QUIMERISMO DONANTE-RECEPTOR COMO ORIGEN DEL DESARROLLO DE BRONQUIOLITIS OBLITERANTE EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RETRASPLANTE DE TRÁQUEA EN RATAS

P. Moreno Casado[1,4], J. R. Cano García[1], R. Ramírez Chamond[2], D. Espinosa Jiménez[1,4], A. Álvarez Kindelán[1,4], R. Sánchez Sánchez[3], C. Baamonde Laborda[1,4], F. Cerezo Madueño[1,4], F. J. Algar Algar[1,4], Á. Salvatierra Velázquez[1,4].

[1]Unidad Gestión Clínica de Cirugía Torácica y Trasplante Pulmonar. H. U. Reina Sofía, Córdoba. [2]Experimental. [3]Servicio de Anatomía Patológica, H U Reina Sofía, Córdoba. [4]Grupo Asociado Neoplasias Torácicas-Trasplante Pulmonar. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

Financiado por Fundación Neumosur.

Resumen

Objetivos: 1. Desarrollar un modelo de bronquiolitis obliterante en ratas (BO), mediante trasplante heterotópico de tráquea; 2. Eliminar el componente de rechazo alogénico mediante el reimplante del injerto en un animal isogénico; y 3. Estudiar la respuesta inflamatoria persistente que podría autoperpetuar la lesión.

Métodos: Se utilizaron ratas de las razas Lewis (LW), Wistar (W) y Brown Norway (BN). Se realizaron trasplantes singénicos (LW-LW, n=14; W-W, n=6; y BN-BN, n=6) y alogénicos A➔B (LW-W, n=6; BN-LW, n=6; y W-LW, n=6), alojando el injerto en el tejido celular subcutáneo cervical. Tras 15 días, se explantó el injerto e implantó en una tercera rata singénica o alogénica por otros 15 días, estableciendo un modelo de retrasplante A-B-A y A-B-B. Los injertos se procesaron para realizar estudios histológicos e inmunohistoquímicos. El origen de las células epiteliales se analizó mediante PCR.

Resultados: El retrasplante de tráquea, tanto en el diseño A-B-B como A-B-A, dió lugar a la aparición de una rápida respuesta inflamatoria compatible con un proceso de BO, en aquellos animales que habían desarrollado rechazo por trasplante alogénico previo. En trasplantes ♀-♂-♀, se detectaron células con el cromosoma Y en tráqueas del 2º receptor ♀.

Conclusiones: En el modelo de retrasplante de tráquea en ratas, junto a los hallazgos típicos de BO se produce una respuesta inflamatoria leve-moderada compatible con un rechazo celular MHC incompatible. Células procedentes del primer receptor se integrarían en la tráquea del segundo trasplante, produciéndose un quimerismo donante receptor, que sería el responsable, en último término, del desarrollo de BO.

Palabras clave: Trasplante pulmonar. Rechazo crónico. Bronquiolitis obliterante. Disfunción crónica del injerto pulmonar.

DONOR-RECEIVER CHIMERISM AS THE ORIGIN OF OBLITERATIVE BRONCHIOLITIS IN AN EXPERIMENTAL MODEL FOR TRACHEA RE-TRANSPLANT IN RATS

Abstract

Objectives: 1. Develop an obliterative bronchiolitis (OB) model in rats, by means of heterotopic trachea transplant; 2. Eliminate the allogenic rejection component by re-implanting a graft in an isogenic animal; and 3. Study the persistent inflammatory response that could self-perpetuate the injury.

Methods: The following rat breeds were used: Lewis (LW), Wistar (W) and Brown Norway (BN). Syngenic (LW-LW, n=14; W-W, n=6; and BN-BN, n=6) and allogenic A➔B (LW-W, n=6; BN-LW, n=6; and W-LW, n=6) transplants were performed, housing the graft in the cervical subcutaneous cellular tissue. After 15 days, the graft was removed and implanted into a third syngenic or allogenic rat for another 15 days, to establish a re-transplant model A-B-A and A-B-B. The grafts were processed to carry out histological and immunohistochemical studies. The origin of the epithelial cells was analyzed using PCR.

Results: The tracheal re-transplant, both in the A-B-B and A-B-A design, gave rise to the appearance of a rapid inflammatory response compatible with OB process, in those animals that rejected the transplant due to previous allogenic transplant. In ♀ -♂ -♀ transplants, cells were detected with the Y chromosome in trachea of the 2nd ♀ receiver.

Conclusions: In the trachea re-transplant model in rats, together with typical OB discoveries, a compatible slight-moderate inflammatory response takes place with an MHC incompatible cellular rejection. Cells from the first receiver became integrated into the trachea of the second transplant, producing a donor-receiver chimerism that would, in the final location, be responsible for the development of OB.

Key words: Lung transplant, chronic rejection, obliterative bronchiolitis, chronic dysfunction of the lung graft.

INTRODUCCIÓN

El trasplante de pulmón, realizado con éxito por primera vez en humanos por James Hardy en 1963[1], tras una extensa investigación previa desarrollada en perros, constituye la única opción de tratamiento para pacientes con enfermedad pulmonar en fase terminal y mal pronóstico a corto plazo, en los que mejora la

Recibido: 30 de julio de 2012. Aceptado: 6 de julio de 2013.

Ángel Salvatierra Velázquez
asalvati@separ.es

supervivencia y la calidad de vida[2].

A pesar de que en las últimas décadas se ha producido una mejora en los resultados del trasplante pulmonar gracias a los avances obtenidos en la técnica quirúrgica, la preservación pulmonar, la introducción de protocolos de inmunosupresión eficaces y un mejor manejo del donante, así como de las infecciones y del rechazo en el receptor, el principal factor determinante del éxito a largo plazo sigue siendo la aparición del síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS)[3].

El BOS, como expresión del rechazo crónico pulmonar, se caracteriza a nivel clínico por un descenso persistente del volumen espiratorio máximo forzado en el primer segundo (VEMS), que no responde a terapia broncodilatadora y, se correlaciona a nivel histológico, con la detección de BO[4]. Ésta afecta a la vía aérea pequeña, no cartilaginosa, y los hallazgos típicos consisten en la aparición de fibrosis e inflamación de la vía aérea con preservación de los espacios alveolares circundantes[5].

El BOS es la principal causa de morbilidad a largo plazo y mortalidad tras el trasplante de pulmón. Así, a los 5 años del trasplante el 50% de los pacientes desarrollan esta entidad, y sólo un 30-40% de los pacientes que desarrollan BOS sobreviven después de 5 años[6]. La patogénesis de la BO sigue sin esclarecerse, por lo que se ha desarrollado un profuso estudio en animales de experimentación con el objeto de desarrollar fármacos eficaces que pudieran enlentecer o controlar el proceso, ya que actualmente carece de tratamiento. Sólo algunos grupos contemplan el retrasplante como una opción para estos pacientes, siendo los resultados en términos de función del injerto y supervivencia inferiores a los del trasplante inicial[7].

En los últimos años se han desarrollado numerosos modelos en animales con el objeto de investigar el BOS. Estos modelos proporcionan una herramienta de enorme valor para investigar los posibles mecanismos inmunológicos que subyacen al BOS, así como para testar nuevas opciones de tratamiento efectivas. Así, se han realizado con éxito trasplantes unipulmonares en roedores[8], que sirven fundamentalmente para el estudio del rechazo agudo; en otro modelo, el del trasplante heterotópico de tráquea en roedores[9-10], aparecen lesiones similares histológicamente a la BO, con la ventaja de que técnicamente es más sencillo de realizar y requiere una menor curva de aprendizaje. La característica más importante del modelo heterotópico de tráquea es la naturaleza aloinmune del proceso patológico[11]. Se han estudiado mecanismos específicos de la respuesta inmune alogénica utilizando ratones transgénicos Knock-out para algún gen del complejo MHC, así como de las células B o T u otras células inflamatorias[12]. Estudios recientes han demostrado que las células epiteliales del donante serían la principal diana de esta respuesta inmune[13]. En este sentido el grupo de St. Louis postuló que el epitelio respiratorio es la primera diana del rechazo del injerto en un modelo murino de traqueítis obliterativa[14]

Se ha sugerido, asimismo, que en el trasplante de órganos se produce un quimerismo celular entre el órgano injertado y el tejido receptor, y que podría jugar un papel protector importante en el rechazo de órganos como el corazón o el riñón[15-16].

El objetivo del presente trabajo fue analizar nuestros resultados con el trasplante heterotópico de tráquea, y estudiar los mecanismos inmunológicos subyacentes tras eliminar el componente alogénico del mismo, desarrollando un modelo experimental de retrasplante en el que se reimplantó el injerto en un animal isogénico o alogénico respecto al primer donante.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo del modelo experimental se han utilizado un total de 136 ratas: 58 ratas de la raza Lewis, 48 de la raza Wistar y 30 de la Brown Norway, con pesos entre 250 y 350 gramos y 10-14 semanas de edad. Los animales fueron adquiridos a HarlanSprague-Dawley Inc. (Indianapolis, IN) (BN), y CharlesRiverCanada Inc. (St. Constant, PQ, Canada), (W y LW).Todas ellas en condiciones óptimas de estabulación establecidas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba y la normativa legal vigente (R.D. 1201/2005). Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico rellenas de serrín, manteniendo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, y con acceso a agua y pienso ad libitum. El proyecto se dividió en 2 fases: una inicial, en el que se desarrolló el modelo de trasplante heterotópico de tráquea; y un segundo periodo en el que se realizaron re-trasplantes traqueales en un tercer receptor de la misma cepa que el donante inicial (injerto singénico, esquema A-B-A), o de distinta cepa (injerto alogénico, A-B-B).

Primera fase: Desarrollo de un modelo de bronquiolitis obliterante en ratas mediante realización de trasplante heterotópico de tráquea

a) Obtención del injerto: Las ratas donantes se anestesiaron con pentobarbital sódico (80mg/Kg) por vía intraperitoneal. Posteriormente, se les rasuró la región torácica anterior, se realizó una esterno-laparotomía media ampliada hasta la región cervical; se expuso el mediastino anterior y se disecó el árbol traqueobron-

quial desde el cartílago tiroides hasta la bifurcación bronquial, extrayendo la tráquea desde el primer anillo hasta la carina. A continuación se colocó el injerto en una placa de Petri con suero fisiológico a 4ºC, y se lavó la luz con la misma solución, previo a su implante en el receptor.

b) Implante del injerto: Se anestesiaron las ratas receptoras con ketamina (50 mg/Kg) y atropina (80 mg/Kg) por vía intraperitoneal. Se les rasuró la región dorsal y se aplicó una solución descontaminante por vía tópica. Seguidamente, se realizó una incisión de aproximadamente 1-2 cm en la línea media cervical dorsal, paralelo a la columna vertebral y entre las 2 escápulas. Mediante disección roma, se creó un bolsillo subcutáneo, en el que se alojó el injerto del donante; se cerró la herida con puntos de seda y se colocó al animal en su caja, en la que se vigiló las horas subsiguientes para monitorizar la aparición de complicaciones en el despertar postanestésico. En ningún animal se dejó drenaje alguno tras la cirugía. Tampoco se administró medicación inmunosupresora en el postoperatorio.

c) Trasplantes singénicos: siguiendo la metodología detallada en los apartados a y b se realizaron trasplantes heterotópicos singénicos en las razas LW-LW, W-W y BN-BN. A los 15 días del implante, se sacrificaron las ratas receptoras tras anestesiarlas con pentobarbital sódico (80 mg/Kg) por vía intraperitoneal y exanguinarlas mediante sección de la aorta torácica, y se extrajeron y procesaron los injertos en formol para realizar después estudios histológicos.

d) Trasplantes alogénicos: igualmente, se realizaron trasplantes alogénicos en las mismas cepas, siguiendo el esquema LW-W, BN-LW y BN-W. Tras 15 días se sacrificaron los receptores del mismo modo que en el apartado c, y se procesaron las muestras para histología.

Segunda fase: Desarrollo de un modelo de retrasplante de tráquea singénico (A-B-A, A-C-A y B-C-B) y alogénico (A-B-B, A-C-C y B-C-C)

Utilizando ratas de las razas Lewis y Wistar, y usando el mismo procedimiento de cirugía experimental, se diseñó un modelo de retrasplante de tráquea en el cual, a los 15 días de trasplantar el injerto traqueal al primer receptor (siguiendo un esquema A-B), se explantó y se implantó a un tercer huésped de la misma raza que la primera donante (injerto singénico con el primer donante, esquema A-B-A), o de raza diferente (injerto alogénico, A-B-B). Se realizaron un total de 12 retrasplantes traqueales, 6 en cada esquema (A-B-A y A-B-B). Transcurridos 15 días del segundo trasplante, se sacrificaron los animales, se extrajeron los injertos tras disecar el bolsillo subcutáneo donde se alojaban, y se procesaron las muestras en tres fragmentos de igual tamaño para realizar estudios de PCR, histología e inmunohistoquímica. Con la finalidad de analizar la posible influencia del fondo genético en la aparición de rechazo del injerto, realizamos el mismo procedimiento en otras razas de ratas distintas. Así, se realizaron 12 retrasplantes en ratas Lewis y Brown-Norway siguiendo los esquemas A-C-A (singénico, n=6) y A-C-C (alogénico, n=6), y otros 12 retrasplantes en ratas Wistar y Brown Norway (6 singénicos B-C-B y otros 6 alogénicos B-C-C).

Estudio del quimerismo celular entre donante y receptor: Para estudiar el origen de las células epiteliales en los injertos traqueales, se realizaron trasplantes desde ratas hembras a machos y, desde estos últimos, a un tercer receptor hembra. Uno de los 3 fragmentos en los que se dividió cada injerto traqueal al sacrificar el tercer huésped en los esquemas A-B-A/A-B-B se envió en un frasco estéril con suero fisiológico para su estudio inmediato. Se determinó el quimerismo celular tras re-trasplante de tráquea mediante PCR, analizando la presencia de células con cromosoma Y en ratas receptoras hembras. Se utilizó el RNAs y mini Kit de Qiagen, homogeneizando las muestras en primer lugar en UltraTurrax. Se aisló el AND genómico de las muestras tras incubarlas con 1 mL de solución con proteinasa K (0,4 mg/ml proteinasaK- 10 mg/ml SDS en buffer Tris, ph 7,4; Sigma) a 45º durante 24 h. Posteriormente se purificó el ADN precipitado empleando el DNasytissue kit (Qiagen, Chatsworth, CA). Se usaron unos 300 ng de AND para estudiar la epitelización del injerto, con una mezcla de solución de PCR universal (AppliedBiosystems). Las condiciones fueron una desnaturalización inicial de 94ºC durante 10 min, seguida de 45 ciclos de desnaturalización a 94ºC durante 1 min, y anillamiento a 60ºC durante 1 min.

Estudio de la respuesta inflamatoria inmunomediada: Histología e inmunohistoquímica

a) Histología: uno de los fragmentos de cada injerto traqueal se fijó en formalina al 10%, se embebió en parafina y se tiñó con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. Se realizaron secciones de 5 uM, analizándose posteriormente por morfometría computerizada (Olympus DP-Soft) la aparición y la intensidad

del infiltrado inflamatorio, la obliteración de la luz y el estado del epitelio, de forma ciega por un patólogo experto. Se consideraron como traqueítis obliterativa aquellos injertos que presentaban alteraciones en el epitelio, infiltrado inflamatorio y obliteración de la luz traqueal por tejido fibroproliferativo.

b) Inmunohistoquímica: otro fragmento traqueal se conservó en solución TissueTek (Miles Inc, Elkhart, IN; USA) y se congeló en nitrógeno líquido a -80ºC hasta su procesamiento. Se realizaron secciones de 5uM en un criostato, se colocaron sobre portas pre-recubiertos de poli-L-lisina, y se dejaron secar a temperatura ambiente por 2 horas, fijándolas posteriormente con acetona durante 15 minutos. Tras bloquear con un agente bloqueante de proteínas (DAKO DiagnosticCanada Inc., Mississauga, ON, Canada), se incubaron las secciones con los anticuerpos primarios CD4, (policlonal anti-CD4 antibody; DAKO DiagnosticCanada, Inc.), CD20 (monoclonal anti-CD20 antibody clona L26; DAKO DiagnosticCanada Inc.), CD43 (monoclonal anti-CD 43 antibody clona DF-T1; DAKO DiagnosticCanada, Inc), y CD3 (policlonal anti-CD3, DAKO DiagnosticCanada, Inc) durante 30 minutos. El anticuerpo secundario y la conjugación con fosfatasa alcalina se realizaron con el Kit LSAB2 para muestras de rata de DAKO (DAKO DiagnosticCanada Inc.). Se potenció el color de la reacción añadiendo Fast Red substrateSystem(DAKO DiagnosticCanada Inc.) incluyendo un bloqueante de la actividad peroxidasa endógena (Levamisole; DAKO DiagnosticCanada Inc.). Finalmente, las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Los controles negativos se incubaron con PBS+BSA 0,1 % y el isotipo IgG específico de rata.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como medias ± DEM. El estudio estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5 para Windows (GraphPad Software, Inc.). Las comparaciones entre los trasplantes alogénicos y singénicos se realizaron mediante t-student o el test de Mann Whitney (no-paramétricos). Se consideró como significativo un valor P <0,05.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran el total de trasplantes heterotópicos de tráquea singénicos y alogénicos realizados en las tres razas de ratas usadas en nuestra serie. El tiempo medio por procedimiento no excedió en ningún caso los 45 minutos (datos no mostrados). No se observó ninguna complicación en el despertar postanestésico en ningún animal del estudio, como tampoco se produjo ninguna muerte precoz en el periodo de 15 días tras el trasplante. Finalizaron el protocolo experimental todos los animales incluidos inicialmente. Tal como se refleja en la tabla1, ningún injerto procedente de los 3 grupos de trasplantes singénicos desarrolló traqueítis obliterativa, siendo el estudio histológico prácticamente normal. Así, la tinción con hematoxilina-eosina puso de manifiesto una luz traqueal patente, con integridad del epitelio respiratorio y un mínimo infiltrado inflamatorio con predominio de células mononucleares. Por el contrario, en el 100% de los animales que recibieron un injerto alogénico se produjo un remodelado tisular por tejido fibroproliferativo, similar a la bronquiolitis obliterativa que se detecta en la vía aérea de pequeño calibre tras el trasplante pulmonar en humanos, aunque con diferente intensidad. La figura 1 muestra el análisis cuantitativo del grado de oclusión de la luz traqueal de los injertos, tanto singénicos como alogénicos, a los 14 días del trasplante. En los singénicos, el porcentaje de oclusión de la luz traqueal fue del 13%, comparado con un 60% en los alogénicos (P=0,03). En la figura 2 se muestra un ejemplo de traqueítis obliterativa como expresión de un rechazo crónico, en el cual la luz traqueal se encuentra ocupada por tejido de granulación fibrovascular laxo, con presencia de histiocitos.

Tabla 1: Trasplantes heterotópicos de tráquea singénicos y alogénicos realizados en los 3 tipos de ratas

Donante	Receptor	Desarrollo traqueítis obliterativa
LW	LW (n=14) s W (n=6) a	0/14 (0%) 6/6 (100%)
W	W (n=6) s LW (n=6) a	0/6 (0%) 6/6 (100%)
BN	BN (n=6) s LW (n=6) a	0/6 (0%) 6/6 (100%)

s= singénico; a= alogénico; LW= Lewis; W= Wistar; BN= Brown Norway.

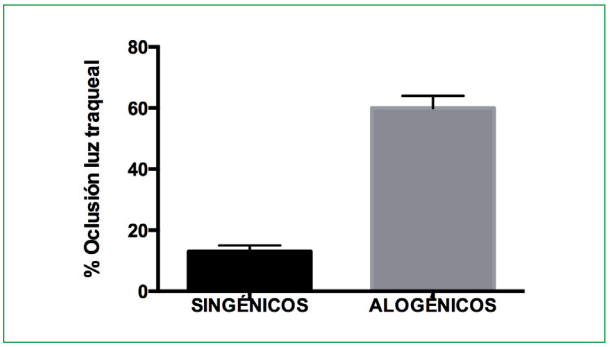

Figura 1. Análisis cuantitativo del grado de oclusión de la luz traqueal de los injertos, tanto singénicos como alogénicos, a los 14 días del trasplante.

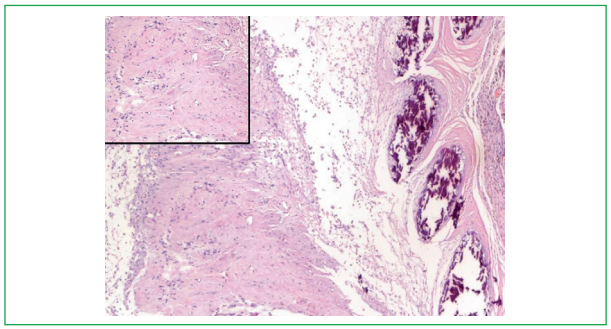

Figura 2. Hematoxilina-eosina de traqueítis obliterante. Aumento original 40x. Cuadrante superior izquierdo 100x. Luz traqueal ocupada por tejido de granulación fibrovascular laxo, con presencia de histiocitos. Ausencia de linfocitos y de reacción pericondral.

Se realizaron un total de 36 retrasplantes traqueales, 18 en el esquema de trasplante singénico (A-B-A, A-C-A y B-C-B) y otros 18 en el del alogénico (A-B-B, A-C-C y B-C-C). En la Figura 3 se muestran los resultados del estudio histológico de los retrasplantes realizados en las cepas Lewis y Wistar bajo los esquemas A-B-A y A-B-B. Así, en el esquema de trasplante singénico (A-B-A), la mayoría de animales desarrollaron un rechazo celular tras recibir el primer injerto (fase A-B, Figura 3A). Igualmente, en el esquema de trasplante alogénico (A-B-B), la mayoría de animales desarrolló un rechazo agudo al recibir el primer injerto (fase A-B). Sin embargo, al explantar el injerto traqueal e implantárselo a una tercera rata singénica con el primer donante (fase B-A del esquema A-B-A), sólo 1 animal de 6 desarrolló cambios histológicos compatibles con rechazo crónico, mientras que el hallazgo histológico predominante fue un discreto infiltrado inflamatorio no transmural, limitado sobre todo al epitelio traqueal. Por el contrario, cuando el injerto traqueal se implantó a un tercer huésped alogénico con el primer donante (fase B-B del esquema A-B-B), en 4 de 6 animales se objetivó un rechazo celular intenso que afectaba a la tráquea de forma transmural (Figura 3B). Estos mismos cambios histológicos se volvieron a evidenciar cuando el modelo de retrasplante se realizó introduciendo una tercera raza de rata distinta (Brown Norway) a la utilizada en un principio. Las figuras 4 y 5 muestran unas fotos representativas del rechazo del injerto inmunomediado, en ambos tipos de retrasplante (singénico y alogénico) realizado en ratas Wistar y Brown Norway bajo los esquemas B-C-B y B-C-C.

Figura 3A

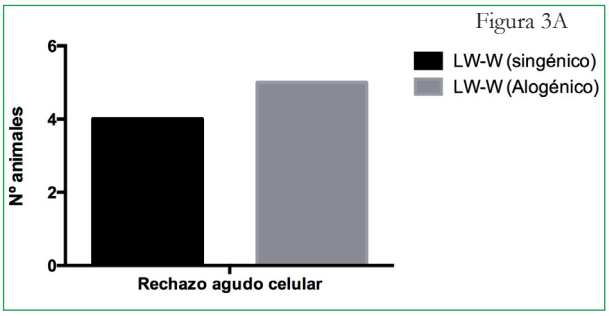

Figura 3B

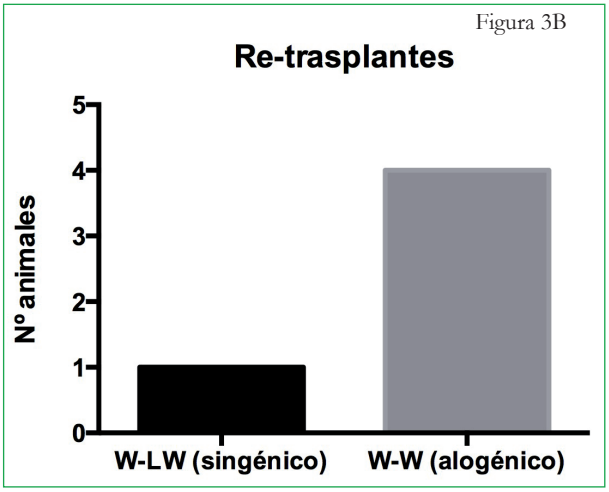

Figura 3. Composición de figuras que muestra los resultados del estudio histológico de los retrasplantes realizados en las cepas Lewis y Wistar bajo los esquemas A-B-A (trasplante singénico) y A-B-B (trasplante alogénico).

Figura 3A: Primera parte del esquema para ambos tipos de trasplante (A-B, cepas LW-W) que muestra que 4/6 injertos singénicos y 5/6 alogénicos desarrollan un rechazo agudo celular.

Figura 3B: Segunda parte del esquema para ambos tipos de trasplante (B-A, singénico; y B-B, alogénico) en la que se evidencia que sólo 1/6 injertos singénicos desarrollan rechazo crónico, comparado con 4/6 injertos alogénicos.

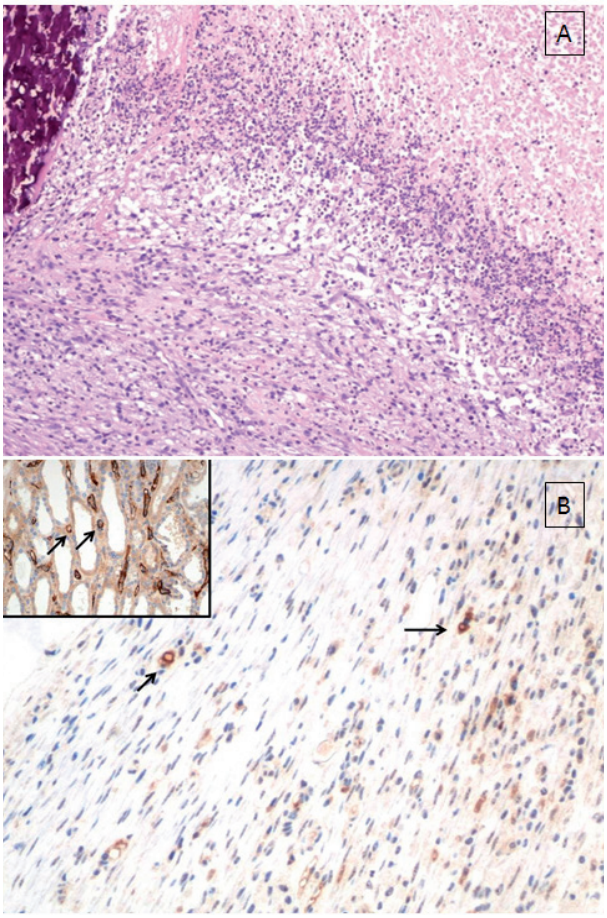

Figura 4. Composición de fotos pertenecientes a cortes histológicos de injerto traqueal obtenido del esquema de retrasplante singénico y alogénico en ratas Wistar y Brown Norway.

a) Tinción de hematoxilina-eosina. Necrosis difusa de la mucosa con intensa reacción inflamatoria aguda. Aumento original a 100x.

b) Inmunohistoquímica para CD4: Marcaje positivo para CD4 en infiltrado inflamatorio y vasos capilares (tinción lineal continua). Aumento original 200X. Cuadrante superior izquierdo, control positivo.

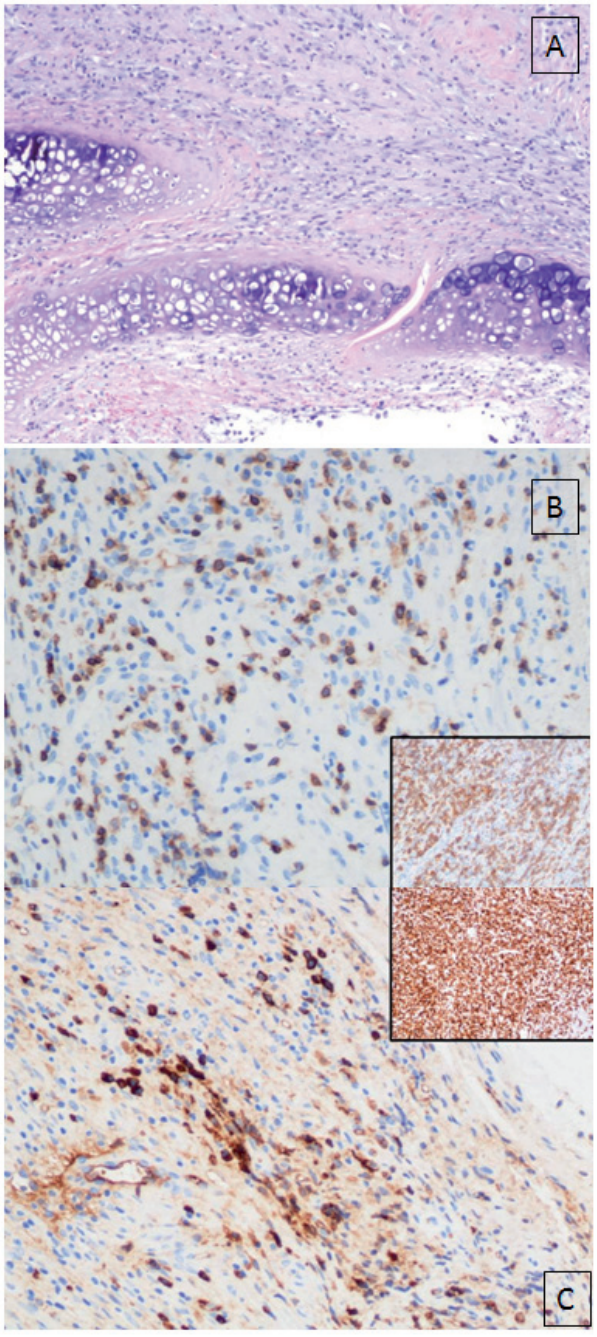

Figura 5. Composición de fotos pertenecientes a cortes histológicos de injerto traqueal obtenido del esquema de retrasplante singénico y alogénico en ratas Wistar y Brown Norway.

a) Rechazo agudo celular evolucionado: inflamación crónica transmural (mucosa, submucosa y tejido peritraqueal). Pérdida total de epitelio. Tinción de hematoxilina-eosina, aumento original 100X.

b) Rechazo agudo celular: infiltrado inflamatorio CD3+. Aumento original 200X. Cuadrante inferior derecho, control positivo.

c) Rechazo agudo celular: infiltrado inflamatorio CD43+ preferentemente en tejido peritraqueal. Aumento original 200X. Cuadrante superior derecho, control positivo.

No obstante, independientemente del modelo de retrasplante empleado (singénico o alogénico) y la raza de rata, en el tercer huésped se produjo una reacción inflamatoria leve-moderada de tipo linfocitario, compatible con un proceso de rechazo celular MHC incompatible. Para determinar si la causa posible de este fenómeno era la reepitelización del injerto a partir de células del primer receptor, se repitió el esquema de retrasplante de tráquea pero en este caso, utilizando como primer huésped una rata macho, siendo la primera donante y la segunda huésped, hembras (esquema ♀-♂-♀). Para ello se realizaron 12 retrasplantes traqueales en ratas de la raza LW, siguiendo el esquema ♀-♂-♀, y se determinó la presencia de células ♂ en el tejido explantado de ratas ♀, realizando en todos ellos un ensayo de reacción en cadena de polimerasa (PCR). En la figura 6 mostramos cómo 4 de 6 injertos traqueales se re-epitelizan con epitelio procedente del receptor, ya que se detectan cromosomas XY (caracterizados por la presencia de 2 bandas comparado con los cromosomas XX, que se definen por la presencia de una única banda) en las tráqueas de las ratas ♀.

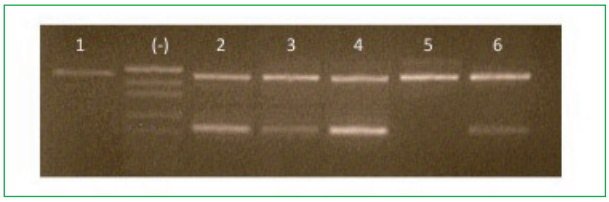

Figura 6. Quimerismo donante-receptor en epitelio traqueal en retrasplante heterotópico en ratas LW.
Ejemplo de PCR de retrasplante ♀-♂-♀ que muestra la presencia de cromosoma Y en el epitelio traqueal implantado en el tercer huésped (♀) en los injertos 2, 3, 4 y 6, de manera que se produciría un quimerismo donante receptor, que sería el responsable en último término del desarrollo de BO.
De izquierda a derecha: (1) muestra, (2) marcador de DNA, y resto de muestras. La presencia de 1 banda es característica del cromosoma XX, mientras que la presencia de 2 bandas es característica del XY.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Desde que se publicó el modelo de trasplante heterotópico de tráquea en roedores en 1993[10], muchos investigadores lo han utilizado para estudiar la patogénesis de la BO tras el trasplante pulmonar clínico. Al tratarse de un modelo altamente reproducible, sencillo de realizar y que no requiere una curva de aprendizaje prolongada, permite determinar de forma cuantitativa el desarrollo de fibrosis e investigar de forma efectiva los mecanismos básicos implicados en el remodelado tisular fibroproliferativo.

En este trabajo demostramos la utilidad del trasplante heterotópico de tráquea en ratas para el estudio de la BO. Ninguno de los animales de experimentación utilizados desarrolló complicaciones relacionadas con el mismo, así como tampoco hubo ninguna muerte dentro de los 15 días post-trasplante. Esto refuerza los resultados publicados por la comunidad científica con este tipo de modelo, en el que con poco tiempo de entrenamiento se puede realizar la técnica sin causar morbilidad significativa en los animales. Además, tiene el valor añadido de que se obtienen resultados en un periodo muy corto de tiempo, lo que permite tener resultados inmediatos, comparado con otros modelos animales cuyo periodo de latencia es mucho mayor.

En concordancia con los resultados ya publicados previamente, en el trasplante singénico no detectamos rechazo del injerto en ninguno de los animales. Sin embargo, en los trasplantes alogénicos se produjo rechazo agudo de tipo celular o humoral, y obliteración de la luz traqueal concordante con una traqueítis obliterativa. Este proceso es muy similar al que sucede en la vía aérea de pequeño calibre tras el trasplante de pulmón clínico. La secuencia temporal que tiene lugar en el epitelio del injerto ya fue descrita por el grupo de St. Louis[17], y consiste en la aparición en primer lugar de una infiltración linfocitaria y apoptosis del epitelio regenerado y, posteriormente, ocurre una migración y proliferación de fibroblastos/miofibroblastos que da lugar a una producción excesiva de matriz extracelular y, finalmente, una obliteración completa de la luz de la vía aérea.

En la última década se han generado además una gran cantidad de ratones transgénicos para diversos componentes clave en fenómenos moleculares, celulares y funcionales básicos, siendo de gran valor para investigar en detalle la respuesta inmune y los mecanismos biológicos que subyacen a la fibrosis obliterante de la vía aérea.

En segundo lugar, el retrasplante de tráquea en un diseño experimental A-B-B o A-B-A, confirmó una rápida reacción inmunológica, tipificada como una lesión inflamatoria compatible con un proceso de BO, en aquellos animales que habían sufrido rechazo por un trasplante alogénico anterior (Figuras 3, 4 y 5). A pesar de que en los animales del grupo A-B-A el retrasplante pulmonar se acompañó de una rápida respuesta inflamatoria, nos llamó la atención el hecho de que, independientemente del modelo A-B-A o A-B-B, junto al desarrollo de bronquiolitis obliterante, en ambos se objetivaba una leve o moderada respuesta linfocitaria que era compatible con un proceso de rechazo celular MHC incompatible. Esto, parecía razonable en el modelo A-B-B, en el que el último receptor recibía una tráquea A, pero era más difícil de interpretar en el modelo A-B-A, ya que en este último

caso, la tráquea de una rata A, volvía a ser re-injertada en un animal singénico (A).

Para explicar estos resultados planteamos diferentes hipótesis:

1.- Al tomar la tráquea del huésped intermedio (B) en el re-trasplante A-B-A, arrastrábamos tejido peritraqueal y/o células circulantes del animal B que se quedarían adheridas a la tráquea. Estas células podrían ser reconocidas como MHC incompatibles por el último huésped (A). Esta hipótesis parece poco probable, ya que los animales del modelo (A-B-B), en el que el segundo y el tercer huésped eran isogénicos, también presentaron una activación inmunológica, aunque de menor intensidad que la observada en el modelo (A-B-A).

2.- Podría ocurrir que estuviésemos observando alguna reactividad inmune asociada al genotipo de los animales utilizados, por lo que utilizamos una tercera raza de ratas C. Tanto en el modelo A-C-A como en B-C-B se observó infiltrado inflamatorio además de fibrosis obliterante, por lo que parece que esta segunda hipótesis tampoco sería correcta.

3.- Células del huésped se integrarían en la tráquea en el segundo trasplante. Este hecho ha sido constatado previamente en trabajos que demuestran que en la interacción entre el huésped y el órgano injertado, células del huésped se integran en el nuevo órgano. Ya en 1965, Medawar[18] postuló que el endotelio vascular se reemplazaba por células endoteliales procedentes del receptor, y que esto podría proporcionar algún grado de tolerancia al injerto. En esta misma línea, trabajos recientes realizados en riñón, corazón, hígado y aorta han demostrado que estos órganos sufren una re-endotelización tras el trasplante[19, 20, 21, 22].

Para testar esta hipótesis realizamos el modelo de retrasplante (A-B-A) entre ratas Lewis de diferente sexo (♀-♂-♀) para analizar mediante PCR si células conteniendo el cromosoma "Y" se encontraban en la tráquea de la última rata receptora. En estos estudios confirmamos que células ♂ se detectaban en la tráquea de la rata ♀, independientemente de la combinación de genotipos que se usaron, lo que sugiere que podría producirse un quimerismo entre células de donante y receptor.

En este sentido cabe decir que este modelo se ha utilizado para determinar el efecto del recubrimiento epitelial respiratorio en la prevención de la aparición de fibrosis pulmonar, así como en la investigación de la regeneración de dicho epitelio. Genden y cols.[23], Ikonen y cols.[24] demostraron que el aloinjerto se reepiteliza con células procedentes del receptor, y esto se detecta ya a los 14 días del trasplante. Además, en los primeros 14-21 días tras el trasplante, se detectan células en el epitelio tanto del donante como del receptor, pero a partir de los 48 días, sólo se detectan células del receptor y no del donante. Por el contrario, investigadores de la Universidad de Virginia han postulado que la regeneración del epitelio traqueal tendría lugar a partir de células del donante. Empleando el modelo de trasplante heterotópico de tráquea en ratones, encontraron que, al 3º día post-trasplante, se produce (tanto en los isoinjertos como en los aloinjertos), una pérdida completa del epitelio traqueal, secundaria al daño de isquemia-reperfusión; seguidamente, entre el 3º y 7º días post-trasplante, el epitelio se regenera; y, finalmente, se produce una nueva pérdida del epitelio traqueal entre los días 12º y 21º, pero esta fase solo tiene lugar en los trasplantes alogénicos. Además, la regeneración epitelial en esta segunda fase se produce a partir de células basales del donante, puesto que utilizando tráqueas de ratones GFP+ en ratones Balb/c, encontraron que las células epiteliales regeneradas eran GFP+[25].

Caben destacar algunas limitaciones del modelo experimental empleado en nuestro estudio. En primer lugar, una de las limitaciones más importantes del estudio de la BO en modelos animales radica en la diferencia en la respuesta inmune entre especies animales y humanos. En humanos, aún en presencia de unos niveles adecuados de inmunosupresión post-trasplante, es inevitable la aparición de BO tras varios meses-años. Por el contrario, en el modelo animal de trasplante heterotópico de tráquea, la BO aparece ya tras 4 semanas post-trasplante en ausencia de inmunosupresión[26]. En segundo lugar, se trasplantan vías aéreas de gran calibre comparado con las pequeñas vías aéreas del interior del pulmón. Y, finalmente, el entorno en el que se coloca el injerto (peritoneo, tejido subcutáneo) es diferente al empleado en el trasplante clínico y además, carece de vascularización. Es difícil, en este sentido, determinar con exactitud el grado de activación del sistema inmune a nivel local y sistémico tras el trasplante, puesto que probablemente se encuentre alterada la quimiotaxis y circulación de células inflamatorias desde el torrente sanguíneo hasta el injerto.

Por tanto, concluimos que el modelo de trasplante heterotópico de tráquea es sencillo de realizar y proporciona una herramienta de gran valor para investigar la bronquiolitis obliterante. En el modelo de retrasplante, junto a la BO se produce una leve-moderada respuesta linfocitaria compatible con un pro-

ceso de rechazo celular MHC incompatible. Células del huésped se integrarían en la tráquea en el segundo trasplante, originando el cuadro de rechazo en último término. Si bien con los resultados obtenidos en nuestro estudio no se puede extrapolar que este quimerismo esté involucrado en el desarrollo de rechazo en el retrasplante de tráquea, sí explicaría que se observe rechazo en el modelo de retrasplante singénico (A-B-B) y, junto con los datos previamente obtenidos en el trasplante de corazón o hígado, abren nuevas perspectivas de estudio para analizar si este quimerismo también se observa en humanos, o si las células que reepitelizan el órgano se derivan de subpoblaciones de células diferenciadas no terminales presentes en el propio órgano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, et al. Lung homotransplantation in man. JAMA 1963; 186:1065-74.
2. Trulock EP, Christie JD, Edwards LB, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Tansplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report 2007. J Heart Lung Transplant 2007; 26(8):782-95.
3. Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, et al. International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update–a consensus report from the pulmonary scientific council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. J Heart Lung Transplant 2006; 25:745–55.
4. Cooper JD, Billingham M, Egan T, et al. A working formulation for the standardization of nomenclature for clinical staging of chronic dysfunction in lung allografts: International Society for Heart and Lung Transplantation. J Heart Lung Transplant 1993; 12:713–716.
5. Estenne M, Maurer JR, Boehler A, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. J Heart Lung Transplant 2002; 21:297–310.
6. Sundaresan S, Trulock EP, Mohanakumar T, et al. Prevalence and outcome of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. Ann Thorac Surg 1995; 60: 1341-6.
7. Novick RJ, Schäfers HJ, Stitt L, et al. Seventy-two pulmonary retransplantations for obliterative bronchiolitis: predictors of survival. Ann Thorac Surg 1995, 60:111-6.
8. Okazaki M, Krupnick AS, Kornfeld CG, et al. A mouse model of orthotopic vascularized aerated lung transplantation. Am J Transplant 2007; 7:1672–1679.
9. Huang X, Reichenspurner H, Shorthouse R, et al. Heterotopic tracheal allograft transplantation: a new model to study the cellular and molecular events causing obliterative airway disease (OAD) in rats. J Heart Lung Transplant 1995; 14: S49.
10. Hertz MI, Jessurun J, King MB, et al. Reproduction of the obliterative bronchiolitis lesion after heterotopic transplantation of mouse airways. Am J Pathol 1993; 142:1945–1951.
11. Tullius SG, Tilney NL. Both alloantigen dependent and independent factors influence chronic allograft rejection. Transplantation 1995; 59: 313.
12. Richards DM, Dalheimer SL, Hertz MI, et al. Trachea allograft class I molecules directly activate and retain CD8+ T cells that cause obliterative airways disease. J Immunol 2003; 171: 6919–6928.
13. Mauck KA, Hosenpund JD. The bronchial epithelium: a potential allogenic target for chronic rejection after lung transplantation. J Heart Lung Transplant 1996; 15: 709.
14. Fernández FG, Jaramillo A, Chen C, et al. Airway epithelium is the primary target of allograft rejection in murine obliterative airway disease. Am J Transplant 2004; 4 (3):319-25.
15. Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, et al. Chimerism of the transplanted heart. N Engl J Med 2002; 346: 5–15.
16. Sedmak DD, Sharma HM, Czajak CM, et al. Recipient endothelialization of renal allografts: an immunohistochemical study utilizing blood group antigens. Transplantation 1988; 46:907-910.
17. Higuchi T, Jaramillo A, Kahleem Z, et al. Different kinetics of obliterative airway disease development in heterotopic murine tracheal allografts induced by CD4+ and CD8+ T cells. Transplantation 2002; 74:646–651.
18. Medawar PB. Transplantation of tissues and organs: introduction. Br Med Bull 1965;21:97-99.
19. Williams GM, Alvarez CA. Host repopulation of the endothelium in allografts of kidneys and aorta. Surg Forum 1969; 20:293-294.
20. O'Connell JB, Renlund DG, Bristow MR, et al. Detection of allograft endothelial cells of recipient origin following ABO-compatible, nonidentical cardiac transplantation. Transplantation 1991; 51:438-442.
21. Sinclair RA. Origin of endothelium in human renal allografts. Br Med J 1972; 4:15-16.
22. Fung JJ. Tolerance and chimerism in liver transplantation. Transplant Proc 1997; 29 (7):2817-8.
23. Genden EM, Iskander AJ, Bromberg JS, et al. Orthotopic tracheal allografts undergo reepithelialization with recipient derived epithelium. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2003; 129: 118–123.
24. Ikonen TS, Brazelton TR, Berry GJ, et al. Epithelial regrowth is associated with inhibition of obliterative airway disease in orthotopic tracheal allografts in non-immunosuppressed rats. Transplantation 2000; 70:857–863.
25. Zhao Y, Steidle JF, Upchurch GR, et al. Prevention of the second stage of epithelial loss is a potential novel treatment for bronchiolitis obliterans. J Thorac Cardiovasc Surg 2013; 145:940-7.
26. Romaniuk A, Prop J, Petersen AH, et al. Expression of class II major histocompatibility complex antigens by bronchial epithelium in rat lung allografts. Transplantation 1987; 44: 209–214.