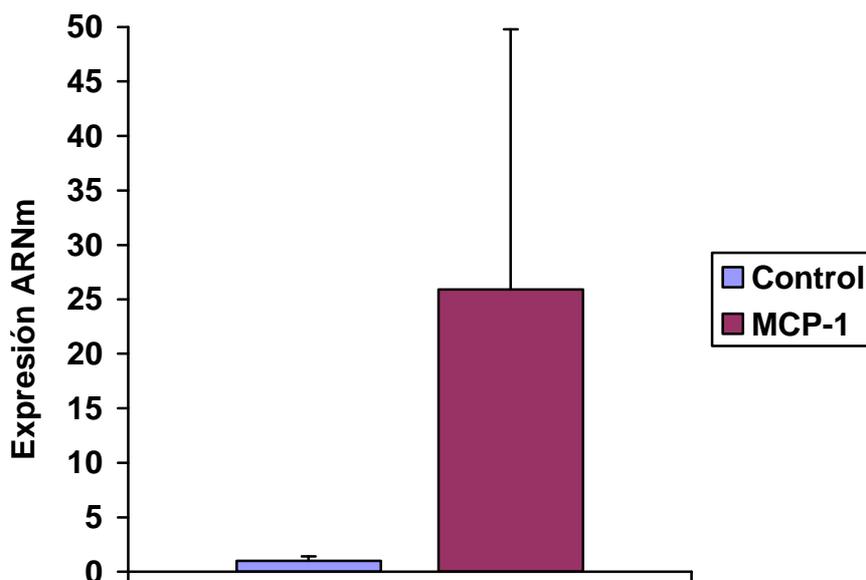
En el pulmón trasplantado se detectó un aumento significativo en los niveles de expresión de todos los genes IGF-1, MCP-1 y TGFB-1 tiene además significación estadística, de forma que MCP-1 incrementó su nivel de expresión 25 veces más en el RC.

A continuación se muestra gráficamente la expresión de los genes con significación estadística.

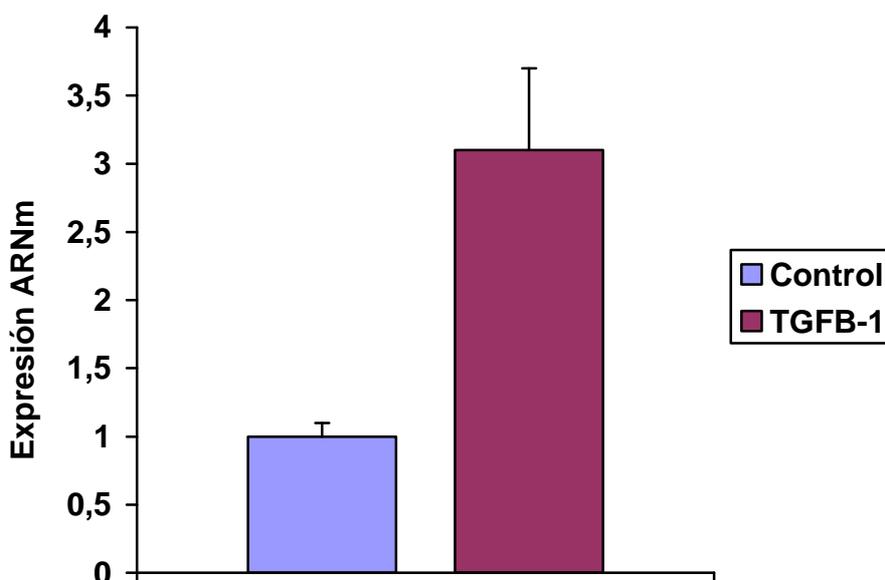


Gráfica. 1: Expresión de IGF-1 en el pulmón trasplantado





Gráfica. 2: Expresión de MCP-1 en el pulmón trasplantado



Gráfica. 3: Expresión de TGFB-1 en el pulmón trasplantado

A continuación en la tabla XIII se muestra la expresión genómica analizada del pulmón no trasplantado. Los datos han sido normalizados en función de la Polr2a y estandarizados según la media o mediana del grupo control por lo que se presentan como cambios relativos en relación al mismo. Todos los datos se han expresado en función de la media desviación típica, excepto Socs2 que se ha expresado como los valores de la mediana con su máximo y mínimo dada la dispersión del grupo control. El valor de “p” estima las diferencias entre el grupo control y el trasplantado mediante el test de la U de Mann-Whitney.

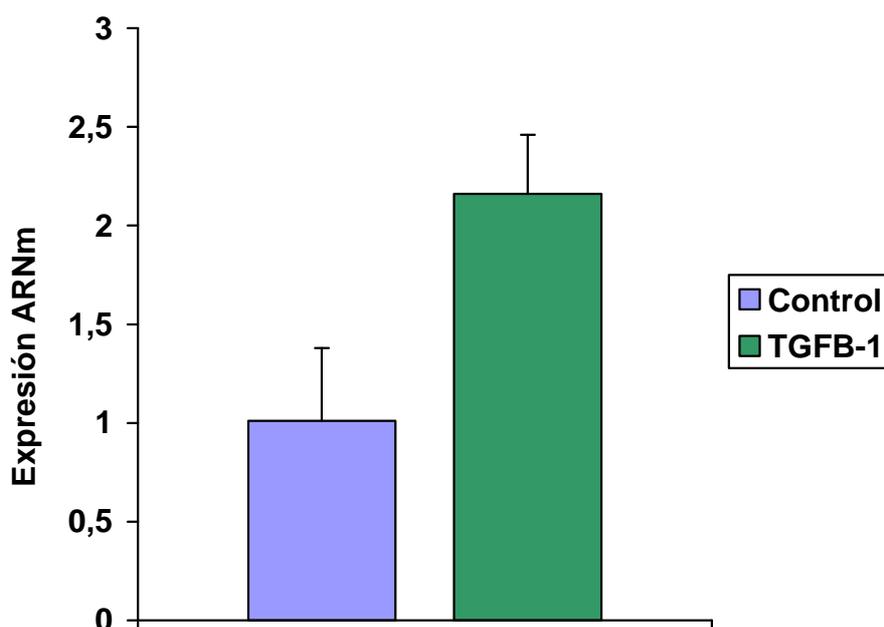


<i>Tabla XIII: expresión del pulmón no trasplantado</i>			
<i>Genes</i>	<i>Control</i>	<i>No trasplantado</i>	<i>P</i>
<i>Socs2*</i>	1,07(0,74-3,58)	1,12(0,59-3,18)	0,806
<i>Socs3</i>	1 ± 0,36	2,11 ± 1,50	0,142
<i>IGF-1</i>	1 ± 0,10	1,61 ± 1,26	0,624
<i>MCP-1</i>	1 ± 0,40	4,3 ± 5,19	0,327
<i>TGFB-1</i>	1 ± 0,37	2,16 ± 0,30	0,014
<i>Col4a1</i>	1 ± 0,29	0,93 ± 0,57	0,624
<i>Fn1</i>	1,03 ± 0,64	1,50 ± 0,76	0,462
<i>Ctgf</i>	1 ± 0,14	0,79 ± 0,88	0,462

*mediana, máximo y mínimo

Se ha observado que Socs 3, IGF-1, MCP-1 y TGFB-1 presentan un aumento de expresión en el pulmón sano con respecto a los controles y que de ellos la expresión de TGFB-1 ha sido estadísticamente significativa.

A continuación se muestra gráficamente la expresión de los genes con significación estadística.



Gráfica. 4: Expresión de TGFB-1 en pulmón no trasplantado





DISCUSIÓN



El trasplante de órganos y tejidos es un viejo sueño de la humanidad, y, probablemente sea la expresión más espectacular de la medicina reparadora: *la sustitución de un órgano enfermo por otro sano*. Es uno de los grandes logros de la Medicina del siglo veinte, teniendo en cuenta que los primeros trasplantes experimentales se realizaron durante la década de los años 50 y se convirtieron en una realidad terapéutica en los años 70. El trasplante ha llegado a revolucionar la Medicina, incorporándose a la rutina terapéutica de un número cada vez mayor de centros en casi todos los países desarrollados. Esto ha sido posible gracias a una selección de los receptores cada vez más rigurosa, a una mejor técnica quirúrgica y anestésica, a la mejora de los cuidados postoperatorios y al desarrollo de la inmunología y de la farmacología en el campo de los inmunosupresores y los antimicrobianos.

El trasplante pulmonar es una opción terapéutica aplicable en el estadio final de la patología pulmonar no maligna, que incluye afecciones de la vía aérea, del parénquima pulmonar y la circulación pulmonar. Representa una alternativa terapéutica, una vez que se han agotado los recursos médicos convencionales y el paciente tiene una esperanza de vida corta a causa de su enfermedad de base. Sin embargo, la realización y el éxito del trasplante pulmonar están limitados por múltiples factores tales como el escaso número de donantes, las infecciones, y las complicaciones inmunológicas del mismo como son el fallo primario del injerto, el rechazo agudo y el rechazo crónico que están relacionados con diferentes lesiones en el pulmón producidas antes y después del trasplante y que incluye las lesiones originadas por la isquemia y la reperfusión y los daños mediados por la respuesta del sistema inmune.

El RC como manifestación principal de las complicaciones del TP, continúa siendo el talón de Aquiles de este procedimiento terapéutico. A pesar de la acusada mejoría en la supervivencia inmediata, la supervivencia a largo plazo para los receptores de un TP sigue siendo baja en comparación con la de otros órganos sólidos debido a la alta presencia de RC, un proceso fibroproliferativo que conduce a la obliteración de la vía aérea y a la fibrosis del injerto y que es responsable de esta limitada supervivencia.

Los hallazgos histológicos presentes en el RC sugieren que existen dos procesos distintos que abocan el uno al otro. Por un lado, existe una inflamación de las estructuras bronquiolares de origen inmune y/o infeccioso que conduce a una respuesta fibroproliferativa de los bronquiolos y bronquio de la vía aérea de mayor tamaño con progresiva obstrucción, dilatación y fibrosis del injerto. La lesión del RC se considera activa si se acompaña de infiltración linfocítica peribronquiolar o inactiva si la infiltración es escasa o ausente. En nuestro estudio los cambios fibroproliferativos del pulmón trasplantado con desaparición del parénquima pulmonar y persistencia de los bronquios y bronquiolos dilatados se acompaña de infiltrados en manguito de células linfoplasmocitarias peribronquiales y perivasculares con una intensa vasculitis que indican que nos encontramos ante un rechazo crónico pulmonar severo pero activo,



objetivo fundamental a alcanzar para saber que la expresión genómica que hemos valorado corresponde realmente a esta intensa fase de cambios irreversibles del pulmón trasplantado.

Por otro lado, la activación de la respuesta inmune es un mecanismo protector muy importante pero también puede causar daño tisular en determinadas condiciones⁽¹⁴⁶⁾. Entre las respuestas del sistema inmune que están asociadas con el rechazo al trasplante está el incremento de MCP-1. Esta es una molécula con una potente actividad para reclutar células inflamatorias provocando una respuesta inmune aguda intensa que es la responsable del rechazo al trasplante. MCP-1 se sobreexpresa desde las fases iniciales de la lesión pulmonar⁽¹⁴⁷⁾ (y datos no mostrados en esta Tesis) incluyendo la LIR y el RA. En consonancia con esto, en el análisis histológico se demostró que en el RC también se observa un intenso infiltrado de mononucleares peribronquiales y perivasculares. Esto se asoció con un incremento significativo (25 veces más que en el tejido pulmonar sano) del nivel de ARNm para el gen MCP-1, lo cual sugiere que MCP-1 participa no sólo en las fases iniciales de la lesión pulmonar sino también en las fases crónicas del rechazo pulmonar⁽¹⁴⁷⁾. Algunos autores también han sugerido que MCP-1 podría tener una acción directa en la respuesta inflamatoria crónica y que su intensidad se asocia de manera directa con la disminución de la supervivencia de los pacientes trasplantados⁽¹⁴⁸⁾. De hecho, la reducción en la expresión de MCP-1 se acompaña de una menor respuesta inflamatoria durante el rechazo pulmonar y esto podría ser una parte importante de los objetivos de los protocolos de inmunosupresión⁽¹⁴⁹⁾. A favor de la hipótesis que defiende un papel de MCP-1 en la respuesta inflamatoria crónica podemos añadir que esta proteína está también implicada en la respuesta inflamatoria crónica asociada a otras patologías como la obesidad, la resistencia a la insulina o la aterosclerosis⁽¹⁵⁰⁾. El aumento de la expresión de MCP-1 está claramente asociado con las acciones de mediadores proinflamatorios activados durante el rechazo pulmonar.

Es bien conocido el papel del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) en la respuesta de rechazo al órgano trasplantado. La disparidad de los antígenos HLA entre el donante y el receptor son el mayor factor de riesgo para un RA⁽¹⁵¹⁾. El complejo MHC-I es expresado por todas las células nucleadas mientras que el MHC-II lo es por células presentadoras de antígenos (p.ej., células Kupffer en el hígado). Al reconocer como extraño el pulmón se produce la activación de los linfocitos T que liberan citoquinas, sobre todo IL-2, responsables de la proliferación celular mononuclear y de la expresión de los HLA de clase II (HLA-DP, DQ, DR) en el epitelio bronquial y en el endotelio que aumentan la superficie antigénica de las células del receptor y es ahí donde se van a desarrollar las lesiones del rechazo pulmonar agudo y posteriormente crónico. De hecho, la recurrencia de episodios de RA se relaciona directamente con el desarrollo de RC⁽¹⁵²⁾.



Por tanto, el daño mediado por el sistema inmune al pulmón trasplantado se produciría por una amplia variedad de respuestas inflamatorias/inmunes las cuales estarían desencadenadas por péptidos antígenos con reconocimiento específico por el sistema MHC. Este reconocimiento antigénico incrementaría la retención de células T activadas en el órgano afecto. En consonancia con el papel del MHC en el trasplante, nuestro estudio muestra que entre los genes regulados existe una representación significativa dentro de la ruta de señalización dedicada al procesamiento y presentación de antígenos (anexo: tablas 10 y 11 figura 2). Al menos 12 genes de dicha red de señalización tenían unos niveles de expresión reducidos en el pulmón trasplantado. Este es el caso de los genes involucrados en la actividad del proteosoma (p.ej., catepsina b) o en la presentación de antígenos asociados con el sistema MHC-II. Si este tipo de alteración en los niveles de expresión génica tiene o no alguna relación con el RC del trasplante pulmonar se escapa de los objetivos de esta Tesis y requiere de otro tipo de estudios.

TGF-B se encuentra significativamente elevado tanto en el pulmón trasplantado como en el contralateral no trasplantado. Esto último, probablemente esté relacionado con los fenómenos compensadores que afectan al pulmón no trasplantado a medida que el trasplantado ha ido involucionando por efecto del RC ⁽¹⁵³⁾. Una de las principales actividades de TGFB-1, es la inhibición del crecimiento e inducción de la apoptosis. Su papel en la fisiopatología del RC parece estar ligado a su contribución en la activación de la inflamación crónica. Se ha detectado un incremento de TGFB-1 en los lavados bronquioalveolares en relación con procesos de infecciosos y el rechazo del pulmón trasplantado ⁽¹⁵⁴⁾. Además, TGF-B es capaz de estimular directamente a los miofibroblastos e inducir fibrosis pulmonar ⁽¹⁵⁵⁾ por lo que sus actividades están íntimamente relacionadas con la generación de enfermedad obstructiva pulmonar e hipertensión pulmonar. Es interesante destacar que, en un gran número de células, el TGFB-1 es capaz de provocar una respuesta de estrés oxidativo la cual parece estar asociada con la actividad del factor de transcripción TIEG (TGFB-1-inducible early-response gene) ⁽¹⁵⁵⁾.

El incremento de especies reactivas de oxígeno podría mediar en procesos como la apoptosis o en cambios de la expresión de genes como los que codifican para proteínas de la matriz extracelular ⁽¹⁵⁶⁾. A diferencia de la muerte celular por necrosis que se ha observado a nivel experimental en los pulmones trasplantados de las ratas entre las 6 y 12 horas de isquemia en frío, la apoptosis no se presenta durante la isquemia, sino que aparece rápidamente tras la reperusión del pulmón trasplantado y no se relaciona con la función pulmonar postrasplante. La inducción de la apoptosis está modulada por dos vías. La *vía intrínseca* que implica a las mitocondrias y que es activada por los RLO y la *vía extrínseca* que es activada a través de señales procedentes de los receptores de membrana de muerte celular cuando se unen a ellos su respectivos ligandos, como son entre otros el TNF y Fas. La primera vía se activa en la fase precoz



de la reperfusión, mientras que la segunda tarda varias horas en hacerlo. Precisamente, una de las funciones GO más representadas, dentro del conjunto de genes regulados por el RC en nuestro modelo experimental, era la “respuesta al estrés”.

En el pulmón trasplantado se identificaron, relacionados con la “GO: response to stress” (P corregida = 0), 68 y 60 genes inducidos e inhibidos, respectivamente (anexo: tablas 12 y 13). Por ejemplo, HSP70, selenoproteína o VEGF estaban inducidos 6, 4 y 3 veces, respectivamente. Por el contrario, NOS-2, IL-1 receptor antagonist, ApoE o S100 estaban inhibidos 3-4 veces. La disminución de agentes proinflamatorios como NOS puede deberse a la activación de respuestas antioxidantes o antiinflamatorias. Este es el caso del factor de transcripción Nrf (Nuclear-factor-E2-related factor), miembro de la familia de factores de transcripción bZIP que se expresa en muchos tejidos en respuesta al estrés oxidativo ⁽¹⁵⁷⁾.

En nuestro estudio, también observamos una inducción significativa aunque moderada de Nrf en el pulmón trasplantado. La activación transcripcional de los genes antioxidantes depende en gran medida de Nrf2 y, en consonancia con su actividad, nuestro análisis mostró inducción de algunos genes regulados por Nrf2 como ubiquinona o glutathione S-transferasa. Es interesante destacar un estudio reciente con cultivos celulares donde la activación del factor de transcripción Nrf causa profundos efectos protectores a través de mecanismos antiinflamatorios, por ejemplo inhibiendo la NOS inducible ⁽¹⁵⁸⁾. Esta asociación, inducción de la expresión de Nrf y represión de la NOS inducible, fue encontrada también en nuestro análisis de microarrays. Pendiente de confirmarse con otros métodos complementarios, nuestros hallazgos sugieren un papel relevante de la activación de Nrf como mecanismo para compensar el daño tisular causado por el RC. Por otra parte, es interesante destacar que en nuestro estudio también se observaron otras muchas evidencias de una inhibición en la respuesta inmune/inflamatoria asociada con el RC. Este es el caso de muchos genes relacionados con la respuesta dependiente de interferón como IRF (interferon-regulatory factor), un activador de la transcripción de genes inducidos por interferones. En concreto, los IRF (2, 3 y 5) o proteínas inducidas por IFN-g como p30, GTPasa o el propio receptor de interferón gamma-1, tenían reducidos sus niveles, de forma moderada pero significativa, en un rango de 1.2 a 2 veces.

IGF-1 es un potente estimulante del crecimiento en casi todos los tejidos de mamíferos, incluyendo el pulmonar ⁽¹⁵⁷⁾. Este factor de crecimiento está implicado en la regulación del metabolismo de proteínas y ejerce potentes efectos sobre la proliferación y la diferenciación de las células en la mayor parte de los tejidos. IGF-1 señala a través de una compleja red intracelular de quinasas que en última instancia son las responsables de regular la proliferación, la diferenciación y de proteger contra la apoptosis ⁽¹⁵⁸⁾. En nuestro estudio, se ha observado que el RC se asocia con un incremento significativo de los niveles de ARNm de IGF-1 en el tejido pulmonar



trasplantado. Además, los análisis de microarrays demostraron cambios significativos en los niveles de expresión de un gran número de genes relacionados con la diferenciación y proliferación del tejido musculo-nervioso y de regulación de la apoptosis. Estas manifestaciones están en consonancia con las funciones descritas para IGF-1 como son su capacidad para estimular el crecimiento muscular, actuar como factor neurotrófico, la comunicación neuromuscular o como regulador de la apoptosis (158).

Por el contrario, el papel fisiológico del IGF-1 en el contexto de la respuesta inflamatoria, en general, o en relación con el RC al trasplante pulmonar, en particular, es prácticamente desconocido. Entre los pocos hallazgos descritos hasta ahora está el incremento de los niveles de expresión de IGF-1 en el lavado bronquial de los pacientes con RC y en los estadios de fibrosis pulmonar del síndrome de BO (159). Los efectos celulares de IGF-1 están influenciados por la expresión de un grupo de proteínas con capacidad para fijarlo, la familia de IGFBP (1 a 6) (159). Estas, dependiendo del tipo de IGFBP, pueden tanto aumentar como inhibir los efectos del IGF-1 en las células. Es interesante destacar que en nuestro análisis de microarrays se observó una disminución significativa de IGFBP3 (37%) e IGFBP4 (49%) en el pulmón trasplantado. Aunque estos cambios son aparentemente poco intensos, no debemos olvidar que variaciones sutiles en los niveles de expresión de un gen pueden tener repercusiones biológicas relevantes. Estos resultados, a falta de ser validados por técnicas complementarias (p.ej., RTPCR o inmunohistoquímica), sugieren que tanto la intensidad como el tipo de actividades que IGF-1 ejerce sobre el tejido pulmonar trasplantado puede verse modulado por una reducción significativa en IGFBP3 e IGFBP4 durante la respuesta al RC. En consonancia, nuestro estudio muestra que entre los genes regulados positivamente existe una representación significativa dentro de la ruta de señalización dedicada a la síntesis de proteínas (anexo: tablas 7, 8 y figura 1). Al menos 17 genes de la ruta KEGG: ribosome (P corregida= 0.00; enriquecimiento= 4.3) tenían unos niveles de expresión inducidos en el pulmón trasplantado. Estos hallazgos sugieren que el patrón de expresión de genes citosólicos relacionados con las actividades ribosomales es una respuesta al RC muy importante lo cual podría estar relacionado con una respuesta de reparación y desarrollo tisular ante el RC, lo que podría justificar la presencia de la proteína antiapoptótica Bax en las muestras del pulmón trasplantado.

En resumen, nuestro estudio ha sido diseñado para intentar comprender los cambios funcionales y en la expresión génica global asociados con el RC del trasplante pulmonar. Hemos usado herramientas de análisis estadístico potente para interpretar los datos de microarrays e identificar clases funcionales (GO), y vías de señalización (KEGG) inducidas o reprimidas por el RC. El objetivo principal era definir una respuesta a un tratamiento, en nuestro caso el trasplante pulmonar, en cuyo caso la representación biológica de un conjunto de genes es siempre más interesante que los genes individuales por sí mismo.



En el presente estudio, las representaciones biológicas de nuestro modelo son las clases GO y las vías KEGG con un determinado peso estadístico. El análisis ha puesto de manifiesto la participación conjunta de, al menos, dos tipos de respuestas biológicas asociadas al RC: 1) la potenciación de los constituyentes citosólicos relacionados con las actividades de los ribosomas y 2) la represión de los sistemas de presentación antigénica dependiente del sistema MHC. Se ha observado una representación significativa de genes que como IGF-1 contribuyen a la síntesis de proteínas, la reparación tisular o a proteger de la apoptosis, lo cual sugiere un intento del organismo a contrarrestar la agresión y a reparar los daños que está sufriendo durante el RC. Al mismo tiempo, el RC se asocia con una supresión importante de la respuesta inmune/inflamatoria por la inhibición del sistema MHC que media la presentación antigénica y también de genes regulados por interferón. Esta aparente paradoja podría deberse a que el análisis de la expresión génica se realizó en una etapa final de la respuesta al RC ⁽¹⁶⁰⁾, correspondiendo con un estadio muy avanzado de involución del pulmón trasplantado. Una segunda hipótesis podría estar relacionada con la capacidad endógena de la rata para defenderse de una respuesta exacerbada de su sistema en respuesta al trasplante pulmonar. De confirmarse esta última hipótesis sería muy interesante identificar qué agentes inmunosupresores “endógenos”, si existieran, participan en esta respuesta.

Por último, el incremento de los niveles de expresión de los genes MCP-1, IGF-1 y TGFB-1 en el tejido pulmonar con RC corrobora los hallazgos descritos hasta la fecha basada en el análisis del lavado broncolaveolar de los pacientes sometidos a TP. Hasta ahora no se había determinado su expresión en el tejido pulmonar afecto de RC. Estos genes podrían ser analizados como potenciales biomarcadores de RC en los pacientes trasplantados de pulmón durante su seguimiento, lo que podría ayudar a identificar e intentar tratar este proceso más precozmente o incluso seleccionar a aquellos pacientes que por sus peculiares características pudieran ser candidatos a un retrasplante pulmonar ⁽¹⁶¹⁾.

Es cierto que la mayor parte de los genes identificados en nuestro análisis necesitan aún otros estudios complementarios para confirmar o no su papel dentro de la fisiopatología del rechazo crónico del pulmón trasplantado. Sin embargo, nuestra estrategia de análisis ha puesto en evidencia que es muy útil para identificar nuevas dianas moleculares. Estas podrían ser manipuladas para regular una respuesta inmune/inflamatoria exacerbada y contribuir significativamente al desarrollo de tratamientos capaces de proteger del daño al pulmón trasplantado.



CONCLUSIONES



Primera: “Los hallazgos histológicos demostraron cambios característicos de la respuesta al rechazo crónico. En concreto, una desaparición del parénquima pulmonar con persistencia de bronquios y bronquiolos dilatados y una importante infiltración de células linfoplasmocitarias peribronquiales y perivasculares”.

Segunda: “El estudio inmunohistoquímico mostró una elevada positividad tanto para marcadores anti-apoptóticos (Bcl-2) como proapoptóticos (Bax, Caspasa 3). Aunque es difícil precisar en qué tipo de células se están desarrollando estos procesos biológicos, los resultados sugieren una elevada actividad de los mecanismos tanto de supervivencia como de muerte celular programada, dos procesos biológicos esenciales en la respuesta al rechazo crónico”.

Tercera: “El uso de la técnica de microarrays ha permitido identificar importantes cambios en los niveles de expresión génica asociados con el rechazo crónico. En este sentido, de los 713 genes identificados, 326 incrementaron su nivel de expresión con respecto al pulmón sano en más del 50% mientras que 387 lo reducían en la misma proporción”.

Cuarta: “Los genes regulados en respuesta al rechazo crónico están significativamente representados por, al menos, las respuestas biológicas relevantes para este modelo: “regulación de la apoptosis”, “actividades de ribosomas”, “presentación y procesamiento de antígenos”, “respuesta inmune” y “respuesta al estrés celular”.

Quinta: “El rechazo crónico pulmonar se asocia con una disminución importante de genes relacionados con la respuesta inmune/inflamatoria. Entre los genes inhibidos existe una representación significativa de la ruta de señalización dedicada al procesamiento y presentación de antígenos asociadas al Complejo Mayor de Histocompatibilidad y la respuesta inmune dependiente de interferón”.

Sexta: “El rechazo crónico pulmonar se asocia con una activación importante de los mecanismos de respuesta al estrés celular. Se identificaron 128 genes asociados con la respuesta al estrés entre los que se encontraban HSP70, selenoproteínas, VEGF, NOS inducible, antagonista del receptor para IL-1, ApoE y S100.

Séptima: “El incremento en la expresión del factor de transcripción Nrf sugiere el desarrollo de una respuesta al estrés oxidativo. Esta respuesta se asoció con una disminución de agentes proinflamatorios como la NOS inducible”.



Octava: “En nuestro estudio, se ha observado que el rechazo crónico se asocia con un incremento significativo de los niveles de IGF-1. Los análisis de microarrays demostraron cambios significativos en los niveles de expresión de un gran número de genes relacionados con la síntesis de proteínas, la reparación tisular o la anti-apoptosis. Esto sugiere un intento del organismo de compensar los daños que está sufriendo durante el RC”.

Novena: “En nuestro estudio, se ha observado que el rechazo crónico se asocia con un incremento de los niveles de MCP-1, TGF-B e IGF-1 en el pulmón trasplantado. Muchas de las actividades de estos genes están íntimamente relacionadas con los procesos biológicos y vías de señalización identificadas en los análisis de microarrays. Esto sugiere que participan de forma muy activa en la respuesta del rechazo al trasplante pulmonar”.

Décima: “Desde el punto de vista translacional, estos conocimientos podrían ayudar a identificar marcadores de rechazo del pulmón trasplantado. Este es el caso de MCP-1, IGF-1 o TGF-b cuyos aumentos en el nivel de expresión podrían aplicarse para monitorizar la evolución hacia el rechazo crónico de los pacientes trasplantados de pulmón”.

Undécima.- “La aplicación de las nuevas tecnologías genéticas, genómicas y proteómicas en el trasplante está aún en su infancia. Nuestro estudio ha aportado un análisis genómico básico al estudio del trasplante pulmonar experimental y ha demostrado que la técnica de microarrays resulta muy eficaz para analizar los cambios genómicos asociados al rechazo crónico. Esto muestra el poder potencial de los microarrays de ADN para identificar nuevas dianas moleculares relacionadas con los cambios fisiopatológicos que sufre el pulmón trasplantado. Estas dianas podrían ser manipuladas para regular la respuesta inmune/inflamatoria exacerbada o para contribuir al desarrollo de tratamientos más selectivos capaces de proteger al pulmón trasplantado del rechazo”.



BIBLIOGRAFIA



1. V. D. Experimental transplantation of vital organ. New York: Consultants Bureau Enterprises, Inc.; 1962.
2. Hardy JD, Eraslan S, Dalton ML, Jr. Autotransplantation and Homotransplantation of the Lung: Further Studies. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1963 Nov;46:606-15.
3. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Jr., Walker GR, Jr. Lung Homotransplantation in Man. *JAMA.* 1963 Dec 21;186:1065-74.
4. Veith FJ, Richards K. Lung transplantation with simultaneous contralateral pulmonary artery ligation. *Surg Gynecol Obstet.* 1969 Oct;129(4):768-74.
5. Wildevuur CR, Heemstra H, Tammeling GJ, Hilvering C, Bouma HG, ten Hoor F, et al. Long-term observation of the changes in pulmonary arterial pressure after reimplantation of the canine lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1968 Dec;56(6):799-809.
6. Noirclerc M, Chauvin G, Pons R, Malmejac C, Courbil JL, Lebreuil G, et al. [Technical and control problems in lung transplantation based on 120 experiments]. *Ann Chir Thorac Cardiovasc.* 1969 Mar;8(2):215-22.
7. Levasseur P, Kulski M, Hay JM, Rojas-Miranda A, Brunet AM, Weiss M. [Pulmonary transplantation. 3. Left pulmonary allotransplantation with immediate ligation of the right pulmonary artery]. *Ann Chir Thorac Cardiovasc.* 1972 Jan;11(1):107-17.
8. Serrano F CM, García F. Trasplantes experimentales de pulmón. *Rev Clin Esp* 1968(110):225-33.
9. H. M. Proc Acad Sci Preliminary note sur la greffe totale du poumon chez le chien. 1950;231:1176-7.
10. Hugh-Jones P, Macarthur AM, Cullum PA, Mason SA, Crosbie WA, Hutchison DC, et al. Lung transplantation in a patient with fibrosing alveolitis. *Br Med J.* 1971 Aug 14;3(5771):391-8.
11. Veith FJ, Sinha SB, Torres M, Richards K. Bilateral simultaneous canine lung allotransplantation. *Ann Surg.* 1971 Jul;174(1):48-50.
12. Nelems JM, Rebuck AS, Cooper JD, Goldberg M, Halloran PF, Vellend H. Human lung transplantation. *Chest.* 1980 Oct;78(4):569-73.
13. Derom F, Barbier F, Ringoir S, Versieck J, Rolly G, Berzsenyi G, et al. Ten-month survival after lung homotransplantation in man. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1971 Jun;61(6):835-46.
14. Trummer M BP, editor. lung transplantation. Illinois ; Springfield; 1970.
15. Veith FJ, Richards K. Improved technic for canine lung transplantation. *Ann Surg.* 1970 Apr;171(4):553-8.
16. Pearson FG, Goldberg M, Stone RM, Colapinto RF. Bronchial arterial circulation restored after reimplantation of canine lung. *Can J Surg.* 1970 Jul;13(3):243-50.
17. Lima O, Cooper JD, Peters WJ, Ayabe H, Townsend E, Luk SC, et al. Effects of methylprednisolone and azathioprine on bronchial healing following lung autotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1981 Aug;82(2):211-5.
18. Goldberg M, Lima O, Morgan E, Ayabe HA, Luk S, Ferdman A, et al. A comparison between cyclosporin A and methylprednisolone plus azathioprine on bronchial healing following canine lung autotransplantation. *J Thorac*



- Cardiovasc Surg. 1983 Jun;85(6):821-6.
19. Dubois P, Choiniere L, Cooper JD. Bronchial omentopexy in canine lung allotransplantation. *Ann Thorac Surg.* 1984 Sep;38(3):211-4.
 20. Saunders NR, Egan TM, Chamberlain D, Cooper JD. Cyclosporin and bronchial healing in canine lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1984 Dec;88(6):993-9.
 21. Cooper. Sequential bilateral lung transplantation for paraquat poisoning. A case report. The Toronto Lung Transplant group. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985 May;89(5):734-42.
 22. Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA, Pennock JL, Billingham ME, Oyer PE, et al. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N Engl J Med.* 1982 Mar 11;306(10):557-64.
 23. LEWIS. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. Toronto Lung Transplant Group. *N Engl J Med.* 1986 May 1;314(18):1140-5.
 24. Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA, Todd TR, Ginsberg RJ, Goldberg M, et al. Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987 Feb;93(2):173-81.
 25. Pearson FG. Lung transplantation: the Toronto experience. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1989;3(1):6-11.
 26. Patterson GA, Cooper JD, Goldman B, Weisel RD, Pearson FG, Waters PF, et al. Technique of successful clinical double-lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1988 Jun;45(6):626-33.
 27. Patterson GA, Cooper JD, Dark JH, Jones MT. Experimental and clinical double lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988 Jan;95(1):70-4.
 28. Patterson GA, Todd TR, Cooper JD, Pearson FG, Winton TL, Maurer J. Airway complications after double lung transplantation. Toronto Lung Transplant Group. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990 Jan;99(1):14-20; discussion -1.
 29. Hudson C MA. the extracardiac anastomosis of the coronary arteries *J Exp Med.* 1932;56:919-26.
 30. Noirclerc MJ, Metras D, Vaillant A, Dumon JF, Zimmermann JM, Caamano A, et al. Bilateral bronchial anastomosis in double lung and heart-lung transplantations. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1990;4(6):314-7.
 31. Paris F, Lopez Merino V. [Bronchial circulation in bronchial dilatation]. *Bronches.* 1969 Nov-Dec;19(6):466-72.
 32. Alican F, Cayirli M, Isin E, Hardy JD. Surgical technique of one-stage bilateral lung reimplantation in the dog. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1971 Jun;61(6):847-56.
 33. Pasque MK, Cooper JD, Kaiser LR, Haydock DA, Triantafillou A, Trulock EP. Improved technique for bilateral lung transplantation: rationale and initial clinical experience. *Ann Thorac Surg.* 1990 May;49(5):785-91.
 34. Kaiser LR, Pasque MK, Trulock EP, Low DE, Dresler CM, Cooper JD. Bilateral sequential lung transplantation: the procedure of choice for double-lung replacement. *Ann Thorac Surg.* 1991 Sep;52(3):438-45; discussion 45-6.
 35. Astudillo J BC. Trasplante bilateral secuencial. Técnica y resultados de los tres primeros casos. *Arch Bronconeumol.* 1994;30:348-53.
 36. Borro J TV. Ampliación de los criterios en el trasplante pulmonar 1999;35:129-35.



37. J. F. Guidelines for the determination of death. Report of the medical consultants on the diagnosis of death to the President's Commission for the Study of Ethical Problems in Medicine and Biomedical and Behavioral Research. *JAMA*. 1981/11/13 ed; 1981. p. 2184-6.
38. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: seventeenth official report-2000. *J Heart Lung Transplant*. 2000 Oct;19(10):909-31.
39. Minai OA, Maurer JR, Kesten S. Comorbidities in end-stage lung disease. *J Heart Lung Transplant*. 1999 Sep;18(9):891-903.
40. Sole. Indicaciones del TP y seleccion de receptor. *Consejeria en BCN* 2001:22-31.
41. Smith CM. Patient selection, evaluation, and preoperative management for lung transplant candidates. *Clin Chest Med*. 1997 Jun;18(2):183-97.
42. Patterson GA. Indications. Unilateral, bilateral, heart-lung, and lobar transplant procedures. *Clin Chest Med*. 1997 Jun;18(2):225-30.
43. Stillwell PC, Mallory GB, Jr. Pediatric lung transplantation. *Clin Chest Med*. 1997 Jun;18(2):405-14.
44. Hopkinson DN, Bhabra MS, Hooper TL. Pulmonary graft preservation: a worldwide survey of current clinical practice. *J Heart Lung Transplant*. 1998 May;17(5):525-31.
45. Cooper JD, Patterson GA, Trulock EP. Results of single and bilateral lung transplantation in 131 consecutive recipients. Washington University Lung Transplant Group. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994 Feb;107(2):460-70; discussion 70-1.
46. Sundaresan S, Trachiotis GD, Aoe M, Patterson GA, Cooper JD. Donor lung procurement: assessment and operative technique. *Ann Thorac Surg*. 1993 Dec;56(6):1409-13.
47. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Fiol B, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: sixteenth official report--1999. *J Heart Lung Transplant*. 1999 Jul;18(7):611-26.
48. Khan SU SJ. Acute pulmonary edema after lung transplantation: the pulmonary reimplantation response. *Chest*. 1999;116:187-94.
49. King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, et al. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2000 Jun;69(6):1681-5.
50. Schulman LL. Perioperative mortality and primary graft failure. *Chest*. 1998 Jul;114(1):7-8.
51. Shimada K, Kondo T, Okada Y, Matsumura Y, Oyaizu T, Handa M, et al. Lung transplantation from non-heart-beating donors. *Transplant Proc*. 2000 Mar;32(2):279-80.
52. D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, Eckhoff DE, Love RB, Kalayoglu M, et al. Controlled non-heart-beating donors: a potential source of extrarenal organs. *Transplant Proc*. 1995 Feb;27(1):707-9.
53. Mallory GB, Jr., Cohen AH. Donor considerations in living-related donor lung transplantation. *Clin Chest Med*. 1997 Jun;18(2):239-44.
54. Gridelli B, Remuzzi G. Strategies for making more organs available for transplantation. *N Engl J Med*. 2000 Aug 10;343(6):404-10.
55. Platt JL. Xenotransplantation: The Need, The Immunologic Hurdles, and



- The Prospects for Success. *ILAR J.* 1995;37(1):22-30.
56. Mollaret P, Goulon M. [The depassed coma (preliminary memoir)]. *Rev Neurol (Paris)*. 1959 Jul;101:3-15.
57. Matesanz R, Miranda B, Felipe C. Organ procurement and renal transplants in Spain: the impact of transplant coordination. Spanish National Transplant Organization (ONT). *Nephrol Dial Transplant*. 1994;9(5):475-8; discussion 9-81.
58. Egan TM, Lambert CJ, Jr., Reddick R, Ulicny KS, Jr., Keagy BA, Wilcox BR. A strategy to increase the donor pool: use of cadaver lungs for transplantation. *Ann Thorac Surg*. 1991 Nov;52(5):1113-20; discussion 20-1.
59. V. C. Selección y mantenimiento del donante pulmonar. Valencia, España; 2001.
60. Wijnen RM, Booster MH, Nieman FH, Daemen JH, Heineman E, Kootstra G. Retrospective analysis of the outcome of transplantation of non-heart-beating donor kidneys. *Transplant Proc*. 1995 Oct;27(5):2945-6; discussion 35-9.
61. Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, Nghiem D, Miracle K, Fung JJ, et al. Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. *Transplant Proc*. 1995 Oct;27(5):2898.
62. Ploeg RJ VdVA. Workshop International. *Transpl Proc*. 1995(79):977-82.
63. BOE. Real Decreto 30 Diciembre Colección de Organos. España; 1999.
64. Experience with single-lung transplantation for pulmonary fibrosis. The Toronto Lung Transplant Group. *JAMA*. 1988 Apr 15;259(15):2258-62.
65. Ulicny KS, Jr., Egan TM, Lambert CJ, Jr., Reddick RL, Wilcox BR. Cadaver lung donors: effect of preharvest ventilation on graft function. *Ann Thorac Surg*. 1993 May;55(5):1185-91.
66. Shennib H, Kuang JQ, Giaid A. Successful retrieval and function of lungs from non-heart-beating donors. *Ann Thorac Surg*. 2001 Feb;71(2):458-61.
67. Love RB PJ, Mentts RM. non heart donors. *Ann Thorac Surg*. 1995;14:88.
68. Steen S, Sjoberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet*. 2001 Mar 17;357(9259):825-9.
69. Sanchez-Fructuoso AI, de Miguel Marques M, Prats D, Barrientos A. Non-heart-beating donors: experience from the Hospital Clinico of Madrid. *J Nephrol*. 2003 May-Jun;16(3):387-92.
70. Starnes VA, Barr ML, Cohen RG. Lobar transplantation. Indications, technique, and outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994 Sep;108(3):403-10; discussion 10-1.
71. Artemiou O, Wieselthaler G, Zuckermann A, Wisser W, Wekerle T, Senbaklavaci O, et al. Downsizing of the donor lung: peripheral segmental resections and lobar transplantation. *Transplant Proc*. 1997 Nov;29(7):2899-900.
72. Judson MA. Clinical aspects of lung transplantation. *Clin Chest Med*. 1993 Jun;14(2):335-57.
73. Dworkin PH, Allen D, Geertsma A, Solkoske L, Cullina J. Does developmental content influence the effectiveness of anticipatory guidance? *Pediatrics*. 1987 Aug;80(2):196-202.
74. Varela A, Montero CG, Cordoba M, Antequera A, Perez M, Tabuenca MJ, et al. Improved distribution of pulmonary flush solution to the tracheobronchial wall in pulmonary



- transplantation. *Eur Surg Res.* 1997;29(1):1-4.
75. Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med.* 2000 Dec;136(6):427-40.
76. Miyoshi S, Demertzis S, Eckstein F, Hohlfeld J, Schaefer HJ. Chest size matching in single and double lung transplantation. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 Apr;47(4):163-70.
77. Kelly J, Hurley D, Raghu G. Comparison of the efficacy and cost effectiveness of pre-emptive therapy as directed by CMV antigenemia and prophylaxis with ganciclovir in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2000 Apr;19(4):355-9.
78. Vicente R RF. Selección y mantenimiento del donante. *Rev Esp Ana.* 1997;42:51-7.
79. Ueno T, Yokomise H, Oka T, Puskas J, Mayer E, Slutsky AS, et al. The effect of PGE1 and temperature on lung function following preservation. *Transplantation.* 1991 Oct;52(4):626-30.
80. Novick RJ, Bennett LE, Meyer DM, Hosenpud JD. Influence of graft ischemic time and donor age on survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1999 May;18(5):425-31.
81. Glanville AR, Marshman D, Keogh A, Macdonald P, Larbalestier R, Kaan A, et al. Outcome in paired recipients of single lung transplants from the same donor. *J Heart Lung Transplant.* 1995 Sep-Oct;14(5):878-82.
82. Haniuda M, Dresler CM, Hasegawa S, Patterson GA, Cooper JD. Changes in vascular permeability with ischemic time, temperature, and inspired oxygen fraction in isolated rabbit lungs. *Ann Thorac Surg.* 1994 Mar;57(3):708-14.
83. Haniuda M, Dresler CM, Mizuta T, Cooper JD, Patterson GA. Free radical-mediated vascular injury in lungs preserved at moderate hypothermia. *Ann Thorac Surg.* 1995 Nov;60(5):1376-81.
84. Haniuda M, Hasegawa S, Shiraishi T, Dresler CM, Cooper JD, Patterson GA. Effects of inflation volume during lung preservation on pulmonary capillary permeability. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Jul;112(1):85-93.
85. Muller C, Furst H, Reichenspurner H, Briegel J, Groh J, Reichart B. Lung procurement by low-potassium dextran and the effect on preservation injury. *Munich Lung Transplant Group. Transplantation.* 1999 Oct 27;68(8):1139-43.
86. Meyers BF, Lynch J, Trulock EP, Guthrie TJ, Cooper JD, Patterson GA. Lung transplantation: a decade of experience. *Ann Surg.* 1999 Sep;230(3):362-70; discussion 70-1.
87. DeCampos KN, Keshavjee S, Liu M, Slutsky AS. Optimal inflation volume for hypothermic preservation of rat lungs. *J Heart Lung Transplant.* 1998 Jun;17(6):599-607.
88. Date H, Lima O, Matsumura A, Tsuji H, d'Avignon DA, Cooper JD. In a canine model, lung preservation at 10 degrees C is superior to that at 4 degrees C. A comparison of two preservation temperatures on lung function and on adenosine triphosphate level measured by phosphorus 31-nuclear magnetic resonance. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Apr;103(4):773-80.
89. Ueno T, Snell GI, Williams TJ, Kotsimbos TC, Smith JA, Rabinov M, et al. Impact of graft ischemic time on outcomes after bilateral sequential single-lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1999 Jun;67(6):1577-82.



90. Novick RJ, Gehman KE, Ali IS, Lee J. Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *Ann Thorac Surg.* 1996 Jul;62(1):302-14.
91. Date H, Matsumura A, Manchester JK, Cooper JM, Lowry OH, Cooper JD. Changes in alveolar oxygen and carbon dioxide concentration and oxygen consumption during lung preservation. The maintenance of aerobic metabolism during lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Mar;105(3):492-501.
92. Fukuse T, Hirata T, Nakamura T, Kawashima M, Hitomi S, Wada H. Influence of deflated and anaerobic conditions during cold storage on rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Aug;160(2):621-7.
93. Puskas JD, Hirai T, Christie N, Mayer E, Slutsky AS, Patterson GA. Reliable thirty-hour lung preservation by donor lung hyperinflation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Oct;104(4):1075-83.
94. Meyer KC, Love RB, Zimmerman JJ. The therapeutic potential of nitric oxide in lung transplantation. *Chest.* 1998 May;113(5):1360-71.
95. Grover FL, Fullerton DA, Zamora MR, Mills C, Ackerman B, Badesch D, et al. The past, present, and future of lung transplantation. *Am J Surg.* 1997 Jun;173(6):523-33.
96. Rinaldi M, Martinelli L, Volpato G, Minzioni G, Goggi C, Mantovani V, et al. University of Wisconsin solution provides better lung preservation in human lung transplantation. *Transplant Proc.* 1995 Oct;27(5):2869-71.
97. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Feb 15;167(4):490-511.
98. Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, Sakamaki Y, Starnes VA, Barr ML. A comparison of the new preservation solution Celsior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury. *Transplantation.* 1999 Jan 15;67(1):152-5.
99. Muller C, Hoffmann H, Bittmann I, Isselhard W, Messmer K, Dienemann H, et al. Hypothermic storage alone in lung preservation for transplantation: a metabolic, light microscopic, and functional analysis after 18 hours of preservation. *Transplantation.* 1997 Mar 15;63(5):625-30.
100. Gammie JS, Cheul Lee J, Pham SM, Keenan RJ, Weyant RJ, Hattler BG, et al. Cardiopulmonary bypass is associated with early allograft dysfunction but not death after double-lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 May;115(5):990-7.
101. Zamora MR, Davis RD, Keshavjee SH, Schulman L, Levin J, Ryan U, et al. Complement inhibition attenuates human lung transplant reperfusion injury: a multicenter trial. *Chest.* 1999 Jul;116(1 Suppl):46S.
102. Maurer JR, Tullis DE, Grossman RF, Vellend H, Winton TL, Patterson GA. Infectious complications following isolated lung transplantation. *Chest.* 1992 Apr;101(4):1056-9.
103. Lick SD, Brown PS, Jr., Kurusz M, Vertrees RA, McQuitty CK, Johnston WE. Technique of controlled reperfusion of the transplanted lung in humans. *Ann Thorac Surg.* 2000 Mar;69(3):910-2.
104. Protocolo de trasplante pulmonar Hospital Puerta de Hierro. 2001.
105. Zhao G, al-Mehdi AB, Fisher AB. Anoxia-reoxygenation versus ischemia



- in isolated rat lungs. *Am J Physiol.* 1997 Dec;273(6 Pt 1):L1112-7.
106. Herridge MS, de Hoyos AL, Chaparro C, Winton TL, Kesten S, Maurer JR. Pleural complications in lung transplant recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 Jul;110(1):22-6.
107. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 1995 Apr;9(7):526-33.
108. King-Biggs MB. Acute pulmonary allograft rejection. Mechanisms, diagnosis, and management. *Clin Chest Med.* 1997 Jun;18(2):301-10.
109. Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR, et al. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest.* 1998 Jul;114(1):51-60.
110. Sole. Rechazo crónico y agudo en el TP / reporte de la consejería de Valencia 2001:127-39.
111. Sarahrudi K, Carretta A, Wisser W, Senbaklavaci O, Ploner M, Neuhauser P, et al. The value of switching from cyclosporine to tacrolimus in the treatment of refractory acute rejection and obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Transpl Int.* 2002 Jan;15(1):24-8.
112. Guilinger RA, Paradis IL, Dauber JH, Yousem SA, Williams PA, Keenan RJ, et al. The importance of bronchoscopy with transbronchial biopsy and bronchoalveolar lavage in the management of lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Dec;152(6 Pt 1):2037-43.
113. Lander, E.S., et al., Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001. 409(6822): p. 860-921.
114. Waterston, R.H., et al., Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 2002. 420(6915): p. 520-62.
115. Lockhart, D.J. and E.A. Winzler, Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 2000. 405(6788): p. 827-36.
116. Ren, B., et al., Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, 2000. 290(5500): p. 2306-9.
117. Lee, T.I., et al., Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 2002. 298(5594): p. 799-804.
118. Elkouss, R., et al., Genome-wide in silico identification of transcriptional regulators controlling the cell cycle in human cells. *Genome Res*, 2003. 13(5): p. 773-80.
119. Qiu, P., Recent advances in computational promoter analysis in understanding the transcriptional regulatory network. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 309(3): p. 495-501.
120. Jackson-Hayes, L., et al., A thyroid hormone response unit formed between the promoter and first intron of the carnitine palmitoyltransferase- α gene mediates the liver-specific induction by thyroid hormone. *J Biol Chem*, 2003. 278(10): p. 7964-72.
121. Schena, M., et al., Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995. 270(5235): p. 467-70.
122. Iyer, V.R., et al., The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*, 1999. 283(5398): p. 83-7.
123. Spellman, P.T., et al., Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*, 1998. 9(12): p. 3273-97.



- 124 Golub, T.R., et al., Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 1999. 286(5439): p. 531-7.
- 125 Lockhart, D.J., et al., Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 1996. 14(13): p. 1675-80.
- 126 Pollack, J.R. and V.R. Iyer, Characterizing the physical genome. *Nat Genet*, 2002. 32 Suppl: p. 515-21.
- 127 Kern, W., et al., Correlation of protein expression and gene expression in acute leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*, 2003. 55(1): p. 29-36.
- 128 Futcher, B., et al., A sampling of the yeast proteome. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(11): p. 7357-68.
- 129 Gygi, S.P., et al., Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(3): p. 1720-30.
- 130 Anderson, N.L. and N.G. Anderson, Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 1998. 19(11): p. 1853-61.
- 131 Schena, M., et al., Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(20): p. 10614-9.
- 132 Alizadeh, A.A., et al., Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 2000. 403(6769): p. 503-11.
- 133 Churchill, G.A., Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet*, 2002. 32 Suppl: p. 490-5.
- 134 Quackenbush, J., Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet*, 2002. 32 Suppl: p. 496-501.
- 135 Eisen, M.B., et al., Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(25): p. 14863-8.
- 136 Stoeckert, C.J., Jr., H.C. Causton, and C.A. Ball, Microarray databases: standards and ontologies. *Nat Genet*, 2002. 32 Suppl: p. 469-73.
- 137 Kawai, J., et al., Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature*, 2001. 409(6821): p. 685-90.
- 138 Lagreid, A., et al., Predicting gene ontology biological process from temporal gene expression patterns. *Genome Res*, 2003. 13(5): p. 965-79.
- 139 Jelinsky, S.A., et al., Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(21): p. 8157-67.
- 141 Gunther, E.C., et al., Prediction of clinical drug efficacy by classification of drug-induced genomic expression profiles in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(16): p. 9608-13.
- 142 Feng, X., et al., Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Mol Endocrinol*, 2000. 14(7): p. 947-55.
- 143 Manual de procedimientos y leyes para el bienestar animal (Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, Directiva del Consejo Europeo 86/609, Real Decreto Español 1201/2005 y la Ley 32/2007)
- 144 Santana Rodriguez N et al., Lung transplantation in rats: a viable experimental model. *Arch Bronconeumol*. 2004 Oct;40(10):438-42.
- 145 Briggs, A.D., et al., The effect of endotoxin on bleomycin-induced lung fibrosis in the rat. *Toxicol Lett*, 1985. 27(1-3): p. 91-6.



- 146 Leesley M., et al Metabolism of lipids and genomic rate. *J Clin Endocrinol Metab* 92(7):2688-2695, 2007.
- 147 Hoffman, S.A., et al., Plasma cytokines and chemokines in primary graft dysfunction post-lung transplantation. *Am J Transplant*, 2009. **9**(2): p. 389-96.
- 148 Weigt, S.S., et al., Altered levels of CC chemokines during pulmonary CMV predict BOS and mortality post-lung transplantation. *Am J Transplant*, 2008. **8**(7): p. 1512-22.
- 149 Bharat, A., et al., Early posttransplant inflammation promotes the development of alloimmunity and chronic human lung allograft rejection. *Transplantation*, 2007. **83**(2): p. 150-8.
- 150 Zhao, M., et al., Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006. **291**(5): p. L1018-26.
- 151 Hodge, G., et al., Up-regulation of interleukin-8, interleukin-10, monocyte chemoattractant protein-1, and monocyte chemoattractant protein-3 in peripheral blood monocytes in stable lung transplant recipients: are immunosuppression regimens working? *Transplantation*, 2005. **79**(4): p. 387-91.
- 152 Rose, C.E., Jr., S.S. Sung, and S.M. Fu, Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation*, 2003. **10**(3-4): p. 273-88.
- 153 Belperio, J.A., et al., Critical role for the chemokine MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest*, 2001. **108**(4): p. 547-56.
- 154 Choi, J.E., et al., Insulin-like growth factor-I receptor blockade improves outcome in mouse model of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. **179**(3): p. 212-9.
- 155 Hetzel, M., et al., Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung*, 2005. **183**(4): p. 225-37.
- 156 Charpin, J.M., et al., Insulinlike growth factor-1 in lung transplants with obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **161**(6): p. 1991-8.
- 157 Beghe, B., et al., Transforming growth factor-beta type II receptor in pulmonary arteries of patients with very severe COPD. *Eur Respir J*, 2006. **28**(3): p. 556-62.
- 158 Vanaudenaerde, B.M., et al., The role of the IL23/IL17 axis in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Am J Transplant*, 2008. **8**(9): p. 1911-20.
- 159 Hodge, G., et al., Acute lung transplant rejection is associated with localized increase in T-cell IFNgamma and TNFalpha proinflammatory cytokines in the airways. *Transplantation*, 2007. **84**(11): p. 1452-8.
- 160 Mamessier, E., et al., T regulatory cells in stable posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation*, 2007. **84**(7): p. 908-16.
- 161 Ramirez, A.M., et al., Myofibroblast transdifferentiation in obliterative bronchiolitis: tgf-beta signaling through smad3-dependent and -independent pathways. *Am J Transplant*, 2006. **6**(9): p. 2080-8.



